



T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI



KOLOREKTAL KANSER TANISI ALAN VE ALMAYAN OLGULARIN KOLON MİKROBİYOTASINDA
ENTEROTOKSİJENİK *BACTEROIDES FRAGILIS* VE *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM*
KOLONİZASYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ UZMANLIK TEZİ

Dr. Yeşim ÖZTÜRK BAKAR

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN

İSTANBUL – 2020

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KOLOREKTAL KANSER TANISI ALAN VE ALMAYAN OLGULARIN KOLON MİKROBİYOTASINDA
ENTEROTOKSİJENİK *BACTEROIDES FRAGILIS* VE *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM*
KOLONİZASYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ UZMANLIK TEZİ

Dr. Yeşim ÖZTÜRK BAKAR

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN

İSTANBUL – 2020

ÖNSÖZ

Eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen bilgilerinden yararlandığım Anabilim Dalı Başkanı'mız hocam Sayın Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI'ya

Uzmanlık eğitimime başladığım günden itibaren derin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tezimin planlanması, yürütülmesi ve yönlendirilmesinde yardımcı olan, akademik desteği dışında manevi desteği, sabrı ve anlayışı için değerli hocam Sayın Prof.Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN'a

Eğitimim süresince çok emekleri geçen hocalarımız Sayın Prof.Dr. Bekir KOCAZEYBEK, Prof.Dr. Gökhan AYGÜN, Prof.Dr. Arif KAYGUSUZ, Prof.Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ, Prof.Dr. Kenan MİDİLLİ, Prof.Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR, Prof.Dr. Sevgi ERGİN, Doç.Dr. Erdal POLAT ve Dr. Ahmet Mert KUŞKUCU'ya

Tezimin gerçekleştirilmesi için gereken dokuların temininde vermiş oldukları destek ve yardımları için Prof.Dr. İhsan TAŞÇI, Uzm. Dr. Süleyman DEMİRYAS, Genel Cerrahi Endoskopi Ünitesi doktorları, hemşireleri ve çalışanlarına,

Dokulara ait histopatolojik değerlendirme sonuçlarını benimle paylaşarak tez çalışmama katkıda bulunan Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Nuray KEPİL'e

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki eğitimim süresince beraber çalıştığım, tanımış olmaktan büyük mutluluk duyduğum değerli asistan arkadaşlarıma ve tüm mesai arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Büyük bir özveriyle beni bugünlere getiren, her zaman yanımda olduklarını hissettiğim aileme, eşime ve biricik oğluma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Yeşim ÖZTÜRK BAKAR

İÇİNDEKİLER

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ	I
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	III
TABLolar DİZİNİ	IV
ETİK KURUL ONAYI.....	V
TEZ/PROJE FİNANSAL DESTEK BİLDİRİMİ	VI
ÖZET.....	VII
ABSTRACT	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kolon Anatomisi	3
2.2. Kolon Histolojisi.....	3
2.3. Kolon Fizyolojisi.....	4
2.4. Kolorektal Kanser	4
2.4.1. Kolorektal Kanserin Gelişimi	5
2.4.2. Kolorektal Kanserde Klinik Bulgular	5
2.4.3. Kolorektal Kanser Histopatolojisi	6
2.4.4. Kolorektal Kanserlerin Tanısı	6
2.5. Bağırsak Mikrobiyotası ve Mikrobiyotanın Gelişimi	8
2.6. Mikrobiyotanın İmmün Sistemle İlişkisi.....	9
2.7. Kolon Mikrobiyotası	9
2.8. Dışkı Mikrobiyotası	9
2.9. Mikrobiyotanın İşlevleri.....	10
2.9.1. Koruyucu İşlevler.....	10
2.9.2. İmmünolojik İşlevler	10
2.9.3. Metabolik İşlevler.....	11
2.10. Mikrobiyotayı Etkileyen Faktörler	12
2.10.1. Yaş	12

2.10.2. Cinsiyet	13
2.10.3. Genetik Özellikler	13
2.10.4. Coğrafi Konum.....	13
2.10.5. Beslenme	13
2.10.6. Antibiyotik Kullanımı	14
2.10.7. Sağlık Durumu, Yaşam Şartları ve Stres	14
2.11. Kolon Mikrobiyotası ve Kanser İlişkisi.....	15
2.12.1. <i>Fusobacterium nucleatum</i>	19
2.12.2. <i>Fusobacterium nucleatum</i> ve Kolon Kanseri	19
2.13. <i>Bacteroides fragilis</i> spp.	20
2.13.1. <i>Bacteroides fragilis</i>	21
2.13.2. Enterotoksijenik <i>Bacteroides fragilis</i> (ETBF)	21
2.13.3. <i>Bacteroides fragilis</i> ve Kolon Kanseri İlişkisi	22
2.14. Mikrobiyota Çalışmalarında Kullanılan Teknikler	22
2.14.1. Kültür Bağımlı Teknikler.....	23
2.14.2. Kültür Bağımsız Teknikler.....	23
2.14.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	23
2.14.2.2. Kantitatif PZR (qPZR)	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması.....	25
3.1.1. Hasta Grubu	25
3.1.2. Kontrol Grubu	25
3.2. Çalışmadan Dışlanma Ölçütleri.....	28
3.2.1. Hasta Grubu Dışlanma Ölçütleri.....	28
3.2.2. Kontrol Grubu Dışlanma Ölçütleri	29
3.3. Yöntemler	29
3.3.1. Hastalara ve Kontrollere Ait Bilgilerin Yer Aldığı Formların Doldurulması	29
3.3.2. Biyopsi Örneklerinin Laboratuvara Taşınması ve Saklanması	29
3.3.3. Biyopsi Örneklerinden Bakteri DNA'sının İzolasyonu.....	30

3.3.4. DNA'lardan Bakteri Sayımı İçin Yapılan İşlemler	30
3.3.4.1. ETBF ve F.nucleatum'un Gerçek Zamanlı PZR (qPZR) Kantitasyon alışması	31
3.4. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR	35
5. TARTIşMA.....	43
6. SONUÇ.....	53
7. KAYNAKLAR	55
8. EKLER.....	75
9. ÖZGEçMİş	79
10. İNTİHAL TARAMA RAPORU.....	80

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

KRK: Kolorektal kanser

GİS: Gastrointestinal sistem

NSAİ: Non-steroid antiinflamatuvar ilaç

qPCR: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

FQ-PCR: Floresans Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

NGS: Next-jenerasyon Sekanslama

APC: Adenomatöz Polipozis Koli

DCC: Deleted in colon carcinoma

MSI: Mikrosatellit instabilite

CIMP: CpG adalarının metilatör fenotipi

MLH1: Mismatch tamir geni1

NDC: Besinsel sindirilemeyen karbonhidratlar

dNTP: Dinükleotit Trifosfat

PET: Pozitron Emisyon Tomografisi

BT: Bilgisayarlı Tomografi

CRP: C- Reaktif Protein

CEA: Karsinoembriyojenik Antijen

CA 19- 9: Karbonhidrat Antijeni 19-9

STAT 3: Sinyal Çevirici ve Transkripsiyon Aktivatörü 3

NF-κB: Nükleer Faktör -κB

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

İBH: İnflamatuvar bağırsak hastalıkları

GALT: Bağırsak ilişkili lenfoid doku

CHD7: Kromodomain helikaz DNA bağlayan protein 7

CHD8: Kromodomain helikaz DNA bağlayan protein 8

K-RAS: Kirsten sıçan sarkom viral onkojen

BRAF: v-Raf murin sarkomu viral onkojen homologu B

Fap2: Yağ asidi bağlayıcı protein 2

SMO: Poliamin kataliz spermin oksidaz

COX-2: Siklooksijenaz-2

Wnt: Wingless ve integrasyon-1

MAPK: Mikrotübül ilişkili protein kinaz

MYC: Miyelositomatozis

c-myc: Cell - Miyelositomatozis

DPC4/SMAD4: Deleted in Pancreatic Cancer-4/Mothers Against Decapentaplegic Homolog-4

SMAD2: Mothers Against Decapentaplegic Homolog-2

TLR: Toll Benzeri Reseptör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. KRK tanısı almış hastaların ve kontrol grubundaki bireylerin cinsiyete göre dağılımı

Şekil 3.2. KRK tanısı almış hastaların ve kontrol grubundaki bireylerin yaş ve cinsiyete göre dağılımı



TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Tanısal kolonoskopi endikasyonları

Tablo 2.2. KRK'li hastaların dışkı mikrobiyotasında saptanan değişimler

Tablo 2.3. KRK'li hastaların tümör doku örnekleri incelemesi sonucunda mikrobiyotada saptanan değişimler

Tablo 3.1. KRK tanısı almış hastaların ve kontrol grubundaki bireylerin yaş gruplarına göre dağılımı

Tablo 3.2. Primerler tablosu

Tablo 3.3. Her bir reaksiyon için ETBF mastermiks hazırlama protokolü

Tablo 3.4. Her bir reaksiyon için *F.nucleatum* hazırlama protokolü

Tablo 3.5. ETBF ve *F.nucleatum* için uygulanan gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü

Tablo 4.1. KRK tanısı almış hastalarda ve kontrol grubundaki bireylerde *F.nucleatum* ve ETBF varlığının s(%) ve miktarlarının (log10bakteri/25mg) karşılaştırılması

Tablo 4.2. *F. nucleatum* ve ETBF varlığı s(%) ile miktarlarının (log10bakteri/25mg) KRK tanısı almış kadın ve erkek hastalarda karşılaştırılması

Tablo 4.3. *F. nucleatum* ve ETBF miktarlarının (log10bakteri/25mg) hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Tablo 4.4. *F. nucleatum* ve ETBF miktarlarının (log10bakteri/25mg) hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde yaş gruplarına göre karşılaştırılması

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 20/06/2018 tarihli 11256 sayılı yazı ile etik kurul onayı alınmıştır.



TEZ/PROJE FİNANSAL DESTEK BİLDİRİMİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Rektörlüğü Araştırma Fonu TTU-2018-31658 numaralı proje olarak desteklenmiştir.



ÖZET

Kolorektal Kanser Tanısı Alan ve Almayan Olguların Kolon Mikrobiyotasında Enterotoksijenik *Bacteroides fragilis* ve *Fusobacterium nucleatum* Kolonizasyonunun Karşılaştırılması

Amaç: Son yıllarda bazı bakterilerin kolorektal kanser (KRK) ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Çalışmamızda KRK'li hastaların ve sağlıklı bireylerin kolon dokularında *Fusobacterium nucleatum* ve Enterotoksijenik *Bacteroides fragilis* (ETBF) miktarlarını karşılaştırarak bu bakterilerin KRK etiolojisindeki rolünü araştırmayı amaçladık.

Gereç ve yöntem: 35 KRK'li ve 35 sağlıklı bireyden alınan kolon biyopsi örneklerinde kantitatif PZR ile *F. nucleatum* ve ETBF miktarları belirlenerek sonuçlar hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırıldı.

Bulgular: *F. nucleatum* saptanma oranı ve miktarları KRK'li kadın hastalara ait dokularda erkek hastalardakine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla: $p=0,003$, $p=0,013$). ETBF saptanma oranı ve miktarı bakımından KRK'li kadın ve erkek hasta dokuları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0,521$, $p=0,515$). 50-74 yaş grubunda KRK'li kadınlarda ve erkeklerde kontrollere göre ETBF miktarlarının istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu (sırasıyla $p= 0.005$, $p=0,047$), bunun yanısıra *F. nucleatum* miktarı bakımından kadın hastalarda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu ancak erkek hasta ve kontroller arasında fark bulunmadığı saptandı ($p=0.009$, $p=0,083$). Yaş ve cinsiyete bakılmaksızın KRK'li hastaların dokularında, *F. nucleatum* saptanma oran ve miktarının kontrollere göre istatistiksel olarak farklı olmadığı (sırasıyla $p=0,473$, $p=0,995$), buna karşın ETBF saptanma oranı ve ETBF miktarının, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi. (sırasıyla $p=0,002$, $p=0,004$).

Sonuç: KRK yönünden rutin taramaların yapıldığı 50-74 yaş aralığında ETBF'in hem erkeklerde hem de kadınlarda, *F. nucleatum*'un ise yalnız kadınlarda KRK etiolojisinde rol oynayabileceği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal kanser, *Fusobacterium nucleatum*, Enterotoksijenik *Bacteroides fragilis*, qPZR



ABSTRACT

Comparison of Enterotoxygenic *Bacteroides fragilis* and *Fusobacterium nucleatum* Colonisation in Colon Microbiota of Patients with and without Colorectal Cancer Diagnosis

Aim: In recent years, some bacteria associated with colorectal cancer (CRC) were shown. We aimed to investigate the role of *Fusobacterium nucleatum* and Enterotoxygenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) in the etiology of CRC comparing their quantities in colon tissues of patients with CRC and healthy individuals.

Materials and Methods: *F. nucleatum* and ETBF quantities were determined by quantitative PCR in colon biopsies of 35 CRC patients and 35 healthy individuals then the results were compared.

Results: *F. nucleatum* rate and quantities in female patients with CRC was found statistically significantly higher than those of male patients ($p=0,003$, $p=0,013$ respectively). There was no statistically significant difference between female and male patients with CRC in terms of ETBF rate and quantities ($p=0.521$, $p=0.515$). In 50-74 age group, in women and men with CRC, comparing with controls ETBF quantities were statistically significantly higher ($p=0.005$, $p=0.047$) and *F. nucleatum* quantities were statistically significantly high between women patients and controls but not different between male patients and controls ($p=0.009$, $p=0.083$). Regardless age and gender, the rate and quantities of *F. nucleatum* was not statistically different between patients and controls ($p=0.447$, $p=0.95$), whereas ETBF rate and quantities were statistically significantly higher in patients compared to controls ($p=0.002$, $p=0.004$).

Conclusion: Between 50-74 ages, in which routine screening was performed in terms of CRC ETBF could play a role in the etiology of CRC in both men and women and *F. nucleatum* only in women.

Keywords: Colorectal cancer, *Fusobacterium nucleatum*, Enterotoxygenic *Bacteroides fragilis*, qPCR

1. GİRİŞ

İnsan bağırsak mikrobiyotası 100 trilyon kadar mikroorganizmaya sahip kompleks ekolojik çevreye sahiptir. Bağırsakta bulunan toplam genom miktarı insan genomunun yaklaşık 100 katı kadardır. Fekal ağırlığın tahmini yarısı kadarı mikroorganizmalardan oluşmakta, ortalama 40.000 veya daha fazla tür bulunmaktadır. Mikrobiyota konaktaki bazı metabolik aktiviteler, immün sistem modülasyonu, patojenlere karşı koruma gibi görevler üstlenmekte, diyet ve çevresel faktörlerden etkilenebilmektedir[1].

Çeşitli mikroorganizmalar ile bazı kanserler arasında kanıtlanmış ilişkiler bulunmaktadır. Örneğin Dünya Sağlık Örgütü'nün bildirimine göre *Helicobacter pylori* mide kanseri gelişiminde sınıf 1 karsinojendir[2]. Kolonda olası onkojenik bakterilere ait ilişki; örneğin *Streptococcus bovis* bakteriyemisi/endokarditi ile KRK arasındaki klinik bağlam daha önceden ortaya konmuştur[3]. Daha sonra KRK'li hastaların fekal ve doku örnekleri ile yapılan incelemeler sonucunda daha fazla spesifik bakterial patojenin KRK ile ilişkisi ortaya konmuştur. Özellikle *Fusobacterium* spp. *Streptococcus gallolyticus*, *Enterococcus faecalis*, ETBF incelemeye alınan bakteriler arasındadır[4-7].

B. fragilis ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda bakterinin ishale neden olduğu düşünülmüş ve bu durum hayvan modellerinde gösterilmiştir. Sonraki çalışmalarda ETBF'in inflamasyona neden olduğu hayvan çalışmaları ile desteklenmiş, farelerde akut semptomatik kolite neden olduğu ve kolonda kolonize olarak persistan inflamasyona yol açtığı saptanmıştır. ETBF'in uzun süreli inflamasyon cevabı oluşturarak KRK kanserde rol oynayabileceği düşünülmüştür[8-10].

F. nucleatum oral mikrobiyotada bulunur ve farklı patojenler ile birlikte gingivitis, periodondit gibi enfeksiyonlara yol açabilen bir bakteridir. Bu bakteri, fuziform morfolojide, adezyon ve invazyon özellikleri bakımından suştan suşa oldukça heterojen olan bir bakteridir ve son yıllarda artan miktarlarda intraabdominal abse,

apendisit gibi enfeksiyonlarda rapor edilmektedir[11]. Yakın zamanda ise KRK'li olguların tümörlü dokularında çok fazla miktarda bulunduğu gösterilmiş, KRK ile ilişkisi bakımında dikkat çeken bir patojen olmuştur[12-15].

Güncel veriler doğrultusunda bağırsak mikrobiyotasında bulunan *F. nucleatum* ve ETBF'in KRK'li tümör dokularında artmış miktarlarda bulunması bu bakterilerle kolon kanseri arasında ilişki olabileceğini ortaya koymuştur[11-31].

Ülkemizde bu konuda özellikle kolondan alınan tümör biyopsi örnekleriyle yapılmış bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda KRK'li hastaların tümör biyopsi örneklerinde *F.nucleatum* ve ETBF varlığını ve miktarını belirlemeyi, bunları sağlıklı bireylerin kolon biyopsi örneklerindeki miktarlarla kıyaslayarak, KRK'li olgularda bu bakterilerin miktarı bakımından bir farklılık olup olmadığını saptamayı böylece KRK etiyolojisinde *F. nucleatum* ve ETBF'nin rolünü belirlemeye yönelik bir pilot çalışma yapmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolon Anatomisi

İleumun terminalinden anal kanala uzanan bölüm kolon olarak adlandırılmaktadır. Yaklaşık yüz - iki yüz cm uzunluğundadır. Terminal ileumun içeriğini boşalttığı ilk bölüm çekum, sonra çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum gelmektedir[32,33]. Temel işlevi sıvı absorpsiyonu ve sonrasında dışkının boşaltılmasıdır. Bölümden bölüme çapı değişmektedir. Çekum en geniş bölüm sigmoid ise en dar bölümdür. Temel fonksiyonları; su emilimi, bazı vitaminlerin üretilmesi, içeriğin dışkı haline dönüşmesi ve atılımıdır. Çıkan kolon yaklaşık on beş cm uzunluğundadır ve çekumdan karaciğer sağ lobunun altına uzanarak sola dönüp sağ hepatik fleksurayı oluşturur ve transvers kolon olarak uzanır. Transvers kolon ise yaklaşık kırk beş cm uzunluğunda, hepatik ve splenik fleksura arasında uzanır. İnen kolon yaklaşık yirmi beş cm uzunluğunda, böbreğin ön komşuluğunda olacak şekilde uzanır. Sigmoid kolon uzunluğu on beş ile elli cm arasında olabilir (ortalama otuz sekiz cm) ve rektum, sigmoid kolonla beraber dışkı rezervuarı olarak görev alır. On iki- on beş cm uzunluğundadır[34,35,36].

2.2. Kolon Histolojisi

Histopatolojik olarak içten dışa tunika mukoza, tunika submukoza, musküler tunika ve serozadan oluşmuştur. Tunika mukoza; epitelyal lamina, lamina propria ve muskularis mukoza olarak üç kısımdan oluşur. Kripta adı verilen mukus salgılayan mukozal katlantılar içerir. Yüzey epiteli, basit kolumnar ve küboid epitelidir. Villus bulunmaz. Tunika submukoza ise bolca kan damarı, lenfatikler, yağ hücreleri ve lenfatik nodüller içeren gevşek bağ dokusudur. Musküler tunika, sirküler ve longitudinal kas tabakaları ile Auerbach nöral pleksusu içerir. Tunika seroza, visseral peritondur[37,38,39].

2.3. Kolon Fizyolojisi

Kolon ve rektum esas olarak, su ile elektrolitlerin emilimi, dışkının depolanması ve dışarı atılmasından sorumludur. Günde bin beş yüz ml kadar kimüs kalın bağırsağa gelir, yüz ml'den daha az kısmı dışkıya dönüşerek atılır. Dışkının büyük miktarı su, geri kalanı katı maddelerdir. Kolonda bulunan mikroorganizmalar, B12, tiyamin, riboflavin gibi çeşitli vitaminlerin sentezinde ve çeşitli gazların oluşumunda etkilidir[40,41].

2.4. Kolorektal Kanser

KRK'ler çeşitli faktörlere bağlı olarak gelişebilmektedir. Örneğin genetik, diyet içeriği, çevresel etkilenmeler, inflamatuvar özellikler gibi faktörlerin KRK gelişiminde rol oynadığı bildirilmektedir. Elde edilen veriler ile yaş, erkek cinsiyet, sigara öyküsü, aile öyküsü, sedanter yaşam tarzı, İBH (İnflamatuvar bağırsak hastalıkları), obezite, KRK gelişiminde en önde gelen çevresel ve genetik faktörlerdir. Özellikle yüksek kalori içerikli diyet, kırmızı et tüketiminin fazlalığı, fazlaca kızartılmış kırmızı et, satüre yağ tüketiminin fazlalığı, alkol kullanımının fazlalığı gibi diyet özelliklerinin KRK'lere yakalanma olasılığını arttırdığı gösterilmiştir. Bunun aksine lif oranından yüksek diyet, antioksidan özellikli vitaminler, taze sebze ve meyve, NSAİİ (non-steroid antiinflamatuvar ilaç) ve kalsiyumdan zengin besinlerin tüketiminin ise KRK'i azalttığı bildirilmektedir[42,43,44,45].

