

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Urša KOŠIR

**KVANTIFIKACIJA ČREVESNIH BAKTERIJSKIH
SKUPIN IZ BIOPSIJSKIH VZORCEV PACIENTOV S
KOLOREKTALNIM RAKOM Z VERIŽNO
REAKCIJO S POLIMERAZO**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Urša KOŠIR

**KVANTIFIKACIJA ČREVESNIH BAKTERIJSKIH SKUPIN IZ
BIOPSIJSKIH VZORCEV PACIENTOV S KOLOREKTALNIM
RAKOM Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**QUANTIFICATION OF INTESTINAL BACTERIAL GROUPS FROM
BIOPSY SAMPLES OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER
BY POLYMERASE CHAIN REACTION**

M. Sc. THESIS

Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani v sodelovanju s Kliničnim oddelkom za gastroenterologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Gorazda Avguština, za somentorja dr. Luka Lipoglavška in za recenzenta dr. Matjaža Ocepka, višji znan. sod.

Mentor: prof. dr. Gorazd Avguštin

Somentor: dr. Luka Lipoglavšek

Recenzent: dr. Matjaž Ocepek, višji znan. sod.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Alojz IHAN

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Gorazd AVGUŠTIN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: dr. Luka LIPOGLAVŠEK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: dr. Matjaž OCEPEK, višji znan. sod.

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja do javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem speltu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Urša Košir

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
DK UDK 579.61:616.34-006:577.2.083(043)=163.6
KG kolorektalni rak/črevesna mikrobiota/mikrobne združbe/filogenetske skupine/16S rRNK/molekularne tehnike/qPCR
AV KOŠIR, Urša, dipl. mikrobiol. (UN)
SA AVGUŠTIN, Gorazd (mentor)/ LIPOGLAVŠEK, Luka (somentor)/ OCEPEK, Matjaž (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI 2015
IN KVANTIFIKACIJA ČREVESNIH BAKTERIJSKIH SKUPIN IZ BIOPSIJSKIH VZORCEV PACIENTOV S KOLOREKTALNIM RAKOM Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP X, 66 str., 13 pregl., 11 sl., 9 pril., 128 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Kolorektalni rak sodi med najpogostejša rakava obolenja na svetu. Neponreden vzrok za nastanek bolezni ni znan. Sodeč po zadnjih odkritjih naj bi imela pomembno vlogo pri nastanku in razvoju bolezni tudi črevesna mikrobiota, saj je pri pacientih s kolorektalnim rakom moč opaziti spremembe v njeni strukturi in vrstni pestrosti. V nalogi smo ugotavljali, ali so relativni deleži treh dominantnih bakterijskih filogenetskih skupin črevesne mikrobiote, tj. *Bacteroides-Prevotella*, *Clostridium leptum* (rRNK gruča IV), *Clostridium coccoides* (rRNK gruča XIVa) in pripadnikov družine *Enterobacteriaceae*, drugačni v vzorcih pacientov s kolorektalnim rakom. Iz biopsijskih vzorcev 16 pacientov smo osamili skupno mikrobijsko DNK ter z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR) pomnožili izbrane informativne odseke ribosomskih genov za 16S rRNK. S specifičnimi pari začetnih oligonukleotidov smo v vzorcih ugotavljali delež posameznih bakterijskih skupin glede na ocenjeno skupno število bakterij. Z analizo vzorcev pacientov smo pokazali, da je črevesna mikrobiota vzdolž prebavne cevi dokaj stabilna. Zaradi individualnih razlik med pacienti statistično značilnih sprememb v razliki deležev preučevanih skupin med tumorsko spremenjenimi in nespremenjenim vzorci nismo pokazali, čeprav smo le-te lahko opazili.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 579.61:616.34-006:577.2.083(043)=163.6
CX colorectal cancer/gut microbiota/microbial communities/phylogenetic groups/16S rRNA/molecular techniques/qPCR
AU KOŠIR, Urša
AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor)/ LIPOGLAVŠEK, Luka (co-supervisor)/ OCEPEK, Matjaž (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2015
TI QUANTIFICATION OF INTESTINAL BACTERIAL GROUPS FROM BIOPSY SAMPLES OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER BY POLYMERASE CHAIN REACTION
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO X, 66 p., 13 tab., 11 fig., 9 ann., 128 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Colorectal cancer (CRC) is one of the most commonly diagnosed malignancies worldwide. The exact cause of colorectal cancer is still unknown, but according to recent discoveries gut microbiota may also play an important role in development of the disease. Several recent studies have observed a significant shift in the composition of the gut microbiota in patients with CRC. To determine whether the relative share of the three dominant phylogenetic groups of gut microbiota i.e. the *Bacteroides-Prevotella*, *Clostridium leptum* (rRNA cluster IV), *Clostridium coccoides* (rRNA cluster XIVa) and of the family *Enterobacteriaceae* are different in samples from patients with CRC we investigated biopsy samples from 16 patients. Total microbial DNA was extracted from mucosal biopsies and qPCR amplification of selected regions of the 16S rRNA genes was used to determine the relative amounts of targeted bacterial groups. We have shown that gut microbiota is relatively stable along the gastrointestinal tract. Changes in abundance of examined groups when cancerous tissue was compared with normal tissue were observed, but the differences were not statistically significant due to inter-individual variability of the colon microbiota composition among patients.

KAZALO VSEBINE

| | |
|---|-------------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA..... | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION..... | IV |
| KAZALO VSEBINE..... | V |
| KAZALO PREGLEDNIC..... | VII |
| KAZALO SLIK..... | VIII |
| KAZALO PRILOG | IX |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI..... | X |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 NAMEN MAGISTRSKEGA DELA | 2 |
| 1.2 DELOVNE HIPOTEZE..... | 2 |
| 2 PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1 KOLOREKTALNI RAK..... | 3 |
| 2.2 NORMALNA ČREVESNA MIKROBIOTA | 4 |
| 2.3 VLOGA ČREVESNE MIKROBIOTE PRI NASTANKU KOLOREKTALNEGA RAKA | 7 |
| 2.3.1 Mikroorganizmi, ki so domnevno vpleteni v nastanek kolorektalnega raka | 7 |
| 2.3.1.1 <i>Streptococcus bovis</i> | 7 |
| 2.3.1.2 <i>Bacteroides fragilis</i> | 7 |
| 2.3.1.3 <i>Escherichia coli</i> | 8 |
| 2.4 HIPOTEZE IN MODELI NASTANKA KOLOREKTALNEGA RAKA | 9 |
| 2.5 DISBIOZA IN RAZVOJ KOLOREKTALNEGA RAKA | 10 |
| 2.6 METODE OPISOVANJA ČREVESNE MIKROBIOTE | 15 |
| 2.7 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU | 17 |
| 2.7.1 Absolutna kvantifikacija z umeritveno krivuljo | 17 |
| 2.7.2 Fluorescentni reporterji..... | 18 |
| 2.7.3 Interpretacija rezultatov PCR v realnem času | 18 |
| 3 MATERIALI IN METODE | 20 |
| 3.1 MATERIALI..... | 20 |
| 3.1.1 Vzorci..... | 20 |
| 3.1.2 Bakterijski sevi | 20 |
| 3.1.3 Gojišča | 20 |
| 3.1.4 Raztopine..... | 22 |
| 3.1.5 Pari začetnih oligonukleotidov | 23 |
| 3.2 METODE..... | 24 |
| 3.2.1 Odvzem in priprava vzorcev | 24 |

| | | |
|----------------|---|-----------|
| 3.2.2 | Priprava bakterijskih kultur | 24 |
| 3.2.3 | Direktno štetje celic pod mikroskopom..... | 24 |
| 3.2.4 | Osamitev skupne mikrobne DNK | 25 |
| 3.2.5 | Priprava evkariontskih celic in osamitev DNK iz celic Caco-2..... | 26 |
| 3.2.6 | Verižna reakcija s polimerazo (PCR)..... | 26 |
| 3.2.7 | Agarozna gelska elektroforeza | 27 |
| 3.2.8 | Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR) | 27 |
| 3.2.9 | Obdelava rezultatov qPCR reakcij..... | 28 |
| 3.2.10 | Statistična analiza rezultatov | 30 |
| 4 | REZULTATI | 31 |
| 4.1 | ISKANJE NAJPRIMERNEJŠEGA PARA UNIVERZALNIH BAKTERIJSKIH ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV ZA UGOTAVLJANJE SKUPNEGA ŠTEVILA BAKTERIJ | 31 |
| 4.2 | PRIMERJAVA DVEH qPCR SISTEMOV ZA UGOTAVLJANJE SKUPNEGA ŠTEVILA BAKTERIJ V VZORCIH ZZNANO KOLIČINO BAKTERIJSKE IN EVKARIOTSKE DNK | 33 |
| 4.3 | ANALIZA VZORCEV PACIENTOV | 38 |
| 4.3.1 | Relativni deleži preučevanih bakterijskih skupin v biopsijskih vzorcih nespremenjene sluznice, odvzetih vzdolž debelega črevesa | 39 |
| 4.3.2 | Struktura mikrobne združbe v biopsijskih vzorcih tumorsko spremenjene in okoliške zdrave sluznice debelega črevesa ter vzorcev črevesnih vsebin pri pacientih s kolorektalnim rakom | 40 |
| 4.3.3 | Stopnja spremembe deleža bakterijskih skupin v vzorcih tumorsko spremenjene sluznice in v vzorcih črevesnih vsebin v primerjavi z nespremenjeno sluznico pri pacientih s kolorektalnim rakom | 41 |
| 4.3.3.1 | Stopnja spremembe v deležu bakterij skupine <i>Bacteroides-Prevotella</i> | 42 |
| 4.3.3.2 | Stopnja spremembe v deležu bakterij skupine <i>C. leptum</i> (rRNK gruča IV) | 43 |
| 4.3.3.3 | Stopnja spremembe v deležu bakterij skupine <i>C. cocoides</i> (rRNK gruča XIVa) | 44 |
| 4.3.3.4 | Stopnja spremembe v deležu bakterij družine <i>Enterobacteriaceae</i> | 45 |
| 5 | RAZPRAVA..... | 46 |
| 6 | SKLEPI | 53 |
| 7 | POVZETEK..... | 54 |
| 8 | VIRI | 56 |
| | ZAHVALA | |
| | PRILOGE | |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|---|----|
| Preglednica 1: Študije, ki ugotavljajo povezavo med črevesno mikrobioto in nastankom kolorektalnega raka z opisom uporabljenih vzorcev in metod ter namenom študije. | 10 |
| Preglednica 2: Molekularne metode, ki se uporabljajo za opis sestave črevesne mikrobiote (prirejeno po Fraher in sod., 2012)..... | 16 |
| Preglednica 3: Bakterijske skupine, bakterijski sevi in uporabljeni gojišča ter atmosfera | 20 |
| Preglednica 4: Sestava gojišča BHI (Holdeman in sod., 1977)..... | 20 |
| Preglednica 5: Sestava modificiranega gojišča M2 (Hobson, 1969)..... | 21 |
| Preglednica 6: Sestava gojišča RCM..... | 21 |
| Preglednica 7: Sestava gojišča PYX..... | 22 |
| Preglednica 8: Sestava uporabljenih raztopin..... | 22 |
| Preglednica 9: Uporabljeni pari začetnih oligonukleotidov | 23 |
| Preglednica 10: PCR programi za tarčne bakterijske filogenetske skupine in za dva para univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov..... | 27 |
| Preglednica 11: Ocenjeno število kopij tarčne bakterijske in evkariontske DNK | 33 |
| Preglednica 12: Teoretično število kopij tarčne DNK, ki smo jih dodajali v reakcijske mešanice | 34 |
| Preglednica 13: Rezultati qPCR reakcij pomnoževanja bakterijske DNK, evkariontske DNK in mešanic obeh v potencialnih razmerjih 1:1, 1:5, 1:10 in 1:100 s paroma univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov Nadkarni F+R in EUB 338F+518R | 34 |

KAZALO SLIK

| | | |
|-----------|---|----|
| Slika 1: | Model kancerogeneze kolorektalnega raka, kot sta ga predlagala Fearon in Volgenstein, 1990 (Ravnik Glavač, 2000)..... | 4 |
| Slika 2: | Shema opravljenih PCR reakcij v postopku iskanja najprimernejšega para univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov (ZO) | 31 |
| Slika 3: | Agarozna gelska elektroforeza PCR produktov, nastalih pri pomnoževanju odsekov gena za 16S rRNA s paroma začetnih oligonukleotidov EUB 338F+518R in Nadkarni F+R. | 32 |
| Slika 4: | Redčitev 1: Grafični prikaz rezultatov qPCR reakcij s paroma univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov Nadkarni F+R (modri stolpci) in EUB 338F+518R (oranžni stolpci).. | 35 |
| Slika 5: | Redčitev 2: Grafični prikaz rezultatov qPCR reakcij s paroma univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov Nadkarni F+R (modri stolpci) in EUB 338F+518R (oranžni stolpci).. | 36 |
| Slika 6: | Grafični prikaz deležev bakterijskih skupin (preračunanih na 100 %) pri štirih vzorcih pacienta A, odvzetih na različnih mestih debelega črevesa.. | 39 |
| Slika 7: | Grafični prikaz strukture mikrobne združbe 11 pacientov s kolorektalnim rakom. Struktura mikrobne združbe je prikazana kot deleži štirih preučevanih bakterijskih skupin (preračunanih na 100 %). | 40 |
| Slika 8: | Grafični prikaz stopnje spremembe deleža bakterij skupine <i>Bacteroides-Prevotella</i> v vzorcih nespremenjene (sivi stolpci) in tumorsko spremenjene (rdeči stolpci) sluznice debelega črevesa pacientov. | 42 |
| Slika 9: | Grafični prikaz stopnje spremembe deleža bakterij skupine <i>C. leptum</i> (rRNA gruča IV) v vzorcih nespremenjene (sivi stolpci) in tumorsko spremenjene (rdeči stolpci) sluznice debelega črevesa pacientov..... | 43 |
| Slika 10: | Grafični prikaz stopnje spremembe deleža bakterij skupine <i>C. coccoides</i> (rRNA gruča XIVa) v vzorcih nespremenjene (sivi stolpci) in tumorsko spremenjene (rdeči stolpci) sluznice debelega črevesa pacientov. | 44 |
| Slika 11: | Grafični prikaz stopnje spremembe števila bakterij družine <i>Enterobacteriaceae</i> v vzorcih nespremenjene (sivi stolpci) in tumorsko spremenjene (rdeči stolpci) sluznice debelega črevesa pacientov..... | 45 |

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Mesto odvzema vzorca, opis vzorca in diagnoza pri posameznem pacientu
- Priloga B: Rastne krivulje bakterijskih sevov čistih kultur *B. thetaiotaomicro*, *C. leptum*,
C. clostridioforme in *E. coli*
- Priloga C: Čas gojenja, optična gostota (645 nm) in število preštetih celic pod
mikroskopom v ml suspenzije
- Priloga D: Parametri qPCR reakcij za ugotavljanje števila bakterij filogenetskih skupin in
za ugotavljanje skupnega števila bakterij v vzorcih.
- Priloga E: Izračun relativnih deležev preučevanih bakterijskih skupin pri pacientih s
kolorektalnim rakom
- Priloga F: Izračuni stopnje sprememb med tumorsko spremenjenimi vzorci in vzorci
črevesnih vsebin glede na vzorce nespremenjene sluznice
- Priloga G: Rezultati SPSS testov
- Priloga H: Količina DNK, ki smo jo dodajali v reakcijske mešanice podana v številu kopij
tarčne DNK/ μ l in masi v ng/ μ l
- Priloga I: Rezultati qPCR reakcij pomnoževanja evkariotske DNK, bakterijske DNK in
mešanice evkariotske in bakterijske DNK z metodo qPCR

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|----------------|---|
| Bp | vzorec tumorsko nespremenjene sluznice |
| bp | bazni par, enota dolžine zaporedja nukleinske kisline |
| CRC | kolorektalni rak (<i>angl. colorectal cancer</i>) |
| C _T | mejna vrednost (<i>angl. threshold cycle</i>) |
| CTAB | Heksadeciltrimetiamonijev bromid |
| Da | Dalton, enota za maso, s katero izražamo atomske in molekulske mase |
| DMEM | Eaglovo gojišče po Dulbeccu (<i>angl. Dulbecco's modified Eagle's medium</i>) |
| DNK | deoksiribonukleinska kislina (<i>angl. deoxyribonucleic acid; DNA</i>) |
| dNTP | 2'-deoksinukleozid trifosfat |
| dsDNA | dvojerižna molekula DNA |
| EDTA | Etilendiaminetetraocetna kislina (<i>angl. ethylenediaminetetraacetic acid</i>) |
| ETBF | enterotoksigeni sevi <i>Bacteroides fragilis</i> |
| EtBr | Etidijev bromid |
| FBS | serum telečjega zarodka (<i>angl. fetal bovine serum</i>) |
| GC | bazi gvanin in citozin |
| HMP | projekt človeškega mikrobioma (<i>angl. Human Microbiome Project</i>) |
| LB | nalagalni pufer (<i>angl. loading buffer</i>) |
| Mb | mega bazni par, kar znaša milijon baznih parov |
| Ng | nano gram |
| NTC | vzorec brez tarče (<i>angl. no template control</i>) |
| OTU | operacijska taksonomska enota (<i>angl. operational taxonomic unit</i>) |
| PCR | verižna reakcija s polimerazo (<i>angl. polymerase chain reaction</i>) |
| qPCR | kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času |
| RNK | ribonukleinska kislina (<i>angl. ribonucleic acid; RNA</i>) |
| rRNK | ribosomska RNK (<i>angl. ribosomal RNA, rRNA</i>) |
| TE | Tris-EDTA |
| Tm | temperatura taljenja (<i>angl. melting temperature</i>) |
| TS | vzorec tumorsko spremenjene sluznice |
| UKC | Univerzitetni klinični center v Ljubljani |

1 UVOD

Rak debelega črevesa in danke ali kolorektalni rak sodi med najpogostejša rakava obolenja na svetu. Zaradi visoke pojavnosti in umrljivosti se v zadnjem času veliko pozornosti usmerja v odkrivanje dejavnikov za razvoj bolezni.

Neposrednega vzroka za nastanek kolorektalnega raka ne poznamo. Med pomembne dejavnike tveganja štejemo, poleg genetske predispozicije tudi neustrezno prehrano bogato z rdečim mesom, čezmerno uživanje alkoholnih pijač (Huxley in sod., 2009) in kronično vnetje v prebavnem traktu (Itzkowitz in Yio, 2004). Slednji so morda povezani s spremembami v sestavi in funkciji črevesne mikrobiote, to je komplekse združbe mikroorganizmov, ki naseljuje prebavni trakt ljudi (Zackular in sod., 2013).

Črevesno mikrobioto po ocenah znanstvenikov sestavlja približno 10^{14} mikroorganizmov, ki so za človeka večinoma koristni ali neškodljivi in opravljajo pomembno funkcijo pri vzdrževanju homeostaze (Whitman in sod., 1998). Na drugi strani pa porušenje ravnotesja v strukturi črevesne mikrobiote oziroma disbiozo povezujejo z razvojem bolezni, med drugim tudi s kolorektalnim rakom (Sobhani in sod., 2011; Wang in sod., 2012).

Danes obstaja več hipotez o tem, kakšno vlogo naj bi imela črevesna mikrobiota pri nastanku kolorektalnega raka. Nekateri znanstveniki pomembno vlogo pripisujejo določenim patogenim bakterijam, ki naj bi s svojimi specifičnimi virulentnimi dejavniki vplivale na razvoj raka. Najpogosteje so z razvojem kolorektalnega raka povezovali enterotoksigene seve *Bacteroides fragilis* (ETBF) ter bakterije iz vrst *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecalis* in *Escherichia coli* (Sears in Pardoll, 2011). V zadnjem času se omenja tudi povezava med bakterijo *Fusobacterium nucleatum* in razvojem kolorektalnega raka (Castellarin in sod., 2011; Kostic in sod., 2011; McCoy in sod., 2013).

Poleg delovanja specifičnih mikroorganizmov je pri pacientih s kolorektalnim rakom moč opaziti bistveno spremembo v strukturi in vrstni pestrosti črevesne mikrobiote v primerjavi z zdravimi prostovoljci (Shen in sod., 2010; Marchesi in sod., 2011; Sobhani in sod., 2011; Sanapareddy in sod., 2012). Vloga drugačne sestave črevesne mikrobiote še ni dobro pojasnjena, zato so raziskave na tem področju bistvene za popolnejše razumevanje nastanka in etiologije bolezni.

1.1 NAMEN MAGISTRSKEGA DELA

Namen magistrskega dela je bil ugotoviti, ali so relativni deleži treh dominantnih bakterijskih filogenetskih skupin, to so *Bacteroides-Prevotella*, *Clostridium leptum* (rRNK gruča IV), *Clostridium coccoides* (rRNK gruča XIVa) in pripadniki proteobakterijske družine *Enterobacteriaceae*, ki kot komenzalni simbionti naseljujejo površino črevesne sluznice ljudi, spremenjeni v vzorcih pacientov s kolorektalnim rakom. Spremembe relativnih deležev omenjenih skupin smo ugotavljali iz razlik, ki smo jih opazili pri analizi tumorsko spremenjenih in nespremenjenih biopsijskih vzorcev črevesnih sluznic 16 pacientov. Vzorci, ki smo jih analizirali, so bili odvzeti na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo UKC Ljubljana v okviru rutinskih diagnostičnih pregledov pacientov, vključenih v program SVIT.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Sestava mikrobne združbe, ki naseljuje črevesno sluznico, je individualno specifična.
- Mikrobna združba v vzorcih črevesne sluznice je manj pestra in revnejša od fekalne mikrobne združbe.
- Struktura mikrobne združbe je različna v vzorcih obolelega in zdravega črevesnega epitela pacientov.
- Zaradi individualno specifične strukture mikrobnih združb razlik med zdravimi prostovoljci in pacienti ne bomo opazili.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KOLOREKTALNI RAK

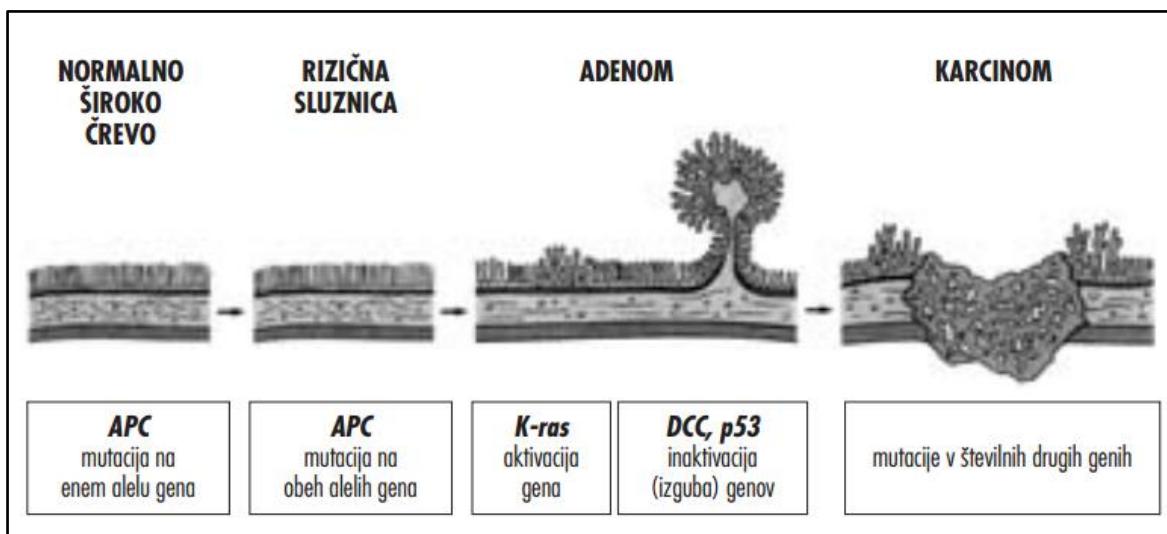
Kolorektalni rak (CRC, *angl. colorectal cancer*) ali rak na debelem črevesu in danki sodi med najpogosteje bolezni modernega sveta. V svetovnem merilu je četrti najpogosteje diagnosticiran rak z več kot milijon novo odkritih primerov in več kot 600.000 smrti letno (Ferlay in sod., 2010).

V Sloveniji je po podatkih Registra raka leta 2011 rak debelega črevesa in danke tretji najpogosteje diagnosticiran rak tako pri moških (13,8 % vseh rakavih obolenj) kot pri ženskah (11,1 %). Pogostejše vrste raka so pri nas le še rak prostate pri moških, rak dojke pri ženskah in kožni rak (razen melanoma) (Rak v Sloveniji..., 2015).

Od leta 2009 je v Sloveniji vzpostavljen program SVIT, državni program zgodnjega odkrivanja predrakavih sprememb in raka na debelem črevesu in danki. Namen programa je s pomočjo presejalnega testa (test na prikrito krvavitev v blatu) in nato v primeru pozitivnega presejalnega testa z diagnostično kolonoskopijo odkriti ženske in moške v starosti med 50 in 69 let, ki imajo predstopnjo ali začetno stopnjo raka, in jih primerno zdraviti (Novak Mlakar in sod., 2013). Najpomembnejša in najzanesljivejša diagnostična metoda pri odkrivanju raka debelega črevesa in danke je kolonoskopija, ki z največjo verjetnostjo potrdi ali izključi prisotnost tumorja. Omogoča natančen pregled sluznice črevesa in bioptični odvzem tkiva ter polipov za histološke preiskave (Štabuc in Ferkolj, 2011).

Natančen vzrok za nastanek kolorektalnega raka še ni znan, domnevno pa je rak debelega črevesa in danke posledica kombinacije medsebojnega delovanja dednih dejavnikov in vplivov okolja. Najpomembnejši dejavniki tveganja so neustrezna prehrana (predvsem energetsko bogata hrana, ki vsebuje veliko mesa, maščob in beljakovin v kombinaciji z nizkim vnosom vlaknin in vitamina D), premajhna telesna aktivnost, adenomatozni polipi črevesne sluznice, kronične vnetne črevesne bolezni (ulcerativni kolitis in Chronova bolezen), hormonski ter genetski dejavniki ter obsevanje (Štabuc in Ferkolj, 2011).

Večstopenjski molekularni model nastanka raka oziroma kancerogeneze kolorektalnega raka sta leta 1990 predlagala Fearon in Vogelstein. Model predpostavlja, da kopiranje genetskih in epigenetskih mutacij vodi v spremembe normalne črevesne sluznice preko predrakavih sprememb do invazivnega raka (Fearon in Vogelstein 1990; Fearon 2011). Najpogosteje so okvarjeni tumorsko zaviralni geni *apc*, *p53*, *dcc* in *dpc4*. Poleg okvar teh genov se morajo za napredovanje adenomov v karcinom aktivirati še nekateri onkogeni, npr. *k-ras* in *c-src*. Na spremenjeno izražanje genov vplivajo tudi epigenetske spremembe, ki ne povzročijo neposredno mutacije ali izgube genov, ampak vplivajo na obseg njihovega prepisovanja. Med epigenetske dejavnike štejemo acetilacijo, fosforilacijo in metilacijo histonov, ki lahko povzročijo spremembe v sestavi kromatina (Itzkowitz in Yio, 2004; Itzkowitz in sod., 2006; Ocepek in Skok, 2008).



Slika 1: Model kancerogeneze kolorektalnega raka, kot sta ga predlagala Fearon in Vogelstein, 1990 (Ravnik Glavač, 2000).

2.2 NORMALNA ČREVESNA MIKROBIOTA

Normalna črevesna mikrobiota so mikroorganizmi, ki naseljuje prebavni trakt ljudi. Ocenjeno število mikrobnih celic, ki sestavlja črevesno mikrobioto, je približno 10^{14} , kar je več kot desetkrat toliko kot je človeku lastnih evkariontskih celic (Savage, 1977; Whitman in sod., 1998; Ley in sod. 2006). Njihovi genomi (mikrobiom) pa vsebujejo vsaj stokrat več genov kot človeški (Qin in sod., 2010). Zato ni čudno, da tej izredno veliki in kompleksni mikrobni združbi, ki opravlja pomembne funkcije, pravijo tudi »skriti« ali »navidezni« organ (O'Hara in Shanahan, 2006).

Razširjenost in raznolikost mikroorganizmov vzdolž prebavnega trakta je odvisna od razmer, ki vladajo v posameznem odseku prebavne cevi (Manson in sod., 2008). Kisline v želodcu, žolč in prebavni encimi omogočajo v tem delu prebavne cevi naselitev le manjšemu številu izbranih bakterij (Davis, 1996), medtem ko dosežejo v zadnjem delu tankega in v debelem črevesu bakterije koncentracijo od 10^{11} do 10^{12} na gram vsebine črevesa in zavzemajo do 60 % suhe mase blata (Stephen in Cummings, 1980).

Spremembe v strukturi normalne črevesne mikrobiote povezujejo z debelostjo (Ley, 2010), podhranjenostjo (Kau in sod., 2011), kronično vnetno črevesno boleznijo (Fava in Danese, 2011), nevrološkimi obolenji (Gonzalez in sod., 2011) in kolorektalnim rakom (Sobhani in sod., 2011; Wang in sod., 2012).

Nekatere študije ugotavljajo, da se mikrobiota, ki je pritrjena na površino črevesne sluznice, razlikuje od mikrobiote v svetlini debelega črevesa (Nava in Stappenbeck, 2011), ter od mikrobiote, ki prevladuje v blatu (Zoetendal in sod., 2002). Te razlike so večje kot razlike v sestavi mikrobiote na različnih mestih debelega črevesa, kar kaže, da je črevesna mikrobiota vzdolž debelega črevesa v posamezniku relativno stabilna (Zoetendal in sod., 2002; Macfarlane in sod., 2004; Lepage in sod., 2005).

Črevesna mikrobiota vsebuje predstavnike vseh treh domen življenja – bakterije, arheje in evkariotske mikroorganizme. Najbolj pesta (vrstno) in najštevilčnejša je bakterijska populacija (Bäckhed in sod., 2005). Črevesno mikrobioto posameznega človeka skupaj sestavlja po nekaterih ocenah več kot 1000 različnih bakterijskih vrst, od katerih se velika večina (~ 80 %) uvrsti v le tri debla: *Firmicutes* (po Gramu pozitivne bakterije z nizko vsebnostjo GC baznih parov), *Bacteroidetes* (po Gramu negativne bakterije) in *Actinobacteria* (po Gramu pozitivne bakterije z visoko vsebnostjo GC baznih parov) (Eckburg in sod., 2005; Yatsunenko in sod., 2012). Od tega naj bi predstavniki le dveh bakterijskih debel, tj. *Firmicutes* in *Bacteroidetes*, skupaj predstavljali kar 90 % vseh bakterijskih t. i. filotipov¹ (Tap in sod., 2009). V manjši meri so prisotne tudi bakterije, ki jih uvrščamo v debla *Proteobacteria*, *Fusobacteria* in *Verrumicrobia* (Eckburg in sod., 2005; Tap in sod., 2009). Manj številčni predstavniki črevesne mikrobiote so tudi metanogene arheje (predvsem *Methanobrevibacter smithii*), evkariotski mikroorganizmi (predvsem kvasovke), ter virusi (predvsem bakteriofagi). Nekateri rastlinski virusi RNK lahko dosegajo koncentracije do 10^9 virionov na gram suhega blata (Zhang in sod., 2006; Reyes in sod., 2010).

Kljub temu da so zgoraj omenjeni predstavniki črevesne mikrobiote skoraj vedno prisotni pri vseh ali vsaj večini ljudi, pa se njihovi relativni deleži in vrstna sestava precej razlikujeta med posamezniki (Eckburg in sod., 2005; Lozupone in sod., 2012). Na sestavo in velikost mikrobne populacije vpliva veliko dejavnikov. Gostiteljev genotip (Manson in sod., 2008), starost in geografsko poreklo (Yatsunenko in sod., 2012), prehrana (Wu in sod., 2011), antibiotične terapije (Bartosch in sod., 2004) ter dodajanje probiotikov, prebiotikov ali simbiotikov hrani (Collins in Gibson, 1999) so le nekateri med njimi.

Večina predstnikov črevesne mikrobiote je za človeka neškodljivih ali koristnih, nekateri pa opravljajo pomembno funkcijo pri vzdrževanju črevesne homeostaze. Sodelujejo pri presnovi in pridobivanju energije iz hrane, pri sintezi vitaminov, kot sta biotin in vitamin K (LeBlanc in sod., 2013), in produkciji hormonov, ki direktno vplivajo na uravnavanje skladiščenja maščob (Bäckhed in sod., 2005; Manson in sod., 2008). Črevesna mikrobiota je pomembna za normalen razvoj in aktivacijo imunskega sistema (Schuijt in sod., 2013). S svojo prisotnostjo na sluznici preprečuje rast patogenih mikroorganizmov (Guarner in Malagelada, 2003). Novejše raziskave poročajo o vplivu črevesne mikrobiote pri razvoju možganov in poznejšem vedenju odraslih (Diaz Heijtz in sod., 2011; Cryan in Dinan, 2012). Porušenje ravnotesja v strukturi normalne črevesne mikrobiote povezujejo z debelostjo (Ley in sod., 2010), podhranjenostjo (Kau in sod., 2011), kronično vnetno črevesno boleznijo (Fava in Danese, 2011), nevrološkimi obolenji (Gonzalez in sod., 2011) in kolorektalnim rakom (Sobhani in sod., 2011; Wang in sod., 2012).

¹ Filotip oz. sekvenčni tip je filogenetska kategorija, ki znotraj filogenetskega drevesa predstavlja monofletski grozd več sorodnih sekvcenc. Gre za evolucijsko in ne klasično taksonomsko kategorijo.

