



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**KOLOREKTAL KANSERDE BAĞIRSAK MİKROBİYOTASI İLE
MİKROBİYOTA FERMANTASYON ÜRÜNÜ GAİTA KISA
ZİNCİRLİ YAĞ ASİTLERİNİN ROLÜNÜN İNCELENMESİ VE
TANIDA KULLANILABİLECEK OLASI BİYOBELİRTEÇLERİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Esra SAYLAM

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç.Dr. Salih MAÇİN

Konya-2024

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**KOLOREKTAL KANSERDE BAĞIRSAK MİKROBİYOTASI İLE
MİKROBİYOTA FERMANTASYON ÜRÜNÜ GAİTA KISA
ZİNCİRLİ YAĞ ASİTLERİNİN ROLÜNÜN İNCELENMESİ VE
TANIDA KULLANILABİLECEK OLASI BİYOBELİRTEÇLERİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Esra SAYLAM

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç.Dr. Salih MAÇİN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 23122015 proje numarası ile desteklenmiştir.

Konya-2024

ÖNSÖZ

Tez çalışma sürecimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, eğitimimde emeği geçen ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Salih MAÇIN'e,

Çalışmam boyunca destek ve yardımlarından dolayı Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Duygu FINDIK, Prof. Dr. Uğur ARSLAN ve Prof. Dr. Hatice TÜRK DAĞI'na,

Birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım araştırma görevlisi arkadaşlarım ve Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına,

Hep yanımda olan sevgili aileme,

Her daim koşulsuz sevgi ve desteğini hissettiğim biricik eşime,

Minik dostlarım Fıstık ve Minnoş'a,

Sonsuz teşekkürler.

Esra SAYLAM

Konya-2024

İÇİNDEKİLER

SİMGELER ve KISALTMALAR	iv
TABLO VE ŞEKİLLER.....	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Amaç.....	1
1.2. Kolorektal Kanser.....	2
1.2.1. Kolon Anatomisi.....	2
1.2.2. Epidemiyoloji	2
1.2.3. Etyoloji	3
1.2.4. Patogenez.....	5
1.2.5. Klinik ve Prognoz	7
1.2.6. Tanı ve Tedavi	7
1.2.7. Tarama	8
1.3. Mikrobiyota	12
1.3.1. Mikrobiyotanın Gelişimi	13
1.3.2. Mikrobiyotayı Etkileyen Faktörler	15
1.3.3. Bağırsak Mikrobiyotası	18
1.3.4. Bağırsak Mikrobiyotasının İşlevleri	20
1.3.5. Bağırsak Mikrobiyotasının Hastalıklar ile İlişkisi.....	27
1.3.6. Mikrobiyota Analiz Yöntemleri	32
1.4. Zonulin	37
1.4.1. Zonulinin Düzenlenmesi.....	38
1.4.2. Zonulinin Hastalıklar ile İlişkisi	38
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
2.1. Çalışma Gruplarının Seçilmesi.....	39
2.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması.....	39

2.3. Mikrobiyota Analizi	39
2.3.1. Gaita Örneklerinden DNA İzolasyonu	39
2.3.2. 16S Hiperdeğişken Bölgelerin Amplifikasyonu	40
2.3.3. DNA Fragmanlarının Uç Tamiri	41
2.3.4. Örneklerle Barkod Bağlanması.....	41
2.3.5. Ürünlerin Saflaştırılması.....	42
2.3.6. Adaptör Reaksiyonu Kurma	42
2.3.7. DNA Miktarının Ölçülmesi	43
2.3.8. SpotON Akış Hücrelerini Hazırlama ve Yükleme	43
2.3.9. Biyoinformatik Analiz	44
2.4. Lipopolisakkarit Bağlayıcı Protein ve Zonulin Analizi.....	45
2.5. Kısa Zincirli Yağ Asidi Analizi.....	45
2.6. İstatistiksel Analiz	47
3. BULGULAR.....	48
3.1. Demografik Bulgular.....	48
3.2. Bağırsak Mikrobiyota Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi	48
3.2.1. Alfa Çeşitlilik.....	48
3.2.2. Beta Çeşitlilik	51
3.2.3. Operasyonel Taksonomik Birimlerin Dağılımları	52
3.2.4. LEFse Analizi	60
3.2.5. Biyokimyasal Bulgular	61
4. TARTIŞMA	62
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	81
KAYNAKLAR	84
ÖZET.....	93
SUMMARY	94
EKLER.....	95

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABD:	Amerika Birleşik Devletleri
ACS:	Amerikan Kanser Derneği
AMP:	Antimikrobiyal Peptit
APC geni:	Adenomatosis Poliposis Koli geni
ASCO:	American Society of Clinical Oncology
BT:	Bilgisayarlı Tomografi
BTK:	Bilgisayarlı Tomografi Kolonografi
CDT:	Sitoletal Genişletici Toksin
CXCR3:	CXC Kemokin Reseptörü 3
DNA:	Deoksiribonükleik asit
ELISA:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ETBF:	Enterotoksijenik <i>Bacteroides fragilis</i>
FAP:	Ailesel Adenamatöz Poliposis
FISH:	Floresan in-situ Hibridizasyon
FIT:	İmmünokimyasal testler
gFOBT:	Guaiac bazlı gaitada gizli kan testi
GİS:	Gastrointestinal Sistem
GRP:	G Protein Bağlı Reseptör
HCC:	Hepatoselüler Kanser
HDAC:	Histon Deasetilaz İnhibitörü
HMP:	İnsan Mikrobiyom Projesi
HRP:	Avidin-Horseradish Peroxidase
HSgFOBT:	Yüksek hassasiyetli Guaiac bazlı gaitada gizli kan testi

İBH:	İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı
kb:	Kilobaz
KBH:	Kronik Böbrek Hastalığı
KDa:	Kilodalton
KETEM:	Kanser Erken Teşhis Tarama ve Eğitim Merkezi
KOAH:	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
KRK:	Kolorektal Kanser
LBP:	Lipopolisakkarit Bağlayıcı Protein
LCN2:	Lipokalin 2
LDA:	Lineer Diskriminant Analizi
LPS:	Lipopolisakkarit
m²:	Metrekare
µl:	Mikrolitre
MCT1:	Monokarboksilat Taşıyıcı-1
MetaHIT:	İnsan Bağırsak Sisteminin Metagenomisi
MR:	Manyetik Rezonans
mt-sDNA:	Gaita DNA testi
nm:	Nanometre
NTBF:	Toksik olmayan <i>Bacteroides fragilis</i>
OTU:	Operasyonel taksonomik birim
PCoA:	Temel Koordinat Analizi
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PET:	Pozitron Emisyon Tomografisi
RNA:	Ribonükleik asit

rRNA:	Ribozomal RNA
SCFA:	Kısa Zincirli Yağ Asitleri
sIgA:	Salgısal İmmünglobulin A
TLR:	Toll-benzeri Reseptör
V:	Volt
VLDL:	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü



TABLO VE ŞEKİLLER

Tablo 2.1. Kullanılan 16S primer dizileri

Tablo 2.2. Kullanılan termal döngüleyici program

Şekil 2.1. Agaroz jelde yürütülen amplikon boyutları

Şekil 2.2. Manyetik rafta saflaştırılan örnek

Şekil 2.3. MinION (Oxford Nanopore,UK) sekans cihazı

Şekil 2.4. GC-MS/MS (Agilent 8860 serisi, USA) cihazı

Tablo 3.1. Çalışma gruplarının demografik özellikleri

Şekil 3.1. Shannon index grafikleri (GP1: hasta grubu, GP2: kontrol grubu)

Şekil 3.2. Simpson indeks grafikleri (GP1: hasta grubu, GP2: kontrol grubu)

Şekil 3.3. Chao-1 indeks grafikleri (GP1: hasta grubu, GP2: kontrol grubu)

Şekil 3.4. Bray-Curtis PCoA analizi grafiği (GP1: hasta grubu, GP2: kontrol grubu)

Şekil 3.4. Örneklerin mikrobiyota analizi filum düzeyi grafiği (GP1: hasta grubu, GP2:kontrol grubu)

Tablo 3.2. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun filum düzeyinde incelenmesi

Şekil 3.5. Örneklerin mikrobiyota analizi sınıf düzeyi grafiği (GP1: hasta grubu, GP2: kontrol grubu)

Tablo 3.3. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun sınıf düzeyinde incelenmesi