KRK'de olası risk faktörlerini belirlemek hedef popülasyonları oluşturmak ve sonrasında tarama ve takip programları oluşturmak için önemlidir. KRK için yaşın önemli bir risk faktörü olarak rol oynadığı; özellikle KRK'lerin görülme oranının elli yaşından sonra önemli derecede arttığı çalışmalarda belirtilmektedir. Bu nedenle hiçbir şikayeti ve klinik bulgusu olmayan bireylerde tarama programının elli yaş ve üzerinde başlaması önemlidir[46,47].

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun yayınladığı 2013 yılındaki Kansere İstatistikleri'nde Türkiye'de 35-39 yaş aralığındaki erkeklerde 100.000'de 3,1 olan kanser insidansı yaş ile artarak 70-74 yaşları arasında 100.000'de 130'a kadar çıktığı belirtilmektedir[48].

2.4.1. Kolorektal Kanserin Gelişimi

KRK oluşumunda iki farklı mekanizma bulunmaktadır. İlk mekanizma sporadik KRK vakalarının ortalama %80'inde bulunan APC/betakatenin yoludur. Bu mekanizma, adenom- karsinom süreci olarak da anılmaktadır. Bu yolda, kromozomal dengesizlik sonucu aşamalı olarak onkogenik genlerde ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlar gerçekleşir ve birikir. Önce kolonda epitel proliferasyonu ile lokalize bir bölgede küçük adenomlar oluşur; bu adenomlar sonrasında progresif genişler; displazi meydana gelir ve invaziv kansere ilerler. Adenomlarda başlatıcı, APC geninin kaybıdır. APC tümör baskılayan bir genidir. APC geni, beta-kateninin yıkımından sorumludur ve fonksiyonunun bozulmasıyla beta13 katenin birikimi ile MYC ve siklin D1 nükleusta aktive olur DNA transkripsiyonu süratlenir. APC kaybı ile mutasyona uğrayan Kirsten sıçan sarkom viral onkogen (K-RAS) aktifleşerek sabit mitotik sinyalleri iletir, apoptoz engellenir. Aynı zamanda, kanser baskılayıcı gen olduğu düşünülen 18q21 geninin delesyonu da KRK gelişimi üzerinde etkilidir. Bu bölgede; Deleted in Colon Carcinoma (DCC), Deleted in Pancreatic Cancer 4 (DPC4/SMAD4) ve Mothers Against Decapentaplegic Homolog-2 (SMAD2) genleri vardır. Bu genlerden hangisinin kanser gelişiminde rol oynadığı bilinmemektedir. Wild tip P53 (TP53)'de kolon kanserlerinin %70-80'inde kaybı görülen bir başka tümör baskılayıcı genidir. İkinci yol ise DNA mismatch tamir genleri ile ilgilidir. Genetik lezyonların olması ile karakterizedir. Sporadik vakalarda %10-15 oranında bulunmaktadır[49,50].

2.4.2. Kolorektal Kanserde Klinik Bulgular

KRK mukozadan köken alarak yavaş yavaş büyür, ilk olarak bağırsak duvarına invaze olup sonrasında komşu organlara invaze olur. Obstrüksiyona neden olabilecek kadar büyüyebilir. Komşuluğundaki organlarda yaptığı basıya bağlı bulgular görülebilir. Sağ kolon tümörleri asemptomatik olabilir veya ilk bulgusu anemi olabilir. Başlıca belirtiler dışkılamada değişiklik, dışkı kalibresinde azalma, iştahsızlık, kilo kaybı, melena, konstipasyondur[51].

2.4.3. Kolorektal Kanser Histopatolojisi

KRK'ler başlıca adenokanserdir ve farklı boyutlarda gland benzeri yapılar içerir[52]. %90'ı adenomlardan köken almaktadır. Adenom oluşumu ve sonrasında displazi, insitu ve invazif kanserin meydana gelmesinin ortalama on yıl sürdüğü bilinmektedir. KRK gelişme olasılığı, polip sayısı ve büyüklüğünün yanı sıra villöz histolojide olması ile artmaktadır. Adenomların fazlaca miktarı polipoiddir ve poliplerin az bir kısmı düz veya deprese özelliktedir. Tübüler adenomların kanserleşme olasılığı %5'tir, tübülo-villöz olanlarda bu oran %22, villöz adenomlarda bu oran ise %40 civarındadır. Polip boyutu 2 cm'den fazla ise kanserleşme riski de artmaktadır[53,54,55,56].

2.4.4. Kolorektal Kanserlerin Tanısı

Başlıca kolonoskopi, fleksibl sigmoidoskopi, rektosigmoidoskopi, akciğer grafisi, baryumlu kolon grafisi, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme, pozitron emisyon tomografisi, laboratuvar tetkikleri histopatolojik inceleme klinik tanıda kullanılmaktadır[57].

Kolonoskopi

Modern endoskopi ve kolonoskopi 60'lı yıllarda fiberoptik aletlerin geliştirilmesiyle başlamış, 1970'lerin başından itibaren fiberoptik (fleksibl) endoskopi, gastrointestinal hastalıkların tanısında en önemli araçlardan biri haline gelmiştir. Önceki yıllarda açık cerrahi ile tedavi edilen birçok gastrointestinal hastalık, endoskopik yöntemlerle tedavi edilebilmeye başlanmıştır. Fiberoptik endoskopideki teknolojik gelişmeler gastrointestinal cerrahi uygulamalarına dahil edilerek, sindirim sistemi hastalıklarına çok yönlü yaklaşımı mümkün kılmıştır[57].

Kolonoskopi endikasyonları

Kolonoskopi en sık kullanılan tanısal yöntemlerden biridir. Kolondaki birçok hastalığın tanı ve tedavisinde kullanılmaktadır. Bazı hastalıklarda takip amaçlı da kullanılmaktadır. Tanısal kolonoskopi endikasyonları aşağıda sıralanmıştır[57,58].

Tablo 2.1. Tanısal kolonoskopi endikasyonları[57,58]

- Açıklanamayan rektal kanama
- Radyolojik olarak tespit edilen lezyonların teyidi veya histopatolojik değerlendirilmesi
- Polip veya kanser takibi
- İBH tanı ve takibi
- Divertiküler hastalık tanı ve takibi
- Anemi etiyolojisinin belirlenmesi
- Ciddi organik hastalıkların belirtileri olan iştahsızlık, halsizlik, kilo kaybı, bağırsak alışkanlığında değişiklik gibi belirtilerin araştırılması
- Erken kanser tespiti için tarama
- Sebebi belirlenemeyen ishal, kabızlık
- Transplantasyon öncesi tarama
- Klinik araştırma
- Sıvı veya doku örneği almayı gerektiren durumlar
- Çeşitli nedenlere bağlı kolit varlığı (radyasyon koliti, iskemik kolit, enfeksiyöz kolit vs.)
- Kronik karın ağrısı

Fleksibl Sigmoidoskopi: KRK'lerin %50'si bu bölgede yerleştiğinden çift kontrastlı baryum enema ile birlikte yapıldığında kolonoskopiye alternatif olabilir[57].

Rektosigmoidoskopi: 40 yaş altı düşük riskli bireylerin taraması için kullanılmaktadır[57].

Akciğer Grafisi: KRK'ler karaciğerden sonra en sık akciğere metastaz yaptığından cerrahi girişim öncesi ve takipler esnasında akciğer grafisi çekilmektedir[59].

Baryumlu Kolon Grafisi: Primer başvurulması gereken radyolojik görüntüleme yöntemidir[59,60].

Ultrasonografi (USG): Batın içi kitlelerin değerlendirilmesi, karaciğer metastazlarının incelenmesi ve rektum tümörlerinin evrelendirilmesinde kullanılmaktadır[60,61].

Bilgisayarlı Tomografi (BT): BT taraması, KRK evrelemesi için vazgeçilmez bir yöntemdir. Tümörün alanını, büyüklüğünü, lokal, bölgesel ve metastatik yayılımını

belirlemeye yardımcı olur. Duvar invazyonu, mezenter içine tümör yayılımı ile lenf nodu ve uzak metastazların varlığı gibi hasta prognozunu etkileyen faktörlerin belirlenmesine yardımcı olur[61].

Manyetik Rezonans Görüntüleme: Lokal tümör ekstansiyonu, lokalizasyon, T evresi, potansiyel çevresel rezeksiyon alanları, mezorektal fasyal tutulum ve ektramural veya venöz invazyonun belirlenmesi, tedavi stratejisini belirlemek için kullanılmaktadır. Başlangıç evrelemede önerilen yöntemdir[60,61].

Pozitron Emisyon Tomografisi (PET): Pelviste nüks tümör ile fibröz dokuyu ayırt etmekte kullanılır. Hastaya fluorodeoksiglukoz substratı enjekte edilerek doku metabolizmasındaki farklılığı ortaya konur. Kanserli hücrelerde hipermetabolizma nedeniyle kanser hücrelerinin bulunduğu yerde aktivite tutulumu görülür[61].

PET ve BT: Küçük rekürrensleri veya lenfadenopatilerdeki tümör odaklarını göstermek amacıyla kullanılır[61].

Helikal BT: Artefaktların azalması ve birçok planda üç boyutlu görüntü verebilmesi ile farklı avantajları bulunmaktadır[61].

Laboratuvar Bulguları: Tam kan sayımı, karaciğer fonksiyonunu gösteren testler, CRP, dışkıda gizli kan, Prokalsitonin, CEA, CA-19-9 gibi tetkikler yapılmaktadır[61].

Histopatolojik Tanı: Alınan biyopsi örneklerine histopatolojik inceleme yapılarak tanı konur[61].

2.5. Bağırsak Mikrobiyotası ve Mikrobiyotanın Gelişimi

Gastrointestinal sistem (GİS) yaşamın başında steril olmasına rağmen birkaç saat içinde annenin vajinası ve fekal mikrobiyotasındaki mikroorganizmalar ile kolonize olur[62,63,64]. Karmaşık bir süreç olan kolonizasyon süreci çeşitli faktörlerin etkileşimiyle oluşur[65].

Kolonizasyon süreci 4 dönemde incelenebilir, bu süreç ömür boyu sürmektedir[66].

Doğum sırası dönem başlangıç kolonizasyonu gibi düşünülebilir. Özellikle *Enterobacteriales* gibi aerobik bakterilerin alınmasıyla meydana gelir. Doğum sonrası dönem, emzirme ile kompleks karbonhidratları seven aerobik ve anaerobik bakteriler (*Lactobacillales* vb.) ile ikinci haftadan sonra ilk floranın oluşmasıdır. Normal beslenme dönemi, diğer bir deyişle erişkin dönemde, süt haricindeki

gıdaların alınması sonucu özellikle anaerop bakterilerin baskın olduğu mikroorganizmalar ile kolonizasyon gerçekleşir. Yaşlılık döneminde, fizyolojik dengenin bozulmasıyla *Clostridium* spp. miktarında artış gözlenir.

Normal beslenme döneminde mikrobiyota yaklaşık 10^{14} hücre/gr oranında bakteri içermektedir. Bu sayı vücuttaki toplam hücre sayısından yaklaşık 10 kat daha fazladır[67, 68, 69]. Mikrobiyotada sayıca baskın aileler *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* filumlarıdır[70].

Coğrafik bölgeler ve demografik nedenler mikrobiyotanın içeriğini etkileyebilir. Bağırsak ekolojisinde farklılığın potansiyel nedenleri lokal çevre, kalıtım, beslenme, yaşam tarzlarındaki farklılıklar olarak sıralanabilir[71,72,73].

2.6. Mikrobiyotanın İmmün Sistemle İlişkisi

Mikrobiyota mukoza ile sıkı ilişki halindedir. Mikrobiyota ve ürünleri konağı etkilerken aynı zamanda konak da mikrobiyotada mutlaka etki oluşturur. Buradaki bakterilerin bağırsak epiteli ile sıkı ilişkili olması, immün sistemin uyarılması aynı zamanda bağırsak bütünlüğü için oldukça önemlidir. Bu ilişki dengelidir. Konak, bakteriler ile sürekli temastadır bu nedenle inflamasyon görülmemelidir, aksi takdirde bağırsak bütünlüğü bozulabilir ve inflamasyon sürekli bir hale gelir, diğer taraftan bakteriyel invazyon olmaması için immün yanıt her zaman tetiklenebilmelidir. Bu sebeplerden dolayı konak hücreleri, kommensal bakterileri kesinlikle ayırabilmelidir[74]. Konağın bu bakterileri tanıması ve sağlıklı dokularda bu bakterilere inflamatuvar yanıtı oluşmaması “kommensal paradoks” şeklinde tanımlanır [75].

2.7. Kolon Mikrobiyotası

Kolon mikrobiyotası olarak yaptığımız kaynak tarama neticesinde bağırsağın bu bölgesindeki mikrobiyotanın ince bağırsağına farklı olduğunu belirten bir kaynağa rastlayamadık.

2.8. Dışkı Mikrobiyotası

Mikrobiyota ile ilgili çoğu çalışma dışkı mikrobiyotasından yapılmıştır. Çünkü toplanması ve ulaşımı kolaydır. Dışkı mikrobiyotasında mukozal bakteriler ile birlikte

lümene yapışmayan bakteriler bir arada bulunmaktadır[76]. Kolon mukozasına ilişik mikrobiyal karışımın dışkı içeriğindeki karışımdan daha farklı olduğu gösterilmiştir[77]. İnce bağırsak mukozasındaki mikrobiyotanın benzer şekilde dışkıda da aynı baskın türlerle yer alması nedeniyle dışkı mikrobiyotasının kanalın mikrobiyotasını gösterdiğine inanılmaktadır. İnsan dışkı mikrobiyotasının araştırılmasında günümüzde sekans yöntemleri kullanılan çalışmalarda DNA dizilerinin %90'dan fazlasının *Firmicutes* ve *Bacterioidetes*'e ait olduğu saptanmıştır[78].

2.9. Mikrobiyotanın İşlevleri

Bağırsak mikrobiyotasının işlevleri; koruyucu işlevler, immünolojik işlevler ve metabolik işlevlerdir.

2.9.1. Koruyucu İşlevler

Mikrobiyota, potansiyel patojenler kolonizasyonuna karşı konağı korur. Epitel hücreleri ile immünolojik hücreler arasında ilişkiyi oluşturur. Mikrobiyotadaki bakteriler mukozaya çeşitli şekillerde bağlanabilir[79]. Hidrojen peroksit ve nitrojen oksit salgılayabilirler. Bu maddeler antimikrobiyal özelliktedirler. Mikrobiyotadaki bakteriler, farklı antimikrobiyal peptitler de sentezleyebilirler[80,81]. Ayrıca, besinleri tüketerek, bakterosidinler üreterek, intralüminal pH'ı azaltarak ve dış kaynaklı ya da kolonize olabilen patojenlerin çoğalmasını kontrol altına alarak koruyucu özellik gösterirler[82,83].

2.9.2. İmmünolojik İşlevler

Doğumda yenidoğan, steril intrauterin çevreden antijenden zengin ekstrauterin bölgeye geçiş yapar. Bu dönemde, potansiyel patojenlerin ve kommensal bakterilerin tanınması, ayrımlarının yapılması oldukça önemlidir. Bunun sonucunda uygun yanıt ile konağı hastalıklardan korur[84].

Bağışıklık sistemi ile çevre arasında temel ara yüz bağırsak mukozasıdır. Bağırsak ilişkili lenfoid doku (GALT), vücudun en büyük organize lenf dokusudur[85].

Dolaşan lenfositlerin %70'i bağırsaklardadır, bu sebeple bağırsak en büyük immünolojik organdır. Mikrobiyotada bulunan antijenler, Peyer plaklarındaki M hücreleri ile alınarak lokal dendritik hücrelerle işlenir, CD4+ düzenleyici T'lere (Treg) sunulur, IL-10, TGF- β salgılanarak antijenlere tolerans sağlanır [86].

Mikrobiyotadaki bakteriler, toll benzeri reseptörler (TLR) ile sinyal oluşturarak daha kompleks hücre içi sinyal yollarını aktifleştirirler[87]. Gram negatiflerde lipopolisakkarit (LPS) ile oluşan sinyal TLR-4 aracılığıyla [88], Gram pozitiflerde lipoteikoik asit ile oluşan sinyal TLR-2 aracılığıyla etki göstermektedir[89].

Mikrobiyotadaki Gram pozitifler IL-12 ve IFN-gama salınımını, Gram negatifler IL-6, IL-8 ve IL-10 salınımını uyarırlar[90] . Konak immün sistemi ve mikrobiyota arasında kompleks bir çapraz reaksiyon bulunmaktadır. Örneğin *B. fragilis*, Polisakkarit A ile regülatuvar hücrelerde antiinflamatuvar sitokinlerin uyarımını sağlamaktadır [87].

2.9.3. Metabolik İşlevler

Mikrobiyotada bulunan mikroorganizmalar metabolik olaylar için gerekli kısa zincirli yağ asitlerinin yıkılmasının engellenmesi, K vitamini sentezi, besinsel sindirilemeyen karbonhidrat (NDC)'ların yıkılması gibi metabolik işlevlerde görev alırlar[91,92].

Kısa zincirli yağ asitlerinin sentez görevini üstlenen bakteriler özellikle kolon epitelinin farklılaşmasında trofik etki yaparlar. Asetat, propiyonat, bütirat ve laktat gibi NDC'lar kolon epitelinde önemli besin kaynaklarını oluşturur ve bu kaynaklar metabolik fonksiyonlar için önem arz eder[93].

Lipofilik özellikte olan K vitamini bağırsaktaki bakteriler tarafından sentez edilir. K vitamini bazı enzimler için esansiyeldir. Eksikliğinde yeni doğanlarda hemorajik hastalığa neden olmaktadır. Vitamin B12, bağırsaktaki bakterilerin ürettiği diğer bir vitamindir. Aynı zamanda bağırsak bakterileri üre ve amonyumdan amino asit sentez edebilirler. *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Pediococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. ve *Propionibacterium* spp. gibi bağırsak mikrobiyotasında bulunan bakteriler esansiyel yağ asitlerini üretebilirler[94,95]. İnce bağırsakta sindirilemeyen karbonhidratları mikrobiyotadaki

bakteriler fermente ederek asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit gibi kısa zincirli yağ asitlerini üretebilirler. Kolon epiteli için bütirik asit temel enerji kaynağıdır, diğer kısa zincirli yağ asitleri ise dolaşıma geçerek diğer dokularda metabolize olur[96].

2.10. Mikrobiyotayı Etkileyen Faktörler

Mikrobiyotayı etkileyen faktörler iç ve dış faktörler olarak iki gruptur. İç faktörler: Yaş, cinsiyet, genetik vb., dış faktörler: Stres, ilaç kullanımı, beslenme alışkanlıkları, coğrafik yerleşim vb[97].

2.10.1. Yaş

Yeni doğanların mikrobiyotası, doğum şekli, doğum zamanı, beslenme şekli, antibiyotik kullanımı, yaşam şekli ve yaşanılan çevreye göre şekillenmektedir[98-104]. İlk kolonize olan bakteriler sıklıkla *Enterobacteriales*, *Streptococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp. gibi fakültatif anaeroplardır. Sonrasında kolonize olan bakteriler *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp. ve *Bacteroides* spp. gibi fakültatif anaeroplardır[98-108]. Normal doğum ile doğan bebeklerde, doğumdan sonra ilk 24 saatte mikrobiyota, vajinal mikrobiyota içeriğine benzer. Özellikle, *Lactobacillus* spp. ve *Prevotella* spp. baskın türlerdir. Sezeryanla doğan bebeklerde, mikrobiyota, deride bulunan bakteriler ile oluşmaktadır. *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. ve *Propionibacterium* spp. gibi türler baskındır. Erken doğan bebeklerde mikrobiyota, zamanında doğmuş bebeklerdeki mikrobiyotaya göre daha az çeşitte bakteri içermektedir[109].

Yaşlıların daha sabit bir mikrobiyotaya sahip olduğu bildirilmiştir fakat mikrobiyota içerikleri daha çeşitlidir ve ana gruplar genç bireylerden daha farklı olabilir[110-112]. Yaşlı bireylerde genellikle, genç bireylere göre bifidobakteri oranının daha düşük olduğu saptanmıştır[111-115]. Bifidobakterilerin daha az olması vitamin ve proteinlerin sentezini bozabilir, bu durum sindirim, emilim ve immün sistem fonksiyonlarını etkileyebilir[115,116].

