

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

***Fusobacterium nucleatum*'A KARŞI OLUŞAN ANTİKORLARIN KOLOREKTAL
KANSERİN SEROLOJİK TANISINDA DEĞERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. MELİKE KURT

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

2019

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

***Fusobacterium nucleatum*'A KARŞI OLUŞAN ANTİKORLARIN KOLOREKTAL
KANSERİN SEROLOJİK TANISINDA DEĞERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. MELİKE KURT

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ZEKİ YUMUK

ETİK KURUL ONAYI TARİHİ VE SIRA SAYISI:29.03.2018-2018/34

2019

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	VI
Kısaltmalar dizelgesi	VII
Çizelgeler dizelgesi.....	IX
Çizimler dizelgesi.....	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mikrobiyota	3
2.1.1. Bağırsak Mikrobiyotası	4
2.1.2. Mikrobiyota ve Konak İlişkisi.....	5
2.1.3. Mikrobiyotanın Değişkenliği	6
2.1.4. Mikrobiyota ve Kanser İlişkisi.....	7
2.2. Kolorektal Kanser.....	8
2.2.1. Epidemiyoloji.....	8
2.2.2. Etiyoloji.....	9
2.2.2.1. İnflamatuvar bağırsak hastalıkları	10
2.2.2.2. Herediter kanser sendromları.....	10
2.2.2.3. Kolorektal kanserin oluşumunda genetik yollar	10
2.2.3. Kolorektal Kanser Tanısı	11

2.2.4.	Kolorektal Kanser Taraması.....	11
2.2.4.1.	Kolonoskopi.....	12
2.2.4.2.	Gaitada gizli kan testi	12
2.2.4.3.	Fekal immünokimyasal test	12
2.2.4.4.	Serum tabanlı testler	12
2.3.	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	12
2.3.1.	Genel Tanımlama ve Sınıflama.....	12
2.3.2.	Virülans Faktörleri	13
2.3.2.1.	Kolonizasyon ve yayılma.....	13
2.3.2.2.	<i>F.nucleatum</i> 'un virülans faktörü olarak immün yanıtı uyarması.....	14
2.3.3.	<i>F.nucleatum</i> ve Kolorektal Kanser İlişkisi.....	14
2.3.4.	<i>F.nucleatum</i> 'a Karşı Meydana Gelen İmmün Yanıt	16
3.	GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	18
3.1.	Örneklerin ve Verilerin Toplanması.....	18
3.1.1.	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (kPZR) Çalışması.....	18
3.1.2.	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) Çalışması.....	18
3.1.3.	Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri	19
3.2.	Örneklerin Saklanması	21
3.2.1.	Doku Örneklerinin Saklanması	21
3.2.2.	Serum Örneklerinin Saklanması.....	21

3.3.	ELISA Çalışması	21
3.3.1.	Ayrıraçlar ve Malzemeler	21
3.3.1.1.	Steril fosfat tampolu tuz çözeltisinin (PBS) hazırlanması	21
3.3.1.2.	Tween 20 içeren fosfat tamponlu tuz çözeltisinin (PBS-T) hazırlanması .	21
3.3.1.3.	Karbonat-Bikarbonat ($\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$) tamponunun hazırlanması.....	22
3.3.1.4.	Bloklama tamponunun hazırlanması	22
3.3.1.5.	Enzim Konjugat	22
3.3.1.6.	Kromojen/Substrat	22
3.3.1.7.	Sülfürik asit solüsyonunun hazırlanması	22
3.3.1.8.	ELISA plakları	23
3.3.2.	Hasta Örneklerinin Hazırlanması	23
3.3.3.	ELISA Plaklarını Yıkama Prosedürü	23
3.3.4.	Bakteri Kültürü.....	23
3.3.5.	ELISA Kitinin Hazırlanması.....	24
3.3.5.1.	Bakterinin ısıyla inaktive edilmesi	24
3.3.5.2.	Kaplama solüsyonunun hazırlanması	24
3.3.5.3.	ELISA plaklarının kaplanması.....	24
3.3.6.	ELISA akış şeması	25
3.4.	kPZR Çalışması	26
3.4.1.	Deoksiribonükleik Asit İzolasyonu	26

3.4.1.1.	İzolasyon basamakları.....	26
3.4.1.2.	Doku örneklerindeki DNA miktarının ölçülmesi	27
3.4.2.	kPZR İşlemi.....	27
3.4.2.1.	Standart eğrinin oluşturulması	27
3.4.2.2.	<i>Fusobacterium nucleatum</i> 'un miktarının saptanması.....	29
3.5.	İstatistiksel Analiz	30
3.6.	Etik Kurul Onayı	30
4.	BULGULAR	31
4.1.	Demografik veriler	31
4.1.1.	kPZR Çalışması.....	31
4.1.2.	ELISA Çalışması.....	31
4.2.	kPZR Çalışması Sonuçları.....	31
4.3.	ELISA Çalışması Sonuçları.....	32
4.3.1.	IgA antikorları	32
4.3.2.	IgG Antikorları.....	37
4.4.	IgA ve IgG antikorları arasındaki ilişki	42
4.5.	ROC Eğrisi Analizi.....	42
4.5.1.	ELISA IgA sınır değerin belirlenmesi	43
4.5.2.	ELISA IgG sınır değerin belirlenmesi	46
5.	TARTIŞMA	49

6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	56
7. ÖZET.....	58
8. ABSTRACT	60
9. KAYNAKLAR.....	62



ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması sürecinin her aşamasında deneyim ve bilgisiyle bana yol gösteren, ilgisi, hoşgörüsü ve desteğiyle her zaman yanımda olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Zeki YUMUK'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren, her konuda destek veren saygıdeğer hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fetiye KOLAYLI'ya,

Eğitimimin en başından bu yana karşılaştığım her türlü zorlukta bana destek olan, engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ, Prof. Dr. Fatma BUDAK, Prof. Dr. Sema KEÇELİ, Prof. Dr. Devrim DÜNDAR, Prof. Dr. Murat HÖKELEK ve Dr. Öğr. Üyesi Erdener BALIKÇI'ya,

Hasta örneği toplama sürecindeki yardımlarından dolayı başta Prof. Dr. Altay ÇELEBİ olmak üzere Gastroenteroloji Bilim Dalı öğretim üyelerine, uzman doktorlarına ve endoskopi ünitesi ekibine,

Anlayış, yardım ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim sevgili çalışma arkadaşlarım Arş.Gör. Hüseyin UZUNER, Arş.Gör.Dr. Doğanhan ER, Dr. Agim OSMANİ, Uzm. Dr. Serpil GENÇ, Uzm. Dr. Fatma Zehra Duymaz, Arş. Gör. Eda ÖZÇELİK, Dr. Melike DEMİR, Dr. Elif OKUMUŞ, Dr. Handan GENEZ, Dr. Merve YILDIZ, Dr. Yılmaz PULCU, Dr. İrem GÜLER, Nurdan GÜNGÖR ve laboratuvar teknisyeni arkadaşlarıma,

Tez projemdeki desteği için Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Bu günlere gelmemde büyük emekleri olan, sevgilerini ve özverilerini hiç esirgemeyen, her anımda yanımda olan annem Emine SAĞIR ve babam Cevdet SAĞIR, kız kardeşlerim Merve SAĞIR ve Saliha SAĞIR'a,

Sevgisini ve desteğini her daim hissettiğim hayat arkadaşım Yunus KURT'a çok teşekkür ederim.

Dr. Melike KURT

Kısaltmalar dizelgesi

APC	:Adenomatöz Polipozis Coli
BRAF	:Raf mürin sarkoma viral onkogen
CA19-9	:Kanser antijeni 19-9
CEA	:Karsinoembriyojenik antijen
CECAM 1	:Karsinoembriyonik antijene bağılı hücre adezyon molekülü 1
CIMP	:CpG adacık metilatör fenotip
CIN	:Kromozomal İnstabilite
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
FadA	:Fusobacterium adhesin A
Fap2	:Fusobacterium autotransporter protein 2
FomA	:Fusobacterial outer membran protein A
GALT	:Bağırsak ile ilişkili mukoza dokusu
IARC	:Uluslararası kanser araştırma ajansı
KCL	:Potasyum Klorür
kPZR	:Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
KRAS	:Kirsten rat sarkoma viral onkogen
KRK	:Kolorektal Kanser
KZYA	:Kısa Zincirli Yağ Asitleri
MDSCs	:Myeloid kökenli süpresif hücreler
miRNA	: Mikroribonükleik asit
MMR	:DNA mismatch repair

MSI	:Mikrosatellit instabilite
NF-Kb	:Nükleer faktör-kappa B
NIH	:National Institute of Health
NK	:Doğal öldürücü
OD	:Optik dansite
OMV	:Dış membran vezikülleri
ROC	:Receiver Operating Characteristics
TGF	:Dönüştürücü büyüme faktörü
TIGIT	:T hücre immünglobulin ve ITIM domain
TLR	:Toll-benzeri reseptör
TNF	:Tümör nekrozis faktör

Çizelgeler dizelgesi

1. Çizelge. Standartların kPZR karışımları.....	28
2. Çizelge. kPZR döngüleri.	29
3. Çizelge. KRK grubunun kanser ve normal mukoza dokularındaki <i>F.nucleatum</i> kopya sayıları (Bakteri sayısı/50 ng DNA).	32
4. Çizelge. Benign kolon hastalıkları grubunun lezyon ve normal mukoza dokularındaki <i>F.nucleatum</i> kopya sayıları (Bakteri sayısı/50 ng DNA).	33
5. Çizelge. KRK grubunun ELISA IgA ölçüm sonuçlarına göre OD değerleri ve üç ölçümün ortalaması.	33
6. Çizelge. Benign kolon hastalıkları grubunun ELISA IgA ölçüm sonuçlarına göre OD değerleri ve üç ölçümün ortalaması.....	34
7. Çizelge. Sağlıklı kontrol grubunun ELISA IgA ölçüm sonuçlarına göre OD değerleri ve üç ölçümün ortalaması.....	36
8. Çizelge. KRK grubunun ELISA IgG ölçüm sonuçlarına göre OD değerleri ve üç ölçümün ortalaması.	38
9. Çizelge. Benign kolon hastalıkları grubunun ELISA IgG ölçüm sonuçlarına göre OD değerleri ve üç ölçümün ortalaması.....	39
10. Çizelge. Sağlıklı kontrol grubunun ELISA IgG ölçüm sonuçlarına göre OD değerleri ve üç ölçümün ortalaması.....	41
11. Çizelge. ELISA IgA testinin ROC eğrisi analizi ile elde edilen değerler.	44
12. Çizelge. ELISA IgG testinin ROC eğrisi analizi ile elde edilen değerler.	47

Çizimler dizelgesi

1. Çizim. Akış Şeması.	20
2. Çizim. Standartların amplifikasyon eğrileri.	28
3. Çizim. kPZR’de kullanılan standart eğri.	29
4. Çizim. kPZR sonrası elde edilen bazı KRK hastalarının kanser ve normal mukoza dokularındaki <i>F.nucleatum</i> ’a ait amplifikasyon eğrileri.	34
5. Çizim. Gruplara göre ELISA IgA testiyle elde edilen OD değerlerinin ortalamaları.	37
6. Çizim. Gruplara göre ELISA IgG testiyle elde edilen OD değerlerinin ortalamaları.	42
7. Çizim. ELISA IgA testinin ROC eğrisi.	43
8. Çizim. ELISA IgG testinin ROC eğrisi.	46

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikrobiyota, vücudumuzun epitel bariyer dokularında bulunan mikroorganizmaların tümüne verilen addır. Bu mikroorganizmalar birbirleriyle ve konakla denge halinde yaşayarak insan sağlığında önemli rol oynamaktadır. Mikrobiyota dengesinin bozulması, otoimmün hastalıklar, gastrointestinal sistem hastalıkları ve kanser gibi çeşitli patolojilere neden olabilmektedir.^{1,2,3}

Kolorektal kanser (KRK), yılda ortalama 1,2 milyon yeni vaka ve yılda yaklaşık 600 bin ölüm ile dünya genelinde en sık görülen kanserlerden biridir.⁴ Erkeklerde, akciğer ve prostat kanserinden sonra üçüncü; kadınlarda, meme kanserinden sonra ikinci sırada görülmektedir ve kansere bağlı ölümlerde üçüncü sırada yer almaktadır.⁵ Türkiye’de, kadınlarda yüz binde 14,4, erkeklerde yüz binde 23,1 sıklıkta görülmektedir. Her iki cinsiyette de sıklık olarak üçüncü sıradadır.⁶ Kolorektal kanser taramasında kullanılan yöntemlerden biri olan kolonoskopi; hasta için hazırlık süreci zor, maliyetli, deneyim gerektiren ve invaziv bir işlemdir. Uygun maliyetli, örnek temini ve uygulaması kolay bir tarama yöntemi olan gaitada gizli kan testinin, duyarlılığı ve özgüllüğü düşüktür.⁷ Kolorektal kanser için kullanılabilecek, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek yeni tarama testlerine ihtiyaç vardır.

Fusobacterium nucleatum bakterisi, nadir görülen bir intestinal mikrobiyota elemanı olmasına rağmen adenomatöz polip gibi prekanseröz lezyonlarda ve kolorektal kanser dokularında normal dokuya oranla daha fazla miktarda saptanmıştır.^{1,8} *F.nucleatum*, adezinleri ile dokuları invaze edip bağırsak mukozasında inflamatuvar reaksiyonları başlatmaktadır.⁹ Bu sayede, kolorektal kanserin başlamasında ve ilerlemesinde rol oynadığı düşünülmektedir.¹⁰

F.nucleatum’a karşı antikor miktarını tayin eden az sayıda çalışma bulunmaktadır.¹¹ Dünyanın farklı coğrafi bölgelerinde, benign kolon lezyonları ve KRK lezyonlarında *F.nucleatum* miktarının araştırıldığı çalışmalar artmaktadır.^{7,8} Araştırdığımız kadarıyla ülkemizde, KRK ve *F.nucleatum* ilişkisiyle ilgili olarak hastaların tükürük örneklerindeki bakteri miktarının incelendiği bir çalışma bulunmaktadır.¹²

Bu çalışmanın amacı; KRK hastalarında *F.nucleatum*'a karşı antikor varlığının teşhise yardımını araştırmak ve kanserli dokularda *F.nucleatum*'un varlığını ve sayısının KRK ile ilişkisini belirlemektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikrobiyota

Dünya, 10^{30} kadar mikroorganizmaya ev sahipliği yaparken insan vücudunda yaklaşık 1000 farklı türe ait 10^{13} kadar mikroorganizma olduğu varsayılmaktadır.^{3,13,14}

Vücudumuzun epitel bariyer dokularında bulunan mikroorganizmalar; bakteriler, virüsler, mantarlar ve arkealardır. Bu mikroorganizmaların tamamına mikrobiyota; mikroorganizmaların genomunun tümüne mikrobiyom denmektedir.³

İnsan, kendisine birçok alanda fayda sağlayan mikrobiyotayla birlikte süperorganizma olarak adlandırılan bir yapıdır.¹⁵ İnsan vücudunun, kendi hücresi ve kendi hücre sayısının 3 katı kadar vücuda yerleşmiş mikroorganizmadan oluştuğu düşünülmektedir.¹⁶ Vücudumuzda bulunan mikroorganizmaların kapladığı alan yaklaşık 400 m^2 kadardır ve bu mikroorganizmaların oluşturduğu ağırlık, ortalama olarak vücut kütlelerinin %1-2'sine tekabül etmektedir.^{16,17}

Mikrobiyolojinin klasik uygulamalarında bakteriler, uygun besiyerlerinde üretilerek incelenir. Doğada bulunan mikroorganizmaların çok az miktarı bu yöntem ile incelenebilir. Günümüzde mikroorganizmaları araştırmak amacıyla, metagenomik çalışmalar kapsamında moleküler yöntemlere dayalı teknikler kullanılmaktadır. Bu çalışmalar ile tek seferde yüksek verimli sonuçlar elde edilmektedir. Metagenomik çalışmalar sayesinde mikroorganizmalar izole edilmeden DNA dizileri belirlenebilmektedir. Metagenomik teknikte, prokaryot ribozomunun 16S RNA'yı kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu yapılarak örnekteki bütün DNA'lar incelenebilmektedir.¹⁸

Mikrobiyotayı incelemek amacıyla 2008 yılında ABD'de, NIH (National Institute of Health) tarafından insan mikrobiyom projesi (Human Microbiome Project, HMP) başlatılmıştır. Bu proje ile mikrobiyom ve mikrobiyotayı oluşturan mikroorganizmaların türünü, oranlarını, evrimlerini ve bunları etkileyen faktörleri belirlemek amaçlanmıştır. Birçok ülkenin ve bilim dalının çalıştığı bu proje ile günümüze kadar insan vücudunda 10000'in üzerinde bakteri, mantar, arkea ve 3000'den fazla virüs türü saptanmıştır.¹⁷

2.1.1. Bağırsak Mikrobiyotası

Mikrobiyotanın yoğun olarak bulunduğu bölümler; deri, genitoüriner sistem, solunum sistemi ve gastrointestinal sistemdir.³ Bağırsak mukozası, en yoğun nüfuslu mikrobiyal ekosistemlerdendir ve insan vücudundaki mikrobiyotanın %99'u kolonda bulunmaktadır.¹⁵ Kolonda bulunan tüm bu mikroorganizmalar, konak ile sürekli etkileşim halindedir.¹⁹

İntestinal mikrobiyotanın çoğunluğunu bakteriler oluşturmaktadır. Bakterilerin neredeyse %99'luk kısmı anaeroplardan oluşmaktadır. Moleküler parmak izi analiz yöntemleri ve 16S rRNA dizileme analizi çalışmaları ile kolonda birkaç çeşit filuma ait bakteriler saptanmıştır. Anaeroplara %60'ını gram negatif *Firmicutes* filumu oluşturmaktadır.²⁰ *Firmicutes* filumu içerisinde 50'ye yakın cins bulunmaktadır. Bunlardan bazıları, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Phascolarctobacterium*, *Lachnospira*, *Oscillospira*, *Blautia*, *Lactococcus*, *Dorea*, *Roseburia*, *Coprococcus*, *Streptococcus*, *Butyrivibrio*, *Anerostipes*, *Faecalibacterium*, *Enterococcus* ve *Staphylococcus* cinsleridir.²¹ İntestinal mikrobiyotada *Clostridium* cinsi, *Firmicutes* filumunun çoğunu oluşturmaktadır.^{17,20,21} Gram negatif *Bacteroidetes* filumu da intestinal mikrobiyotada yüksek oranda görülmektedir. *Bacteroidetes* filumu içerisinde bulunan *Bacteriodes* cinsi bakteriler, intestinal mikrobiyotadaki anaeroplara %20'den fazlasını oluşturmaktadır.²⁰ *Prevotella* ve *Parabacteriodes* cinsleri de *Bacteroidetes* filumu içerisinde yer alan mikrobiyota elemanlarındandır. Gram negatif olan *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia* filumları ile gram pozitif *Actinobacteria* filumu gibi filumlar da daha az miktarlarda mikrobiyota içerisinde bulunmaktadır. *Fusobacteria* filumunda *Fusobacterium* cinsi, *Verrucomicrobia* filumunda *Akkermansia* cinsi, *Actinobacteria* filumu içinde *Collinsella* cinsi bakteriler bulunmaktadır.²¹

Mikroorganizmaların cinsi ve oranları, bağırsağın farklı anatomik bölgelerinde değişkenlik gösterebilmektedir. Duodenumda, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus* cinsleri; jejunumda, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* cinsleri ile çeşitli maya türleri; ileumda, segmentli filamentöz bakteriler, *Enterobacterales* ailesi üyeleri, *Bacteriodes*, *Clostridium* cinsleri ve kolonda, *Bacteriodes*, *Clostridium* cinsleri, *Prevotellaceae* ailesi üyeleri, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia* filumlarına ait bakteriler şeklinde sıralanabilmektedir.¹⁶

Bağırsak mikrobiyota elemanları, bağırsak boşluğunda bulunan ve epitel yüzeyinde bulunan şekilde de sınıflandırılabilirler. *Clostridium spp.* ve *Bacteriodes fragilis* daha çok kolonun lümeninde yerleşirken, gram pozitif segmentli filamentöz bakteriler daha çok epitel hücrelerine sıkıca yapışık şekilde bulunmaktadır.²²

2.1.2. Mikrobiyota ve Konak İlişkisi

İnsan bağırsak mukozası, insan hücreleri ve mikrobiyal ekosistem ağı ile birlikte dinamik bir yapıdır.²³ Bağırsak mikrobiyotası, çeşitli mekanizmalar ile insana immünolojik, yapısal ve metabolik açıdan birçok fayda sağlamaktadır.^{19,24}

Mikrobiyota, Toll-Like Reseptör (TLR)'ü aktive ederek enterositlerin homeostazisinin sağlanmasında rol oynamaktadır.²⁵ TLR'nin olmadığı farelerde enterosit proliferasyonunun azaldığı saptanmıştır.²⁴ İntestinal mikrobiyotanın bulunmadığı durumda, kas duvar kalınlığında, damarlanmada, sindirim sistemi enzim aktivitesinde, goblet hücre sayısında ve mukus tabakasında azalma gözlenmiştir.²⁴

İntestinal mikrobiyota, konağın immün sisteminin matürasyonunda rol oynamaktadır. Konak immün sistemi de bağırsaktaki mikrobiyal kompozisyonu düzenlemektedir. İmmün sistem ve mikrobiyota arasındaki bu ilişki çok erken yaşlarda başlamaktadır. Bağırsaktaki mikroorganizmalar, bağırsağın lamina propriasındaki immün sisteme ait dendritik hücre ve makrofajları patojenlere karşı sürekli hazır hale getirerek immün sistem hücrelerini geliştirmektedirler. Ayrıca, bağırsaktaki antikor üreten hücreleri uyararak oluşturduğu hafif düzeyde inflamasyon ile lenfoid yapıların olgunlaşmasına katkıda bulunmaktadır.^{18,26}