Şekil 3.6. Örneklerin mikrobiyota analizi aile düzeyi grafiği (GP1: hasta grubu, GP2: kontrol grubu)

Tablo 3.4. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun aile düzeyinde incelenmesi

Şekil 3.7. Örneklerin mikrobiyota analizi cins düzeyi grafiği (GP1: hasta grubu, GP2: kontrol grubu)

Tablo 3.5. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun cins düzeyinde incelenmesi

Şekil 3.8. Örneklerin mikrobiyota analizi tür düzeyi grafiği (GP1: hasta grubu, GP2: kontrol grubu)

Tablo 3.6. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun tür düzeyinde incelenmesi

Şekil 3.9. Taksonların cins ve tür düzeyinde LEFse grafiği (GP1: hasta grubu, GP2: kontrol grubu)

Tablo 3.7. Çalışma gruplarının serum zonulin ve LBP düzeylerinin incelenmesi

Tablo 3.8. Çalışma gruplarının gaita yağ asidi düzeylerinin incelenmesi

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Kolorektal kanser (KRK), tüm dünyada her iki cinsiyette de en sık ölüme yol açan malignitelerde üçüncü sırada yer almaktadır. Hastalığın sağkalım oranı erken evrede %70-90 arasında iken, ilerlemiş evrelerde ölüm oranı çok yüksektir. Kolorektal kanser taraması için önerilen tetkikler; gaitada gizli kan testi, kolonoskopi, bilgisayarlı tomografi kolonografi ve sigmoidoskopidir. Tanı için kullanılan non-invaziv işlemlerin invaziv işlemlere göre sensitivite-spesifite oranlarının düşük olması nedeniyle tanıda kullanılabilecek non-invaziv yeni biyobelirteçlerin araştırılması önem arz etmektedir.

İnsan vücudunda, konakçıyla beraber yaşayan mikroorganizmalar bütününe mikrobiyota denilmektedir. Kolon, insan vücudundaki mikropların yaklaşık %70'ini barındırması nedeniyle mikrobiyota çeşitliliği en fazla olan organdır. Bağırsak mikrobiyotası, bağırsak mukozası ile bir uyum içindedir ve çok önemli metabolik, immünolojik ve koruyucu görevleri mevcuttur. Mikrobiyota analizinde, geleneksel kültür yöntemlerinin yerini yeni nesil dizileme tekniklerinin almasıyla tespit edilen bakteri türlerinde önemli artışlar kaydedilmiştir. Son zamanlarda, kanser patogeneğinde mikrobiyotanın rolü ortaya koyulmuştur. Özellikle KRK ile bağırsak disbiyozisi arasındaki ilişki araştırılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda, KRK hastalarının bağırsaklarında bazı bakteri gruplarının artışı saptanmış ve bazı bakterilerin ise kanser ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Disbiyozis ile birlikte, mikrobiyota metaboliti olan gaita kısa zincirli yağ asitlerinin (SCFA) seviyesinde azalma ve bağırsak geçirgenliğinin göstergesi olan zonulinin salgısında artma saptanmıştır. Kolorektal kanser hastalarında mikrobiyota, mikrobiyota metabolitleri ve zonulini kapsayan multifaktöriyel çalışmalar çok kısıtlıdır.

Bu çalışmada, KRK hastalarından mikrobiyoloji ve biyokimya laboratuvarına rutin inceleme için gönderilen serum örneklerinden lipopolisakkarit bağlayıcı protein ve zonulin düzeyleri, gaita örneklerinden kısa zincirli yağ asidi ve mikrobiyota analizleri yapılacaktır. Kolorektal kanser hastaları ile sağlıklı gönüllülerin sonuçları kıyaslanacaktır. Elde edilen veriler ışığında, KRK ile bağırsak mikrobiyotası arasındaki ilişkinin aydınlatılmasına katkıda bulunmak ve KRK tanısında olası yeni biyobelirteçlerin saptanması amaçlanmaktadır.

1.2. Kolorektal Kanser

1.2.1. Kolon Anatomisi

Kalın bağırsak, ileoçekal bileşkeden anüse kadar uzanan sindirim sisteminin bir bölümüdür. Yetişkinlerde yaklaşık uzunluğu 1-1,5 m, ortalama çapı 4,8 cm kadardır. Kalın bağırsak çekum, asenden kolon, transvers kolon, desenden kolon, sigmoid kolon ve rektum olarak 6 bölümden oluşmaktadır.

Kalın bağırsağın arteriyel beslenmesi superior ve inferior mezenterik arterlerden sağlanmaktadır. Çekum, apendiks, asenden kolon ve transvers kolonun proksimal üçte ikisi superior mezenterik arter dalları tarafından beslenmektedir. Transvers kolonun distal üçte biri, desenden kolon, sigmoid kolon ve üst anal kanal bölümü inferior mezenterik arter ve internal iliak arter dalları tarafından beslenmektedir. Kalın bağırsak venöz drenajı bu arterlere eşlik eden superior ve inferior mezenterik venler tarafından portal vene olmaktadır. Ancak rektumun bir kısmı median rektal ven ile internal iliak vene ve internal rektal ven ile internal pudendal vene drene olmaktadır. Kalın bağırsağın lenfatik drenajı ise arteriyel seyir boyunca izlenmektedir (1).

Histolojik olarak incelendiğinde kalın bağırsak dıştan içe doğru; seroza, longitudinal düz kas tabakası, sirküler düz kas tabası, submukoza ve mukozadan oluşmaktadır (2). İnce bağırsaktan farklı olarak kalın bağırsak mukozasında villus yoktur ve bezlerde yoğun olarak müsin salgılayan goblet hücreleri bulunmaktadır.

Sağlıklı bir kolorektum, bağırsak lümeninden su ve sodyumun emilmesi, bağırsak içeriğinin ileri doğru itilmesi ve geçici olarak dışkının depolanmasında görev almaktadır (1).

1.2.2. Epidemiyoloji

Kanser, tüm dünyada ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2019 yılı verilerine göre 183 ülkenin 112'sinde 70 yaş altı ölümlerde birinci veya ikinci sıra nedeni olarak kanser yer almaktadır. WHO 2022 verilerine göre yaklaşık 1,9 milyon yeni KRK vakası ve buna bağlı 882 000 ölüm saptanmıştır (3). En sık görülen kanserlerde KRK (%10,6), erkeklerde akciğer ve prostat kanserinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Kadınlarda ise KRK (%9,5), meme kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanserdir. Kansere bağlı ölüm nedenlerinde her iki cinsiyette de KRK üçüncü sırada yer almaktadır (4).

En sık görülen ülkeler; Macaristan, Hollanda, Norveç ve Danimarka iken en az görülen ülkeler; Bangladeş, Gana ve Mozambik'tir. Bu coğrafi farklılık diyet, çevresel faktörler ve genetik yatkınlığa bağlı olup sosyoekonomik gelişimin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (4, 5). Sanayileşmiş ülkelerde yaşam boyu KRK gelişme ihtimali yaklaşık %5'tir ve KRK'ya dönüşebilen benign bir tümör olan adenom gelişme ihtimali ise % 20'dir. Hastalığın erken evrede sağkalım oranı %70-90 arasında iken, ilerlemiş evrelerde ölüm oranı çok yüksektir (6).

Türkiye'de KRK görülme sıklığı dünya ile benzerlik göstermektedir. Erkeklerde ve kadınlarda en sık görülen kanserlerde üçüncü sıradadır. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü 'Türkiye Kanser İstatistikleri 2018' raporuna göre KRK sıklığı erkeklerde yüz binde 24,8, kadınlarda yüz binde 14,7'dir (7).

Kolorektal tümörler, ≥ 65 yaş popülasyonda en sık proksimal kolonda (%50) görülmektedir. Fakat ≤ 50 yaş popülasyonda en sık rektumda (%37) görülürken bunu distal kolon (%25) takip etmektedir (8).

1.2.3. Etiyoloji

Çevresel faktörler

Sigara, obezite, alkol, kırmızı ve işlenmiş et KRK riskini artırırken; fiziksel aktivite, lifli ve tahıllı gıdalar, süt ürünleri, D vitamini ve kalsiyum takviyesi, omega-3 yağ asidi alımı, aspirin kullanımı ise riski azaltmaktadır (9). Antidiyabetik bir ilaç olan metformin kullanımının da kanser riskini azalttığı düşünülmektedir (10).