2.10.2. Cinsiyet

Mikrobiyotaya cinsiyetin etkisini inceleyen çalışma çok yapılmamıştır ancak bazı araştırmalarda cinsiyetin oluşturduğu farklar üzerinde durulmuştur. Örneğin; *Bacteroides* spp. ve *Prevotella* spp. filumlarının kadınlarda erkeklere göre daha az olduğu bildirilmiştir. Cinsiyetler arası farklılıkların gösterilmesi anatomik, hormonal gibi fizyolojik farklılıklar olduğu için kolay değildir[114,117].

2.10.3. Genetik Özellikler

Mikrobiyota üzerine etki eden faktörlerden biri genetikdir. Bu durum tek yumurta ikizlerinde fekal mikrobiyotanın benzer olması ile gösterilmiştir. Dolayısıyla mikrobiyotanın ve mikrobiyotadaki bakteriyel kompozisyonun genetik durumdan etkilenebildiğini düşündürmüştür[118-121].

2.10.4. Coğrafi Konum

Genetik faktörlerin dışında, bulunulan coğrafi konum da mikrobiyota için incelenmiştir. Avrupa'da ülkeler arasında farklılık olduğu bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda İtalyan erişkinlerde diğer Avrupa ülkelerinin erişkinlerine göre *Bifidobacterium* spp. 2 veya 3 kat fazla bulunmuştur fakat diğer bakteriler açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır[71,114]. Kuzey Avrupa ülkelerinde bebeklerin mikrobiyotası, güney Avrupa ülkelerindeki bebeklerin mikrobiyotasına göre daha fazla *Bifidobacterium* spp. içerdiği saptanmişken, buna karşın güney Avrupa ülkelerindeki bu bebeklerde, *Bacteroides* spp. oranı ve mikrobiyota çeşitliliğinin daha fazla olduğu bildirilmiştir[98]. Farklı kıtalarda da benzer çalışmalar yapılmıştır. Avrupa ve Kuzey Amerika Kıtası'nda dışkı mikrobiyotası, Güney Amerika, Afrika ve Çinli katılımcıların dışkı mikrobiyotasından farklı olduğu saptanmıştır[72,117].

2.10.5. Beslenme

Sağlıklı yetişkinlerde mikrobiyotanın kompozisyonunda etkili dış faktörler büyük besinsel farklılıklar ve antibiyotik kullanımınıdır. Beslenmenin mikrobiyotaya etkisi tam olarak açıklanamamıştır. Buna karşın kontrollü diyet değişimlerinin bazı

bakteri gruplarında değişim yaptığı gözlenmiştir. Proteinden zengin diyet[122,123], prebiyotikler[124,125,126], probiyotikler[126-130], kilo kaybına neden olan beslenme[71,132,133] gibi beslenme çeşitleri araştırılmıştır. Beslenme ile bakteriyel metabolizma etkilenebilir ve spesifik besinlerle beslenme sağlık açısından fark yaratabilir. Örneğin, sığır etiyle fazla miktarda beslenen bireylerde dışkı mikrobiyotasında, etsiz beslenenlere göre *Bacteroides* spp., *B. vulgatus*, *B. fragilis* ve *Clostridium* spp. miktarlarının arttığı, *Bifidobacterium adolescentis*'in ise azaldığı gösterilmiştir[134,135,136]. Yüksek karbonhidratla beslenme durumunda *Bacteroides* spp. miktarı azaldığı, *E. coli* ve *Enterococcus* spp. miktarının ise ön plana çıktığı görülmüştür[137,138]. Nişasta, lif ve bitki içeriğindeki polisakkaritlerden fazla, yağ ve hayvansal proteinlerden daha az beslenen Afrikalı çocukların mikrobiyotasında, düşük life karşın, hayvansal proteinden zengin besinlerle beslenen Avrupalı çocuklara göre, *Bacteroidetes* ve *Actinobacteria*'larının daha fazla, *Firmicutes* ve *Proteobacteria*'larının az sayıda olduğu bildirilmiştir[72]. Vejeteryanlarda, mikrobiyota *E. rectale* – *B. coccoides* grup ve *C. ramosum* bakterilerinin oranının fazla olduğu görülmektedir[139].

2.10.6. Antibiyotik Kullanımı

Farklı sınıftaki antibiyotikler, birbirinden farklı etki mekanizmaları ile mikrobiyota üzerine farklı etki gösterirler ve konağın yanıtı da farklı olabilir[140,141].

2.10.7. Sağlık Durumu, Yaşam Şartları ve Stres

Sağlık durumu, yaşam şartları ve stres durumu mikrobiyotayı etkileyen diğer faktörlerdir. İskoçya'da hastanede yatan yaşlılarda, sağlıklı yaşlılara göre *Bacteroides* spp. ve *Prevotella* spp. grubu bakterilerin mikrobiyotada daha az, *E. faecalis*'in ise fazla olduğu saptanmıştır. Burada antibiyotik kullanımı sonucu *Bifidobacterium* spp.'de de azalma gözlenmiştir[142]. Sinirsel stresin, dışkıda *Bacteroides thetaiotaomicron* sayısını fazlalaştırdığı, duygusal stresin ise *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. sayısını azalttığı bildirilmiştir[143,144].

2.11. Kolon Mikrobiyotası ve Kanser İlişkisi

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla KRK ile kolon mikrobiyotası arasında ilişki olabileceği bildirilmektedir[11-31]. *Clostridium septicum*, *E. faecalis*, *S. bovis/gallolyticus*, *B. fragilis*, *E. coli* ve *Fusobacterium* spp. gibi kolon mikrobiyotasında bulunan bazı bakterilerin KRK patogenezinde rol oynayabileceği saptanmıştır[12]. Örneğin *S. gallolyticus* kolon tümörlerinde normal dokuya göre %20-50'ye kadar daha fazla bulunmuştur[13]. Aynı zamanda bazı çalışmalarda KRKli kişilerde *Bacteroides/Prevotella* oranı ve *F. nucleatum* popülasyonunun normalden fazla olduğu bildirilmiştir[145].

Kolon mikrobiyotasında bulunan bakterilerin oluşturduğu sekonder metabolitler örneğin; DNA hasarı veren oksijen ara ürünleri, genotoksin üreterek direkt hücre hasarı yaparak patogenezinde rol alırlar[146].

Yapılan çalışmalarda ETBF miktarının KRK'li hastalarda arttığı saptanmıştır[7-10]. Aynı zamanda bazı çalışmalarda *F. nucleatum*'un KRK'li kişilerde daha fazla miktarda olduğunu saptanmıştır[12,13,142].

Balamurugan R ve ark.'nın yaptığı çalışmada *E. faecalis*'in KRK'li hastaların dışkılarında hasta olmayan kişilere göre daha fazla olduğunu bildirmiştir. Bu bakteriler oksijen ve nitrojen radikalleri üreterek direkt DNA hasarı, nokta mutasyon ve kromozomal instabilite yaparak KRK gelişimine katkıda bulunurlar[6].

Ayrıca kolon mikrobiyotası ve kolon kanseri ilişkisi incelendiğinde; kolon mikrobiyotasında bulunan mikroorganizmalardan salınan artmış miktarda inflamatuvar ajanlar inflamasyon yollarını aktifler, normal hücrelerde kanserleşme sürecine katkıda bulunurlar. Yapılan araştırmalar kolorektal inflamasyonun KRK'e neden olabileceğini bildirmektedir[148]. Kolorektal bölgede myeloid ve lenfoid hücrelerde sinyal yolları bunda ana rol oynamaktadır. Örneğin sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü-3 (STAT3) ve Nükleer Faktör-κB (NF-κB) intestinal epitelde tümör gelişimine katkıda bulunmaktadır[149,150].

Aşağıda Tablo-2.2. ve Tablo-2.3.'te gösterildiği gibi KRK'li kişilerin fekal ve doku örneklerinde *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Bacteroides* ve *Prevotella*

kökenlerinin miktarlarının artmış olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda bu kökenlerin artışı görüldüğü üzere coğrafi bölgelerde farklılık göstermemektedir. Bu durum KRK ile kolon mikrobiyotası arasındaki ilişkiyi ortaya koyabilir. Bu rol bazı mekanizmalar üzerinden meydana gelmektedir. Bu mekanizmalar; genotoksin oluşumu, metabolizma ve inflamasyondur. Konak immün cevabı etkileyerek intestinal epigenetik mekanizmalar üzerinden etki ettiğini düşünülmele birlikte tam olarak nasıl kansere neden olduğu aydınlatılamamıştır. Tablo 2.2. ve Tablo 2.3.'te gösterildiği gibi kanserli dokularda ve fekal örneklerde *F. nucleatum* ve *B. fragilis* kökeninin daha fazla olduğunu bildiren çalışmaların olması bu bakterilerin KRK gelişiminde risk faktörü olabileceği düşündürmektedir[151].



Tablo 2.2. KRK'li hastaların dışkı mikrobiyotasında saptanan değişimler[151]

Referans	Örnek tipi	Artan bakteri	Method
Sinha ve ark. 2016	Fekal örnekler	<i>Fusobacterium ve Porphyromonas</i>	16S rRNA gen pirosekanslama
Flemer ve ark. 2016	Fekal ve mukozal örnekler	<i>Bacteroides ve Prevotella</i>	16s rRNA amplifikasyon sekanslama
Wong ve ark. 2016	Fekal örnekler	<i>F. nucleatum</i>	qPCR
Liang ve ark. 2016	Fekal örnekler	<i>F. nucleatum</i>	qPCR
Suehiro ve ark. 2016	Fekal örnekler	<i>F. nucleatum</i>	Droplet dijital PCR
Kasai ve ark. 2016	Fekal örnekler	<i>Actinomyces odontolyticus, Bacteroides fragiles, Clostridium nexile, Fusobacterium varium, Haemophilus parainfluenzae, Prevotella stercorea, Streptococcus gordonii, Veillonella dispar</i>	NGS
Fukugaiti ve ark. 2015	Fekal örnekler	<i>F. nucleatum ve C. difficile</i>	q-PCR
Chen ve ark. 2013	Fekal örnekler	<i>Enterococcus ve Streptococcus</i>	16S rRNA gen pirosekanslama
Sobhani ve ark. 2011	Fekal örnekler	<i>Bacteroides/Prevotella</i>	Pirosekanslama ve qRT-PCR
Ahn ve ark. 2013	Fekal örnekler	<i>Atopobium/Porphyromonas ve Fusobacterium</i>	Pirosekanslama ve Realtime-PCR
Balamurugan ve ark. 2008	Fekal örnekler	<i>Enterococcus fecalis</i>	Realtime-PCR

Tablo 2.3. KRK'li hastaların tümör doku örnekleri incelemesi sonucunda mikrobiyotada saptanan değişimler [151]

Referans	Örnek tipi	Artan bakteri	Method
Mima ve ark. 2016	Tümör doku örneği	<i>F. nucleatum</i>	Kantitatif PCR
Wei ve ark. 2016	Tümör doku örneği	<i>F. nucleatum</i> ve <i>Bacteroides fragilis</i>	16S rRNA gen pirosekanslama
Li ve ark. 2016	Tümör doku örneği	<i>F. nucleatum</i>	FQ-PCR
Zhou ve ark. 2016	Tümör doku örneği	<i>Fusobacterium</i> spp., <i>E. faecalis</i> , <i>ETBF</i>	Real-time PCR
Burns ve ark. 2015	Tümör doku örneği	<i>Fusobacterium</i> ve <i>Providencia</i>	qPCR ve 16S rRNA gen pirosekanslama
Gao ve ark. 2015	Tümör doku örneği	<i>Firmicutes</i> ve <i>Fusobacteria</i>	16S rRNA gen pirosekanslama
Mira-Pascual ve ark. 2015	Tümör doku örneği ve fekal örnekler	<i>F. nucleatum</i> ve <i>Enterobacteriaceae</i>	qPCR ve 16S ribozomal RNA gen pirosekanslama
Viljoen ve ark. 2015	Tümör doku örneği	<i>Fusobacterium</i> spp., <i>enterotoxigenic</i> <i>Bacteroides fragilis</i> (ETBF)	Real-time PCR
Tahara ve ark. 2014	Tümör doku örneği	<i>F. nucleatum</i> and <i>Pan- fusobacterium</i>	Real-time PCR
Geng ve ark. 2013	Tümör doku örneği	<i>Fusobacterium</i> spp., <i>Roseburia</i>	16S rRNA Gen pirosekanslama
Warren ve ark. 2013	Tümör doku örneği	<i>Fusobacterium</i> , <i>Leptotrichia</i> and <i>Campylobacter</i>	16S rRNA gen pirosekanslama
Castellarin ve ark. 2012	Tümör doku örneği	<i>F. nucleatum</i>	RNA sekanslama
Kostic ve ark. 2012	Tümör doku örneği	<i>Fusobacterium</i>	Tüm Genom Sekanslamanın kantitatif PCR ve 16S rDNA sekanslama ile eşleştirilmesi
Marchesi ve ark. 2011	Tümör doku örneği	<i>Fusobacterium</i>	rRNA sekanslama

2.12.1. *Fusobacterium nucleatum*

F. nucleatum anaerop, insan ağız ve bağırsak mukozasında bulunan Gram negatif spor oluşturmeyen çomaktır. *Fusobacteriaceae* ailesinin üyesidir. *Fusobacterium* genusunda 14 tür bulunmaktadır. *F. nucleatum* türü oldukça heterojendir, 5 alt türde sınıflandırılmaktadır: *nucleatum*, *polymorphum*, *vincentii*, *fusifforme* ve *animalis*. Bu bakteri oldukça heterojen olduğu için koloni morfolojileri farklı olmaktadır ve oral mikrobiyotada bulunmaktadır. Dental plaklarda dominant bakteridir ve primer olarak periodontal hastalıklarla ilişkilidir. Aynı zamanda Lemierre's sendromu, perikardit, akut apandisit gibi enfeksiyonlara da neden olabilir[152].

Adhezinler, lipopolisakkarit, serin proteaz, amonyum ve butirat oluşumu, yağ asidi bağlayıcı protein-2 (Fap2) ve RadD dış membran proteinleri *F. nucleatum*'un virülans faktörleridir. Adhezinler, Fap2 ile birlikte konak hücrelerine bağlanarak invazyona neden olur. Lipopolisakkarit konak hücrelerine hasar verir, IgA degradesyonu yapar. Amonyum ve bütirat gingival fibroblastlarda proliferasyonu inhibe eder. RadD ve Fap2 fonksiyonları adhezinler gibi Gram pozitif bakterilere ve *Porphyromonas gingivalise* bağlanır. Lenfosit apoptozisini indükler[153].

2.12.2. *Fusobacterium nucleatum* ve Kolon Kanseri

KRK spesifik genetik ve epigenetik lezyonlarla karakterizedir ve moleküler özellikleri bakımından heterojenite gösterir. KRK'de en sık onkojen K-RAS, tümör protein 53 (TP53) ve Adenomatöz Polipozis Koli (APC) gen mutasyonları görülmektedir. KRK'lerde epigenetik değişimlere de sıklıkla rastlanmaktadır; özellikle gen promotör DNA metilasyonu buna örnek teşkil eder. KRK'ler gen mutasyonları ve DNA metilasyon durumları ile CpG adalarının metilatör fenotipi (CIMP) baz alınarak sınıflandırılmaktadır[152].

Tipik olarak yüksek miktarda CIMP içeren KRK'lerde mikrosatellit instabilitesi (MSI) gelişmekte ve bu durum mismatch tamir geni (MLH-1) nin etkisiz hale gelmesi ve aynı zamanda v-Raf murin sarkomu viral onkogen homologu B (BRAF) geni mutasyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu olayda sıklıkla kromatin düzenleyici genlerde özellikle Kromodomain helikaz DNA bağlayan protein 7 (CHD7) ve Kromodomain

helikaz DNA bağlayan protein 8 (CHD8) mutasyonlarının meydana geldiği, kromodomain helikaz ATP bağımlı kromatinin remodalize olması ile CIMP1 KRK'in meydana geldiği gösterilmiştir[152].

Son yıllarda *Fusobacterium* türlerinin kolorektal kanser ile ilişkisini gösteren yeni çalışmalara yer verilmiştir. Bu çalışmalarda *F. nucleatum* ve *pan-Fusobacterium* türlerinin KRK'li dokularda, bitişik sağlıklı dokulara göre daha yoğun bulunduğu saptanmıştır[12,13]. Bu güne kadar kanserle ilişkilendirilen çok sayıda mikroorganizma olmasına rağmen *Fusobacterium* türlerinin KRK ile ilişkisi yeni bir konsepttir ve mikrobiyotanın normal üyesi olan bu bakterinin tümörogeneze sebep olabileceği düşünülmektedir[152].

Tahara T ve ark. yaptıkları çalışmada *Fusobacterium* kökenlerini farklı KRK tiplerinde araştırmışlardır. Yüksek miktarda *Fusobacterium* buldukları KRK'lerde nadir genetik ve epigenetik profil elde etmişlerdir. Elde edilen bulgularla bağırsak mikrobiyotası ile KRK'in moleküler özellikleri arasındaki potansiyel ilişki varlığını desteklemişlerdir[23,152,154].

Araştırmacılar çoğu KRK'lerde karsinogenezdeki moleküler olayların *F.nucleatum* ile ilişkili olabileceğini rapor etmişlerdir, bu moleküler olaylardan bazıları, MSI, CIMP, TP53, BRAF, CHD7 ve CHD8 olarak bildirilmiştir. Önce *F. nucleatum*'un KRK karsinogenezindeki rolü APC fare modeli üzerinden kanıtlanmış ve KRK hücre büyümesinde E-kaderin/beta katenin sinyalini *Fusobacterium* adhesin A (FadA) ile aktive ettiği ayrıca *F. nucleatum*'un diğer virülans faktörleri ile de KRK ile ilişkili olabileceği keşfedilmiştir. *F. nucleatum*'un Fap2 proteini ile immün hücrelerin yanıtını engelleyerek tümör hücrelerini immün savunma mekanizmalarına karşı koruduğu belirtilmiştir. Ancak KRK gelişiminde *F.nucleatum*'un aşırı bulunmasının kanser gelişimine etkisi ve ilişkili patobiyolojik yollar henüz tam olarak bilinmemektedir[13].

2.13. *Bacteroides fragilis* spp.

Bacteroides fragilis spp. bağırsak mikrobiyotasında fazlaca bulunur. Aynı zamanda ağız, üst solunum yolları ve genital mikrobiyota üyesidir. Yirmiden fazla türü içinde barındıran büyük bir gruptur. Diğer anaeroplara gibi fırsatçı

enfeksiyonlara neden olabilirler. En sık intraabdominal bölgede enfeksiyon oluşturmakla beraber pulmoner bölge ve kadınlarda ürogenital bölgede enfeksiyon oluşturabilirler[155].

2.13.1. *Bacteroides fragilis*

Gram negatif, hareketsiz, zorunlu anaerop bir bakteridir. Boyutları 0.8-0.13 µm'den 0.8-1.6 µm uzunluğa kadar değişmektedir. Kapsül içeren bazı kökenleri bulunmaktadır. Katı besiyerinde 1.3 mm çapında konveks, yarıopak koloniler oluşturmaktadır. hemin içeren besiyerinde üretilebilir, kuvvetli asit oluştururlar, bu asit nedeniyle ölürlür. Bu nedenle fragil olarak adlandırılmıştır. %20 oranındaki safraya dirençlidirler ve 25-45°C de ürerler pH=8,0'da çok zayıf ürerler. Katalaz testi pozitif olarak saptanır[156]. β-laktamaz üretir ve penisiline ve birçok sefalosporine dirençlidir aynı zamanda plazmit ile tetrasiklin, eritromisin ve klindamisine direnç geliştirebilir. Apandisit, peritonit, rektal abse, kalp kapak enfeksiyonları ve pilonidal kist enfeksiyonu, postoperatif yara enfeksiyonuna neden olabilir. Penisilin ile kombine β-laktamaz inhibitörleri ve doksisisiklin tedavide sıklıkla tercih edilir[157,158].

2.13.2. Enterotoksijenik *Bacteroides fragilis* (ETBF)

Bacteroides fragilis'in, enterotoksijenik ve non-enterotoksijenik olmak üzere 2 farklı varyasyonu tanımlanmıştır. Non-enterotoksijenik *B. fragilis* polisakkarit metabolizma ve koruyucu immün cevabı sağlayan simbiyotik ilişkisi ile karakterizedir. Enterotoksijenik olanlar ise *B. fragilis* toksini (BFT) içermektedirler. Bu toksin bft geni tarafından kodlanmaktadır. BFT aynı zamanda fragilisin olarak da adlandırılmaktadır ve çinko içerir. Pre-proprotein metalloproteaz holotoksindir. 20kDA ağırlığındadır. Litik aktivite göstermez, hücre proliferasyonunu uyarır. BFT'nin 3 farklı izotipi bulunmaktadır: BFT-1, BFT-2 ve BFT-3. Bunların birbirlerinden farklı toksisiteleri bulunmaktadır ve en toksik tipi BFT-2 dir. BFT'nin in vitro olarak biyolojik aktivitesi tanımlanmıştır, inflamatuvar ishali potansiyel olarak tetiklediği ve aynı zamanda kolon kanseri ile bağlantılı olabileceği belirtilmiştir[159].