Mikroorganizmasız bir ortamda, steril bir şekilde büyütülen farelerin enfeksiyonlara daha duyarlı oldukları saptanmıştır. Steril farelerde, intraepitelyal ve dolaşımdaki lenfosit sayısı, serum immünglobülin seviyesi azalmış ve Peyer plak boyutları küçük kalmıştır.^{24,27} Steril şekilde büyütülen fareler, tek bir mikroorganizma ile kolonize edildiğinde intraepitelyal lenfositlerin ve antijen sunan hücrelerin aktivitesi artarak lokal bağışıklıkta matürasyon sağlandığı gözlenmiştir.²⁸

İntestinal mukozanın yüksek miktarda içerdiği mikroorganizmalar, bağırsak epiteline bağlanmasını ve besin kaynaklarını kullanmasını sınırlayarak patojenleri inhibe etmektedir. Ürettiği laktik asit, kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal

faktörlerle enfeksiyonlara karşı koruma sağlamaktadır.^{24,29} Ayrıca, mikrobiyota elemanları tarafından üretilen KZYA, ortamın pH'sını değiştirerek patojenlerin inhibisyonunu sağlayabilmektedir.³⁰ Örneğin; *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin ürettiği asetat, ortamı asidikleştirilmiş ve Enterohemorajik *Escherichia coli* serotip 0157:H7'yi inhibe etmiştir.³¹

Mikrobiyota elemanları, vücut için gerekli olan biyotin, folat ve vitamin K gibi ürünleri sentezleyerek dolaşıma katılmasını da sağlamaktadırlar.²⁴ Kolondan absorbe edilemeyen karbonhidratlar ve ölü epitel hücreler, intestinal mikrobiyota elemanları tarafından metabolize edilerek bütirat, propiyonat ve asetat gibi KZYA oluşmaktadır. Üretilen KZYA'nın konak üzerinde çeşitli etkileri bulunmaktadır. Epitel hücreleri için enerji kaynağı olduğundan konağın enerji dengesinde önemli rol oynamaktadır.²⁰ Bağırsakta bariyer fonksiyonunu güçlendirmekte ve antiinflamatuvar etki göstermektedir.³¹ Karbonhidratların metabolize edilmesi sırasında su ve tuzun bağırsak tarafından emilmesi indüklenmektedir.²⁹ Ayrıca, oksidatif stresi azaltarak antikanserojenik etki göstermektedir.³¹

2.1.3. Mikrobiyotanın Değişkenliği

Kültüre dayalı çalışmalar, yetişkinlerde çekirdek mikrobiyota olduğunu ve bunu oluşturan türlerin her insanda aynı olduğunu belirtmektedir.³² Kültürden bağımsız metagenomik çalışmalar ise zaman içerisinde ve insan popülasyonları arasında değişkenlik gösterebilen çekirdek mikrobiyota dışında bir mikrobiyota olduğunu göstermiştir.³²

Mikrobiyota içerisinde kişilere özel türler bulunabilmektedir. Çocukluk yıllarında kazanılan bir tür, spesifik mikrobiyota elemanı olabilmektedir. Bu tür, konağa oldukça güçlü bir şekilde uyum sağlayıp varlığını sürdürebilmekte ve mikrobiyotada değişiklik olsa bile yıllarca sabit kalabilmektedir.¹⁸

Mikrobiyotayı hem çeşitlilik hem de miktar yönünden etkileyen ekzojen ve endojen birçok faktör bulunmaktadır. Cinsiyet, yaş, beden kitle endeksi, ırk, yaşanan coğrafya, beslenme alışkanlıkları, yaşam tarzı, doğum şekli, genetik yapı, antibiyotik kullanımı ve geçirilen hastalıklara bağlı olarak mikrobiyotada değişiklikler meydana gelebilmektedir.^{17,33-35}

İntestinal mikrobiyota, anne karnından itibaren şekillenmeye başlamaktadır. İnsanın steril olarak dünyaya gelip bilgisi son yıllarda değişmiş olup amniyon sıvısına, plasentaya ve göbek kordonuna ait bir mikrobiyomun olduğu gösterilmiştir.³⁶ Doğum şekli, beslenme ve kişinin dünyaya geldiği ortam şartları gibi değişkenler mikrobiyotayı etkilemektedir. Hayatın ilk yıllarında anneden vajina, cilt ve feçes mikroorganizmaları alınmaktadır.^{3,37} Yatsunenko ve ark.³⁸'nin yaptıkları çalışmada; bebeklerin mikrobiyotasında, *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin baskın olduğu, çeşitliliğin az olduğu ve erişkin mikrobiyotasına göre daha değişkenliğin fazla olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, bebeklerin mikrobiyomunda, folat sentezinde yer alan enzimleri kodlayan genlerin sunumunun fazla olduğu saptanmıştır. Konaktaki fizyolojik süreç ve çevreden gelen mikroorganizmalar arasındaki etkileşim sonucu mikrobiyota şekillenmektedir.³⁷ Yaş ilerledikçe *Firmicutes* filumuna ait bakteriler artarken, *Bacteroidetes* filumuna ait bakteriler azalmakta ve erişkin mikrobiyotasına dönüşüm olmaktadır.¹⁷

Beslenme alışkanlıklarındaki farklılıklar, intestinal mikrobiyota içeriğini etkilemektedir. Anne sütü ile beslenen bebeklerin intestinal mikrobiyotasında, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin arttığı gösterilmiştir. Mikrobiyotanın bu kompozisyonu, astım ve egzemayı önleyecek şekilde immün sistemin olgunlaşmasını sağlamaktadır.³⁴ Hayvansal yiyeceklerle beslenenlerde, *Alistipes*, *Bilophila* ve *Bacteriodes* cinsleri artarken, *Roseburia* cinsi, *Eubacterium rectale* ve *Ruminococcus bromii* gibi bütirat üreten *Firmicutes* filumuna ait bakterilerin azaldığı saptanmıştır.³³ *Bacteriodes* cinsi bakteriler, protein ağırlıklı hayvansal gıdalarla, doymuş yağ asitleriyle beslenmeyle ilişkilendirilirken; *Prevotella* cinsi bakterilerin, bitkisel ve lifli gıdalarla beslenmeyle ilişkili olduğu gösterilmiştir.³²

2.1.4. Mikrobiyota ve Kanser İlişkisi

Kanser, etiyolojik olarak multifaktoriyal bir hastalıktır. Güncel bilgiler ile intestinal mikrobiyotanın kolorektal kanserin oluşmasında yeni bir faktör olduğu düşünülmektedir.³⁴ Mikrobiyotada meydana gelen değişiklikler, toksin ve kanserojenik maddelerin artışına, epitel bariyerinin harabiyetine ve yararlı metabolitlerin azalmasına neden olabilmektedir. Bu değişiklikler, immün sistem aktivasyonuna neden olarak kronik inflamasyon başlatmaktadır. Aynı zamanda, hücrelerin proliferasyonunda artış meydana getirmektedir.^{15,39}

Mikrobiyotanın ürettiği biyotin, folat gibi düşük molekül ağırlıklı moleküllerin ve KZYA'nın, konakta onkogenleri baskılamak, tümör süpresör genleri aktive etmek, DNA tamirinde rol almak gibi kansere karşı koruyucu etkileri bulunmaktadır. Kanser hastalarında, koruyucu etkileri olan bu maddelerin azaldığı saptanmıştır.³⁴

Kolorektal kanser hastalarının ve sağlıklı kişilerin mikrobiyota içerikleri karşılaştırıldığında farklılıklar saptanmıştır. Kolorektal kanser hastalarının mikrobiyotalarında patojenik mikroorganizmaların sayısı artarken, yararlı mikroorganizmaların sayısının azaldığı gözlenmiştir. *Fusobacterium*, *Enterococcus*, *Peptostreptococcus*, *Collinsella*, *Erysipelotrichaceae*, *Anaerotruncus*, *Campylobacter* cinsleri ve *Escherichia coli*, *Streptococcus gallolyticus* türlerinin KRK'nin ilerlemesinde etkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, KRK hastalarının intestinal mukozasında *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus* ve *Mogibacterium* cinsleri artış gösterirken, *Bifidobacterium*, *Blautia* ve *Faecalibacterium* cinslerinin azaldığı saptanmıştır.³⁴ Son yıllarda *F.nucleatum* ile KRK ilişkisini destekleyen yayınların sayısı artış göstermiştir.^{1,40,41} Castellarin ve ark.⁸'nin yaptıkları çalışmada, *F.nucleatum*'un, KRK dokusunda önemli derecede artmış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, *F.nucleatum* yükünün yüksek olması KRK'nin prognozunun kötü olduğunu gösteren bir belirteç olduğu düşünülmektedir.⁴²

2.2. Kolorektal Kanser

2.2.1. Epidemiyoloji

Kanser, dünyada ve ülkemizde ölüm sebepleri arasında 2. sırada yer almaktadır. Uluslararası kanser araştırma ajansı (IARC)'ın Globocan 2018 yılı verilerine göre 18 milyon yeni kanser vakasının olduğu, 9,6 milyon kişinin kansere bağlı olarak yaşamını yitirdiği tahmin edilmektedir.^{43,44}

Kolorektal kanser, dünya genelinde morbidite ve mortaliteye sebep olan bir kanser türüdür. Erkeklerde akciğer ve prostat kanserlerinden sonra üçüncü, kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci sırada görülmektedir.⁵ Kolon ve rektum kanserinde 2018 yılında toplam yeni vaka sayısının 1,8 milyon olduğu ve 86 bin kişinin bu nedenlerle hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir.⁴³ Yeni KRK tanısı alanların ve KRK nedeniyle ölümlerin sayısı 2030 yılına kadar %60 oranında artması beklenmektedir.⁴⁵

Türkiye Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün 2015 yılında yayınladığı Türkiye kanser istatistiklerine göre KRK, erkeklerde yüz binde 23,1 ve kadınlarda yüz binde 14,4 sıklığındadır. Her iki cinsiyette de üçüncü sırada görülmektedir.⁶

Kolorektal kanser hastalarının yaklaşık %55'inin gelişmiş ülkelerde olduğu saptanmıştır. En yüksek mortalite oranı orta ve doğu Avrupa'da görülmektedir.⁵

2.2.2. Etiyoloji

Kolorektal kanser riskinin yaşla birlikte arttığı saptanmıştır. Sporadik KRK; 40 yaşın altında nadir olarak görülmektedir. İnsidans, 40-50 yaş arasında yüksek olup sonraki her 10 yılda insidans oranları giderek artmaktadır. Cinsiyetin, KRK üzerine etkisi vardır. Mortalite oranının erkeklerde kadınlardan yaklaşık %25 daha yüksek olduğu bulunmuştur. Kadınlarda postmenapozal dönemde proksimal yerleşimli tümörler artış göstermektedir.⁴⁶

Beslenme alışkanlıkları, KRK etiyojisinde oldukça önemlidir. Dünya genelindeki kolorektal kanserlerin %30 ila %50 sinde diyetin neden olduğu düşünülmektedir. Kalsiyumdan, folik asitten, D vitamininden fakir ve lif oranı düşük beslenme alışkanlığı KRK riskini arttırmaktadır. Ayrıca, kırmızı etin fazla tüketildiği beslenme alışkanlıklarında da risk artmaktadır.⁴⁷ Beden kitle indeksinin KRK oluşumuna etkisi bulunmaktadır. Farklı ülkelerden birçok katılımcı üzerinde yapılan bir metaanalizde, obez kategorisindeki kişilerde normal kiloda olanlardan 1,3 kat daha yüksek KRK gelişme riski olduğunu gösterilmiştir.⁴⁸ Alkol ve tütün tüketimi gibi alışkanlıkların KRK kanser oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır. Günde 30 g etanol tüketiminin, KRK geliştirme riskini %16; 45 g etanol tüketiminin riski %41 oranında arttırdığı saptanmıştır. Sigara kullanımı, %18 oranında KRK riski artışına neden olmaktadır.³⁹

Batı toplumlarında bir kişinin hayatı boyunca KRK olma ihtimalinin %3-5 olduğu varsayılmaktadır ve aile öyküsünde kanser olan bireylerde risk daha da artmaktadır. Birinci derecede 50 yaş üstü bir tane akrabada KRK olması durumunda riskin ikiye katlandığı, birinci derecede 50 yaş altında bir akrabada KRK olması durumunda riskin üçe katlandığı bildirilmiştir. Kanserli akraba sayısı arttıkça risk de artmaktadır.⁴⁹

2.2.2.1. İnflamatuvar bağırsak hastalıkları

Kronik inflamatuvar bağırsak hastalıkları olanlarda, olmayan gruplara kıyasla 2-5 kat arasında kanser riski artmaktadır.⁵⁰ Ülseratif kolit tanısından sonraki 8-10 yıl içerisinde kanser riski yükselmektedir. Pankoliti olan hastalarda yüksek risk mevcut iken sol kolonun tutulduğu hastalarda orta derecede risk mevcuttur. Tüm KRK'li hastaların %1'i ülseratif kolit zemininden gelişmektedir.⁵¹ Crohn hastalığında KRK riski artmakla birlikte aile öyküsü, hastalığın süresi ve kolonun tutulum yeri gibi çeşitli faktörlere bağlı risk değişiklik göstermektedir.⁵²

2.2.2.2. Herediter kanser sendromları

Kolorektal kanserlerin sadece % 5-10'u herediter genetik sendromlardan kaynaklanmaktadır. En sık görülen sendromlar, Ailesel Adenomatöz Polipozis, Herediter Non Polipozis Coli'dir. Bu sendromlarda daha erken yaşlarda kanser gelişebilmektedir.⁴⁹

2.2.2.3. Kolorektal kanserin oluşumunda genetik yolaklar

Kolorektal kanser oluşumunda, ilk olarak normal epitel mukozasının proliferasyonu artmaktadır. Aşırı çoğalan intestinal epitel hücreleri organizasyon oluşturma yetisini ve yapısını kaybedip adenom formuna dönüşmektedir. Adenomlar, büyüyüp submukozayı invaze edebilmekte ve kanserleşebilmektedir. 'Adenom-karsinom' sekansı olarak adlandırılan bu heterojen sürece moleküler değişiklikler de eşlik etmektedir. Kromozomal instabilite, mikrosatellit instabilite ve CpG adacık metilatör fenotip şeklinde üç farklı moleküler yolak ile KRK gelişebilmektedir.³⁹

Kromozomal instabilite (CIN) yolağı: En sık görülen yolağıdır. Tüm KRK'lerin %85'inde, sporadik KRK'lerin %70'inde görülmektedir. Onkogen olan *KRAS* ve *c-MYC* genlerinde aktivasyon, tümör süpresör *APC* ve *TP53* genlerinde inaktivasyon meydana gelmektedir.⁵³

CpG ada metilatör Fenotip (CIMP) yolağı: Kolorektal kanser vakalarının %20'sinde görülmektedir. Hipermetilasyon ile *MLH1* gibi tümör süpresör geni inhibe olmakta, onkogen *BRAF* aktive olmaktadır. Hücre proliferasyonu artmaktadır.^{53,54}

MSI (Mikrosatellit instabilite) yolağı: DNA onarımında yer alan *MMR* geninde mutasyon olmaktadır.⁵⁴

2.2.3. Kolorektal Kanser Tanısı

Kolorektal kanser, hastalığın başlangıcında asemptomatik olabilmekte ve asemptomatik hastalar, tarama esnasında tanı alabilmektedir.⁵⁵ Semptomatik hale geldiğinde tümörün yerine göre; kanlı dışkılama, bağırsak alışkanlıklarının değişmesi, demir eksikliği anemisi, kilo kaybı, karın ağrısı ve yorgunluk ile kendini gösterebilmektedir.⁵⁶

2.2.4. Kolorektal Kanser Taraması

Kolorektal kanser, çoğunlukla iyi huylu bir adenomdan gelişmektedir. Normal mukozadan adenom, adenomdan adenokarsinom gelişmesi için geçmesi gereken zaman ortalama 5-10 yıldır.⁵⁵ Preklinik evrenin uzun olması nedeniyle, diğer malignitelere göre daha fazla popülasyonun taranmasına uygundur. Bu durum, KRK'nin erken tanınması için bir fırsattır.⁴⁹

Oldukça yüksek oranda görülen KRK, erken tanındığında beklenen yaşam ömrü belirgin ölçüde artmaktadır. Erken teşhis edilirse, hala lokalize olacağından 5 yıllık sağkalım oranı % 80'nin üzerindedir. Teşhiste gecikme olursa, kanserin evresi ilerleyeceğinden 5 yıllık sağkalım oranı %10'un altına düşmektedir.⁴

Tarama için invaziv ve invaziv olmayan testler mevcuttur. Çoğu ülke ilk basamakta invaziv olmayan bir tarama testi ile invaziv olan kolonoskopi işleminin popülasyon oluşturmaktadır. İnvaziv olmayan testler arasında genelde tercih edilen test gaitada gizli kan testidir.⁴⁹ Bilgisayarlı tomografi de taramada kullanılabilen testlerdendir. Tarama testleri, risk faktörü olmayan 50 yaş üzeri yetişkinler için önerilmektedir.⁵⁷ Risk faktörü olan hastalar, daha erken yaşlardan itibaren daha sık taranmalıdırlar.⁵⁸ Yapılan güncel bir çalışmada, tekrarlayan *Clostridium difficile* enfeksiyonları gibi nedenlerle dışkı transplantasyonu yapılan kişilere KRK'ye neden olan bakterilerin de aktarılabilceği gösterilmiştir. Bu özelliğe sahip hastaların KRK açısından daha sık takip edilmesi önerilmiştir.⁵⁹

2.2.4.1. Kolonoskopi

Kolorektal kanser tanısında ve taramasında altın standarttır. Tümör lokalizasyonunun değerlendirilmesi, eş zamanlı olarak lezyonun patolojik tanısı için örnek alınabilmesi, polibin çıkartıldığı durumlarda tedavi edici etkisi olması gibi avantajları vardır.⁴⁹

2.2.4.2. Gaitada gizli kan testi

Heminin peroksidaz aktivitesine dayalı bir testtir. Diyetle alınan kırmızı etten ve bitkilerdeki peroksidazdan etkilenebilmektedir. Duyarlılığı ve pozitif prediktif değeri sırasıyla %50 ve %3-10'dur.⁶⁰

2.2.4.3. Fekal immünokimyasal test

Diyetle alınan et ile reaksiyona girmez ve sadece insan globülinini tanır. Üst gastrointestinal sistemden olan kanamalarında globin sindirildiği için sadece alt gastrointestinal sistem kanamalarında pozitiflik saptanmaktadır. Testin ardışık olarak tekrarlanmasına gerek yoktur.⁶⁰

2.2.4.4. Serum tabanlı testler

Karsinoembriyjenik antijen (CEA) ve kanser antijeni 19-9 (CA 19-9) testlerinin duyarlılıkları %40-70 arasında ve özgüllükleri %73-90 arasındadır. Tanı testi olarak kullanılması uygun değildir. Sürveyans ve tedavi takibinde kullanılmaktadır.⁵⁵

2.3. *Fusobacterium nucleatum*

2.3.1. Genel Tanımlama ve Sınıflama

Fusobacteriaceae ailesinden *Fusobacterium* cinsine ait olan *Fusobacterium nucleatum*, zorunlu anaerop, spor oluşturmeyen ve hareketsiz bir bakteridir.^{61,62} *F.nucleatum*'un G+C oranı %27-28 arasındadır ve genom uzunluğu $2,4 \times 10^6$ bç'dir.⁶² Gram negatif, fusiform, uzun, ince ve uçları konik şekilli basil yapısındadır. Hücrelerde sferik şişlik bulunmaktadır. Genellikle 5-10 mikrometre uzunluğundadır.⁶³ *F.nucleatum*, üreyebilmek için zenginleştirilmiş besiyerine ihtiyaç duymaktadır. Genellikle triptikaz, pepton, maya özütü içeren ortamlarda daha iyi büyümektedir. Üretilmesi için aminoasit ve peptidlere ihtiyaç duymaktadır.⁶² Anaerop kanlı besiyerinde kolonileri, 1-2 mm çapında, hafif konveks ve

düzensiz kenarlıdır. Kolonilerin içinde karakteristik olarak kristal görüntüsü vardır. Düzensiz kenarları ve kristal yapısı nedeniyle kolonisi ekmek kırıntısına benzetilmektedir.⁶³

Fusobacterium cinsi bakterilerin birçoğu nonfermentatif veya zayıf fermentatiftir.⁶³ Glukozu, hücre içi moleküllerin biyosentezi için kullanıp, enerji metabolizması için kullanmazlar. Enerji sağlamak için aminoasit katabolizmasını kullanan az sayıda anaerobik türden birisidir.⁶² *Bacteriodes*, *Prevotella*, *Porphyromonas* ve *Leptotrichia* cinslerinden bütirik asit üretip, izobütirik asit ve izovalerik asit üretmemesi ile ayrılmaktadır. Birçok türü Vankomisin diskine dirençli iken kolistin ve kanamisin disklerine duyarlıdır. *Fusobacterium* cinsi içerisinde çoğu tür safraya duyarlıdır.⁶³

Fusobacterium cinsi oldukça heterojendir ve 14 adet tür içermektedir. Bunlardan en sık izole edileni ve en çok bilineni *F. nucleatum*'dur. *F. nucleatum*'un *animalis*, *fusiforme*, *vincentii*, *polymorphum* ve *nucleatum* olmak üzere beş tane alt türü bulunmaktadır.^{61,64}

F. nucleatum, normal ağız ve bağırsak mikrobiyotasının bir parçası olmasına rağmen birçok enfeksiyon tablosundan sorumlu bulunmuştur.⁴⁴ Periodonditit ve gingivitte başlıca patojenlerden biridir. Sinüzit, endokardit, septik artrit, tonsillit, beyin, deri ve karaciğer abseleri gibi bir çok enfeksiyon odağından izole edilmiştir.⁶¹ Bu hastalıkların dışında; kardiyovasküler hastalıklar, romatoid artrit, Lemierre sendromu ve Alzheimer gibi geniş spektrumda hastalıklarla ilişkilendirilmiştir.⁶⁵ Gebelik esnasında amniyotik membranı invaze edip düşük ve ölü doğumlara sebep olabileceği gösterilmiştir.⁶¹

2.3.2. Virülans Faktörleri

Fusobacterium nucleatum, çeşitli virülans faktörleri ile birçok yerde enfeksiyona sebep olabilmektedir. Virülans faktörlerinde biri, kolonizasyon ve yayılma diğeri konak immün yanıtının uyarılmasıdır.⁶⁵