Arumugam in sodelavci so v študiji iz leta 2011 razvili koncept kategorizacije bakterijskih predstavnikov normalne črevesne mikrobiote. S primerjavo metagenomskeh sekvenč iz vzorcev blata evropskih, azijskih in ameriških prostovoljcev so identificirali tri skupine bakterij in jih poimenovali enterotipi. Ti se razlikujejo glede na vsebnost enega od prevladajočih bakterijskih rodov *Bacteroides* (enterotip 1), *Prevotella* (enterotip 2) ali *Ruminococcus* (enterotip 3). Sočasno s prevladajočo vrsto v blatu se pojavljajo nekatere druge prisotne vrste, kar kaže na to, da so enterotipi skupina bakterij, ki skupaj tvorijo prevladajočo mikrobično skupnost. Enterotipi se razlikujejo v metagenomskem potencialu za tvorbo energije iz hranil, izdelovanju vitaminov in v različni dovzetnosti gostitelja za določene bolezni (Arumugam in sod., 2011; Lozupone in sod., 2012).

Na drugi stani pa Koren in sodelavci (2013), ki so analizirali obsežno bazo sekvenč informativnih odsekov gena za 16S rRNK, pridobljenih v okviru projekta človeškega mikrobioma (*angl. Human Microbiome Project*), in sekvenč iz dodatnih 16 objavljenih študij ter dostopne podatke sekvenč bakterijskih genomov, pridobljenih v okviru projektov MetaHIT (*angl. Metagenomics of the Human Intestinal Tract*), niso uspeli dokazati obstoja jasno ločenih gruč oziroma skupin bakterij, ki bi tvorile enterotipe. Pokazali so, da na zaznavo enterotipov vpliva uporabljeni metodologiji, npr. izbrana metoda za analizo gruč, uporabljeni distančni matriki, definiranje OTU²-jev, vrsta uporabljenih podatkov (sekvenč izbranih delov bakterijskega gena za 16S rRNK ali metagenomske sekvenč) in drugi faktorji.

Veliko raziskovalcev je že poskusilo opisati sestavo in funkcijo normalne črevesne mikrobiote, vendar je zaradi razlik v črevesni mikrobioti med posamezniki, kompleksnosti mikrobne združbe in nizkega števila udeležencev v študijah natančna opredelitev pojma težavna. Kljub temu da danes velika večina študij črevesne mikrobiote temelji na preučevanju gena za bakterijsko 16S rRNK in bi jih bilo zaradi tega v splošnem mogoče primerjati, pa so razlike v protokolih v različnih laboratorijih tako velike, da marsikdaj presežejo biološke razlike med vzorci (Rajilić-Stojanović in sod., 2007; Lozupone in sod., 2012).

² OTU – operacijska taksonomska enota (*angl. operational taxonomic unit*)

2.3 VLOGA ČREVESNE MIKROBIOTE PRI NASTANKU KOLOREKTALNEGA RAKA

Prvi so vpletjenost črevesne mikrobiote na nastanek kolorektalnega raka leta 1975 nakazali Reddy in sodelavci. S kancerogeno snovjo 1,2-dimetilhidrazin so inducirali nastanek tumorjev debelega črevesa pri podghanah z normalno črevesno mikrobioto in brez nje (angl. germ-free rats). Tumorji so se razvili le pri 20 % sterilnih podgan in pri kar 93 % podgan z normalno črevesno mikrobioto (Reddy in sod., 1975).

2.3.1 Mikroorganizmi, ki so domnevno vpleteni v nastanek kolorektalnega raka

2.3.1.1 *Streptococcus bovis*

V kar nekaj študijah so raziskovalci opisovali povezavo med septikemijo, ki jo je povzročila vrsta *S. bovis*, in neoplastičnimi spremembami debelega črevesa. Mehanizmi, s katerimi okužba z bakterijo *S. bovis* vpliva na razvoj kolorektalnega raka, pa so za enkrat še nejasni. Gold in sodelavci (2004) ocenjujejo, da se pri približno 25–80 % pacientih z bakteriemijo, ki jo je povzročila *S. bovis*, razvije rak debelega črevesa in danke. V vzorcih blata pacientov s kolorektalnim rakom so zaznali veliko višje koncentracije *S. bovis* v primerjavi z vzorci blata zdravih ljudi. Ellmerich in sodelavci (2000) so s poskusom na podghanah pokazali, da se je po okužbi z bakterijo *S. bovis* povečalo izražanje tumorskih označevalcev in induciralo nastanek adenomov debelega črevesa pri 50 % podgan, pri katerih so opazili tudi više število neobičajnih kript v epitelu debelega črevesa. Poleg tega so odkrili, da je prisotnost bakterije *S. bovis* povezana s povиšanim izločanje interlevkina 8 (IL-8) v sluznici debelega črevesa. IL-8 inducira tvorbo dušikovega monoksida in reaktivnih kisikovih zvrsti, ki prispevajo k neoplaziji s spremenjanjem celične DNK.

2.3.1.2 *Bacteroides fragilis*

Sevi *Bacteroides fragilis* predstavljajo približno 0,1 % normalne črevesne mikrobiote in jih najdemo v črevesni mikrobioti več kot 80 % otrok in odraslih (Compare in Nardone, 2013). Enterotoksigeni sev *Bacteroides fragilis* (ETBF) povezujejo z nastankom diareje pri ljudeh in živalih (Myers in sod.; 1984, Myers in sod., 1987) in z nastankom kronične vnetne črevesne bolezni (Prindiville in sod., 2000; Basset in sod. 2004). Sevi ETBF pa naj bi imel vlogo tudi pri nastanku kolorektalnega raka (Toprak in sod., 2006).

Sposobnost povzročanja diareje in vnetja je pri sevih ETBF povezana z izločanjem od cinka odvisnega metaloproteaznega toksina »fragilizina« ali BTF (*B. fragilis* toksin). Protein z molekulsko maso 20 kDa je kodiran na genu *btf*. Vloga fragilizina v poteku kancerogeneze je povezana s cepitvijo zunajcelične domene E-kadherina v β-katenine. E-kadherini so transmembranski proteini v epitelnem tkivu, kjer omogočajo medcelične povezave (Wu in sod., 1998; Wu in sod., 2003). Stabilnost β-kateninov znotraj celice je ključna, saj lahko kopiranje prostih kateninov v citosolu vodi v prepisovanje onkogenov v jedru (npr. *c-myc*) (Hardy in sod., 2000).

Toprak in sodelavci (2006) so preiskovali pogostost ETBF v vzorcih blata 73 pacientov s kolorektalnim rakom in pri 59 zdravih prostovoljcih. Gen za enterotoksin BTF so odkrili v 38 % izolatov *B. fragilis* iz vzorcev blata pacientov s kolorektalnim rakom in le v 12 % izolatov pri prostovoljcih iz kontrolne skupine. Wu in sodelavci (2009) so pokazali, da ETBF sproži kolitis in nastanek tumorjev debelega črevesa pri Min miših (*angl. Multiple intestinal neoplasia mice*) s selektivno aktivacijo Stat3 in Th17 imunskega odziva. Pokazali so tudi, da protitelesa proti IL-17 in proti IL-23, ki je glavni citokin, ki izzove Th17 odziv, inhibirajo z ETBF inducirani kolitis, hiperpalzijo debelega črevesa in nastanek tumorjev pri miših.

2.3.1.3 *Escherichia coli*

Bakterija *Escherichia coli* je predstavnik normalne črevesne mikrobiote. V večini primerov sobiva s človekom v komenzalnem sožitju. Na drugi strani pa lahko patogeni sevi *E. coli*, ki imajo različne virulentne dejavnike, povzročajo črevesne ter zunajčrevesne okužbe (Guarner in Malagelada, 2003).

Swidsinski in sodelavci so v raziskavi leta 1998 ugotovili, da je v biopsijskih vzorcih sluznice debelega črevesa pacientov s kolorektalnim rakom prisotno večje število bakterij kot v vzorcih zdravih prostovoljcov. V biopsijskih vzorcih pacientov so bakterije vrste *E. coli* skupaj s še tremi sorodnimi vrstami enterobakterij predstavljalne kar 82 % pridobljenih bakterijskih sekvenc. Z gentamicinskim testom so pokazali, da je v vzorcih pacientov 87 % bakterij vrste *E. coli* znotrajceličnih (Swidsinski in sod., 1998). Podobno so Martin in sodelavci (2004) ugotovili povišanje znotrajceličnih bakterij, zlasti bakterij vrste *E. coli*, v biopsijskih vzorcih pacientov s kolorektalnim rakom. Sevi *E. coli*, izolirani iz biopsijskih vzorcev pacientov, so v 38 % izražali hemaglutininaktivnost in sposobnost vezave na celični liniji človeških črevesnih epitelnih celic I407 in HT29, kar je znatno več v primerjavi s sevi, izoliranimi iz zdravih prostovoljcov (4 %). S to ugotovitvijo so podprli vlogo, ki jo imajo bakterije s sposobnostjo vezave in invazije v celice črevesne sluznice, zlasti bakterije vrste *E. coli* v patogenezi kolorektalnega raka (Martin in sod., 2004).

Na podlagi virulenčnih dejavnikov, proizvodnje toksinov in adhezije razdelimo seve *E. coli* v več skupin. Eno izmed njih predstavljajo AEEC (*angl. Attaching and effacing E. coli*), ki imajo gen *eae* z zapisom za adhezijski protein intimin, s katerim se pritrdijo na črevesno sluznico. Pri človeku je najpogosteja AEEC enteropatogena *E.coli* (EPEC), ki izkorišča sistem izločanja tipa III za prenos efektorskih proteinov v gostiteljevo celico. Okužba z EPEC povzroči obsežne učinke na proteom gostiteljske celice (Maddocks in sod., 2009). Maddocks in sodelavci (2009) poročajo, da naj bi okužba z EPEC vplivala tudi na tumorigenezo kolorektalnega raka. V celični liniji debelega črevesa, okuženi s sevi EPEC, se je namreč drastično zmanjšalo izražanje ključnih DNK popravljalnih proteinov MSH2 in MLH1. Z imunofluorescenčnim barvanjem so odkrili EPEC, pritrjene na kripte debelega črevesa, pogosto v predelu proliferacije.

Seve bakterijske vrste *E. coli* lahko razvrstimo v vsaj štiri glavne filogenetske skupine (A, B1, B2 in D). Hitra in preprosta tehnika za določanje filogenetskih skupin temelji na pomnoževanju kombinacije dveh genov (*chuA* in *yjaA*) in fragmenta DNK TSPE4.C2 z metodo PCR ter delitev v skupine na osnovi prisotnosti omenjenih filogenetskih markerjev (Clermont in sod., 2000). Virulentni sevi *E. coli* spadajo predvsem v skupini B2 in D, med tem ko večina komenzalnih sevov pripada filogenetski skupini A. Sevi *E. coli*, ki se uvrščajo v filogenetsko skupino B2, imajo genomske otoki »pks«, ki nosijo zapis za poliketidni peptid kolibaktin. Cuevas-Ramos in sodelavci (2010) so ugotovili da okužba miši z *E. coli* z otoki »pks« povzroči fosforilacijo histonov H2AX v enterocitah, kar se ne zgodi pri okužbi s pks izogenimi mutantami brez toksina. Fosforilacija H2AX domnevno prispeva k razvoju sporadičnega kolorektalnega raka.

2.4 HIPOTEZE IN MODELI NASTANKA KOLOREKTALNEGA RAKA

Danes obstaja več hipotez o tem kakšno vlogo naj bi imela črevesna mikrobiota pri kancerogenezi kolorektalnega raka. Ena od hipotez pravi, da bakterije v črevesu sodelujejo, tako da povzročijo raka na debelem črevesu, še posebej, če gostitelj uživa hrano, ki prispeva k nastanku raka. Ta predpostavka temelji na epidemioloških podatkih, ki kažejo, da je tveganje za razvoj kolorektalnega raka višje pri Afroameričanh, ki uživajo zahodni tip diete, kot pri Afričanh, ki uživajo njihovo tradicionalno afriško dieto (O'Keefe in sod., 2007). Bolj konvencionalne hipoteze predpostavlja, da so izbrani predstavniki črevesne mikrobiote dovolj dominantni, da lahko sami predstavljajo onkogeno tveganje (Hope in sod., 2005).

Sears in Pardoll (2011) sta na podlagi študije enterotoksigene *Bacteroides fragilis* (ETBF) oblikovala hipotezo »alfa bakterij«. Alfa bakterije imenujeta nekatere predstavnike črevesne mikrobiote, ki imajo edinstvene virulentne dejavnike. Ne samo, da so neposredno proonkogene, ampak so zmožne preoblikovati črevesno mikrobioto v takšno, ki krepi njihovo rast. Inducirajo lahko imunski odgovor ter spremenijo epitelne celic debelega črevesa, kar vodi v nastanek raka na debelem črevesu. Poleg tega lahko alfa bakterije okrepijo kancerogenezo s selektivnim izrivanjem protirakovih, zaščitnih mikrobnih vrst. Drugi kandidati za alfa bakterije so z njihovimi specifičnimi mehanizmi delovanja *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecalis* in *Escherichia coli*.

Za razliko od hipoteze alfa bakterij ki predpostavlja, da so določene bakterije stalno prisotne in kolonizirajo razvijajoči tumor, model bakterijskih »voznikov in potnikov«, ki so ga predlagali Tjalsma in sodelavci (2012), predvideva, da se ključne bakterije skozi čas spreminjajo. Model predpostavlja, da so promotorji nastanka kolorektalnega raka ali »vozniki« prisotni samo v začetnih stopnjah razvoja, v kasnejših stadijih pa jih zamenjajo »potniki«. Predlagani bakterijski »vozniki« so *Enterococcus faecalis*, sevi *Escherichia coli* z otoki »pks« in sevi ETBF. Prisotnost teh sevov povzroča trajno vnetje, povečano proliferacijo in izločanje genotoksičnih substanc, ki prispevajo k nastanku predrakovih lezij. Čez čas naj bi se zaradi razvoja neoplazije mikrookolje tumorja spremenilo in postalo ugodnejše za bakterijske »potnike«, ki so oportunistični patogeni iz rodov *Fusobacterium*

ali *Streptococcus*, komenzalne ali probiotične bakterije (npr. predstavniki družine *Coriobacteriaceae*) in druge. V nedavnih študijah so raziskovalci kot najpomembnejše spremembe v mikrokolju razvijajočega tumorja navedli izrazito znižanje količine glukoze in piruvata ter povišanje laktata, amino kislin, lipidov in maščobnih kislin (Righi in sod., 2009).

Model bakterijskih »voznikov in potnikov« so v kitajski populaciji preverjali Geng in sodelavci (2014). Kot »voznike« so opredelili vrste iz družine *Enterobacteriaceae* in kot »potnike« bakterijske vrste iz družine *Streptococcus*. Opisali so tudi nekaj potencialno novih bakterijskih »voznikov in potnikov«, bakterije iz družin *Pseudomonadaceae* in *Neissenaceae* kot voznike in provnetne predstavnike rodov *Staphylococcus* in *Veillonella* kot potnike.

2.5 DISBIOZA IN RAZVOJ KOLOREKTALNEGA RAKA

Disbioza je stanje porušenja normalne črevesne mikrobiote. Spremembo sestave črevesne mikrobiote v literaturi povezujejo z različnimi boleznimi in stanji, od kroničnih vnetnih črevesnih bolezni, kot sta Chronova bolezen in ulcerativni kolitis (Kaur in sod., 2011), sindroma kronične utrujenosti (Lakhan in Kirchgessner, 2010), debelosti (Turnbaugh in sod., 2006; Turnbaugh in sod., 2009) do kolorektalnega raka (Sobhani in sod., 2011).

Rezultati študij, ki poročajo o disbiozi pri pacientih s kolorektalnim rakom, so si pogosto nasprotuječi. Bakterijske skupine, ki bi bila direktno povezana s prisotnostjo ali z razvojem kolorektalnega raka, žal ni moč izpostaviti. Ti rezultati sicer jasno kažejo na povezavo med spremenjeno sestavo črevesn mikrobiote in kolorektalnim rakom, vendar sočasno opozarjajo, da je potrebno bistveno boljše poznavanje vloge črevesne mikrobiote v tem procesu (Zackular in sod., 2013).

V Preglednici 1 so omenjene nekatere študije, v katerih so ugotavljali povezanost črevesne mikrobiote in spremembe v njeni sestavi v povezavi s kolorektalnim rakom.

Preglednica 1: Študije, ki ugotavljajo povezavo med črevesno mikrobioto in nastankom kolorektalnega raka z opisom uporabljenih vzorcev in metod ter namenom študije.

| Avtor in leto | Vzorci | Namen študije | Metode |
|-----------------------|-------------------------------------|---|---------------------------------------|
| Moore in Moore, 1995 | blato | primerjati paciente s polipi (n=18) in prostovoljce z različnim tveganjem za nastanek CRC* (n=70) | anaerobno gojenje |
| Ahmed in sod., 2007 | nespremenjena črevesna sluznica | primerjati črevesno mikrobioto vzdolž kolona pri pacientih s CRC (n=24) in z divertikli (n=2); | DGGE, FISH, qPCR |
| O'Keefe in sod., 2007 | blato in biopsije črevesne sluznice | primerjati vpliv prehrane in mikrobiote na pogostost pojava CRC pri skupinah z različnim tveganjem za pojav kolorektalnega raka | anaerobno gojenje histologija biopsij |

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1: Študije, ki ugotavljajo povezavo med črevesno mikrobioto in nastankom kolorektalnega raka z opisom uporabljenih vzorcev in metod ter namenom študije.

| Avtor in leta | Vzorci | Namen študije | Metode |
|---------------------------|---|--|---|
| Balamurugan in sod., 2008 | blato | kvantificirati bakterije <i>Eubacterium rectale</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Desulfovibrio</i> (SRB**) in <i>Enterococcus faecal</i> pri pacientih s CRC (n=20), pacientih z rakom v zgornjem GIT*** (n=9) in zdravih prostovoljcih (n=17) | qPCR |
| Scanlan in sod., 2008 | blato | oceniti raznolikost in časovno stabilnost črevesne mikrobiote pacientov s CRC (n=20), pacientov po odstranitvi polipov (n=20) ter zdravih prostovoljcev (n=20) | DGGE, RISA |
| Scanlan in sod., 2009 | blato | ugotoviti razliko v številu <i>Desulfovibrio</i> sp. med pacienti s CRC (n=27), pacienti po odstranitvi polipov (n=27) in dvema skupinama zdravih prostovoljcev; starejšimi (n=8) in mladimi odraslimi (n=30) | qPCR |
| Shen in sod., 2010 | nespremenjena črevesna sluznica | opredeliti bakterijske skupine črevesne mikrobiote in ugotoviti razlike v sestavi mikrobiote biopsijskih vzorcev sluznice rektuma pacientov z adenomom (n=21) in brez (n=23) | TRFLP, sekvenciranje baterijskega gena za 16S rRNK, FISH |
| Castellarin in sod., 2011 | nespremenjena in tumorsko spremenjena črevesna sluznica | primerjati mikrobioto nespremenjene in rakovo spremenjene sluznice pri pacientih s CRC (n=11), nato s qPCR za <i>nusG</i> gen preverjati prisotnost <i>F. nucleatum</i> v dodatnih parih vzorcev (n=88), direktno gojenje <i>F. nucleatum</i> iz 12 vzorcev | sekvenciranje skupne RNK, qPCR, anaerobno gojenje |
| Kostic in sod., 2011 | nespremenjena in tumorsko spremenjena črevesna sluznica | opisati črevesno mikrobioto nespremenjene in tumorsko spremenjene sluznice pacientov s CRC (n=9), s qPCR potrditi povišanje števila <i>F. nucleatum</i> s primerjavo dodatnih parov vzorcev (n=95) | WG**** sekvenciranje, qPCR, FISH |
| Marchesi in sod., 2011 | nespremenjena in tumorsko spremenjena črevesna sluznica | primerjati črevesno mikrobioto, ki kolonizira tumorsko spremenjeno in nespremenjeno tkivo istega pacienta s CRC (n=6) | DGGE, RISA, sekvenciranje V1-V3 regije bakterijskega gena za 16S rRNK |
| Sobhani in sod., 2011 | blato, nespremenjena črevesna sluznica | primerjati vzorce blata pacientov s CRC (n=6) in zdravih prostovoljcev (n=6), opisati disbiozo pri pacientih; kvantificirati dominantne bakterijske skupine črevesne sluznice pacientov (n=60) in zdravih prostovoljcev (n=119) | pirosekvenciranje regije V3-V4 bakterijskega gena za 16S rRNK, qPCR |
| Chen in sod., 2012 | blato, rektalni bris in sluznica | opisati strukturo mikrobiote pri pacientih s CRC (n=46) in v zdravih prostovoljcih (n=56), primerjati vzorce tumorsko spremenjene in nespremenjene sluznice istega pacienta, pregled rektalnih brisov | pirosekvenciranje regije V1-V3 bakterijskega gena za 16S rRNK |
| Sanapareddy in sod., 2012 | nespremenjena črevesna sluznica | primerjati sestavo mikrobiote biopsijskih vzorcev sluznice rektuma pacientov z adenomom (n=33) in brez (n=38) | pirosekvenciranje regije V1-V2 bakterijskega gena za 16S rRNK |

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1: Študije, ki ugotavljajo povezavo med črevesno mikrobioto in nastankom kolorektalnega raka z opisom uporabljenih vzorcev in metod ter namenom študije.

| Avtor in leta | Vzorci | Namen študije | Metode |
|---------------------|---|---|--|
| Wang in sod., 2012 | blato | opisati sestavo in razlike v združbi blata med pacienti s CRC (n=46) in zdravimi prostovoljci (n=56) | pirosekvenciranje V3 regije bakterijskega gena za 16S rRNK, qPCR |
| Ahn in sod., 2013 | blato | primerjati sestavo mikrobiote blata pacientov s CRC (n=47) in zdravih prostovoljcev (n=94) | qPCR, sekvenciranje variabilne regije V3-V4 bakterijskega gena za 16S rRNK |
| McCoy in sod., 2013 | nespremenjena in tumorsko spremenjena črevesna sluznica | primerjati zastopanost vrst <i>Fusobacterium</i> v vzorcih rektalne sluznice pacientov z (n=48) in brez adenomov (n=67), s pirosekvenciranjem ugotoviti prisotnost fuzobakterij v parihi vzorcev tumorjev (n=10) in nespremenjene (n=9) črevesne sluznice | qPCR, FISH, pirosekvenciranje variabilne regije V1-V3 bakterijskega gena za 16S rRNK |

* CRC (*angl. colorectal cancer*) – kolorektalni rak; ** SRB – sulfat reducirajoče bakterije (*angl. sulphate reducing bacteria*); *** GIT – gastrointestinalni trakt; **** WG (*angl. whole genome sequencing*) – sekvenciranje celotnih genomov

Moore in Moore (1995) sta iz vzorcev blata 88 preiskovancev z različno stopnjo tveganja za nastanek kolorektalnega raka izolirala več kot 5000 izolatov anaerobnih bakterij, ki so zrastle na uporabljenih gojiščih. Visoko rizično skupino so predstavljali pacienti s polipi v debelem črevesju in dve skupini preiskovancev (Havajci japonskega porekla in Severnoameričani), ki so se prehranjevali z zahodnim tipom diete. Japonci in Afričani s podeželja, ki so uživali njihove tradicionalne diete z malo rdečega mesa, pa so predstavljali nizko rizično skupino. Identificirali so 15 bakterijskih taksonomskih skupin, ki so bile značilno povezane z visoko rizično skupino, in 5 skupin, ki so bile povezane z nizko rizično skupino. Nekatere vrste znotraj rodu *Lactobacillus* in vrsta *Eubacterium aerofaciens*, ki proizvajajo visoke količine mlečne kisline, so povezali s skupino z nizkim tveganjem. Pri osebah z visokim tveganjem za nastanek kolorektalnega raka pa so ugotovili povišanje bakterij iz rodu *Bacteroides*. Presenetljivo pa je, da so ugotovili tudi povišanje števila bakterij iz rodu *Bifidobacterium*, ki se sicer uporablja kot probiotiki.

Podobno so O'Keefe in sodelavci (2007) preverjali vpliv prehrane in mikrobiote debelega črevesa na približno šestdesetkrat višjo pojavnost kolorektalnega raka pri Afroameričanh v primerjavi z Afričani. Ugotovili so, da je višja pojavnost kolorektalnega raka povezana z višjim vnosom živalskih beljakovin in maščob ter z višjim številom bakterij, ki proizvajajo 7 α-dehidroksilaze, in zmanjšanim številom bakterij vrste *Lactobacillus plantarum*.

Scanlan in sodelavci (2008) so primerjali vzorce blata pacientov in zdravih prostovoljcev z molekularnimi metodami. Ugotovili so, da imajo pacienti s kolorektalnim rakom in pacienti s polipi bolj raznovrstno sestavo mikrobiote blata v primerjavi z zdravimi prostovoljci. Bistveno povečanje raznolikosti je bilo pri obeh preiskovanih skupinah pacientov opazno znotraj filogenetskih skupin *Clostridium leptum* in *Clostridium coccoides*. DGGE analiza skupine *C. coccoides* je pokazala, da sta obe skupini pacientov

značilno različni od kontrolne skupine, razlikovali pa sta se tudi med sabo. Največja raznolikost znotraj skupine *C. leptum* je bila opazna pri skupini s polipi, med tem ko razlike med rakavimi bolniki in zdravimi prostovoljci ni bilo mogoče opaziti. Tudi razlik v DGGE profilih znotraj skupine *Bacteroides* niso opazili.

Scanlan in sodelavci (2009) so kvantificirali bakterije iz rodu *Desulfovibrio* pri pacientih s kolorektalnim rakom in pri pacientih po odstranitvi polipov. Sulfat reducirajoče bakterije (*angl. sulphate reducing bacteria*), med njimi tudi *Desulfovibrio*, uporabljajo kot vir ogljika in energije za redukcijo sulfata (SO_4^{2-}) v vodikov sulfid (H_2S), laktat, piruvat, etanol ali nekatere maščobne kisline. Nekatere študije nakazujejo povezavo med povišanimi vrednostmi H_2S in razvojem kronične vnetne črevesne bolezni in kolorektalnega raka (Huycke in Gaskins, 2004). Vendar pa Scanlan in sodelavci razlik v številnosti teh bakterij pri pacientih po odstranitvi polipov in pri zdravih prostovoljcih (v povprečju 10^6 kopij gena za 16S rRNK na gram blata) niso opazili. Pri pacientih s kolorektalnim rakom so celo zaznali nižje število bakterij iz rodu *Desulfovibrio* (v povprečju 10^5 kopij gena za 16S rRNK na gram blata). Predpostavili so, da bi lahko bilo zmanjšanje v številu bakterij iz rodu *Desulfovibrio* posledica kolektomije (popolne ali delne odstranitve kolona) pri preiskovanih pacientih. Balamurugan in sodelavci (2008) prav tako niso ugotovili razlik v številu *desulfovibrijev* v vzorcih blata pacientov s kolorektalnim rakom in zdravimi prostovoljci, kar kaže na to, da ni mogoče preprosto povezati števila *desulfovibrijev* in drugih sulfat reducirajočih bakterij pri razvoju gastrointestinalnih bolezni, ampak je potrebno upoštevati njihovo sposobnost proizvodnje H_2S (Fite in sod., 2004).

Dve raziskovalni skupini, ki sta primerjali mikrobioto blata evropskih (Sobhani in sod., 2011) in azijskih (Wang in sod., 2012) pacientov, sta ugotovili, da je kljub podobnemu skupnemu številu bakterij v vzorcih blata pacientov z rakom in zdravih prostovoljcev možno opaziti razliko v strukturi mikrobiote blata med preiskovanima skupinama. Sobhani in sodelavci (2011) so pri pacientih s kolorektalnim rakom, podobno kot Moore in Moore (1995), ugotovili povečanje števila bakterij iz skupine *Bacteroides/Prevotella* v blatu, medtem ko razlik v številu bakterij skupin *Bifidobacterium*, *Lactobacillus/Leuconostoc*, *Clostridium coccoides/Clostridium leptum* in *Fecalibacterium prausnitzii* niso opazili. Wang in sodelavci (2012) so pokazali, da se pri pacientih s kolorektalnim rakom zniža število bakterij iz rodu *Roseburia* in drugih butirat producirajočih bakterij iz družine *Lachnospriaceae* ter poviša število bakterij iz rodov *Enterococcus*, *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella*, *Streptococcus* in *Peptostreptococcus*. Za razliko od študije, ki so jo opravili Sobhani in sodelavci (2011), je bila bakterijska skupina *Bacteroides* pri pacientih s kolorektalnim rakom v azijskih pacientih manj zastopana v primerjavi z zdravimi prostovoljci. Samo 1 OTU, soroden *B. fragilis*, je bil povišan v vzorcih pacientov s kolorektalnim rakom, med tem ko so bili 3 OTU-ji, sorodni *B. vulgatus* in *B. uniformis*, povišani v vzorcih iz zdravih prostovoljcev (Wang in sod., 2012).

Veliko raziskovalnih skupin je mnenja, da se največja sprememba v mikrobioti pri pacientih s kolorektalnim rakom zgodi na račun zmanjšanja števila bakterij, ki sintetizirajo zaščitne kratko verižne maščobne kisline, predvsem masleno kislino (butirat) (Scharlau in

sod., 2009), in povišanja števila oportunističnih bakterij (Aituov in sod., 2012). Bakterije, ki spadajo v filogenetske skupine *Clostridium coccoides*, *Clostridium leptum* in *Faecalibacterium prausnitzii*, so znani proizvajalci butirata, ampak njihovo številčno zmanjšanje ni konstantno potrjeno v različnih študijah. Wang in sodelavci (2012) so ugotovili zmanjšanje v številu bakterij iz skupine *Clostridium coccoides*, vendar zmanjšanja niso opazili v številu bakterij iz vrste *Faecalibacterium prausnitzii*. Nasprotno pa so Balamurugan in sodelavci (2008) pokazali pomembno zmanjšanje bakterij *Fecalibacterium prausnitzii* pri pacientih s kolorektalnim rakom.

V študijah, v katerih so primerjali biopsijske vzorce nespremenjene črevesne sluznice pacientov z adenomi z vzorci nespremenjene črevesne sluznice zdravih prostovoljcev, so prav tako opazili značilne razlike med vzorci. Shen in sodelavci (2010) so v biopsijskih vzorcih adenomov opazili povečanje števila bakterij iz debla *Proteobacteria* in zmanjšanje bakterij iz rodu *Bacteroides*. Ni pa bilo opaziti razlike v številčnosti bakterij iz debla *Firmicutes*. Na nivoju vrst je prišlo pri pacientih z adenomi do povišanja bakterij iz rodov *Faecalibacterium*, *Shigella* in *Dorea* in do znižanja vrst iz rodov *Bacteroides* in *Coprococcus*. Opazili so tudi povišanje števila bakterij in večjo pestrost (večje število OTU) pri pacientih v primerjavi z zdravimi prostovoljci. Podobno so Sanapareddy in sodelavci (2012) pri pacientih z adenomi ugotovili večje število bakterij iz 87 OTU, samo pri 5 OTU je bilo opaziti povišanje števila bakterij pri zdravih prostovoljcih. Pri pacientih so ugotovili večje število potencialno patogenih mikrobov, kot so vrste iz rodov *Pseudomonas*, *Helicobacter* in *Acinetobacter*, ter bakterij iz rodu *Lactobacillus*, kar je zanimivo, saj bakterije iz rodu *Lactobacillus* običajno veljajo za koristne mikrobe v prebavilih.

Za razliko od omenjenih študij so Marchesi in sodelavci (2011) primerjali črevesno mikrobioto istega pacienta z odvzemom dveh biopsijskih vzorcev, pri čemer so pokazali jasno razliko v sestavi mikrobiote, ki naseljuje tumorsko spremenjeno in nespremenjeno sluznico. V vzorcih tumorsko spremenjene sluznice so pri vseh pacientih opazili povišanje števila bakterij iz rodov *Coriobacteria*, *Roseburia*, *Fecalibacterium* in *Fusobacterium*, ki na splošno veljajo za komenzalne bakterije, ter manjše število potencialno patogenih predstavnikov iz družine *Enterobacteriaceae* (*Citrobacter*, *Shigella*, *Serratia*, *Salmonella*). Podobno, kot to predpostavlja model bakterijskih »voznikov in potnikov« (Tjalsma in sod., 2012), so Marchesi in sodelavci (2011) predpostavili, da je spremenjeno mikrookolje razvijajočega tumorja ugodnejše za rast komenzalnih in probiotičnih bakterij. Nasprotno pa so Chen in sodelavci (2012) pri primerjavi vzorcev črevesne sluznice tumorsko spremenjenega in nespremenjenga tkiva istega pacienta opazili nižje število bakterij iz rodu *Faecalibacterium* v tumorskih vzorcih. Prav tako so nižje število bakterij iz rodu *Faecalibacterium* opazili v vzorcih črevesne sluznice pacientov s kolorektalnim rakom v primerjavi z vzorci črevesne sluznice zdravih prostovoljcev. Na podlagi teh rezultatov so predpostavili, da bi probiotične bakterije rodu *Faecalibacterium* lahko imele zaščitno vlogo pred nastankom kolorektalnega raka.