2.13.3. *Bacteriodes fragilis* ve Kolon Kanseri İlişkisi

BFT in vitro olarak kolon epitel hücrelerinde klor kanalları üzerinden bariyer geçirgenliğini artırır, bu durum ishale neden olur ve aynı zamanda kolonda inflamasyon ve karsinogeneze neden olur. BFT'nin indüklediği bariyer geçirgenliği hücreler arasındaki adhezyon proteini olan E-kadherin'in temizlenmesi ile ilişkilidir[159].

BFT proteaz bir toksin olmasına rağmen eldeki veriler BFT'nin E kadherin'in temizlenmesinde direkt etkisini desteklememektedir. BFT kolon epitel hücre yüzeyinde henüz karakterize edilememiş bir reseptöre bağlanır. BFT'nin bağlanmasından sonra E-kadherin proteininin ATP bağımlı yolla parçalanmasıyla hücrenin geçirgenliği artar. E-kadherin proteininin yıkılması β -kathenin yolağını indükler. β -kathenin Wingless ve integrasyon-1 (Wnt) yolağının kritik sinyal molekülüdür. Wnt yolağı APC geni ile regüle edilir. APC mutasyonu olduğunda sporadik kolon kanseri ortaya çıkar. Wnt sinyali hücre proliferasyonunun tek regülatörüdür. APC mutasyona uğradığında β -kathenin nükleer sinyali sonucunda disregüle proliferasyon başlar. BFT'nin indüklediği E-kadherin yıkılımı sonucu β -kathenin nükleer sinyali ile onkogen cell - miyelositomatozis (c-myc) indüklenir ve hücre proliferasyonu meydana gelir. Aynı zamanda BFT'nin indüklediği poliamin kataliz spermin oksidaz (SMO) enzimi serbest oksijen radikalleri ortaya çıkarır. Hücre proliferasyon yollarının tam olarak nasıl indüklendiği anlaşılamamıştır. Bilinen, BFT'nin NF- κ B'yı aktive ettiği ve hücrelerde mikrotübül ilişkili protein kinaz (MAPK) sinyalinin aktive olarak proinflamatuvar sitokinlerin salındığıdır. BFT aynı zamanda siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimini indükler, mukozal prostoglandin E2 yi arttırır. Bu mekanizma ile inflamatuvar ishal indüklenir[159].

Bunların sonucunda E-kadherin'in temizlenmesi ile NF- κ B yolağı aktive olur. Poliamin mekanizması aktive olur, DNA hasarı indüklenir. Bu yol BFT'nin karsinogenezinin anahtar rolüdür[159].

2.14. Mikrobiyota Çalışmalarında Kullanılan Teknikler

Yeni ortaya çıkan ve gelişen moleküler yöntemler ile kültürü yapılamayan mikroorganizmalar saptanabilmiş ve bakteri çeşitliliği çok daha iyi kavranmıştır.

Güvenilir dizi verilerinin artması ile çalışmalar aşama atlamıştır[161]. Teknikler kültür bağımlı ve kültür bağımsız olarak iki aşamada açıklanmıştır.

2.14.1. Kültür Bağımlı Teknikler

İlk çalışmalar farklı türlerin kültürde üretilmesine ve kolonilerin yapısı ve biyokimyasal metodlar ile identifiye edilmesine dayalıydı[162,163]. Bu yöntemle mikrobiyotadaki bakterilerin yalnızca %20'si üretilebilir[164].

2.14.2. Kültür Bağımsız Teknikler

1990'lardan itibaren moleküler teknikler klinik araştırmalarda kullanılmış ve mikrobiyal toplulukları belirleme açısından çok büyük bir veri elde edilmiştir[165]. Bu teknikler mikrobiyotanın içeriğini tanımlamaya ve takip etmeye olana sağlamıştır. Bu tekniklerin esası numunelerin içeriğindeki nukleik asitlerin (DNA ve/veya RNA) izolasyonunu sağlamaktır. RNA'nın çalışma esnasında potansiyel olarak parçalanmasından dolayı DNA çalışmalarda daha sık kullanılmaktadır[166].

2.14.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR tüp içerisinde kalıp DNA, ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi Taq polimeraz, birbirine eşit miktarlarda Adenin, Timin, Guanin ve Sitozin bazları, katalizör amaçlı Mg ve Mn gibi iki değerli katyonlar, tamponlar (Tris-Cl) ve tek zincirli hedefe spesifik oligonükleotidler (primer) ile DNA veya RNA dizilerinin in vitro çoğaltılması işlemidir. PZR yönteminde sıcaklık değişimleri döngüler boyunca uygulanır. Polimeraz olarak en sık termofilik *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq polimeraz enzimi kullanılır.

Reaksiyonda prensip olarak üç ısı değişimi ile gerçekleşir:

1. Yüksek sıcaklık ile DNA denatüre edilir.
2. Düşük sıcaklıklarda primerler bağlanır.
3. Orta düzey sıcaklıklarda dNTP (dinükleotit trifosfat)'ler ile komplementer dizi meydana gelir[167].

2.14.2.2. Kantitatif PZR (qPZR)

Kantitatif veya gerçek zamanlı PZR, hedef genin kantitasyonuna gerçek zamanlı olarak olanak sağlar. Oldukça güvenilir aynı zamanda tekrarlanabilir duyarlı bir yöntemdir. Mikrobiyolojide bu teknik bakteriler ve virüslerin kantitasyonunda kullanılır. Florasans tespitine dayanan bu teknikte tamamlanan her siklusta oluşan amplikonların sayısına göre florasan sinyal toplanır. Gerçek zamalı PZR sistemleri oluşan florasan sinyalin lcm ile amplifikasyon eğrileri oluşturur (Ct, Cq veya Cp). Aranana DNA'nın miktarı bu eğrilerle hesaplanır[168].

Florasans sinyalin toplanması için 2 teknik kullanılır. Birinci teknikte, SYBR green I kullanılır ve hedef spesifik değildir. En sık kullanılan non spesifik boya olan SYBR green I, oluşan tüm çift zincirli DNA'lara bağlanarak ve sinyal verir[169].

Diğer teknik ise hedef spesifik çalışır. Bu teknikte raporlayıcı ve baskılayıcı içeren özel boyalar kullanılmaktadır. Bu boyalar gerçek zamanlı PZR'da ikinci sıklıkta kullanılır ve aynı zamanda bunlar Taqman veya hidroliz problemleri olarakta anılır. Bu boyalarda, baskılayıcı boya 3', raporlayıcı boya ise 5' ucuna bağlanır. Hedefe spesifiktirler. Raporlayıcı ve baskılayıcılar yakın oligonukleotidlerde oluşturulmuşlardır. Yan yana oturduklarında florasans oluşurmazlar[170]. Yeni dizi oluştuğunda Taq polimerazın 5' ekzonukleaz aktivitesi prob'u 5' ucundan kesmesiyle raporlayıcı ve baskılayıcı biri diğerinden ayrılır sonrasında raporlayıcının oluşturduğu yoğun florasans tespit edilebilir duruma gelir[168].

Mikrobiyota çalışmalarında bakterilerin kantitasyonunun yapılması ve yanı sıra kültürde üretilmeyen bakterilerin tespit edilmesinde kantitatif PZR sıklıkla kullanılmaktadır. Maliyetlerinin diğer yöntemlere göre uygun olması, verilerin duyarlılığının yüksek olması, değerlendirmede biyoinformatik gereksinimlere ihtiyaç olmaması sebebiyle son yıllarda yapılan birçok mikrobiyota çalışmasında bu teknik kullanılmıştır [11-31].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Eylül 2018 - Eylül 2019 tarihleri arasında, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı Endoskopi Ünitesi'ne kolonoskopi olmak üzere gelen bireylerden alınan kolon biyopsi örnekleriyle gerçekleştirilmiştir. Biyopsi örneklerine ait histopatolojik değerlendirme sonuçları fakültemiz Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiş, hasta ve kontrol gruplarının oluşturulması sırasında bu sonuçlar kullanılmıştır. Biyopsi örneklerinden DNA izolasyonu fakültemiz Ekrem Kadri Unat 2 Laboratuvar'ında gerçekleştirilmiştir. PZR analizlerinde Fullgen Biyoteknoloji Laboratuvarlarından destek alınmıştır. Sonuçlar danışman hocamla birlikte değerlendirilmiştir. Olgu kontrol temelli kesitsel çalışmamız için Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır. Çalışmaya katılan her bireye Ek-1'de belirtilen onam formu okutulmuş ve gereken onam alınmıştır.

3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

3.1.1. Hasta Grubu

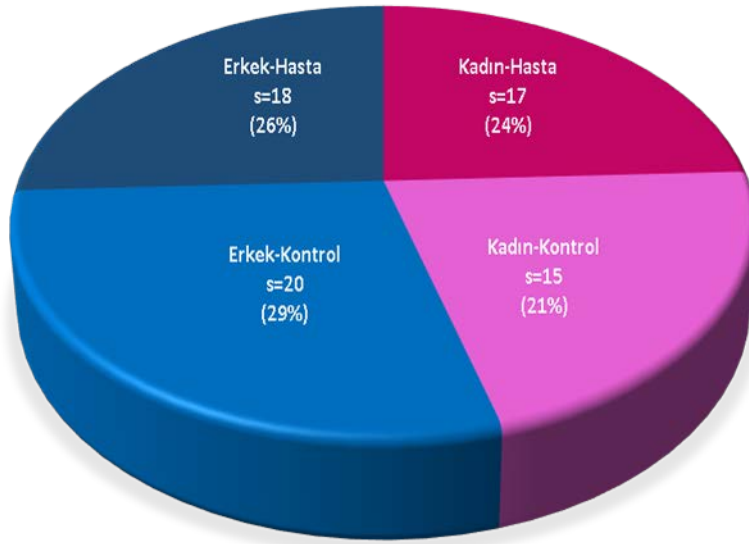
İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Endoskopi Ünitesi'ne dışkılama alışkanlığında değişiklik, dışkıda kan, dışkı kalibresinde azalma, iştahsızlık, kilo kaybı, melena, konstipasyon gibi çeşitli şikayetler ile başvuran, kolonoskopi ile alınan biyopsi örneğinin histopatolojik inceleme sonucu kolorektal karsinom tanısı alan, KRK dışında başka bir kanser tanısı almamış ve kolonoskopiden önceki 30 gün içerisinde antibiyotik kullanmamış 35 erişkin hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada her hasta için bir biyopsi örneği kullanılmıştır.

3.1.2. Kontrol Grubu

İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Endoskopi Ünitesi'ne dışkılama alışkanlığında değişiklik, dışkıda kan,

dışkı kalibresinde azalma, iştahsızlık, kilo kaybı, melena, konstipasyon gibi çeşitli şikayetler ile başvuran, kolonoskopi ile alınan biyopsi örneğinin histopatolojik inceleme sonucu kolorektal karsinom tanısı veya KRK dışında başka bir kanser tanısı almamış olan, yaş ve cinsiyet bakımından hasta grubu ile eşleştirilmiş (match) bireylerle oluşturulmuştur. Kolonoskopiden önceki 30 gün içerisinde antibiyotik kullanmamış 35 erişkin birey çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada her kontrol için bir biyopsi örneği kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grupları, yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilerek çalışmaya dahil edilmişlerdir (hasta grubu; %48,6 kadın %51,4 erkek, kontrol grubu; %42,9 kadın %57,1 erkek, Pearson Ki-Kare testi $p=0,631$) (hasta grubu yaş ort. $62,57 \pm 12,34$, kontrol grubu yaş ort. $56,86 \pm 12,21$, Student-t Testi $p=0,056$).

KRK tanısı almış 35 hastanın 17 (%48.5)'si kadın, 18 (%51.5)'i erkek hastadır. Kontrol grubumuzda ise 15 (%42.8)' kadın 20(%57.2)' erkek olmak üzere 35 birey bulunmaktadır.



Şekil 3.1. KRK tanısı almış hastaların ve kontrol grubundaki bireylerin cinsiyete göre dağılımı

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) KRK taramasını 50 ila 75 arasında yapılmasını ancak 1. derece yakınlarında KRK bulunan kişilerin 40 yaşından itibaren KRK yönünden taranması gerektiğine işaret etmektedir[171].

Ayrıca yine CDC 75 - 85 yaş arası kişilerin rutin tarama yerine ancak hekimlerinin istediği zaman KRK yönünden araştırılmasını önermektedir[172].

Çalışmamızda KRK tanısı alan hastalarımız da 40 ila 81 yaş arasındadır. Kanser taraması yapılan 50 - 75 yaş grubunda 10'u kadın ve 13'ü erkek olmak üzere 23 hasta bulunmaktadır. 40 - 49 yaş arası hastalar ailede KRK hikayesi olduğundan taramaya dahil edilmiş ve tanı almış 5 hastadır. ≥ 75 yaş grubunda ise hekim isteği nedeniyle KRK yönünden araştırıldıktan sonra tanı almış 7 hasta bulunmaktadır.

Tablo 3.1. KRK tanısı almış hastaların ve kontrol grubundaki bireylerin yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Grupları	Hasta		Kontrol	
	Kadın	Erkek	Kadın	Erkek
40 - 49 yaş	3 (8,5)	2 (5,8)	4 (11,4)	5(14,2)
50 - 75 yaş	10 (28,6)	13 (37,2)	10 (28,6)	14 (40)
≥ 75 yaş	4 (11,4)	3 (8,5)	1 (2,9)	1 (2,9)
Toplam	17 (48,5)	18 (51,5)	15 (42,8)	20 (57,2)

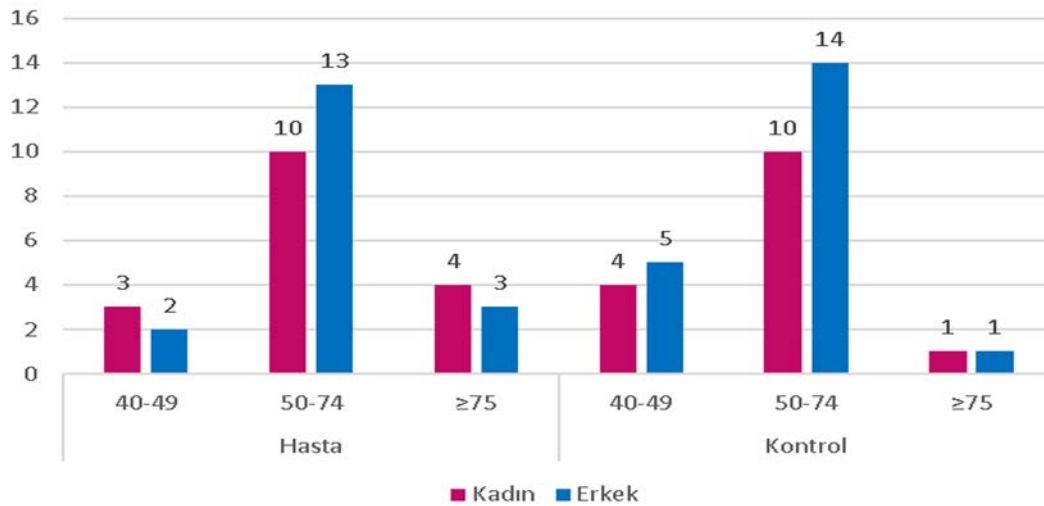
Çalışmamızda KRK tanısı almış 35 hastanın 5 (%14.3)'i 40-49 yaş grubunda 23 (%65.8)'ü 50 - 75 yaş ve 7 (%20)'si ≥ 75 yaş grubundadır.Kontrol grubumuzdaki

bireylerin ise 9 (%25.6)'u 40 - 49 yaş grubunda, 24 (%68.6)'ü 50 - 75 yaş grubunda 2 (%5.8)'si ≥ 75 yaş grubundadır.

40 - 49 yaş grubunda yer alan hastaların 3 (%8.5)'ü kadın 2 (%5.8)'si erkek hasta iken aynı yaş grubunda kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireylerin 4 (%11.4)'ü kadın 5 (%14.2)'i erkektir.

50 - 74 yaş grubunda yer alan hastaların 10 (%43.4)'u kadın 13 (%56.6)'ü erkek hasta iken aynı yaş grubunda kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireylerin 10 (%41.6)'u kadın, 14 (%58.4)'ü erkektir.

≥ 75 yaş grubunda yer alan hastaların 4 (%11.4)'ü kadın 3 (%8.5)'ü erkek hasta iken aynı yaş grubunda kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireylerin 1 (%2.9)'i kadın 1 (%2.9)'i erkektir.



Şekil 3.2. KRK tanısı almış hastaların ve kontrol grubundaki bireylerin yaş ve cinsiyete göre dağılımı

3.2. Çalışmadan Dışlanma Ölçütleri

3.2.1. Hasta Grubu Dışlanma Ölçütleri

Histopatolojik incelemesinde kolorektal karsinom saptanmayan hastalar, kolonoskopiden önceki 30 gün içerisinde antibakteriyal tedavi alan hastalar, KRK dışında herhangi bir kanseri olan, son 2 ay içerisinde kemoterapi veya radyoterapi alan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.2.2. Kontrol Grubu Dışlanma Ölçütleri

Histopatolojik incelemesinde kolorektal karsinom saptanan hastalar, kolonoskopiden önceki 30 gün içerisinde antibakteriyal tedavi alan hastalar, KRK dışında herhangi bir kanseri olan, son 2 ay içerisinde kemoterapi veya radyoterapi alan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.3. Yöntemler

Çalışmamızda numune alımından sonuçların elde edilmesine kadar olan aşamalarda kullandığımız yöntemler aşağıda özetlenmiştir.

- a. Hastalara ve kontrollere ait bilgilerin yer aldığı formların doldurulması
- b. Biyopsi örneklerinin laboratuvara taşınması ve saklanması
- c. Biyopsi örneklerinden bakterilere ait DNA izolasyonlarının gerçekleştirilmesi
- d. Gerçek zamanlı PZR (qPZR) ile elde edilen DNA'lardan *F. nucleatum* ve ETBF kantitasyonunun yapılması

3.3.1. Hastalara ve Kontrollere Ait Bilgilerin Yer Aldığı Formların Doldurulması

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Endoskopi Ünitesi'ne kolonoskopi olmak üzere gelen bireylerden kolon biyopsi örnekleri alınmadan önce çalışma için hazırladığımız formlar dolduruldu. Bu formlarda bireylerin yaş, cinsiyet, meslek, sigara ve alkol kullanımı, kronik hastalıklar, kullanılan antibiyotik, daha önce tanı alınan önemli hastalıklar, kullanılan ilaç, kemoterapi uygulanması ve tanı konulan diğer kanserler sorgulanmıştır.

3.3.2. Biyopsi Örneklerinin Laboratuvara Taşınması ve Saklanması

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Endoskopi Ünitesi'nde kolonoskopi esnasında alınan doku örnekleri 1 ml Dnase Rnase içermeyen distile su içeren ependorflar içine konularak en kısa zamanda laboratuvara transfer edilmesi sağlandı. Sonrasında diğer işlemler yapılanaya kadar -80 °C'de saklandı.

3.3.3. Biyopsi Örneklerinden Bakteri DNA'sının İzolasyonu

DNA izolasyonu için farklı yöntemler bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda DNA izolasyonu için High Pure PCR template preparation kiti kullanıldı (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya). Üretici direktifleri ile biyopsi örneklerine aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. 25 mg biyopsi örneğine 200 µl Doku Lysis Buffer eklendi, üzerine de 40 µl Proteinase K eklendi ve iyice karıştırıldı. 55 °C'de 1 saat inkübe edilerek dokunun tamamen erimesi sağlandı.

2. Erimiş örneğe 200 µl Binding Buffer eklenerek derhal karıştırıldı, 70 °C'de 10 dk inkübe edildi.

3. İnkübasyondan sonra üzerine 100 µl izopropanol eklendi iyice karıştırıldı ve erimeyen küçük doku parçalarından arındırıldı.

4. Elde edilen lizat High Pure Filter Tubüne aktarıldı 8,000 devirde 1 dk. santrifüj edilerek üzerine 500 µl inhibitör removal bufferi eklendi sonrasında tekrar 8,000 devirde 1 dk santrifüjlendi. Bu işlem her aşamada üstte kalan kısım atılarak 2 kez daha tekrar edildi.

5. Ardından 10s, 13.000 devirde santrifüjlendi ve üstteki kısım atıldı. Oluşan çöküntü yeni bir tüpe alındı. Üzerine 200 µl elution buffer eklenerek, tekrar 8,000 devirde 1 dk santrifüjlendi ve çöküntüden DNA izole edildi.

6. İşlem tamamlandığında 100 µl DNA elde edildi. Biyopsi örneklerinden elde edilen bu DNA'lar nanodrop spektrofotometre (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) ile kontrol edildi 260 nm'de konsantrasyonlarının ve 260/280 nm'de saflıklarının ölçümü yapıldı.

7. Örnekler cihazdan alındıktan sonra 1,5 ml'lik steril ependorf tüplerine alındı -20 °C'de gerçek zamanlı PZR (qPZR) yapılincaya kadar saklandı.