2.3.2.1. Kolonizasyon ve yayılma

Fusobacterium nucleatum, adeziv bir bakteridir ve oral kavitede çeşitli mikrobiyal elemanlarla birlikte plak formasyonu oluşturmaktadır. Epitel, endotel, polimorfonükleer lökositler, monosit, eritrosit, fibroblast, HeLa hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücreleri gibi çok çeşitli memeli hücrelerine adeze olabilmektedir.^{65,66} Adezyondan sonra endotel ve

epitel hücrelerini invaze edebilmektedir.⁶⁵ *F. nucleatum*, konak hücresi içerisine girdikten sonra membrana bağlı bir vakoulde canlı kalarak kısa bir süre çoğalmaya devam etmektedir.⁶¹

F.nucleatum'un adezyonundan, FadA, Fap2, RadD, aid1 ve FomA gibi adezinler sorumludur.^{65,67} FadA proteini, kaderinlere bağlanır. Bakteri, FadA ile epitel hücre yüzeyindeki E-kaderine bağlanarak kolonize olmaktadır ve hücre içi ikincil sinyalleri aktive etmektedir.⁶⁶ Endotel kaderini olan, hücre-hücre birleşim molekülü VE-kaderine bağlandıktan sonra endotel geçirgenliğini arttırmaktadır. Bu şekilde hem *F.nucleatum* hem de diğer bakterilerin geçişi kolaylaştırmakta ve yayılmalarına neden olmaktadır. Vücudun farklı yerlerinde meydana gelen kolonizasyonun bu mekanizma ile gerçekleştiği düşünülmektedir.^{26,68,10} RadD adezini, *F.nucleatum*'un farklı bakteriler ile iletişime geçmesini sağlayarak biyofilm oluşumunda rol oynamaktadır.²⁶ FomA adezini, *F.nucleatum*'un diğer bakterilere agrege olmasını kolaylaştıran en önemli proteindir.⁶⁷ *F.nucleatum*'un diğer bir virülans faktörü, dış membran vezikülleridir (OMV). Bu veziküller, E-kaderinlerin yapısının bozulmasına neden olarak, bakteri ve kanser hücrelerinin invazyonu kolaylaştırmaktadır.^{34,26}

2.3.2.2. *F.nucleatum*'un virülans faktörü olarak immün yanıtı uyarması

F.nucleatum, konakta çeşitli immün cevaplara neden olmaktadır. Gebe farelerle yapılan çalışmada, *F.nucleatum*'un TLR-2,TLR-4 aracılığıyla plasentada immün cevabı arttırdığı gösterilmiştir.⁶⁹ İnflamatuvar cevap, TLR-4 antagonisti ile baskılandığında bakteriyel kolonizasyon olsa bile fetüslerde ölüm oranı azalmıştır.⁶⁹ Myeloid kökenli immün hücrelerin sayısını arttırmaktadır ve T hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir.⁷⁰

2.3.3. *F.nucleatum* ve Kolorektal Kanser İlişkisi

Normal şartlarda ağızda ve gastrointestinal sistemde nadir bir mikrobiyota elemanı olan *Fusobacterium nucleatum*, bulunduğu yerin dışına çıktığında veya mikrobiyota dengesinin bozulduğu durumlarda patojene dönüşmektedir.^{10,65} Bağırsakta inflamatuvar mikroçevre oluşturmak, antitümör immün aktiviteyi baskılamak gibi etkileri ve direkt tümör hücreleri üzerindeki etkileri ile kolorektal kanserin başlamasında ve ilerlemesinde rol aldığı düşünülmektedir.¹⁰

F.nucleatum, kanser hücresine yapıştığında onkogenlerin ekspresyonunu ve kanser hücre proliferasyonunu arttırabilmektedir. *F.nucleatum*'un epitel hücrelerine adezyon ve invazyonunu sağlayan FadA adezini, kanserogeneze etkilidir.⁷¹ FadA adezini sayesinde bakteri, Wnt/ β -katenin sinyal yolağını aktive etmektedir. Bu şekilde, bazı onkogen ve regülatuar genlerin transkripsiyonunu değiştirip kanser hücrelerinin proliferasyonunu arttırmaktadır.³⁴ Kanser hücrelerinin büyümesini Ca^{2+} bağımlı fosfolipid bağlayıcı proteinlerden olan Anneksin A1 aktivasyonu yoluyla seçici olarak uyardığı saptanmıştır.⁶⁶ KRK hücrelerinde miRNA-21 ekspresyonunu arttırmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu baskılayan miRNA-21, onkogen gibi fonksiyon göstermektedir.⁷² Tümör mikroçevresinde, hücrelerde mitojen ile aktifleşen protein kinaz p38 aktivasyonu ile matriks metalloproteinaz 9 (jelatinaz) ve 13'ün (kollajenaz) salınımı artmaktadır. Bu metalloproteinazlar tümör hücrelerinin proliferasyonuna ve invazyonuna neden olmaktadır.⁶⁷

F.nucleatum, diğer bakterilerle birlikte kanserleşmeyi başlatabilmektedir. *F.nucleatum*'un güçlü koagregasyon ve taşıyıcı etkisi bulunmaktadır. Normalde invaziv olmayan veya güçsüz mikroorganizmaları Fap2 adezini ile hücre içine taşımaktadır. Bu sayede hücrelerde oluşturduğu toksik etki artmaktadır.^{73,74} Fap2, konak polisakkariti olan Gal-Gal-Nac'ın lektinidir. *F.nucleatum*, Fap2 sayesinde konak polisakkaritine bağlanmaktadır.⁷⁵

F.nucleatum, NF-kB dengesini etkileyerek kanserogeneze neden olmaktadır. TLR-2 ve TLR-4 reseptörleri ile NF-kB'yi aktive ederek, IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olmaktadır.^{44,76} Oluşturulan inflamatuvar mikroçevre epitel ve stromal hücrelerde hasar meydana getirmektedir. Bazı faktörler sayesinde, tümör mikroçevresinde pH değeri 7,4'ten 6,5'e kadar düşmektedir. Bu değişiklik mikrobiyal kompozisyonda değişikliğe neden olmakta ve *F.nucleatum* sayısını arttırmaktadır. *F.nucleatum* çoğalması ile mukozal hasar ve kanserogenez artış göstermektedir.¹⁰

F.nucleatum, immün sistem hücrelerini etkileyerek de kanseri kolaylaştırabilmektedir. Güncel bir çalışmada, tanımlanamayan bir *F.nucleatum* ligandının, NK hücresi ve T hücresinin yüzeyinde bulunan CEACAM 1'e bağlanarak hücrelerin fonksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.⁷⁷ Bu reseptör, tümör hücre yüzeyinde de bulunmaktadır ve tümör

progresyonu, metastaz ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir.⁷² İnflamatuvar komponentlerle tümör mikroçevresi oldukça karmaşık hale gelmektedir. Tümörü infiltre eden T lenfositler, antitümoral etki gösterirken, myeloid kökenli supresif hücreler (MDSCs) ve regülatuvar T hücreleri immün sistemi baskılamaktadır. *F.nucleatum*'un KRK dokusunda MDSC'leri arttırdığı gösterilmiştir. Tümör dokusunu infiltre eden MDSC'ler, immün sistemin antitümöral etkisini ve T hücrelerini inhibe etmektedirler.¹⁰ Gur ve ark.⁷⁸ yaptıkları çalışmada, *F.nucleatum*'un Fap2 adezininin, NK ve T hücrelerinde TIGIT inhibitör reseptörlerine bağlanarak immünsüpresif etki sağladığı gösterilmiştir. *F.nucleatum*'un, RadD ve Fap2 adezinleri ile lenfosit ölümüne neden olduğu saptanmıştır.⁴⁴ *F.nucleatum*, nötrofillerin protümörojenik nötrofil yönünde değişimini sağlayan TGF- β salınımına neden olmaktadır. Böylece, kanser dokusunun büyümesini ve anjiyogenezisi arttırmaktadır. Markofajlar, *F.nucleatum*'un etkisi ile protümörojenik makrofaj yönünde gelişmekte ve tümör mikroçevresine infiltre olmaktadır. Protümörojenik makrofaj, kanserin ilerlemesinde ve metastaz yeteneğinde etkilidir.^{44,79}

2.3.4. *F.nucleatum*'a Karşı Meydana Gelen İmmün Yanıt

Hümmoral bağışıklık, özellikle antikor aracılı yanıt, hücre dışı patojenlere karşı konak savunmasında kilit bir rol oynar.⁸⁰ Bağırsakta bulunan dendritik hücreler, epitel içerisindeki uzantıları ile lümendeki bakterileri doğrudan tanıyabilir. Dendritik hücre, şekil değiştirip ve bakteriyi B lenfositlere sunarak bağırsakla ilişkili lenfoit dokularda (GALT) IgA sentezlenmesini sağlamaktadır.⁸¹ Lokal bağışıklıkta rol oynayan sekretuvar IgA salınımının çoğu GALT'ta olmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile bağırsak mikrobiyotasındaki bakterilerin serum IgA seviyesini arttırdığı bildirilmiştir.⁸⁰ Mikrobiyotanın potansiyel patojen olan elemanları, sağlıklı bir mikrobiyota içerisinde ve kolon bariyeri sağlam iken bile IgG yanıtını uyarabilmektedir. Bu bakterilerin, kan dolaşımına yayılmasına ve sistemik immün tepkinin oluşmasına izin veren virülans faktörleri bulundurmasından dolayı IgG yanıtını uyardığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, mikrobiyotanın dengesinin bozulması ve kolon bariyerinin defektif hale geçmesi IgG üretimini arttırmaktadır. Mikrobiyotadaki bakterilere karşı IgG yanıtının, Crohn, diyabet ve kanser gibi hastalıkları olanlarda daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bu durumun oluşmasındaki en önemli sebep epitel bariyerinin defektif hale gelip bakterilerin translokasyonu olduğu düşünülmektedir.^{80,81}

Mikroorganizmaların antijenleri, in vivo ortamda hümmoral immün sistemi aktive ederek antikor oluşumuna neden olmaktadır.¹¹ *F.nucleatum*'a ait protein yapıları güçlü bir antikor yanıtı oluşturmaktadır. Poliklonal B hücresi aktivasyonu ile, her biri spesifik antikor üreten birden fazla B hücresi klonu uyarılmaktadır. Kronik inflamasyon bölgelerinde *F.nucleatum* antijenlerinin etkisi ile plazma hücreleri birikip, IgG, IgA, IgM üretimi artmaktadır.⁶² Kronik oral enfeksiyonu olan hastalarda, *F.nucleatum*'a karşı hümmoral immün yanıtın arttığı gösterilmiştir.^{62,82}

Enfeksiyon ile ilişkili kanserlerde, enfeksiyon etkenine karşı immün yanıtın değerlendirilmesi kanser taramasında kullanılabileceği düşünülmektedir. Epstein Barr Virüs, Humanpapilloma Virüs ve *Helicobacter pylori*'ye karşı oluşmuş antikorlar, enfeksiyonun teşhisi ve kanser tanısı için kullanılmıştır.¹¹ Kolorektal kanserde, miktarı artan bakterilere karşı oluşan antikorların, kanserin biyobelirteci olabileceği çeşitli çalışmalar ile öne sürülmüştür. Butt ve ark.⁸³ *S.gallolyticus*'a karşı oluşan antikorların kanserleşme belirteci olabileceğini bildirmişlerdir. Wang ve ark.¹¹ *F.nucleatum*'a karşı oluşan antikorların KRK tanısında kullanılabilecek yeni bir belirteç olduğunu savunmuşlardır.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Örneklerin ve Verilerin Toplanması

Çalışmamız, Mayıs 2018 ve Ağustos 2019 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde yapıldı. Gastroenteroloji Bölümü'ne başvurup kolonoskopi kararı alınan hastalardan, kolonoskopiden hemen önce kan örneği ve kolonoskopi sırasında doku örneği alındı. Ayrıca, Genel Cerrahi Bölümü'ne başvurup KRK tanısı konmuş ve tedavi almamış hastalardan ameliyat öncesi kan örneği alındı. ELISA çalışmasına 22 KRK hastasından, 35 benign kolon hastalığı olan kişiden ve 21 sağlıklı gönüllüden alınan serumlar dahil edildi. Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (kPZR) çalışmasında 15 KRK hastasına, 26 benign kolon hastalığı olan hastaya ait lezyon ve normal mukoza dokuları analiz edildi. Hastaya ait bilgiler, hastadan ve Hastane Bilgi Yönetim Sistemi'nden (Nucleus, Monad Yazılım) sağlandı. Hastalara çalışma hakkında bilgi verilerek aydınlatılmış onamları alındı. Çalışmaya katılmayı kabul edenler çalışmaya alınıp, reddedenler dahil edilmedi. Gastroenteroloji Bölümü'ne başvuran hastalara ait örneklerin akış şeması 1. Çizim'de gösterildi.

3.1.1. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (kPZR) Çalışması

Kolonoskopi sırasında kanser şüphesi olan lezyonlardan alınan biyopsi örneklerinin bir bölümü patoloji laboratuvarına gönderilirken, bir bölümü de çalışma için alındı. Biyopsi alınan lezyonlu hastanın, sağlıklı mukoza dokusundan ikinci doku örneği alınarak kontrol grubu oluşturuldu. Patoloji raporuna göre malignite saptanan hastalar, KRK çalışma grubuna; benign kolon lezyonu (adenomatöz polip, hiperplastik polip, kronik inflamasyonlu doku) saptanan hastalar, benign kolon hastalığı çalışma grubuna alındı.

3.1.2. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) Çalışması

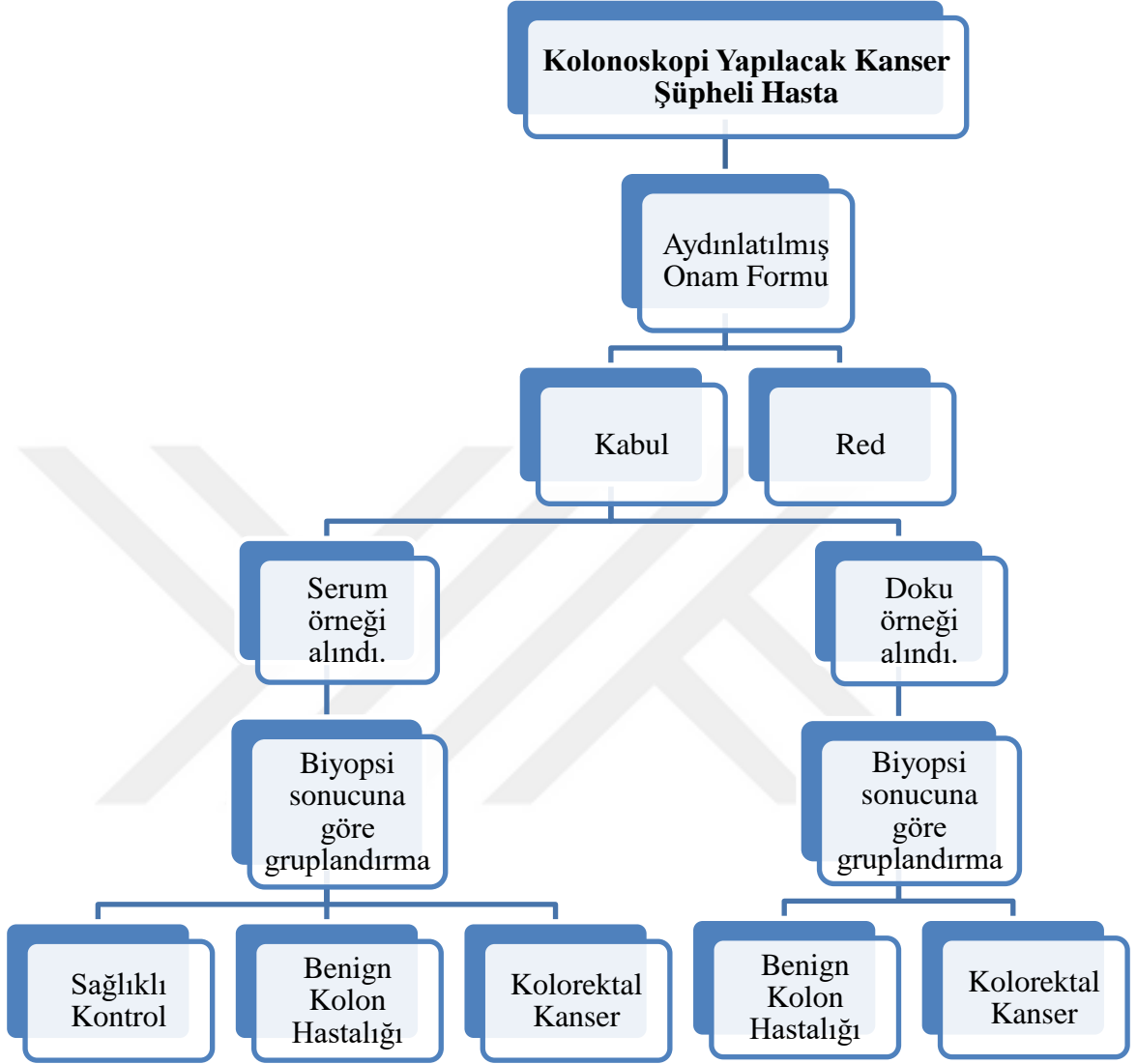
Kan örnekleri, bir enjektörle periferik venden aseptik şartlarda alındı. Alınan örnekler, en kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı. Kolonoskopi yapılan ve patoloji raporu ile KRK olduğu kesinleşen, cerrahi müdahale yapılmamış hastalardan KRK çalışma grubu oluşturuldu. Kolonoskopi yapılan ve patoloji raporu ile benign kolon lezyonu saptanan hastalar, benign kolon hastalıkları grubuna alındı. Sağlıklı kontrol grubu ise kolonoskopi ile incelendiğinde herhangi bir patolojik bulgusu olmayan kişilerden oluşturuldu.

3.1.3. Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri

Kolorektal kanser teşhisi konulmuş, tedaviye yönelik herhangi bir işlem yapılmamış hastalar çalışmaya alındı. Kolorektal kanser tanısına yönelik radyoterapi veya kemoterapi almış hastalar ve cerrahi müdahale ile kanser dokusu çıkarılmış olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Ayrıca, KRK dışında başka bir kanser tanısı bulunanlar çalışmaya dahil edilmedi.



1. Çizim. Akış Şeması *



*Gastroenteroloji Bölümü'ne başvurup kolonoskopi yapılmasına karar verilen hastalar.

3.2. Örneklerin Saklanması

3.2.1. Doku Örneklerinin Saklanması

Doku örnekleri, kolonoskopi ile alındı. Örneklerin temizlenmesi için, steril fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra dokular -80°C'de saklandı. Çalışmadan hemen önce dondurucudan çıkartılan dokular oda ısısına gelinceye kadar bekletildi.

3.2.2. Serum Örneklerinin Saklanması

Kan örnekleri, 4000 devirde 15 dakika (dk) santrifüj edildikten sonra serumları ayrı bir tüpe aktarıldı. Serumlar, miktarına göre üç veya daha fazla porsiyonlar halinde, her porsiyonda en az 200 mikrolitre (μ l) olacak şekilde -80°C'de saklandı. Çalışma yapılmadan hemen önce serumlar dondurucudan çıkartılarak oda ısısına gelmesi beklendi. Çözünen örnekler, tekrar dondurulmadı ve atıldı.

3.3. ELISA Çalışması

3.3.1. Ayıraçlar ve Malzemeler

3.3.1.1. Steril fosfat tampolu tuz çözeltisinin (PBS) hazırlanması

Ticari olarak satın alınan 0,14 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,01 M PO_4^{3-} içerikli kimyasal, üretici firmanın (Euroimmun, Almanya) tarif ettiği şekilde 1000 mililitre (ml) steril deiyonize su ile hazırlandı. Hazırlanan tamponun pH'sı, pH metre ile oda ısısında (25°C), 7,4 olarak ayarlandı. Otoklavda, 121°C'de 15 dk steril edildi. Bir aydan uzun olmayacak şekilde +4°C'de saklandı.

3.3.1.2. Tween 20 içeren fosfat tamponlu tuz çözeltisinin (PBS-T) hazırlanması

PBS olarak bilinen fosfat tamponlu tuz çözeltisinin içerisine Tween 20 adı verilen iyon bulundurmayan bir deterjan eklendiğinde PBS-T tampon adını almaktadır. PBS-T tamponu ELISA ve Western blot gibi testlerin uygulanmasında istenmeyen, spesifik olmayan bağlanmaları ve protein-protein etkileşimini engellediği için testlerin doğru çalışmasını

sağlamaktadır. Bu sayede, özgül olmayan bağlanmalar ve boyanmalar azaldığından ELISA sonuçları daha kolay yorumlanmaktadır.

PBS içerisine son konsantrasyonu %0,05 olacak şekilde Tween 20 (Merck, Almanya) PBS-T elde edildi. Hazırlanan tampon bir aydan uzun olmayacak şekilde +4°C’de saklandı.

3.3.1.3. Karbonat-Bikarbonat ($\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$) tamponunun hazırlanması

Kaplama tamponu olarak kullanılan çözeltiyi hazırlamak için, 500 ml distile su içerisinde 1,59 g Na_2CO_3 (Merck, Almanya) ve 2,93 g NaHCO_3 (Sigma-Aldrich, Almanya) çözüldü. Tamponun pH’ı, pH metre yardımıyla oda ısısında 9,6’ya ayarlandı. Tampon hacmi distile su ile 1000 ml’ye tamamlandı ve 0,05 M karbonat-bikarbonat tamponu elde edildi. Tampon, +4°C’de 2 haftayı aşmayacak şekilde muhafaza edildi.⁸⁴

3.3.1.4. Bloklama tamponunun hazırlanması

PBS-T’e, %1 konsantrasyonunda olacak şekilde yağsız süt tozu (BIO-RAD, ABD) eklenerek hazırlandı.

3.3.1.5. Enzim Konjugat

Bağlı antikörlerin belirlenmesi için horseradish peroksidaz enzimi ile işaretli anti-insan IgA ve IgG (Euroimmun, Almanya) kullanıldı.

3.3.1.6. Kromojen/Substrat

Substart olarak tetrametilbenzidin (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı.