Severnoameriški raziskovalci so v dveh neodvisnih študijah v letu 2011 objavili podobne ugotovitve v povezavi s spremembo mikrobiote črevesne sluznice biopsijskih vzorcev rakavo spremenjene sluznice (Castellarin in sod., 2011; Kostic in sod., 2011). Prišli so do podobnega zaključka, da je v vzorcih rakavo spremenjene črevesne sluznice opazno značilno povišanje bakterij iz rodu *Fusobacterium* (v glavnem *Fusobacterium nucleatum*). Kostic in sodelavci (2011) so ugotovili, da je bilo v tumorsko spremenjeni sluznici devetih pacientov zmanjšano število bakterij iz debel *Firmicutes* in *Bacteroidetes* in statistično značilno povišano število bakterij rodu *Fusobacterium*. To so potrdili s qPCR in sekvenciranjem gena za 16S rRNK vzorcev petindevetdesetih dodatnih pacientov. Z metodo fluorescentne in situ hibridizacije (FISH; angl. fluorescent in situ hybridization) so pokazali prisotnost bakterij rodu *Fusobacterium* na črevesnem epiteliju. Bakterije vrste *Fusobacterium nucleatum*, izolirane iz rakave sluznice, so odkrili celo v limfnih vozilih in jetrnih metastazah, kar kaže na možnost translokacije teh bakterij. Castellarin in sodelavci (2011) so ugotovili značilno povišanje sekvenc, podobnih sekvenci genoma bakterije *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* (ATCC 25586) v tumorskih vzorcih. Iz zmrznjenega tumorskega vzorca so celo uspeli izolirati nov sev iz rodu *Fusobacterium* (CC53) in potrditi invazivnost tega izolata v Caco-2 celicah. Povišanje števila bakterij iz rodu *Fusobacterium* so v vzorcih blata pacientov s kolorektalnim rakom pokazali tudi Ahn in sodelavci (2013). McCoy in sodelavci (2013) so povišanje števila bakterij iz rodu *Fusobacterium* dokazali tudi v vzorcih črevesnih sluznic adenomov, ki so predstopnje v razvoju kolorektalnega raka.

Naštete študije nakazujejo, da imajo pacienti s kolorektalnim rakom spremenjeno črevesno mikrobioto v primerjavi z zdravimi prostovoljci. Vendar zaenkrat ostaja nepojasnjeno, ali so te spremembe posledica kancerogenze ali vzrok zanjo (Zackular in sod., 2013).

2.6 METODE OPISOVANJA ČREVESNE MIKROBIOTE

Celovito poznavanje sestave črevesne mikrobiote je ključno za razumevanje vloge, ki jo ima mikrobiota pri nastanku in v razvoju črevesnih bolezni. V preteklosti sta bila zlati standard za opredeljevanje predstavnikov črevesne mikrobiote gojenje in biokemijska identifikacija bakterijskih vrst (Fraher in sod., 2012). Ker je le majhen delež predstavnikov črevesne mikrobiote, po ocenah manj kot 30 % (Guarner in Malagelada, 2003; Eckburg in sod., 2005), možno gojiti, se od 90. let prejšnjega stoletja za preučevanje črevesne mikrobiote široko uporabljajo različne molekularne metode. Številne molekularne metode temeljijo na analizi sekvenc gena za 16S rRNK. Gen za 16S rRNK je primeren molekuarni marker, saj je visoko ohranjen med bakterijskimi vrstami, a dovolj različen, da omogoča filogenetsko identifikacijo (Fraher in sod., 2012).

Z molekularnimi metodami lahko ugotavljamо sestavo črevesne mikrobiote ali kvantificiramo bakterijske predstavnike. Nekatere izmed molekularnih metod, ki se danes uporablajo za preučevanje črevesne mikrobiote, ter njihove prednosti in slabosti so opisane v preglednici 2. Vsaka izmed opisanih metod ima različno možnost uporabe v preučevanju črevesne mikrobiote.

Preglednica 2: Molekularne metode, ki se uporabljajo za opis sestave črevesne mikrobiote (prirejeno po Fraher in sod., 2012)

| Metoda | Opis metode | Prednosti | Slabosti |
|------------------------------------|---|---|--|
| DGGE/TGGE | ločevanje PCR produktov v gradientu denaturanta (DGGE) ali temperature (TGGE) na osnovi vsebnosti GC baznih parov | hitra, semi-kvantitativna, lise lahko iz gela izrežemo za nadaljnjo analizo | PCR pristransko, zahtevna in dolgotrajna izvedba, težavna standardizacija |
| T-RFLP | fluorescenčno označeni začetni oligonukleotidi za PCR, encimska restrikcija produktov, ločevanje fragmentov različnih dolžin | hitra, semi-kvantitativna, poceni, standardizacija omogoča dobro primerjavo med vzorci | ni možnost filogenetske identifikacije, PCR pristransko, slaba ločljivost |
| FISH | hibridizacija fluorescentno označene oligonukleotidne sonde s komplementarno tarčno 16S rRNA sekvenco, pretočna citometrija fluorescentnih celic | možnost filogenetske identifikacije, semi-kvantitativna, ni PCR pristransko | odvisna od poznavanja tarčne sekvene, nemogoče identificirati nove mikrobne vrste, običajno omejena le na nekaj filogenetskih skupin nižjega taksonomskega ranga |
| DNK mikromreže | hibridizacija fluorescentno označene oligonukleotidne sonde s komplementarno tarčno tarčno, fluorescenco zaznamo za laserjem | filogenetska identifikacija, semi-kvantitativna, ni PCR pristransko | navzkrižna hibridizacija, PCR pristransko, težavna detekcija maloštevilnih vrst |
| sekvinciranje 16S rRNA klonov | kloniranje celotnega 16S rRNA gena, sekvinciranje po Sangerju | filogenetska identifikacija, kvantitativna | PCR pristransko, draga, zahtevna, napake pri kloniraju |
| sekvinciranje gena za 16S rRNA | sekvinciranje delov 16S rRNA pomnožkov s tehnologijo NGS (sekekvenciranje naslednje generacije <i>angl. next generation sequencing</i>) npr. 454 pirosekvenciranje | filogenetska identifikacija, kvantitativna, hitra, identifikacija novih bakterijskih vrst | pristransko PCR, draga, zahtevna, relativno kratki pomnožki, nezanesljiva filogenetska identifikacija |
| naključno sekvinciranje mikrobioma | sekvinciranje naključnih delov celotnih genomov s tehnologijo NGS (sekekvenciranje naslednje generacije <i>angl. next generation sequencing</i>) npr. 454 pirosekvenciranje, Illumina, Solid | filogenetska identifikacija, kvantitativna | draga, relativno kratki pomnožki, nezanesljiva filogenetska identifikacija analiza rezultatov je računalniško zahtevna |

* DGGE (*angl. denaturing gradient gel electrophoresis*) – poliakrilamidna gelska elektroforeza v gradientu denaturanta; TGGE (*angl. temperature gradient gel electrophoresis*) – gelska elektroforeza v temperaturnem gradientu; T-RFLP (*angl. terminal restriction fragment lenght polymorphism*) – restrikcijski polimorfizem dolžine končnih fragmentov; FISH (*angl. fluorescent in situ hybridization*) – fluorescentna *in situ* hibridizacija

2.7 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Pri običajni verižni reakciji s polimerazo ali PCR lahko nastali produkt pomnoževanja kvantificiramo šele po zadnjem ciklu reakcije (Mullis, 1990). Teoretično sicer obstaja povezava med številom tarč DNK za pomnoževanje v začetku in količino nastalega PCR produkta v kateremkoli ciklu reakcije, vendar je v resnici pomnoževanje eksponentno samo do določene točke. Med poznnimi cikli reakcije namreč pride do tako imenovanega »efekta platoja«, ko pomnoževanje ne poteka več eksponentno, saj nekatere komponente reakcijske mešanice postanejo limitirajoče (količina začetnih oligonukleotidov, aktivnost polimeraze, količina dNTP-jev), zato je točna kvantifikacija vstopnega materiala pri PCR nemogoča (Valasek in Repa, 2005).

Na drugi strani pa z metodo PCR v realnem času lahko spremljamo nastajanje produktov v vsakem ciklu reakcije PCR. S sledenjem reakciji med eksponentno fazo podvajanja DNK lahko določimo začetno koncentracijo tarčne DNK z veliko natančnostjo. Zaznavanje nastalih produktov reakcije omogoča uporaba fluorescentnih barvil, ki se nespecifično vgradijo v nastajajoče molekule dvoverižne DNK, ali z uporabo fluorescentno označenih začetnih oligonukleotidov ali sond, ki so komplementarni tarčnemu zaporedju. Naraščajoč signal fluorescence med reakcijo je direktno proporcionalen številu PCR produktov, ki nastajajo (Wittwer in sod., 1997; Valasek in Repa, 2005).

2.7.1 Absolutna kvantifikacija z umeritveno krivuljo

Za absolutno kvantifikacijo tarčne DNK v vzorcu na isti ploščici pomnožujemo vzorce in referenčni standard. Za izdelavo umeritvene krivulje potrebujemo vzorec z znano količino DNK, ki jo zaporedno redčimo v primernem koncentracijskem območju. Kot DNK standard lahko uporabimo rekombinantno plazmidno DNK, osamljeno genomsko DNK iz mikrobne kulture z znanim številom celic ali PCR produkt (Rutledge in Côté, 2003).

Graf umeritvene krivulje (*angl. standard curve*) je premica, ki prikazuje vrednosti Ct redčitev standarda v odvisnosti od logaritma količine DNK v redčitvi. Vrednost Ct (*angl. threshold cycle*) je cikel, pri katerem fluorescentni signal preseže arbitrarno postavljeni prag zaznave. Iz enačbe umeritvene krivulje lahko izračunamo količino tarčne DNK v vzorcih. Iz enačbe umeritvene krivulje lahko določimo tudi naklon premice (*angl. slope*), ki nam pove, kolikšna je učinkovitost pomnoževanja reakcije PCR. Kadar je naklon krivulje -3,32, je učinkovitost pomnoževanja 100 %. Iz enačbe umeritvene premice lahko določimo tudi odsek na osi Y (*angl. Y-intercept*), ki je teoretična limita detekcije reakcije oziroma Ct vrednost, ki jo pričakujemo pri najnižji vrednosti tarčne molekule, če bi bil signal pomnoževanja pri tej vrednosti signifikanten. Pomembna mera umeritvene krivulje je tudi korelacijski koeficient (R^2) (*angl. correlation coefficient*), ki ponazarja linearno povezanost standardne krivulje. Idealna vrednost R^2 je 1 (Life Technologies, 2012; Zhang in Fang, 2006).

2.7.2 Fluorescentni reporterji

Najpogosteje uporabljeni sistemi detekcije pri PCR v realnem času so SYBR Green I, sonde TaqMan (*angl.* TaqMan probe) in molekularne svetilke (*angl.* Molecular beacons).

SYBR Green I je nespecifično barvilo, ki se veže v mali greben dvojne vijačnice DNK (dsDNK). Nevezano barvilo v raztopini lo malo fluorescira, njegova fluorescanca pa se po vezavi močno poveča. Med potekom reakcije se barvilo veže v pomnožene odseke dvojerižne DNK in oddaja fluorescentni signal. Z vsakim ciklom nastaja več PCR produkta, zato narašča tudi signal fluorescence. Ker se barvilo veže nespecifično v DNK, je po koncu PCR reakcije potrebno nastanek želenega produkta preveriti z analizo talilne krivulje (*angl.* melting curve). Pri temperaturi taljenja (*angl.* melting temperature), ki je odvisna od dolžine in bazne sestave DNK molekule, dvojerižna DNK razpade, posledično se barvilo sprosti in fluorescanca ugasne. V primeru nespecifične vezave se barvilo veže v različne DNK molekule, ki imajo različne temperature taljenja, kar na grafu talilne krivulje opazimo kot več vrhov pri različnih temperaturah (Valasek in Repa, 2005).

Večjo specifičnost pomnoževanja dosežemo z uporabo tretjega oligonukleotida, ki se veže na regijo med mesti pomnoževanja obeh začetnih oligonukleotidov. Sonda TaqMan ima na 5' koncu kovalentno vezano fluorescentno barvilo oziroma poročevalce (*angl.* reporter) in na 3' koncu drugo fluorescentno barvilo oz. dušilec (*angl.* quencher). Kadar sta reporter in dušilec v neposredni bližini, dušilec absorbira fluorescentni signal reporterja. Med podaljševanjem verige DNK polimeraza s svojo 5'-3' eksonukleazno aktivnostjo razgradi sondu. S tem se v raztopino sprostita tudi reporter in dušilec, kjer sta dovolj oddaljena, da pride do fluorescence reporterskega barvila, ki jo merimo z detektorskim sistemom (Holland in sod., 1991; Valasek in Repa, 2005).

Podoben sistemu TaqMan sond je sistem molekularnih svetilk. Sonde imajo prav tako na 5' koncu fluorescentno barvilo in na 3' koncu dušilec. Na obeh koncih ima sonda še kratko komplementarno sekvenco, ki pri nizkih temperaturah omogoča hibridizacijo koncev, ustvari se struktura podobna lasnicu, ki zaradi bližine dušilca onemogoča fluorescenco reporterja. Osrednja regija sonde je komplementarna tarčni sekvenci produkta PCR, pri temperaturah naleganja sonda nalega na tarčno sekvenco, struktura lasnice se poruši in reportersko barvilo oddaja fluorescentni signal (Tyagi in Kramar, 1996; Zhang in Fang, 2006).

2.7.3 Interpretacija rezultatov PCR v realnem času

Pri vseh izvedbah PCR v realnem času inštrument meri naraščanje fluorescence med celotno reakcijo PCR, ki jih prikaže kot krivuljo pomnoževanja (*angl.* amplification plot). Med začetnimi cikli je spremembu v fluorescentnem signalu majhna in predstavlja ozadje reakcije. Da izločimo signal ozadja, definiramo bazno linijo (*angl.* baseline), ki je običajno postavljena med 3 in 15 ciklom. Signifikantno povišanje signala preko bazne linije določimo s pragom zaznave (*angl.* threshold), ki je običajno postavljen na začetek

eksponentne faze pomnoževanja. Ti dve meri program inštrumenta nastavi avtomatsko, lahko pa jih uporabnik korigira tudi ročno (Life Technologies, 2012).

Za zanesljivost rezultatov je pomembno ugotoviti učinkovitost pomnoževanja (*angl. efficiency*), ki jo izračunamo po spodnji enačbi:

$$učinkovitost = 10^{\left(\frac{-1}{naklon}\right)} - 1 \quad \dots(1)$$

Idealno je, če je učinkovitost pomnoževanja 100 %, kar pomeni, da se v eksponentni fazi PCR reakcije matrica DNK v vsakem ciklu podvoji. Običajno pa pomnoževanje tarčne DNK ni tako učinkovito. Pri okoljskih vzorcih lahko štejemo kvantifikacijo z reakcijo PCR v realnem času za zanesljivo, ko je vrednost korelacijskega koeficienta (R^2) umeritvene krivulje nad 0,95 in naklon krivulje med -3,0 in -3,9, kar ustreza učinkovitosti pomnoževanja med 80 % in 115 % (Zhang in Fang, 2006; Callbeck in sod., 2013).

Faktorji, ki lahko vplivajo na učinkovitost pomnoževanja, so dinamika reakcije, koncentracija reagentov, temperaturni in časovni profil, kvaliteta encima in prisotnost PCR inhibitorjev v okoljskih vzorcih (Life Technologies, 2012).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci

Vzorce črevesnih sluznic in vsebin debelega črevesa smo pridobili od prof. dr. Boruta Štabuca s Kliničnega oddelka za gastroenterologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani (UKC). Vzorci so bili odvzeti preiskovancem programa SVIT ob sumu na pojav sprememb na črevesni sluznici oziroma ob rutinskih kontrolnih pregledih preiskovancev. Opis vzorcev je naveden v prilogi A.

3.1.2 Bakterijski sevi

V preglednici 3 so našteti bakterijski sevi in gojišča, na katerih smo jih gojili.

Preglednica 3: Bakterijske skupine, bakterijski sevi in uporabljena gojišča ter atmosfera

| Bakterijska skupina | Bakterijski sev | Gojišče /atmosfera |
|--|---|----------------------|
| <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Escherichia coli</i> K12 | BHI/ CO ₂ |
| <i>Bacteroides-Prevotella</i> | <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> DSM 2079 | M2/ CO ₂ |
| <i>Clostridium leptum</i> (rRNK gruča IV) | <i>Clostridium leptum</i> DSM 753 | PYX/ N ₂ |
| <i>Clostridium coccoides</i> (rRNK gruča XIVa) | <i>Clostridium clostridioforme</i> CCUG 16791 | RCM/ CO ₂ |

3.1.3 Gojišča

Za pripravo tekočih gojišč smo uporabili sestavine, navedene v preglednicah 4 do 7. Za pripravo poltrdih gojišč smo tekočim gojiščem dodali 0,7 ut. % agarja.

Preglednica 4: Sestava gojišča BHI (Holdeman in sod., 1977)

| Sestavina | Koncentracija v gojišču | Koncentracija v raztopini | Proizvajalec |
|--------------------------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------|
| BHI bujon | 37 g/l | | Biolife, Italija |
| kvasni izvleček | 5,0 g/l | | Biolife, Italija |
| resazurin | 1,0 mg/l | | Fluka, Švica |
| cistein HClxH ₂ O | 0,5 g/l | | Sigma-Aldrich, ZDA |
| raztopina hemina | 1 vol. % | | |
| hemin | | 0,5 g/l | Sigma-Aldrich, ZDA |
| 1N NaOH | | 10 ml/l | Merck, Nemčija |
| vitamin K3 | 0,1 vol. % | | |
| vitamin K3 | | 1 g/l | Sigma-Aldrich, ZDA |
| 95 % etanol | | 99,9 vol. % | Sigma-Aldrich, ZDA |
| destilirana voda (dH ₂ O) | 98,9 vol. % | | |

Gojišče BHI smo pripravili tako, da smo Brain Heart Infusion bujon (Biolife, Italija), kvasni izvleček in resazurin med segrevanjem in mešanjem na magnetnem mešalu raztopili v destilirani vodi. Gojišče smo segrevali do vretja, nato smo ga odstavili, dodali cistein, gojišče ponovno hitro zavreli in ohladili. V ohlajeno gojišče smo dodali hemin in vitamin K3. Z dodajanjem 8M NaOH smo uravnali pH gojišča na 7,2, kar smo izmerili s pH metrom (Eutech, Singapur). Gojišče smo nato prepihovali s CO₂ dokler ni izginila rožnata barva indikatorja. Pod zaščitnim plinom (kisika prost CO₂) smo gojišče alikvotirali v Hungatove epruvete (Bellco Glass Inc, ZDA) in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

Preglednica 5: Sestava modificiranega gojišča M2 (Hobson, 1969)

| Sestavina | Koncentracija | | Proizvajalec |
|---|---------------|-------------|---------------------|
| | v gojišču | v raztopini | |
| tripton | 10 g/l | | Liofilchem, Italija |
| kvasni izvleček | 2,5 g/l | | Biolife, Italija |
| glukoza | 2,0 g/l | | Kemika, Hrvaška |
| celobioza | 2,0 g/l | | Calbiochem, Nemčija |
| topni škrob | 2,0 g/l | | Merck, Nemčija |
| NaHCO ₃ | 4,0 g/l | | Sigma-Aldrich, ZDA |
| cistein HClxH ₂ O | 1 g/l | | Sigma-Aldrich, ZDA |
| mineralna raztopina I | 15,0 vol. % | | |
| K ₂ HPO ₄ | | 3,0 g/l | Kemika, Hrvaška |
| mineralna raztopina II | 15,0 vol. % | | |
| KH ₂ PO ₄ | | 3,0 g/l | Merck, Nemčija |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | | 6,0 g/l | Merck, Nemčija |
| NaCl | | 6,0 g/l | Merck, Nemčija |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O | | 0,65 g/l | Merck, Nemčija |
| CaCl ₂ x 2H ₂ O | | 0,6 g/l | Merck, Nemčija |
| vampni sok | 30,0 vol. % | | |
| raztopina resazurina | 0,001 ut. % | | |
| destilirana voda (dH ₂ O) | 40 vol. % | | |

Za pripravo modificiranega gojišča M2 smo vse sestavine iz preglednice 5, razen cisteina, zavreli v destilirani vodi. Nato smo gojišče odstavili, mu dodali cistein, ponovno zavreli in ohladili med prepihovanjem s kisika prostim CO₂. Ko rožnata barva indikatorja ni bila več opazna, smo gojišče pod zaščitnim plinom razdelili v Hungatove epruvete in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

Preglednica 6: Sestava gojišča RCM

| Sestavina | Koncentracija | Proizvajalec |
|--------------------------------------|---------------|----------------|
| RCM Reinforced Clostridial Medium | 38 g/l | Merck, Nemčija |
| destilirana voda (dH ₂ O) | 100 vol. % | |

Gojišče RCM Reinforced Clostridial Medium smo pipravili po navodilu proizvajalca (Merck, Nemčija). Pod zaščitnim plinom (CO₂) smo ga alikvotirali v Hungatove epruvete in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

Preglednica 7: Sestava gojišča PYX

| Sestavina | Koncentracija | | Proizvajalec |
|---------------------------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| | v gojišču | v raztopini | |
| triptikazni pepton | 5,0 g/l | | Biolife, Italija |
| pepton | 5,0 g/l | | Biolife, Italija |
| kvasni izvleček | 10,0 g/l | | Biolife, Italija |
| maltoza | 10,0 g/l | | Merck, Nemčija |
| resazurin | 1,0 mg/l | | Fluka, Švica |
| solna raztopina | 4 vol % | | |
| CaCl ₂ x H ₂ O | | 0,25 g/l | Kemika, Hrvaška |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O | | 0,50 g/l | Merck, Nemčija |
| K ₂ HPO ₄ | | 1,00 g/l | Merck, Nemčija |
| KH ₂ PO ₄ | | 1,00 g/l | Kemika, Hrvaška |
| NaHCO ₃ | | 10,0 g/l | Merck, Nemčija |
| NaCl | | 2,00 g/l | Merck, Nemčija |
| cistein HClxH ₂ O | 0,5 g/l | | Sigma-Aldrich, ZDA |
| destilirana voda (dH ₂ O) | 96 vol % | | |

Za pripravo gojišča PYX smo sestavine iz preglednice 7, razen cisteina, raztopili v destilirani vodi in ob stalnem mešanju na magnetnem mešalu zavreli. Po 1-minutnem vretju smo gojišče ohladili na sobno temperaturo s sočasnim preprihovanjem z N₂. Nato smo dodali cistein in uravnali pH gojišča na 7,0. Gojišče smo preprihovali z N₂, dokler ni izgubilo rožnate barve indikatorja in alikvotirali v Hungatove epruvete in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

3.1.4 Raztopine

Preglednica 8: Sestava uporabljenih raztopin

| Raztopina/Kemikalija | Sestava | Proizvajalec |
|-----------------------------|---|---|
| CTAB/NaCl | 10 ut. % CTAB 0,7 M NaCl | Sigma-Aldrich, ZDA Merck, Nemčija |
| LB pufer | 0,25 vol. % bromfenol 0,25 vol. % ksilen cianol 40 ut. % saharoze | Serva, Nemčija Sigma-Aldrich, ZDA Kemika, Hrvaška |
| TE pufer | 10mM Tris-HCl 1mM EDTA | Merck, Nemčija Merck, Nemčija |
| TBE pufer | 0,045 M Tris 0,045 M H ₃ BO ₃ 1 mM EDTA | Merck, Nemčija Merck, Nemčija Merck, Nemčija |

3.1.5 Pari začetnih oligonukleotidov

Preglednica 9: Uporabljeni pari začetnih oligonukleotidov

| Specifičnost | Oznaka* | Nukleotidno zaporedje 5'→3' | Mesto naleganja ** | Dolžina produkta | Vir |
|--|---|--|-------------------------------|---------------------|--|
| <i>Enterobacteriaceae</i> | Eco 1457F | CAT TGA CGT TAC CCG CAG AAG AAG C | 476-501 | 195 bp | Bartosch in sod., 2004 |
| | Eco 1652R | CTC TAC GAG ACT CAA GCT TGC | 645-666 | | |
| <i>Bacteroides-Prevotella</i> | Bac 303F | GAA GGT CCC CCA CAT TG | 301-318 | 418 bp | Bernhard in Field, 2000; Bartosch in sod., 2004 |
| | Bac 708R | CAA TCG GAG TTC TTC GTG | 707-725 | | |
| rRNK gruča <i>C. leptum</i> (IV) | S-* S-* -Clos-0561-a-S-17 -Clept-1129-1-A-17 | TTA CTG GGT GTA AAG GG TAG AGT GCT CTT GCG TA | 560-578 1128-1145 | 580 bp | Van Dyke in McCarthy, 2002 |
| rRNK gruča <i>C. coccoides</i> (XIVa) | g-Ccoc-F g-Ccoc-R | AAA TGA CGG TAC CTG ACT AA CTT TGA GTT TCA TTC TTG CGA A | 477-496 895-916 | 438-441 bp | Matsuki in sod., 2002 |
| Univerzalni bakterijski | EUB 338F EUB 518R | ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG ATTACC GCG GCT GCT GG | 338-358 518-534 | 180 bp | Fierer in sod., 2005 |
| Univerzalni bakterijski | Klindworth F Klindworth R Klindworth R2 | CCT ACG GGN GGC WGC AG TAC NVG GGT ATC TAA TCC GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC | 341-357 785-802 785-805 | 464 bp 467 bp | Klindworth in sod., 2013 |
| Univerzalni bakterijski | Nadkarni F Nadkarni R | TCC TAC GGG AGG CAG CAG T GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT | 340-359 781-806 | 466 bp | Nadkarni in sod., 2002 |
| Univerzalni bakterijski | BactQuant F BactQuant R | CCT ACG GGD GGC WGC A GGA CTA CHV GGG TMT CTA ATC | 341-356 786-806 | 465 bp | Liu in sod., 2012 |

* F – kot forward; k 3' koncu obrnjen začetni oligonukleotid, R – kot reverse; k 5' koncu obrnjen začetni oligonukleotid , ** po *E. coli*

3.2 METODE

3.2.1 Odvzem in priprava vzorcev

Vzorci sluznic in vsebin debelega črevesa so bili odvzeti pacientom med kolonoskopsko preiskavo. Manjše polipoidne in nepolipoidne spremembe ($< 0,5$ cm) črevesne sluznice so bile odvzete s kleščicami na potisk ali z zanko brez elektrokavterizacije. Večje polipoidne in sesilne spremembe ($> 0,5$ cm) pa so bile odstranjene z zanko z elektrokavterizacijo in nato v laboratoriju aseptično razdeljene na približno 30 mg težke vzorce. Med preiskavo je kolonoskopist približno 10 cm od tumorsko spremenjene črevesne sluznice odvzel vzorce nespremenjene črevesne sluznice, ki so bili težki približno 15 mg in so imeli površino do 6 mm². Pri nekaterih preiskovancih so bili iz debelega črevesa aspirirani tudi vzorci črevesnih vsebin. Vzorci sluznic in črevesnih vsebin so bili takoj po odvzemu preneseni v sterilne mikrocentrifugirke z navojem, ki so vsebovale 50 µl pufra TE, ter do uporabe shranjeni pri -80 °C.

3.2.2 Priprava bakterijskih kultur

Vse naštete seve iz preglednice 3 smo gojili v plinotesnih Hungatovih epruvetah z 8 ml tekočega gojišča po Bryantovi modifikaciji Hungatove metode (Bryant, 1972). Za shranjevanje sevov pri -20 °C smo uporabljali Hungatove epruvete s 7 ml poltrdega gojišča. Cepitev kulture v tekoče gojišče je potekala pod zaščitnim plinom (kisika prost CO₂ ali N₂). Zaprte epruvete smo inkubirali pri 37 °C in spremljali rast bakterijske populacije z merjenjem optične gostote v enournih ali daljših časovnih intervalih. Optično gostoto smo merili s spektrofotometrom Novaspec II (Biochrom, Velika Britanija) z izsevanjo svetlobe valovne dolžine 654 nm. Za umerjanje spektrofotometra smo uporabljali sterilna gojišča. Povečanje števila bakterijskih celic smo grafično prikazali z rastnimi krivuljami, iz katerih smo ugotovili čas, ko je bila bakterijska kultura v pozni eksponentni fazì rasti. V tej fazì smo rast bakterij ustavili in celice prešteli pod mikroskopom.

3.2.3 Direktno štetje celic pod mikroskopom

Za štetje bakterijskih celic smo 8 ml tekoče bakterijske kulture v pozni eksponentni fazì rasti centrifugirali (10 minut, 3.000 vrt./min) v centrifugi CENTRIC 322A (Tehntica, Slovenija). Nato smo celice sprali v 2 ml fiziološke raztopine in centrifugirali (10 minut, 3.000 vrt./min). Celice smo nato resuspendirali v 2 ml fiziološke raztopine. Od te količine smo vzeli 0,5 ml suspenzije in jo 10-krat redčili v fiziološki raztopini. 5 ml raztopine smo alikvotirali v 5 sterilnih mikrocentrifugirk po 1 ml.

Za štetje pod mikroskopom smo vsebino ene mikrocentrifugirke redčili do ustrezone stopnje, da smo v enem kvadratu števne komore videli 5 do 15 celic. Celice smo šteli pri 400-kratni povečavi mikroskopa Olympus BX50 (Olympus, Japonska) v števni komori Improved Neubauer (Laboroptik, Velika Britanija). Prešteli smo celice v petih kvadratih ter izračunali povprečje števila celic v enem kvadratu. Volumen suspenzije v enem

kvadratu smo izračunali glede na dimenzijske stevne kvadra ($0,2 \times 0,2 \times 0,02 \text{ mm}^3$). Število celic v enem mililitru smo po navodilih proizvajalca izračunali s pomočjo spodnje enačbe.

$$\frac{\text{število celic}}{\text{ml}} = \frac{\text{povprečno št. celic v enem kvadru}}{\text{volumen kvadra}} \times \text{faktor redčitve} \quad \dots(2)$$

3.2.4 Osamitev skupne mikrobne DNK

Skupno mikrobno DNA smo osamili iz vzorcev črevesnih sluznic in črevesnih vsebin ter iz bakterijskih suspenzij z znanim številom celic. Uporabili smo postopek, ki je vključeval fizikalno razbijanje celic z ultrazvočnim razbijalcem in čiščenje osamljene DNA s kloroformom oziroma mešanico fenol:kloroform 25:24.

1 ml bakterijske suspenzije z znanim številom celic smo najprej razdelili v dve paralelki po 500 µl. V primeru bakterijskega seva *E.coli* smo skupno mikrobno DNA osamili iz 0,8 ml suspenzije, ki smo jo prav tako predhodno razpolovili na paralelki z volumnom 400 µl. Obe paralelki bakterijskih suspenzij smo nato sprali v 500 µl pufra TE in centrifugirali (5 minut, $7.000 \times g$). Odstranili smo supernatant in pelet resuspendirali v 600 µl pufra TE.

Vzorce črevesnih sluznic in črevesnih vsebin smo brez predhodnega spiranja resuspendirali v 600 µl pufra TE. Nadaljnji postopki osamitve skupne mikrobne DNA so bili za bakterijske suspenzije in vzorce črevesnih sluznic in črevesnih vsebin enaki.

Vsebine mikrocentrifugirk smo v ultrazvočnemu razbijalcu Soniprep 150 (MSE, Velika Britanija) razbijali v treh ciklih s 30-sekundnim delovanjem in 15-sekundnim premorom. Ves čas delovanja ultrazvočnega razbijalca smo vzorce hladili na ledu. Razbite celice smo nato centrifugirali (8 minut, $12.000 \times g$) in supernatant prenesli v nove sterilne mikrocentrifugirke. Nato smo dodali 100 µl 5M NaCl (Merck, Nemčija), premešali in dodali še 80 µl CTAB/NaCl. Vsebino smo dobro premešali in v termobloku CH-100 BIOSAN (Chemas d.o.o., Slovenija) inkubirali 10 minut pri 65°C . Po inkubaciji smo vzorcem dodali enak volumen kloroforma (Merck, Nemčija) in centrifugirali (10 minut, $12.000 \times g$). Vodno fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko z mešanico fenol:kloroform:izoamilalkohol 25:24:1, pH 8,0 (Calbiochem, ZDA). Nato smo vzorce ponovno centrifugirali (10 minut, $12.000 \times g$). Ekstrakcijo smo še enkrat ponovili z dodatkom kloroforma. DNA smo oborili z 0,6 volumna izopropanola (Merck, Nemčija) in centrifugirali (5 minut, $14.000 \times g$). Odstranili smo supernatant in oborjeno DNA sprali s 500 µl 70 % etanola (Merck, Nemčija). Centrifugirali smo (5 minut, $14.000 \times g$) in ves etanol odstranili. Osamljeno DNA smo osušili ob gorilniku in resuspendirali v 50 µl pufra TE. Ves čas postopka osamitve DNA, razen v stopnjah ekstrakcije, smo vzorce in pufre hladili na ledu ter centrifugirali v ohlajeni centrifuggi MIKRO 200R (Hettich, Nemčija) pri 4°C .

3.2.5 Priprava evkariontskih celic in osamitev DNK iz celic Caco-2

Evkariontski DNK so nam odstopili na Katedri za mlekarstvo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Evkariantska DNA je bila osamljena iz celične linije Caco-2 (ATCC HTB 37). Celice Caco-2 so celice humanega adenokarcinoma debelega črevesa.

Celice Caco-2 so gojili v gojišču DMEM (Life Technologies, ZDA) z dodatkom 10 % FBS (Life Technologies, ZDA) in 0,1 % gentamicina (GE Healthcare, Anglija) ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$). Celice so odmrznili v 31. pasaži. Do 34. pasaže so celice gojili v polistirenskih plastenkah s površino 75 cm^2 (Sarstedt, Nemčija). V času gojenja so gojišče menjali dvakrat tedensko. V 35. pasaži so celice (s koncentracijo 7×10^4 celic/ml) nasadili v vdolbinice s površino $1,12 \text{ cm}^2$. Po približno enem tednu, ko so celice dosegle konfluentno fazo rasti, so izvedli postopek tripsinizacije, tj. postopek odlepljanja celic enoslojne kulture z dna gojitvene posode z encimom tripsinom, in celice prešteli pod mikroskopom. Celice so centrifugirali ($900 \times \text{rpm}$, 10 minut) in po centrifugiranju supernatant odstranili in iz peletiranih celic osamili evkariontski DNA. Uporabili so aparat za avtomatizirano osamitev DNA Maxwell® 16 Instrument (Promega, ZDA). Pripravljenim peletiranim celicam so dodali $500 \mu\text{l}$ $1 \times$ pufra TE. Nato so celice resuspendirali in jih prenesli v kartušo Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit (Promega, ZDA). DNA so raztopili v $300 \mu\text{l}$ elucijskega pufra po navodilih proizvajalca.