3.3.4. DNA'lardan Bakteri Sayımı İçin Yapılan İşlemler

Bakterilerin gerçek zamanlı PZR (qPZR) işlemlerinde aşağıdaki yöntemler takip edildi. Plazmid standartlar ile sistem tarafından otomatik oluşturulan standart

eğriler numunelerin içerdikleri bakteri miktarının hesaplanmasında kullanıldı. Bu sonuçlarla kontrol grubu ve hasta grupları karşılaştırıldı.

3.3.4.1. ETBF ve *F.nucleatum*'un Gerçek Zamanlı PZR (qPZR) Kantitasyon Çalışması

Biyopsi numunelerinden elde edilmiş DNA'larla ETBF ve *F. nucleatum* çalışmasının yapılması için, ETBF'e ve *F. nucleatum*'a spesifik forward ve reverse primerleri (Sentromer DNA Teknolojileri, İstanbul, Türkiye) (Tablo 3.1) üretici firma direktifleri ile Fast Start Essential Sybr Green Master Mix kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) içinde bulunan Rnase ve Dnase içermeyen steril distile su kullanılarak sulandırıldı. Primerler konsantrasyonları, qPCR reaksiyon final konsantrasyonu 0,5 µMol olacak biçimde ayarlandı. Tablodaki miktarlar ile çalışılacak her bir reaksiyon için mastermiks hazırlandı (Tablo 3.3.,Tablo 3.4.).

Tablo 3.2. Primerler tablosu[3,8,12]

ETBF-F	GAC GGT GTA TGT GAT TTG TCT GAG AGA
ETBF-R	ATC CCT AAG ATT TTA TTA TCC CAA GTA
<i>F. nucleatum</i>-F	CGG GTG AGT AAC GCG TAA AG
<i>F. nucleatum</i>-R1	GCC GTG TCT CAG TCC CCT
<i>F. nucleatum</i>-R2	GCA TTC GTT TCC AAA TGT TGT CC

Tablo 3.3. Her bir reaksiyon için ETBF mastermiks hazırlama protokolü

Malzeme	Miktar
PZR kalite su	4,6 µl
ETBF primer F	0,2 µl
ETBF primer R	0,2 µl
Sybr Green Master	10 µl
Toplam Miktar	15 µl

Tablo 3.4. Her bir reaksiyon için *F. nucleatum* hazırlama protokolü

Malzeme	Miktar
PZR kalite su	4,6 µl
<i>F.nucleatum</i> primer F	0,2 µl
<i>F.nucleatum</i> primer R	0,2 µl
Sybr Green Master	10 µl
Toplam Miktar	15 µl

Oluşan mastermiks'lerden LightCycler 480 çok kuyucuklu beyaz pleyt üzerindeki (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) kuyucuklara 15 µl pipetlendi, sonra bu kuyucuklara elde edilmiş DNA'lardan, plazmid standartlardan ve negatif kontrolden 5 µl ilave edilerek toplam 20 µl'lik qPZR miks + DNA karışımı oluşturuldu. Pipetasyon yapılarak iyice karıştırıldı. Pleytlerin üzeri folyo, (sealing foil - Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) ile kapatılarak çalışma sırasında

buharlaşma engellendi. Sonrasında üretici firma direktifleri ile pleytler 1500xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilmiş pleytler, LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) qPZR cihazı ile çalışılmaya alındı (Tablo 3.4.). Sybr Green boyasının doğası gereği oluşabilecek herhangi bir çift zincirli DNA'ya bağlanabilecek olmasından dolayı spesifik ürünlerin olup olmadığını kontrol etmek amacıyla çoğalma eğrileri (Amplifikasyon eğrileri), protokolde erime eğrisi protokolü ile oluşturulmuş her bir reaksiyon için oluşan spesifik erime eğrileri kontrol edildi ve doğrulandı. Sistemde değeri bilinen standartlarla otomatik olarak oluşturulan standart eğriye göre pozitif numunelerde sistem yazılımıyla numunelere ait otomatik sonuçlar oluşturuldu.

Tablo 3.5. ETBF ve *F.nucleatum* için uygulanan gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü

	Preinkübasyon		Amplifikasyon		Erime (Melting)		Soğuma
Aşama	Preinkübasyon	Denatürasyon	Bağlanma ve Uzama	Denatürasyon	Bağlanma	Erime ve Okuma	Soğuma
Döngü sayısı	1 Siklus	45 Siklus		1 Siklus			1 Siklus
Sıcaklık	95 °C	95 °C	60 °C	95 °C	65 °C	95 °C	40 °C
Süre	10 dk.	5 sn.	45 sn.	1 dk.	1 dk.	-	30 sn.
Analiz modu	Yok	Yok	Tek nokta okuma	Yok	Yok	Sürekli okuma	Yok

3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda istatistik programı olarak IBM SPSS versiyon 21 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM Analytics, Armonk, New York, USA) kullanıldı. Kategorik veriler sıklık ve yüzdeler, sürekli veriler ortalama ve standart hata değerleriyle tanımlandı. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu vizüel (histogram, boxplot) ve analitik yöntemler (Shapiro Wilk Testi) ile belirlendi. Sürekli değişkenlerin normal dağılım göstermediği durumlarda, iki kategorili niteliksel grupların (ETBF ve *F. nucleatum* varlığı/yokluğu gibi) sürekli değişkenler bakımından karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Kategorik verilerin birbirleri ile karşılaştırılmasında Ki-kare testi uygulandı. $P < 0,05$ istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda 35 KRK tanısı almış hastanın kolondaki tümörlü bölgesine ait biyopsi örneklerinde ve 35 kanser ve başka bir patoloji saptanmamış bireyin kolondan alınan biyopsi örneklerinde elde edilen ETBF ve *F. nucleatum* varlığı ve miktarı hakkındaki bulgularımız aşağıda açıklanmıştır.

Birçok araştırmada *F. nucleatum* ve *B. fragilis*'in KRK tanısı almış hastalarda bağırsak mikrobiyotasında artış gösterdiği vurgulanmıştır. Bu bakterileri KRK ile ilişkilendiren bazı araştırmacılar olsa da tartışmalar devam etmektedir.

Biz de çalışmamızda öncelikle KRK tanısı alan tüm hastalarımıza ait biyopsi örneklerinde cinsiyet ve yaşa bakılmaksızın, *F. nucleatum* ve ETBF bulunup bulunmadığını saptadık ve sonuçları istatistiksel olarak kıyasladık. Bunun yanı sıra hasta grubumuza ait biyopsi örneklerinde saptadığımız ortalama *F. nucleatum* ve ETBF miktarını kontrol grubundaki bireylerde saptadığımız miktarla istatistiksel olarak karşılaştırdık.

Tablo 4.1. KRK tanısı almış hastalarda ve kontrol grubundaki bireylerde *F. nucleatum* ve ETBF varlığının s(%) ve miktarlarının (log10bakteri/25mg) karşılaştırılması

Bakteriler		Hasta (s=35)		Kontrol (s=35)		P
		(+)	(-)	(+)	(-)	
<i>F. nucleatum</i>	s (%)	20 (57,1)	15 (42,9)	17 (48,6)	18 (51,4)	0,473*
	Miktar	3,67 ± 0,548		3,04 ± 0,544		0,995**
ETBF	s (%)	25 (71,4)	10 (28,6)	12 (34,3)	23 (65,7)	0,002*
	Miktar	2,98 ± 0,350		1,40 ± 0,348		0,004**

*Pearson Ki-Kare Testi

**Mann-Whitney U Testi

Elde ettiğimiz sonuçlar neticesinde:

Doku örneklerinden yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde *F. nucleatum* varlığı 35 hastanın 20 (%57,1)'sinde, kontrol grubunda ise 35 bireyin 17 (%48,6)'sinde saptanmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasında *F. nucleatum* saptanma oranı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür (p=0,473). Ayrıca *F. nucleatum* miktarları bakımından da hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p=0,995).

ETBF varlığı 35 hastanın 25 (%71,4)'inde, kontrol grubunda ise 35 bireyin 12 (%34,3)'sinde saptanmıştır. ETBF saptanma oranı, hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,002). Aynı zamanda ETBF miktarı da hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,004).

Yukarıdaki verileri elde ettikten sonra, çalışmamızda KRK tanısı alan kadın ve erkek hastalarımıza ait biyopsi örneklerinde *F. nucleatum* ve ETBF bulunup bulunmadığını araştırdık ve sonuçları istatistiksel olarak kıyasladık. Bunun yanı sıra

kadın hastalara ait biyopsi örneklerinde saptadığımız ortalama *F. nucleatum* ve ETBF miktarını erkek hastalarda saptadığımız miktarla istatistiksel olarak karşılaştırdık.

Tablo 4.2. *F. nucleatum* ve ETBF varlığı s(%) ile miktarlarının (log10bakteri/25mg) KRK tanısı almış kadın ve erkek hastalarda karşılaştırılması

Bakteriler		Erkek Hastalar (s=18)		Kadın Hastalar (s=17)		P
		(+)	(-)	(+)	(-)	
<i>F. nucleatum</i>	s (%)	6 (33,3)	12 (66,7)	14 (82,4)	3 (17,6)	0,003*
	Miktar	2,13 ± 0,731		5,30 ± 0,624		0,013**
ETBF	s (%)	12 (66,7)	6 (33,3)	13 (76,5)	4 (23,5)	0,521*
	Miktar	2,81 ± 0,528		3,17 ± 0,466		0,515**

*Pearson Ki-Kare Testi

**Mann-Whitney U Testi

Doku örnekleri ile yapılan çalışma sonucunda *F. nucleatum* varlığı 18 erkek hastanın 6 (%33,3)'sında, 17 kadın hastanın 14 (%82,4)'ünde saptanmıştır. Kadın hastalarda *F. nucleatum* saptanma oranı erkek hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,003). Aynı zamanda kadın hastalarda *F. nucleatum* ortalama miktarları erkek hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (p=0,013).

ETBF varlığı 18 erkek hastanın 12 (%66,7)'sinde, 17 kadın hastanın 13 (%76,5)'ünde saptanmıştır. Erkek ve kadın hastalar arasında ETBF saptanma oranı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,521). Bununla birlikte ETBF ortalama miktarları bakımından da kadın ve erkek hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,515).

Çalışmamızda KRK tanısı alan kadın ve erkek hastaların ve kontrol grubundaki kadın ve erkek bireylerin yaşları dikkate alınarak bunlar 40 - 49 yaş grubu, 50 - 74 yaş grubu ve ≥ 75 yaş grubu olmak üzere üç yaş grubunda toplanmıştır. Doku örneklerindeki *F. nucleatum* ve ETBF miktarları hasta kadınlarla sağlıklı kadınlar arasında ve hasta erkeklerle sağlıklı erkekler arasında yaş grupları bakımından kıyaslanmıştır.

Tablo 4.3. *F. nucleatum* ve ETBF miktarlarının (log₁₀ bakteri/25mg) hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Bakteriler	Yaş Grupları	Hasta grubu (kadın)		Kontrol grubu (kadın)		p*
		s	Ort \pm S.Hata	s	Ort \pm S.Hata	
<i>F.nucleatum</i>	40 - 49	3	4,32 \pm 2,162	4	4,90 \pm 1,636	0,212
	50 - 74	10	5,78 \pm 0,674	10	2,05 \pm 0,858	0,009
	≥ 75	4	4,83 \pm 1,610	1	6,54**	0,157
	Tüm yaşlar	17	5.30 \pm 0,624	15	3.11 \pm 0,800	0,250
ETBF	40 - 49	3	2,66 \pm 1,333	4	2,58 \pm 1,590	0,714
	50 - 74	10	4,19 \pm 0,268	10	1,45 \pm 0,604	0,005
	≥ 75	4	0,98 \pm 0,989	1	0,30 **	0,617
	Tüm yaşlar	17	3,17 \pm 0,466	15	1,66 \pm 0,576	0,044

*Mann-Whitney U Testi

** İlgili bölme ait yalnızca bir birey olduğundan standart hata hesaplanamadı.

F. nucleatum miktarı kadın hasta ve kontrollerde incelendiğinde:

40 - 49 yaş aralığında *F. nucleatum* miktarı bakımından, hasta kadınlar ile kontrol grubundaki kadınlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,212).

50 - 74 yaş aralığında *F. nucleatum* miktarı hasta kadınlarda kontrol grubundaki kadınlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. (p=0,009).

≥75 yaş aralığında *F. nucleatum* miktarı bakımından, hasta kadınlar ile kontrol grubundaki kadınlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,157).

Tüm yaş gruplarındaki toplam kadınlar değerlendirildiğinde hasta kadınlar ile kontrol grubundaki kadınlar arasında *F. nucleatum* miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,250).

ETBF miktarı kadın hasta ve kontrollerde incelendiğinde:

40 - 49 yaş aralığında hasta kadınlar ile kontrol grubundaki kadınlar arasında ETBF miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,714).

50 - 74 yaş aralığında ETBF miktarı hasta kadınlarda kontrol grubundaki kadınlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,005).

≥75 yaş aralığında hasta kadınlar ile kontrol grubundaki kadınlar arasında ETBF miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,617).

Tüm yaş gruplarındaki toplam kadınlar değerlendirildiğinde ETBF miktarı hasta kadınlarda, kontrol grubundaki kadınlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,044).

Tablo 4.4. *F. nucleatum* ve ETBF miktarlarının (log10bakteri/25mg) hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Bakteriler	Yaş Grupları	Hasta grubu (erkek)		Kontrol grubu (erkek)		p*
		s	Ort ± S.Hata	s	Ort ± S.Hata	
<i>F.nucleatum</i>	40 - 49	2	3,22 ± 3,227	5	3,91 ± 1,597	0,421
	50 - 74	13	2,45 ± 0,896	14	2,40 ± 0,895	0,911
	≥75	3	0,30 ± 0,30	1	6,53**	0,083
	Tüm yaşlar	18	2,13 ± 0,731	20	2,98 ± 0,758	0,246
ETBF	40 - 49	2	1,59 ± 1,598	5	2,69 ± 1,128	0,421
	50 - 74	13	2,51 ± 0,614	14	0,77 ± 0,420	0,047
	≥75	3	4,93 ± 0,815	1	0,30**	0,180
	Tüm yaşlar	18	2,81 ± 0,528	20	1,21 ± 0,437	0,054

*Mann-Whitney U Testi

** İlgili bölme ait yalnızca bir birey olduğundan standart sapma hesaplanamadı.

F. nucleatum miktarı erkek hasta ve kontrollerde incelendiğinde:

40 - 49 yaş aralığında yer alan hasta erkekler ile kontrol grubundaki erkekler arasında *F. nucleatum* miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,421).

50 - 74 yaş aralığında yer alan hasta erkekler ile kontrol grubundaki erkekler arasında *F. nucleatum* miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,911).

≥75 yaş aralığında yer alan hasta erkekler ile kontrol grubundaki erkekler arasında *F. nucleatum* miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,083).

Tüm yaş gruplarındaki toplam erkekler değerlendirildiğinde hasta erkekler ile kontrol grubundaki erkekler arasında *F. nucleatum* miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,246$).

ETBF miktarı erkek hasta ve kontrollerde incelendiğinde:

40 - 49 yaş aralığında yer alan hasta erkekler ile kontrol grubundaki erkekler arasında ETBF miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,421$).

50 - 74 yaş aralığında ETBF miktarı hasta erkeklerde, kontrol grubundaki erkeklere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,047$).

≥ 75 yaş aralığında yer alan ve ETBF varlığı saptanmış olan hasta erkekler ile kontrol grubundaki erkekler arasında ETBF miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,180$).

Tüm yaş gruplarındaki toplam erkekler değerlendirildiğinde hasta erkekler ile kontrol grubundaki erkekler arasında ETBF miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,054$).

Hasta ve kontrol gruplarında bulunan bireylere ait kolon biyopsi dokularıyla yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz veriler neticesinde:

50 - 74 yaş grubunda KRK'li kadınlarda hem *F. nucleatum* hem de ETBF miktarlarının kontrol grubundaki kadınlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (sırasıyla: $p=0.009$, $p= 0.005$). Aynı yaş grubunda KRK'li erkeklerde ETBF miktarlarının kontrol grubundaki erkeklere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu ($p=0,047$) ancak *F. nucleatum* miktarı bakımından erkek hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı belirlenmiştir ($p=0,083$).

Yaş gruplarına bakılmaksızın *F. nucleatum* miktarı bakımından KRK'li tüm kadın hastalarla, kadın kontroller arasında, ayrıca erkek hastalarla erkek kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla: $p=0,250$, $p=0,246$). ETBF miktarı ise KRK'li kadın hastalarda, kadın kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş ancak KRK'li erkek

hastalarla, erkek kontroller arasında ETBF miktarı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla: $p=0,044$, $p=0,054$).

KRK'li kadın hastalara ait dokularda *F. nucleatum* saptanma oranı ve miktarları erkek hastalara ait dokularda saptanmış olan oran ve miktara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla: $p=0,003$, $p=0,013$). ETBF saptanma oranı ve miktarı bakımından KRK'li kadın ve erkek hastalara ait dokular arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla: $p=0,521$, $p=0,515$).

Yaş grupları ve cinsiyete bakılmaksızın *F. nucleatum* saptanma oranı ve miktarı bakımından KRK'li hastalara ait dokularla, kontrollere ait dokular arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir (sırasıyla: $p=0,473$, $p=0,995$). Buna karşın ETBF saptanma oranı ve miktarı, KRK'li hastalara ait dokularda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla: $p=0,002$, $p=0,004$).

5. TARTIŞMA

KRK dünyada en sık tanı konulan kanserlerden biridir. KRK etiyojisine ilişkin yapılan çok sayıda çalışma olmasına karşın hala günümüzde etiyojisi tam olarak aydınlatılamamıştır[173,174]. Çevresel ve genetik faktörler başlıca risk faktörü olmakla beraber çok fazla miktar ve çeşitlilikte mikroorganizma barındıran kolon mikrobiyotasındaki değişikliklerin KRK etiyojisinde rol oynayabileceği düşünülmektedir[11-31]. Kolonda çok fazla miktar ve çeşitlilikte mikroorganizma bulunmaktadır. Yaşamın ilk yılları boyunca mikrobiyotanın içeriği ve miktarında çevresel faktörler ile şekillenen hızla değişiklikler olmaktadır[175,176,177]. Bağırsak mikrobiyotasında baskın olarak *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, ve *Atopobium* gibi anaeroplara ve az miktarda *Enterococ*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*, ve *Streptococcus* gibi fakültatif anaeroplara bulunmaktadır. Mikrobiyota aynı zamanda kısa zincirli yağ asitlerinin üretimi ve anaerobik karbonhidratların fermentasyonunu gerçekleştirir. Bütirat, propiyonat ve asetat gibi kısa zincirli yağ asitleri bağırsakta enerji kaynağı olarak kullanılır ve ayrıca epitel proliferasyonu ve differasyonuna yardımcı olmaktadır[178,179].

Disbiyozis, bağırsak mikrobiyotasının fonksiyon ve yapısal özelliklerindeki dengesizlik olarak ifade edilmektedir. Son yıllarda inflamatuvar bağırsak hastalığı, obezite, kolit ve KRK'in disbiyozis ile ilişkili olabileceği üzerinde durulurken özellikle KRK'lerde disbiyozisin prekanseröz mekanizmalara neden olabileceği gösterilmiştir[180-184]. Bağırsak mikrobiyotasının, DNA hasarına neden olan reaktif oksijen ara maddeleri gibi ikincil metabolizma ürünlerinin yoluyla veya genotoksin üretimi yoluyla hücre dönüşümü üzerinde doğrudan etki ile kolorektal karsinogeneizde rol oynadığı ayrıca, bağırsak mikrobiyotasındaki değişimlerin inflamatuvar yolları tetikleyerek, inflamatuvar ajanların salınımını arttırması

sonucu normal epitel hücrelerinin prekanseröz hücrelere dönüşmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir[148]. Birçok çalışmada, farklı bakteri türlerinin KRK'in patogenezi ile ilişkisi araştırılmış, *Clostridium septicum*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Bacteroides fragilis*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* ve *Fusobacterium* spp.'nin KRK patogenezinde rol oynayabileceğine değinilmiştir[12,145,185,186,187]. KRK'li hastalarla yapılan çalışmalarda kolon mikrobiyotasında *Ruminococcus bromii*, *Clostridium clostridioforme* ve *Bifidobacterium longum* prevelansının düşük olduğu, *Bacteroides / Prevotella* oranı ve *Fusobacterium nucleatum* popülasyonunun önemli derecede arttığı belirtilmiştir[147].