3.3.1.7. Sülfürik asit solüsyonunun hazırlanması

Stop solüsyonu olarak kullanılarak sülfürik asit (H_2SO_4) solüsyonunu hazırlamak için, 75 ml distile su üzerine molaritesi (M) yaklaşık 18 M olan saf H_2SO_4 (Merck, Almanya) 8,416 ml damla damla eklendi. Asit eklendikten sonra hacim distile su ile 300 ml’ye tamamlandı. Son konsantrasyonu 0,5 M olan H_2SO_4 solüsyonu oda ısısında karanlıkta muhafaza edildi.

3.3.1.8. ELISA plakları

Çalışmada, 96 kuyucuklu, fotometrenin okumasına izin verecek şekilde düz tabanlı ve yüksek protein bağlama özelliği olan polistiren yapıda plaklar (Greiner Bio-One, Almanya) kullanıldı.

3.3.2. Hasta Örneklerinin Hazırlanması

Hasta serumu, IgA antikorunun saptanacağı ELISA için 1/1000 oranında, IgG antikorunun saptanacağı ELISA için 1/4000 oranında örnek tamponu (Euroimmun, Almanya) içerisinde dilüe edildi.

Dilüsyonların hazırlanması:

IgA'nın saptandığı çalışma için, 100 µl hasta serumu 900 µl örnek tamponu ile steril cam tüp içerisinde karıştırıldı. Elde edilen 1ml karışım, 9 ml örnek tamponuna eklenerek 1/100 dilüsyon oranı sağlandı. Bu dilüsyon tekrar 1/10 dilüe edilerek 1/1000 oranında serum içeren örnek tamponlu karışım elde edildi.

IgG'nin saptandığı çalışma için, hasta serumu yukarıda anlatıldığı gibi 1/100 oranında dilüsyon elde edildi. Hazırlanan dilüsyondan 1ml karışım alınarak 39 ml örnek tamponu içeren tüpe eklendi ve 1/4000 oranında serum içeren örnek tamponlu karışım elde edildi.

3.3.3. ELISA Plaklarını Yıkama Prosedürü

Yıkama işlemleri, yıkama cihazı (Diagnostic Automation, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Yıkama tamponu olarak PBS-T kullanıldı. Her bir kuyucuk 400 µl yıkama tamponu ile 3 defa yıkandı. Kuyucuklarda kalabilecek rezidüe sıvı absorbans değerinin yanlış şekilde düşük olmasına neden olacağından yıkama işlemi tamamlandıktan sonra kuyucukların kurutulması için plaklar ters çevrilerek 3- 4 defa hafif sertlikte düz bir zeminde kurutma kağıdına vuruldu. Bu şekilde rezidüe sıvı kalması önlendi.

3.3.4. Bakteri Kültürü

ELISA plaklarını kaplamak için, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 suşu kullanıldı. Suş, %5 koyun kanlı Columbia agarda (BioMérieux, Fransa) anaerop ortamda, 37°C'de, 48 saat inkübe edilerek üretildi.

3.3.5. ELISA Kitinin Hazırlanması

3.3.5.1. Bakterinin ısıyla inaktive edilmesi

Steril PBS içerisinde, 0,5 McFarland bulanıklığında *F.nucleatum* süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan süspansiyon, 56°C'de 30 dk kuru ısıtıcı blok (Eppendorf, ThermoStat Plus, Almanya) içerisinde inkübe edilerek, bakteri inaktive edildi.⁸⁵ İnaktivasyon işleminin doğruluğu, bakterilerin %5 koyun kanlı Columbia agarda, anaerob ortamda ürememesi ile kontrol edildi.

3.3.5.2. Kaplama solüsyonunun hazırlanması

Isı ile inaktive edilen bakteri süspansiyonu, 14.000 devirde 30 dk santrifüj edildi. Dipteki bakteri pelletine dokunmadan PBS dikkatlice pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Bakteri pelleti, kaplama tamponu olan karbonat-bikarbonat tamponu içerisinde süspansiyon edilerek vorteks yardımıyla bakterinin homojenizasyonu sağlandı.

3.3.5.3. ELISA plaklarının kaplanması

Kaplama İşlemi:

Bakteri içeren kaplama solüsyonu, tüm kuyucuklarda 100 µl olacak şekilde pipetlendi. ELISA plakları, +4°C'de bir gece boyunca inkübe edilerek bakterilerin kuyucuklara bağlanması sağlandı. İnkübasyon sonrası, kuyucukların tabanında kaplanan bakterilere dokunmadan sıvı aspire edildi. ELISA testi Wang ve ark.¹¹ çalışmasından modifiye edilerek yapıldı.

Bloklama İşlemi:

Bloklama işlemi için, kuyucuklara 200'er µl bloklama tamponu pipetlendi ve 2 saat oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, kuyucuklar, 3 kez yıkama prosedürüne uygun olarak yıkandı.

3.3.6. ELISA akış şeması

Örneklerin inkübasyonu:

Dilüe edilmiş örneklerin her biri, kuyucuklara 100'er µl pipetlendikten sonra 37°C'de, karanlıkta, 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, tüm kuyucuklar yıkama prosedürüne göre yıkandı.

Enzim Konjugat inkübasyonu:

Her bir kuyucuğa 100 µl enzim konjugat pipetlendi. Karanlıkta ve 37°C'de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında yıkama işlemi prosedüre uygun şekilde yıkandı.

Substrat inkübasyonu:

Her bir kuyucuğa 100 µl substrat solüsyonu pipetlendi. Oda ısısında ve karanlıkta 15 dk inkübe edildi.

Reaksiyonun durdurulması:

Reaksiyonu durdurmak için her bir kuyucuğa 100 µl substratın eklendiği sıra doğrultusunda stop solüsyonu eklendi.

Ölçüm:

Reaksiyon sonrası oluşan renk yoğunluğu, cihaz (Triturus, İspanya) yardımıyla ölçüldü. Bu işlem, 450 nm dalga boyunda ve 620-650 nm referans dalga boyunda yapıldı. Reaksiyonunun durdurulmasından sonra 30 dk içerisinde ölçüm yapılmasına dikkat edildi. Ölçümden önce, plak hafif bir şekilde çalkalanarak boyanın solüsyonda homojen dağılması sağlandı.

Sonuçların hesaplanması:

Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen OD değerleri kaydedildi.

3.4. kPZR Çalışması

3.4.1. Deoksiribonükleik Asit İzolasyonu

Toplanan doku örneklerinden deoksiribonükleik asit (DNA) izolasyonu, QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) ile üreticinin talimatlarına uygun olarak yapıldı. İzolasyon işlemi aşağıdaki prosedüre göre gerçekleştirildi.

3.4.1.1. İzolasyon basamakları

1. Örnekler, bistüri ile parçalandı ve parçalar mikrosantrifüj tüpüne kondu. Üzerlerine, 180 µl “Tissue lizis” tamponu ile 20 µl “Proteinaz K” eklendi. Hazırlanan solüsyon 56°C’de bekletilirken, aralıklarla dokuların lizis işlemini hızlandırmak için vortekslendi. İnkübasyon bir gece boyunca devam ettirildi.
2. İnkübasyondan sonra parçalanmış dokuların üzerine 200 µl “AL” tamponu eklendi. Karışım 15 saniye vortekslendikten sonra 70°C’de 10 dakika inkübe edildi.
3. Karışımın üzerine %96-100 konsantrasyonunda 200 µl etanol eklendi. Karışım filtreli tüpe alındı, 8000 devirde 1 dk santrifüj edildi. Filtreli tüpün altındaki kollektör tüp yenisiyle değiştirildi. Tüm solüsyonun geçmesi için işlem tekrarlandı.
4. Filtreli tüpe 500 µl “AW1” tamponu pipetlendi, 8000 devirde 1 dk santrifüj edildi. Kollektör tüp yenisiyle değiştirildi ve 500 µl “AW2” tamponu eklendi. Yaklaşık 14.000 devirde 3 dk santrifüj edildikten sonra kollektör tüp yenisiyle değiştirildi. En yüksek devirde 1 dk santrifüj işlemi tekrar edildi.
5. Filtreli tüp, 1,5 ml mikrosantrifüj tüp içerisine kondu ve üzerine 200 µl elüsyon tamponu eklendi. Oda ısısında 5 dk inkübe edildikten sonra, 8000 devirde 1 dk santrifüj edildi. Filtreli tüp atıldı ve dipte toplanan DNA içeren sıvı, çalışma yapılarına kadar -15°C ila -30°C arası bir ısıda saklandı.

3.4.1.2. Doku örneklerindeki DNA miktarının ölçülmesi

Doku örneklerinden izole edilen DNA'ların miktarı, nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific, Nanodrop 1000 Spektrofotometre) ile saptandı. Elüsyon tamponu içerisinde çözülen DNA süspansiyonundan 2,5 µl kadar cihaza pipetlendi ve DNA miktarı ölçüldü. Tüm örnekler için aynı işlem yapıldı. Ölçümler arasında örneğin pipetlendiği kısım silindi.

3.4.2. kPZR İşlemi

Bakterinin 16S rRNA bölgesine spesifik primerleri ve probu içeren ticari bir kit (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Kitin içerisinde, Mikrobiyal kPZR Master karışımı, Mikrobiyal DNA kPZR Assay (primer karışımı), Mikrobiyal DNA içermeyen su ve *F.nucleatum*'a ait 2×10^4 kopya DNA/µl içeren solüsyon bulunmaktaydı.

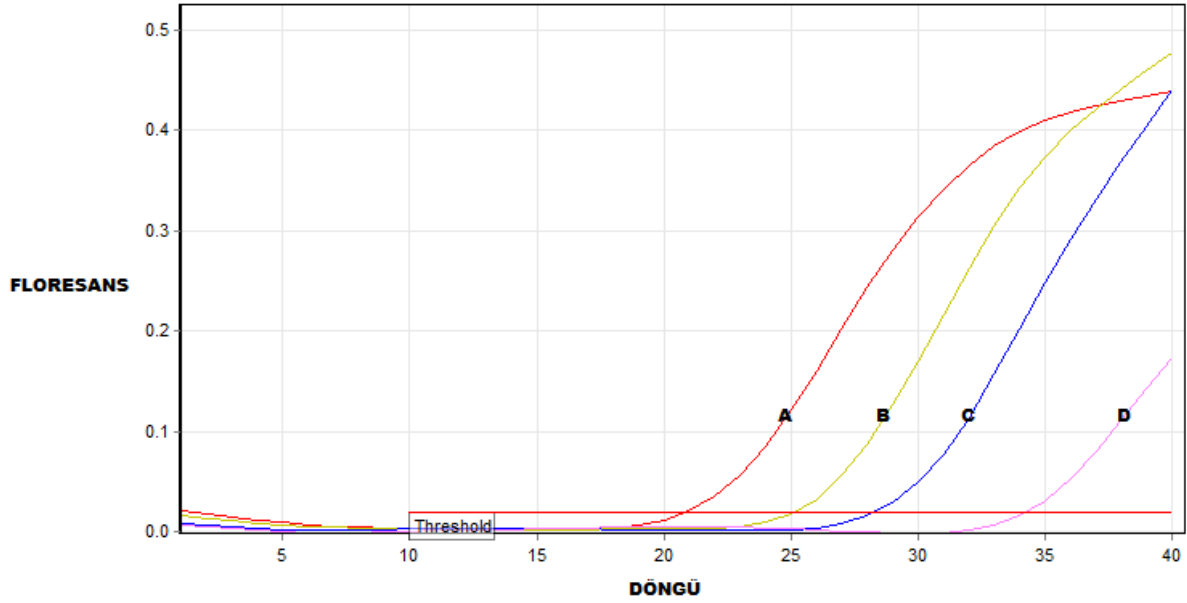
3.4.2.1. Standart eğrinin oluşturulması

Bakteri kopya sayısını değerlendirebilmek için standart eğri oluşturuldu. *F.nucleatum*'a ait 2×10^4 kopya DNA/µl içeren solüsyondan (Qiagen, Almanya) kopya sayısını bildiğimiz standartlar oluşturuldu. Başlangıçta, 2×10^4 kopya DNA/µl içeren standart, ½ oranında nükleik asit içermeyen su ile karıştırıldı ve 10^4 kopya DNA/µl içeren standart elde edildi. 10^4 kopya DNA/µl içeren standarttan logaritmik seri dilüsyonlar yapılarak 10^3 , 10^2 ve 10^1 kopya DNA/µl standartları hazırlandı. En yüksek kopya sayısını içeren standardı elde etmek için, kPZR karışımı içerisine 1. Çizelge'de gösterildiği gibi 2×10^4 kopya DNA/µl solüsyonundan 5µl konularak 10^5 kopya içeren standart elde edildi. Diğer standartlar için, 1.Çizelge'de gösterilen şekilde kPZR karışımı hazırlandı. Tüm standartların amplifikasyonu, 2. Çizelge'de yer alan ısı döngüleri ile RotorGene Q (Qiagen,Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Standart eğri için en iyi verimlilik (E) ve eğim (m) değerlerinin saptandığı 10^5 , 10^4 , 10^3 ve 10^1 standartları kullanıldı. Standartlara ait amplifikasyon eğrileri 2. Çizim'de gösterildi. Bu standartların amplifikasyonu sonucu elde edilen Ct değerlerinden geçen bir standart eğri oluşturuldu. Oluşturulan bu standart eğrinin, E değeri 1.01, m değeri -3.292 olarak saptandı (3. Çizim).

1. Çizelge. Standartların kPZR karışımları.

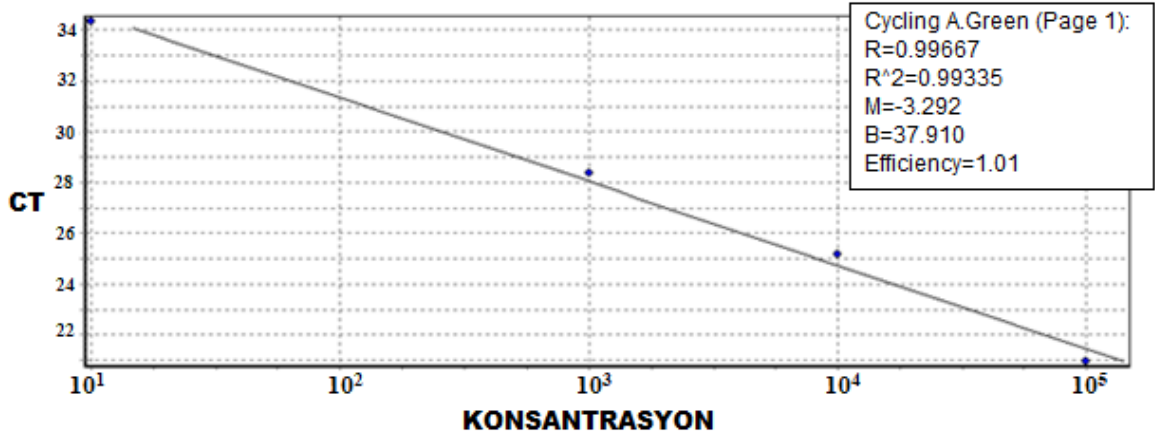
Bileşenler	Standartlar için tek reaksiyon hacmi (µl)	
	$10^1 - 10^4$	10^5
Mikrobiyal kPZR Master karışımı	10	10
Mikrobiyal DNA kPZR Assay	0,8	0,8
Mikrobiyal DNA içermeyen su	8,2	3,2
Standartlar	1	5
Total hacim	20	20

2. Çizim. Standartların amplifikasyon eğrileri.



- A. 10^5 Kopya
- B. 10^4 Kopya
- C. 10^3 Kopya
- D. 10^1 Kopya

3. Çizim. kPZR’de kullanılan standart eğri.



3.4.2.2. *Fusobacterium nucleatum*'un miktarının saptanması

Her örnek için 10 µl Mikrobiyal kPZR Master karışımı, 0,8 µl Mikrobiyal DNA kPZR Assay (Primer karışımı), 50 ng DNA örneği ve DNA örneğine göre değişen miktarlarda mikrobiyal DNA içermeyen su içeren total hacmi 20 µl olan kPZR karışımı hazırlandı. Karışım, 200 µl'lik mikrosantrifüj tüpleri içerisinde ve soğuk blok üzerinde hazırlandı. Amplifikasyon şartları, 2.Çizelge'de gösterildiği şekilde oluşturuldu. Reaksiyon, RotorGene Q (Qiagen,Almanya) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Doku örneklerindeki bakteriye ait gen bölgesinin kopya sayısı standart eğri kullanılarak hesaplandı. Örneklerle ait Ct değerlerinin standart eğriyi kestiği noktaya karşılık gelen kopya sayısı, örneklerdeki *F.nucleatum* miktarı olarak belirlendi.

2. Çizelge. kPZR döngüleri.

Basamak	Döngü Sayısı	Süre	Sıcaklık
Başlangıç denatürasyonu	1	10 dk	95 °C
Denatürasyon	40	15 s	95 °C
Bağlanma ve uzama	40	2 dk	60 °C

3.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) paket programı ile yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğunun araştırılmasında Kolmogorov-Smirnov Testi kullanıldı. Dokudan elde edilen bakteri sayıları, sıfır değerinin kayıp değer olarak işlem görmesini engellemek için logaritma 10 tabanına artı bir düzeltme ile çevrildi. Bakteri sayılarının karşılaştırılmasında bağımlı gruplar için t testi kullanıldı. ELISA sonuçları OD değerlerine göre kaydedildi. İki grubun arasındaki farkın belirlenmesinde Mann Whitney U testi kullanıldı. ELISA testinin seçicilik ve duyarlılığının belirlenmesi ve buna bağlı olarak bir sınır değer önerilmesi için ROC (Receiver Operating Characteristics) eğrisi analizi yapıldı. IgA ve IgG arasındaki ilişki, Pearson korelasyon testi ile belirlendi. P değeri 0,05'in altında olanlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

3.6. Etik Kurul Onayı

Çalışma için Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan etik kurul onayı alındı (Tarih:29.03.2018 Karar no:2018/134). Projede kullanılacak kitlerin temini için Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine Tıpta uzmanlık Tez projesi desteği için başvuruldu. Proje, ilgili birim tarafından onaylanıp yürürlüğe girdi (Proje No:2018/090).

4. BULGULAR

4.1. Demografik veriler

4.1.1. kPZR Çalışması

Kolorektal kanseri olan hastaların 10/15'i (% 66,7) kadın, 5/15'i (% 33,3) erkek ve yaş ortalaması $70,1 \pm 10,2$ (54-88) olarak bulundu. Benign kolon hastalığı grubundakilerin 11/26'sı (% 42,3) kadın, 15/26'sı (%57,7) erkek ve yaş ortalaması $58,9 \pm 15,7$ (30-86) olarak belirlendi.

4.1.2. ELISA Çalışması

Kolorektal kanser grubunda bulunan 22 hastanın yarısı kadın, diğer yarısı erkek ve yaş ortalaması $65,8 \pm 15,1$ (22-88) olarak bulundu. Benign kolon hastalıkları olanların 16/35'i (% 45,7) kadın, 19/35'i (% 54,3) erkek ve ortalama yaş $57,9 \pm 14,8$ (30-86) olarak bulundu. Kontrol grubunda olan sağlıklı kişilerin 12/21'si (% 57,1) kadın, 9/21'i (%42,9) erkek ve ortalama yaş $55,3 \pm 17,9$ (20-84) olarak saptandı.

4.2. kPZR Çalışması Sonuçları

Kolonoskopi yapılan hastanın lezyon yerinden ve yakınındaki normal mukoza dokusundan alınan biyopsi örneğinde *F.nucleatum* sayısı kPZR ile belirlendi. Bazı hastalara ait kanser ve normal mukoza dokusu örneklerinin kPZR analizi ile elde edilen amplifikasyon eğrileri 4. Çizim'de gösterildi. Veriler, logaritma 10 tabanına çevrildikten sonra istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Kanser dokusu biyopsi örneklerinin 13/15'inde (%86,6) ve normal mukoza dokusu biyopsi örneklerinin 10/15'inde (%66,6) *F.nucleatum* pozitif saptandı. Kanser dokusundan alınan biyopsi örneklerindeki ortalama *F.nucleatum* sayısı ($2,8550 \pm 2,1283 \log_{10}$ kopya/50 ng DNA), normal mukoza dokusundan alınan biyopsi örneklerindeki ortalama sayısına göre ($1,6283 \pm 1,4662 \log_{10}$ kopya/50 ng DNA) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$). Kanser ve normal mukoza dokusu biyopsi örneklerine ait bakteri kopya sayıları 3. Çizelge'de gösterildi.

Benign kolon hastalığı lezyon dokusu biyopsi örneklerinin 19/26'sında (%73) ve normal mukoza dokusu biyopsi örneklerinin 15/26'sında (%58) *F.nucleatum* pozitif saptandı. Benign kolon hastalığı lezyon dokusu ($1,3316 \pm 1,0494 \log_{10}$ kopya/50 ng DNA) ile normal mukoza dokusu biyopsi örneklerindeki ortalama *F.nucleatum* sayısı ($1,0862 \pm 1,0856 \log_{10}$ kopya/50 ng DNA) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Lezyon ve normal mukoza dokusu biyopsi örneklerine ait bakteri kopya sayıları 4. Çizelge'de gösterildi.

3. Çizelge. KRK grubunun kanser ve normal mukoza dokularındaki *F.nucleatum* kopya sayıları (Bakteri sayısı/50 ng DNA).