3.2.6 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Z metodo PCR smo pomnoževali različne odseke genov za 16S rRNK tarčnih filogenetskih bakterijskih skupin. Uporabljali smo pare začetnih oligonukleotidov, ki so našteti v preglednici 9.

Za vsak vzorec smo v komori DNA in RNA FREE CHAMBER (Biosan, Latvija) pripravili reakcijsko mešanico. Skupni volumen reakcijske mešanice je bil $20 \mu\text{l}$ in je vseboval 2 mM MgCl_2 (Thermo Scientific, ZDA), $1 \times$ *Taq* pufer + KCl- MgCl_2 (Thermo Scientific, ZDA), $0,2 \text{ mM}$ mešanice deoksinukleotid trifosfatov (Thermo Scientific, ZDA), $0,2 \mu\text{M}$ začetnih oligonukleotidov (Microsynth, Švica), $0,045 \text{ U}/\mu\text{l}$ DNA polimeraze *Taq* (Thermo Scientific, ZDA), vodo (Sigma-Aldrich, ZDA) in $1 \mu\text{l}$ matrice DNA.

PCR reakcije smo izvajali v cikličnem termostatu MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad, ZDA) ali SuperCycler (Kyratec, Avstralija). Pri vseh programih, ki so navedeni v preglednici 10, sta bila dodana še dva dodatna koraka: začetna denaturacija bakterijske DNA (95°C , 3 minute) in končno podaljševanje (72°C , 5 minut).

Preglednica10: PCR programi za tarčne bakterijske filogenetske skupine in za dva para univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov

| Specifičnost | Temperatura (°C) in čas (s) | | | Število ciklov |
|--|-----------------------------|-------------|--------------|----------------|
| | denaturacija | naleganje | pomnoževanje | |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | 95 °C, 30 s | 63 °C, 30 s | 72 °C, 20 s | 35 |
| <i>Bacteroides-Prevotella</i> | 95 °C, 30 s | 62 °C, 30 s | 72 °C, 30 s | 35 |
| <i>Clostridium leptum</i> (rRNA gruča IV) | 94 °C, 60 s | 60 °C, 60 s | 72 °C, 60 s | 40 |
| <i>Clostridium coccoides</i> (rRNA gruča XIVa) | 94 °C, 20 s | 50 °C, 20 s | 72 °C, 50 s | 35 |
| Univerzalni bakterijski (EUB 338F+ 518R) | 95 °C, 60 s | 53 °C, 15 s | 60°C, 60 s | 40 |
| Univerzalni bakterijski (Nadkarni F+R) | 95 °C, 20 s | 60 °C, 20 s | 72 °C, 30 s | 30 |

3.2.7 Agarozna gelska elektroforeza

Uspešnost osamitve mikrobne DNK in velikost dobljenih PCR produktov smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Gel smo pripravili tako, da smo agarozo SeaKem, LE (Lonza, ZDA) raztopili v $0,5 \times$ TBE pufru. Vzorcem smo pred nanašanjem na gel dodali pufer za nanašanje vzorcev (LB, *angl.* loading buffer). Za oceno velikosti produktov pomnoževanja smo uporabili velikostni standard GeneRuler™ 1 KB DNA Ladder (Thermo Scientific, ZDA). Elektroforeza je potekala v elektroforeznici MINI-SUB in WIDE MINI-SUB CELL GT (Bio-Rad, ZDA) pri konstantni napetosti 10 V/cm v $0,5 \times$ TBE pufru. Po končani elektroforezi smo gele inkubirali 10 minut v raztopini etidijevega bromida (SigmaAldrich, ZDA) s koncentracijo 1 µg/ml in nato 20 minut spirali v destilirani vodi. Gele smo fotografirali z napravo Gel Doc v programu Molecular analyst™ 1.5 (BioRad, ZDA).

3.2.8 Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR)

Z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) smo ugotavljali število bakterij preučevanih bakterijskih skupin v vzorcih črevesnih sluznic in črevesnih vsebin. Pri tem smo uporabili vzpostavljene sisteme qPCR za kvantifikacijo mikrobiote blata (Matijašić in sod., 2014).

Reakcijske mešanice s končnim volumnom 20 µl so vsebovale 10 µl univerzalne mešanice za PCR KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal (Kapa biosystems, ZDA), 0,4 µl barvila ROX (pasivno referenčno barvilo za qPCR, Kapa biosystems, ZDA), 0,2 µM začetnih oligonukleotidov in 5 µl DNK matrice. Univerzalna mešanica za qPCR vsebuje integrirana protitelesa za vroč začetek reakcije, SYBR® Green I fluorescenčno barvilo, MgCl₂, vse 4 dNTP-je in stabilizatorje.

15 µl pripravljene reakcijske mešanice smo nanesli na optično ploščico MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, ZDA) in dodali 5 µl redčenega vzorca (osamljene in ustrezno redčene DNK). Vsak vzorec smo na ploščico nanesli v treh

paralelkah. Za kontrolo kontaminacije NTC (*angl. »no template control«*) sestavin reakcijske mešanice smo na izbrana mesta v optični ploščici namesto vzorca dodali 5 µl sterilne H₂O (Sigma-Aldrich, ZDA). Ploščico smo prekrili s samolepilno folijo, centrifugirali 1 minuto pri 15.000 × g in jo vstavili v ciklični termostat ViiA™ 7 Real Time PCR System (Applied Biosystems, ZDA). Za računalniško spremeljanje in obdelavo podatkov smo uporabljali pripadajoč program ViiA™ 7 Software v 1.2.2 (Applied Biosystems, ZDA).

Pomnoževanje smo začeli s korakom začetne denaturacije in aktivacije polimeraze 10 minut pri 95 °C, razen pri pomnoževanju s parom univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov Nadkarni F+R, kjer je začetni korak trajal 2 minuti pri 95 °C. Sledili so PCR programi za pomnoževanje tarč, ki so bili enaki kot opisani v podpoglavlju 3.2.6. Specifičnost pomnoževanja smo po zadnjem ciklu PCR reakcije preverili s talilno krivuljo. Fluorescenco smo spremljali pri zadnjem koraku disociacije nastalih PCR produktov, v katerem smo s hitrostjo 0,05 °C/sekundo segrevali vzorce od 60 °C do 95 °C.

Število bakterij posamezne bakterijske skupine smo podajali relativno na skupno število bakterij v vzorcih. Število bakterij tarčnih bakterijskih filogenetskih skupin smo ugotavljeni z reakcijami qPCR, v katerih smo uporabili pare začetnih oligonukleotidov, specifičnih za skupine *Bacteroides-Prevotella*, *C. leptum* (rRNK gruča IV), *C. coccoides* (rRNK gruča XIVa) in *Enterobactericeae*. Za ugotavljanje skupnega števila bakterij smo uporabljali qPCR s paroma univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov EUB 338F+518R in Nadkarni F+R.

Umeritvene krivulje za qPCR reakcije smo pripravili iz serijsko redčene osamljene DNK iz znanega števila celic bakterijskih čistih kultur (rezultati so predstavljeni v prilogi C). Za ugotavljanje števila bakterij filogenetskih skupin smo kot standarde za umeritvene krivulje uporabili serijsko redčeno osamljeno DNK bakterijskega seva pripadajoče skupine. Za ugotavljanje skupnega števila bakterij v vzorcih smo na ploščico nanesli vse štiri standarde in za izračun skupnega števila bakterij iz umeritvene krivulje definirali enak standard kot pri skupini. DNK smo redčili v koncentracijskem območju 10³ do 10⁷ celic/µl (*B. thetaiotaomicron*, *C. leptum*, *C. clostridioforme*) oziroma 10² do 10⁶ celic/µl (*E. coli*).

3.2.9 Obdelava rezultatov qPCR reakcij

Rezultat qPCR reakcije je bilo število celic v reakcijski mešanici, ki ga je program ViiA Software izračunal avtomatsko glede na definirano število celic v standardu. Najprej smo rezultate izvozili v program Excel, nato smo za vsako qPCR reakcijo posebej definirali dve vrednosti, cikel spodnje meje detekcije qPCR reakcije (C_t_{LLD}) ter število celic v reakcijski mešanici pri tem ciklu (Q_{LLD}).

Kot spodnjo mejo detekcije qPCR reakcije oziroma cikel spodnje meje detekcije Ct_{LLD} (*angl. lower limit of detection*) smo določili signal, ki smo ga zaznali 3 cikle pred signalom negativne kontrole NTC (Ct_{NTC}).

$$Ct_{LLD} = (Ct_{NTC} - 3) \quad \dots(3)$$

Število celic v reakcijski mešanici pri spodnji meji detekcije qPCR reakcije smo izračunali po enačbi,

$$\log(Q_{LLD}) = \frac{Ct_{vzorca} - b}{m} \quad \dots(4)$$

kjer je Q_{LLD} – število celic v reakcijski mešanici pri spodnji meji detekcije, Ct_{vzorca} – Ct vrednost vzorca, b – presek y osi in m – naklon premice umeritvene krivulje. Vrednost Q_{LLD} smo izračunali z antilogaritmiranjem.

Vzorci, ki so bili pod spodnjo mejo detekcije qPCR reakcije za ugotavljanje skupnega števila bakterij oziroma so imeli Ct vrednost večjo ali enako Ct vrednosti pri spodnji meji detekcije reakcije ($Ct_{vzorca} \geq Ct_{LLD}$), so bili iz nadaljnje analize izločeni. Za te vzorce smo sklepali, da ne vsebujejo bakterijske DNK oziroma da je bila osamitev bakterijske DNK iz vzorca neuspešna.

Vzorcem, ki so bili pod spodnjo mejo detekcije qPCR reakcije za ugotavljanje števila bakterij filogenetskih skupin oziroma so imeli Ct vrednost večjo ali enako Ct vrednosti pri spodnji meji detekcije reakcije ($Ct_{vzorca} \geq Ct_{LLD}$), smo pripisali vrednost ene polovice števila celic v reakcijski mešanici pri spodnji meji detekcije ($\frac{1}{2} Q_{LLD}$). Rezultate qPCR reakcij smo na tak način obdelali za potrebe statistične analize. Te rezultate pa smo nato uporabili tudi za vse izračune in za grafičen prikaz.

Za izračun števila celic v vzorcih črevesnih sluznic oziroma črevesnih vsebin smo število celic v reakcijski mešanici množili s faktorjem redčitve (R), za katerega smo redčili vzorec, in z volumnom pufra TE, v katerem smo raztopili osamljeno bakterijsko DNK.

$$\text{št. celic v vzorcu} = \text{št. celic v reakc. mešanici} \times R \times \text{volumen TE} \quad \dots(5)$$

Da bi izničili vpliv različne učinkovitosti osamitve bakterijske DNK iz vzorcev, smo izračunali relativno število oziroma delež posamezne skupine od skupnega števila bakterij v vzorcih. Skupno število bakterijskih celic v vzorcu smo definirali za vsako od štirih skupin posebej, saj smo kot umeritveno krivuljo uporabili isto raztopino DNK kot pri posamezni skupini. Delež posamezne bakterijske skupine smo izračunali s pomočjo spodnje zvezе.

$$\text{rel. št. celic v vzorcu} = \frac{\text{št. celic v vzorcu}}{\text{skupno št. bakt. celic v vzorcu}} \times 100 \quad \dots(6)$$

Pri pacientih, kjer smo imeli več vzorcev nespremenjene ali tumorsko spremenjene sluznice, smo izračunana relativna števila celic v vzorcu povprečili.

Grafično smo rezultate prikazali kot strukturo mikrobiote, sestavljeni iz deležev štirih preučevanih bakterijskih skupin. Prav tako smo grafično predstavili stopnjo spremembe relativnega števila celic v tumorsko spremenjenih vzorcih in vzorcih črevesnih vsebin glede na relativno število bakterij v nespremenjenih vzorcih. Stopnjo spremembe smo izračunali po spodnji enačbi:

$$\text{stopnja spremembe} = \frac{\text{rel. št. celic v tumorskem vzorcu ali vzorcu črevesnih vsebin}}{\text{rel. št. celic v nespremenjenem vzorcu}} \quad \dots(7)$$

Standardne odklone (SD) smo izračunali, kot je opisal Hogan (2006).

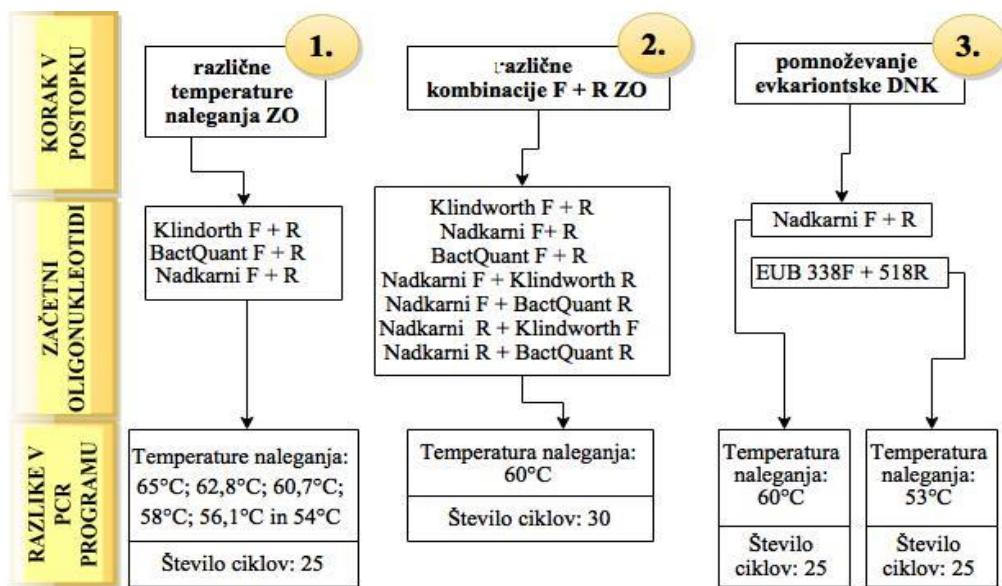
3.2.10 Statistična analiza rezultatov

Da bi ugotovili, ali se povprečna vrednost relativnega števila bakterij posamezne skupine iz vzorcev nespremenjene sluznice statistično značilno razlikuje od relativnega števila bakterij posamezne skupine iz vzorca tumorsko spremenjene sluznice pri posameznem pacientu, smo rezultate statistično ovrednotili. Za ugotavljanje razlik med skupinama vzorcev, ki so bile normalno porazdeljene, smo uporabili parni t-test. Za spremenljivke, ki niso bile normalno porazdeljene, pa smo naredili Wilcoxon test.

4 REZULTATI

4.1 ISKANJE NAJPRIMERNEJŠEGA PARA UNIVERZALNIH BAKTERIJSKIH ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV ZA UGOTAVLJANJE SKUPNEGA ŠTEVILA BAKTERIJ

Za ugotavljanje skupnega števila bakterij v vzorcih smo najprej uporabili par začetnih oligonukleotidov EUB 338F+518R. Ker je bil seštevek deležev štirih preučevanih bakterijskih skupin v več kot 80 % vzorcev manjši od 10 %, smo domnevali, da je ocenjeno skupno število bakterij v vzorcih precenjeno. Znano je namreč, da par univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov EUB 338F+518R nalega na in pomnožuje tudi evkariotsko (gostiteljevo) DNK (Huys in sod., 2008), ki je bila v vzorcih prisotna v precejšnjem deležu in najverjetneje osamljena skupaj z bakterijsko DNK. Da bi preverili to domnevo, smo preizkusili tri teoretično boljše pare začetnih oligonukleotidov Nadkarni F+R (Nadkarni in sod., 2002), Klindworth F+R (Klindworth in sod., 2013) in BactQuant F+R (Liu in sod., 2012). Na sliki 2 je prikazana shema opravljenih PCR reakcij.



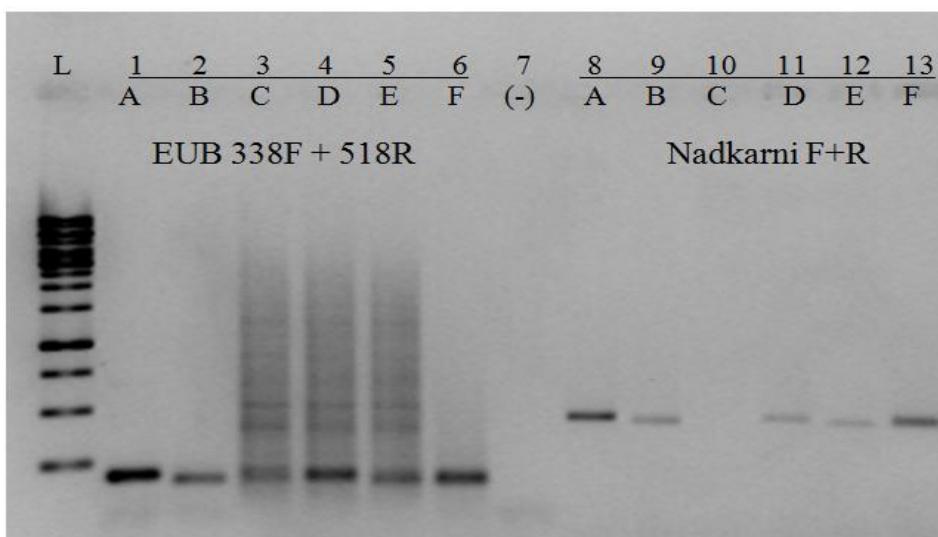
Slika 2: Shema opravljenih PCR reakcij v postopku iskanja najprimernejšega para univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov (ZO).

V vseh korakih, ki so predstavljeni na shemi, smo PCR program začeli s korakom začetne denaturacije DNK (95 °C, 2 minuti). Sledilo je različno število ciklov s tremi stopnjami: denaturacija (95 °C, 20 sekund), naleganje (temperature navedene v shemi, 20 sekund) in pomnoževanje (72 °C, 30 sekund). Na koncu je sledil korak končnega podaljševanja (72 °C, 5 minut). Reakcijske mešanice so bile enake kot opisane v poglavju Materiali in metode 3.2.6. Nastanek PCR produktov smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo, kot opisano v poglavju Materiali in metode (3.2.7).

V prvem koraku postopka smo preverili vpliv sedmih različnih temperatur naleganja treh novo preizkušenih parov začetnih oligonukleotidov na učinkovitost pomnoževanja odsekov gena za 16S rRNA osamljene bakterijske DNK. Ugotovili smo, da pri danih temperaturah in časih naleganja dobro pomnožuje tarčno sekvenco le par Nadkarni F+R, najbolje pri temperaturi naleganja 60 °C (rezultati niso predstavljeni).

V drugem koraku smo želeli preveriti, če kateri začetni oligonukleotid od izbranega para ne deluje optimalno, zato smo kombinirali pare med sabo in uporabili sedem različnih kombinacij parov začetnih oligonukleotidov Forward (F) in Reverse (R), pri čemer smo ponovno ugotovili, da je najučinkovitejša kombinacija par začetnih oligonukleotidov Nadkarni F+R (rezultati niso prikazani).

V tretjem koraku smo v PCR reakciji dodajali osamljeno evkariontsko DNA ali osamljeno bakterijsko DNA ali mešanice obeh v količinskem razmerju 1:1 in preverjali učinkovitost pomnoževanja odsekov DNA s parom začetnih oligonukleotidov EUB3 338F+518R in s parom Nadkarni F+R. DNA smo redčili do stopnje, ki je ustrezala koncentracijskemu območju DNA v vzorcih. Nastanek PCR produktov smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Rezultati so predstavljeni na sliki 3.



Slika 3: Agarozna gelska elektroforeza PCR produktov, nastalih pri pomnoževanju odsekov gena za 16S rRNA s paroma začetnih oligonukleotidov EUB 338F+518R in Nadkarni F+R.

Števila 1–13 predstavljajo linije na gelu: L – velikostni standard; (–) – negativna kontrola. Matrica DNA dodana v reakcijsko mešanico je osamljena iz čistih bakterijskih kultur, vzorca P/TS in evkariontskih celic: A – *B. thetaiotaomicron*; B – *C. leptum*; C – evkariontska DNA; D – *B. thetaiotaomicron* + evkariontska DNA v količinskem razmerju 1:1; E – *C. leptum* + evkariontska DNA v količinskem razmerju 1:1; F – vzorec tumorsko spremenjene sluznice P/TS

Iz slike 3 je razvidno, da oba para začetnih oligonukleotidov učinkovito pomnožujeta odseke DNA, osamljene iz čistih bakterijskih kultur, medtem ko odseke osamljene evkariontske DNA pomnožuje le par EUB 338F+518R. Tako pri evkariontski DNA kot pri mešanici bakterijske in evkariontske DNA ter pri DNA, osamljeni iz vzorca tumorsko

spremenjene sluznice, je pri paru EUB 338F+518R prišlo do nespecifičnega pomnoževanja več odsekov različnih dolžin, kar lahko na gelu opazimo kot večje število nastalih elektroforetskih lis. Pri paru Nadkarni F+R pa na drugi strani na gelu vedno opazimo le en produkt. Elektroforetske lise so pri paru Nadkarni F+R manj izrazite, kar pomeni, da je količina nastalega produkta manjša.

4.2 PRIMERJAVA DVEH qPCR SISTEMOV ZA UGOTAVLJANJE SKUPNEGA ŠTEVILA BAKTERIJ V VZORCIH ZZNANO KOLIČINO BAKTERIJSKE IN EVKARIOTSKE DNK

Da bi ugotovili, v kolikšni meri para univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov EUB 338F+518R in Nadkarni F+R pomnožujeta bakterijsko in evkariantsko DNA, smo naredili dve qPCR reakciji, pri čemer smo enkrat vzorce pomnoževali z enim parom začetnih oligonukleotidov in drugič z drugim. Pri obeh reakcijah smo v reakcijske mešanice dodajali znane količine bakterijske in evkariantske DNA, podane v številu kopij tarčne DNA.

Število kopij tarčne DNA smo ocenili po naslednjem postopku. Iz znane velikosti genoma organizma (v Mb) in molekularne teže baznega para ($660 \text{ Da} \times 1,09 \times 10^{-12} \text{ ng}$) smo izračunali maso genoma (v ng). Glede na koncentracijo DNA v vzorcu, ki smo jo izmerili spektrofotometrično z napravo NanoVue™ (GE Healthcare LifeSciences), smo izračunali, koliko genomov je v $1 \mu\text{l}$ raztopine DNA. Nato smo dobljeno število zmnožili s številom operonov 16S rRNA za bakterijski sev oziroma s številom kopij mitohondrijske 16S rDNA za evkariantske celice.

Pri izračunu števila kopij tarčne evkariantske DNA smo predpostavili, da ima diploidna evkariantska celica, poleg genoma, 2.500 kopij mitohondrijske 16S rDNA. Število kopij mitohondrijske DNA smo ocenili iz podatka, da lahko celica vsebuje tudi do 1.000 mitohondrijev (Cooper in Hausman, 2007), pri čemer smo upoštevali srednjo vrednost. Vsak mitohondrij pa vsebuje od 2 do 10, v povprečju 5 (Satoh in Kuroiwa, 1991), kopij mitohondrijske DNA. Ker je v primerjavi z jedrno DNA kopij mitohondrijske DNA veliko več, smo število kopij jedrne DNA zanemarili.

Preglednica 11: Ocenjeno število kopij tarčne bakterijske in evkariantske DNA

| | Velikost genoma [Mb]* | Masa genoma [ng] | Konc. DNA [ng/μl] | Število genomov/μl | Število operonov 16S rRNA**# | Število kopij tarčne DNA/μl |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------------|
| <i>B. thetaiotaomicron</i> | 6,29 | $6,86 \times 10^{-6}$ | 79,5 | $1,16 \times 10^7$ | 6 | $6,96 \times 10^7$ |
| <i>C. leptum</i> | 3,27 | $3,56 \times 10^{-6}$ | 12,8 | $3,59 \times 10^6$ | 9 | $3,23 \times 10^7$ |
| <i>C. clostridioforme</i> | 5,752 | $6,27 \times 10^{-6}$ | 20,0 | $3,19 \times 10^6$ | 9 | $2,87 \times 10^7$ |
| <i>E. coli</i> | 4,6 | $5,01 \times 10^{-6}$ | 31,0 | $6,18 \times 10^6$ | 7 | $4,33 \times 10^7$ |
| evkariantska DNA | 6400 | $6,98 \times 10^{-3}$ | 38,0 | $5,45 \times 10^3$ | 2500 | $1,36 \times 10^7$ |

*= vir NCBI, **= vir baza podatkov rrndb (Klappenbach in sod., 2001)

#= po delovni hipotezi je ob enem evkariantskem genomu prisotnih 2.500 kopij mitohondrijske 16S rDNA

V reakcijske mešanice smo dodajali bodisi samo bakterijsko DNK ali samo evkariontsko DNK, bodisi mešanice bakterijske in evkariontske DNK v potencialnih razmerjih tarčnih kopij 1:1, 1:5, 1:10 in 1:100 glede na dve izbrani redčitvi bakterijske DNK. Redčitvi bakterijske DNK smo izbrali na podlagi umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili z osamljeno DNK bakterijskega seva *B. thetaiotaomicron* (Redčitev 1 = 111.317 kopij DNK/ μ l in Redčitev 2 = 22.263 kopij DNK/ μ l). Izbrani redčitvi sta ustrezali spodnjem rangu pričakovanih količin bakterijske DNK v vzorcih. Shema ocenjenih količin, ki smo jih dodajali v reakcijske mešanice, je predstavljena v preglednici 12. V prilogi H je količina DNK, ki smo jo dodajali v reakcijske mešanice poleg ocenjenega števila kopij tarčne DNK/ μ l, podana še v masi (ng/ μ l), ki smo jo izmerili spektrofotometrično.

Preglednica 12: Teoretično število kopij tarčne DNK, ki smo jih dodajali v reakcijske mešanice

| | Redčitev 1 | | Redčitev 2 | |
|---------------------------|---|--|---|--|
| | Bakterijska DNK (št. kopij/ μ l) | Evkariontska DNK (št. kopij/ μ l) | Bakterijska DNK (št. kopij/ μ l) | Evkariontska DNK (št. kopij/ μ l) |
| | EVK DNK (1 enota) | 108.945 | 21.789 | |
| EVK DNK (5 enot) | | 544.725 | | 108.945 |
| EVK DNK (10 enot) | | 1.089.450 | | 217.890 |
| EVK DNK (100 enot) | | 10.894.495 | | 2.178.899 |
| BAKT DNK (1 enota) | 111.317 | | 22.263 | |
| BAKT:EVK 1:1 | 111.317 | 108.945 | 22.263 | 21.789 |
| BAKT:EVK 1:5 | 111.317 | 544.725 | 22.263 | 108.945 |
| BAKT:EVK 1:10 | 111.317 | 1.089.450 | 22.263 | 217.890 |
| BAKT:EVK 1:100 | 111.317 | 10.894.495 | 22.263 | 2.178.899 |

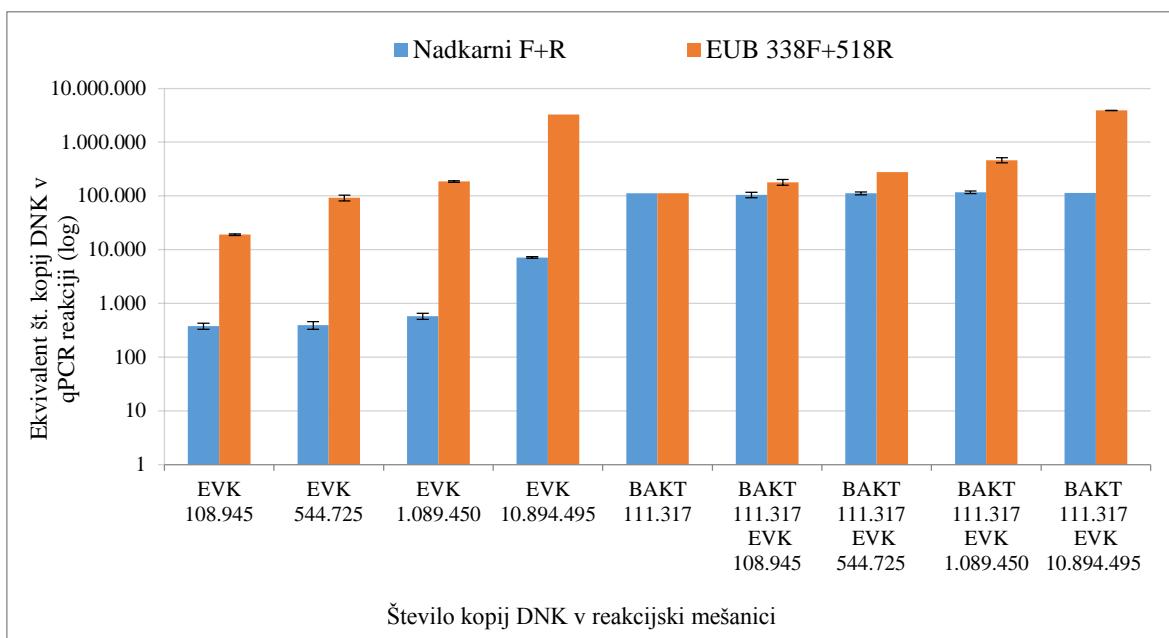
BAKT DNK – bakterijska DNK, EVK DNK – evkariontska DNK

V preglednici 13 so zbrani rezultati qPCR reakcij za obe redčitvi. Rezultat prestavlja povprečje dveh ponovitev na ploščici. Rezultati za obe ponovitvi s podano srednjo vrednostjo in standardno napako so zbrani v prilogi I. Na slikah 4 in 5 sta grafična prikaza rezultatov.

Preglednica 13: Rezultati qPCR reakcij pomnoževanja bakterijske DNK, evkariontske DNK in mešanic obeh v potencialnih razmerjih 1:1, 1:5, 1:10 in 1:100 s paroma univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov Nadkarni F+R in EUB 338F+518R

| | Redčitev 1 | | Redčitev 2 | |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Nadkarni F+R | EUB 338F+518R | Nadkarni F+R | EUB 338F+518R |
| EVK DNK (1 enota) | 378 | 19.038 | 559 | 4.434 |
| EVK DNK (5 enot) | 395 | 91.993 | 378 | 19.038 |
| EVK DNK (10 enot) | 578 | 185.109 | 820 | 26.258 |
| EVK DNK (100 enot) | 7.152 | 3.283.148 | 3.004 | 332.779 |
| BAKT DNK (1 enota) | 111.317* | 111.317* | 22.263** | 22.263** |
| BAKT:EVK 1:1 | 104.630 | 179.081 | 18.845 | 35.371 |
| BAKT:EVK 1:5 | 111.763 | 275.613 | 19.231 | 59.670 |
| BAKT:EVK 1:10 | 116.720 | 462.317 | 15.974 | 71.244 |
| BAKT:EVK 1:100 | 113.989 | 3.894.379 | 17.199 | 433.896 |

BAKT DNK – bakterijska DNK, EVK DNK – evkariontska DNK; *, ** – vrednosti 111.317 in 22.263 sta bili definirani kot standard za umeritveno krivuljo qPCR reakcije.

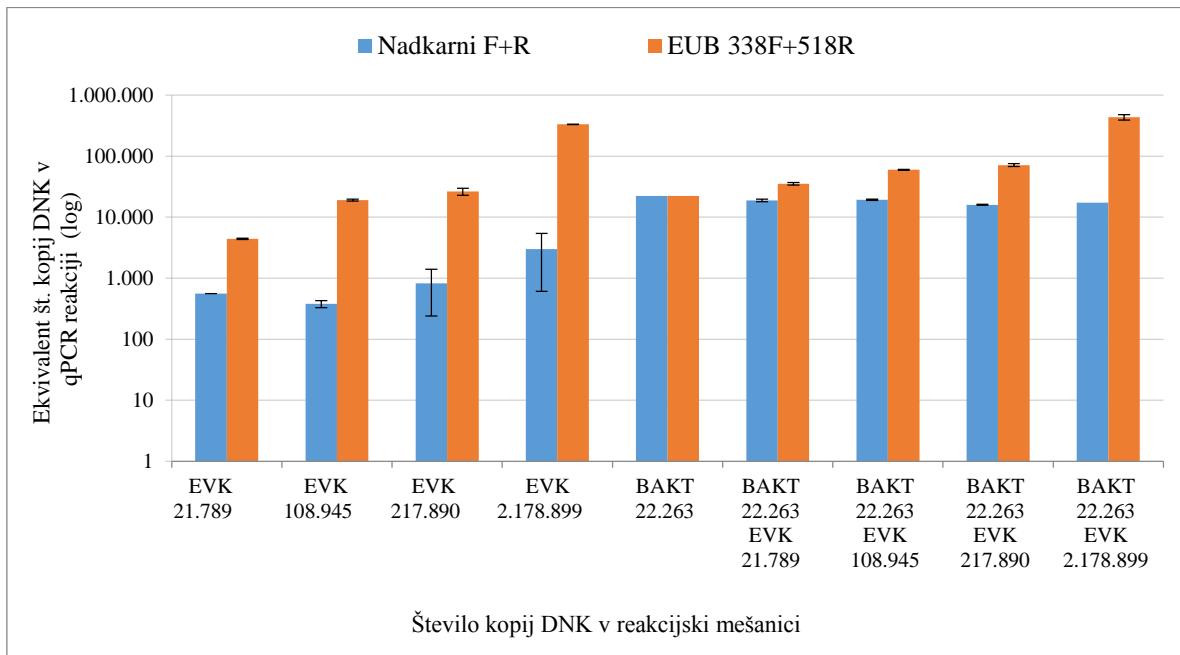


Slika 4: Redčitev 1: Grafični prikaz rezultatov qPCR reakcij s paroma univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov Nadkarni F+R (modri stolpci) in EUB 338F+518R (oranžni stolpcji). EVK – evkariantska DNK, BAKT – bakterijska DNK. Rezultati so zaradi laže ponazoritve prikazani na logaritemski skali.