Obezite

Obezitenin olası üç farklı mekanizma ile KRK gelişimine neden olduğu düşünülmektedir. Bunlardan birincisi; bağırsak mikrobiyotasında meydana gelen değişiklikler ile bağırsak bariyer fonksiyonu bozulup geçirgenlik artmaktadır. İkinci mekanizma; yüksek yağlı diyetle bağlı olarak cis-düzenleyici bölgelerdeki asetilasyon ile kanser gelişimini tetikleyen transkripsiyonel tepkimeler ve DNA metilasyonunun etkilenmesidir. Üçüncü mekanizma; gram pozitif bağırsak bakteriler tarafından üretilen ikincil safra asidi olan deoksikolik asit üretiminin artmasıdır. Deoksikolik asit reaktif oksijen metaboliti üretimiyle DNA hasarına yol açmakta ve hepatik yıldız hücrelerde yaşlanmayı artırarak prostaglandin E₂ salgılanmasına neden olmaktadır. Tüm bu süreç mikrobiyota disbiyozisi ile KRK gelişimini tetiklemektedir (11).

Fiziksel aktivite

Fiziksel aktivite, kolon kanser gelişimini azaltırken rektum kanserini önlemede etkili bulunmamıştır. Yapılan çalışmalar egzersizin SCFA üretimini artırıp bağırsak mikrobiyotasında olumlu yönde değişiklere yol açtığını göstermiştir (12).

Diyet

Lif, SCFA üreten bağırsak bakteriyel fermantasyonunun ana substratıdır. Liften zengin beslenmenin SCFA düzeylerini artırdığı tespit edilmiştir. Kısa zincirli yağ asitleri; histon deasetilaz aktivitesini inhibe ederek, kolonik epitel hücre yüzeyindeki G protein bağlı reseptörler ile etkileşime girip inflamasyonu baskılar ve Treg hücre fonksiyonunu modüle edip bağırsak immün hemostazını destekleyerek kanser oluşumunu engellemektedir (13).

Kırmızı ve işlenmiş etin fazla tüketimi KKRK başta olmak üzere birçok kanser riskini artırmaktadır. Bu etlerde koruyucular (nitrit, nitrat), zenginleştirilmiş besin maddeleri (hem demiri, kükürt, doymuş yağ), işlenme ve pişirilme sırasında üretilen kimyasallar (heterosiklik amin, polisiklik aromatik karbon) gibi çeşitli etkenlerin prekanseröz etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (11).

Omega-3 yağ asitleri (eikosapentaenoik asit ve dokosaheksaenoik asit), antiinflamatuvar aktiviteye sahiptir. Bu yağ asitleriyle zengin beslenme, omega-6 çoklu doymamış yağ asitleri ve antibiyotiklerin neden olduğu bağırsak disbiyozunu iyileştirerek mikrobiyota çeşitliliğini artırmaktadır. Omega-3 takviyesi alan bireylerde KKRK gelişme riskinin düşük olduğu tespit edilmiştir (14).

Alkol tüketiminin, doz bağımlı KKRK riskini artırdığı tespit edilmiştir. Kronik etanol tüketimi bağırsak disbiyozisine neden olmaktadır. Mikrobiyota değişiklikleri, etanol oksidasyonu ve kolon asetaldehit seviyelerini artırarak karsinogenezi başlatmaktadır. Sigaranın latent dönemle birlikte uzun süreli kullanımı kanser riskini artırdığı saptanmıştır (11).

D vitamini kullanımının özellikle anti-inflamatuvar ve immün düzenleyici özelliği ile KKRK insidansı ve mortalitesini azalttığı saptanmıştır. Süt ürünlerindeki konjuge linoleik asit, laktoz, bütirat ve laktik asit üreten bakteriler antineoplastik aktiviteye sahiptir. Antineoplastik aktivitenin kanser riskini azalttığı bildirilmiştir (11).

Metformin, tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan biguanid türevi bir ilaçtır. Metformin kullanımının kanser insidansını azalttığı tespit edilmiştir. Protein kinaz aktivasyonu ile hücrel proliferasyonu azaltıp antineoplastik aktivite göstermektedir (15).

Uzun süreli aspirin kullanımının (haftada ≥ 2 tablet), prostoglandin sentezi inhibisyonuna bağlı olarak kolon kanser riskini azaltırken rektum kanserine etkisi saptanmamıştır (16).

Genetik faktörler

Kolorektal kanserlerin % 35'i genetik olarak meydana gelmektedir. Genetik faktörlerden kalıtsal geçişliler tüm KRK'ların %5'ini oluştururken, ailesel geçişliler % 30'luk kısmını oluşturmaktadır (17).

Lynch sendromu, DNA onarım genlerindeki mutasyon nedeniyle meydana gelen otozomal dominant geçişli nonpolipozis bir hastalıktır. Kolorektal kanserlerin %3'lük kısmını oluşturmaktadır. Lynch sendromunda yaşam boyu KRK gelişme riski %80'dir. Bu hastalar over, mide, endometrium, hepatobiliyer ve ince bağırsak karsinomu gibi ekstrakolonik kanser açısından da yüksek risk altındadır (17).

Ailesel Adenamatöz Polipozis (FAP), APC gen mutasyonunun neden olduğu otozomal dominant geçişli bir hastalıktır. Kolorektal kanserlerin %1'lik kısmını oluşturmaktadır. Hastalarda yaşam boyu kolorektal kanser gelişme riski %100'dür (18). 20 yaşına kadar tüm FAP hastalarına profilaktik cerrahi önerilmektedir. Juvenil Polipozis Sendromu, Peutz-Jehgers Sendromu, Cowden Sendromu, Hiperplastik Polipozis ve MUTYH ilişkili polipozis kalıtsal geçiş gösteren KRK gelişme riski yüksek diğer hastalıklardandır (17).

Ailede KRK öyküsünün olması kanser gelişim riskini artırmaktadır. Birinci derece yakınlarda kanser öyküsü olan hastalarda kanser gelişme riski 1,7 kat artmıştır. Ailede <55 yaş kanser tanısı olan hastalarda KRK gelişme riski daha fazla artmaktadır (19).

1.2.4. Patogenez

Kolonda iki farklı genetik mekanizma ile karsinom gelişebilir. Bunlar; APC/ β -katenin yolu ve mikrosatellit instabilite yoludur.

Sporadik kolon tümörlerinin %80'inin erken evrelerinde APC tümör supresör gen mutasyonu mevcuttur. APC, WNT sinyal yolunun bileşeni olan β -katenin'in negatif düzenleyicisidir. Normal fizyolojik süreçte APC, β -katenin'e bağlanarak yıkılmasına neden olmaktadır. APC fonksiyon kaybıyla, çekirdekte β -katenin birikmekte ve burada proliferasyonu artıran MYC ve siklin D1'i kodlayan genlerin transkripsiyonunu aktive etmektedir. Bunu apoptozisi önleyen KRAS mutasyonları takip etmektedir. KRAS mutasyonu neoplastik sürecin geç evrelerinde meydana gelmektedir (20).

Neoplastik süreç, TGF- β sinyalini kodlayan ve birer tümör supresör gen olan SMAD2 ve SMAD4'teki mutasyonlarla da ilişkilidir. Normalde, TGF- β sinyali hücre döngüsünü inhibe etmektedir ve bu genlerin kaybı ise kontrolsüz hücre bölünmesine neden olmaktadır. Kolon kanserinin %70-80'inde tümör supresör gen olan TP53 mutasyonu mevcuttur (20).

DNA mismatch tamir bozukluğu, MLH1-MSH2 gibi bunu kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Mutasyonlar sonucu tekrarlayan nükleotit dizileri oluşmakta, bu da mikrosatellit instabilite olarak adlandırılmaktadır. Meydana gelen bu mutasyonlar sessizdir çünkü mikrosatellitler DNA'nın kodlanmayan bölgelerinde bulunmaktadır. Tip II TGF- β reseptörü ve pro-apoptotik protein olan BAX'ı kodlayan genler gibi mikrosatellit dizilerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda karsinom gelişmektedir. TGF- β , kolon epitelyal hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir, tip II TGF- β reseptöründeki bir mutasyon kontrolsüz hücre bölünmesine neden olmaktadır. BAX mutasyonunda ise genetik olarak anormal hücreler hayatta kalmaktadır (20).

Proksimal kolon tümörleri, çekum ve asenden kolonda polipoid ve ekzofitik kitleler olarak büyürler; nadiren tıkanmaya neden olurlar. Distal kolon tümörleri ise lümen daralmasına neden olan lezyonlar şeklindedir. Sağ ve sol kolon tümörlerinin mikroskopik özelliği benzerdir. Çoğu displastik epitele benzeyen uzun kolumnar hücrelere sahiptir. Bazı tümörler bağırsak duvarında biriken bol miktarda müsin üretir; bu kötü prognozu göstermektedir. Bazıları ise mide kanserine benzer şekilde taşlı yüzük hücrelerinden oluşmaktadır (20).