Hasta No	Kanser Dokusu		Sağlıklı Doku	
	Sayı	Sayı (\log_{10}^*)	Sayı	Sayı (\log_{10}^*)
1.	2660177	6,4249	5400	3,7325
2.	89	1,9542	107	2,0334
3.	2372838	6,3753	0	0,0000
4.	372389	5,5710	17612	4,2458
5.	25329	4,4036	17	1,2553
6.	0	0,0000	0	0,0000
7.	552	2,7427	18	1,2788
8.	555	2,7451	628	2,7987
9.	2	0,4771	0	0,0000
10.	286	2,4579	28	1,4624
11.	4449	3,6484	360	2,5575
12.	11	1,0792	0	0,0000
13.	0	0,0000	0	0,0000
14.	40	1,6128	54	1,7404
15.	2152	3,3330	2088	3,3199

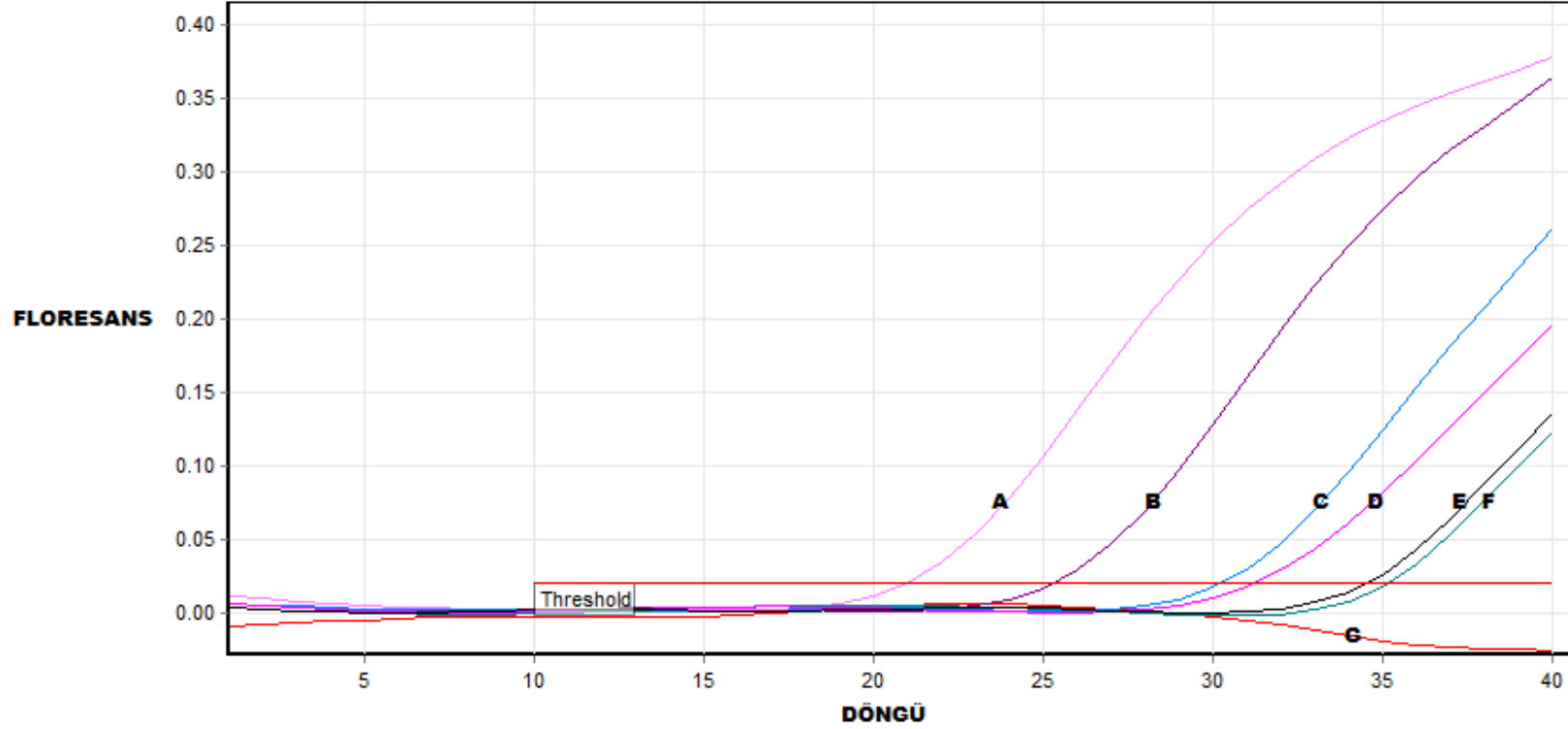
*: $\log_{10}(\text{kopya sayısı}+1)$ şeklinde düzeltme yapıldı.

4. Çizelge. Benign kolon hastalıkları grubunun lezyon ve normal mukoza dokularındaki *F.nucleatum* kopya sayıları (Bakteri sayısı/50 ng DNA).

Hasta No	Lezyon Dokusu		Sağlıklı Doku	
	Sayı	Sayı (log10 [*])	Sayı	Sayı (log10 [*])
16.	117	2,0719	483	2,6848
17.	9	1,0000	0	0,0000
18.	7	0,9031	0	0,0000
19.	11	1,0792	57	1,7634
20.	24	1,3979	4	0,6990
21.	29	1,4771	0	0,0000
22.	99	2,0000	29	1,4771
23.	0	0,0000	0	0,0000
24.	9	1,0000	74	1,8751
25.	124	2,0969	231	2,3655
26.	975	2,9894	2126	3,3278
27.	67	1,8325	0	0,0000
28.	0	0,0000	0	0,0000
29.	0	0,0000	39	1,6021
30.	32	1,5185	0	0,0000
31.	0	0,0000	0	0,0000
32.	0	0,0000	0	0,0000
33.	0	0,0000	58	1,7709
34.	0	0,0000	6	0,8451
35.	7	0,9031	102	2,0128
36.	96	1,9868	16	1,2304
37.	1278	3,1069	73	1,8692
38.	26	1,4314	0	0,0000
39.	688	2,8382	84	1,9294
40.	49	1,6990	0	0,0000
41.	1948	3,2898	615	2,7896

*: log10(kopya sayısı+1) şeklinde düzeltme yapıldı.

4. Çizim. kPZR sonrası elde edilen bazı KRK hastalarının kanser ve normal mukoza dokularındaki *F.nucleatum*'a ait amplifikasyon eğrileri.



- A. 4 No'lu KRK hastasının kanser dokusu
- B. 4 No'lu KRK hastasının normal mukoza dokusu
- C. 7 No'lu KRK hastasının kanser dokusu
- D. 10 No'lu KRK hastasının kanser dokusu
- E. 10 No'lu KRK hastasının kanser normal mukoza dokusu
- F. 7 No'lu KRK hastasının normal mukoza dokusu
- G. Negatif Kontrol

4.3. ELISA Çalışması Sonuçları

Her bir hasta serumunda ELISA IgA ve IgG testleri üç defa çalışıldı. Her bir ölçüm sonucundan elde edilen optik dansite (OD) değerinin ortalaması ve standart sapma (SS) değeri hesaplandı. *F.nucleatum*'a karşı hastada meydana gelen antikor seviyesinin kolorektal kanseri göstermede kullanılabilecek bir özelliğinin olup olmadığı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasıyla ortaya çıkartıldı. Bu sonuçlara göre sınır değer belirlemek için ROC eğrisi analizi yapıldı.

4.3.1. IgA antikorları

Kolorektal kanser hastalarının serumlarındaki ELISA IgA sonuçları, 5. Çizelge'de gösterildi. Sağlıklılarına ait serumlardaki ELISA IgA sonuçları, 7. Çizelge'de gösterildi. KRK hastalarına ait serumlarda, *F.nucleatum*'a karşı oluşan ortalama IgA OD değeri ($0,636 \pm 0,376$), sağlıklı kişilere ait serumlardaki ortalama IgA OD değerinden ($0,411 \pm 0,268$) istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla bulundu ($p < 0,05$).

Benign kolon hastalıkları olanların serumundaki ELISA IgA sonuçları, 6. Çizelge'de gösterildi. Benign kolon hastalıkları olan kişilere ait serumlarda, *F.nucleatum*'a karşı oluşan ortalama IgA OD değeri ($0,516 \pm 0,238$), sağlıklı kişilere ait serumlardaki ortalama IgA OD değeri ($0,411 \pm 0,268$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$).

Kolorektal kanser hastalara ait serumlarda, *F.nucleatum*'a karşı oluşan ortalama IgA OD değeri ($0,636 \pm 0,376$), benign kolon hastalıkları olanlara ait serumlardaki ortalama IgA OD değeri ($0,516 \pm 0,238$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$). Gruplara göre ELISA IgA testiyle elde edilen OD değerlerinin ortalamaları 5. Çizim'de gösterildi.

5. Çizelge. KRK grubunun ELISA IgA ölçüm sonuçlarına göre OD değerleri ve üç ölçümün ortalaması.

Hasta No	1.Ölçüm	2. Ölçüm	3. Ölçüm	Ortalama	Standart Sapma
1.	0,348	0,263	0,177	0,263	0,086
2.	0,409	0,307	0,177	0,298	0,116
3.	1,507	0,731	0,722	0,987	0,451
4.	1,713	0,821	1,111	1,215	0,455
5.	0,979	0,546	0,386	0,637	0,307
6.	1,108	0,497	0,302	0,636	0,421
7.	1,685	0,807	0,998	1,163	0,462
8.	0,539	0,329	0,215	0,361	0,164
9.	0,936	0,498	0,449	0,628	0,268
10.	1,738	0,853	1,12	1,237	0,454
11.	0,522	0,319	0,224	0,355	0,152
12.	0,361	0,241	0,169	0,257	0,097
13.	0,541	0,263	0,256	0,353	0,163
14.	0,644	0,334	0,243	0,407	0,210
15.	0,472	0,227	0,163	0,287	0,163
16.	1,498	0,769	0,663	0,977	0,455
17.	0,356	0,497	0,363	0,405	0,079
18.	0,334	0,166	0,12	0,207	0,113
19.	1,774	0,85	1,161	1,262	0,470
20.	1,484	0,754	0,837	1,025	0,400
21.	0,413	0,206	0,144	0,254	0,141
22.	1,166	0,601	0,581	0,783	0,332

6. Çizelge. Benign kolon hastalıkları grubunun ELISA IgA ölçüm sonuçlarına göre OD değerleri ve üç ölçümün ortalaması.

Hasta No	1.Ölçüm	2. Ölçüm	3. Ölçüm	Ortalama	Standart Sapma
23.	0,856	0,392	0,224	0,491	0,327
24.	0,359	0,152	0,111	0,207	0,133
25.	0,452	0,323	0,346	0,374	0,069
26.	0,661	0,42	0,366	0,482	0,157
27.	0,215	0,134	0,199	0,183	0,043
28.	0,804	0,384	0,827	0,672	0,249
29.	1,473	0,768	0,206	0,816	0,635
30.	0,517	0,301	0,157	0,325	0,181
31.	1,704	0,262	0,427	0,798	0,789
32.	0,9	0,465	0,49	0,618	0,244
33.	1,074	0,46	0,456	0,663	0,356
34.	1,229	0,622	0,784	0,878	0,314
35.	1,164	0,535	0,449	0,716	0,390
36.	1,443	0,738	0,775	0,985	0,397
37.	0,247	0,132	0,123	0,167	0,069
38.	1,185	0,548	0,403	0,712	0,416
39.	1,217	0,625	0,657	0,833	0,333
40.	1	0,474	0,333	0,602	0,352
41.	0,245	0,139	0,091	0,158	0,079
42.	0,932	0,507	0,492	0,644	0,250
43.	1,054	0,529	0,466	0,683	0,323
44.	0,65	0,664	0,375	0,563	0,163
45.	0,586	0,34	0,317	0,414	0,149
46.	0,251	0,146	0,103	0,167	0,076
47.	0,649	0,355	0,296	0,433	0,189
48.	0,762	0,358	0,363	0,494	0,232
49.	1,029	0,665	0,475	0,723	0,282

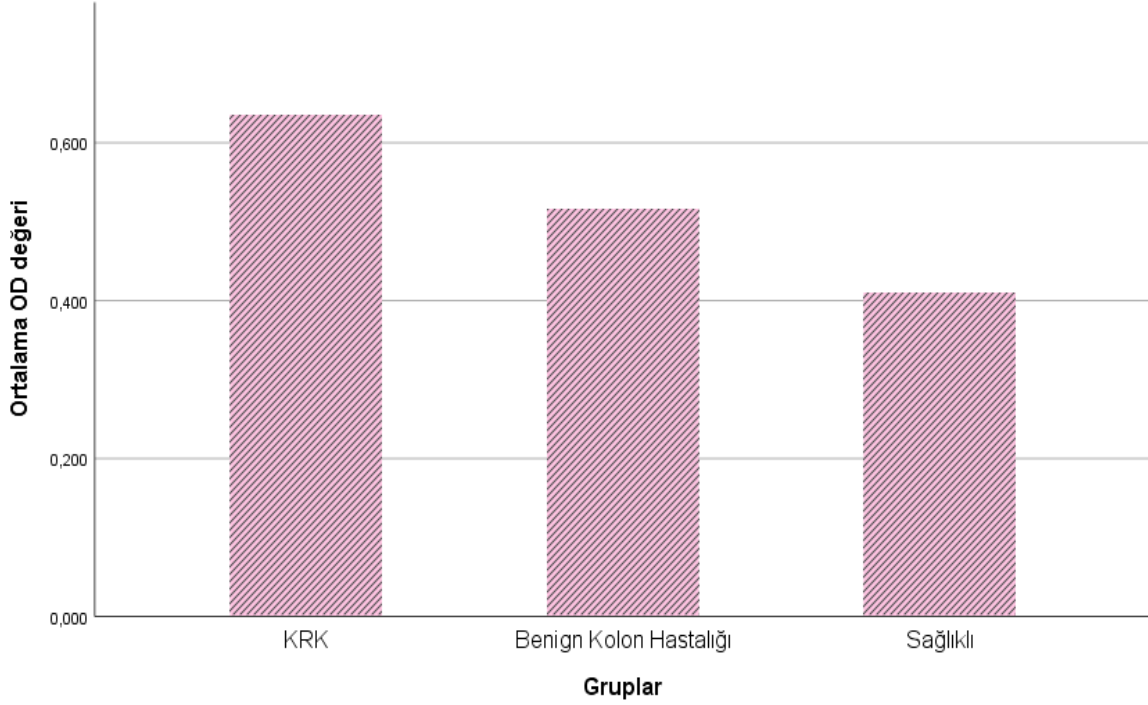
6. Çizelge. Benign kolon hastalıkları grubunun ELISA IgA ölçüm sonuçlarına göre OD değerleri ve üç ölçümün ortalaması (Devam).

Hasta No	1.Ölçüm	2. Ölçüm	3.Ölçüm	Ortalama	Standart Sapma
50.	0,471	0,256	0,199	0,309	0,143
51.	1,002	0,584	0,386	0,657	0,314
52.	0,22	0,143	0,107	0,157	0,058
53.	0,612	0,355	0,351	0,439	0,150
54.	0,978	0,564	0,461	0,668	0,274
55.	0,318	0,21	0,183	0,237	0,071
56.	0,227	0,144	0,146	0,172	0,047
57.	0,956	0,435	0,533	0,641	0,277

7. Çizelge. Sağlıklı kontrol grubunun ELISA IgA ölçüm sonuçlarına göre OD değerleri ve üç ölçümün ortalaması.

Hasta No	1.Ölçüm	2. Ölçüm	3.Ölçüm	Ortalama	Standart Sapma
58.	1,196	0,584	0,623	0,801	0,343
59.	0,493	0,299	0,196	0,329	0,151
60.	0,258	0,143	0,137	0,179	0,068
61.	0,366	0,241	0,243	0,283	0,072
62.	0,299	0,148	0,105	0,184	0,102
63.	0,903	0,624	0,525	0,684	0,196
64.	0,893	0,525	0,607	0,675	0,193
65.	0,123	0,093	0,084	0,100	0,020
66.	0,276	0,184	0,142	0,201	0,069
67.	0,859	0,511	0,392	0,587	0,243
68.	0,309	0,19	0,148	0,216	0,084
69.	1,321	0,723	0,76	0,935	0,335
70.	0,241	0,16	0,115	0,172	0,064
71.	0,787	0,551	0,425	0,588	0,184
72.	0,264	0,144	0,16	0,189	0,065
73.	0,698	0,509	0,032	0,413	0,343
74.	0,192	0,112	0,016	0,107	0,088
75.	0,923	0,543	0,731	0,732	0,190
76.	1,037	0,573	0,739	0,783	0,235
77.	0,297	0,18	0,234	0,237	0,059
78.	0,266	0,186	0,258	0,237	0,044

5. Çizim. Gruplara göre ELISA IgA testiyle elde edilen OD değerlerinin ortalamaları.



4.3.2. IgG Antikorları

Kolorektal kanser hastalarının serumlarındaki ELISA IgG sonuçları, 8. Çizelge’de, gösterildi. Sağlıklılarına ait serumlardaki ELISA IgG sonuçları, 10. Çizelge’de gösterildi. KRK hastalarına ait serumlarda, *F.nucleatum*’a karşı oluşan IgG antikor OD değeri ($0,121 \pm 0,127$), sağlıklı kişilere ait serumlardaki IgG OD değerinden ($0,070 \pm 0,042$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$).

Benign kolon hastalığı olanlara ait serumlardaki ELISA IgG sonuçları, 9. Çizelge’de gösterildi. Benign bağırsak hastalıkları olan kişilere ait serumlarda, *F.nucleatum*’a karşı oluşan IgG antikor OD değeri ($0,077 \pm 0,049$), sağlıklı kişilere ait serumlardaki IgG OD değeri ($0,070 \pm 0,042$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$).

Kolorektal kanser hastalara ait serumlarda, *F.nucleatum*’a karşı oluşan IgG antikor OD değeri ($0,121 \pm 0,127$), benign bağırsak hastalıkları olan kişilere ait serumlardaki IgG OD değeri ($0,077 \pm 0,049$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$). Gruplara göre ELISA IgG testiyle elde edilen OD değerlerinin ortalamaları 6. Çizim’de gösterildi.

8. Çizelge. KRK grubunun ELISA IgG ölçüm sonuçlarına göre OD değerleri ve üç ölçümün ortalaması.

Hasta No	1.Ölçüm	2. Ölçüm	3.Ölçüm	Ortalama	Standart Sapma
1.	0,057	0,04	0,029	0,042	0,014
2.	0,058	0,14	0,035	0,078	0,055
3.	0,095	0,045	0,042	0,061	0,030
4.	0,66	0,247	0,08	0,329	0,299
5.	0,139	0,058	0,033	0,077	0,055
6.	0,094	0,062	0,092	0,083	0,018
7.	0,15	0,125	0,086	0,120	0,032
8.	0,093	0,068	0,065	0,075	0,015
9.	0,123	0,123	0,123	0,123	0,000
10.	0,705	0,6	0,47	0,592	0,118
11.	0,06	0,043	0,041	0,048	0,010
12.	0,062	0,055	0,045	0,054	0,009
13.	0,112	0,05	0,051	0,071	0,036
14.	0,083	0,051	0,039	0,058	0,023
15.	0,08	0,052	0,032	0,055	0,024
16.	0,279	0,193	0,078	0,183	0,101
17.	0,159	0,139	0,13	0,143	0,015
18.	0,043	0,039	0,026	0,036	0,009
19.	0,281	0,241	0,204	0,242	0,039
20.	0,082	0,068	0,053	0,068	0,015
21.	0,057	0,065	0,025	0,049	0,021
22.	0,091	0,063	0,073	0,076	0,014

9. Çizelge. Benign kolon hastalıkları grubunun ELISA IgG ölçüm sonuçlarına göre OD değerleri ve üç ölçümün ortalaması.

Hasta No	1.Ölçüm	2. Ölçüm	3.Ölçüm	Ortalama	Standart Sapma
23.	0,074	0,07	0,61	0,251	0,311
24.	0,029	0,065	0,02	0,038	0,024
25.	0,035	0,06	0,024	0,040	0,018
26.	0,048	0,088	0,031	0,056	0,029
27.	0,072	0,246	0,042	0,120	0,110
28.	0,046	0,061	0,064	0,057	0,010
29.	0,056	0,057	0,057	0,057	0,001
30.	0,066	0,051	0,065	0,061	0,008
31.	0,069	0,048	0,053	0,057	0,011
32.	0,084	0,082	0,029	0,065	0,031
33.	0,079	0,063	0,042	0,061	0,019
34.	0,053	0,044	0,039	0,045	0,007
35.	0,161	0,151	0,044	0,119	0,065
36.	0,154	0,114	0,089	0,119	0,033
37.	0,036	0,033	0,03	0,033	0,003
38.	0,078	0,287	0,24	0,202	0,110
39.	0,135	0,125	0,094	0,118	0,021
40.	0,172	0,218	0,067	0,152	0,077
41.	0,03	0,065	0,02	0,038	0,024
42.	0,079	0,092	0,056	0,076	0,018
43.	0,078	0,108	0,071	0,086	0,020
44.	0,053	0,044	0,025	0,041	0,014
45.	0,029	0,074	0,025	0,043	0,027
46.	0,028	0,042	0,018	0,029	0,012
47.	0,033	0,037	0,038	0,036	0,003
48.	0,081	0,071	0,04	0,064	0,021

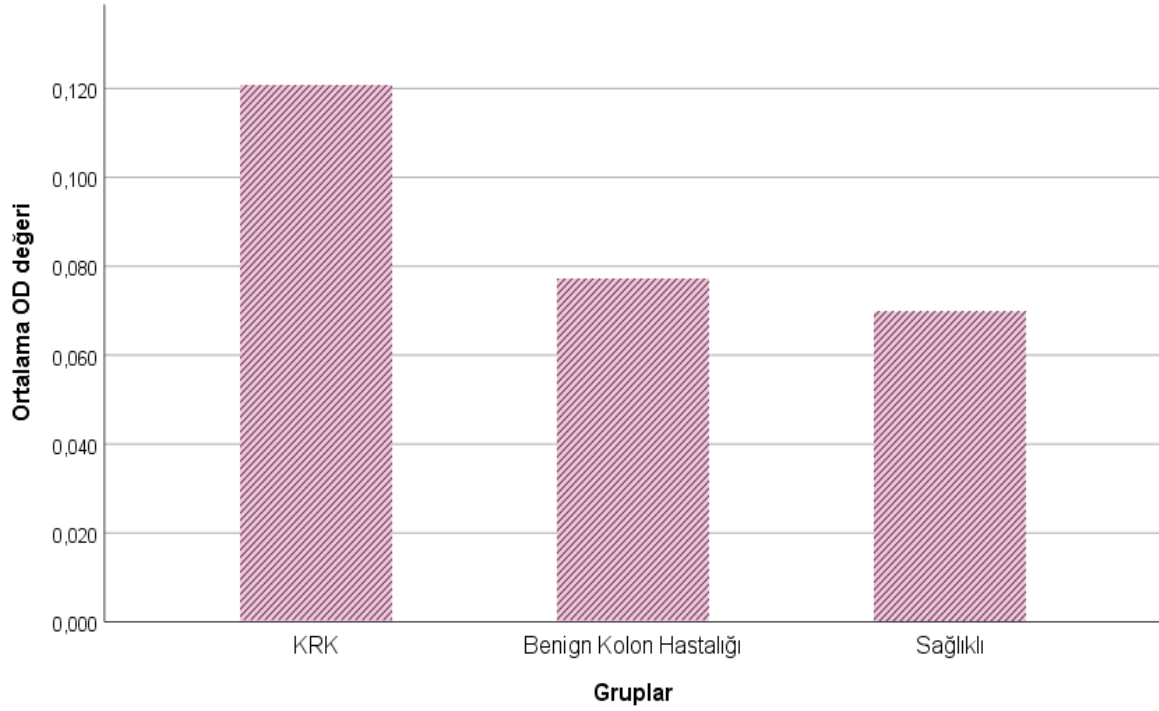
9. Çizelge. Benign kolon hastalıkları grubunun ELISA IgG ölçüm sonuçlarına göre OD değerleri ve üç ölçümün ortalaması (Devam).