Iz grafa na sliki 4 je razvidno, da pri pomnoževanju tarčnih odsekov iz same evkariantske DNK s parom začetnih oligonukleotidov EUB 338F+518R nastane večje število PCR produktov kot s parom Nadkarni F+R. Pri pomnoževanju s parom EUB 338F+518R smo pri dodatku ene enote evkariantske DNK zaznali 50-krat več, pri dodatku petih enot 233-krat več, pri dodatku desetih enot 320-krat več in pri dodatku stotih enot 459-krat več PCR produktov kot s parom začetnih oligonukleotidov Nadkarni F+R. Število PCR produktov se glede na dodano eno enoto evkariantske DNK pri paru Nadkarni F+R pri dodatku petih enot praktično ne spremeni, pri dodatku desetih enot se poveča za približno polovico, pri dodatku stotih enot pa za približno 19-krat. Par EUB 338F+518R pa na drugi strani tarčne odseke iz evkariantske DNK pomnožuje veliko učinkoviteje. Glede na eno enoto evkariantske DNK pri dodatku petih enot nastane približno 5-krat več PCR produkta, pri dodatku desetih enot 10-krat več produkta in pri dodatku stotih enot nastane kar 172-krat več PCR produkta pri pomnoževanju s parom EUB 338F+518R.

Pri pomnoževanju tarčnih odsekov iz mešanic bakterijske in evkariantske DNK smo prav tako zaznali večje število nastalih PCR produktov pri pomnoževanju s parom začetnih oligonukleotidov EUB 338F+518R kot s parom Nadkarni F+R. Pri pomnoževanju s parom EUB 338F+518R opazimo, da pride pri dodatku enake količine bakterijske in evkariantske DNK do nastanka približno polovice več PCR produkta, kot je dodanih kopij bakterijske DNK v reakcijski mešanici. Pri dodatku petkrat večje količine evkariantske DNK glede na količino dodane bakterijske DNK pride do 2,5-krat več produkta glede na število dodanih kopij bakterijske DNK. Pri desetkrat večji količini evkariantske DNK nastane 4-krat več produkta, pri stokrat večji količini evkariantske DNK pa 35-krat več produkta, kot če bi

bila v reakcijski mešanici sama bakterijska DNK, medtem ko pri pomnoževanju mešanice bakterijske in evkarijntske DNK s parom Nadkarni F+R opazimo, da se kljub dodatku različnih količin evkarijntske DNK rezultat qPCR reakcije bistveno ne spremeni.



Slika 5: **Redčitev 2:** Grafični prikaz rezultatov qPCR reakcij s paroma univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov Nadkarni F+R (modri stolpci) in EUB 338F+518R (oranžni stolpcji). EVK – evkarijntska DNK, BAKT – bakterijska DNK. Rezultati so zaradi laže ponazoritve prikazani na logaritemski skali.

Iz grafa na sliki 5 je razvidno, da tudi pri nižjem številu kopij same evkarijntske DNK v reakcijski mešanici par začetnih oligonukleotidov EUB 338F+518R to pomnožuje bolj učinkovito kot par Nadkarni F+R. Zopet lahko opazimo, da nastane pri pomnoževanju s parom EUB 338F+518R več PCR produkta kot pri pomnoževanju evkarijntske DNK s parom Nadkarni F+R. Vendar je razlika tokrat manjša in doseže največjo vrednost pri stotih enotah evkarijntske DNK, ko je ta razlika približno 100-kratna.

Pri mešanicah bakterijske in evkarijntske DNK lahko opazimo, da ima pri pomnoževanju s parom začetnih oligonukleotidov Nadkarni F+R dodatek evkarijntske DNK inhibitorni učinek na pomnoževanje bakterijske DNK. Ne glede na količinsko razmerje bakterijske in evkarijntske DNK v mešanici nastane manjše število PCR produktov, kot je bilo dodanih kopij bakterijske DNK. Tudi pri mešanici nastane s parom začetnih oligonukleotidov EUB 338F+518R več PCR produkta kot pri paru Nadkarni F+R. Pri dodatku enake količine bakterijske in evkarijntske DNK je ta razlika približno 2-kratna, pri dodatku petih enot 3-kratna, pri dodatku desetih enot je ta razlika 4,5-kratna. Pri dodatku stotih enot nastane s parom EUB 339F+518R že približno 25-krat več PCR produkta kot s parom Nadkarni F+R.

Povzamemo lahko, da ima dodatek evkariontske DNK pri pomnoževanju s parom začetnih oligonukleotidov Nadkarni F+R dvojno vlogo. Pri manjši količini bakterijske DNK v reakcijski mešanici deluje dodatek evkariontske DNK inhibitorno na pomnoževanje bakterijske DNK, medtem ko pri dodatku same evkariontske DNK, predvsem če je te veliko, deluje kot tarčna DNA za pomnoževanje. Glede na dobljene rezultate sklepamo, da je v spodnjem rangu pričakovanih količin bakterijske DNK v vzorcih sistem za ugotavljanje skupnega števila bakterij Nadkarni F+R bolj zanesljiv in daje boljši približek pričakovanim rezultatom. S sistemom Nadkarni F+R namreč dobimo rezultat, ki je za največ 30 % nižji od pričakovanega, medtem ko s sistem EUB 338F+518R zaznamo tudi do 500 % več produkta DNK, kot bi ga pričakovali glede na število dodanih kopij bakterijske DNK.

Iz rezultatov za Redčitev 1 (priloga I1) ugotovimo, da je nihanje med ponovitvami istega vzorca pri pomnoževanju z obema paroma začetnih oligonukleotidov v rangu do 20 %. Pri Redčitvi 2 (priloga I2) pa je to nihanje pri pomnoževanju s parom Nadkarni F+R lahko do 200 %.

4.3 ANALIZA VZORCEV PACIENTOV

Najprej smo iz vzorcev vseh pacientov, ki so opisani v prilogi A, osamili skupno mikrobno DNK po postopku, ki je predstavljen v poglavju Materiali in metode (3.2.4). Mikrobno DNK smo uspešno osamili iz vzorcev 16 pacientov. Osamitev skupne mikrobne DNK iz vzorcev pacientov E in F ni uspela.

Osamljeno DNK vzorcev smo uporabili kot matrico za pomnoževanje v kvantitativnih reakcijah PCR v realnem času (qPCR). Programi qPCR reakcij in reakcijske mešanice so opisani v poglavju Materiali in metode (3.2.8). Vsako redčitev standarda in vsak vzorec smo na ploščico nanesli trikrat.

Za ugotavljanje števila bakterij vsake izmed bakterijskih filogenetskih skupin smo naredili dve qPCR reakciji. V drugi reakciji smo za vzorce, ki so bili pod spodnjo mejo detekcije ali so imeli nenavadno obliko krivulje pomnoževanja, uporabili drugačen faktor redčitve. Za ugotavljanje skupnega števila bakterij v vzorcih smo uporabili dva para začetnih oligonukleotidov (EUB 338F+518R in Nadkarni F+R). Za izračun relativnega števila bakterij v vzorcu smo kot podatek za skupno število bakterij uporabili rezultat sistema Nadkarni F+R. Parametri vseh opravljenih qPCR reakcij so predstavljeni v prilogi C.

Rezultate qPCR reakcij smo najprej obdelali, kot je opisano v poglavju Materiali in metode (3.2.10). Pod spodnjo mejo detekcije qPCR reakcije za ugotavljanje skupnega števila bakterij so bili pri pacientih B in D vsi vzorci (B/Bp1, B/Bp2, B/Bp3 in D/Bp, D/TS1, D/TS2), pri pacientih H in S oba vzorca nespremenjene sluznice (H/Bp1, H/Bp2 in S/Bp1, S/Bp2) ter pri pacientih K in J eden od vzorec nespremenjene sluznice (K/Bp1 in J/Bp2). Te vzorce smo iz nadaljnje analize izločili. Tako smo od skupno 57 vzorcev pridobili in analizirali rezultate 44 vzorcev.

Razlike med vzorci tumorsko spremenjene in nespremenjene sluznice smo ugotavljali pri 10 pacientih (C, I, J, K, L, M, N, O, P in R). Pri ostalih šestih pacientih (A, B, D, G, H in S) namreč nismo imeli podatka za oba tipa vzorcev, ker bodisi niso bili vzorčeni (pacient A samo zdrava sluznica, pacient G samo tumorsko spremenjena sluznica), bodisi nismo zaznali bakterijske DNK (B, D, H in S). Ločeno smo ugotavljali tudi razlike med vzorci nespremenjene in tumorsko spremenjene sluznice pri petih pacientih z adenomi (C, I, J, K in R) in pri ostalih petih pacientih z adenokarcinomi (L, M, N, O in P).

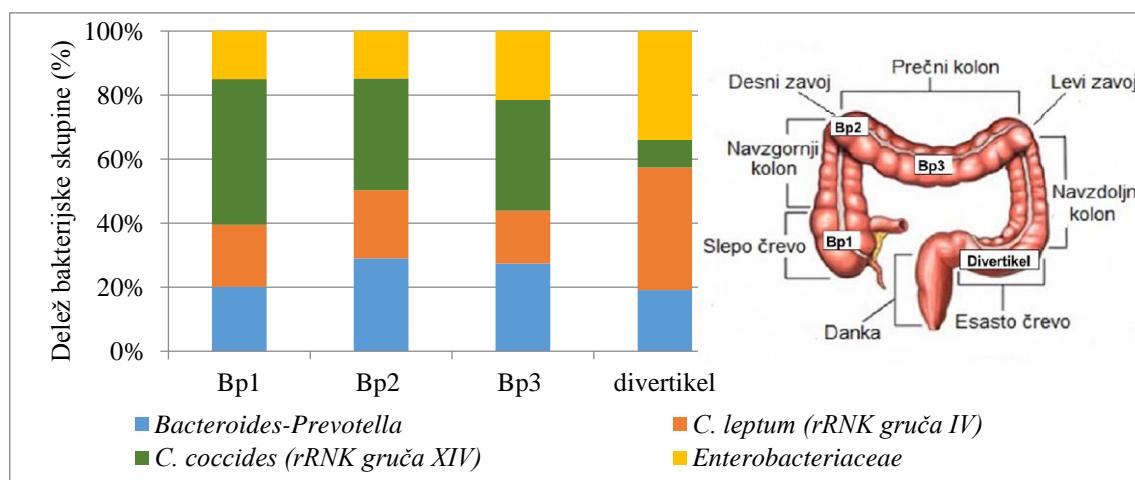
Vzorci črevesnih vsebin so bile odvzeti pri 8 pacientih (H, I, K, L, M, P, R in S). Od tega pri dveh pacientih (H in S) nismo zaznali bakterij v vzorcih nespremenjene sluznice. Pri šestih pacientih (I, K, L, M, P in R), pri katerih smo analizirali vzorce črevesnih vsebin, so rezultati predstavljeni kot stopnja spremembe deleža bakterij v črevesni vsebini glede na delež bakterij v nespremenjeni sluznici.

4.3.1 Relativni deleži preučevanih bakterijskih skupin v biopsijskih vzorcih nespremenjene sluznice, odvzetih vzdolž debelega črevesa

Pri pacientu A so bili biopsijski vzorci nespremenjene sluznice odvzeti na različnih mestih debelega črevesa. Odvzeti so bili štirje vzorci, od katerih so bili trije brez posebnosti (Bp1-3), medtem ko je bil četrти vzorec označen kot »divertikel«.

Črevesni divertikli so žepasti mešički, izbočeni skozi mišično plast črevesne stene. Razvijejo se lahko v kateremkoli delu debelega črevesa, vendar se v 95 % pojavljajo v esastem črevesu. Divertikoluza je večinoma asimptomatska, lahko pa zaradi peristaltično nedejavne stene divertikla v njih zastaja blato, kar lahko povzroči vnetje z bolečinami v spodnjem delu trebuha, povišano telesno temperaturo in levkocitozo (Schein in Paladugn, 2001; Hobson in Roberts, 2004).

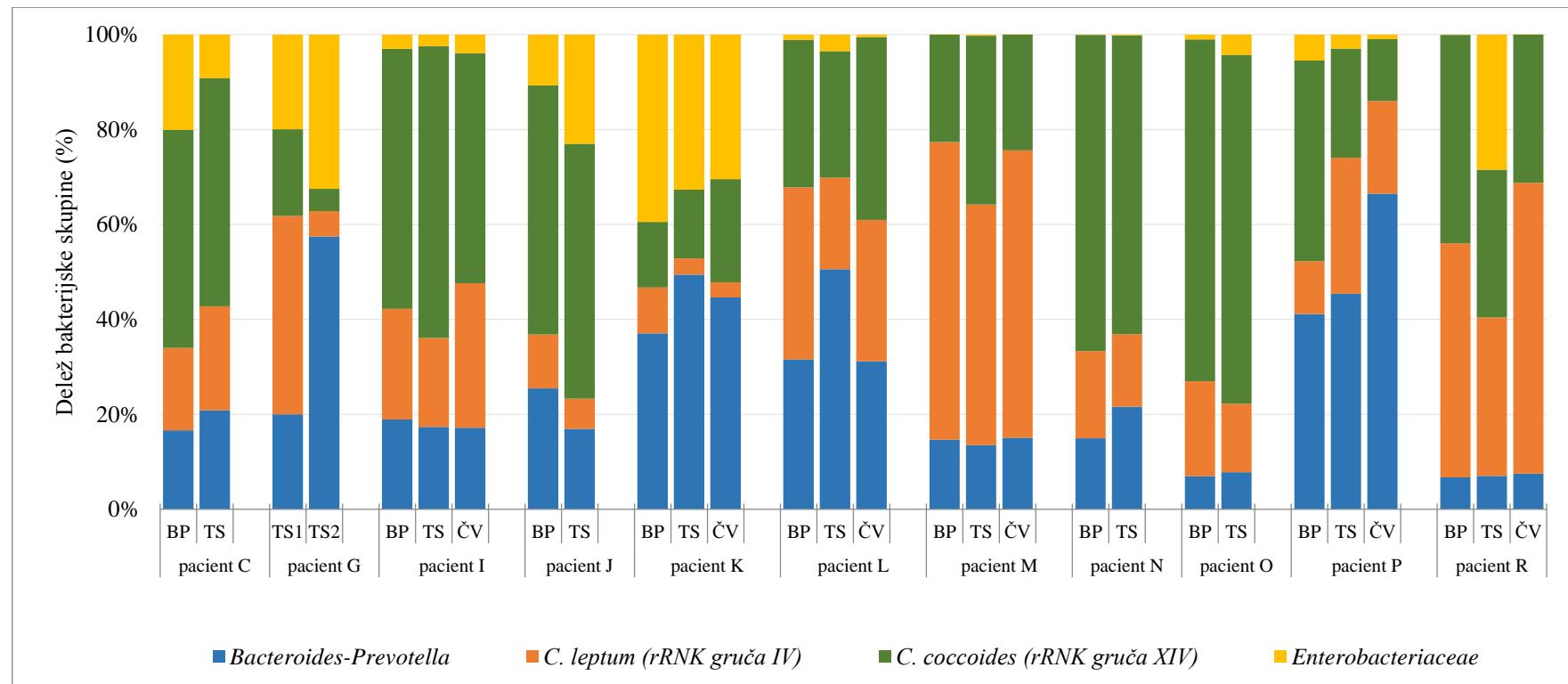
Na sliki 6 so grafično prikazani deleži bakterijskih skupin v vzorcih, ki so bili odvzeti pri pacientu A. V prilogi E1 so podani izračuni relativnega števila celic posamezne bakterijske skupine v vzorcu, ki smo jih izračunali, kot je opisano v poglavju Materiali in metode (3.2.10). Zaradi lažje ponazoritve smo relativna števila celic v vzorcu grafično predstavili kot deleže, ki jih vrednosti prispevajo k celoti (100 %).



Slika 6: Grafični prikaz deležev bakterijskih skupin (preračunanih na 100 %) pri štirih vzorcih pacienta A, odvzetih na različnih mestih debelega črevesa. Desno so prikazana mesta odvzema vzorcev: Bp1 – slepo črevo, Bp2 – desni zavoj debelega črevesa, Bp3 – prečni kolon in divertikel – esasto črevo.

Kot je razvidno iz grafa, so si vzorci Bp1, Bp2 in Bp3 med sabo podobni in različni od vzorca divertikla. Sprememba je posebej izrazita v povečanju števila bakterij filogenetske skupine *C. leptum* (rRNA gruča IV) in *Enterobacteriaceae* ter zmanjšanju števila bakterij skupine *C. coccoides* (rRNA gruča XIVa) v vzorcu, odvzetem na mestu divertikla.

4.3.2 Struktura mikrobne združbe v biopsijskih vzorcih tumorsko spremenjene in okoliške zdrave sluznice debelega črevesa ter vzorcev črevesnih vsebin pri pacientih s kolorektalnim rakom



Slika 7: Grafični prikaz strukture mikrobne združbe 11 pacientov s kolorektalnim rakom. Struktura mikrobne združbe je prikazana kot deleži štirih preučevanih bakterijskih skupin (preračunanih na 100 %). Na osi x so nanzani pacienti in vzorci, ki imajo označke: BP – nespremenjena sluznica brez posebnosti, TS – tumorsko spremenjena sluznica in ČV –črevesna vsebina.

Strukturo mikrobiote smo pri pacientih s kolorektalnim rakom predstavili kot delež štirih preučevanih bakterijskih filogenetskih skupin. Relativno število celic v vzorcu smo izračunali, kot je opisano v poglavju Materiali in metode (3.2.10). Izračuni so podani v prilogi E2.

Ugotovili smo, da v vzorcih črevesne sluznice in v vzorcih črevesnih vsebin prevladujejo pričakovane bakterijske skupine, obe klostridijski gruči in skupina *Bacteroides-Prevotella*, medtem ko smo predstavnike družine *Enterobacteriaceae* v opaznejšem delu (več kot 1 %) zaznali pri polovici od vseh analiziranih vzorcev.

Iz grafa na sliki 7, ki prikazuje strukturo črevesne mikrobiote, je razvidno, da so razlike v sestavi mikrobiote večje med pacienti kot pa med vzoreci zdrave in tumorsko spremenjene sluznice odvzete pri istem pacientu.

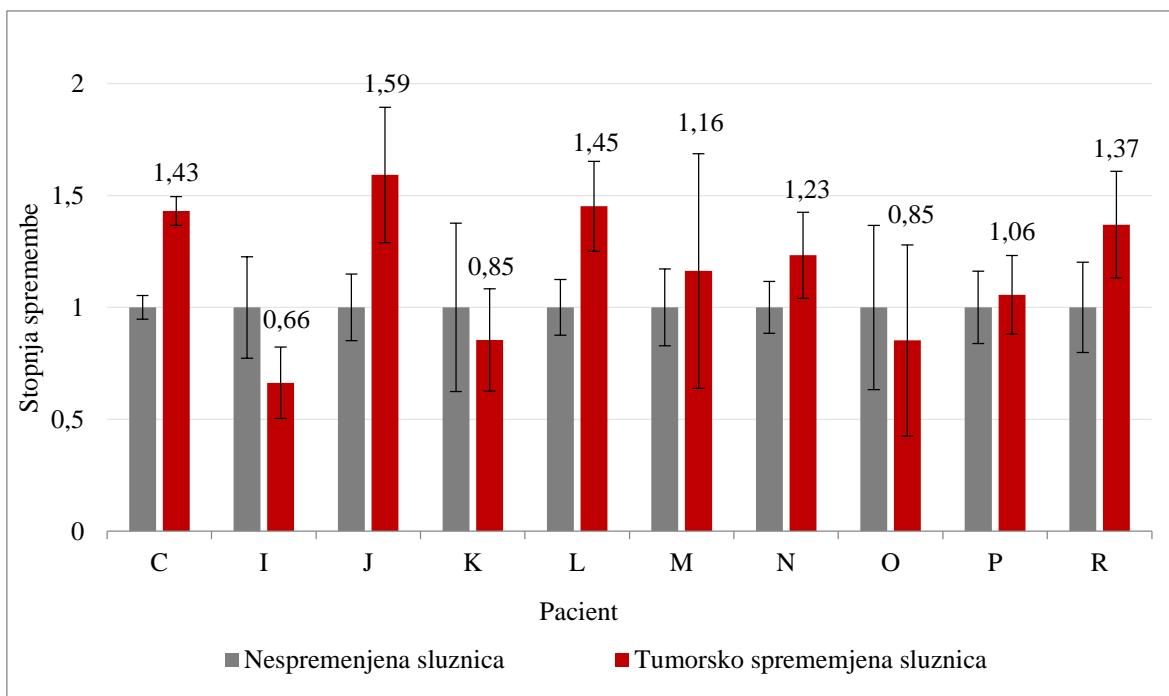
Prav tako lahko opazimo, da obstajajo razlike med vzorci črevesnih vsebin med pacienti. Pri treh pacientih (I, L in M) opazimo, da so si vzorci črevesnih vsebin in biopsijski vzorci zdrave sluznice med sabo precej podobni in različni od tumorsko spremenjenih vzorcev medtem ko podobnosti med vzorci črevesnih vsebin in zdravih sluznic pri ostalih treh pacientih (K, P in R) ne opazimo.

Pri pacientu G smo analizirali dva vzorca tumorsko spremenjene sluznice. Oba vzorca sta bila odvzeta iz danke, vendar sta bila odvzeta na različnih razvojnih stopnjah nastanka rakave tvorbe. Vzorec G/TS1 je adenom nizke stopnje displazije, medtem ko je vzorec G/TS2 adenokarcinom. Med vzorcema opazimo razliko v deležih opazovanih bakterijskih skupin. V adenokarcionomu, torej v napredovali obliki, opazimo povišanje deleža bakterij iz filogenetskih skupin *Bacteroides-Prevotella* in *Enterobacteriaceae* ter znižanje deleža obeh klostridijskih gruč.

4.3.3 Stopnja spremembe deleža bakterijskih skupin v vzorcih tumorsko spremenjene sluznice in v vzorcih črevesnih vsebin v primerjavi z nespremenjeno sluznico pri pacientih s kolorektalnim rakom

Stopnjo spremembe deleža bakterijskih skupin smo ugotavljali med vzorci tumorsko spremenjene sluznice v primerjavi z zdravo sluznico in med vzorci črevesnih vsebin v primerjavi z zdravimi sluznicami istega pacienta. Stopnje sprememb smo izračunali in statistično analizirali, kot je opisano v poglavju Materiali in metode (3.2.10). Grafično smo stopnje spremembe prikazali za tumorsko spremenjene vzorce, medtem ko smo za črevesne vsebine podali le izračune. Vsi podatki so zbrani v prilogi F. Rezultati statističnih analiz so predstavljeni v prilogi G.

4.3.3.1 Stopnja spremembe v deležu bakterij skupine *Bacteroides-Prevotella*

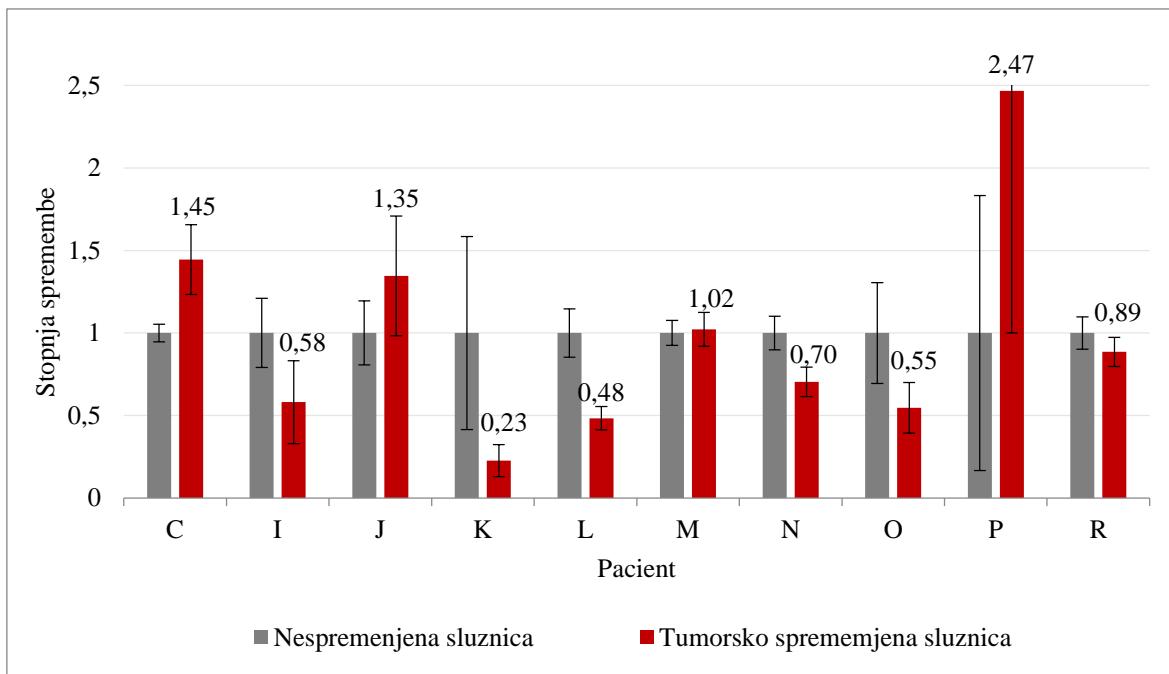


Slika 8: Grafični prikaz stopnje spremembe deleža bakterij skupine *Bacteroides-Prevotella* v vzorcih nespremenjene (sivi stolpci) in tumorsko sprememjene (rdeči stolpci) sluznice debelega črevesa pacientov. Vrednosti nad stolpcji predstavljajo stopnjo spremembe.

Povišanje deleža bakterij skupine *Bacteroides-Prevotella* v tumorsko spremenjenih vzorcih opazimo pri sedmih pacientih (C, J, L, M, N, P in R) in znižanje pri treh pacientih (I, K in O). Rezultati Wilcoxonovega testa vsote rangov niso pokazali statistično značilnih sprememb med vzorci tumorsko sprememjene in nespremenjene sluznice ($P=0,248$). Prav tako ni bilo statistično značilnih razlik pri primerjavi vzorcev pacientov z diagnozo adenoma (t-test $P=0,551$; Wilcoxon test $P=0,600$) ali z diagnozo adenokarcinoma (t-test $P=0,132$; Wilcoxon test $P=0,080$).

Povišanje deleža bakterij skupine *Bacteroides-Prevotella* v vzorcih črevesnih vsebin glede na vzorce nespremenjene sluznice smo zaznali pri treh pacientih (L, P in R), znižanje pa pri ostalih treh pacientih (I, K in O) (podatki v prilogi E). Rezultati statističnih testov niso pokazali značilnih sprememb med vzorci črevesnih vsebin in nespremenjene sluznice (t-test $P=0,690$; Wilcoxon test $P=0,600$).

4.3.3.2 Stopnja spremembe v deležu bakterij skupine *C. leptum* (rRNK gruča IV)

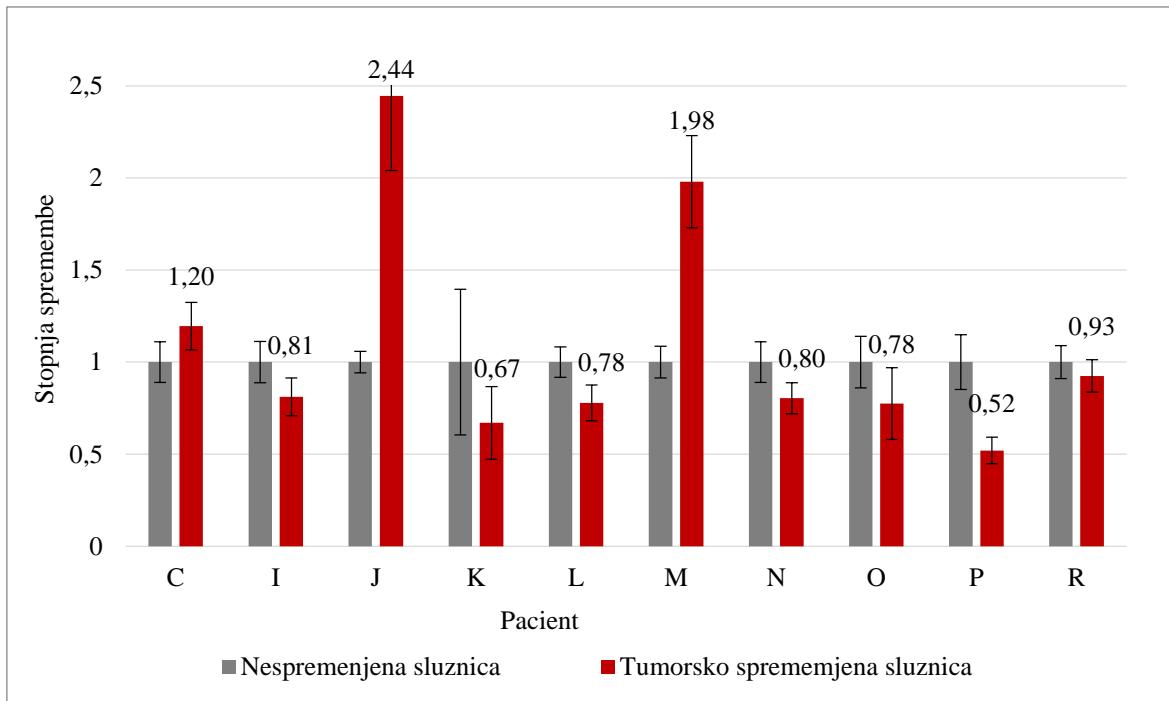


Slika 9: Grafični prikaz stopnje spremembe deleža bakterij skupine *C. leptum* (rRNK gruča IV) v vzorcih nespremenjene (sivi stolpci) in tumorsko spremenjene (rdeči stolpci) sluznice debelega črevesa pacientov. Vrednosti nad stolpcji predstavljajo stopnjo spremembe.

Povišanje deleža bakterij skupine *C. leptum* (rRNK gruča IV) v tumorsko spremenjenih vzorcih opazimo pri štirih pacientih (C, J, M in P) in znižanje pri šestih pacientih (I, K, L, N, O in R). Rezultati Wilcoxonovega testa niso pokazali statistično značilnih sprememb med vzorci tumorsko spremenjene in nespremenjene sluznice ($P=0,155$). Prav tako ni statistično značilnih razlik, če primerjamo paciente z diagnozo adenoma (t-test $P=0,203$; Wilcoxon test $P=0,173$) ali paciente z diagnozo adenokarcinoma (t-test $P=0,676$; Wilcoxon test $P=0,500$).

Povišanje deleža bakterij skupine *C. leptum* (rRNK gruča IV) v vzorcih črevesnih vsebin glede na vzorce nespremenjene sluznice opazimo pri pacientih (I, L, P in R) in znižanje pri dveh pacientih (K in M) (podatki v prilogi E). Rezultati statističnih testov niso pokazali statistično značilnih sprememb med vzorci črevesnih vsebin in nespremenjene sluznice (t-test $P=0,504$; Wilcoxon test $P=0,463$).

4.3.3.3 Stopnja spremembe v deležu bakterij skupine *C. coccoides* (rRNK gruča XIVa)

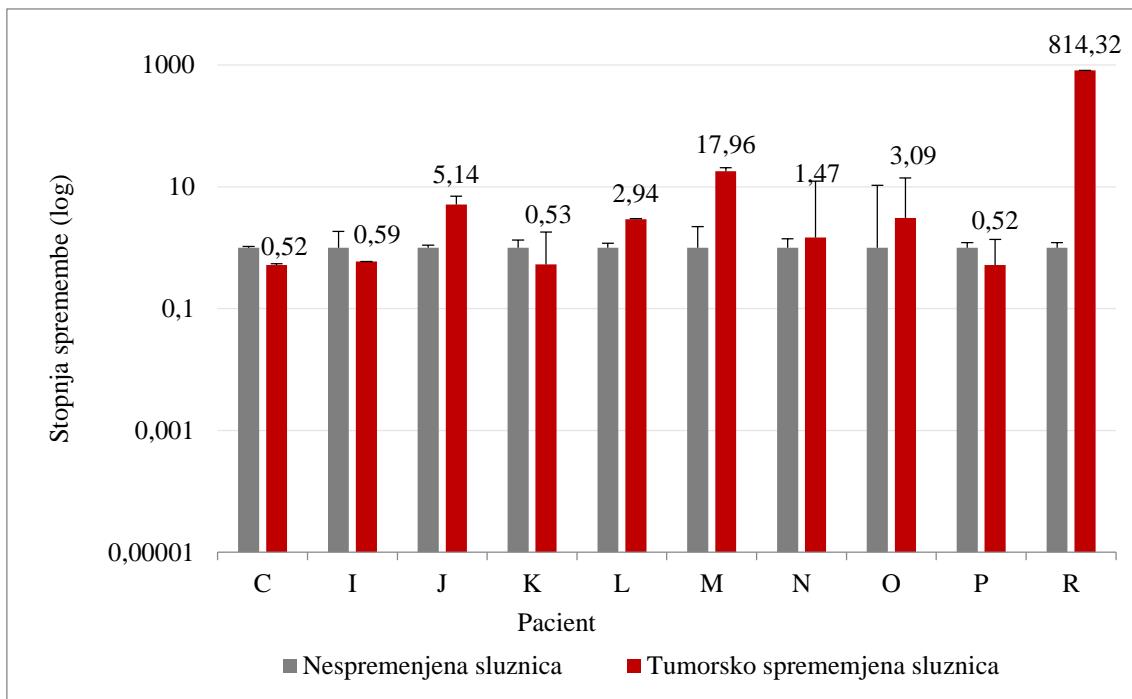


Slika 10: Grafični prikaz stopnje spremembe deleža bakterij skupine *C. coccoides* (rRNK gruča XIVa) v vzorcih nespremenjene (sivi stolpci) in tumorsko spremenjene (rdeči stolpci) sluznice debelega črevesa pacientov. Vrednosti nad stolpcji predstavljajo stopnjo spremembe.