KRK ile *F. nucleatum* ve ETBF'in ilişkili olabileceğini gösteren araştırmalar *F. nucleatum* için 2013, ETBF için 2009 yılından itibaren bilimsel kaynaklarda yer almaya başlamıştır. *F. nucleatum*'un KRK etiolojisinde rol alıp almadığını araştıran yayınların büyük bölümünün Amerika Birleşik Devletleri'nden yapılmış çalışmalar olduğu[13,23,152,185,188,189,190], bunu Japonya'dan yapılan araştırmaların izlediği görülmüştür[19,152,190,192]. Asya ülkelerinden, Çin[25,193] ve Hindistan'dan[194] da bu konuda çalışmalara rastlanmaktadır. Ortadoğu bölgesinden İran[151], ve İsrail'den[188,189,195] de bu bakterilerin KRK etiolojisindeki rollerine değinen veriler kaynaklarda yer almaktadır.

Ülkemizde ise KRK'li hastaların barsak mikrobiyotasında veya tümör dokusunda *F. nucleatum*'un miktarını araştırarak bu bakterinin KRK etiolojisindeki rolünü belirlemeyi hedefleyen bir araştırma henüz bulunmamaktadır.

ETBF nin KRK etiolojisindeki rolünü araştıran ise daha sınırlıdır. Amerika'da 2014 yılında Boleij A ve ark.[5] tarafından, 2009 ve 2014 yıllarında Cynthia LS ve ark.[196,197] tarafından, 2016 yılında Fathi ve Wu tarafından[198], 2015 yılında Viljoen KS ve ark.[199] tarafından yapılan çalışmalar mevcuttur. Yeni Zelanda'dan 2016 yılında Keenan JI ve ark.[200] ve 2017 yılında Purcell RV ve ark.[201] tarafından yapılan iki çalışma mevcuttur. Rusya'da 2016 yılında Snezhkina AV ve ark.[159] tarafından yapılan bir çalışma mevcuttur. Zamani S ve ark.[202] tarafından İtalya ve

İran'dan ortak 2019 yılında yapılan bir çalışma vardır. Bu yayınlarda ETBF'in KRK etiolojisinde rolü olup olmadığına değinmişlerdir.

Ülkemizde ise Toprak NU ve ark, 73 KRK'li birey ve 59 sağlıklı birey ile yaptıkları çalışmada fekal mikrobiyotada *B. fragilis* ve bft geninin varlığını saptayarak *B. fragilis*'in KRK etiolojisindeki rolünü araştırmışlardır[7]. Bu çalışmanın bizim çalışmamızdan en büyük farkı biyopsi dokusu yerine çalışmanın gaita örnekleri ile yapılmış olması ve *B. fragilis* ya da ETBF miktarına bakılmamış olmasıdır.

KRK etiolojisinde *F. nucleatum* ve *B. fragilis*'in rolünü araştıran makaleler incelendiğinde bunlardan bir bölümünün KRK'li hastaların tümör dokusu ile sağlıklı dokusu arasında bu bakterilerin miktarlarındaki farklılıkları gösteren çalışmalar olduğu[5,25,191,201,202] diğer bir bölümünün ise KRK'li hastaların fekal mikrobiyotası ve sağlıklı kişilerin fekal mikrobiyotası arasında bu bakterilerin miktarındaki değişimleri araştıran çalışmalar olduğu görülmektedir[5,7,201,203]. Viljoen KS ve ark.[199] 2015 yılında yaptıkları çalışmada KRK'li dokularda ETBF ile *F. nucleatum* miktarlarını sağlıklı dokudaki miktarlarla kıyaslamışlar ve başka hiçbir parametreye değinmeden, miktar farklılıklarını belirleyerek bu bakterilerin KRK etiolojisinde rol oynayabileceğini belirtmişlerdir. Bu araştırmalar dışında sınırlı sayıda *F. nucleatum* ve ETBF'in spesifik gen bölgelerini ve konağın immüniteden sorumlu hücre ve moleküllerini araştırarak bu bakterilerin KRK etiolojisindeki rolünü belirlemeye çalışan araştırmalar da mevcuttur[159,195].

Biz de yukarıda belirttiğimiz kaynaklarla uyumlu olarak araştırmamızda KRK'li hastaların tümör dokusu ile sağlıklı kişilerin dokularında bu bakterilerin miktarını kantitatif olarak kıyaslayarak gruplar arasında bir farklılık olup olmadığını saptamaya yönelik bir pilot çalışma gerçekleştirdik.

F. nucleatum ve ETBF'in KRK etiolojisindeki rolüne değinen araştırmalarda kullanılan örneklerin formalinle tespit edilmiş ve parafin emdirilmiş (FFPE) dokular, frozen dokuları, genomik DNA veya gayta olduğu görülmektedir[204]. Bunun yanı sıra, dokularla yapılmış çalışmalarda ağırlıkla KRK'li tümör dokusunda bulunan *F. nucleatum* ve ETBF miktarının aynı bağırsakta morfolojik olarak sağlıklı görünen dokudaki miktarlarla kıyaslandığı saptanmıştır[5,13,25,152,159,199]. Buna karşın

çalışmaya dahil edilecek örnek türü olarak KRK'li hastaların bağırsak tümör dokusu ile sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubuna ait bağırsak dokularını kullanan ve bu olgu kontrol grupları arasında *F. nucleatum* ve ETBF miktarlarını kıyaslayarak KRK etiolojisinde bu bakterilerin rolünü belirten çalışmalar da bulunmaktadır[205]. Çalışma yöntemi olarak aynı bireyin kolonundan alınan tümör dokusu ve sağlıklı dokusu ile yapılmış çalışmaların mı yoksa bizim çalışmamızdaki gibi farklı bireylerden oluşan olgu ve kontrol grupları ile yapılmış çalışmaların mı daha iyi sonuç verdiği konusunda kesin bir görüş henüz bulunmamaktadır. Bundgaard-Nielsen ve ark.[205] 2019 yılında Danimarka'da yaptıkları araştırmada tümör dokusu ile bitişik sağlıklı doku alınarak yapılan araştırmalarda bazı çakışmalar yaşanabileceğini öne sürmüşlerdir.

2019 yılında Zamani S ve ark.[202] İtalya ve İran'la yapılmış çok merkezli bir çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi prekanseröz ve kanseröz dokulardaki ETBF miktarını sağlıklı kişilerin dokularındaki miktarla kıyaslayarak bu bakterinin KRK etiolojisindeki rolü olup olmadığını belirlemeye çalışmışlardır. Benzer şekilde, Flemer B ve ark.[20] 2019 yılında 59 hasta ve 56 kontrole ait bağırsak biyopsi dokuları ile çalışarak KRKde mikrobiyotayı saptamaya çalışmışlardır. 2014 yılında Boleij A ve ark.[5] 49 KRK'li hasta ve 49 sağlıklı bireyin bağırsak mukoza biyopsisi ile çalışarak ETBF varlığını bft genini saptayarak araştırmışlar yine aynı yılda İspanya'da Mira-Pascual ve ark.[29] 11 prekanseröz lezyondan alınan biyopsi örneği, 7 KRK'li dokudan alınan biyopsi örneği ve 10 sağlıklı bireyden alınan biyopsi örneğinde *F. nucleatum* miktarını kantitatif olarak kıyaslayarak bu bakterinin KRK etiolojisinde rolü olup olmadığını belirlemeye çalışmışlardır.

Biz de araştırmamızda hasta ve kontrol grubu oluşturarak her iki gruptan aldığımız biyopsi örnekleriyle araştırmamızı gerçekleştirdik.

F. nucleatum ve ETBF'in miktarını olgu kontrol grupları arasında kıyaslayarak bu bakterilerin KRK etiolojisindeki yerine değinen araştırmaların bir kısmında çalışmaya dahil edilen birey sayısının bizim çalışmamızdakinden daha yüksek diğer bir kısmında ise birey sayısının çalışmamızdakine yakın ya da daha düşük olduğu dikkatimizi çekmiştir. Çalışmalarda elde edilen verilerin değeri kullanılan örnek

genişliği ile ilişkilidir ancak kullanılan kitlerin yüksek maliyeti, örnek teminindeki zorluklar, değişen çevre koşulları her zaman arzu edilen örnek genişliği ile çalışmanın gerçekteşmesine olanak vermemektedir. Fukugaiti M ve ark.[1] 2015 yılında Brezilya'da yaptıkları bir çalışmada hasta grubunu oluşturan 7 KRK'li bireye ve kontrol grubunu oluşturan 10 sağlıklı bireye ait gayta örneği ile *F. nucleatum* ve *C. difficile*'nin KRK etiyojisindeki rolünü belirlemeye çalışmışlardır. Güney Afrika'da KRK ile ilişkili olabilecek bakterilerin miktarını saptamaya yönelik bir araştırmayı 55 KRK'li bireye ait tümörlü doku ve 55 sağlam doku ile [199], 2016 yılında benzer bir çalışmayı, Yeni Zelanda'da Keenan JI ve ark.[200] 71 KRK'li hasta ve 71 sağlıklı birey ile gerçekteştirilmişlerdir. Haghi F. ve ark.[203] 2019 yılında İran'da yaptıkları çalışmada 30'u kadın, 30'u erkek 60 KRK'li hasta ve 30'u kadın, 30'u erkek 60 sağlıklı birey ile ETBF'in KRK etiyojisindeki rolünü araştırmışlardır. Zamani S ve ark.[202] 2019 yılında yaptıkları çok merkezli bir çalışmada 68 KRK hasta ve 52 sağlıklı bireye ait bağırsak mukoza biyopsi örneği ile ETBF'in KRK etiyojisindeki rolünü araştırmışlardır. Saptayabildiğimiz kadarıyla çok düşük sayıda bireyden oluşan olgu kontrol grubuyla yapılmış çalışmalar yanı sıra 150'şer kişilik olgu kontrol gruplarından oluşmuş kapsamlı çalışmaları da bulunmaktadır. Bu çalışmaları bizim çalışmamızdaki olgu ve kontrol gruplarımızdaki birey sayısını kıyasladığımızda sayımızın ideal olmadığı ancak bazı kaynaklardaki sayılarla uyum gösterdiği kanaatindeyiz.

KRK'lerin etiyojisinde birçok faktör rol oynamaktadır. Yaş, erkek cinsiyet, obezite ve beslenme şeklinin en önde gelen faktörler olduğu belirtilmektedir. Bunun yanı sıra genetik yapı, çevresel faktörler ve inflamatuvar özelliklerin de KRK için risk teşkil ettiği belirtilmiştir[42,43,44,45].

KRK'de risk faktörlerini belirlemek hedef popülasyonları oluşturarak tarama ve takip programları planlama bakımından önem arz etmektedir. KRK için yaşın önemli bir risk faktörü olduğu; özellikle KRK'lerin görölme oranının 50 yaşından sonra önemli derecede arttığı çalışmaları belirtilmektedir [46,47]. CDC, KRK taramasının 50 ile 75 arasında yapılması gerektiğine ancak 1. derece yakınlarında kolon kanseri bulunan kişilerin 40 yaşından itibaren KRK yönünden taraması gerektiğine işaret etmektedir[171]. Yine CDC 75 - 85 yaş arası kişilerin rutin tarama

yerine ancak hekimlerinin istediği zaman kolon kanseri yönünden araştırılmasını önermiştir[172]. Biz de çalışmamızda hasta ve kontrol grubumuzu oluşturan kişilerin yaşlarını gruplarken CDC'nin yaş önerisini göz önünde bulundurduk ve olgu gruplarımızdaki biyopsi örneklerini topladıktan sonra hastaların kayıtlarında yer alan yaş bilgisine göre hastaları 40 - 49, 50 - 74 ve ≥ 75 olmak üzere 3 yaş grubunda topladık. Daha sonra kontrol grubumuzu da aynı yaş aralıklarında bulunan benzer sayıdaki bireylerle oluşturduk.

F. nucleatum ve ETBF'in KRK etiolojisindeki yerine değinen araştırmalar incelendiğinde genelde çalışmaların olgu ve kontrol gruplarında erkek ve kadın bireylerin yer aldığı ve bunların sayılarının da birbirine çok yakın veya eşit tutulduğu görülmektedir. Li YY ve ark.'nın[25] 2016 yılında Çin'de yaptıkları çalışmada 46'sı kadın, 55'i erkek; 101 birey ile *F. nucleatum*'un KRK etiolojisinde rol alıp almadığını araştırmışlardır.

Haghi F. ve ark.[203] 2019 yılında İran'da yaptıkları çalışmada 30'u kadın, 30'u erkek 60 KRK'li hasta ve 30'u kadın, 30'u erkek 60 sağlıklı birey ile ETBF'in KRK etiolojisinde rol alıp almadığını araştırmışlardır.

Biz de çalışmamızı 18'i erkek, 17'si kadın 35 KRK'li hasta ve 20'si erkek, 15'i kadın olmak üzere 35 sağlıklı birey ile gerçekleştirdik.

Yapılan çalışmalarda KRK'li hastalara ve kontrollere ait örneklerde *F. nucleatum* ve ETBF miktarını saptamak için farklı yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemler kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR), fluoresan in-situ hibridizasyon (FISH), damlacık dijital polimeraz zincir reaksiyonu (ddPCR), fluoresan kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (FQ-PCR) olarak sayılabilir. 2016 yılında Çin de Li YY ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 101 KRK'li frozen dokuda bakterilerin miktarı FQ-PCR ve qPCR yöntemleri ile saptanmıştır.[25]. 2015 yılında Amerika'da Mima K ve ark.[23] tarafından yapılan çalışmada ise 598 KRK'li FFPE (formalinle tespit edilmiş ve parafin emdirilmiş) doku örneğinde bakteriler qPCR yöntemi ile belirlenmiştir. 2014 yılında Amerika ve Japonya'nın dahil olduğu Tahara T ve ark. tarafından yapılan çok merkezli bir çalışmada 149 KRK li primer doku örneğinden qPCR ile elde edilen genomik DNA' lar çalışmaya dahil edilmiştir[152]. Çok sayıda

çalışmada yer alan qPCR metodunu, biz de çalışmamızda *F. nucleatum* ve ETBF miktarını belirlemede kullandık.

F. nucleatum'un KRK etiolojisinde rol alıp almadığını araştıran makaleler incelendiğinde bu bakterinin hemen hemen hepsinde KRK'li doku örneklerinde veya KRK'li bireylerin gaitasında anlamlı derecede yüksek bulunduğu saptanmıştır. Ülkemizde KRK'li hastaların kolon biyopsi örneklerinde ya da gaita örneklerinde *F. nucleatum* miktarını araştıran bir olgu kontrol çalışması henüz bulunmadığından elde ettiğimiz sonuçları yalnızca yurt dışı yayınlara ait verilerle kıyaslama imkanı bulduk. 2015 yılında Mima K ve ark.[23] Amerika'da 598 KRK'li doku örneği ve 558 bitişik sağlam doku örneği ile yaptıkları çalışmada *F. nucleatum*'un KRK'li dokularda bitişik sağlam dokuya göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğunu belirlemişlerdir. 2015 yılında İto M ve ark. [190] 296 prekanseröz lezyonlu ve 225 KRK'li olguyla yaptıkları çalışmada *F. nucleatum* miktarının KRK'li dokularda, prekanseröz lezyonlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğunu belirlemişlerdir. 2016 yılında Suehiro Y ve ark.[19] Japonya'da 60 sağlıklı birey, 11 erken evre adenom,19 geç dönem adenom/karsinoma insitu ve 158 KRK'li bireyin gaitasında *F. nucleatum*'un istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda ise *F. nucleatum* miktarı bakımından KRK'li hastalara ait dokularla, kontrollere ait dokular arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir ($p=0,995$). Hasta ve kontrol grubumuzu oluşturan bireylere ait dokuların en fazla olduğu 50 - 74 yaş grubunu cinsiyet yönünden incelediğimizde , KRK'li kadınlarda *F. nucleatum* miktarlarının kontrol grubundaki kadınlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($p=0,009$). Aynı yaş grubunda *F. nucleatum* miktarı bakımından erkek hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı belirlenmiştir ($p=0,083$). Bizim bulgularımıza benzer şekilde Danimarka'da 2019 yılında Bundgaard-Nielsen C. ve ark.[205] yaptıkları çalışmada 99 KRK'li doku, 99 sağlam doku, 96 adenomlu doku ve 104 divertikülden alınan örneklerde *B. fragilis* ile *F.nucleatum* miktarının adenomlarda KRK'li doku ve divertiküllere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğunu *F. nucleatum*'un ise KRK'li dokularda bitişik

sağlam dokuya göre istatistiksel olarak anlamlı derece fark göstermediğini saptamışlardır. *S. galloyticus*'u ise tümör, adenom ya da divertikül dokusunda bulamadıklarını belirtmişlerdir. Bunun yanı sıra KRK'li doku örneklerini bitişik sağlam doku ile karşılaştırdıklarında iki doku arasındaki mikrobiyal dağılımda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır. Bu nedenle KRK etiolojisinde rol alabilecek mikroorganizmaları araştırırken bitişik sağlam doku kullanmanın hatalı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Çalışmamızda yaş ve cinsiyete bakılmaksızın KRK'li dokularda saptadığımız *F. nucleatum* miktarının, sağlam dokulara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fark göstermemesi bu bakterinin kolorektal mukozaya kolonizasyonundaki yatkınlığında ortaya çıkabilecek etnik farklılıklardan, bulunduğumuz coğrafik bölgeden, beslenme alışkanlıklarımızdaki farklılıklardan kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. Benzer bakış açısı Viljoen KS ve ark.[199]'nın yaptıkları çalışmada da belirtilmiştir. Çalışmamızda *F. nucleatum*, KRK'li kadın hastalara ait dokuların %82,4'ünde ve erkek hastalara ait dokuların %33,3'ünde saptanmıştır. KRK'li kadın hastalara ait dokularda bu bakterinin bulunma oranının erkek hastalara ait dokulara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($p=0.003$). KRK'li kadın hastalara ait dokularda *F. nucleatum* saptanma miktarları da erkek hastalara ait dokularda saptanmış olan miktarlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,013$). İto ve M ark.[190] yaptıkları çalışmada bizim çalışmamıza benzer şekilde *F. nucleatum*'un KRK'li dokularda ve sağlıklı dokulardaki miktarını cinsiyet yönünden kıyaslamışlar ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulamamışlardır. Viljoen KS ve ark.[199] ise yaptıkları çalışmada *F. nucleatum*'un KRK'li dokularda bulunma miktarını erkeklerde kadınlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Her ne kadar bizim elde ettiğimiz sonuçları destekleyen yayınlar bulunsa da sonuçlarımızı desteklemeyen karşıt verilerin de bulunduğu görülmektedir. Bu farklılıkların çalışmalara dahil edilen kadın ve erkeklerin sayısındaki farklardan, çalışmaların yapıldığı coğrafik bölgelerden ve değişik beslenme alışkanlıklarından kaynaklanmış olabileceği kanaatindeyiz.

ETBF'in KRK etiolojisindeki rolünü araştıran çalışmalar incelendiğinde bu bakterinin miktar bakımından, KRK'li doku örneğinde veya KRK'li bireylerin

gaitasında kontrol gruplarındakine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirtilmiştir. 2015 yılında Boleij A ve ark.[5] 49 kolorektal neoplazili hasta ve 49 sağlıklı bireye ait doku örneği ile yaptıkları çalışmada KRK'li doku ve bitişik sağlam dokuyu ETBF miktarı bakımından karşılaştırdıklarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadıklarını, kontrol grubu bireyelerine ait doku örneklerini geç evre KRK doku örnekleri ile karşılaştırdıklarında ise ETBF nin geç evre KRK'li dokularda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğunu belirlemişlerdir. 2016 yılında Keenan JI ve ark.[200] 71 KRK'li hastaya ve 71 sağlıklı bireye ait gaita ile çalışmışlar ETBF miktarını KRK'li bireyelerin gaitasında istatistiksel olarak anlamlı derece yüksek bulmuşlardır. Toprak NU ve ark.[7] ise 73 KRK'li hasta ve 59 sağlıklı bireyle yaptıkları çalışmada, hastaların % 38'inde kontrollerin ise %12'sinde bft geni varlığını saptayarak hastalardaki oranın kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğunu belirtmişlerdir. 2019 yılında Haghi F ve ark.[203] 60 KRK'li hastaya ve 60 sağlıklı bireye ait gaita ile yaptıkları çalışmada KRK'li hastalarda sağlıklı bireylere göre ETBF miktarını istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. 2020 yılında Zamani S ve ark.[202] 68 kolorektal prekanseröz veya kanseröz lezyondan ve 52 sağlıklı bireyden alınan doku biyopsisinde ETBF miktarının kanseröz lezyonlarda artmış olduğunu saptamışlar, prekanseröz lezyonlar ile KRK'li doku arasında ise ETBF miktarı yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır. Bizim çalışmamızda ETBF varlığı 35 hastanın 25 (%71,4)'inde, kontrol grubunda ise 35 bireyin 12 (%34,3)'sinde saptanmıştır. Hem ETBF saptanma oranı, hem de ETBF miktarı, KRK'li hastalara ait dokularda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla: $p=0,002$, $p=0,004$). Bu sonucumuz, KRK'li hastaların kanseröz lezyonlarında ETBF miktarının sağlıklı dokuya göre artmış olduğunu belirten çalışmalarla uyum göstermiştir.