Hasta No	1.Ölçüm	2. Ölçüm	3.Ölçüm	Ortalama	Standart Sapma
49.	0,045	0,034	0,026	0,035	0,010
50.	0,087	0,142	0,128	0,119	0,029
51.	0,062	0,077	0,056	0,065	0,011
52.	0,058	0,063	0,069	0,063	0,006
53.	0,056	0,037	0,032	0,042	0,013
54.	0,049	0,055	0,061	0,055	0,006
55.	0,025	0,185	0,036	0,082	0,089
56.	0,112	0,096	0,029	0,079	0,044
57.	0,044	0,147	0,118	0,103	0,053

10. Çizelge. Sağlıklı kontrol grubunun ELISA IgG ölçüm sonuçlarına göre OD değerleri ve üç ölçümün ortalaması.

Hasta No	1.Ölçüm	2. Ölçüm	3.Ölçüm	Ortalama	Standart Sapma
58.	0,063	0,052	0,061	0,059	0,006
59.	0,074	0,045	0,055	0,058	0,015
60.	0,049	0,053	0,03	0,044	0,012
61.	0,048	0,044	0,03	0,041	0,009
62.	0,022	0,127	0,017	0,055	0,062
63.	0,033	0,066	0,041	0,047	0,017
64.	0,045	0,148	0,136	0,110	0,056
65.	0,039	0,028	0,024	0,030	0,008
66.	0,044	0,031	0,033	0,036	0,007
67.	0,068	0,122	0,432	0,207	0,196
68.	0,027	0,066	0,038	0,044	0,020
69.	0,05	0,14	0,182	0,124	0,067
70.	0,069	0,23	0,047	0,115	0,100
71.	0,151	0,12	0,059	0,110	0,047
72.	0,068	0,058	0,04	0,055	0,014
73.	0,065	0,055	0,044	0,055	0,011
74.	0,057	0,08	0,051	0,063	0,015
75.	0,027	0,07	0,041	0,046	0,022
76.	0,029	0,073	0,084	0,062	0,029
77.	0,061	0,058	0,044	0,054	0,009
78.	0,029	0,095	0,028	0,051	0,038

6. Çizim. Gruplara göre ELISA IgG testiyle elde edilen OD değerlerinin ortalamaları.



4.4. IgA ve IgG antikorları arasındaki ilişki

IgA (OD:0,522 ± 0,299) ve IgG (OD:0,086 ± 0,080) antikorları arasındaki ilişkiyi göstermek için Pearson korelasyon testi yapıldı. IgA ile IgG arasında pozitif bir korelasyon tespit edildi (R=0,524, p<0,05). Bu analize göre IgA ve IgG artışı birbirlerini takip etmektedir.

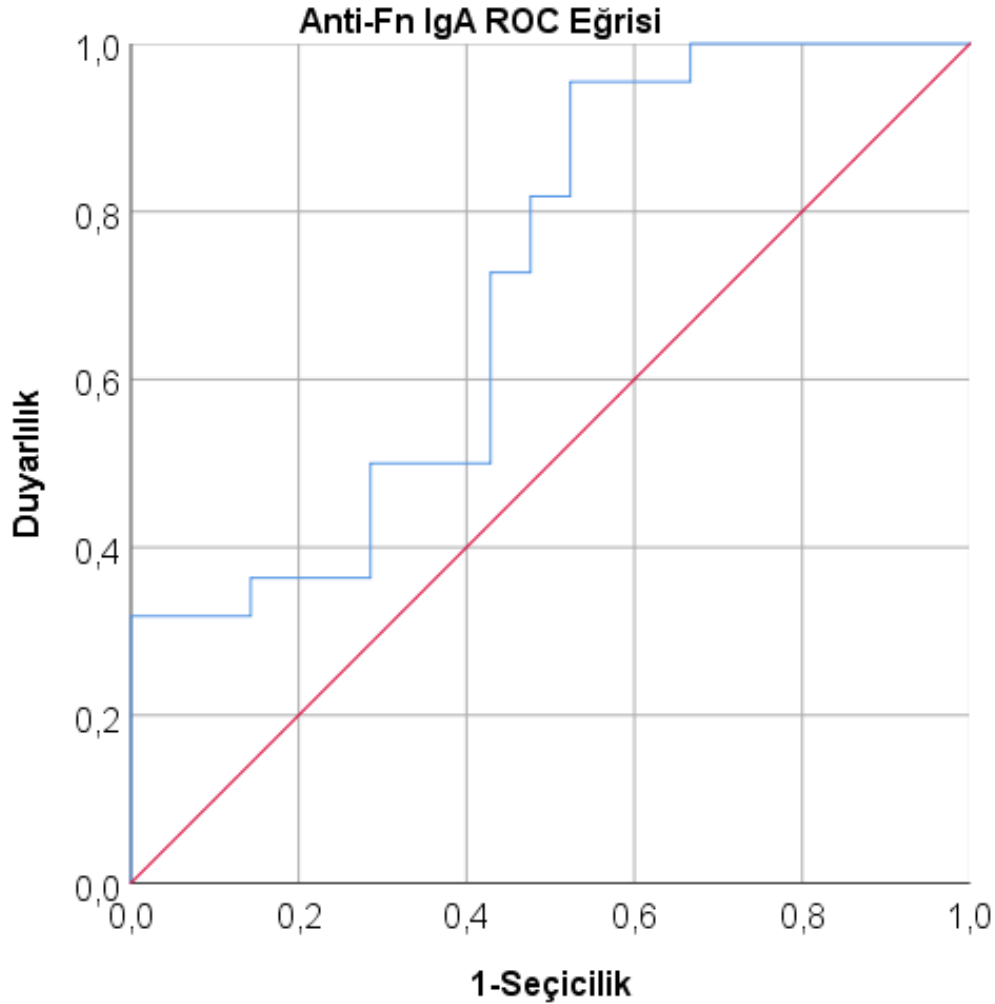
4.5. ROC Eğrisi Analizi

Kolorektal kanserin taramasında ve teşhisinde *F. nucleatum*'a karşı oluşan antikorların değeri ROC eğrisi analizi ile araştırıldı.

4.5.1. ELISA IgA sınır değerin belirlenmesi

IgA antikorları analiz edildiğinde, eğri altında kalan alan \pm standart hata ($0,712 \pm 0,080$) istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). ELISA IgA testinin ROC eğrisi 7. Çizim’de gösterildi. Analiz ile elde edilen değerler 11. Çizelge’de gösterildi. Testin özgülüğü %48 olarak tercih edildiğinde, duyarlılığı %96 olarak hesaplandı. Bu durumda, OD değeri 0,246’nın üzerinde olan hastaların KRK olabileceği görüldü. Pratik uygulamada, ELISA testi ile hastaya ait OD değerinin, sınır değer OD olarak belirlenen 0,246’ya bölünmesi sonucunda değerin 1’den büyük olması aynı sonucu gösterdi.

7. Çizim. ELISA IgA testinin ROC eğrisi.



11. Çizelge. ELISA IgA testinin ROC eğrisi analizi ile elde edilen değerler.

Sınır Değer	Duyarlılık	1-Özgüllük
-0,90000	1,000	1,000
0,10333	1,000	0,952
0,13933	1,000	0,905
0,17567	1,000	0,857
0,18167	1,000	0,810
0,18667	1,000	0,762
0,19500	1,000	0,714
0,20367	1,000	0,667
0,21117	0,955	0,667
0,22617	0,955	0,619
0,23683	0,955	0,571
0,24567	0,955	0,524
0,25567	0,909	0,524
0,25983	0,864	0,524
0,27300	0,818	0,524
0,28533	0,818	0,476
0,29250	0,773	0,476
0,31350	0,727	0,476
0,34133	0,727	0,429
0,35417	0,682	0,429
0,35800	0,636	0,429
0,38317	0,591	0,429
0,40617	0,545	0,429
0,41000	0,500	0,429
0,50017	0,500	0,381
0,58750	0,500	0,333
0,60767	0,500	0,286
0,63167	0,455	0,286
0,63633	0,409	0,286
0,65600	0,364	0,286
0,67950	0,364	0,238
0,70817	0,364	0,190
0,75750	0,364	0,143
0,78283	0,318	0,143
0,79200	0,318	0,095
0,86783	0,318	0,048

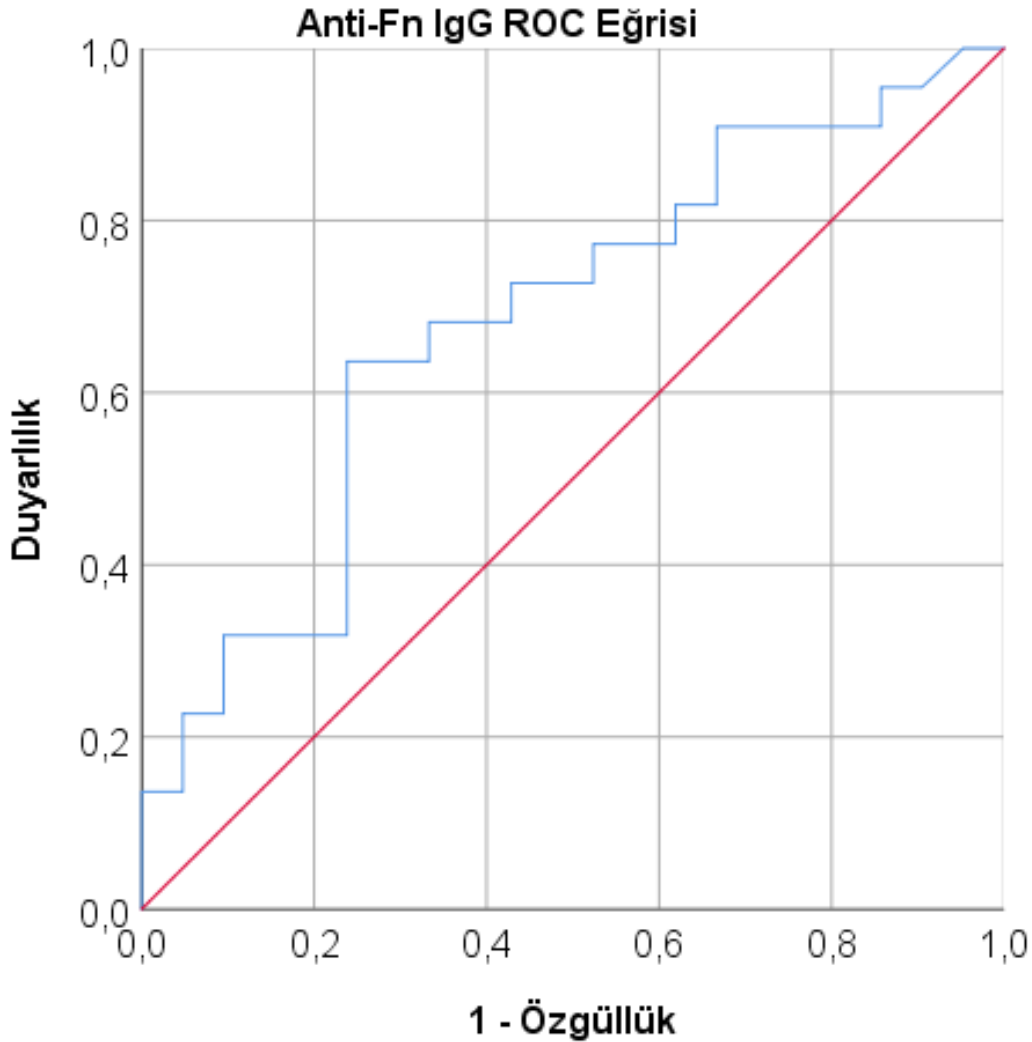
11. Çizelge. ELISA IgA testinin ROC eğrisi analizi ile elde edilen değerler (Devam).

Sınır Değer	Duyarlılık	1-Özgüllük
0,95567	0,318	0,000
0,98167	0,273	0,000
1,00583	0,227	0,000
1,09417	0,182	0,000
1,18917	0,136	0,000
1,22600	0,091	0,000
1,24933	0,045	0,000
2,26167	0,000	0,000

4.5.2. ELISA IgG sınır değerin belirlenmesi

IgG antikorları analiz edildiğinde, eğri altında kalan alan \pm standart hata ($0,683 \pm 0,082$) istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). ELISA IgG testinin ROC eğrisi 8. Çizim’de gösterildi. Analiz ile elde edilen değerler 12. Çizelge’de gösterildi. Testin özgüllüğü, %48 olarak tercih edildiğinde duyarlılığı %77 olarak hesaplanmaktadır. Bu durumda, OD değeri 0,055’in üzerinde olan hastaların KRK olabileceği görülmektedir. Pratik uygulamada ELISA testi ile hastaya ait OD değerinin, sınır değer OD olarak belirlenen 0,055’ye bölünmesi sonucunda değerin 1’den büyük olması aynı sonucu göstermektedir.

8. Çizim. ELISA IgG testinin ROC eğrisi.



12. Çizelge. ELISA IgG testinin ROC eğrisi analizi ile elde edilen değerler.

Sınır Değer	Duyarlılık	1-Özgüllük
0,00000	1,000	1,000
0,03317	1,000	0,952
0,03833	0,955	0,905
0,04133	0,955	0,857
0,04283	0,909	0,857
0,04383	0,909	0,810
0,04500	0,909	0,762
0,04633	0,909	0,714
0,04733	0,909	0,667
0,04850	0,864	0,667
0,04983	0,818	0,667
0,05233	0,818	0,619
0,05417	0,773	0,619
0,05450	0,773	0,571
0,05467	0,773	0,524
0,05500	0,727	0,524
0,05533	0,727	0,476
0,05650	0,727	0,429
0,05783	0,682	0,429
0,05833	0,682	0,381
0,05967	0,682	0,333
0,06133	0,636	0,333
0,06233	0,636	0,286
0,06517	0,636	0,238
0,06933	0,591	0,238
0,07317	0,545	0,238
0,07550	0,500	0,238
0,07617	0,455	0,238
0,07717	0,409	0,238
0,08017	0,364	0,238
0,09617	0,318	0,238
0,10983	0,318	0,190
0,11267	0,318	0,143
0,11783	0,318	0,095
0,12167	0,273	0,095
0,12350	0,227	0,095
0,13333	0,227	0,048
0,16300	0,182	0,048

12. Çizelge. ELISA IgG testinin ROC eğrisi analizi ile elde edilen değerler (Devam).

Sınır Değer	Duyarlılık	1-Özgüllük
0,19533	0,136	0,048
0,22467	0,136	0,000
0,28550	0,091	0,000
0,46033	0,045	0,000
1,00000	0,000	0,000

5. TARTIŞMA

Kolorektal kanser, önemli bir halk sağlığı sorunudur. Tüm dünyada kanserler arasında sık görülmekte ve sıklığı, yıllar içerisinde artmaya devam etmektedir. Kolorektal kanser ve mikrobiyota arasındaki ilişki, son zamanlarda önem kazanmış araştırma konularından biridir. Bağırsakta bulunan mikroorganizmalar birbirleriyle denge içerisinde bulduklarında insan vücudu için birçok açıdan fayda sağlamaktadır. Ancak, bu mikroorganizmaların arasındaki denge bozulduğunda, kolonda bulunan bazı bakteriler kanserleşmeye neden olmaktadır. Bu bakterilerden en önemlisi *F.nucleatum*'dur ve mikrobiyotadaki bakteriler arasındaki dengenin bozulduğu durumlarda sayısı artmaktadır.¹⁰ Sayısı artan *F.nucleatum* birçok mekanizma ile KRK'nin başlamasına ve ilerlemesine neden olabilmektedir.²⁶ Yapılan bir çalışmada *F.nucleatum*'a karşı oluşan antikorları saptayan bir ELISA testi ile KRK'nin erken tespit edilebileceği bildirilmiştir.¹¹ Kanser taramasında ELISA testi kullanılması, halk sağlığı açısından önemli fayda sağlayacaktır.

Son yıllarda yapılan birçok çalışma ile kolonun normal mukozasında bulunan *F.nucleatum*'un, KRK dokusunda oranının arttığı gösterilmiştir.⁴² Mikrobiyota ve KRK arasındaki ilişki, iki farklı araştırmacı grubu tarafından 2012 yılında araştırılmıştır. Kostic ve ark.⁴¹ dizileme analizi ile tümör dokusunda normal dokuya göre mikrobiyal kompozisyonunun değiştiğini saptamışlardır. *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* filumuna ait bakterilerin azalırken, *Fusobacterium* cinsine ait türlerin değişen mikrobiyota ortamında sayısını arttırarak varlığını devam ettirdiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada yapılan kPZR ve floresan in situ hibridizasyon metotları ile de tümör dokusunda *Fusobacterium* cinsine ait türlerin artışı saptanmıştır. Castellarin ve ark.⁸'nın 99 hasta örneği ile yaptıkları çalışmada, KRK dokuları ve normal kolon mukozası dokuları dizileme analizi ve kPZR ile analiz edilmiştir. Çalışmada, *F.nucleatum* miktarının, normal dokuya oranla kanser dokusunda 415 kat artmış olduğu görülmüştür.

F.nucleatum, gastrointestinal sistem ve ağız mikrobiyotasının bir elemanıdır. Mikrobiyota; yaşanan coğrafya, ek hastalıklar, beslenme alışkanlıkları gibi endojen ve ekzojen birçok faktörden etkilenmektedir.¹⁷ Bu nedenle, KRK dokusundaki mikrobiyota değişimlerini göstermek amacıyla yapılan mikrobiyota analizleri, farklı coğrafi bölgelerde ve farklı çalışma grupları üzerinde yapılmaktadır. Asya kıtasında, Japonya ve Çin'den KRK ile *F.nucleatum* ilişkisinin araştırıldığı çalışmalar raporlanmıştır. Çin'de, evre 3 ve 4

KRK tanısı olan 280 hastadan elde edilen örneklerde *F.nucleatum* miktarı, insan dokusuna ait β -aktin proteinine oranlanarak hesaplanmıştır. Çalışmada, tümör dokularında aynı hastalara ait normal mukoza dokularına oranla önemli derecede yüksek miktarda *F.nucleatum* saptanmıştır.⁸⁶ Japonya'dan raporlanan çalışmada, hastaların tümör ve normal dokularındaki median *F.nucleatum* kopya sayısı sırasıyla 1,9 kopya sayısı/ng ve 0,4 kopya sayısı/ng şeklinde bulunmuştur. Hastalar evrelere göre gruplandırıldığında, evre 4 tümörlere ait bakteri kopya sayısı, normal görünümlü mukozadan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.⁸⁷ Avrupa'da bulunan üç ülkede, farklı hasta popülasyonları ile üç ayrı kohort çalışması yapılmıştır. Almanya'da yapılan kohort çalışmasında, *F.nucleatum* miktarının normal dokuya göre 43 kat, Çek Cumhuriyeti'ndeki kohortta 66 kat ve İrlanda'da yapılanda 9 kat arttığı gösterilmiştir. Çalışmalar ortak olarak analiz edildiğinde artış 45 kat olarak hesaplanmıştır. Bu üç kohort çalışması birbirleriyle karşılaştırıldığında ise anlamlı fark elde edilmemiştir.⁸⁸ ABD'de ülke genelinde yapılan kohort çalışmaları; Nurses' Health Study ve Professionals Follow-up study çalışmalarından elde edilen 598 kanser dokusu ve 558 normal mukoza dokusu analiz edilmiş, kanser dokularının 76'sında (%13) ve normal dokuların 19'unda (%3,4) *F.nucleatum* pozitif saptanmıştır. *F.nucleatum*'un, kanser dokusunda, normal dokuya göre artmış olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada, *F.nucleatum* saptanan vakalarda CD3⁺ T lenfosit yoğunluğunun düşük olduğu bulunmuştur.⁴⁰ Brezilya'da, Proença ve ark.⁷⁶'nın 43 KRK hastası ile yaptığı çalışmada, 33 (%76,7) adet kanser dokusunda ve 31 (%72,1) adet normal dokuda *F.nucleatum* pozitif bulunmuştur ve *F.nucleatum*, miktarının kanser dokusunda anlamlı derecede fazla olduğu saptanmıştır. Farklı ülkelerden yapılan çalışmalarda, genel olarak KRK dokusunda *F.nucleatum* miktarının normal dokuya göre arttığı sonucu elde edilmiştir. Ancak, Nielsen ve ark.⁸⁹'nin Danimarka'da yaptıkları bir çalışmada, 99 KRK hastasına ait tümör dokusu, normal doku ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık elde edilmemiştir. Çalışmamız, ülkemizde KRK ile *F.nucleatum*'un ilişkisinin araştırıldığı az sayıda çalışmadan biridir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre tümör dokularındaki ve normal dokulardaki ortalama *F.nucleatum* kopya sayıları, 2,8550 ve 1,6283 log10 kopya/50ng şeklinde bulundu. Çalışmamızda, literatürdeki çalışmalar ile benzer nitelikte tümör dokusunda normal dokuya göre *F.nucleatum* miktarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olduğu saptandı. Kanser ve normal mukoza dokularındaki *F.nucleatum*, miktarının karşılaştırıldığı çalışmaların sonuçlarındaki farklılıklar, kullanılan tam genom dizileme, floresan in situ

hibridizasyon, gerçek zamanlı PZR gibi yöntemlerin değişkenliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.⁷²

Analiz için seçilen örneklerin özelliği, çalışmalarda saptanan *F.nucleatum* prevalansını etkileyebilmektedir. Mikroorganizmaların tespitinde ve kantitasyonunda parafinize doku kullanmak çalışmayı kısıtlayabilmektedir. Dokuyu sabitleme, parafine gömme, depolama gibi rutin histopatoloji prosedürleri kPZR analizini etkileyebilmektedir. Formalinle sabitlenmiş dokularda, histon benzeri proteinlerin DNA'ya çapraz bağlandığı ve genomik DNA'nın zamanla bozulduğu saptanmıştır. Ancak parafinize doku, retrospektif çalışmalarda daha kolay ulaşılabilir tek örnek tipi olduğu için tercih edilebilmektedir.⁹⁰ ABD'de yapılan bir çalışmada 1102 adet parafinize tümör doku örneğinin %13'ünde *F.nucleatum* pozitifliği saptanırken, Japonya'da 100 adet taze dondurulmuş tümör dokusu ile yapılan çalışmada, pozitiflik oranı %75 olarak bulunmuştur.^{87,91} Bizim çalışmaya aldığımız KRK hastalarına ait taze dondurulmuş tümör dokusu ve normal mukoza doku örnekleri incelendiğinde; kanser dokularının %86,6'sında, normal dokuların %66,6'sında *F.nucleatum* pozitif saptandı.