Povišanje deleža bakterij skupine *C. coccoides* (rRNK gruča XIVa) v tumorsko spremenjenih vzorcih opazimo pri treh pacientih (C, J in M). Pri ostalih sedmih pacientih (I, K, L, N O, P in R) pa opazimo v vzorcih tumorsko spremenjene sluznice nižje vrednosti bakterij skupine *C. coccoides* (rRNK gruča XIVa). Rezultat Wilcoxonovega testa ni pokazal statistično značilnih sprememb med vzorci tumorsko spremenjene in nespremenjene sluznice pacientov ($P=0,722$). Prav tako ni statistično značilnih razlik, če primerjamo paciente z diagnozo adenoma (Wilcoxon test $P=0,753$) ali paciente z diagnozo adenokarcinoma (t test $P=0,604$; Wilcoxon test $P=0,500$).

Povišanje deleža bakterij skupine *C. coccoides* (rRNK gruča XIVa) v vzorcih črevesnih vsebin glede na vzorce nespremenjene sluznice opazimo pri pacientu L in znižanje pri ostalih petih pacientih (I, K, M, P in R) (podatki v prilogi E). Rezultati statističnih testov niso pokazali statistično značilnih sprememb med vzorci črevesnih vsebin in nespremenjene sluznice (t-test $P=0,204$; Wilcoxon test $P=0,249$).

4.3.3.4 Stopnja spremembe v deležu bakterij družine *Enterobacteriaceae*



Slika 11: Grafični prikaz stopnje spremembe števila bakterij družine *Enterobacteriaceae* v vzorcih nespremenjene (sivi stolpci) in tumorsko spremenjene (rdeči stolpci) sluznice debelega črevesa pacientov. Zaradi velikih sprememb med rezultati so podatki prikazani na logaritemski skali osi Y. Vrednosti nad stolpci predstavljajo stopnje spremembe.

Povišanje deleža bakterij družine *Enterobacteriaceae* v tumorsko spremenjenih vzorcih opazimo pri šestih pacientih (J, L, M, N, O in R). Pri ostalih štirih pacientih (C, I, K in P) pa opazimo v vzorcih tumorsko spremenjene sluznice nižje vrednosti bakterij družine *Enterobacteriaceae*. Rezultati statističnih testov niso pokazali statistično značilnih sprememb med vzorci tumorsko spremenjene in nespremenjene sluznice (t -test $P=0,869$; Wilcoxon test $P=0,657$). Prav tako ni statistično značilnih razlik, če primerjamo paciente z diagnozo adenoma (t -test $P=0,959$; Wilcoxon test $P=0,753$) ali paciente z diagnozo adenokarcinoma (t -test $P=0,735$; Wilcoxon test $P=0,500$).

Povišanje deleža bakterij družine *Enterobacteriaceae* v vzorcih črevesnih vsebin glede na vzorce nespremenjene sluznice opazimo pri pacientu L in znižanje pri ostalih petih pacientih (I, K, M, P in R) (podatki v prilogi E). Rezultati statističnih testov niso pokazali statistično značilnih sprememb med vzorci črevesnih vsebin in nespremenjene sluznice (t -test $P=0,345$; Wilcoxon test $P=0,173$).

5 RAZPRAVA

V magistrski nalogi smo ugotovljali, ali se deleži širih bakterijskih filogenetskih skupin, ki naseljujejo in običajno predstavljajo številčno najpomembnejše skupine bakterij debelega črevesa pri ljudeh, razlikujejo pri vzorcih, ki so bili odvzeti iz tumorsko spremenjenega in nespremenjenega tkiva sluznice pri pacientih s kolorektalnim rakom. Zato smo iz Kliničnega oddelka za gastroenterologijo UKC Ljubljana pridobili vzorce pacientov, ki so bili vključeni v nacionalni program SVIT. Od 18 pacientov smo pri dveh pacientih dobili samo vzorce zdrave sluznice (pacienta A in B), pri enem pacientu sta bili vzorčeni dve različni tumorski spremembi (pacient G), pri osmih pacientih (H, I, K, L, M, P, R in S) pa so bili odvzeti tudi vzorci blata oziroma aspiracije črevesne vsebine.

Iz dobljenih vzorcev smo osamili skupno mikrobno DNK. Pri tem smo uporabili postopek, ki je vključeval fizikalno razbijanje celic z ultrazvočnim razbijalcem in čiščenje nukleinskih kislin s kloroformom oziroma mešanico fenol:kloroforma. Osamitev skupne mikrobne DNK iz vzorcev pri dveh pacientih (E in F) ni uspela. Vzrok je najverjetneje tehnična težava ali napaka v postopku osamitve DNK. Vzorce smo namreč pridobivali v daljšem časovnem obdobju, osamitev skupne mikrobne DNK pa je potekala v več ločenih serijah, kar dopušča možnost, da je v eni seriji prišlo do napake v postopku osamitve. Uspešno osamljeno DNK vzorcev ostalih 16 pacientov smo uporabili kot matrico za pomnoževanje v reakcijah kvantitativnega PCR v realnem času (qPCR).

Z metodo qPCR smo pomnoževali izbrane informativne odseke za analizo – to so bili odseki ribosomskih genov za 16S rRNA. V vzorcih smo ugotovljali skupno število vseh bakterij z dvema paroma univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov in število bakterij iz preučevanih filogenetskih skupin s specifičnimi pari začetnih oligonukleotidov.

Pred samo izvedbo qPCR reakcij smo pripravili standarde za umeritvene krivulje, zato smo anaerobno gojili štiri bakterijske seve, predstavnike filogenetskih skupin. Rast bakterijskih kultur smo v eksponentni fazi rasti ustavili in bakterijske celice prešteli pod mikroskopom. Števila bakterij iz posamezne filogenetske skupine nismo podajali v absolutnih vrednostih, temveč relativno glede na skupno število bakterij v vzorcu. Z izračunom deležev, ki ga skupine predstavljajo k celoti, torej vsem bakterijam v vzorcu, smo namreč zagotovili, da do razlik med vzorci ni prihajalo zaradi različno učinkovite osamitve DNK iz vzorcev. Metoda osamitve DNK je bila namreč ročna in povsem možno je, da smo pri katerem od korakov v postopku osamitve DNK v protokol vnesli razlike (npr. pri čiščenju DNK, kjer se prenašajo vodne faze, se lahko prenesejo različni volumni).

Za ugotavljanje skupnega števila bakterij smo uporabili enak standard kot pri ugotavljanju števila bakterij posamezne skupine. Število kopij operonov gena za 16S rRNA se med bakterijskimi vrstami, ki smo jih uporabili kot standarde za umeritvene krivulje, namreč razlikuje. Iz javno dostopne podatkovne zbirke rrndb (Klappenbach in sod., 2001) smo pridobili podatek, da imajo bakterije iz vrste *B. thetaioitaomicron* 6, *C. leptum* 9, *C. clostridioforme* 9 in *E.coli* 7 kopij operonov 16S rRNA. Z definiranjem enakega standarda

umeritvene krivulje qPCR reakcije za ugotavljanje števila bakterij iz različnih filogenetskih skupin in skupnega števila bakterij smo zagotovili, da je bilo upoštevano enako število kopij operonov 16S rRNA v obeh reakcijah.

Pri vseh qPCR sistemih, razen pri sistemu za ugotavljanje števila bakterij filogenetske skupine *C. coccoides* (rRNA gruča XIVa), smo dosegli učinkovitost nad 80 %, kar je pri okoljskih vzorcih še dopustno za zanesljivo kvantifikacijo (Zhang in Fang 2006). Čeprav smo poskušali učinkovitost sistema qPCR za ugotavljanje števila bakterij skupine *C. coccoides* (rRNA gruča XIVa) izboljšati tudi s spremenjanjem temperatur naleganja in časi pomnoževanja, opaznega izboljšanja učinkovitosti nismo dosegli.

Po izvedbi qPCR reakcij smo rezultate obdelali in iz analize izločili rezultate, ki so bili pod arbitralno določeno spodnjo mejo detekcije, ki smo jo definirali kot opisano v poglavju 3.2.10. S tem smo od analiziranih 57 vzorcev pridobili rezultat za 44 vzorcev. Vse analizirane vzorce smo redčili, saj so v okoljskih vzorcih pogosto prisotni inhibitorji pomnoževanja (Zhang in Fang, 2006). Inhibicijo pomnoževanja smo pri nekaterih pre malo redčenih vzorcih opazili kot neobičajno krivuljo pomnoževanja. S prevelikim redčenjem pa smo kmalu prišli pod mejo detekcije sistema. Razlog, da smo morali tako veliko število rezultatov izločiti, lahko tiči tudi v tem, da je bilo v teh vzorcih malo ali sploh nič bakterij. Zoetendal in sodelavci (2002) namreč poročajo, da je na biopsijskih vzorcih prisotnih le med 10^5 in 10^6 bakterij, ki so različno močno pritrjene oziroma ugneziane v črevesni sluznici. Razlog je lahko tudi ta, da v nekaterih primerih nismo uspeli osamiti mikrobne DNK ali da v vzorcih določene bakterijske skupine ni bilo prisotne. Fakultativni anaerobi, kot je *E. coli*, so v striktno anaerobnem okolju debelega črevesa prisotni v zelo nizkem številu in skupaj predstavljajo od ~0,1 do ~1 % skupnega števila tam prisotnih bakterij (Hayashi in sod., 2002; Eckburg in sod., 2005).

Iz obdelanih podatkov smo nato za posameznega pacienta sestavili profil mikrobne združbe, ki so jo predstavljali deleži štirih bakterijskih skupin glede na skupno število bakterij v vzorcih. Nato smo primerjali združbe različnih tipov vzorcev istega pacienta in iste tipe vzorcev v različnih pacientih med sabo.

Pri pacientu A so bili biopsijski vzorci nespremenjene sluznice odvzeti na treh različnih lokacijah vzdolž debelega črevesa ter vzorec sluznice na mestu, kjer se je razvil divertikel. Opazili smo, da so si vzorci zdravih sluznic med sabo bolj podobni in so različni od vzorca divertikla, kar je v skladu z ugotovitvijo raziskovalcev, da je sestava mikrobiote črevesne sluznice vzdolž debelega črevesa stabilna, razen v primeru sprememb, ki so lahko posledica bolezni (Zoetendal in sod., 2002; Macfarlane in sod., 2004; Lepage in sod., 2005).

Pri pacientu G sta bila iz istega predela prebavne cevi odvzeta vzorca dveh tumorskih sprememb na različni stopnji razvoja kolorektalnega raka. Pri vzorcu adenokarcinoma, ki je maligna novotvorba, lahko opazimo manjši delež obeh klostridijskih gruč in občutno povečanje bakterij iz skupine *Bacteroides-Prevotella* v primerjavi z vzorcem adenoma, ki

je benigna novotvorba. Te ugotovitve so v skladu s hipotezo Tjalsma in sodelavcev (2012), da se črevesna mikrobiota na različnih stopnjah razvoja kolorektalnega raka razlikuje.

Če pogledamo strukturo mikrobne združbe ostalih pacientov, ki je prikazana na grafu slika 7, vidimo, da so med vzorci nespremenjene sluznice med pacienti precejšnje razlike v deležih preučevanih skupin. Čeprav je dolgo časa veljalo, da je vsak ekosistem poseljen s stabilno populacijo mikroorganizmov, ki so najbolje prilagojeni pogojem habitata, so študije pokazale na veliko razliko v črevesni mikrobioti med zdravimi ljudmi (Eckburg in sod., 2005; Rajilić-Stojanović in sod. 2007).

Prav tako lahko iz grafa razberemo, da obstajajo razlike med tumorsko spremenjeno in nespremenjeno sluznico istega pacienta, vendar so te razlike manjše kot razlike med pacienti. Ti rezultati so v skladu z ugotovitvami Chen in sodelavcev (2012), ki pravijo, da je struktura mikrobiote med rakavim in okoliškim zdravim tkivom istega pacienta precej podobna. Podobno so Kostic in sodelavci (2011) ugotovili, da je mikrobiota tumorskega in okoliškega nespremenjenega tkiva v istem pacientu bolj podobna, kot so si med sabo podobne mikrobiote tumorskih ali zdravih vzorcev sluznic različnih pacientov. Marchesi in sodelavci (2011) pa so med mikrobioto, ki kolonizira tumorsko tkivo in okoliško zdravo sluznico istega pacienta, opazili bistveno razliko.

Večji delež bakterij filogenetske skupine *Bacteroides-Prevotella* smo v tumorskih vzorcih opazili pri sedmih od desetih pacientov. Moore in Moore (1995) sta povisjanje v številu bakterij rodu *Bacteroides* povezala z osebami z višjim tveganjem za razvoj kolorektalnega raka. Prav tako so povisjanje bakterij rodu *Bacteroides* v blatu oseb s kolorektalnim rakom opazili Sobhani in sodelavci (2011). Na drugi strani pa so tako Shen in sodelavci (2010) kot tudi Wang in sodelaci (2012) v blatu oseb s kolorektalnim rakom opazili manj bakterij rodu *Bacteroides* kot v blatu zdravih prostovoljcev. Čeprav se ti podatki navezujejo na drugačen tip vzorcev in primerjajo rezultate med pacienti s kolorektalnim rakom in zdravimi prostovoljci, so do podobnega zaključka v svoji študiji prišli tudi Marchesi in sodelavci (2011). Ti so primerjali tumorsko spremenjeno in okoliško zdravo tkivo in opazili, da je na splošno v tumorsko spremenjenem tkivu več bakterij predstavnikov debla *Bacteriodetes* in manj predstavnikov debla *Firmicutes* kot pa v okoliškem zdravem tkivu. Tudi v naši študiji smo v tumorsko spremenjenih vzorcih pri šestih (*C. leptum* rRNK gruča IV) oziroma sedmih (*C. coccoides* rRNK gruča XIVa) od desetih pacientov opazili nižji delež obeh klostridijskih gruč.

Kljub opaženim spremembam v deležu preučevanih bakterijskih skupin med tumorsko spremenjenim in nespremenjenim tkivom pa nismo uspeli pokazati statistično značilnih sprememb med vzorci zdrave in tumorsko spremenjene sluznice pri nobeni od skupin. Razlog je lahko v tem, da so se pomembne spremembe dogajale na nižjih taksonomskeh nivojih v preučevanih filogenetskih skupinah, česar z našim pristopom nismo opazili. V večini študij, v katerih so raziskovalci preučevali in potrdili disbiozo črevesne mikrobiote pri pacientih s kolorektalnim rakom, so namreč uporabljali bolj občutljive, a tudi veliko dražje metode sekvenciranja informativnih delov ali celotnih genomov mikroorganizmov, kar omogoča razlikovanje tudi na nivoju vrst (Marchesi in sod., 2011; Sobhani in sod., 2011; Chen in sod., 2012; Kostic in sod., 2011).

Možen razlog, zakaj med tumorsko spremenjenimi in nespremenjenimi vzorci nismo opazili statistično značilnih razlik, je tudi ta, da v analizo nismo vključili vseh filogenetskih skupin, ki naseljujejo črevesno sluznico. Gao in sodelavci (2015), ki so preučevali mikrobioto tumorsko spremenjene in nespremenjene sluznice, ugotavlajo, da se za bakterijskimi debli *Firmicutes* in *Bacteroidetes*, ki v obeh tkivih predstavljata največji delež, razvrstijo debla *Proteobacteria*, *Fusobacteria* in *Actinobacteria*. Pogosto so v študije vključene tudi bakterije iz rodu *Bifidobacterium* in *Lactobacillus* (Sobhani in sod., 2011; Chen in sod., 2012).

Možno je, da bi razlike zaznali, če bi drugače kategorizirali paciente, npr. kot paciente z visokim in nizkim tveganjem za razvoj kolorektalnega raka. Paciente bi lahko razvrstili v skupine na podlagi histološke analize biopsijskih vzorcev, stopnje displazije adenomov, velikosti tumorske spremembe in prisotnih dejavnikov tveganja za razvoj kolorektalnega raka (starost, genetske predispozicije, načina življenja, prisotnost bolezni, ki povečajo tveganje za nastanek črevesnega raka idr.). Vendar pa bi za tako analizo potrebovali primerno večje število vzorcev za vsako preučevano skupino.

Možen vzrok, da statistično značilnih sprememb med vzorci tumorsko spremenjene in nespremenjene sluznice nismo zaznali, je lahko tudi vzorčenje. Med postopkom je kolonoskopist namreč odstranjen biopsijski košček s pomočjo curka fiziološke raztopine izpral iz dela debelega črevesa, kjer je bil odstranjen v zbirni kontejner. Na poti do zbirnega kontejnerja je lahko prišlo do prenosa črevesne mikrobite spodnjih delov debelega črevesa na vzorec. Za nadaljnje študije črevesne mikrobiote bi bilo smiselno protokol vzorčenja še skrbnejše načrtovati in morda razmisliti o možnosti uporabe citološke ščetke pri odvzemu vzorcev zdrave črevesne sluznice.

Huse in sodelavci (2014) namreč ugotavljajo, da ima ščetkanje sluznice več prednosti v primerjavi z biopsijskim odvzemom vzorcev. Poleg tega, da je metoda manj invazivna, se lahko vzorči večja površina črevesne sluznice. V študiji, ki so jo opravili, so pacientom z ulcerativnim kolitisom odvzeli parne vzorce, enkrat z biopsijskim kleščicami in drugič s citološko ščetko. S sekvenciranjem V4-V6 ali V5-V6 regij gena za 16S rRNK niso odkrili značilnih razlik v sestavi mikrobiote med vzorci odvzetimi na različna načina. So pa ugotovili, da metoda vzorčenja s ščetkanjem omogoča za nekaj velikostnih razredov več pridobljene bakterijske DNK kot evkariontske (gostiteljeve) DNK. Prav prisotnost evkariontske DNK v biopsijskih vzorcih črevesne sluznice je problem, s katerim smo se soočili tudi v tem magistrskem delu.

S seštevkom deležev vseh štirih bakterijskih skupin namreč v približno 80 % vzorcev nismo pokrili več kot 10 % črevesne mikrobiote, kadar smo računali delež iz skupnega števila bakterij, ki smo ga ugotavljali s sistemom, ki je vključeval začetne oligonukleotide EUB338 in 518R. Takšen rezultat ni bil pričakovani, saj naj bi predstavniki debla *Firmicutes*, kamor spadata in v tem deblu v okolju prebavnega trakta prevladujeta obe klostridijski gruči, in debla *Bacteroidetes*, kamor spada in v prebavnem traktu tudi prevladuje filogenetska skupina *Bacteroides-Prevotella*, skupaj predstavljalci tudi več kot 80 % vseh bakterij v debelem črevesu (Tap in sod., 2009).

Domnevali smo, da je skupno število bakterij v vzorcih precenjeno in da uporabljeni par začetnih oligonukleotidov EUB338 in 518R pomnožuje tudi odseke iz evkariantske (gostiteljeve) DNK. V vzorcih, kjer je prisotne veliko evkariantske DNK, namreč za bakterije specifični začetni oligonukleotidi nalegajo nespecifično tudi na evkariantski gen za 18S rRNK in mitohondrijski gen za 16S rRNK. To je značilnost tudi v primeru pogosto uporabljenih začetnih oligonukleotidov EUB338 in 518R (Huys in sod., 2008; Bakke in sod., 2011).

Da bi preverili, ali je skupno število bakterij v vzorcih precenjeno, smo preizkusili tri dodatne pare univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov. Ugotovili smo, da izmed novo preizkušenih parov začetnih oligonukleotidov osamljeno DNK iz čistih bakterijskih kultur najuspešneje pomnožuje par, ki so ga opisali Nadkarni in sodelavci (2002). Ključna razlika, ki paru začetnih oligonukleotidov Nadkarni omogoča razlikovanje med prokariotsko in evkariotsko DNK, je k 5' koncu obrnjen začetni oligonukleotid, ki nalega na mesto 781-806 (štetje po *E.coli*) (Mori in sod., 2014). To mesto se namreč razlikuje od mesta, kamor nalega začetni oligonukleotid 518R, ki izkazuje 100 % homologijo ohranjeni regiji male podenote gena za evkariotsko rRNK (SSU rRNK) (Bakke in sod., 2011).

Na naslednji stopnji smo z metodo PCR preverili, ali pride do razlik v pomnoževanju izbranih tarč iz osamljene DNK iz čistih bakterijskih kultur in iz evkariotskih celic, kadar uporabimo različna para začetnih oligonukleotidov. Slika agarozne gelske elektroforeze v rezultatih (poglavlje 4.3) pokaže, da oba para začetnih oligonukleotidov pomnožujeta tarčne odseke osamljene DNK čistih bakterijskih kultur, medtem ko odseke osamljene evkariotske DNK pomnožuje le par začetnih oligonukleotidov EUB338 in 518R. Iz slike lahko razberemo, da so pri pomnoževanju s parom EUB338 in 518R nastali pomnožki različnih dolžin, kar je na gelu opazno kot večje število elektroforetskih lis. To kaže na nespecifično pomnoževanje, česar pa z analizo talilne krivulje pri qPCR sistemu nismo opazili.

Nazadnje smo oba sistema za ugotavljanje skupnega števila bakterij primerjali še z metodo qPCR. V reakcijske mešanice smo dodajali znano količino bakterijske in evkariotske DNK ter mešanice v različnih razmerjih bakterijske in evkariotske DNK. Ugotovili smo, da par začetnih oligonukleotidov Nadkarni ne pomnožuje evkariotske DNK v tolikšni meri kot par EUB338F in 518R.

Za eksperiment smo izbrali dve redčitvi bakterijske DNK, ki sta bili v koncentracijskem območju vzorcev in glede na ti vrednosti prilagodili količine dodane evkariotske DNK v reakcijske mešanice. Pri obeh redčitvah smo opazili, da samo pri dodami sami evkariontski DNK par začetnih oligonukleotidov Nadkarni pomnožuje odseke DNK v veliko manjši meri kot par EUB338 in 518R. Vendar tudi pri paru Nadkarni pride ob velikem dodatku evkariotske DNK (100 enot) do opaznejšega zvišanja zaznanega signala. Pri nižji redčitvi (Redčitev 1) pri mešanici bakterijske in evkariotske DNK opazimo, da različna količina dodane evkariotske DNK pri paru Nadkarni ne vpliva dosti na povišanje števila PCR produktov, medtem ko s parom EUB338 in 518R dobimo večje število pomnožkov od pričakovanega. Pri večji redčitvi (Redčitev 2) pa lahko pri mešanicah opazimo, da ne glede

na dodano količino evkariontske DNK pri pomnoževanju s parom začetnih oligonukleotidov Nadkarni zaznamo manjše število pomnožkov kot je dodanih kopij bakterijske DNK. Z večanjem števila dodanih kopij DNK v reakcijsko mešanico, ki se povečuje na račun dodajanja večjega števila dodanih kopij evkariontske DNK, opazimo celo nižji signal. Sklepamo, da dodatek evkariontske DNK na pomnoževanje bakterijske DNK s parom Nadkarni deluje inhibitorno.

Na podlagi rezultatov sklepamo, da lahko pride v vzorcih z veliko evkariontske DNK (v primerjavi z bakterijsko DNK) do podcenitve skupnega števila bakterij s sistemom Nadkarni. Ker v sklopu magistrske naloge nismo ugotavljali, kolikšen delež osamljene DNK iz biopsijskih vzorcev je evkariontski, je težko zaključiti, ali je nižje skupne število bakterij v vzorcih dobljenih s sistemom Nadkarni posledica podcenjenih rezultatov ali je dejansko odraz prisotne evkariontske DNK, ki jo par začetnih oligonukleotidov EUB338 in 518R pomnožuje, par Nadkarni pa ne. Delež evkariontske DNK bi lahko sicer ugotovili, tako da bi z metodo qPCR kvantificirali mitohondrijsko DNK, kot to v članku opisujejo Yu in sodelavci (2007). Vendar se zaradi že tako obsežne naloge za to nismo odločili.

Možna razloga za nižje število zaznanih PCR produktov pri pomnoževanju mešanic bakterijske in evkariontske DNK z začetnimi oligonukleotidi Nadkarni so lahko tudi napake pri delu. Razlike pri ponovitvah istega vzorca so namreč pri mešanici bakterijske in evkariontske DNK pri Redčitvi 2 precej velike. To nejasnost bi lahko hitro odpravili tako, da bi eksperiment ponovili in morda vanj vključili večje število ponovitev istega vzorca.

Možna razloga, zakaj s sistemom za ugotavljanje skupnega števila bakterij Nadkarni zaznamo manjše število bakterij, je lahko tudi ta, da je bila osamljena DNA v vzorcih preveč razbita. Pri pomnoževanju s parom začetnih oligonukleotidov Nadkarni namreč nastaja daljši produkt (466 bp) kot pri pomnoževanju s parom EUB338 in 518R (189 bp). Možno je, da je med postopkom osamitve DNK z ultrazvočnim razbijalcem prišlo do fragmentacije DNK na manjše konce. Čeprav smo imeli možnost nastavitev amplitude in časa delovanja ultrazvočnega razbijalca in smo s tem do neke mere lahko nadzorovali jakost fizikalnega razbijanja mikrobnih celic, ni izključujoče, da smo z jakostjo amplitude fragmentirali sproščeno mikrobeno DNA. Fragmentacijo DNA bi morda preprečili z izbiro druge metode osamitve DNA. Vendar se je ta protokol za osamitve DNA iz biopsijskih vzorcev po obsežni analizi različnih metod osamitve DNA izkazal kot najboljši (Šket, 2014).

V magistrski nalogi smo analizirali tudi aspiracije črevesnih vsebin, ki so bile odvzete pri nekaterih pacientih. Črevesna vsebina je rumena sluzasta snov, ki je v črevesju ostala po izpiranju črevesja pacienta pred preiskavo. Njena sestava naj bi bila podobna blatu. Ker nekatere študije ugotavljajo, da se bakterijska skupnost, pritrjena na površino črevesne sluznice, razlikuje od mikrobiote blata (Zoetendal in sod., 2002), smo se odločili, da pogledamo tudi, ali obstajajo razlike med vzorci črevesnih vsebin in biopsijskimi vzorci nespremenjene sluznice. Iz grafa v rezultatih (poglavlje 4.3) je razvidno, da se vzorci črevesne sluznice razlikujejo od vzorcev nespremenjene sluznice istega pacienta. Čeprav statistično značilnih razlik med vzorci črevesnih vsebin in nespremenjenih vzorcih nismo ugotovili pri nobeni izmed preiskovanih skupin, pa so razlike vseeno opazne. Pri treh

pacientih (I, L in M) so si vzorci črevesnih vsebin in nespremenjenih sluznic bolj podobni med sabo in različni od tumorsko spremenjenih vzorcev, medtem ko so si pri ostalih treh pacientih (K, P in R) vsi tipi vzorcev med sabo različni.

Vzrok, da med vzorci črevesnih vsebin in nespremenjenimi vzorci nismo odkrili statistično značilnih razlik, je lahko v tem, da je bila z aspiriranjem odstranjena tudi površina črevesne sluznice ali pa so bili s črevesno vsebino med odstranjevanjem biopsijskih vzorcev iz debelega črevesa kontaminirani vzorci nespremenjene sluznice.

6 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov sklepamo naslednje:

- Črevesna mikrobiota je vzdolž prebavne cevi dokaj stabilna. Razlika med zdravo in spremenjeno sluznico divertikla je pri preučevanem pacientu opazna.
- Struktura mikrobne združbe sluznice debelega črevesa, sestavljena iz deležev treh najpogosteje zastopanih bakterijskih filogenetskih skupin *Bacteroides-Prevotella*, *Clostridium leptum* (rRNK gruča IV), *Clostridium coccoides* (rRNK gruča XIVa) in družine *Enterobacteriaceae*, je različna v vzorcih tumorsko spremenjene in okoliške nespremenjene sluznice debelega črevesa, vendar statistično značilnih razlik med njima nismo uspeli pokazati.
- Iz rezultatov je razvidno, da so razlike v sestavi mikrobne združbe večje med pacienti kot med vzorci tumorsko spremenjene in okoliške nespremenjene sluznice pri istem pacientu.
- Spremembe deležev širih preučevanih bakterijskih filogenetskih skupin so opazne med vzorci črevesnih vsebin in biopsijskimi vzorci nespremenjene sluznice istega pacienta, vendar te spremembe niso statistično značilne.
- Par univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov, ki so ga opisali Nadkarni in sodelavci (2002), ne pomnožuje tarčnih odsekov evkariontske DNK v tolikšni meri kot pogosteje uporabljeni par univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov EUB 338 in 518R in je zato primernejši za ugotavljanje skupnega števila bakterij v biopsijskih vzorcih.

7 POVZETEK

Rak debelega črevesa in danke ali kolorektalni rak sodi med najpogosteje rakava obolenja. Med pomembne dejavnike tveganja za pojav kolorektalnega raka štejemo poleg genetske predispozicije tudi starost, neustrezen živiljenjski slog ali prisotnost kroničnega vnetja v prebavnem traktu.

V zadnjem času je bilo opisano večje število študij, ki kažejo na razlike v sestavi črevesne mikrobiote med pacienti s kolorektalnim rakom in zdravimi prostovoljci. Vendar pa vloga mikrobiote pri nastanku in razvoju kolorektalnega raka ni jasna. Ni namreč znano, ali so spremembe v sestavi in funkciji mikrobiote posledica ali vzrok za nastanek in razvoj kolorektalnega raka. Rezultati študij, ki poročajo o disbiozi, torej o porušenju strukture normalne črevesne mikrobiote, so si pogosto nasprotuječi. Bakterijske skupine, ki bi bila enoznačno direktno povezana z razvojem kolorektalnega raka, ni moč izpostaviti. Zaradi navedenih razlogov so nadaljnje raziskave na tem področju bistvene za popolnejše razumevanje nastanka in etiologije bolezni.

V magistrski nalogi smo ugotavliali, ali se delež štirih najpogosteje zastopanih bakterijskih filogenetskih skupin črevesne mikrobiote, tj. *Bacteroides-Prevotella*, *Clostridium leptum* (rRNK gruča IV), *Clostridium coccoides* (rRNK gruča XIVa) in predstavniki družine *Enterobacteriaceae*, razlikuje med vzorci tumorsko spremenjene in zdrave sluznice odvzete pri istem pacientu. Zato smo iz Kliničnega oddelka za gastroenterologijo UKC Ljubljana pridobili vzorce pacientov, ki so bili vključeni v program SVIT.

Analizirali smo vzorce 16 pacientov. Število bakterij posamezne bakterijske skupine smo ugotavliali z metodo kvantitativnega PCR v realnem času (qPCR). Pomnoževali smo izbrane informativne odseke ribosomskih genov za 16S rRNK. Z uporabo specifičnih parov začetnih oligonukleotidov za preučevane filogenetske skupine smo v vzorcih ugotavliali število posameznih bakterijskih skupin, medtem ko smo za ugotavljanje skupnega števila bakterij uporabili dva sistema z različnima paroma univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov.

Z analizo vzorcev pacientov smo pokazali, da je črevesna mikrobiota vzdolž prebavne cevi dokaj stabilna. Zaradi individualnih razlik med pacienti statistično značilnih sprememb v razliki deležev preučevanih skupin med tumorsko spremenjenimi in nespremenjenim vzorci nismo pokazali, čeprav smo le te lahko opazili. Prav tako ni bilo opaziti statistično značilnih razlik med vzorci črevesnih vsebin in biopsijskimi vzorci zdravih sluznic.

Glavni razlogi, zakaj razlik z našim pristopom nismo uspeli pokazati, čeprav določene študije govorijo o različni mikrobioti med tumorsko spremenjenim in okoliškim zdravim tkivom, so: (i) pomanjkljivosti pri načinu vzorčenja, (ii) težave pri osamitvi mikrobne DNK, predvsem zaradi prisotnosti velikega deleža evkariontske (gostiteljeve) DNK, in (iii) možnost spremembe na nižjih taksonomskeh nivojih.

Nekatere izmed morebitnih razlogov bi se dalo enostavno preveriti s (i) pripravo bolj učinkovitega protokola vzorčenja s citološko ščetko, s čimer bi se morda lahko izognili velikemu deležu evkariontske DNK v vzorcih, (ii) z opravljenimi dodatnimi molekularnimi

analizami, ki omogočajo razlikovanje na nivoju vrst, (iii) z večjim številom pacientov in več vzorci bi morda lahko pokazali statistično značilne spremembe v mikrobioti črevesne sluznice.

Primerjali smo tudi pomnoževanje tarčnih odsekov iz znane količine bakterijske in evkariontske DNK z metodama PCR in qPCR s parom začetnih oligonukleotidov EUB338 in 518R s parom začetnih oligonukleotidov, ki so ga opisali Nadkarni in sodelavci (2002). Ugotovili smo, da par univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov Nadkarni ne omogoča pomnoževanja tarčnih odsekov evkariontske DNK v tolikšni meri kot par EUB338 in 518R in je zato primernejši za ugotavljanje skupnega števila bakterij v biopsijskih vzorcih.