1.2.5. Klinik ve Prognoz

Kolorektal kanserler sinsi bir şekilde ilerler ve uzun süre fark edilmeyebilir. Sağ kolon kanserleri en sık demir eksikliği anemisine bağlı olarak halsizlik ve yorgunluk gibi bulgular vermektedir. Bu nedenle demir eksikliği anemisi gelişen yaşlı erkek ve postmenopozal kadınlar, aksi ispat edilene kadar gastrointestinal kanser riski taşımaktadır. Sol kolon kanserleri, gizli kanama, bağırsak alışkanlığında değişiklik ve sol alt kadranda ağrıya neden olabilir (20).

En önemli iki prognostik faktör invazyon derinliği ve lenf nodu metastazı varlığıdır. Günümüzde American Joint Committee on Cancer'in belirlediği tümör-nod-metastaz (TNM) evrelemesi kullanılmaktadır.

Submukoza ile sınırlı olan tümörlerin (muskularis mukozayı geçmeyen) 5 yıllık sağkalım oranı %100'e yakındır. Submukoza invazyonunda sağkalım oranı %95'e, muskularis propria invazyonunda %70-90'a düşmektedir. Visseral serozaya veya komşu organlara invazyonda sağkalım oranı daha da düşmektedir. Lenf nodu metastazı varlığında sağkalım azalmaktadır. Bu hastalar genel olarak kemoterapi ve radyoterapi almaktadır. Bazı hastalarda neoadjuvan tedavisi primer tümör rezeksiyonundan önce yapılmaktadır (20).

Akciğer, karaciğer ve diğer organlara uzak metastazda 5 yıllık sağkalım oranı %15'e düşmektedir. Metastaz, portal drenaj nedeniyle en sık karaciğere görülmektedir. Fakat rektumda portal drenaj olmadığı için karaciğere metastaz daha nadirdir (20).

1.2.6. Tanı ve Tedavi

Kolorektal kanserde erken tanı küratif tedavi açısından oldukça önemlidir. Bunun için >50 yaş kişiler asemptomatik olsalar bile taranmalıdır. Semptomatik veya taramada pozitif saptanan kişilerin kesin tanısı için öncelikli kolonoskopi veya fleksible sigmoidoskopi ile eş zamanlı biyopsi yapılmalıdır. Alternatif olarak baryumlu grafi veya bilgisayarlı tomografi kolonografi (BTK) de tanıda kullanılmaktadır. Metastatik yayılım bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MR) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) ile görüntülenmektedir (21).

Kolorektal kanser tedavisinde; cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi seçenekleri mevcuttur. Günümüzde tedavi seçenekleri 'American Society of Clinical Oncology

(ASCO)' tarafından hastalığın evresi temel alınarak oluşturulan güncel kılavuzlara göre belirlenmektedir.

Erken evre kolon kanserinde primer tedavi cerrahidir. Evre 1 ve 2A'da herhangi bir kontrendikasyon yok ise tek başına minimal invaziv cerrahi önerilmektedir. Evre 2B ve 2C'de geniş rezeksiyon cerrahisine ek olarak adjuvan kemoterapi önerilmektedir. Erken evre rektum kanserinde (T1N0-T2N0) primer olarak total mezorektal eksizyon önerilmektedir. Lokal ileri evre rektum kanserinde (T3N0) ise kemoterapi sonrası total mezorektal eksizyon önerilmektedir (22).

İleri evre kolon kanserinde ilk aşamada önerilen tedavi kemoterapidir. Kemoterapiden sonra hastalık multidispliner olarak tekrar değerlendirilip mümkünse primer tümör, metastatik karaciğer ve akciğer lezyonlarının cerrahi rezeksiyonu yapılmalıdır. İleri evre rektum kanserinde de neoadjuvan kemoterapi veya radyoterapi sonrasında cerrahi tedavi önerilmektedir. Fakat obstrüksiyon, perforasyon, kanama gibi durumlarda ilk yapılması gereken acil cerrahi girişimdir (23).

1.2.7. Tarama

Kolorektal kanserin erken evrede saptanması ve taramada premalign lezyonların tespit edilip uzaklaştırılması mortalite, morbidite ve tedavi maliyetlerini önemli oranda azaltmaktadır. Tarama programlarında gaitada gizli kan testi, kolonoskopi, sigmoidoskopi ve BT kolonografi kullanılmaktadır (24).

Guaiac bazlı gaitada gizli kan testi (gFOBT):

Gaitadaki hemoglobinin hem molekülünü peroksidaz aktivitesi ile ortaya çıkarmaktadır. Bu test üst gastrointestinal kanama, kırmızı et, diyet ile alınan peroksidaz (bazı sebze-meyvelerde mevcut) ve nonsteroid antiinflamatuvar ilaç kullanımı nedeniyle yanlış pozitiflik sonucu verebilmektedir. C vitamini gibi antioksidan kullanımı da yanlış negatifliğe neden olabilmektedir. Guaiac bazlı gaitada gizli kan testinin düşük ve yüksek hassasiyetli çeşitleri mevcuttur. Düşük hassasiyetli gFOBT, piyasada mevcut olmasına rağmen tarama için önerilmemektedir. Yüksek hassasiyetli gFOBT'un (HSgFOBT) ise taramada kullanılması önerilmektedir. Yüksek hassasiyetli gFOBT'un duyarlılığı %62-79, özgüllüğü ise %87-96 arasında değişmektedir. Guaiac bazlı gaitada gizli kan testi, diğer testlere göre ucuzdur ve non-invaziv bir test olduğu için uygulaması da kolaydır (25).

İmmünokimyasal testler (FIT):

İnsan hemoglobininin globin molekülünü seçici olarak ayırt eden antikorlar kullanılmaktadır. Globin, üst gastrointestinal kanalda bulunan sindirim enzimleri tarafından parçalandığı için FIT sonucu buradaki bir kanamadan etkilenmemektedir. Bu testte kullanılan antikor, insan hemoglobinine özgü olduğu için sonucu ilaç, hayvan hemoglobini (kırmızı et) ve gıdalardan gelen peroksidazdan etkilenmemektedir. Bu nedenle gFOBT’da önerilen uygulama öncesi diyetle FIT için gerek yoktur. İmmünokimyasal testlerin duyarlılığı %73-92, özgüllüğü ise %91-97 arasında değişmektedir. Guaiac bazlı gaitada gizli kan testi ile kıyaslandığında FIT daha pahalıdır fakat yalancı pozitiflik oranı daha düşük olduğu için maliyet etkinliğe öne geçmektedir (24, 25).

Gaita DNA testi (mt-sDNA):

Hemoglobin için immünokimyasal bir test ile anormal şekilde metillenmiş BMP3, NORG, NDRG4, mutasyona uğramış K-ras ve kolon neoplazm hücrelerinden dökülen B-actini birleştiren bir testtir. Mt-sDNA’nın duyarlılığı %52-91, özgüllüğü ise %88-95 arasında değişmektedir. Duyarlılık ve özgüllüğü yüksek non-invaziv bir test olmasına rağmen maliyet açısından bakıldığında oldukça pahalıdır (25).

Kolonoskopi:

Tüm kolonun doğrudan görülmesi ve aynı seansta lezyonun tespiti ile beraber biyopsi alınması ve çıkarılabilmesi nedeniyle diğer tarama yöntemlerinden avantajlıdır. Kolonoskopi aynı zamanda diğer tarama yöntemlerinde pozitif saptanan hastaların ileri değerlendirilmesinde de kullanılmaktadır. Kolonoskopi, ≥ 6 mm adenomların tespitinde duyarlılığı %75-93 arasında, özgüllüğü %94, ≥ 1 cm adenomların tespitinde duyarlılığı %89-98 arasında değişmekte iken özgüllüğü ortalama %89’dur. Majör komplikasyonu perforasyon ve kanamadır ve bu komplikasyonlar polipektomi yapıldığında daha sık görülmektedir. Kolonoskopi yapılmadan önce sıvı içerikli diyet başlanır ve işlem öncesinde rektal lavmanlar uygulanarak bağırsağın temizlenmesi sağlanmaktadır. Kolonoskopi genellikle sedasyon eşliğinde yapılır ve invaziv bir işlem olması nedeniyle hem zor hem de oldukça pahalı bir yöntemdir (25).