Kolorektal kanser ve *F.nucleatum* arasındaki ilişki, doku örnekleri dışında farklı örnekler kullanılarak da araştırılmıştır. Kolorektal kanserli hastalardan alınan dışkı örneklerinde, sağlıklı kontrollere kıyasla *F.nucleatum* miktarı düzeyi yüksek bulunmuştur.⁹² Bu durum kanserli dokulardan *F.nucleatum*'un daha fazla saçılmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Diğer bir olasılık ise; KRK hastalarında sağlıklı kontrollere oranla ağızdan kolona kadar daha fazla *F.nucleatum* taşınmasıdır.⁷² Komiya ve ark.⁹³ KRK hastalarının kanser dokularında ve oral kaviterinde olan *F.nucleatum*'un aynı izolat olduğu göstermişlerdir. Güven ve ark.¹² 71 KRK'li 69 hastanın tükürük örneğinde ve kanser olmayan 77 kişinin 74'ünün tükürük örneğinde *F.nucleatum* pozitif saptamışlardır. Çalışmada, KRK hastalarında (6,89 log10 kopya/ml), sağlıklı kontrollere (6,35 log10 kopya/ml) göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Russo ve ark.⁹⁴ ise böyle bir fark gözlemlenmemişlerdir.

Yüksek *F.nucleatum* miktarı, sağkalımın azalması ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Wei ve ark.⁹⁵ yaptıkları çalışmada, KRK'li 180 hastanın tümör dokuları 16S rRNA dizileme analizi ile araştırılmıştır. Hastalar, sağkalım olan, sağkalım olmayan, rekürrens ve bilinmeyen şeklinde 4 gruba ayrılmıştır. *F.nucleatum* miktarının rekürrens

grubunda sağkalım olan gruba göre önemli derecede arttığı saptanmıştır. Ayrıca; miktarın yüksek olması invazyon derinliği ve lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur. Li ve ark.⁹⁶'nın yaptıkları çalışmada, yüksek miktarda *F.nucleatum* taşıyanlarda lenf nodu metastazı daha fazla görülmüştür. Mima ve ark'nın⁹¹ çalışmasında, çıkan kolona yerleşmiş tümörlerde *F.nucleatum* daha fazla bulunmuştur. Ayrıca; güncel bir çalışmada yüksek *F.nucleatum* miktarı, ileri evre, kötü diferansiye tümör dokusu, MSI pozitifliği, BRAF mutasyonu, MLH1 ve 2'nin ekspresyonunun kaybı ile ilişkilendirilmiştir.⁹⁰

Kolorektal kanserli hastalara ait tümör dokusu ve dışkı örneklerinde zengin *F.nucleatum* saptanan ilk çalışmalarda, bu bakterinin kanserin nedeni mi sonucu mu olduğu netleştirilmemiştir. Fakat bu çalışmalar, kanser etiolojisinde *F.nucleatum*'un araştırıldığı çalışmalara öncülük etmiştir.⁷¹ *F.nucleatum*'un, FadA adezini sayesinde kanser hücrelerinin çoğalmasını arttırdığı, inflamasyonu tetiklediği, onkogenleri aktive ettiği ve bu şekilde kanserleşmede rol aldığı gösterilmiştir.⁷¹ FadA adezini, kanser dokularında prekanseröz lezyonlara göre, prekanseröz lezyonlarda da normal dokulara göre daha yüksek oranda saptanmıştır.⁶⁵ Ito ve ark.⁹⁷ Japonya'da parafinize prekanseröz lezyon dokuları ile yaptıkları çalışmada, KRK'nin ortaya çıkması ve gelişmesi sırasında prekanseröz lezyon aşamasında *F.nucleatum*'un pozitiflik oranının yüksek olduğunu göstermişlerdir. Prekanseröz lezyonları histopatolojisine göre gruplandırdıklarında, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Amitay ve ark.⁵ Almanya'da yaptıkları bir çalışmada, KRK'li hastalara ait dışkı örneklerinde *F.nucleatum* miktarının arttığını, ancak yeni adenom ve ileri dereceli adenomu olanlar ile kontrol grubu arasında bakteri miktarında farklılık olmadığını bildirmişlerdir. Bu sonuca göre, *F.nucleatum*'un kanser nedeni olmadığını, kanserleşme sonucu tümör mikroçevresinde meydana gelen değişikliklere bağlı olarak sayısının arttığını savunmuşlardır. Taze dondurulmuş doku örnekleri ile yaptığımız bu çalışmada, 26 hastanın benign kolon lezyonundaki ve normal mukoza dokusundaki *F.nucleatum* oranları sırasıyla 1,3316 ve 1,0862 log10 kopya/50ng olarak bulundu. Benign kolon lezyonlarındaki pozitiflik oranı %73 iken, normal mukozalarındaki pozitiflik oranı %58 olarak saptandı. Benign lezyonlardaki *F.nucleatum* miktarı ile normal mukozalardaki bakteri miktarı arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Kolorektal kanserin taramasında, invaziv ve invaziv olmayan testler kullanılabilir. Kolorektal kanserin erken tanısı ve etkili tedavi sayesinde sağkalım

önemli düzeyde artarken, vakaların sadece %40'ı erken tanı alabilmektedir. ABD'de, gaitada gizli kan taraması, kolonoskopi gibi tarama testleri sayesinde 1975'ten 2010'a kadar KRK'ye bağlı ölüm oranları yıllık %2,8 azalmıştır. ABD'deki yetişkinlerin %30'u yaşına ve risk faktörlerine uygun bir tarama testi yaptırmamaktadır. Tarama testi yaptıranların, %50-60 kadarı invaziv olmayan tarama yöntemlerini tercih etmektedir. Bu invaziv tarama testlerine hastaların uyum göstermemesi, kolonoskopinin maliyetinin yüksek olması, hazırlık ve uygulama aşamasındaki zorluklardan kaynaklanmaktadır. Bireylerin kolonoskopi ile değerlendirilmesinden önce; düşük maliyetli, uygulaması kolay, invaziv olmayan tarama testlerine ihtiyaç vardır.⁵⁷ *F.nucleatum* prevelansı, farklı ülkelerde farklılık göstermiş olsa da, *F.nucleatum*'un genellikle KRK hastalarının dokularında ve dışkılarında bulunduğu ve sağlıklı kontrollere göre daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, '*F.nucleatum*, KRK'nin erken tespitinde potansiyel bir belirteç olabilir.' düşüncesi gündeme gelmiştir. Liang ve ark.⁹⁸ dışkıdaki *F.nucleatum* miktarı ölçülerek, %77,7 duyarlılık ve %79,5 özgüllük ile kanserin erken saptanabileceğini söylemişlerdir. Wong ve ark.⁹²'nin yaptıkları çalışmada, KRK ve yüksek dereceli adenomun tespitinde dışkı örneklerindeki *F.nucleatum* miktarı kullanıldığında, duyarlılıklar sırayla %73,1 ve %15,5 olarak bulunmuştur.

F.nucleatum'un, KRK erken tanısında kullanılabilme yollarından biri *F.nucleatum*'a karşı oluşan antikorların varlığını saptamak olabilir. Enfeksiyonlara bağlı oluşan kanserlerin teşhisinde etkene yönelik antikor yanıtı kanser tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. İnaktive edilmiş *F.nucleatum* bakteri ekstraktının enjekte edildiği farelerde, diğer oral bakterilerden daha fazla ve spesifik hümmoral antikor yanıtın meydana geldiği görülmüştür.⁹⁹ *F.nucleatum*'un virülans faktörlerinden biri olan FomA proteini, TLR-2 agonistidir ve immün adjuvan aktivitesine sahiptir. FomA, farelerde in vivo olarak TLR-2 vasıtasıyla spesifik antikor sekresyonunu arttırmaktadır.¹⁰⁰ *F.nucleatum* bütün hüccesine karşı oluşan antikorların, *F.nucleatum*'un etken olduğu oral enfeksiyonları teşhis edebildiği gösterilmiştir. Bu enfeksiyonların önlenmesi ve başarılı tedavisi ile antikor miktarı önemli ölçüde azalmıştır.¹¹ Antikor miktarını analiz etmek için yapılan ELISA'da, bakterinin bir proteini veya bütün hali kullanılabilir. *Helicobacter pylori*'ye karşı oluşan antikorları saptamak amacıyla yapılan, *H.pylori* bütün hüccesi veya virülans faktörü olan CagA proteininin kullanıldığı ELISA sonuçları arasında farklılık oluşturmamıştır.¹¹ Wang ve ark.¹¹ Çin'de yaptıkları çalışmada, antijen olarak *F.nucleatum*'un tam hüccesinin

kullanıldığı ELISA testi ile *F.nucleatum*'a karşı oluşan antikorları değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucuna göre; KRK'lilerde, benign kolon hastalığı olanlarda ve sağlıklı kontrol grubunda IgA ve IgG antikorlarının ortalama OD değerleri sırayla 0,390, 0,268, 0,246 ve 0,362, 0,270, 0,262 şeklinde saptanmıştır. KRK hastalarının serumlarında, sağlıklı kontrollere kıyasla *F.nucleatum*'a karşı yüksek miktarda poliklonal antikor miktarı saptanmıştır ve *F.nucleatum*'un enfeksiyonunun KRK'li hastalarda güçlü hümmoral yanıtı indüklendiği gösterilmiştir. Benign kolon hastalık grubu ile sağlıklı kontrol grubu sonuçları arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Antikor miktarı, yaş, cinsiyet, tümör boyutu, invazyon derinliği, metastaz ve klinik evre gibi parametrelerle değişmemiştir. Çalışmada ayrıca, dışkıında *F.nucleatum* pozitif saptanan 6 kanser hastasından ve 1 sağlıklı kişiden alınan serum örnekleri ile yapılan Western blot analizinde *F.nucleatum*'a karşı oluşan antikorların spesifik olduğu bulunmuştur. *B.fragilis*, *E.coli*, *E.faecalis* ve *E.cloacae* ile karşılaştırılan pozitif serumlarda hiç bant görülmemiştir. IgA ve IgG antikorları pozitif korelasyon göstermiştir. Ancak, ne CEA ne de CA19-9, IgA veya IgG ile ilişkili bulunmuştur. IgA ve IgG antikorlarının KRK tanısında yerini gösterebilmek için ROC eğrisi analizi yapılmıştır. IgA'nın duyarlılığının, Ca19-9'dan yüksek, CEA'dan düşük olduğu görülmüştür. IgA, Ca19-9 ve CEA kombine edildiğinde daha iyi duyarlılık ve özgüllük değerlerine ulaşılmıştır. Çalışmamızda, *F.nucleatum*'un bütün hüccresinin kullanıldığı ELISA deneyi ile IgA ve IgG antikorları araştırıldı. Her iki antikor tipi için de aynı yöntem kullanıldı. Kolorektal kanser hastalarındaki, benign hastalık grubundaki ve sağlıklı kontrollerdeki ortalama IgA ve IgG seviyeleri sırasıyla 0,636, 0,516, 0,411 ve 0,121, 0,077, 0,070 şeklinde saptandı. Kolorektal kanser hastalarına ait serumlardaki IgA ve IgG ortalama antikor miktarları, sağlıklıların ortalama antikor miktarlarından anlamlı derecede yüksek saptandı. Benign kontrol grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında ise anlamlı fark görülmedi. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ile Çin'de yapılan çalışmanın sonuçları karşılaştırıldığında, IgA'ya ait ortalama OD değerleri üç hasta grubu için de daha yüksek iken, IgG'ye ait olanlar daha düşüktür. Sonuçlar benzer olmasına rağmen, OD değerlerde oluşan bu farklılık, ELISA testinin tekniğindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Kolorektal kanser tanısı olmayan fakat, kansere yatkınlığı olan kişilerde *F.nucleatum*'a karşı oluşan antikor miktarının araştırılması amacıyla Avrupa'da çok merkezli güncel bir çalışma yapılmıştır.¹⁰¹ Bu çalışmada, beslenme ve kanser kohortuna ait kolorektal kanseri

olan 485 kişinin tanı öncesi ve 485 sağlıklı kontrole ait serum örneklerinde *F.nucleatum*'a ait 11 adet antijene karşı antikor yanıtı multipleks serolojik test ile değerlendirilmiştir. Sağlıklı kontrol grubundakilerin proteinlere karşı seroprevelansı %3 ile %10 arasında değiştiği ve en az iki proteine karşı antikor pozitifliğinin %21, en az üç proteine karşı antikor pozitifliğinin %9 oranında görüldüğü bildirilmiştir. Kolorektal kanser tanısı alanlarda oluşan antikorlar %2 ile %11 arasında, en az iki proteine karşı antikor pozitifliği %17 en az üç proteine karşı antikor pozitifliği %9 oranında saptanmıştır. Sonuç olarak her iki grup arasında anlamlı fark olmadığı görülmüştür.

Kanserle ilişki mikroorganizmalardan mukozal enfeksiyon alanına girenler, spesifik IgA salınmasına neden olmaktadır. Epstein barr Virüs'e karşı oluşan IgA antikorunun nazofaringeal karsinomada ve Humanpapilloma Virüs'e karşı oluşan IgA antikorunun servikal kanserde belirgin düzeyde arttığı saptanmıştır.^{11,102,103} Wang ve ark.¹¹ yaptıkları ELISA çalışması ile IgA'nın performansını IgG'ye göre daha yüksek bulmuşlardır. Bizim çalışmamızın bulgularına göre de *F.nucleatum*'a karşı oluşan IgA antikor, KRK tanısı için daha yüksek tanı değeri taşımaktadır.

Zaman ve bütçemizin sınırlı olması, çalışmamızı kısıtlayan faktörlerdir. Uzmanlık tezi çalışması olması nedeniyle, çalışmanın kısa sürede tamamlaması için örnek toplama sürecini kısa tuttuk ve az sayıda hasta ile çalışmamızı gerçekleştirdik. Kolorektal kanser dokusunda mikroorganizmaların değişiklikleri gösterebilmek için yeni nesil dizileme gibi daha gelişmiş yöntemler yerine uygun maliyetli PZR yöntemi ile sadece *F.nucleatum*'un analizini yaptık.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Kolorektal kanser hastalarının kanser dokusunda normal dokuya göre daha fazla *Fusobacterium nucleatum* bulunmuştur. Bu çalışma, bildiğimiz kadarıyla ülkemizde *F.nucleatum*'un KRK dokusundaki miktarının araştırıldığı ilk çalışmadır. Elde ettiğimiz veriler, bakteri miktarının farklı coğrafi bölgelerde, farklı hasta gruplarıyla araştırılması yaklaşımına katkı sağlamaktadır. Hem ülkemizde hem de dünyanın çeşitli yerlerinde bu çalışmanın daha fazla hasta popülasyonu ile çalışılması önerilir.
2. Çalışmamızda, benign kolon hastalığı olanların lezyonlarındaki ve normal dokularındaki *F.nucleatum* sayısı arasında fark olmadığı saptanmıştır. Aynı coğrafyada yaşayan benzer beslenme alışkanlığına sahip hastalarda, kanser dokusunda *F.nucleatum* miktarı artarken benign lezyonlarda artış olmaması, *F.nucleatum*'un KRK'nin patogenezindeki rolü hakkındaki araştırmalar için yardımcı bir veri olabilir. Diğer taraftan, benign lezyonu olanların kolonoskopiyle kanser açısından takibi yapılırken *F.nucleatum* sayısının da eş zamanlı olarak belirlenmesi kanserin erken teşhisine katkıda bulunabilir. Örneğin; *F.nucleatum* sayısında belirgin bir artış belirlenmiş ise histopatolojik inceleme sonucu henüz kanseri göstermiyor olmasına rağmen lezyonun kanser öncüsü olduğu düşünülebilir.
3. Teknolojideki gelişmeler sayesinde, kolonoskopi sırasında alınan biyopsi örneklerinden bakteri sayısının saptanması zaman kaybetmeden eş zamanlı yapılabilir. Lezyona ait histopatolojik incelemelerin yanı sıra mikrobiyolojik açıdan bakteri sayısının da belirlenmesi prognozun öngörülmesinde yardımcı olacaktır.
4. *F.nucleatum*'un, kolorektal kanserin başlangıcındaki ve ilerlemesindeki rolünün kanıtlanması durumunda, kanseri önleyici yaklaşımlarda ve tedavi algoritmalarında *F.nucleatum*'un sayısını azaltacak probiyotiklerin kullanımı gibi seçenekler araştırılabilir.
5. Kolorektal kanser hastalarında, *F.nucleatum*'a karşı oluşan IgA ve IgG antikorlarının miktarı sağlıklılara oranla artarken, benign kolorektal hastalığı

olanlarda sağlıklıllara oranla değişiklik olmamıştır. *F.nucleatum*'un, dokudaki miktarının analizinin sonucu ile serumda oluşturduğu antikorların analizinin sonucu paralellik göstermektedir. Yeni yapılacak çalışmalar ile benign kolon hastalığı olanların takip edilerek antikor seviyelerinde artış olup olmadığının değerlendirilmesi ile antikor belirleyen testlerin, KRK taraması amacıyla kullanılmasının yolu açılacaktır. Bu sayede, hastalardaki antikor artışına bağlı olarak kanserleşmenin belirlenebileceği bir serolojik test geliştirilebilecektir.

6. *F.nucleatum*'a karşı oluşan IgA ve IgG antikorlarının ROC eğrisi analizi ile değerlendirilmesiyle IgA için sınır değer 0,246 alındığında %96 duyarlılık ve %48 özgülük ve IgG için sınır değer 0,055 olarak belirlendiğinde %77 duyarlılık ve %48 özgülük ile KRK tanısında kullanılabileceği görülmüştür. IgA antikorunun tanı değeri IgG'ye göre daha yüksek saptanmıştır. ELISA gibi her laboratuvarında bulunabilen, uygulaması basit, kolay örnek sağlanabilen ve uygun maliyetli bir test geliştirilmesi ile KRK'in teşhisi kolaylaşabilir. *F.nucleatum*'a karşı oluşan antikorlar, tek başına veya KRK'nin tanısında kullanılan diğer testlerle kombine edilerek daha farklı ülkelerde yaşayan insanları da kapsayacak şekilde geniş hasta gruplarıyla araştırılmalıdır. Bu sayede coğrafik ve etnik farklılıkların, testin sınır değerini belirlenmesine yardımcı olacaktır.

7. ÖZET

***Fusobacterium nucleatum*'a karşı oluşan antikorların kolorektal kanserin serolojik tanısında değerinin araştırılması**

Giriş ve amaç

Fusobacterium nucleatum, intestinal mikrobiyotanın değerli bir üyesi olan anaerobik gram negatif bir bakteridir. *F.nucleatum*, mikrobiyota bakterileri içerisinde denge halinde az sayıda bulunmaktadır ve en önemlisi kolorektal kanserin (KRK) başlangıcında ve gelişiminde rol oynamaktadır. Bu çalışmada, KRK veya benign kolon hastalığı olanlarda bağırsak lezyon ve normal mukoza dokularındaki *F.nucleatum* miktarı karşılaştırıldı. Aynı zamanda, KRK tanısında *F.nucleatum*'a karşı oluşan antikorların kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem

Çalışmamız, Mayıs 2018 ve Ağustos 2019 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'ne başvuran KRK hastaları, benign kolon hastalığı olanlar ve kolonoskopi ile kolorektal patolojisi saptanmayan kişiler ile yapıldı. Hastalardan alınan doku ve serum örnekleri çalışmaya kadar -80°C'de saklandı. Hastaların lezyon dokuları ve normal mukoza dokularındaki *F.nucleatum* miktarı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (kPZR) (Qiagen,Almanya) yöntemi kullanılarak belirlendi. *F.nucleatum*'a karşı oluşan IgA ve IgG antikorları ELISA ile saptandı. ELISA plaklarını kaplamak amacıyla *F.nucleatum* ATCC 25586 suşu kullanıldı. Her test üç defa tekrar edildikten sonra elde edilen OD değerlerinin ortalaması alındı. Antikorların tanı değeri, ROC eğrisi analizi ile değerlendirildi.

Bulgular

F.nucleatum miktarının analizi için, 15 KRK hastası, 26 benign kolon hastalığı olan hasta çalışmaya alındı. Antikor analizi, KRK tanısı olan 22 hastaya, benign kolon hastalığı olan 35 hastaya ve sağlıklı 21 kişiye ait serum örnekleri ile yapıldı. Kolorektal kanser ve normal mukoza dokularında *F.nucleatum* pozitifliği sırasıyla %86,6, %66,6 oranlarında saptandı ve kanser dokusunda normal dokuya oranla miktarı fazla bulundu ($p<0,05$). Benign kolon lezyonlarında ve normal mukoza dokularında sırasıyla %73, %58 oranlarında

pozitiflik bulundu ve örneklerdeki miktarlar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Kolorektal kanserlilerdeki IgA ve IgG antikorları sağlıklılardakine oranla anlamlı derecede artmıştır ve antikorlar pozitif korelasyon gösterdi ($p<0,05$, $R=0,524$). ROC eğrisi analizi ile IgA ve IgG antikorunun eğri altında kalan alanlar sırasıyla 0,712, 0,683 şeklinde saptandı. IgA için sınır değeri 0,246 olarak belirlendiğinde duyarlılık %96, özgüllük %48, IgG için sınır değeri 0,055 olarak belirlendiğinde duyarlılık %77, özgüllük %48 olmaktadır.