Hasta ve kontrol grubumuzu oluşturan bireylere ait dokuların en fazla olduğu 50 - 74 yaş grubunu incelediğimizde bu yaş grubundaki KRK'li kadınlarda saptanan ETBF miktarlarının kontrol grubundaki kadınlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($p=0,005$). Benzer şekilde KRK'li erkeklerde saptanan ETBF miktarlarının da kontrol grubundaki erkeklere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($p=0,047$). ETBF saptanma oranı ve

ETBF miktarı bakımından KRK'li kadın ve erkek hastalara ait dokular arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla: $p=0,521$, $p=0,515$).

KRK'li hastaların bağırsak mikrobiyotasında veya bağırsak dokularında ETBF miktarını belirleyerek kontrol gruplarındaki miktarlarla karşılaştıran çalışmalarda kadın ve erkek olgu kontrol grupları kullanıldığı halde sonuçlarda cinsiyet yönünden değerlendirmeye gitmiş olan bir makaleye rastlayamadık.

Birçok araştırmada bildirildiği gibi bu tez çalışmamızın da bazı limitasyonları bulunmaktadır. Olgu ve kontrol gruplarımızı oluşturan birey sayısının az olması, hastalara ait kanser oluşumunu etkileyecek çevresel faktörlerden ve beslenme alışkanlıklarından haberdar olmamamız bu limitasyonlar arasındadır.

6. SONUÇ

Çalışmamız kapsamında yaş ve cinsiyet dikkate alınmadığında *F. nucleatum* 35 hastanın 20 (%57,1)'sinde, kontrol grubunda ise 35 bireyin 17 (%48,6)'sinde saptanmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasında *F. nucleatum'un* saptanma oranı ve miktarı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla: $p=0,473$, $p=0,995$).

Çalışmamız kapsamına giren hasta ve kontrollerin bulunduğu yaş aralığı dikkate alınmadığında KRK'li tüm kadın hastalarla, kadın kontroller arasında ve tüm erkek hastalarla erkek kontroller arasında *F. nucleatum* miktarı bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (sırasıyla: $p=0,250$, $p=0,246$). CDC'nin KRK yönünden rutin tarama yaşı olarak önerdiği 50 - 74 yaş aralığında ise durum değişmekte, KRK'li kadınlarda *F. nucleatum* miktarlarının kontrol grubundaki kadınlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu ancak erkek hasta ve kontrol grupları arasında bu yaş aralığında *F. nucleatum* miktarı bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı belirlenmiştir (sırasıyla: $p=0,009$, $p=0,083$). Hasta kadın ve hasta erkekler arasında karşılaştırma yapıldığında KRK'li kadın hastalara ait dokularda *F. nucleatum* saptanma oranı ve miktarlarının erkek hastalara ait dokulara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş olması da (sırasıyla: $p=0,003$, $p=0,013$) dikkatimizi çekmiş ve bu sonuçlar bize *F. nucleatum'un*, özellikle 50 - 74 yaş aralığındaki kadınlarda, KRK etiolojisinde rol oynayan bir bakteri olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamız kapsamında yaş ve cinsiyet dikkate alınmadığında ETBF varlığını 35 hastanın 25 (%71,4)'inde, kontrol grubunda ise 35 bireyin 12 (%34,3)'sinde saptadık. ETBF saptanma oranını ve ETBF miktarını hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulduk ($p=0,002$, $p=0,004$).

Çalışmamız kapsamına giren hasta ve kontrollerin bulunduğu yaş aralığı dikkate alınmadığında ETBF miktarı KRK'li kadın hastalarda, kadın kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş ancak KRK'li erkek hastalarla, erkek kontroller arasında ETBF miktarı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla: $p=0,044$, $p=0,054$). 50 - 74 yaş aralığında ise durum değişmiş KRK'li hem kadınlarda hem de erkeklerde ETBF miktarlarının kontrol grubundakilere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (sırasıyla: $p=0,005$, $p=0,047$). Hasta kadın ve hasta erkekler arasında ETBF saptanma oranı ve miktarı KRK'li kadın ve erkek hastalara ait dokular arasında karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla $p=0,521$, $p=0,515$). Bu sonuçlar bize özellikle 50 - 74 yaş aralığında ETBF'in hem kadınlarda hem de erkeklerde KRK etiolojisinde rol oynayan bir bakteri olabileceğini düşündürmüştür.

Ülkemizde ilk defa yapılan bu pilot çalışma ile elde ettiğimiz sonuçların ileride daha geniş olgu kontrol gruplarıyla yapılacak çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. H.Fukugaiti M, Ignacio A, R. Fernandes M, Ribeiro Júnior U, Nakano V, J. Avila-Campos M. High occurrence of *Fusobacterium nucleatum* and *Clostridium difficile* in the intestinal microbiota of colorectal carcinoma patients. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2015;46(4):1135-1140.
2. Manuel A, Machado D, Figueiredo C, Seruca R, Juel L. Helicobacter pylori infection generates genetic instability in gastric cells. *Biochim Biophys Acta*. Elsevier B.V. 2015;10(3):1-21.
3. McCoy WC, Mason JM 3rd. Enterococcal endocarditis associated with carcinoma of the sigmoid; report of a case. *Journal Med Assoc State Alabama*. 1951;21(6):162-6.
4. Warren L, Freeman JD, Dreolini L, Castellarin M, Krzywinski M, Strauss J, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res*. 2012;22(2):299–306.
5. Boleij A, van Gelder MMHJ, Swinkels DW, Tjalsma H. Clinical Importance of *Streptococcus gallolyticus* infection among colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2011;53(9):870–8.
6. Balamurugan R, Rajendiran E, George S, Samuel GV, Ramakrishna BS. Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate-producing bacteria, *Desulfovibrio* and *Enterococcus faecalis* in the feces of patients with colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23(8):1298–303.
7. Toprak NU, Yagci A, Gulluoglu BM, Akin ML, Demirkalem P, Celenk T, et al. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(8):782- 6.

8. Sears CL, Islam S, Saha A, Arjumand M, Alam NH, Faraque AS, et al. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection with inflammatory diarrhea. Clin Infect Dis. 2008;47(6):797-803.
9. Sack RB, Myers LL, Almeida-Hill J, Shoop DS, Bradbury WC, Reid R, et al. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: epidemiologic studies of its role as a human diarrhoeal pathogen. J Diarrhoeal Dis Res. 1992;10(1):4-9.
10. Myers LL, Shoop DS, Firehammer BD, Border MM. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with diarrheal disease in calves. J Infect Dis. 1985;152(6):1344-7.
11. Allen-Vercoe E, Strauss J, Chadee K. *Fusobacterium nucleatum*: an emerging gut pathogen? Gut Microbes. 2011;2(5):294–298.
12. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. Genome Res. 2012;22(2):299–306.
13. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. Genome Res. 2012;22(2):292–298.
14. Warren RL, Freeman DJ, Pleasance S, Watson P, Moore RA, Cochrane K, et al. Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas. Microbiome. 2013;1(1):16.
15. Flanagan L, Schmid J, Ebert M, Soucek P, Kunicka T, Liska V, et al. *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;33(8):1381–1390.
16. Sinha R, Ahn J, Sampson JN, Shi J, Yu G, Xiong X, et al. Fecal Microbiota, Fecal Metabolome, and Colorectal Cancer Interrelations. PLoS One. 2016;11:e0152126.
17. Wong SH, Kwong TNY, Chow TC, Luk AKC, Dai RZW, Nakatsu G, et al. Quantitation of faecal *Fusobacterium* improves faecal immunochemical test in detecting advanced colorectal neoplasia. Gut. 2017;66(8):1441-8.

18. Liang Q, Chiu J, Chen Y, Huang Y, Higashimori A, Fang J, et al. Fecal Bacteria Act as Novel Biomarkers for Noninvasive Diagnosis of Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(8):2061-70.
19. Suehiro Y, Sakai K, Nishioka M, Hashimoto S, Takami T, Higaki S, et al. Highly sensitive stool DNA testing of *Fusobacterium nucleatum* as a marker for detection of colorectal tumours in a Japanese population. *Ann Clin Biochem.* 2017;54(1):86-91.
20. Flemer B, Lynch DB, Brown JM, Jeffery IB, Ryan FJ, Claesson MJ, et al. Tumour-associated and non-tumour-associated microbiota in colorectal cancer. *Gut.* 2017;66(4):633-43.
21. Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, et al. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One.* 2011;6:e16393.
22. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, et al. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(22):14428-33.
23. Mima K, Cao Y, Chan AT, Qian ZR, Nowak JA, Masugi Y, et al. *Fusobacterium nucleatum* in Colorectal Carcinoma Tissue According to Tumor Location. *Clin Transl Gastroenterol.* 2016;7:e200.
24. Wei Z, Cao S, Liu S, Yao Z, Sun T, Li Y, et al. Could gut microbiota serve as prognostic biomarker associated with colorectal cancer patients' survival? A pilot study on relevant mechanism. *Oncotarget.* 2016;7(29):46158-72.
25. Li YY, Ge QX, Cao J, Zhou YJ, Du YL, Shen B, et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* infection with colorectal cancer in Chinese patients. *World J Gastroenterol.* 2016;22(11):3227-33.
26. Zhou Y, He H, Xu H, Li Y, Li Z, Du Y, et al. Association of oncogenic bacteria with colorectal cancer in South China. *Oncotarget.* 2016;7(49):80794-802.
27. Burns MB, Lynch J, Starr TK, Knights D, Blekhman R. Virulence genes are a signature of the microbiome in the colorectal tumor microenvironment. *Genome Med.* 2015;7(1):55.

28. Gao Z, Guo B, Gao R, Zhu Q, Qin H. Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Front Microbiol.* 2015;6(2):20.
29. Mira-Pascual L, Cabrera-Rubio R, Ocon S, Costales P, Parra A, Suarez A, et al. Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *J Gastroenterol.* 2015;50(2):167-79.
30. Wang EL, Qian ZR, Nakasono M, Tanahashi T, Yoshimoto K, Bando Y, et al. High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2010;102(5):908-15.
31. Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, Peters WH, Roelofs R, Boleij A, et al. Towards the human colorectal cancer microbiome. *PLoS One.* 2011;6:e20447.
32. Newton CA. An overview of the large intestine: anatomy, physiology and normal function. *Nursing.* 1987;3(21):770-2.
33. Skandalakis JE. Skandalakis Cerrahi Anatomi Modern Cerrahinin Embriyolojik ve Anatomik Temelleri. A. B, editör;2008.
34. Snell RS. Clinical anatomy: an illustrated review with questions and explanations: Lippincott Williams & Wilkins;2004.
35. Rothenberger K. Colon, Rectum, and Anus. In: Brunicaardi F, Andersen D, Billiar T, Dunn D, Hunter J, Matthews J, et al. editors. *Schwartz's Principles of Surgery.* 10 ed;2015. p. 1175-1222
36. Najjia N. Mahmoud JISB, Cary B. Aarons E, et al. Colon and Rectum. In: Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL, editors. *Sabiston Textbook of Surgery* 20 ed: Elsevier Health Sciences;2016. p. 1312-1393.
37. Monsen H. Anatomy of colon. In: Nyhus ML, Baker RJ, editors. *Mastery of 63 Surgery.* Boston: Little Brown and Company;1997. p. 896-898.
38. Skandalakis JE, Skandalakis PN, Skandalakis LJ. Genel Anatomi. İç: Skandalakis JE editör. *Cerrahi Anatomi ve Teknik.* 2. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi;2000. s. 464-468.
39. J. R. In *Ackerman's Surgical Pathology.* 8 ed. J. R, St. Louis, editors;1996.
40. Göçer EMÇ, Ergin F, Küçükçetin A. Sindirim Sistemi Modellerinde Probiyotik Mikroorganizmaların Canlılığı. *Akademik Gıda.* 2016;14(2):158-165.

41. Hall, J.E, Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book. Elsevier Health Sciences;2015.
42. Burn J, Bishop DT, Mecklin JP, Macrae F, Möslein G, Olschwang S. Effect of aspirin or resistant starch on colorectal neoplasia in the Lynch syndrome. *N Engl J Med*. 2008;359(24):2567-78.
43. Meyerhardt JA, Niedzwiecki D, Hollis D, Saltz LB, Hu FB, Mayer RJ. Association of dietary patterns with cancer recurrence and survival in patients with stage III colon cancer. *JAMA*. 2007;298(7):754-64.
44. Aune D, Chan DSM, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ*. 2011;343:d6617.
45. Pala V, Sieri S, Berrino F, Vineis P, Sacerdote C, Palli D. Yogurt consumption and risk of colorectal cancer in the Italian European prospective investigation into cancer and nutrition cohort. *Int J Cancer*. 2011;129(11):2712-9.
46. Itzkowitz SH, Rochester J. Colonic Polyps and Polyposis Syndromes. In: Feldman M, Fiedman LS, Brandt LJ (Eds.) *Gastrointestinal and Liver Disease*. 8th Ed. 2713-2757, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2006.
47. Fry RD, Mahmoud N, Maron DJ, Bleier IS. Colon and Rectum. In: Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL (Eds.) *Sabiston Textbook of Surgery*. 19th Ed.1302, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2012.
48. 2013 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri. [İnternet] 2013 [Erişim Tarihi 21 Nisan 2020]
https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/ANA_rapor_2013v01_2.pdf .
49. Robbins and Cotran Kumar. *Pathologic Basis of Disease*. Sixth Edition; 1997 p.831-835.
50. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1998;319(9):525-532.
51. Rex DK, Johnson DA, Lieberman DA, Burt RW, Sonnenberg A. Colorectal cancer prevention 2000: Screening recommendations of the American Collage of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(4):868-877.

52. Compton CC, Carolyn C. Colorectal carcinomas: diagnostic, prognostic and molecular features. *Mod Pathol.* 2003;16(4):376-388.
53. Rembacken BJ, Fujii T, Cairns A, Dixon MF, Yoshida S, Chalmers DM. Flat and depressed colonic neoplasms: a prospective study of 1000 colonoscopies in the UK. *Lancet.* 2000;355(9211):1211-4.
54. Winawer SJ, Zauber AG, Fletcher RH, Stillman JS, O'Brien MJ, Levin B. Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin.* 2006;56(3):143-59;184-5.
55. Soetikno RM, Kaltenbach T, Rouse RV, Park W, Maheshwari A. Prevalence of nonpolypoid (flat and depressed) colorectal neoplasms in asymptomatic and symptomatic adults. *JAMA.* 2008;299(9):1027-35.
56. Ponugoti PL, Cummings OW, Rex DK. Risk of cancer in small and diminutive colorectal polyps. *Dig Liver Dis.* 2017;49(1):34-37.
57. Fanning A, Ponsky JL. Gastrointestinal Endoscopy. In: Souba WW, Fink MP, Jurkovic GJ, editors. *ACS surgery: principles and practice.* 6 ed: Decker Intellectual Properties Incorporated; 2007. p. 756-767.
58. Çakır M. Alt Gastrointestinal Sistem Endoskopisi. In: Karahan Ö, Cingi A, editors. *Gastrointestinal Sistem Endoskopisi.* Ankara: Türk Cerrahi Derneği; 2016. p. 309-329.
59. Kalaycı G. Kolon Kanserleri, Genel Cerrahi Nobel Tıp Kitabevi İstanbul; 2, 1343-59; 2002. 180 Selçuk Tıp Dergisi 2009 M.Büyükdoğan.
60. Kodner IN, Fry DR, Fleshman JW, Birnbaum EH. Colon Rektum and Anus, *Diagnosis Schwartz Principles of Surgery* 1994; 2. p.1262-64.
61. Scrock TR. Colon and Rektum, *Diagnostic Techniques, Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract.* 1996; 4. p.23-38.
62. Collins MD, Gibson GR. Probiotics, prebiotics synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition.* 1999;69(5);1052 – 1057.
63. Goulet O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. *Nutr Rev.* 2015;73(1):32-40.

64. Martin R, Nauta AJ, Amor KB, Knippels LMJ, Knol J, Garssen J. Early life: gut microbiota and immune development in infancy. *Benefic Microbes*. 2010;1(4):367–382.
65. Yılmaz M. Prebiyotik ve Probiyotikler. *Güncel Pediatri*. 2004;2:142-145.
66. Finegold SM, Sutter VL, Mathisen GE. Normal indigenous intestinal flora. Hentges DJ, editor. *Human Intestinal Flora in Health and Disease*. Newyork, London, Paris: Academic Press; 1983.
67. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006;312(5778):1355-9.
68. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science*. 2005;307(5717):1915-1920.
69. Pagliari D, Piccirillo CA, Larbi A, Cianci R. The Interactions between Innate Immunity and Microbiota in Gastrointestinal Diseases. *J Immunol Res*. 2015;2015:898297.
70. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*. 2007;449(7164):811-8.
71. Lay C, Rigottier-Gois L, Holmström K, Rajilic M, Vaughan EE, de Vos WM et al. Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(7):4153-5.
72. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S. Impact of diet in shaping gut microbiotarevealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(33):14691-6.
73. Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One*. 2010,5:e10667.
74. den Abbeele PV, de Wiele TV, Werstraete W, Possemiers S. The host selects mucosal and luminal associations of coevolved gut microorganisms: a novel concept: The host selects mucosal and luminal gut microorganisms. *FEMS Microbiology reviews*. 2011;35(4):681-704.

75. Tlaskalová-Hogenová H, Stepánková R, Hudcovic T, Tucková L, Cukrowska B, Lodinová-Zádníková R. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett.* 2004;93(2-3):97-108.
76. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 2005;308(5278):1635-8.
77. Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr.* 2004;134(2):465-72.
78. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One.* 2010;5:e9085.
79. von Ossowski I, Reunanen J, Satokari R, Vesterlund S, Kankainen M, Huhtinen H. Mucosal adhesion properties of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG SpaCBA and SpaFED pilin subunits. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(7):2049-57.
80. Stecher B, Hardt WD. The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol.* 2008;16(3):107-14.
81. Valore EV, Park CH, Igreti SL, Ganz T. Antimicrobial components of vaginal fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187(3):561-8.
82. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut.* 1994;35(4):483-9.
83. Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31(8):1231-3.
84. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):379-90.
85. Forchielli ML, Walker WA. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr.* 2005;93(1):41-8.
86. Kültürsay N. Bebeklikte bağırsak florası gelişimi ve immün sisteme etkileri. *Çocuk Enf Derg.* 2009;3:75-78.
87. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(8):313-23.

88. Hedlund M, Frendeus B, Wachtle C, Hang L, Fischer H, Svanborg C. Type 1 fimbriae deliver an LPS- and TLR4-dependent activation signal to CD14- negative cells. *Mol Microbiol.* 2001;39(3):542-52.
89. Grangette C, Nutten S, Palumbo E, Morath S, Hermann C, Dewulf JA. Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(29):10321-6.
90. Skovbjerg S, Martner A, Hynsjö L, Hesse C, Olsen I, Dewhirst FE. Gram-positive and Gram-negative bacteria induce different patterns of cytokine production in human mononuclear cells irrespective of taxonomic relatedness. *J Interferon Cytokine Res.* 2010;30(1):23-32.
91. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000;85(1):9-18.
92. Rowland IR. Interactions of the gut microflora and the host in toxicology. *Toxicol Pathol* 1988;16(2):147-53.
93. Gassull MA. Review article: the intestinal lumen as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24(3):90-5.
94. Wall R, Ross RP, Shanahan F, O'Mahony L, O'Mahony C, Coakley M. Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues. *Am J Clin Nutr.* 2009;89(5):1393-401.
95. Ross RP, Mills S, Hill C, Fitzgerald GF, Stanton C. Specific metabolite production by gut microbiota as a basis for probiotic function. *International Dairy Journal.* 2010;20:269-76.
96. Blaut M, Clavel T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J Nutr.* 2007;137(3 Suppl 2):751-5.
97. Turan İ, Özütemiz Ö. İntestinal mikroflora. *Güncel Gastroenteroloji.* 2005;9:26-144.
98. Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, et al. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;51(1):77-84.

99. Fallani M, Amarri S, Uusijärvi A, Adam R, Khanna S, Aguilera M, et al. Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiol.* 2011;157(5):1385–92.
100. Rougé C, Goldenberg O, Ferraris L, Berger B, Rochat F, Legrand A. Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe.* 2010;16(4):362-70.
101. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics.* 2006;118(2):511-21.
102. Alm JS, Swartz J, Björkstén B, Engstrand L, Engström J, Kühn I. An anthroposophic lifestyle and intestinal microflora in infancy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2002;13(6):402-11.
103. Schwiertz A, Gruhl B, Löbnitz M, Michel P, Radke M, Blaut M. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res.* 2003;54(3):393-9.
104. Bezirtzoglou E, Tsiotsias A, Welling GW. Microbiota profile in feces of breastand formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe.* 2011;17(6):478-82.
105. Favier CF, de Vos WM, Akkermans AD. Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe.* 2003;9(5):219-29.
106. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I et al. Factors influencing the composition of the intestinalmmicrobiota in early infancy. *Pediatrics.* 2006;118(2):511-21.
107. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 2007;5(7):e177.
108. Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(1):219-26.