Sigmoidoskopi:

Kolorektal kanser taraması için etkili olduğu gösterilen ilk görsel inceleme yöntemidir. Kolorektal lümenin splenik fleksuraya kadar olan bölümünü

incelemektedir. Sedasyona gerek olmadan daha sınırlı bir bağırsak hazırlığı ile işlem yapılabilir. En önemli komplikasyonu perforasyondur ve görülme sıklığı yaklaşık %0.08'dir. Sigmoidoskopi kullanımı, KRK mortalitesini %27 oranında azaltmaktadır. Fakat bu oran distal kolon kanserleri için geçerliyken, proksimal kolon görüntülenemediği için buradaki kanserlerde geçerli değildir. Proksimal kolon kanserlerini saptayamaması nedeniyle taramada kullanımı artık önerilmemektedir (25).

BT kolonografisi (BTK):

Sanal kolonoskopi olarak da adlandırılan BTK, ince kesitli bilgisayarlı tomografi çekimleriyle kolonun iki veya üç boyutlu görüntülenmesi sağlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda BTK'nın KRK'yı saptama oranı kolonoskopi ile eş değer bulunmuştur. BTK'nın kanser tespiti için duyarlılığı %96,1, >6 mm adenom tespiti için duyarlılığı %73-98 arasında, özgüllüğü ise %89-91 arasında değişmektedir (25). İşlem sırasında intravenöz katater takılarak bağırsak düz kaslarını gevşeten glukagon gibi ilaçlar verilmektedir (24). Bağırsak hazırlığı ile ilişkili olarak hastalarda karın ağrısı, presenkop veya vazovagal senkop görülebilmektedir. Komplikasyon olarak nadir de olsa perforasyon veya radyasyona maruziyet nedeni kanser görülebilmektedir. Görüntüleme esnasında insidental kolon dışı bulguların tanımlanması, tartışmalı olarak bir avantaj kabul edilmektedir. Görüntülemeye polip saptandığında diğer uzmanlarla koordinasyon sağlandığı durumda ek hazırlığa gerek kalmadan aynı gün kolonoskopi ile polipektomi yapılabilir (25).

Kapsül endoskopi:

Yutulabilir bir kapsülün iki ucunda bulunan kameralar, gastrointestinal kanaldan geçerken kolon ve rektumun görüntülenmesini sağlamaktadır. Görüntüler hastanın taktığı başka bir cihazda kaydedilip, bu görüntüler klinisyen tarafından analiz edilmektedir. Kapsül gaita ile vücuttan atıldığında test tamamlanmaktadır (25). Yapılan sistematik bir çalışmada kapsül endoskopinin ≥ 6 mm polip tespitinde duyarlılığı %87, özgüllüğü ise %76 olarak saptanmıştır (26). İşlem sonrasında bulantı, kusma, karın ağrısı ve yorgunluk gibi yan etkiler görülebilmektedir. Hastaların %0,8'inde meydana gelen kapsülün atılmaması bildirilen en ciddi komplikasyondur. Kapsül endoskopinin KRK taramasında kullanımı önerilmemektedir (25).

Metillenmiş Septin-9 DNA'sı:

Tümörün dolaşıma saçtığı moleküler bir biyobelirteç olarak kabul edilen metillenmiş Septin-9 DNA'yı (m sept9) saptayan bir kan testidir. Sept9 geni, apoptoz, hücre bölünmesi ve hücre iskeleti şekillenmesinde görevli GTP bağlayıcı proteinlerin septin ailesinden Septin-9'u kodlamaktadır. Septin-9 proteinin kontrollü hücre bölünmesini düzenleyen tümör supresör görevi mevcuttur. Sept9 geninin aktivitesindeki değişiklikler meme, over, prostat ve kolon gibi kanserlerle ilişkilendirilmiştir. Sept-v2 transkript dizisi metilasyon varlığında, KRK dokusu sağlıklı dokudan ayırt edilebilmektedir. Yapılan çalışmalarda testin duyarlılığı yüksek olmasına rağmen özgüllüğü düşük saptanmıştır. Asemptomatik popülasyon taraması için sınırlı sayıda kanıt mevcuttur. Bu sınırlamalar nedeniyle kanser taramasında rutinde kullanımı önerilmemektedir (25, 27, 28).

Amerikan Kanser Derneği (ACS) daha önce 50 yaş olarak önerdiği taramaya başlama yaşını 2018 yılında yayınlanan kılavuzunda 45 olarak güncellemiştir. Taramanın durdurulmasını ise 75 yaş veya yaşam beklentisinin 10 yıldan az olduğu durumlarda önermektedir (25). Türkiye'de uygulanan programda ise tarama 50-70 yaş arasını kapsamaktadır. Riskli kişilerde durum farklıdır; birinci derece yakın akrabalarda KRK öyküsü olan kişiler 40 yaşında, birinci derece yakın akrabalarda erken yaşta kanser öyküsü olan kişiler ise akrabalarında kanserin çıkma yaşından 5 yıl önce tarama programına alınmalıdır (24).

Amerikan Kanser Derneği tarama için gaita bazlı testlerden; yıllık gaita HSgFOBt ve FIT veya 3 yılda bir mt-sDNA testi, yapısal incelemelerden; 5 yılda bir BT kolonografisi ve sigmoidoskopi veya 10 yılda bir kolonoskopi önermektedir. (25). Türkiye'de yürütülen programda ise 2 yılda bir gaitada gFOBt ve FIT veya 10 yılda bir kolonoskopi ile taranmaktadır. Gaitada gizli kan testi Toplum Sağlığı Merkezi, Sağlıklı Hayat Merkezi, Kanser Erken Teşhis Tarama ve Eğitim Merkezi (KETEM) ve Aile Hekimliğindeki görevli personeller tarafından tarama kapsamına alınan bireylere uygulanmaktadır. Gaitada gizli kan testi negatif bireylere iki yıl sonra test tekrarlanması önerilmektedir. Test sonucu pozitif bireyler ise kolonoskopi yapılmak üzere gastroenteroloji veya genel cerrahi biriminin olduğu hastanelere yönlendirilmektedir. Kolorektal kanserde etkili sonuç alabilmek için önerilen tarama hızı %70 civarındır. Türkiye'deki 2016 yılındaki verilere göre mevcut tarama hızı %30-

40 arasındadır. ABD’de tarama hızı % 80, Finlandiya’da %71, Fransa’da ise bu oran %54 olarak raporlanmıştır (24).

1.3. Mikrobiyota

İnsan vücudunda çok sayıda bakteri, virüs, arke ve ökaryotlar yer almaktadır. Konakçıyla birlikte yaşayan mikroorganizmalar bütününe mikrobiyota, mikroorganizmaların genomlarına ise mikrobiyom denilmektedir (29). İnsan mikrobiyotasının, vücudumuzda bulunan hücrelerden 10 kat daha fazla yani yaklaşık 10^{14} sayıda bakteri içerdiği tahmin edilmektedir. Mikrobiyota, insan vücudunda dış çevreyle ilişkili hemen hemen her yüzeyde kolonize olabilmektedir. Gastrointestinal sistem (GİS) başta olmak üzere genitoüriner sistem, solunum yolu ve ciltte kolonize olabilmektedir. Kolonun, insan vücudundaki tüm mikropların %70’inden fazlasını barındırdığı tahmin edilmektedir (30).

İnsan mikrobiyotası ve konakçı ilişkisini anlamak için ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından finanse edilen ‘İnsan Mikrobiyom Projesi’ (HMP) 2007 yılında araştırılmaya başlanmıştır. HMP sonraki analizler için kritik olan referans genleri üretmeyi ve yetişkin bir kohort mikrobiyota yapısı ve fonksiyonu ile ilgili bir temel oluşturmayı amaçlamıştır (29). HMP, HMP1 ve HMP2 olarak iki aşamada gerçekleştirilmiştir. HMP1 için ABD’nin iki farklı bölgesinde sağlıklı 300 gönüllüden mikrobiyota örnekleri toplanmıştır. Mikrobiyom örnekleri; oral kavite, solunum yolu, GİS, deri ve ürogenital sistem adı altında erkeklerde 15 bölgeden, kadınlarda ise 3 ek vajinal bölge ile 18 bölgeden toplanmıştır. Buradan elde edilen veriler, insan vücudundaki bölgeleri anlamak, bağırsak antibiyotik direnci, cilt ve oral mikrobiyota gibi bölgeye özgü ekolojiyi incelemek için referans veri kaynağı olarak kullanılmıştır (31). HMP2’de ise analiz kapsamına mikrobiyomla ilişkili olduğu düşünülen gebelik-preterm doğum (gebelerin vajinal mikrobiyomu), inflamatuvar bağırsak hastalıkları (bağırsak mikrobiyomu) ve prediyabet (bağırsak ve burun mikrobiyomları) varlığı dahil edilmiştir. HMP1 ve HMP2’den elde edilen tüm sekans, omik veri ve klinik bilgiler HMP Veri Koordinasyon Merkezi’nde merkezi bir kaynak olarak depolanmaktadır (32).