Sonuç

F.nucleatum'un KRK etiolojisinde var olabileceği kanısına varılırken, benign kolon lezyonlarında buna benzer bir kanı gelişmemiştir. İleride yapılacak olan çalışmalar ile *F.nucleatum*'un sayısındaki artışın kanserleşme üzerine etkisi netleştirilmiş olacaktır. Buna paralel olarak kanserli hastalarda antikor miktarının saptandığı serolojik testler ile KRK teşhisinin konması mümkün olabilir. Bunun için gelecekte daha fazla çalışma yapılması önerilmektedir.

Anahtar Sözcükler: *Fusobacterium nucleatum*, ELISA, kPZR, Kolorektal Kanser, Kanseri etiolojisi

8. ABSTRACT

Utility of anti-*Fusobacterium nucleatum* antibody detection to the serological diagnosis of colorectal cancer

Introduction and purpose

Fusobacterium nucleatum is an anaerobic gram negative bacterium which is a valuable microbiota member of human intestine. *F.nucleatum* is generally in small number and having a balance within the microbiota bacteria and most importantly it is playing a role in the onset and development of colorectal cancer (CRC). In this study, the number of *F.nucleatum* in intestine lesion tissue and normal mucosal tissue were compared in patients with CRC or benign colon disease. Also, it's was aimed to investigate the utility of anti-*F.nucleatum* antibodies in the diagnosis of CRC.

Materials and methods

Our study was performed with patients with CRC, patients with benign colon disease and people with no colorectal pathology by colonoscopy between May 2018 and August 2019 at Kocaeli University Research and Education Hospital. Tissue and serum samples were stored at -80°C until the study. The amount of *F.nucleatum* in the lesion tissues and normal mucosal tissues of the patients was determined by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) (Qiagen, Germany) method. IgA and IgG antibodies against *F.nucleatum* were detected by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. *F.nucleatum* ATCC 25586 strain was used to coat ELISA plates. After each test was repeated three times, the OD values obtained were averaged. The diagnostic value of the antibodies was evaluated by ROC curve analysis.

Results

For analysis of the amount of *F.nucleatum*, 15 patients with CRC and 26 patients with benign colon disease were included in the study. Antibody analysis was performed with serum samples of 22 patients with CRC, 35 patients with benign colon disease and 21 healthy controls. *F.nucleatum* positivity was found 86.6% and 66.6% of CRC and normal mucosal tissues, respectively, and it was found to be higher in cancer tissue compared to normal tissue ($p < 0.05$). Benign colon lesions and normal mucosal tissues were positive in

73% and 58%, respectively, and there was no significant difference between the amounts of *F.nucleatum* in the samples ($p > 0.05$). IgA and IgG antibodies in patients with CRC were significantly increased compared to those in healthy participants and showed positive correlation ($p < 0.05$, $R = 0.524$). ROC curve analysis revealed that the areas under the curve of IgA and IgG antibody were 0.712, 0.683, respectively. When the cut-off value for IgA was determined as 0.246, the sensitivity was 96%, specificity was 48%; when the the cut-off value for IgG was determined as 0.055, the sensitivity was 77%, and the specificity was 48%.

Conclusion

While it was concluded that *F.nucleatum* may be present in the etiology of CRC, no similar conclusion has developed in benign colon lesions. Further studies will clarify the effect of the increase in the number of *F.nucleatum* on cancer formation. In parallel, it may be possible to establish the diagnosis of CRC by serological tests that determine the amount of antibody in cancer patients. For this, further studies are recommended in the future.

Keywords: *Fusobacterium nucleatum*, ELISA, qPCR, Colorectal cancer, Cancer etiology

9. KAYNAKLAR

1. McCoy AN, Araújo-Pérez F, Azcárate-Peril A, Yeh JJ, Sandler RS, Keku TO. Fusobacterium Is Associated with Colorectal Adenomas. PLoS One. 2013;8:e53653.
2. Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, ve ark. Comparison of human gut microbiota in control subjects and patients with colorectal carcinoma in adenoma: Terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing analyses. Oncol Rep. 2016;35:325–333.
3. Çetinbaş A. Mikrobiyota. Euras J Fam Med. 2017;6:51–56.
4. Zeller G, Tap J, Voigt AY, ve ark. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. Mol Syst Biol. 2014;10:766–784.
5. Amitay EL, Werner S, Vital M, ve ark. Fusobacterium and colorectal cancer: Causal factor or passenger? Results from a large colorectal cancer screening study. Carcinogenesis. 2017;38:781–788.
6. Türkyılmaz M, Hacıkamiloğlu E, Baran Deniz E, ve ark. Türkiye Kanser İstatistikleri 2015. Ankara; 2018. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf.
7. Tunsjø HS, Gundersen G, Rangnes F, Noone JC, Endres A, Bemanian V. Detection of Fusobacterium nucleatum in stool and colonic tissues from Norwegian colorectal cancer patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019;38:1367–1376.
8. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, ve ark. Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. Genome Res. 2012;22:299–306.
9. Hussan H, Clinton SK, Roberts K, Bailey MT. Fusobacterium's link to colorectal neoplasia sequenced: A systematic review and future insights. World J Gastroenterol. 2017;23:8626–8650.
10. Zhou Z, Chen J, Yao H, Hu H. Fusobacterium and Colorectal Cancer. Front Oncol. 2018;8:371–382.
11. Wang HF, Li LF, Guo SH, ve ark. Evaluation of antibody level against

- Fusobacterium nucleatum in the serological diagnosis of colorectal cancer. *Sci Rep*. 2016;6:33440.
12. Guven DC, Dizdar O, Alp A, ve ark. Analysis of Fusobacterium nucleatum and Streptococcus gallolyticus in saliva of colorectal cancer patients. *Biomark Med*. 2019;13:725–735.
 13. Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One*. 2012;7:e39743.
 14. Zheng D-W, Dong X, Pan P, ve ark. Phage-guided modulation of the gut microbiota of mouse models of colorectal cancer augments their responses to chemotherapy. *Nat Biomed Eng*. 2019;3:717–728.
 15. Schwabe RF. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13:800–812.
 16. Alkan ŞŞ. İmmün Sistem ve Barsak Mikrobiyotası. *J Biotechnol Strateg Heal Res*. 2017;1:7–16.
 17. Altuntaş Y, Batman A. Mikrobiyota ve metabolik sendrom. *Turk Kardiyol Dern*. 2017;45:286–296.
 18. Yumuk Z. İnsan-Hayvan Simbiyozları: Mikrobiyotalar. Anđ Ö, ed. *Yeni Mikrobiyoloji Mikrobiyomlarda CRISPR Savunma Sistemine*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2019:55–66.
 19. Gao R, Gao Z, Huang L, Qin H. Gut microbiota and colorectal cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36:757–769.
 20. Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology*. 2010;138:2101–2114.
 21. Fujio-Vejar S, Vasquez Y, Morales P, ve ark. The gut microbiota of healthy Chilean subjects reveals a high abundance of the phylum Verrucomicrobia. *Front Microbiol*. 2017;8:1–11.
 22. Fung TC, Artis D, Sonnenberg GF. Anatomical localization of commensal bacteria in immune cell homeostasis and disease. *Immunol Rev*. 2014;260:35–49.

23. Nakatsu G, Li X, Zhou H, ve ark. Gut mucosal microbiome across stages of colorectal carcinogenesis. *Nat Commun.* 2015;6:1–9.
24. Brenchley JM, Douek DC. Microbial Translocation Across the GI Tract. *Annu Rev of Immunology.* 2012;30:149–173.
25. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. *Cell Press.* 2004;118:229–241.
26. Wu J, Li Q, Fu X. *Fusobacterium nucleatum* Contributes to the Carcinogenesis of Colorectal Cancer by Inducing Inflammation and Suppressing Host Immunity. *Transl Oncol.* 2019;12:846–851.
27. Wostmann BS, Pleasants JR, Bealmear P, Kincade PW. Serum proteins and lymphoid tissues in germ-free mice fed a chemically defined, water soluble, low molecular weight diet. *Immunology.* 1970;19:443.
28. O’Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006;7:688–693.
29. Vyas U, Ranganathan N. Probiotics , Prebiotics , and Synbiotics : Gut and Beyond. *Gastroenterol Res Pract.* 2012;2012.
30. Sun Y, O’Riordan MXD. Regulation of Bacterial Pathogenesis by Intestinal Short-Chain Fatty Acids. *Adv Appl Microbiol.* 2014;85:93–118.
31. Lucas C, Barnich N, Nguyen HTT. Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. *Int J Cancernational J Mol Sci.* 2017;18:1310.
32. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity , stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature.* 2012;489:220–230.
33. Allali I, Delgado S, Marron PI, ve ark. Gut microbiome compositional and functional differences between tumor and non-tumor adjacent tissues from cohorts from the US and Spain. *Gut Microbes.* 2015;6:161–172.
34. Hashemi Goradel N, Heidarzadeh S, Jahangiri S, ve ark. *Fusobacterium nucleatum*

- and colorectal cancer: A mechanistic overview. *J Cell Physiol.* 2019;234:2337–2344.
35. Şahin K, Apak R, Atar HH, ve ark. Tüba-Mikrobiyota ve İnsan Sağlığı Sempozyumu Raporu. Türkiye Bilimler Akademisi. <http://www.tuba.gov.tr/tr>. Published 2017.
 36. Staude B, Oehmke F, Lauer T, ve ark. The Microbiome and Preterm Birth : A Change in Paradigm with Profound Implications for Pathophysiologic Concepts and Novel Therapeutic Strategies. *Biomed Res Int.* 2018.
 37. Gagnière J, Raisch J, Veziat J, ve ark. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22:501–518.
 38. Yatsunenکو T, Rey FE, Manary MJ, ve ark. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 2012;486:222–227.
 39. Lucas C. Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. *Int J Cancernational J Mol Sci.* 2017.
 40. Mima K, Sukawa Y, Nishihara R, ve ark. *Fusobacterium nucleatum* and T cells in colorectal carcinoma. *JAMA Oncol.* 2015;1:653–661.
 41. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, ve ark. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012;22:292–298.
 42. Chen Y, Lu Y, Ke Y, Li Y. Prognostic impact of the *Fusobacterium nucleatum* status in colorectal cancers. *Medicine (Baltimore).* 2019;98:39–46.
 43. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, ve ark. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2019;144:1941–1953.
 44. Luo K, Zhang Y, Xv C, ve ark. *Fusobacterium nucleatum* , the communication with colorectal cancer. *Biomed Pharmacother.* 2019;116:108988.
 45. Idrissi Janati A, Karp I, Sabri H, Emami E. Is a *fusobacterium nucleatum* infection

- in the colon a risk factor for colorectal cancer?: A systematic review and meta-analysis protocol. *Syst Rev*. 2019;8:114.
46. Macrae FA. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors. <https://www.uptodate.com>. Published 2019.
 47. Ryan-Harshman M, Aldoori W. Diet and colorectal cancer: Review of the evidence. *Can Fam Physician*. 2007;53:1913–1920.
 48. Ma Y, Yang Y, Wang F, ve ark. Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review of Prospective Studies. *PLoS One*. 2013;8:e53916.
 49. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, ve ark. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Prim*. 2015;1:1–25.
 50. Guagnozzi D, Lucendo AJ. Colorectal cancer surveillance in patients with inflammatory bowel disease: What is new? *World J Gastrointest Endosc*. 2012;4:108–116.
 51. Yashiro M. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20:16389–16397.
 52. dos Santos SCD, Barbosa LER. Crohn's disease: Risk factor for colorectal cancer. *J Coloproctology*. 2017;37:55–62.
 53. Dolatkhah R, Somi MH, Bonyadi MJ, Asvadi Kermani I, Farassati F, Dastgiri S. Colorectal cancer in Iran: Molecular epidemiology and screening strategies. *J Cancer Epidemiol*. 2015.
 54. Atabilen B, Akbulut G. Kolorektal Kanser Oluşumunda Farklı Mekanizmalar ve Beslenmenin Rolü. *Turkiye Klin J Med Sci*. 2019;39:89–107.
 55. Nikolaou S, Qiu S, Fiorentino F, Rasheed S, Tekkis P, Kontovounisios C. Systematic review of blood diagnostic markers in colorectal cancer. *Tech Coloproctol*. 2018;22:481–498.
 56. Karahasanoğlu T. Kolorektal Kanserler : Tanı ve Cerrahi Tedavi. *Gastrointest Sist Hast Sempozyumu*. 2001:271–279.

57. Zackular JP, Rogers MAM, Ruffin IV MT, Schloss PD. The Human Gut Microbiome as a Screening Tool for Colorectal Cancer. *Cancer Prev Res.* 2014;7:1112–1121.
58. Ramsey SD, Grady WM. Screening for colorectal cancer in patients with a family history of colorectal cancer or advanced polyp. <https://www.uptodate.com>. Published 2019.
59. Drewes JL, Corona A, Sanchez U, ve ark. Transmission and clearance of potential procarcinogenic bacteria during fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridioides difficile*. *JCI insight.* 2019;4:e130848.
60. Issa IA, NouredDine M. Colorectal cancer screening: An updated review of the available options. *World J Gastroenterol.* 2017;23:5086–5096.
61. Allen-Vercoe E, Strauss J, Chadee K. *Fusobacterium nucleatum*: An emerging gut pathogen? *Gut Microbes.* 2011;2:294–298.
62. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9:55–71.
63. W.Procop G, Church DL, Hall GS, ve ark., ed. *The Anaerobic Bacteria. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* 7. basım. Philadelphia: Wolters Kluwer Press; 2017:983–1073.
64. Citron DM. Update on the Taxonomy and Clinical Aspects of the Genus *Fusobacterium*. *Clin Infect Dis.* 2002;35:S22–S27.
65. Han YW. *Fusobacterium nucleatum*: A commensal-turned pathogen. *Curr Opin Microbiol.* 2015;23:141–147.
66. Rubinstein MR, Baik JE, Lagana SM, ve ark. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal cancer by inducing Wnt/ β -catenin modulator Annexin A1. *EMBO Rep.* 2019;20:e47638.
67. Lesiów MK, Pietrzyk P, Kyzio A, Urszula Katarzyna Komarnicka. Cu (II) Complexes with FomA Protein Fragments of *F . nucleatum* Increase Oxidative

- Stress and Malondialdehyde Level. *Chem Res Toxicol*. 2019.
68. Fardini Y, Wang X, Témoin S, ve ark. *Fusobacterium nucleatum* adhesin FadA binds vascular endothelial cadherin and alters endothelial integrity. *Mol Microbiol*. 2011;82:1468–1480.
 69. Liu H, Redline RW, Han YW. *Fusobacterium nucleatum* Induces Fetal Death in Mice via Stimulation of TLR4-Mediated Placental Inflammatory Response. *J Immunol*. 2007;179:2501–2508.
 70. Nosho K, Sukawa Y, Adachi Y, ve ark. Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2016;22:557–566.
 71. Rubinstein MR, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G, Han YW. *Fusobacterium nucleatum* Promotes Colorectal Carcinogenesis by Modulating E-Cadherin / β -Catenin Signaling via its FadA Adhesin. *Cell Host Microbe*. 2013;14:195–206.
 72. Lee SA, Liu F, Riordan SM, Lee CS, Zhang L. Global Investigations of *Fusobacterium nucleatum* in Human Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 2019;9:1–11.
 73. Warren RL, Freeman DJ, Pleasance S, ve ark. Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas. *Microbiome*. 2013;1:1–12.
 74. Edwards AM, Grossman TJ, Rudney JD. *Fusobacterium nucleatum* Transports Noninvasive *Streptococcus cristatus* into Human Epithelial Cells. *Infect Immun*. 2006;74:654–662.
 75. Abed J, Emgard JEM, Zamir G, Brennan CA, Garrett WS, Bachrach G. Fap2 Mediates *Fusobacterium nucleatum* Colorectal Adenocarcinoma Enrichment by Binding to Tumor- Article Fap2 Mediates *Fusobacterium nucleatum* Colorectal Adenocarcinoma Enrichment by Binding to Tumor-Expressed Gal-GalNAc. *Cell Host Microbe*. 2016;20:215–225.
 76. Proença MA, Biselli JM, Succi M, ve ark. Relationship between *Fusobacterium nucleatum* , inflammatory mediators and microRNAs in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2018;24:5351–5365.

77. Gur C, Maalouf N, Shhadeh A, ve ark. Fusobacterium nucleatum supresses anti-tumor immunity by activating CEACAM1. *Oncoimmunology*. 2019;8:e1581531.
78. Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B, ve ark. Binding of the Fap2 Protein of Fusobacterium nucleatum to Human Inhibitory Receptor TIGIT Protects Tumors from Immune Cell Attack. *Immunity*. 2015;42:344–355.
79. Chen T, Li Q, Wu J, ve ark. Fusobacterium nucleatum promotes M2 polarization of macrophages in the microenvironment of colorectal tumours via a TLR4-dependent mechanism. *Cancer Immunol Immunother*. 2018;67:1635–1646.
80. Sterlin D, Fadlallah J, Slack E, Gorochov G. The antibody/microbiota interface in health and disease. *Mucosal Immunol*. 2019:1–9.
81. Zeng MY, Cisalpino D, Varadarajan S, ve ark. Gut Microbiota-Induced Immunoglobulin G Controls Systemic Infection by Symbiotic Bacteria and Pathogens. *Immunity*. 2016;44:647–658.
82. Shet U, Oh HK, Chung HJ, ve ark. Humoral immune responses to periodontal pathogens in the elderly. *J Periodontal Implant Sci*. 2015;45:178–183.
83. Butt J, Jenab M, Willhauck-Fleckenstein M, ve ark. Prospective evaluation of antibody response to Streptococcus gallolyticus and risk of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2018;143:245–252.
84. Liddell JE, Cryer A, ed. Media and Buffers. A Practical Guide To Monoclonal Antibodies. 1. basım. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.; 1991:151–161.
85. Gaetti-Jardim E, Luvizotto MCR, Avila-Campos MJ. Virulence of oral Fusobacterium nucleatum from humans and non-human primates in mice. *Brazilian J Microbiol*. 2000;31:146–150.
86. Yan X, Liu L, Li H, Qin H, Sun Z. Clinical significance of Fusobacterium nucleatum, epithelial–mesenchymal transition, and cancer stem cell markers in stage III /IV colorectal cancer patients. *Onco Targets Ther*. 2017;10:5031–5046.
87. Yamaoka Y, Suehiro Y, Hashimoto S, ve ark. Fusobacterium nucleatum as a

- prognostic marker of colorectal cancer in a Japanese population. *J Gastroenterol.* 2018;53:517–524.
88. Flanagan L, Schmid J, Ebert M, ve ark. *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33:1381–1390.
 89. Bundgaard-Nielsen C, Baandrup UT, Nielsen LP, Sørensen S. The presence of bacteria varies between colorectal adenocarcinomas, precursor lesions and non-malignant tissue. *BMC Cancer.* 2019;19:1–13.
 90. de Carvalho AC, de Mattos Pereira L, Datorre JG, ve ark. Microbiota Profile and Impact of *Fusobacterium nucleatum* in Colorectal Cancer Patients of Barretos Cancer Hospital. *Front Oncol.* 2019;9:1–11.
 91. Mima K, Cao Y, Chan AT, ve ark. *Fusobacterium nucleatum* in Colorectal Carcinoma Tissue According to Tumor Location. *Clin Transl Gastroenterol.* 2016;7:e200.
 92. Wong SH, Kwong TNY, Chow TC, ve ark. Quantitation of faecal *Fusobacterium* improves faecal immunochemical test in detecting advanced colorectal neoplasia. *Gut.* 2017;66:1441–1448.
 93. Komiya Y, Shimomura Y, Higurashi T, ve ark. Patients with colorectal cancer have identical strains of *Fusobacterium nucleatum* in their colorectal cancer and oral cavity. *Gut.* 2018;68:1335–1337.
 94. Russo E, Bacci G, Chiellini C, ve ark. Preliminary comparison of oral and intestinal human microbiota in patients with colorectal cancer: A pilot study. *Front Microbiol.* 2018;8:1–13.
 95. Wei Z, Cao S, Liu S, ve ark. Could gut microbiota serve as prognostic biomarker associated with colorectal cancer patients' survival? A pilot study on relevant mechanism. *Oncotarget.* 2016;7:46158–46172.
 96. Li YY, Ge QX, Cao J, ve ark. Association of *Fusobacterium nucleatum* infection with colorectal cancer in Chinese patients. *World J Gastroenterol.* 2016;22:3227–

3233.

97. Ito M, Kanno S, Nosho K, ve ark. Association of *Fusobacterium nucleatum* with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *Int J Cancer*. 2015;137:1258–1268.
98. Liang Q, Chiu J, Chen Y, ve ark. Fecal bacteria act as novel biomarkers for noninvasive diagnosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23:2061–2070.
99. Liu PF, Haake SK, Gallo RL, Huang CM. A novel vaccine targeting *Fusobacterium nucleatum* against abscesses and halitosis. *Vaccine*. 2009;27:1589–1595.
100. Toussi DN, Liu X, Massari P. The FomA porin from *Fusobacterium nucleatum* is a toll-like receptor 2 agonist with immune adjuvant activity. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19:1093–1101.
101. Butt J, Jenab M, Pawlita M, ve ark. Antibody Responses to *Fusobacterium nucleatum* Proteins in Prediagnostic Blood Samples are not Associated with Risk of Developing Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019;28:1552–1555.
102. Monroy OL, Aguilar C, Lizano M, Cruz-Talonia F, Cruz RM, Rocha-Zavaleta L. Prevalence of human papillomavirus genotypes, and mucosal IgA anti-viral responses in women with cervical ectopy. *J Clin Virol*. 2010;47:43–48.
103. Zheng XH, Lu LX, Li XZ, Jia WH. Quantification of Epstein-Barr virus DNA load in nasopharyngeal brushing samples in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma in southern China. *Cancer Sci*. 2015;106:1196–1201.