8 VIRI

- Ahmed S., Macfarlane G.T., Fite A., McBain A.J., Gilbert P., Macfarlane S. 2007. Mucosa-associated bacterial diversity in relation to human terminal ileum and colonic biopsy samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 22: 7435-7442
- 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
- Aituvov B., Duisembekova A., Bulenova A., Alibek K. 2012. Pathogen-driven gastrointestinal cancers: Time for a change in treatment paradigm?. *Infectious Agents and Cancer*, 7, 18: 1-8
- Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende D.R., Fernandes G.R., Tap J., Bruls T., Batto J.M., Bertalan M., Borruel N., Casellas F., Fernandez L., Gautier L., Hansen T., Hattori M., Hayashi T., Kleerebezem M., Kurokawa K., Leclerc M., Levenez F., Manichanh C., Nielsen H.B., Nielsen T., Pons N., Poulaing J., Qin J., Sicheritz-Ponten T., Tims S., Torrents D., Ugarte E., Zoetendal E.G., Wang J., Guarner F., Pedersen O., de Vos W.M., Brunak S., Doré J., Antolín M., Artiguenave F., Blottiere H.M., Almeida M., Brechet C., Cara C., Chervaux C., Cultrone A., Delorme C., Denariaz G., Dervyn R., Foerstner K.U., Friss C., van de Guchte M., Guedon E., Haimet F., Huber W., van Hylckama-Vlieg J., Jamet A., Juste C., Kaci G., Knol J., Lakhdari O., Layec S., Le Roux K., Maguin E., Mérieux A., Melo Minardi R., M'rini C., Muller J., Oozeer R., Parkhill J., Renault P., Rescigno M., Sanchez N., Sunagawa S., Torrejon A., Turner K., Vandemeulebrouck G., Varela E., Winogradsky Y., Zeller G., Weissenbach J., Ehrlich S.D., Bork P. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473, 7346: 174-180
- Bäckhed F., Ley R.E., Sonnenburg J.L., Peterson D.A., Gordon J.I. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307, 5717: 1915-1920
- Bakke I., De Schryver P., Boon N., Vadstein O. 2011. PCR-based community structure studies of bacteria associated with eukaryotic organisms: A simple PCR strategy to avoid co-amplification of eukaryotic DNA. *Journal of Microbiological Methods*, 84, 2: 349-351
- Balamurugan R., Rajendiran E., George S., Samuel G.V., Ramakrishna B.S. 2008. Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate-producing bacteria, *Desulfovibrio* and *Enterococcus faecalis* in the feces of patients with colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 23, 8 Pt 1: 1298-1303
- Bartosch S., Fite A., Macfarlane G.T., McMurdo M.E. 2004. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients

by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6: 3575-3581

Basset C., Holton J., Bazeos A., Vaira D., Bloom S. 2004. Are *Helicobacter* species and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* involved in inflammatory bowel disease?. *Digestive Disease in Science*, 49, 9: 1425-1432

Bernhard A.E., Field K.G. 2000. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 4: 1587-1594

Bryant M.P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, 25, 12: 1324-1328

Callbeck C.M., Sherry A., Hubert C.R., Gray N.D., Voordouw G., Head I.M. 2013. Improving PCR efficiency for accurate quantification of 16S rRNA genes. *Journal of Microbiological Methods*, 93, 2: 148-152

Castellarin M., Warren R.L., Freeman D.J., Dreolini L., Krzywinski M., Strauss J., Barnes R., Watson P., Allen-Vercoe E., Moore R.A., Holt R.A. 2011. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Research*, 22, 2: 299-306

Chen W., Liu F., Ling Z., Tong X., Xiang C. 2012. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One*, 7, 6: e39743, doi: 10.1371/journal.pone.0039743: 9 str.

Clermont O., Bonacorsi S., Bingen, E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 10: 4555–4558

Collins M.D., Gibson G.R. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69, 5: 1052S-1057S

Compare D., Nardone G. 2013. The bacteria-hypothesis of colorectal cancer: pathogenetic and therapeutic implications. *Translational Gastrointestinal Cancer*, 3, 1: 44-53

Cooper G.M., Hausman R.E. 2007. The cell: a molecular approach. 4th ed. Sunderland, Sinauer Associates: 820 str.

Cryan J.F., Dinan T.G. 2012. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 13, 10: 701-712

Cuevas-Ramos G., Petit C.R., Marcq I., Boury M., Oswald E., Nougayrède J.P. 2010. *Escherichia coli* induces DNA damage *in vivo* and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 25: 11537-11542

- Davis C.P. 1996. Normal Flora. V: Medical Microbiology. 4th edition. Baron S. (ed.). Galveston, University of Texas Medical Branch at Galveston, Chapter 6: 12 str. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7617/?report=classic> (december, 2014)
- Diaz Heijtz R., Wang S., Anuar F., Qian Y., Björkholm B., Samuelsson A., Hibberd M.L., Forssberg H., Pettersson S. 2011. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108, 7: 3047-3052
- Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. Science, 308, 5728: 1635-1638
- Ellmerich S., Schöller M., Duranton B., Gossé F., Galluser M., Klein J. P., Raul F. 2000. Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. Carcinogenesis, 21, 4: 753-756
- Fava F., Danese S. 2011. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend or foe?. World Journal of Gastroenterology, 17, 5: 557-566
- Fearon E.R. 2011. Molecular genetics of colorectal cancer. Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease, 6: 479-507
- Fearon E.R., Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell, 61, 5: 759-767
- Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D.M.. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. International Journal of Cancer, 127, 12: 2893-2917
- Fierer N., Jackson J.A., Vilgalys R., Jackson R.B. 2005. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. Applied and Environmental Microbiology, 71, 7: 4117-4120
- Fite A., Macfarlane G.T., Cummings J.H., Hopkins M.J., Kong S.C., Furrie E., Macfarlane S. 2004. Identification and quantitation of mucosal and faecal desulfovibrios using real time polymerase chain reaction. Gut, 53, 4: 523-529
- Fraher M.H., O'Toole P.W., Quigley E.M. 2012. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 9, 6: 312-322
- Gao Z., Guo B., Gao R., Zhu Q., Qin H. 2015. Microbiota dysbiosis is associated with colorectal cancer. Frontiers in Microbiology, 6: 20, doi: 10.3389/fmicb.2015.00020: 9 str.
- Geng J., Song Q., Tang X., Liang X., Fan H., Peng H., Guo Q., Zhang Z. 2014. Co-occurrence of driver and passenger bacteria in human colorectal cancer. Gut Pathogens, 6: 26, doi:10.1186/1757-4749-6-26: 5 str.

- Gold J.S., Bayar S., Salem R.R. 2004. Association of *Streptococcus bovis* bacteremia with colonic neoplasia and extracolonic malignancy. Archives of surgery (Chicago, III.: 1960), 139, 7: 760-765
- Gonzalez A., Stombaugh J., Lozupone C., Turnbaugh P.J., Gordon J.I., Knight R. 2011. The mind-body-microbial continuum. Dialogues in Clinical Neuroscience, 13, 1: 55-62
- Guarner F., Malagelada J.R. 2003. Gut flora in health and disease. Lancet, 361, 9356: 512-519
- Hardy R.G., Meltzer S.J., Jankowski J.A. 2000. ABC of colorectal cancer. Molecular basis for risk factors. British Medical Journal, 321, 7265: 886-889
- Hayashi H., Sakamoto M, Benno Y. 2002. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. Microbiology and Immunology, 46, 8: 535-548
- Hobson K.G., Roberts P.L. 2004. Etiology and pathophysiology of diverticular disease. Clinics in Colon and Rectal Surgery, 17, 3: 147-153
- Hobson P.N. 1969. Rumen bacteria. V: Methods in microbiology. Vol. 3B. Norris J.R., Ribbons D.W. (eds.). New York, Academic press: 133-149
- Hogan R. 2006. How to combine errors. Reading, University of Reading: 2 str. http://www.met.rdg.ac.uk/~swrhgnrj/combining_errors.pdf (januar, 2015)
- Holdeman L.V., Moore W.E.C., Cato E.P. 1977. Anaerobe laboratory manual. 4th ed. Blacksburg, Virginia Polytechnic Institute and State University: 156 str.
- Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America, 88, 16: 7276-7280
- Hope M.E., Hold G.L., Kain R., El-Omar E.M. 2005. Sporadic colorectal cancer-role of the commensal microbiota. FEMS Microbiology Letters, 244, 1: 1-7
- Huse S.M., Young V.B., Morrison H.G., Antonopoulos D.A., Kwon J., Dalal S., Arrieta R., Hubert N.A., Shen L., Vineis J.H., Koval J.C., Sogin M.L., Chang E.B., Raffals L.E. 2014. Comparison of brush and biopsy sampling methods of the ileal pouch for assessment of mucosa-associated microbiota of human subjects. Microbiome, 2: 5, doi: 10.1186/2049-2618-2-5: 8 str.
- Huxley R.R., Ansary-Moghaddam A., Clifton P., Czernichow S., Parr C.L., Woodward M. 2009. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. International Journal of Cancer, 125, 1: 171-180

- Huycke M.M., Gaskins H.R. 2004. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Experimental Biology and Medicine*, 229, 7: 586-597
- Huys G., Vanhoutte T., Joossens M., Mahious A.S., De Brandt E., Vermeire S., Swings J. 2008. Coamplification of eukaryotic DNA with 16S rRNA gene-based PCR primers: possible consequences for population fingerprinting of complex microbial communities. *Current Microbiology*, 56, 6: 553-557
- Itzkowitz S.H. 2006. Molecular biology of dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 35, 3: 553-571
- Itzkowitz S.H., Yio X. 2004. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287, 1: 7-17
- Kau A.L., Ahern P.P., Griffin N.W., Goodman A.L., Gordon J.I. 2011. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, 474, 7351: 327-336
- Kaur N., Chen C.C., Luther J., Kao J.Y. 2011. Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*, 2, 4: 211-216
- Klappenbach J.A., Saxman P.R., Cole J.R., Schmidt T.M. 2001. rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Research*, 29, 1: 181-184
- Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41, 1: e1, doi: 10.1093/nar/gks808: 11 str.
- Koren O., Knights D., Gonzalez A., Waldron L., Segata N., Knight R., Huttenhower C., Ley R.E. 2013. A Guide to Enterotypes across the Human Body: Meta-Analysis of Microbial Community Structures in Human Microbiome Datasets. *PLoS Computational Biology*, 9, 1: e1002863, doi: 10.1371/journal.pcbi.1002863: 16 str.
- Kostic A.D., Gevers D., Pedamallu C.S., Michaud M., Duke F., Earl A.M., Ojesina A.I., Jung J., Bass A.J., Tabernero J., Baselga J., Liu C., Shivdasani R., Ogino S., Birren B.W., Huttenhower C., Garrett W.S., Meyerson M. 2011. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Research*, 22, 2: 292-298
- Lakhan S. E., Kirchgessner A. 2010. Gut inflammation in chronic fatigue syndrome. *Nutrition & Metabolism*, 7: 79, doi:10.1186/1743-7075-7-79: 10 str.
- LeBlanc J.G., Milani C., de Giori G.S., Sesma F., van Sinderen D., Ventura M. 2013. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 2: 160-168

- Lepage P., Seksik P., Sutren M., de la Cochetière M.F., Jian R., Marteau P., Doré J. 2005. Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. *Inflammatory Bowel Disease*, 11, 5: 473-480
- Ley R.E. 2010. Obesity and the human microbiome. *Current Opinion in Gastroenterology*, 26, 1: 5-11
- Ley R.E., Peterson D.A., Gordon J.I. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124, 4: 837-848
- Life Technologies. 2012. Real-time PCR handbook. Carlsbad, Life Technologies Corporation: 66 str.
<http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf> (februar, 2015)
- Liu C.M., Aziz M., Kachur S., Hsueh P.R., Huang Y.T., Keim P., Price L.B. 2012. BactQuant: an enhanced broad-coverage bacterial quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiology*, 12: 56, doi: 10.1186/1471-2180-12-56: 13 str.
- Lozupone C.A., Stombaugh J.I., Gordon J.I., Jansson J.K., Knight R. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489, 7415: 220-230
- Macfarlane S., Furrie E., Cummings J.H., Macfarlane G.T. 2004. Chemotaxonomic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in patients with ulcerative colitis. *Clinical Infectious Diseases*. 38, 12: 1690-1699
- Maddocks O.D., Short A.J., Donnenberg M.S., Bader S., Harrison D.J. 2009. Attaching and effacing *Escherichia coli* downregulate DNA mismatch repair protein *in vitro* and are associated with colorectal adenocarcinomas in humans. *PLoS One*, 4, 5: e5517, doi:10.1371/journal.pone.0005517: 13 str.
- Manson J.M., Rauch M., Gilmore M.S. 2008. The commensal microbiology of the gastrointestinal tract. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 635:15-28
- Marchesi J.R., Dutilh B.E., Hall N., Peters W.H.M., Roelofs R., Boleij A., Tjalsma H. 2011. Towards the human colorectal cancer microbiome. *PLOS ONE*, 6, 5: e20447, doi:10.1371/journal.pone.0020447: 8 str.
- Martin H.M., Campbell B.J., Hart C.A., Mpofu C., Nayar M., Singh R., Englyst H., Williams H.F., Rhodes J.M. 2004. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology*, 127, 1: 80-93
- Matijašić B.B., Obermajer T., Lipoglavšek L., Grabnar I., Avguštin G., Rogelj I. 2014. Association of dietary type with fecal microbiota in vegetarians and omnivores in Slovenia. *European Journal of Nutrition*, 53, 4: 1051-1064
- Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Miyamoto Y., Takada T., Matsumoto K., Oyaizu H., Tanaka R. 2002. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers

for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 11: 5445-551

McCoy A.N., Araújo-Pérez F., Azcárate-Peril A., Yeh J.J., Sandler R.S., Keku T.O. 2013. *Fusobacterium* is associated with colorectal adenomas. *PLoS ONE*, 8, 1: e53653, doi:10.1371/journal.pone.0053653: 8 str.

Moore W.E., Moore L.H. 1995. Intestinal flora of populations that have a high risk of colon cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 9: 3202-3207

Mori H., Maruyama F., Kato H., Toyoda A., Dozono A., Ohtsubo Y., Nagata Y., Fujiyama A., Tsuda M., Kurokawa K. 2014. Design and experimental application of a novel non-degenerate universal primer set that amplifies prokaryotic 16S rRNA genes with a low possibility to amplify eukaryotic rRNA genes. *DNA Research*, 21, 2: 217-227

Mullis K.B. 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de Biologie Clinique*, 48, 8: 579-582

Myers L.L., Firehammer B.D., Shoop D.S., Border M.M. 1984. *Bacteroides fragilis*: a possible cause of acute diarrheal disease in newborn lambs. *Infection and Immunity*, 44, 2: 241-244

Myers L.L., Shoop D. S., Stackhouse L.L., Newman F.S., Flaherty R.J., Letson G.W., Sack R. B. 1987. Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from humans with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 25, 12: 2330-2333

Nadkarni M.A., Martin F.E., Jacques N.A., Hunter N. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 148, Pt 1: 257-266

Nava G.M., Stappenbeck T.S. 2011. Diversity of the autochthonous colonic microbiota. *Gut Microbes*, 2, 2: 99-104

Novak Mlakar D., Bračko M., Maučec Zakotnik J., Keršič Svetel M. 2013. Presejanje za raka na debelem črevesu in danki - program SVIT. *Onkologija*, 17, 1: 21-25

O'Hara A.M., Shanahan F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7, 7: 688-693

O'Keefe S.J., Chung D., Mahmoud N., Sepulveda A.R., Manafe M., Arch J., Adada H., van der Merwe T. 2007. Why do African Americans get more colon cancer than Native Africans?. *Jornal of Nutrition*, 137, 1 Suppl: 175S-182S

Ocepek A., Skok P. 2008. Kronično vnetje in karcinogeneza: primer raka debelega črevesa in danke pri kronični vnetni črevesni bolezni. *Zdravniški vestnik*, 77, 9: 629-634

Prindiville T.P., Sheikh R.A., Cohen S.H., Tang Y.J., Cantrell M.C., Silva J. 2000. *Bacteroides fragilis* enterotoxin gene sequences in patients with inflammatory bowel disease. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 6, 2: 171-174

Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., Mende D.R., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B., Liang H., Zheng H., Xie Y., Tap J., Lepage P., Bertalan M., Batto J.-M., Hansen T., Le Paslier D., Linneberg A., Nielsen H.B., Pelletier E., Renault P., Sicheritz-Ponten T., Turner K., Zhu H., Yu C., Li S., Jian M., Zhou Y., Li Y., Zhang X., Li S., Qin N., Yang H., Wang J., Brunak S., Doré J., Guarner F., Kristiansen K., Pedersen O., Parkhill J., Weissenbach J., Bork P., S. Ehrlich S.D., Wang J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 7285: 59-65

Rajilić-Stojanović M., Smidt H., de Vos W.M. 2007. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental Microbiology*, 9, 9: 2125-2136

Rak v Sloveniji 2011. 2015. Ljubljana, Onkološki inštitut, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije: 96 str.
http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/RRS/LP_2011.pdf
(december, 2014)

Ravnik Glavač, M. 2000. Molekularna genetika v diagnostiki dednega raka širokega črevesa in danke. Medicinski razgledi, 1, 39: 85-93

Reddy B.S., Narisawa T., Wright P., Vukusich D., Weisburger J. H., Wynder E. L. 1975. Colon carcinogenesis with azoxymethane and dimethylhydrazine in germ-free rats. *Cancer Research*, 35, 2: 287-290

Reyes A., Haynes M., Hanson N., Angly F.E., Heath A.C., Rohwer F., Gordon J.I. 2010. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*, 466, 7304: 334-338

Righi V., Durante C., Cocchi M., Calabrese .C, Di Febo G., Lecce F., Pisi A., Tognoli V., Mucci A., Schenetti L. 2009. Discrimination of healthy and neoplastic human colon tissues by *ex vivo* HR-MAS NMR spectroscopy and chemometric analyses. *Journal of Proteome Research*, 8, 4: 1859-1869

Rutledge R.G., Côté C. 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research*, 31, 16: e93, doi: 10.1093/nar/gng093: 6 str.

Sanapareddy N., Legge R.M., Jovov B., McCoy A., Burcal L., Araujo-Perez F., Randall T.A., Galanko J., Benson A., Sandler R.S., Rawls J.F., Abdo Z., Fodor A.A., Keku T. O. 2012. Increased rectal microbial richness is associated with the presence of colorectal adenomas in humans. *ISME Journal*, 6, 10:1858-1868

Satoh M., Kuroiwa T. 1991. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Experimental Cell Research*, 196, 1: 137-140

- Savage D.C. 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. Annual Review of Microbiology, 31: 107-133
- Scanlan P.D., Shanahan F., Clune Y., Collins J.K., O'Sullivan G.C., O'Riordan M., Holmes E., Wang Y., Marchesi J.R. 2008. Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis. Environmental Microbiology, 10, 3: 789-798
- Scanlan P.D., Shanahan F., Marchesi J.R. 2009. Culture-independent analysis of *desulfovibrios* in the human distal colon of healthy, colorectal cancer and polypectomized individuals. FEMS Microbiology Ecology, 69, 2: 213-221
- Scharlau D., Borowicki A., Habermann N., Hofmann T., Klenow S., Miene C., Munjal U., Stein K., Gleis M. 2009. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. Mutation Research, 682, 1: 39-53
- Schein M., Paladugu R. 2001. Diverticulitis. V: Surgical treatment: evidence-based and problem-oriented. Holzheimer R.G., Mannick J.A. (eds.). Munich, Zuckschwerdt, Part IV: 17 str.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6986/?report=classic> (januar, 2015)
- Schuijt T.J., van der Poll T., de Vos W.M., Wiersinga W.J. 2013. The intestinal microbiota and host immune interactions in the critically ill. Trends in Microbiology, 21, 5: 221-229
- Sears C.L., Pardoll D.M. 2011. Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. Journal of Infectious Diseases, 203, 3: 306-311
- Shen X.J., Rawls J.F., Randall T., Burcal L., Mpande C.N., Jenkins N., Jovov B., Abdo Z., Sandler R.S., Keku T. O. 2010. Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. Gut Microbes 1, 3: 138-147
- Sobhani I., Tap J., Roudot-Thoraval F., Roperch J.P., Letulle S., Langella P., Corthier G., Tran Van Nhieu J., Furet J.P. 2011. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. PLoS One, 6, 1: e16393, doi: 10.1371/journal.pone.0016393: 7 str.
- Stephen A.M., Cummings J.H. 1980. The microbial contribution to human faecal mass. Journal of Medical Microbiology, 13, 1: 45-56
- Swidsinski A., Khilkin M., Kerjaschki D., Schreiber S., Ortner M., Weber J., Lochs H. 1998. Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. Gastroenterology, 115, 2: 281-286
- Šket R. 2014. Molekularno odkrivanje bakterije *Fusobacterium nucleatum* v biopsijskih vzorcih pacientov s kolorektalnim rakom. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije: 66 str.

- Štabuc B., Ferkolj I. 2011. Kolorektalni rak. V: Interna medicina. 4. izd. Košnik M., Mrevlje F., Štajer D., Černelč P., Koželj M. (ur.). Ljubljana, Littera Picta, Slovensko medicinsko društvo: 601-605
- Tap J., Mondot S., Levenez F., Pelletier E., Caron C., Furet J.P., Ugarte E., Muñoz-Tamayo R., Paslier D.L., Nalin R., Dore J., Leclerc M. 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology*, 11, 10: 2574-2584
- Tjalsma H., Boleij A., Marchesi J.R., Dutilh B.E. 2012. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 8: 575-582
- Toprak N.U., Yagci A., Gulluoglu B.M., Akin M.L., Demirkalem P., Celenk T. Soyletir G. 2006. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 8: 782-786
- Turnbaugh P.J., Hamady M., Yatsunenko T., Cantarel B.L., Duncan A., Ley R.E., Sogin M.L., Jones W.J., Roe B.A., Affourtit J.P., Egholm M., Henrissat B., Heath A.C., Knight R., Gordon J.I. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457, 7228: 480-484
- 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
- Tyagi S., Kramer F.R. 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*, 14, 3: 303-308
- Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29, 3: 151-159
- Van Dyke M.I., McCarthy A.J. 2002. Molecular biological detection and characterization of *Clostridium* populations in municipal landfill sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4: 2049-2053
- Wang T., Cai G., Qiu Y., Fei N., Zhang M., Pang X., Jia W., Cai S., Zhao L. 2012. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME Journal*, 6, 2: 320-329
- Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 95, 12: 6578-6583
- Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22, 1: 130-131, 134-138
- Wu G.D., Chen J., Hoffmann C., Bittinger K., Chen Y.Y., Keilbaugh S.A., Bewtra M., Knights D., Walters W.A., Knight R., Sinha R., Gilroy E., Gupta K., Baldassano R.,

- Nessel L., Li H., Bushman F.D., Lewis J.D. 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334, 6052: 105-108
- Wu S., Lim K.C., Huang J., Saidi R.F., Sears C. L. 1998. *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 25: 14979-1484
- Wu S., Morin P.J., Maouyo D., Sears C.L. 2003. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology*, 124, 2: 392-400
- Wu S., Rhee K.J., Albesiano E., Rabizadeh S., Wu X., Yen H.R., Huso D.L., Brancati F.L., Wick E., McAllister F., Housseau F., Pardoll D.M., Sears C. 2009. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nature Medicine*, 15, 9: 1016-1022
- Yatsunenko T., Rey F.E., Manary M.J., Trehan I., Dominguez-Bello M.G., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Baldassano R.N., Anokhin A.P., Heath A.C., Warner B., Reeder J., Kuczynski J., Caporaso J.G., Lozupone C.A., Lauber C., Clemente J.C., Knights D., Knight R., Gordon J.I. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486, 7402: 222-227
- Yu M., Zhou Y., Shi Y., Ning L., Yang Y., Wei X., Zhang N., Hao X., Niu R. 2007. Reduced mitochondrial DNA copy number is correlated with tumor progression and prognosis in Chinese breast cancer patients. *IUBMB Life*, 59, 7: 450-457
- Zackular J.P., Baxter N.T., Iverson K.D., Sadler W.D., Petrosino J.F., Chen G.Y., Schloss P.D. 2013. The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *MBio*, 4, 6: e00692-13, doi: 10.1128/mBio.00692-13: 9 str.
- Zhang T., Breitbart M., Lee W.H., Run J.Q., Wei C.L., Soh S.W., Hibberd M.L., Liu E.T., Rohwer F., Ruan Y. 2006. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biology*, 4, 1: e3, doi:10.1371/journal.pbio.0040003: 10 str.
- Zhang T., Fang H.H. 2006. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 3: 281-289
- Zoetendal E.G., von Wright A., Vilpponen-Salmela T., Ben-Amor K., Akkermans A.D., de Vos W.M. 2002. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 7: 3401-3407

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem mentorju prof. dr. Gorazdu Avguštinu za sprejetje mentorstva, za vložen trud in čas, za strokoven pregled magistrske naloge in še posebej za odzivnost in pomoč pri organizaciji vsega potrebnega v zadnjem mesecu pred zagovorom.

Iskreno se zahvaljujem somentorju dr. Luki Lipoglavšku za potrpljenje, predloge za izboljšave in strokovne usmeritve med izvedbo naloge, za hiter pregled vseh poročil in magistrske naloge, za vse odgovore na moja nešteta vprašanja in za pipravljnost deliti svoje znanje z mano.

Hvala prof. dr. Borutu Štabucu, dr. med. in Kliničnemu oddelku za Gastroenterologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani za vzorce in sodelovanje pri študiji.

Zahvaljujem se recenzentu dr. Matjažu Ocepku za hiter pregled magistrske naloge ter predsedniku komisije prof. dr. Alojzu Ihanu za hiter odziv in sodelovanje.

Iskreno se zahvaljujem zaposlenim in vsem ostalim, s katerimi sem delila čas na Katedri za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Hvala Ani, Mojci, Andreji, Domnu, Katji, Maši, Dušku, Lijani in Marti, za pomoč, druženje ob kavah, prevoze in še kaj. Posebna zahvala gre Robertu Šketu za sodelovanje in pomoč pri izvedbi naloge ter Brigitu Nograšek za vse strokovne nasvete, popestritve delovnih vikendov, prijaznost in bodrenje med delom v laboratoriju.

Najlepša hvala Tanji Obermajer, za razlago in vse predloge za izboljšavo izvedbe reakcij qPCR in dr. Manuela Čitar za pripravo evkariontskih celic.

Hvala vsem prijateljicam in prijateljem, ki so me poslušali in me spodbujali. Hvala Pavlu za računalnik, brez katerega bi zelo težko napisala magistrsko nalogu. Hvala Urški Golob za lektoriranje magistrske naloge.

Največja zahvala gre moji družini, posebno staršem, ki sta mi omogočila študij, me vedno spodbujala in podpirala, ter ostalim članom družine, brez katerih si ne predstavljam, kako bi mi uspelo priti do tu, kjer sem danes.

PRILOGE

Priloga A: Mesto odvzema vzorca, opis vzorca in diagnoza pri posameznem pacientu

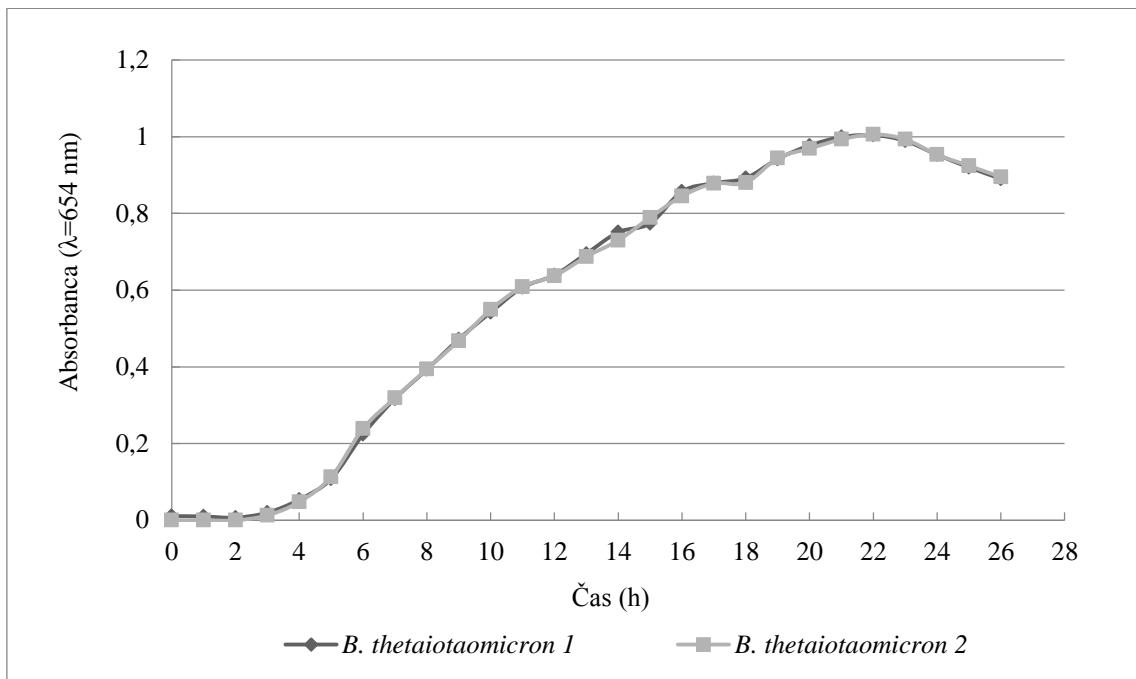
| Pacient | Vzorec | Mesto odvzema | Opis vzorca | Diagnoza |
|---------|--------|------------------------------|--|---|
| A | A/Bp1 | slepo črevo | bp | benigno |
| | A/Bp2 | desni zavoj debelega črevesa | bp | benigno |
| | A/Bp3 | prečni kolon | bp | benigno |
| | A/Bp4 | esasto črevo | bp (divertikli) | benigno |
| B | B/Bp1 | slepo črevo | bp | benigno |
| | B/Bp2 | desni zavoj debelega črevesa | bp | benigno |
| | B/Bp3 | danka | bp | benigno |
| C | C/Bp1 | slepo črevo | bp | benigno |
| | C/Bp2 | navzgornji kolon | sesilna polipoidna neoplazma | benigno |
| | C/TS | danka | intermediarna poliploidna neoplazma | vilozni adenom nizke stopnje displazije |
| D | D/Bp | slepo črevo | bp | benigno |
| | D/TS1 | esasto črevo | nopolipoidna neeksulceriarna neoplazma | adenom nizke stopnje displazije |
| | D/TS2 | danka | pečljata polipoidna neoplazma | adenom nizke stopnje displazije |
| E | E/Bp1 | navzgornji kolon | bp | benigno |
| | E/Bp2 | navzgornji kolon | bp | benigno |
| | E/TS | navzgornji kolon | polip | adenom nizke stopnje displazije |
| F | F/Bp | navzgornji kolon | bp | benigno |
| | F/TS | navzgornji kolon | polip | adenom nizke stopnje displazije |
| G | G/TS1 | danka | adenom | adenom nizke stopnje displazije |
| | G/TS2 | danka | tumor | adenokarcinom |
| H | H/TS | prečni kolon | intermediarna polipoidna neoplazma | tubularni adenom nizke stopnje displazije |
| | H/ČV | prečni kolon | črevesna vsebina | / |
| | H/Bp1 | prečni kolon | bp | benigno |
| I | H/Bp2 | prečni kolon | bp | benigno |
| | I/TS | navzgornji kolon | intermediarna polipoidna neoplazma | tubulovilozni adenom nizke stopnje displazije |
| | I/ČV | navzgornji kolon | črevesna vsebina | / |
| | I/Bp1 | navzgornji kolon | bp | benigno |
| | I/Bp2 | navzgornji kolon | bp | benigno |

Se nadaljuje

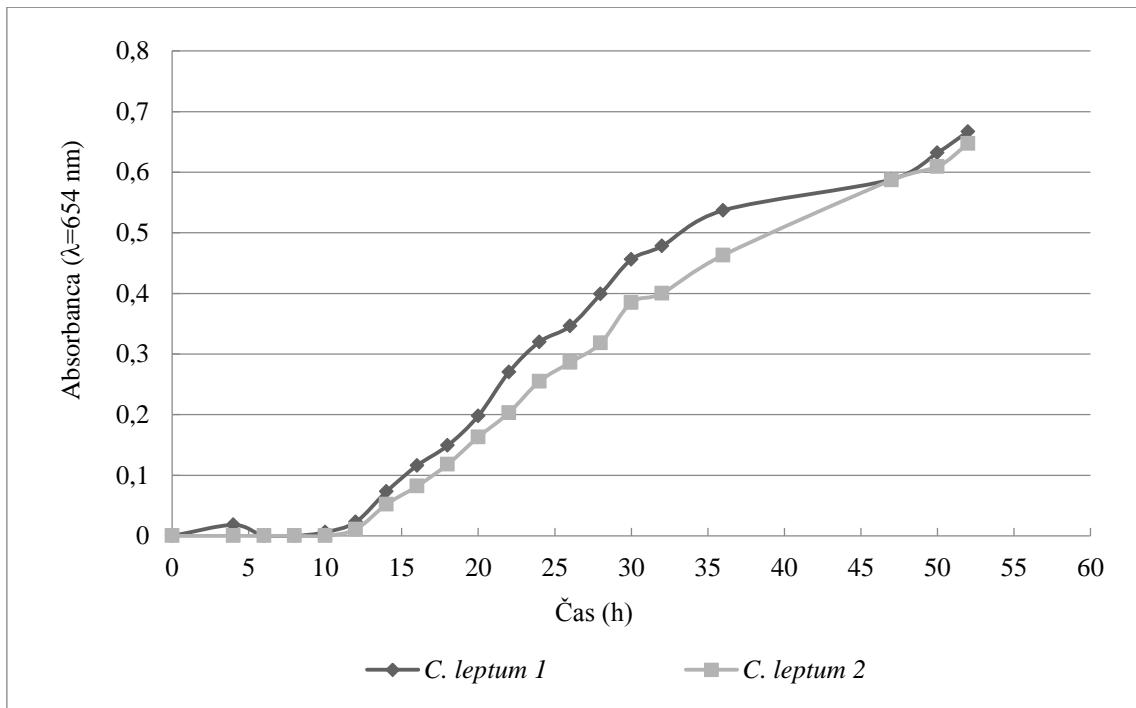
| Pacient | Vzorec | Mesto odvzema | Opis vzorca | Diagnoza |
|---------|--------|---|-------------------------------|--|
| J | J/TS1 | esasto črevo | pecljata polipoidna neoplazma | tubularni adenom nizke stopnje displazije |
| | J/TS2 | esasto črevo | pecljata polipoidna neoplazma | tubularni adenom nizke stopnje displazije |
| | J/Bp1 | esasto črevo | bp | benigno |
| | J/Bp2 | esasto črevo | bp | benigno |
| K | J/Bp3 | esasto črevo | bp | benigno |
| | K/Bp1 | navzdoljni kolon | bp | benigno |
| | K/Bp2 | navzdoljni kolon | bp | benigno |
| | K/ČV | navzdoljni kolon | črevesna vsebina | / |
| L | K/TS | navzdoljni kolon | polip sigme | adenom nizke stopnje displazije |
| | L/Bp1 | slepo črevo | bp | benigno |
| | L/Bp2 | slepo črevo | bp | benigno |
| | L/ČV | slepo črevo | črevesna vsebina | / |
| M | L/TS | slepo črevo | malignom | adenokarcinom |
| | M/TS | danka | tumor | adenokarcinom |
| | M/Bp1 | danka | bp | benigno |
| | M/Bp2 | danka | bp | benigno |
| N | M/ČV | danka | črevesna vsebina | / |
| | N/TS | navzgornji kolon | tumor | adenokarcinom |
| | N/Bp1 | navzgornji kolon | bp | benigno |
| | N/Bp2 | navzgornji kolon | bp | benigno |
| O | O/TS | prečni kolon | tumor linealne fleksure | adenokarcinom |
| | O/Bp1 | prečni kolon | bp | benigno |
| | O/Bp2 | prečni kolon | bp | benigno |
| P | P/Bp | prehod med danko in esastim črevesom | bp | benigno |
| | P/TS | prehod med danko in esastim črevesom | malignom | adenokarcinom |
| | P/ČV | prehod med danko in esastim črevesom | črevesna vsebina | / |
| R | R/TS | esasto črevo | polip | tubolovilozni adenom visoke stopnje displazije |
| | R/Bp1 | esasto črevo | bp | benigno |
| | R/Bp2 | esasto črevo | bp | benigno |
| | R/ČV | esasto črevo | črevesna vsebina | / |
| S | S/ČV | prečni kolon | črevesna vsebina | / |
| | S/TS | prečni kolon | polip | adenom nizke stopnje displazije |
| | S/Bp1 | prečni kolon | bp | benigno |
| | S/Bp2 | prečni kolon | bp | benigno |