Otizmden kansere birçok hastalık ile mikrobiyota değişiklikleri arasındaki ilişkiyi anlamak için yeni nesil moleküler ve epidemiyolojik sistemler kullanılmıştır. Mikrobiyota, aynı zamanda tedavi amaçlı verilen ilaçların etkinliğinde görevli immünolojik mekanizmaları da etkilemektedir (32).

1.3.1. Mikrobiyotanın Gelişimi

İnsanlar mikrobiyotasız bir şekilde dünyaya gelir fakat anne ve çevreden gelen mikroorganizmalar tarafından hızla kolonize olmaktadır (33). İnsan yaşamının erken zamanlarında mikrobiyota oluşumu ve gelişimi bireyler arasında farklılık göstermektedir. Anne ve bebek arasında ortak mikrobiyal suşların gözlenmesi mikrobiyotanın esas olarak anne bağırsağı, vajinası ve sütünden kolonize olduğunu düşündürmektedir (34). Yapılan çalışmalarda mikrobiyal kolonizasyon sürecinin doğumdan hemen sonra hızlı bir şekilde başladığı ve bu gelişim sürecinin yaklaşık üç yaşına kadar devam ettiği ortaya konulmuştur (35). Doğum şekli (vajinal doğum/sezaryen), doğumdaki gebelik yaşı, besleme yöntemi (anne sütü/mama), anne veya bebeğin antibiyotik kullanımı gibi birçok faktör bebek mikrobiyota gelişimini etkilemektedir (36).

Doğum, bebeğin ilk bağırsak mikrobiyota kolonizasyonunda çok önemli bir rol oynar. Doğum esnasında bebek yeni mikroplara maruz kalır ve vajinal veya sezaryen ile doğumda bu maruziyet tamamen farklıdır. Vajinal yolla doğan bebeklerin mikrobiyotası, annenin vajen florasında en bol bulunan *Lactobacillus* başta olmak üzere *Prevotella* ve *Sneathia* cinsi bakterilerle domine edilirken, sezaryenle doğan bebeklerin mikrobiyotası ise ortamda bulunan *Staphylococcus*, *Corynebacterium* ve *Propionibacterium* gibi cilt bakterileri tarafından domine edilmektedir (37). Anne bağırsağı mikrobiyal kolonizasyonun ilk kaynaklarından biridir ve yenidoğan bebekler ve anne arasında suşların paylaşımı yaygın olarak gözlenmektedir. Yapılan çalışmalarda *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Bacteroides vulgatus* ve *Parabacteroides distasonis* gibi anne suşlarının bebeklerin gastrointestinal kanalında kolonize olduğu bulunmuştur. Anneler ve çocukları arasındaki mikrobiyota benzerliği yaşamın ilk birkaç yılında artma eğiliminde olup zamanla bu durum azalmaktadır. Yapılan bir çalışmada, anne ve yenidoğan gaita suş benzerliği postnatal 4. günde %91 iken, 1 yıl sonra %55 olarak saptanmıştır (38).

Gebelik sırasında antibiyotik kullanımı, bebeğin mikrobiyota gelişiminde uzun vadeli etkilere yol açmaktadır. Yapılan bir çalışmada intrapartum antibiyotik kullanmayan annelerin anne sütünde kullananlara kıyasla daha yüksek düzeyde *Bifidobacterium* bulunmuştur. Emzirme sırasında antibiyotik kullanımı ise *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* da dahil olmak üzere anne sütündeki bakteri çeşitliliğini azaltmaktadır. Doğumdan sonraki erken evrede bebeğe antibiyotik

verilmesi bağırsak mikrobiyota gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Antibiyotik verilen bebeklerde *Bifidobacterium* kolonizasyonun azaldığı, *Enterococcus* kolonizasyonun ise arttığı saptanmıştır. Bebeğe antibiyotik verilmesi hem mikrobiyota çeşitliliğini azaltmakta hem de mikrobiyotanın ilk yılda olgunlaşmasını geciktirmektedir (39).

Emzirme, bebek mikrobiyotasının normal gelişimini sağlayan en önemli faktörlerden biridir. Beslenme türü (emzirme/mama), doğumdan sonraki ilk günlerde bağırsak mikrobiyotasının içeriğini önemli ölçüde etkilemektedir. Anne sütü, yağ, protein ve karbonhidrat açısından zengin olup immünoglobulin ve endokannabinoid içermektedir. Anne sütünde bulunan oligosakkaritler, ince bağırsakta tamamen parçalanamaz ve kolonda *Bifidobacterium* tarafından fermente edilip SCFA üretilmektedir. Yapılan çalışmalarda, bebek bağırsağında *Bifidobacterium* artışıyla eş zamanlı olarak asetik asit ve laktik asitte artma, oligosakkarit düzeyinde ise azalma tespit edilmiştir. Bu da oligosakkaritlerin *Bifidobacterium* hakimiyetindeki bağırsak mikrobiyotası gelişiminde faydalı bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (35). Anne sütünde bol miktarda *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus*’un yanı sıra *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Weissella* gibi bazı cilt bakterileri (*Propionibacterium* ve *Staphylococcus*) ve oral kavite bakterileri (*Veillonella*, *Leptotrichia* ve *Prevotella*) bulunmaktadır. Bu bakteriler bebek bağırsağına ulaştığında yararlı-zararlı bakterileri tanıma konusunda immün sisteme yardımcı olmaktadır. Formül mama ile beslenen bebeklerin bağırsağında bol miktarda *Bacteroides*, *Clostridium* ve *Staphylococcus* saptanmıştır (40). Yapılan çalışmalarda oligosakkarit ile desteklenen formül mamayla beslenen bebeklerde anne sütüyle beslenenler gibi düşük pro-inflamatuar düzeyi ve *Bifidobacterium*’dan zengin bağırsak mikrobiyotası saptanmıştır (35, 40).

Anne sütü mikrobiyota kolonizasyon kaynağı ile ilgili çeşitli teoriler mevcuttur. Bunlardan en yaygını, doğum sırasında annenin bağırsak ve vajinal mikrobiyotasına maruz kalan yenidoğanların cilt ve ağız boşluğundan kaynaklandığıdır. Fakat yapılan çalışmalarda doğum öncesi anne sütü mikrobiyotası ile doğum sonrası anne sütü mikrobiyotasının benzer olduğu bulunmuştur. Diğer bir teoride ise ‘Entero-mammary pathway’ denilen endojen bir yol ile anne bağırsağında bulunan bakterilerin mukozayla ilişkili lenfoid sistem aracılığıyla meme bezine ulaşmaktadır. Dendritik hücrelerin bağırsak epitelyumuna geçerek bağırsak

lumeninden kommensal bakterileri aldığı, sistemik dolaşıma geçtiği ve canlı bakterileri birkaç gün boyunca koruduğu saptanmış; böylece bağırsak bakterilerinin dentritik hücreler aracılığıyla meme bezine geçtiği düşünülmektedir. Anne sütü mikrobiyotasını gebelik yaşı, doğum şekli, annenin sağlığı ve diyeti etkilemektedir.(41).

Erken yaşamda bağırsak mikrobiyotası oluşması ile immün sistemin gelişmesi arasında bağlantı mevcuttur. Mikrobiyal kolonizasyon, yaşamın ilk 3 ayında natural killer ve dentritik hücrelerin olgunlaşmasını sağlamaktadır. Fakat mikroorganizma ile immün sistem arasındaki etkileşimin zamanı da çok önemlidir. Mikrobiyal antijenler yaşamın ilk birkaç haftası tanıtıldığında immün toleransı sağlamaktadır. Fakat bu tanıtım daha geç bir sürede meydana gelirse pro-inflamatuvar yanıt ve tolerans kaybına neden olmaktadır (33).