109. Karlsson CL, Molin G, Cilio CM, Ahrné S. The pioneer gut microbiota in human neonates vaginally born at term-a pilot study. *Pediatr Res.* 2011;70(3):282-6.
110. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(26):11971-5.
111. Rajilić-Stojanović M, Heilig HG, Molenaar D, Kajander K, Surakka A, Smidt H. Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ Microbiol.* 2009;11(7):1736-51.
112. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(1):4586-91.
113. Woodmansey EJ, McMurdo ME, Macfarlane GT, Macfarlane S. Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(10):6113-22.
114. Blaut M, Collins MD, Welling GW, Doré J, van Loo J, de Vos W. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. *Br J Nutr.* 2002;87(2):203-11.
115. Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(2):1027-33.
116. Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut.* 2001;48(2):198-205.
117. Mitsuoka T. Intestinal flora and aging. *Nutr Rev.* 1992;50(12):438-46.
118. Li M, Wang B, Zhang M, Rantalainen M, Wang S, Zhou H. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(6):2117-22.

119. Dicksved J, Halfvarson J, Rosenquist M, Jarnerot G, Tysk C, Apajalahti J. Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *ISME J.* 2008;2:716–727.
120. Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-van Vliet WM, De Visser JAGM, De Vos WM. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb Ecol Health Dis.* 2001;13(3):129–34.
121. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2009;457(7228):480-4.
122. Turnbaugh PJ, Quince C, Faith JJ, McHardy AC, Yatsunenko T, Niazi F. Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(16):7503-8.
123. Hentges DJ, Maier BR, Burton GC, Flynn MA, Tsutakawa RK. Effect of a highbeef diet on the fecal bacterial flora of humans. *Cancer Res.* 1977;37(2):568-71.
124. Russell WR, Gratz SW, Duncan SH, Holtrop G, Ince J, Scobbie L. High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *Am J Clin Nutr.* 2011;93(5):1062-72.
125. Tuohy KM, Kolida S, Lustenberger AM, Gibson GR. The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructo-oligosaccharides - a human volunteer study. *Br J Nutr.* 2001;86(3):341-8.
126. Walton GE, van den Heuvel EG, Kusters MH, Rastall RA, Tuohy KM, Gibson GR. A randomised crossover study investigating the effects of galactooligosaccharides on the faecal microbiota in men and women over 50 years of age. *Br J Nutr.* 2012;107(10):1466-75.
127. Langlands SJ, Hopkins MJ, Coleman N, Cummings JH. Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel. *Gut.* 2004;53(11):1610-6.
128. Tannock GW, Munro K, Harmsen HJ, Welling GW, Smart J, Gopal PK. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(6):2578-88.

129. Rinne M, Kalliomäki M, Salminen S, Isolauri E. Probiotic intervention in the first months of life: short-term effects on gastrointestinal symptoms and long-term effects on gut microbiota. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;43(2):200-5.
130. Mohan R, Koebnick C, Schildt J, Schmidt S, Mueller M, Possner M. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *J Clin Microbiol.* 2006;44(11):4025-31.
131. Gueimonde M, Sakata S, Kalliomäki M, Isolauri E, Benno Y, Salminen S. Effect of maternal consumption of lactobacillus GG on transfer and establishment of fecal bifidobacterial microbiota in neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;42(2):166-70.
132. Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, Flint HJ. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond).* 2008;32(11):1720-4.
133. Nadal I, Santacruz A, Marcos A, Warnberg J, Garagorri JM, Moreno LA. Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. *Int J Obes.* 2009;33(7):758-67.
134. Magee EA, Richardson CJ, Hughes R, Cummings JH. Contribution of dietary protein to sulfide production in the large intestine: an in vitro and a controlled feeding study in humans. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(6):1488-94.
135. Pitcher MC, Cummings JH. Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative colitis? *Gut.* 1996;39(1):1-4.
136. Cummings JH, Macfarlane GT. Colonic microflora: nutrition and health. *Nutrition.* 1997;13(5):476-8.
137. Drasar BS, Crowther JS, Goddard P, Hawksworth G, Hill MJ, Peach S, et al. The relation between diet and the gut microflora in man. *Proc Nutr Soc.* 1973;32(2):49-52.
138. Finegold SM, Attebery HR, Sutter VL. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. *Am J Clin Nutr.* 1974;27(12):1456-69.

139. Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Fecal microbial diversity in a strict vegetarian as determined by molecular analysis and cultivation. *Microbiol Immunol.* 2002;46(12):819-31.
140. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(6):423-35.
141. Sullivan A, Edlund C, Nord CE. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect Dis.* 2001;1(2):101-14.
142. Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo MET. 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.* 2004;70(6):3575-3581.
143. Wang SX, Wu WC. Effects of psychological stress on small intestinal motility and bacteria and mucosa in mice. *World Journal of Gastroenterology: WJG.* 2005;11(13):2016-2021.
144. Mikelsaar M, Zilmer M. *Lactobacillus fermentum* ME-3 - an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microbial Ecology in Health and Disease.* 2009;21(1):1-27.
145. Srikanth CV, McCormick BA. Interactions of the intestinal epithelium with the pathogen and the indigenous microbiota: a three-way crosstalk. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2008;2008:626827.
146. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(8):575-82.
147. Ray K. Colorectal cancer: *Fusobacterium nucleatum* found in colon cancer tissue-could an infection cause colorectal cancer? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8(12):662.
148. Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 2010;138(6):2101-14.
149. Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, et al. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and

- cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2009;15:91-102.
150. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 2004;118(3):285-96.
151. Somayeh JS, Masoud A, Sharareh M, Hamed AA, Hajieh GS. Role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer; a review article. *Gastroenterology and Hepatology*. 2018;11(2):101-109.
152. Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, et al. Fusobacterium in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. *Cancer Res*. 2014;74:1311-1318.
153. Kívia Q A, Cássio LC, Almeida S, Robson CS. Immunological Pathways Triggered by *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*: Therapeutic Possibilities? *Hindawi*. 2019 Article ID 7241312.
154. Yu T, Guo F, Yu Y, Sun T, Ma D, Han J, et al. Fusobacterium nucleatum promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy. *Cell*. 2017;170(3):548-563.
155. Wexler HM. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(4):593-621.
156. Johnson JL. Taxonomy of Bacteroides Desoxyribonucleic acid homologies among *Bacteroides fragilis* and other saccharolytic Bacteroides species. *Journal of systematic Bacteriology*. 1978;28:245-256.
157. Fang H, Edlund C, Nord CE, Hedberg M. Selection of Cefoxitin-resistant *Bacteroides thetaiotaomicron* mutants and mechanisms involved in beta-lactam resistance. *Clin Infect Dis*. 2002;35:47-53.
158. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Ruthazer R, Golan Y, Goldstein EJC, et al. National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends in United States from 1997 to 2004. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:1649-55.
159. Snezhkina AV, Krasnov GS, Lipatova AV, Sadritdinova AF, Kardymon OI, Fedorova MS, et al. The Dysregulation of Polyamine Metabolism in Colorectal Cancer Is Associated with Overexpression of c-Myc and C/EBP β rather than

- Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Infection. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:235356.
160. Sears CL, Geis AL, Housseau F. *Bacteroides fragilis* subverts mucosal biology: from symbiont to colon carcinogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(10):4166-4172.
161. Sutcliffe IC, Trujillo ME, Goodfellow M. A call to arms for systematists: revitalising the purpose and practises underpinning the description of novel microbial taxa. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2012;101(1):13-20.
162. Stark PL, Lee A. The bacterial colonization of the large bowel of pre-term low birth weight neonates. *J Hyg*. 1982;89(1):59-67.
163. Westra-Meijer CM, Degener JE, Dzoljic-Danilovic G, Michel MF, Mettau JW. Quantitative study of the aerobic and anaerobic faecal flora in neonatal necrotising enterocolitis. *Arch Dis Child*. 1983;58(7):523-8.
164. Eckburg, PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308:1635-8.
165. Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem*. 2009;55(5):856-66.
166. Nechvatal JM, Ram JL, Basson MD, Namprachan P, Niec SR, Badsha KZ, et al. Fecal collection, ambient preservation, and DNA extraction for PCR amplification of bacterial and human markers from human feces. *J Microbiol Methods*. 2008;72(2):124-32.
167. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51(1):263-73.
168. Smith C, Osborn AM. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)- based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*. 2009;67(1):6-20.
169. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*. 2005;29(3):151-159.
170. Gibson N. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta*. 2006;363(1-2):32-47.

171. Colonoscopy Screening Among US Adults Aged 40 or Older With a Family History of Colorectal Cancer [İnternet]. 2020 [Erişim Tarihi 23 Mayıs 2020]. Erişim adresi: https://www.cdc.gov/pcd/issues/2015/14_0533.htm
172. What Should I Know About Screenin [İnternet] 2020 [Erişim tarihi 23 Mayıs 2020] Erişim adresi: https://www.cdc.gov/cancer/colorectal/basic_info/screening/
173. Haggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. Clin Colon Rectal Surg 2009;22(4):191-7.
174. Watson A J, Collins PD. Colon cancer: a civilization disorder. Dig Dis 2011;29(2):222-28.
175. Azimirad M, Rostami-Nejad M, Rostami K, Naji T, Zali MR. The Susceptibility of Celiac Disease Intestinal Microbiota to Clostridium difficile Infection. Am J Gastroenterol 2015;110(12):1740-41.
176. Rostami Nejad M, Ishaq S, Al Dulaimi D, Zali MR, Rostami K. The role of infectious mediators and gut microbiome in the pathogenesis of celiac disease. Arch Iran Med 2015;18(4):244-49.
177. Phillips ML. Gut reaction: environmental effects on the human microbiota. Environ Health Perspect 2009;117(5):198-205.
178. Gagnière J, Raisch J, Veziat J, Barnich N, Bonnet R, Buc E, et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. World J Gastroenterol 2016;22(2):501-18.
179. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. J Lipid Res 2013;54(9):2325-40.
180. Lepage P, Leclerc MC, Joossens M, Mondot S, Blottiere HM, Raes J, et al. A metagenomic insight into our gut's microbiome. Gut 2012;62(1):146-58.
181. Lakhan, Shaheen E; Kirchgessner, Annette. Gut inflammation in chronic fatigue syndrome. Nut Metabol 2010;7:79.
182. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature 2006;444(7122):1027-31.

183. Mazmanian SK. Capsular polysaccharides of symbiotic bacteria modulate immune responses during experimental colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;46:11-2.
184. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136(5):359-86.
185. Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe* 2013;14(2):207-15.
186. Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, Peters WH, Roelofs R, Boleij A, et al. Towards the human colorectal cancer microbiome. *PLoS One* 2011;6:e20447.
187. Wei H, Dong L, Wang T, Zhang M, Hua W, Zhang C, et al. Structural shifts of gut microbiota as surrogate endpoints for monitoring host health changes induced by carcinogen exposure. *FEMS Microbiol Ecol* 2010;73(3):577-86.
188. Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B, Yamin R, Abed J, Gamliel M, et al. Binding of the Fap2 Protein of *Fusobacterium nucleatum* to Human Inhibitory Receptor TIGIT Protects Tumors from Immune Cell Attack. *Immunity* 2015;42:344-355.
189. Abed J, Maalouf N, Parhi L, Chaushu S, Mandelboim O, Bachrach G. Tumor Targeting by *Fusobacterium nucleatum*: A Pilot Study and Future Perspectives. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017;7:295.
190. Ito M, Kanno S, Noshō K, Sukawa Y, Mitsuhashi K, Kurihara H. Association of *Fusobacterium nucleatum* with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *Int. J. Cancer.* 2015;137(6):1258-1268.
191. McCoy AN, Perez FA, Azcarate-Peril A, Yeh JJ, Sandler RS, Keku TO. *Fusobacterium* Is Associated with Colorectal Adenomas. *Plos One.* 2013;8(1):e53653.
192. Noshō K, Sukawa Y, Adachi Y, Ito M, Mitsuhashi K, Kurihara H, et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(2):557-566.
193. Sun CH, Li BB, Wang B, Zhao J, Li TT, Li WB, et al. The role of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer: From carcinogenesis to clinical management. *Chronic Dis. Transl. Med.* 2019;5(3):178-187.


194. Bashir A, Miskeen AY, Bhat Fazili KM, Ganai BA. *Fusobacterium nucleatum*: an emerging bug in colorectal tumorigenesis. *Eur J Cancer Prev.* 2015;24(5):373-85.
195. Abed J, Embgard JEM, Zamir G, Faroja M, Almogy G, Grenov A, et al. Fap2 Mediates *Fusobacterium nucleatum* Colorectal Adenocarcinoma Enrichment by Binding to Tumor-Expressed Gal-GalNAc. *Cell Host Microbe.* 2016;20(2):215-225.
196. Cynthia LS, Geis AL, Housseau F. *Bacteroides fragilis* subverts mucosal biology: from symbiont to colon carcinogenesis. *J Clin. Invest.* 2014;124(10):4166-72.
197. Cynthia LS. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a Rogue among Symbiotes. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009;22(2):349-69.
198. Fathi P ve Wu S. Isolation, Detection, and Characterization of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in Clinical Samples. *Open Microbiol J.* 2016;14(10):57-63.
199. Viljoen KS, Dakshinamurthy A, Goldberg P, Blackburn JM. Quantitative Profiling of Colorectal Cancer- Associated Bacteria Reveals Associations between *Fusobacterium* spp., Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) and Clinicopathological Features of Colorectal Cancer. *Plos One.* 2015.
200. Keenan JI, Aitchison A, Purcell RV, Greenless R, Pearson JF, Frizelle FA. Screening for enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in stool samples. *Anaerobe.* 2016;40:50-3.
201. Purcell RV, Pearson J, Aitchison A, Dixon L, Frizelle FA, Keenan JI. Colonization with enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* is associated with early-stage colorectal neoplasia. *Plos One.* 2017;12(2): e0171602.
202. Zamani S, Taslimi R, Sarabi A, Jasemi S, Sechi LA, Feizabadi MM. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: A Possible Etiological Candidate for Bacterially-Induced Colorectal Precancerous and Cancerous Lesions. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:449.
203. Haghi F, Goli E, Mirzaei B, Zeighami H. The association between fecal enterotoxigenic *B. fragilis* with colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2019;19:879.

204. Shang FM, Liu HL. *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: A review. *World J Gastroenterol Oncol*. 2018;10(3):71-81.
205. Bundgaard-Nielsen C, Baandrup UT, Nielsen LP, Sorensen S. The presence of bacteria varies between colorectal adenocarcinomas, precursor lesions and non-malignant tissue. *BMC Cancer*. 2019;19:399




8. EKLER

Ek 1: Asgari Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

 <p>T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu</p>	ASGARI BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Doküman Adı: KADB-F.23-R.00
		Yayın Tarihi: 18.04.2013
		Sayfa No: 75/96
		Onaylayan: Daire Başkanı

1. Bu çalışma bir araştırma konusudur.
2. Araştırmamızda barsağınızdan alınacak olan doku örneğinde başta *Bacteroides fragilis* ve *Fusobacterium nucleatum* olmak üzere çeşitli bakterilerin varlığını araştırmak istiyoruz.
3. Araştırmamız kapsamında, araştırma sürecinde size aldığınız tedavi dışında herhangi bir tedavi uygulanmayacaktır.
4. Zaten rahatsızlığınızdan dolayı başvurmuş, kesin tanı alabilmeniz için gerekli olan rutin işlemler sırasında sizden alınan doku örneklerinden patolojik değerlendirmeniz yapıp tanınız konulduktan sonra, şayet artarsa, örneğinizin artan kısmını çalışma için araştırmamızda kullanmak üzere talep ediyoruz.
6. Araştırmamızda, doku örneğinizin alımı için aseptik kurallara uygun şekilde hekiminiz tarafından küçük steril tüplere artan örneğiniz konacaktır. Bunun sonucunda oluşabilecek bir komplikasyon beklenmemektedir.
7. Araştırmamızda, doku örneğinizi, *Bacteroides fragilis* ve *Fusobacterium nucleatum* isimli bakterilerin varlığını moleküler mikrobiyolojik yöntemler ile saptamak için kullanacağız
8. Araştırma için sizden hiçbir ücret talep edilmeyecektir. Size de herhangi bir ücret ödenmeyecektir. Bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kurumundan (SGK'dan) herhangi bir ücret alınmayacaktır.

 <p>TC. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu</p>	ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Doküman Adı: KADB-F.23-R.00
		Yayın Tarihi: 18.04.2013
		Sayfa No: 76/96
		Onaylayan: Daire Başkanı

9. Araştırmaya katılmanız tamamen sizin isteğinize bağlıdır ve istediğiniz zaman herhangi bir cezaya ya da yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkınızı kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan çekilebilirsiniz.

10. Araştırmaya katılmanız halinde İzleyiciler, Etik Kurul, Bakanlık ve diğer sağlık otoriteleri size ait orjinal tıbbi kayıtlara doğrudan erişebilecektir, Bununla birlikte kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır, araştırmaya katılıp bu formu imzalamanız durumunda siz ya da yasal temsilciniz söz konusu erişime izin vermiş olacaksınız.

11. Kimliğinizi ortaya çıkaracak tüm kayıtlar gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanmayacak ve araştırma sonuçlarının yayınlanması durumunda dahi kimliğiniz gizli tutulacaktır.


12. Araştırma konusu kapsamında araştırmaya katılmaya devam isteğinizi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde size ya da yasal temsilcinize en kısa sürede-zamanında bilgi verilecek ve çalışmadan çıkabileceksiniz.

13. Araştırma hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir advers olay hakkında daha ayrıntılı bilgi edinebilmeniz için araştırmacı Dr Yeşim ÖZTÜRK BAKAR a ait 0535 517 81 82 numaralı telefonlardan günün 24 saatinde erişebileceksiniz.

14. Araştırmaya katılmanız durumunda sizden tedaviniz dışında gerekli olacak bir ek süre talebimiz yoktur

15. Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı 70 olarak belirlenmiştir.

16. Sizden edinilecek biyolojik materyal (doku) araştırma konumuz olan *Bacteroides fragilis* ve *Fusobacterium nucleatum* isimli bakterilerin miktar durumlarını belirlemek üzere ve ileri çalışmalarda başka bakterilerin varlığını belirlemek üzere de kullanılabilir.

 <p>T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu</p>	ASGARI BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Doküman Adı: KADB-F.23-R.00
		Yayın Tarihi: 18.04.2013
		Sayfa No: 77/96
		Onaylayan: Daire Başkanı

17. Sizden aldığımız biyolojik materyalin (Doku) analizi İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bünyesinde çalışılacak ve yurtdışında herhangi bir çalışma yapılmayacaktır.

18. “Bağırsaktan alınan doku örneklerinde *Bacteroides fragilis* ve *Fusobacterium nucleatum* isimli bakterilerin araştırılması” adlı araştırmanızda kullanılacak biyolojik örneklerimin;


- Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.
- İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

19. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki bütün açıklamaları okudum. Bana yukarıda konusu ve açıklaması verilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi biliyorum.

- Evet
- Hayır

20. Söz konusu araştırmaya hiçbir baskı olmaksızın kendi arzumuyla katıldığımı beyan ederim.

- Evet
- Hayır

 <p>T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu</p>	ASGARI BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Doküman Adı: KADB-F.23-R.00
		Yayın Tarihi: 18.04.2013
		Sayfa No: 78/96
		Onaylayan: Daire Başkanı

21. Çalışmaya katılan kişinin;

Adı-soyadı ve imzası:

Tarih:

Telefon numarası:

22. Gönüllünün yasal temsilcisinin;

Adı-soyadı ve imzası:

Tarih:

Telefon numarası:

23. Araştırma ekibindeki araştırmacının;

Adı-soyadı ve imzası: Dr Yeşim ÖZTÜRK BAKAR

Tarih:

Telefon numarası: 0535 517 8182

9. ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Yeşim ÖZTÜRK BAKAR

Doğum yeri ve tarihi: Keçiören 09.05.1991

Uyruğu: T.C.

İletişim adresi ve telefonu:

E-posta: yesimozturk49@gmail.com

Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden-eskiye doğru)

İ.Ü-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 2016-2020

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi 2009-2015

Mesleki Deneyimi

Tekirdağ-Ergene Toplum Sağlığı Merkezi 2015 - Pratisyen Hekim

Bilimsel Faaliyetleri

- Yayınları: (ulusal/uluslararası makale, bildiri, poster, kitap ya da kitap bölümü vb.)

Alt Solunum Yolu Örneklerinden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılığı. ANKEM. 2017;31(3):92-96.

- Aldığı burslar/ödülleri
- Projeleri
- Katıldığı kongreler, sempozyum vb.

Klimik kongresi, 2017

10. İNTİHAL TARAMA RAPORU

KOLOREKTAL KANSER TANISI ALAN VE ALMAYAN OLGULARIN KOLON MİKROBİYOTASINDA ENTEROTOKSİJENİK BACTEROIDES FRAGILIS VE FUSOBACTERIUM NUCLEATUM KOLONİZASYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

% 12	% 9	% 6	% 10
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% 1
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
4	Submitted to Inonu University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Akdeniz University Öğrenci Ödevi	<% 1