Bp – nespremenjena sluznica brez posebnosti; TS – tumorsko spremenjena sluznica; ČV – črevesna vsebina

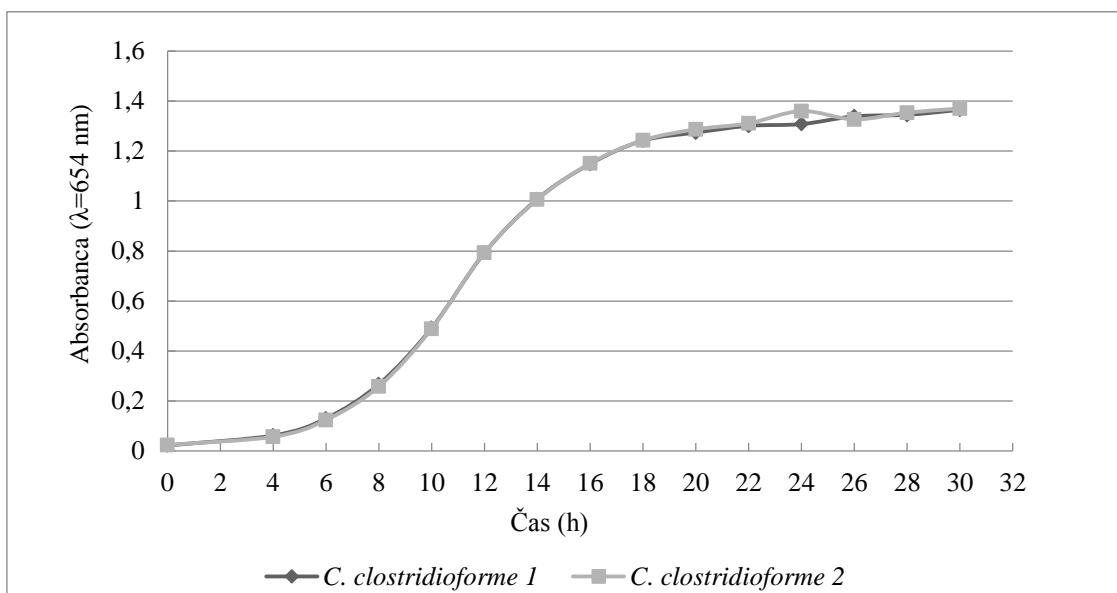
Priloga B: Rastne krivulje bakterijskih sevov čistih kultur *B. thetaiotaomicro*, *C. leptum*, *C. clostridioforme* in *E. coli*



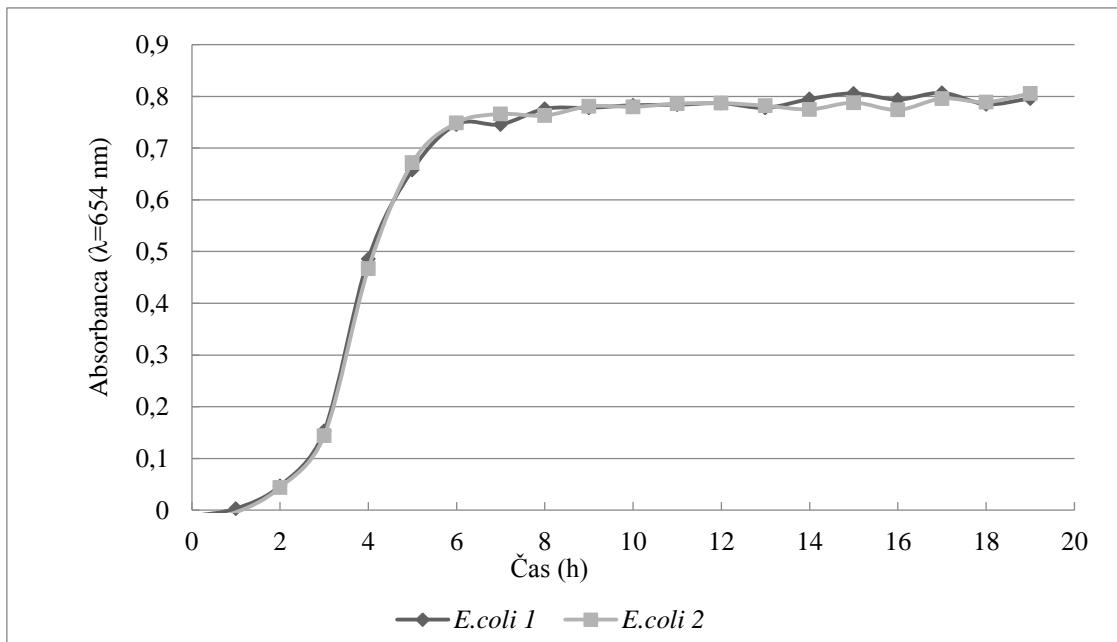
Priloga B1: Rastna krivulja za čisto kulturo *B. thetaiotaomicron*. Na grafu je predstavljeno naraščanje optične gostote, kot funkcija absorbance pri valovni dolžini 654 nm od časa (v urah) merjenja.



Priloga B2: Rastna krivulja za čisto kulturo *C. leptum*. Na grafu je predstavljeno naraščanje optične gostote, kot funkcija absorbance pri valovni dolžini 654 nm od časa (v urah) merjenja.



Priloga B3: Rastna krivulja za čisto kulturo *C. clostridioforme*. Na grafu je predstavljeno naraščanje optične gostote, kot funkcija absorbance pri valovni dolžini 654 nm od časa (v urah) merjenja.



Priloga B4: Rastna krivulja za čisto kulturo *E. coli*. Na grafu je predstavljeno naraščanje optične gostote, kot funkcija absorbance pri valovni dolžini 654 nm od časa (v urah) merjenja.

Priloga C: Čas gojenja, optična gostota (645 nm) in število preštetih celic pod mikroskopom v ml suspenzije

| Bakterijski sev | Čas (h) | Optična gostota (OD ₆₅₄) | Število celic/ml |
|----------------------------|---------|--------------------------------------|--------------------|
| <i>B. thetaiotaomicron</i> | 15 h | 0,80 | $1,44 \times 10^9$ |
| <i>C. leptum</i> | 25 h | 0,32 | $2,04 \times 10^8$ |
| <i>C. clostridioforme</i> | 12 h | 0,80 | $1,75 \times 10^8$ |
| <i>E. coli</i> | 5 h | 0,55 | $1,75 \times 10^8$ |

Priloga D: Parametri qPCR reakcij za ugotavljanje števila bakterij filogenetskih skupin in za ugotavljanje skupnega števila bakterij v vzorcih. Za ugotavljanje števila bakterij vsake od filogenetskih skupin smo qPCR reakcijo naredili dvakrat. Za ugotavljanje skupnega števila bakterij smo na ploščico nanesli vse štiri standarde in za izračun skupnega števila bakterij iz umeritvene krivulje definirali enak standard kot pri skupini.

| Par začetnih oligonukleotidov | Standard za umeritveno krivuljo | Naklon | Y-presek | Baseline* | Ct threshold** | Ct LLC*** | R² | Učinkovitost (%) |
|--------------------------------------|--|---------------|-----------------|------------------|-----------------------|------------------|----------------------|-------------------------|
| Bac 303 in | <i>B. thetaiotaomicron</i> | -3,662 | 33,630 | AUTO | 0,268 | 32,973 | 0,999 | 87,53 |
| Bac 708 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | -3,697 | 33,624 | AUTO | 0,203 | 32,546 | 1 | 84,41 |
| S-*‐Clos-0561-a-S-17 in | <i>C. leptum</i> | -3,610 | 33,899 | AUTO | 0,141 | 32,912 | 0,999 | 89,23 |
| S-*‐Clept-1129-1-A-17 | <i>C. leptum</i> | -3,745 | 33,624 | AUTO | 0,049 | 34,486 | 0,998 | 90,11 |
| g-Ccoc-F in | <i>C. clostridioforme</i> | -4,401 | 43,666 | AUTO | 0,371 | 40,886 | 1 | 68,74 |
| g-Ccoc-R | <i>C. clostridioforme</i> | -4,440 | 43,732 | AUTO | 0,341 | 43,732 | 0,999 | 67,97 |
| Eco 1457F in | <i>E. coli</i> | -3,763 | 35,481 | AUTO | 0,129 | 32,355 | 0,999 | 84,38 |
| Eco 1652R | <i>E. coli</i> | -3,718 | 34,306 | AUTO | 0,126 | 32,633 | 1 | 85,78 |
| Nadkarni F+R | <i>B. thetaiotaomicron</i> | -3,784 | 34,058 | AUTO | 0,229 | 28,09 | 0,999 | 83,76 |
| Nadkarni F+R | <i>C. leptum</i> | -3,793 | 34,117 | AUTO | 0,299 | 28,09 | 0,999 | 83,50 |
| Nadkarni F+R | <i>C. clostridioforme</i> | -3,530 | 35,888 | AUTO | 0,299 | 28,09 | 0,997 | 92,26 |
| Nadkardni F+R | <i>E. coli</i> | -3,515 | 34,178 | AUTO | 0,299 | 28,09 | 0,990 | 92,52 |
| EUB 338F+518R | <i>B. thetaiotaomicron</i> | -3,284 | 30,447 | AUTO | 0,269 | 22,628 | 0,999 | 101,59 |
| EUB 338F+518R | <i>C. leptum</i> | -3,282 | 31,134 | AUTO | 0,269 | 22,628 | 0,999 | 101,67 |
| EUB 338F+518R | <i>C. clostridioforme</i> | -3,275 | 30,550 | AUTO | 0,269 | 22,628 | 0,999 | 101,99 |
| EUB 338F+518R | <i>E. coli</i> | -3,340 | 31,256 | AUTO | 0,269 | 22,628 | 0,999 | 99,26 |

*Baseline – bazna linija; ** Ct threshold – Ct vrednost praga zaznave; *** Ct LLC – cikel spodnje meje detekcije qPCR reakcije

Priloga E: Izračun relativnih deležev preučevanih bakterijskih skupin pri pacientih s kolorektalnim rakom
 Priloga E1: Izračun relativnih deležev bakterijskih skupin pri pacientu A

| Vzorec | Mesto odvzema | Opis vzorca | Relativni delež filogenetske bakterijske skupine | | |
|--------|---------------|-------------|--|----------------------------------|---------------------------------------|
| | | | <i>Bacteroides-Prevotella</i> | <i>C. leptum</i> (rRNK gruča IV) | <i>C. coccoides</i> (rRNK gruča XIVa) |
| Bp1 | slepo črevo | BP | 8,95 | 8,63 | 20,27 |
| Bp2 | desni zavoj | BP | 9,27 | 6,81 | 11,16 |
| Bp3 | prečni kolon | BP | 13,39 | 8,10 | 16,90 |
| Bp4 | esasto črevo | divertikel | 6,14 | 12,35 | 2,78 |
| | | | | | 10,92 |

Priloga E2: Izračun relativnih deležev preučevanih bakterijskih skupin v vzorcih nespremenjene sluznice, tumorsko spremenjene sluznice in črevesnih vsebin pacientov.

| Relativni delež filogenetske bakterijske skupine | | | | | |
|--|-------------|-------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| Pacient | Opis vzorca | <i>Bacteroides-Prevotella</i> | <i>C. leptum</i> (rRNK gruča IV) | <i>C. coccoides</i> (rRNK gruča XIVa) | <i>Enterobacteriaceae</i> |
| pacient C | BP | 8,62 | 9,01 | 23,86 | 10,40 |
| | TS | 12,34 | 13,02 | 28,54 | 5,42 |
| pacient G | TS/1 | 12,10 | 25,35 | 11,07 | 12,09 |
| | TS/2 | 44,67 | 4,18 | 3,64 | 25,24 |
| pacient I | BP | 11,56 | 14,24 | 33,52 | 1,82 |
| | TS | 7,67 | 8,28 | 27,18 | 1,07 |
| | ČV | 10,74 | 19,02 | 30,33 | 2,45 |
| pacient J | BP | 10,16 | 4,52 | 20,95 | 4,28 |
| | TS | 16,17 | 6,08 | 51,21 | 21,98 |
| pacient K | BP | 28,44 | 7,39 | 10,61 | 30,31 |
| | TS | 24,31 | 1,68 | 7,11 | 16,08 |
| | ČV | 16,98 | 1,21 | 8,28 | 11,58 |
| pacient L | BP | 9,12 | 10,46 | 8,98 | 0,31 |
| | TS | 13,24 | 5,05 | 6,98 | 0,91 |
| | ČV | 11,40 | 10,89 | 14,09 | 0,19 |
| pacient M | BP | 6,17 | 26,47 | 9,56 | 0,01 |
| | TS | 7,18 | 27,05 | 18,93 | 0,14 |
| | ČV | 5,28 | 21,21 | 8,54 | 0,00 |
| pacient N | BP | 5,60 | 6,92 | 25,04 | 0,03 |
| | TS | 6,91 | 4,87 | 20,12 | 0,05 |
| pacient O | BP | 1,64 | 4,72 | 17,02 | 0,25 |
| | TS | 1,40 | 2,58 | 13,19 | 0,76 |
| pacient P | BP | 12,80 | 3,46 | 13,16 | 1,69 |
| | TS | 13,52 | 8,54 | 6,84 | 0,88 |
| | ČV | 33,36 | 9,81 | 6,54 | 0,47 |
| pacient R | BP | 3,95 | 29,11 | 25,91 | 0,03 |
| | TS | 5,42 | 25,77 | 23,97 | 21,99 |
| | ČV | 5,08 | 41,72 | 21,23 | 0,01 |

Priloga F: Izračuni stopnje sprememb med tumorsko spremenjenimi vzorci in vzorci črevesnih vsebin glede na vzorce nespremenjene sluznice

Priloga F1: Izračuni stopnje spremembe v številu bakterij skupine *Bacteroides-Prevotella*

| Pacient | Nespremenjena sluznica | | Tumorsko spremenjena sluznica | | Črevesna vsebina | |
|---------|---------------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Stopnja spremembe | Standardni odklon | Stopnja spremembe | Standardni odklon | Stopnja spremembe | Standardni odklon |
| C | 1 | 0,0526 | 1,4307 | 0,0650 | | |
| I | 1 | 0,2269 | 0,6631 | 0,1593 | 0,929 | 0,157 |
| J | 1 | 0,1493 | 1,5921 | 0,3027 | | |
| K | 1 | 0,3767 | 0,8546 | 0,2290 | 0,597 | 0,160 |
| L | 1 | 0,1249 | 1,4522 | 0,2010 | 1,250 | 0,306 |
| M | 1 | 0,1714 | 1,1626 | 0,5237 | 0,855 | 0,107 |
| N | 1 | 0,1161 | 1,2329 | 0,1921 | | |
| O | 1 | 0,3670 | 0,8525 | 0,4272 | | |
| P | 1 | 0,1621 | 1,0564 | 0,1754 | 2,607 | 0,300 |
| R | 1 | 0,2017 | 1,3696 | 0,2382 | 1,285 | 0,212 |

Priloga F2: Izračuni stopnje spremembe v številu bakterij skupine *C. leptum* (rRNK gruča IV)

| Pacient | Nespremenjena sluznica | | Tumorsko spremenjena sluznica | | Črevesna vsebina | |
|---------|---------------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Stopnja spremembe | Standardni odklon | Stopnja spremembe | Standardni odklon | Stopnja spremembe | Standardni odklon |
| C | 1 | 0,0535 | 1,4450 | 0,2123 | | |
| I | 1 | 0,2093 | 0,5812 | 0,2515 | 1,335 | 0,231 |
| J | 1 | 0,1938 | 1,3456 | 0,3625 | | |
| K | 1 | 0,5854 | 0,2267 | 0,0963 | 0,164 | 0,071 |
| L | 1 | 0,1471 | 0,4830 | 0,0710 | 1,041 | 0,238 |
| M | 1 | 0,0754 | 1,0221 | 0,1032 | 0,801 | 0,113 |
| N | 1 | 0,1026 | 0,7037 | 0,0899 | | |
| O | 1 | 0,3050 | 0,5463 | 0,1534 | | |
| P | 1 | 0,8338 | 2,4675 | 1,4673 | 2,835 | 1,705 |
| R | 1 | 0,0977 | 0,8854 | 0,0875 | 1,433 | 0,131 |

Priloga F3: Izračuni stopnje spremembe v številu bakterij skupine *C. coccoides* (rRNK gruča XIVa)

| Pacient | Nespremenjena sluznica | | Tumorsko spremenjena sluznica | | Črevesna vsebina | |
|---------|------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Stopnja spremembe | Standardni odklon | Stopnja spremembe | Standardni odklon | Stopnja spremembe | Standardni odklon |
| C | 1 | 0,1104 | 1,1958 | 0,1285 | | |
| I | 1 | 0,1125 | 0,8107 | 0,1026 | 0,905 | 0,090 |
| J | 1 | 0,0580 | 2,4446 | 0,4041 | | |
| K | 1 | 0,3963 | 0,6698 | 0,1969 | 0,781 | 0,220 |
| L | 1 | 0,0832 | 0,7778 | 0,0972 | 1,569 | 0,368 |
| M | 1 | 0,0868 | 1,9796 | 0,2510 | 0,893 | 0,093 |
| N | 1 | 0,1106 | 0,8037 | 0,0841 | | |
| O | 1 | 0,1402 | 0,7751 | 0,1945 | | |
| P | 1 | 0,1482 | 0,5196 | 0,0721 | 0,497 | 0,052 |
| R | 1 | 0,0895 | 0,9251 | 0,0884 | 0,819 | 0,057 |

Priloga F4: Izračuni stopnje spremembe v številu bakterij družine *Enterobacteriaceae*

| Pacient | Nespremenjena sluznica | | Tumorsko spremenjena sluznica | | Črevesna vsebina | |
|---------|------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Stopnja spremembe | Standardni odklon | Stopnja spremembe | Standardni odklon | Stopnja spremembe | Standardni odklon |
| C | 1 | 0,0461 | 0,5213 | 0,0258 | | |
| I | 1 | 0,0964 | 0,5900 | 1,8671 | 1,350 | 0,101 |
| J | 1 | 0,3304 | 5,1397 | 1,2854 | | |
| K | 1 | 0,1878 | 0,5305 | 0,0720 | 0,382 | 0,053 |
| L | 1 | 1,2228 | 2,9389 | 2,5606 | 0,621 | 0,554 |
| M | 1 | 0,3966 | 17,9640 | 10,8933 | 0,128 | 0,247 |
| N | 1 | 9,5866 | 1,4679 | 10,7994 | | |
| O | 1 | 0,2125 | 3,0924 | 0,8435 | | |
| P | 1 | 0,2150 | 0,5217 | 0,0976 | 0,278 | 0,043 |
| R | 1 | 5,1152 | 814,3151 | 2946,13 | 0,529 | 1,919 |

Priloga G: Rezultati SPSS testov

Priloga G1: Rezultati preverjanja normalne porazdelite spremenljivk s programom SPSS iz vzorcev nespremenjene in spremenjene črevesne sluznice 10 pacientov, pri 5 pacientih z adenomi, pri 5 pacientih z adenokarcinomi in pri vzorcih črevesnih vsebin 6 pacientov. Sivo so označene normalno razporejene spremenljivke, za katere smo naredili t-test.

| Preverjanje normalne porazdelitve spremenljivk | | | | | | |
|--|--------------------------------------|--------------------|------------|---------------------|--------------------|------------|
| | Test Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Test Shapiro-Wilk | | |
| | Vrednost statistike | Stopinje prostosti | p-vrednost | Vrednost statistike | Stopinje prostosti | p-vrednost |
| Nespremenjena in spremenjena sluznica | | | | | | |
| <i>Bacteroides-Prevotella</i> | 0,300 | 10 | 0,007 | 0,762 | 11 | 0,003 |
| <i>C. leptum</i> (rRNK gruča IV) | 0,204 | 10 | 0,200* | 0,896 | 11 | 0,167 |
| <i>C. coccoides</i> (rRNK gruča XIVa) | 0,257 | 10 | 0,041 | 0,730 | 11 | 0,001 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | 0,279 | 10 | 0,016 | 0,879 | 11 | 0,100 |
| Adenomi | | | | | | |
| <i>Bacteroides-Prevotella</i> | 0,221 | 5 | 0,200* | 0,916 | 6 | 0,480 |
| <i>C. leptum</i> (rRNK gruča IV) | 0,254 | 5 | 0,200* | 0,923 | 6 | 0,526 |
| <i>C. coccoides</i> (rRNK gruča XIVa) | 0,302 | 5 | 0,093 | 0,725 | 6 | 0,011 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | 0,185 | 5 | 0,200* | 0,939 | 6 | 0,648 |
| Adenokarcinomi | | | | | | |
| <i>Bacteroides-Prevotella</i> | 0,319 | 5 | 0,107 | 0,862 | 5 | 0,235 |
| <i>C. leptum</i> (rRNK gruča IV) | 0,227 | 5 | 0,200* | 0,953 | 5 | 0,756 |
| <i>C. coccoides</i> (rRNK gruča XIVa) | 0,329 | 5 | 0,082 | 0,781 | 5 | 0,056 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | 0,246 | 5 | 0,200* | 0,889 | 5 | 0,353 |
| Črevesna vsebina | | | | | | |
| <i>Bacteroides-Prevotella</i> | 0,315 | 6 | 0,064 | 0,864 | 6 | 0,203 |
| <i>C. leptum</i> (rRNK gruča IV) | 0,180 | 6 | 0,200* | 0,947 | 6 | 0,713 |
| <i>C. coccoides</i> (rRNK gruča XIVa) | 0,226 | 6 | 0,200* | 0,917 | 6 | 0,485 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | 0,438 | 6 | 0,001 | 0,566 | 6 | 0,000 |

* Vrednosti pod spodnjo mejo dejanske p-vrednosti

^a Lillieforsov popravek

Priloga G2: Rezultati t-testov za normalno porazdeljene pare spremenljivk.

| Parni t-test (t-test za odvisne vzorce) | | | | | | | | |
|--|---|--------------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------|------------|
| | Razlike vrednosti odvisnih spremenljivk | | | | | | | |
| | | | Standardna napaka | 95 % interval zaupanja | | | | |
| | Aritmetična sredina razlik | Standardni odklon razlik | aritmetične sredine razlik | Spodnja meja intervala | Zgornja meja intervala | Vrednost testne statistike | Stopinje prostosti | p-vrednost |
| Nespremenjena in spremenjena sluznica | | | | | | | | |
| <i>C. leptum</i> (rRNK gruča IV) | 2,678 | 6,101 | 1,839 | -1,421 | 6,777 | 1,456 | 10 | 0,176 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | 0,665 | 13,001 | 3,920 | -8,069 | 9,400 | 0,170 | 10 | 0,869 |
| Adenomi | | | | | | | | |
| <i>Bacteroides-Prevotella</i> | 1,970 | 7,556 | 3,085 | -5,959 | 9,900 | 0,639 | 5 | 0,551 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | 0,384 | 17,364 | 7,089 | -17,838 | 18,606 | 0,054 | 5 | 0,959 |
| <i>C. leptum</i> (rRNK gruča IV) | 4,473 | 7,486 | 3,056 | -3,383 | 12,329 | 1,464 | 5 | 0,203 |
| Adenokarcinomi | | | | | | | | |
| <i>Bacteroides-Prevotella</i> | -1,3822 | 1,6376 | 0,7324 | -3,4155 | 0,6512 | -1,8873 | 4 | 0,1322 |
| <i>C. leptum</i> (rRNK gruča IV) | 0,7870 | 3,9068 | 1,7472 | -4,0639 | 5,6380 | 0,4505 | 4 | 0,6757 |
| <i>C. coccoides</i> (rRNK gruča XIVa) | 1,5382 | 6,2985 | 2,8168 | -6,2824 | 9,3587 | 0,5461 | 4 | 0,6140 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | -0,0909 | 0,5610 | 0,2509 | -0,7875 | 0,6056 | -0,3625 | 4 | 0,7353 |
| Črevesne vsebine | | | | | | | | |
| <i>Bacteroides-Prevotella</i> | -1,798 | 10,419 | 4,254 | -12,732 | 9,136 | -0,423 | 5 | 0,690 |
| <i>C. leptum</i> (rRNK gruča IV) | -2,122 | 7,229 | 2,951 | -9,709 | 5,464 | -0,719 | 5 | 0,504 |
| <i>C. coccoides</i> (rRNK gruča XIVa) | 2,122 | 4,036 | 1,648 | -2,114 | 6,358 | 1,288 | 5 | 0,254 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | 3,242 | 7,610 | 3,107 | -4,744 | 11,228 | 1,044 | 5 | 0,345 |

Priloga G3: Rezultati Wilcoxon testa za 10 pacientov (nespremenjena in spremenjena sluznica), 5 pacientov z adenomi, 5 pacientov z adenokarcinomi in pri vzorcih črevesnih vsebin 6 pacientov.

| Wilcoxon test (test z rangi) | | | | |
|--|-------------------------------|-------------------------------------|---|---------------------------|
| | <i>Bacteroides-Prevotella</i> | <i>C. leptum</i> (rRNK gruča IV) | <i>C. coccoides</i> (rRNK gruča VIX) | <i>Enterobacteriaceae</i> |
| Nespremenjena in spremenjena sluznica | | | | |
| Z | -1,156 ^b | -1,423 ^c | -,356 ^c | -,445 ^c |
| p-vrednost | 0,248 | 0,155 | 0,722 | 0,657 |
| Adenomi | | | | |
| Z | -,524 ^b | -1,363 ^b | -,314 ^b | -,314 ^b |
| p-vrednost | 0,600 | 0,173 | 0,753 | 0,753 |
| Adenokarcinomi | | | | |
| Z | -1,753 ^b | -,674 ^c | -,674 ^c | -,674 ^b |
| p-vrednost | 0,080 | 0,500 | 0,500 | 0,500 |
| Črevesne vsebine | | | | |
| Z | -,524 ^b | -,734 ^b | -1,153 ^c | -1,363 ^c |
| p-vrednost | 0,600 | 0,463 | 0,249 | 0,173 |

*b – vsota rangov negativnih razlik; c – vsota rangov pozitivnih razlik

Priloga H: Količina DNK, ki smo jo dodajali v reakcijske mešanice podana v številu kopij tarčne DNK/ μ l in masi v ng/ μ l. Število kopij tarčne DNK smo izračunali po postopku, ki je opisan v poglavju Rezultati (4.2). Masa DNK je ocenjena sprekrofotometrično z napravo NanoVueTM.

| | Redčitev 1 | | Redčitev 2 | |
|-----------------------|--|--------------------------------------|---|-------------------------------------|
| | Bakterijska DNK | Evkariontska DNK | Bakterijska DNK | Evkariontska DNK |
| EVK DNK (1 enota) | | 108.945 kopij/ μ l 0,304 ng | | 21.789 kopij/ μ l 0,06 ng |
| EVK DNK (5 enot) | | 544.725 kopij/ μ l 1,52 ng | | 108.945 kopij/ μ l 0,304 ng |
| EVK DNK (10 enot) | | 1.089.450 kopij/ μ l 3,04 ng | | 217.890 kopij/ μ l 0,61 ng |
| EVK DNK (100 enot) | | 10.894.495 kopij/ μ l 30,4 ng | | 2.178.899 kopij/ μ l 6,08 ng |
| BAKT DNK (1 enota) | 111.317 kopij/μl 0,13 ng | | 22.263 kopij/μl 0,03 ng | |
| | 111.317 kopij/ μ l 0,13 ng | 108.945 kopij/ μ l 0,304 ng | 22.263 kopij/ μ l 0,03 ng | 21.789 kopij/ μ l 0,06 ng |
| BAKT:EVK 1:1 | 111.317 kopij/ μ l 0,13 ng | 544.725 kopij/ μ l 1,52 ng | 22.263 kopij/ μ l 0,03 ng | 108.945 kopij/ μ l 0,304 ng |
| BAKT:EVK 1:5 | 0,13 ng | 1,52 ng | 0,03 ng | 0,304 ng |
| BAKT:EVK 1:10 | 111.317 kopij/ μ l 0,13 ng | 1.089.450 kopij/ μ l 3,04 ng | 22.263 kopij/ μ l 0,03 ng | 217.890 kopij/ μ l 0,61 ng |
| BAKT:EVK 1:100 | 111.317 kopij/ μ l 0,13 ng | 10.894.495 kopij/ μ l 30,4 ng | 22.263 kopij/ μ l 0,03 ng | 2.178.899 kopij/ μ l 6,08 ng |

Priloga I: Rezultati qPCR reakcij pomnoževanja evkarijntske DNK, bakterijske DNK in mešanice evkarijntske in bakterijske DNK z metodo qPCR

Priloga II: Dopolnjeni rezultati qPCR rekacij pomnoževanja evkarijntske DNK, bakterijske DNK in mešanic evkarijntske in bakterijske DNK z metodo qPCR za Redčitev 1

| Ocena števila kopij DNK | Nadkarni F+R | | | EUB 338F+518R | |
|-------------------------|----------------|------------------|--------|--------------------|------------------|
| | Količina | Srednja vrednost | SD | Količina | Srednja vrednost |
| EVK 108.945 | 413 342 | 378 | 50 | 18.537 19.539 | 19.038 |
| EVK 544.725 | 441 348 | 395 | 66 | 84.669 92.391 | 91.993 |
| EVK 1.089.450 | 524 631 | 578 | 75 | 180.179 190.038 | 185.109 |
| EVK 10.894.495 | 6.995 7.308 | 7.152 | 221 | 3.283.148 | 3.283.148 |
| BAKT 111.317 | 113.417 | | | 163.371 | |
| EVK 108.945 | 95.842 | 104.630 | 12.428 | 194.790 | 179.081 |
| BAKT 111.317 | 106.729 | | | 275.613 | 275.613 |
| EVK 544.725 | 116.797 | 111.763 | 7.120 | | |
| BAKT 111.317 | 121.650 | | | 426.679 | |
| EVK 1.089.450 | 111.791 | 116.720 | 6.971 | 497.954 | 462.317 |
| BAKT 111.317 | 113.989 | | | 3.867.678 | |
| EVK 10.894.495 | | 113.989 | | 3.921.081 | 3.894.379 |
| | | | | | 37.762 |

Priloga I2: Dopolnjeni rezultati qPCR rekacij pomnoževanja evkarijntske DNK, bakterijske DNK in mešanic evkarijntske in bakterijske DNK z metodo qPCR za Redčitev 2

| Ocena števila kopij DNK | Nadkarni F+R | | | EUB 338F+518R | |
|-------------------------|----------------|------------------|-------|--------------------|------------------|
| | Količina | Srednja vrednost | SD | Količina | Srednja vrednost |
| EVK 21.789 | 559 | 559 | | 4.354 4.514 | 4.434 |
| EVK 108.945 | 413 342 | 378 | 50 | 18.537 19.539 | 19.038 |
| EVK 217.890 | 410 1.229 | 820 | 580 | 23.862 28.653 | 26.258 |
| EVK 2.178.899 | 1.308 4.700 | 3.004 | 2.398 | 334.003 331.555 | 332.779 |
| BAKT 22.263 | 18.239 | | | 34.150 | |
| EVK 21.789 | 19.452 | 18.845 | 858 | 36.591 | 35.371 |
| BAKT 22.263 | 19.537 | | | 59.000 | |
| EVK 108.945 | 18.926 | 19.231 | 432 | 60.341 | 59.670 |
| BAKT 22.263 | 16.158 | | | 68.569 | |
| EVK 217.890 | 15.790 | 15.974 | 260 | 73.918 | 71.244 |
| BAKT 22.263 | 17.199 | | | 402.415 | |
| EVK 2.178.899 | | 17.199 | | 465.378 | 433.896 |
| | | | | | 44.521 |

EVK – evkarijntska DNK, BAKT – bakterijska DNK

SD – standardni odklon (angl. standard deviation)