Uyku ve beslenme sırasında bebek ile anne temas halindeyken cilt mikrobiyotası yayılmaktadır. Kanguru-bebek bakımı veya doğumdan hemen sonra anne ile bebek arasında ten tene temas, sepsis riskini azaltır, emzirme oranını artırır ve kommensal bakterilerin aktarılmasına neden olmaktadır. Araştırmalar, annelerin yanı sıra babaların, kardeşlerin, tüylü evcil hayvanların ve kreşe gitmenin de mikrobiyota gelişimini etkilediğini bildirmektedir (38).

Doğumdan yetişkinliğe kadar insan mikrobiyotası gelişim halindedir. Doğumdan hemen sonra, yenidoğan bağırsak mikrobiyotası ilk olarak *Enterobacteriaceae* ve *Staphylococcus*'un varlığıyla aşırı çoğalır ve anne sütü başlanmasıyla daha sonra yerini *Bifidobacterium* alır. *Bifidobacterium*'dan zengin mikrobiyota ek gıdaya geçene kadar devam etmektedir. Bebek süttten kesilmeye başlayınca *Bacteroides* hakimiyeti artmakta, *Bifidobacterium* ise azalmaktadır. Süttten kesildikten sonra *Bifidobacterium* yerini *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Clostridium* ve *Veillonella* gibi yetişkin tipi mikroorganizmalara bırakmaktadır. Üç yaşına gelindiğinde ise bağırsak mikrobiyotası yetişkininkine benzer bir hale gelmektedir (35).

1.3.2. Mikrobiyotayı Etkileyen Faktörler

Sağlıklı bir mikrobiyota, taksonomik çeşitlilik ve mikrobiyal gen bakımından zengindir. Mikroorganizmaların dağılımı bireyler arasında farklılık gösterdiği gibi birey içinde de farklılık göstermektedir. Mikrobiyota içeriği bölgeden bölgeye

değişmektedir. Bağırsak, oral, vajina, cilt ve solunum yolu bölgelerinde bulunan mikroorganizmalar önemli derece farklılık göstermektedir (42). Bireyler arası mikrobiyota, genetik, yaş, cinsiyet, gebelik, diyet, coğrafya ve antibiyotik kullanımı gibi nedenlerle farklılık göstermektedir (43).

Diyet, bağırsak mikrobiyotasını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Hayvanlarda yapılan çalışmalarda, yüksek yağlı diyetle sahip olanlarda *Bacteroides* seviyelerinde azalma, *Proteobacteria* ve *Firmicutes* seviyelerinde artış saptanmıştır. Tam tersine, tam tahıl, kuruyemiş, sebze, meyve ve yalnızca belirli hayvansal ürünlerden (balık ve kümes hayvanları) oluşan Akdeniz diyeti, konakçılarda faydalı sonuçlar göstermiştir. Akdeniz diyeti uygulayan bireylerde, *Prevotella*, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir (42). Uzun süreli meyve, sebze ve baklagil lifi bakımından zengin bir diyet, bağırsak mikrobiyotasında çeşitliliğin artmasına neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu diyeti uygulayan kişilerde *Prevotella*'nın arttığı *Bacteroides*'in azaldığı tespit edilmiştir. Batılı tarz beslenme (yüksek şeker/yag, düşük sebze/meyve lifi), yararlı *Firmicutes* seviyesini azaltıp *Proteobacteria* seviyesini artırmaktadır. Yüksek protein-düşük karbonhidratlı 'kilo verme' diyetlerinin kısa süreli uygulanması bile mikrobiyotada önemli değişikliklere yol açmaktadır. Bu kişilerde kilo kaybına ek olarak *Bacteroides*'in arttığı *Firmicutes*'in azaldığı tespit edilmiştir. Bu diyetlerin 4 haftadan uzun süre uygulanması kolon hastalığı riskini artırabilmektedir (44).

Obezitede diyet faktörü ile beraber bağırsak mikrobiyotasında değişiklikler meydana gelmektedir. Bu kişilerde *Firmicutes* artışı ile beraber *Firmicutes/Bacteroides* oranının artışı dikkat çekmektedir (45). *Firmicutes/Bacteroides* oranı sağlıklı kişilerde 3 iken bu hastalık durumunda artmaktadır. Tersine *Firmicutes/Bacteroides* oranının azalması ise kilo kaybıyla ilişkilendirilmiştir (46). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, farelere kalori kısıtlamalı diyet verildiğinde kilo kaybına paralel olarak *Bacteroides*'in arttığı ve *Firmicutes/Bacteroides* oranının normalleştiği gösterilmiştir (45).

Diyete prebiyotik eklenmesinin mikrobiyota üzerinde olumlu etkileri mevcuttur. Prebiyotikler sindirilemeyen diyet lifleridir. Bu lifler, *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* seviyelerini artırır, konakçının mukozal bariyer bütünlüğü ve bağışıklığını artırarak fırsatçı enterik patojenlerin mukoza ile etkileşimini azaltmaktadır (44).

Mikrobiyotayı etkileyen faktörden biri de yaşanan coğrafyadır. Yapılan bir çalışmada İtalya'da yaşayan çocuklar ile Afrika'da yaşayan çocukların bağırsak mikrobiyotası incelenmiştir. İtalya'da yaşayan çocuklarda *Firmicutes* ve *Proteobacteria* düzeyleri yüksek, Afrika'da yaşayanlarda ise *Prevotella*, *Xylanibacter* ve *Treponema* düzeyleri yüksek saptanmıştır. Ayrıca Afrika'daki çocukların bağırsak mikrobiyota çeşitliliği diğerlerine göre fazla bulunmuştur. İtalya'daki çocuklar hayvansal protein ve yağdan zengin, Afrika'daki çocuklar ise posa ve bitkisel proteinden zengin diyetle sahip olduğu için iki grup arasındaki mikrobiyota farklılığının sebebi diyet olarak düşünülmüştür (47). Fakat coğrafi mikrobiyota farklılıklarının sebebi sadece diyetle atfedilmez. Yapılan büyük bir kohort çalışmasında (Avrupa, Amerika, Çin) mikrobiyota değişikliklerinin sadece diyet değil coğrafyaya bağlı erken yaşta maruziyet ve genetiğin de etkili olduğu öne sürülmüştür (48).

HMP1 verileri yapılan bir çalışmada çeşitli vücut bölgelerindeki mikrobiyota ile sosyoekonomik düzey bağlantısı araştırılmıştır. Sosyoekonomik düzey ile oral, solunum yolu ve cilt mikrobiyota çeşitliliği arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Solunum yolu çeşitliliği hava kirliliği ve obezite ile, oral çeşitlilik ağız sağlığı (diş hekimine gitme sıklığı dahil) ve diyet ile, cilt mikrobiyota çeşitliliği ise yaşanan konut ve kullanılan ulaşım aracı ile ilişkilendirilmiştir (31).

Egzersiz ile mikrobiyota ilişkisini inceleyen bir çalışmada egzersiz yapan bireylerin bağırsak mikrobiyota çeşitliliği daha fazla saptanmıştır. Bu çeşitliliğin sebebi egzersiz ve egzersizle birlikte diyet protein tüketimi gösterilmiştir (49).

Mikrobiyotayı etkileyen bir diğer faktör antibiyotiklerdir. İnsanlar sadece tıbbi kullanımla değil çiftlik hayvanları ve mahsullerinin kullanımı nedeniyle de antibiyotiğe çok fazla maruz kalmaktadır. Antibiyotik maruziyeti sonrasında bağırsak mikrobiyotası hızla değişmektedir. Geniş spektrumlu antibiyotikler bağırsak bakterilerinin 1/3'ini etkilemekte ve mikrobiyota çeşitliliğini azaltmaktadır. Antibiyotik kullanımı sonrası mikrobiyota, orijinaline benzer şekline geri dönebilir fakat bazı durumlarda benzer duruma gelmesi aylar ve yıllar sürebilmektedir. Antibiyotik kullanıma bağlı bağırsak mikrobiyotası değişikliğinin birçok sonucu olabilmektedir. Yeni gelen veya florada bulunan fırsatçı patojenlerin aşırı çoğalmasına bağlı olarak bağırsak enfeksiyonu yatkınlığına neden olabilmektedir. Mikrobiyota değişikliğine bağlı olarak temel immün hemostaz etkilenmekte ve atopi, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar ortaya çıkabilmektedir. Antibiyotik kullanımına bağlı olarak

gelişen antibiyotik direnci rezervuarının bağırsak mikrobiyotası olduğu tespit edilmiştir (50). Yapılan çalışmalarda klaritromisin kullanımının *Actinobacteria*'da azalma, *Bacteroides* ve *Proteobacteria*'da artış, oral vankomisin kullanımının ise *Firmicutes*'te azalma *Proteobacteria*'da artışa neden olduğu saptanmıştır (51).

Vajinal mikrobiyota, doğumdan ergenlik ve menopoza kadar değişkenlik göstermektedir. Bu içerik ve stabilite değişikliğinde en büyük rolün seks steroid hormonları olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda menstruasyon ve cinsel aktivitenin vajinal mikrobiyota stabilitesi üzerinde olumsuz etkileri olduğu gösterilmiştir. Menstrual siklusun sekretuar fazında ise mikrobiyotanın daha stabil olduğu saptanmıştır. Gebelik, vajinal mikrobiyotayı değiştiren en önemli unsurlardan biridir. Yapılan bir çalışmada gebelik esnasında vajende *Lactobacillus*'ta artma, bakteriyel vajinozisle ilişki olan *Atopobium*'da azalma saptanmış ve gebelerin vajinal mikrobiyotası diğerlerine göre daha stabil bulunmuştur (52). Gebelik sadece vajinal mikrobiyotayı değil bağırsak mikrobiyotasını da değiştirmektedir. Yapılan çalışmalarda, geç gebelikte bağırsak mikrobiyotasının ilk trimestere göre azaldığı saptanmıştır; *Firmicutes*'te azalma, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Streptococcus*'da artma görülmüştür (35).

1.3.3. Bağırsak Mikrobiyotası

İnsan vücudunda kolonize olan bakteri, virüs, arke ve tek hücreli ökaryotların çok büyük kısmı GİS'te yaşamaktadır. İnsan bağırsak mikrobiyotası, karmaşık bir ekolojik topluluk oluşturan yaklaşık binden fazla mikrobiyal türe sahiptir ve tüm insan genomuna kıyasla yaklaşık 150 kat fazla gen içermektedir (53). Bağırsağın hem yüzey alanının çok fazla olması (yaklaşık 200 m²) hem de besin olarak kullanabileceği kaynaklar açısından zengin olması mikroorganizma kolonizasyonunu artırmaktadır (30). Bağırsak mikrobiyotası, metabolizma, homeostaz, inflamasyon ve hematopoez gibi çeşitli fizyolojik olayları etkileyen primer faktördür. Nöral, endokrin, humoral, immünolojik ve metabolik yollar ile diğer organlarla çok yönlü bir bağlantısı vardır ve yakın zamanda "hayati bir organ" olarak nitelendirilmiştir. Mikrobiyomdaki değişiklikler sadece bağırsakla ilgili sorunlara neden olmaz, aynı zamanda diğer organlarla ilgili hastalıkları da etkiler; fakat bağırsak ve diğer organlar arasındaki etkileşim mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Hipokrat'ın MÖ. 400'lü yıllarda söylediği 'Ölüm bağırsaklarda oturur' sözünden de anlaşılacağı üzere çok

uzun zamandır bağırsağın önemi üzerinde durulmuş ve bu konuyla alakalı çok fazla çalışma yapılmıştır (53).

Eskiden klasik kültür yöntemleri kullanılan bakteri türlerinin tespitinde, 16S rRNA gen dizilimi ve anaerobik kültür tekniklerinin geliştirilmesiyle bağırsak mikrobiyota araştırılması popüler bir konu haline gelmiştir. Bu teknik gelişimle 1000’den fazla bağırsak bakteri türü karakterize edilmiştir (48). 2010 yılında yapılan ‘İnsan Bağırsak Sisteminin Metagenomisi’ (MetaHIT) projesi bağırsak mikrobiyotası ile ilgili yapılan en kapsamlı ilk araştırmadır. MetaHIT kapsamında Avrupa’da yaşayan 124 hasta ve sağlıklı bireylerden gaita örnekleri alınmış ve analiz edilmiştir. Analiz sonucunda, 576,7 gigabaz dizisinden türetilen 3,3 milyon mikrobiyal gen karakterize edilmiş ve bir havuz oluşturulmuştur. Bu genlerin %99,1’i bakteri kökenli olup geri kalanı çoğunlukla arkelerdir, yalnızca %0,1’i ökaryotik ve viral kökenlidir (54).

Bugüne kadar 50’den fazla bakteri filumu tanımlanmış olmasına rağmen insan bağırsak mikrobiyotasında *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* filumları hâkimdir. Daha az oranda ise *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* ve *Cyanobacteria* filumları mevcuttur (30). *Bacteroidetes* filumu, *Bacteroides* ve *Prevotella* gibi bakterilerden oluşmaktadır. *Firmicutes* filumu, %95’i *Clostridium* olmak üzere *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* ve *Ruminococcus* gibi 200’den fazla farklı bakteri grubundan oluşmaktadır. *Actinobacteria* filumunu asıl olarak *Bifidobacterium* türleri oluşturmaktadır. *Proteobacteria* filumunu, *Enterobacteriaceae* ailesi, *Pseudomonas* ve *Helicobacter* türleri, *Fusobacteria* filumunu *Fusobacterium*, *Verrucomicrobia* filumunu ise *Akkermansia* türleri oluşturmaktadır (55). 2021 yılında ‘Uluslararası Prokaryot Sistematik Komitesi’ bazı filumlarda isim değişikliğine karar vermiştir. *Firmicutes* değişerek *Bacillota*, *Bacteroidetes* değişerek *Bacteroidota* ve *Proteobacteria* ise değişerek *Pseudomonadota* ismini almıştır (56).

Bağırsak mikrobiyotası homojen değildir ve gastrointestinal kanalın anatomik kısımlarına göre farklılık göstermektedir. Mide ve duodenumda gram başına 10^1 - 10^3 bakteri, jejunum ve ileumda gram başına 10^4 - 10^7 bakteri, kolonda ise gram başına 10^{11} - 10^{12} bakteri düşmektedir. Yapılan çalışmalarda ince bağırsak ve kolon biyopsi örnekleri karşılaştırıldığında farklı bölgelerde farklı bakteri gruplarının zenginleştiği saptanmıştır. İnce bağırsaktan örneklerinde *Firmicutes* ve *Actinobacteria* filumları

zengin olduğu bulunmuştur. Kolon örneklerinde ise *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* filumundan *Lachnospiraceae* ailesi daha yaygın olarak bulunmuştur (30). Bu heterojenlik ortamların farklılığından kaynaklanmaktadır. İnce bağırsakta geçiş süresi kısa ve safra konsantrasyonu yüksektir; fakat daha yavaş akış hızına ve daha nötr bir pH'a sahip olan kolonda ise daha büyük mikrobiyal topluluklar, özellikle anaerobik tipler yaygın olarak gözlenmektedir (42). Bağırsak mikrobiyotası uzunlamasına heterojenliğe ek, enlemsel olarak da varyasyon göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, bağırsak lümeninde bulunan birçok bakteri türünün mukus tabakasına ve epitel kriptlerine erişmediği saptanmıştır. Örneğin, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* ve *Ruminococcus* üyelerinin tümü dışkıda bulunurken, ince bağırsağın mukus tabakasında ve epitel kriptlerinde yalnızca *Clostridium*, *Lactobacillus* ve *Enterococcus* tespit edilmiştir (30).

2010 yılında MetaHIT projesinde yapılan analizler sonucunda numunelerin enterotip olarak adlandırılan farklı kümeler yaptığı tespit edilmiştir ve MetaHIT tarafından farklı bir sınıflandırma önerilmiştir. Üç temel enterotip tanımlanmıştır: *Bacteroides*'ten zengin Enterotip 1, *Prevotella*'dan zengin Enterotip 2 ve *Ruminococcus*'tan zengin Enterotip 3. Enterotip 1, fermantasyon yoluyla karbonhidrat ve proteinlerden enerji elde etmektedir. Enterotip 2, bağırsağın mukozal tabakasında bulunan müsin glikoproteinlerini parçalamak için sinerjik etki yapmaktadır. Enterotip 3 en sık görülendir ve müsin parçalamakla beraber basit şekerlerin membrandan geçişi ile ilgilidir. Enterotipler, kompleks karbonhidratların emilebilir substratlara dönüşmesinin yanında vitamin metabolizmasında da görevlidir. Enterotip 1'de biotin, pantotenat, riboflavin ve askorbat metabolizması, enterotip 2' de ise folat ve tiamin metabolizması bulunmaktadır (57).

1.3.4. Bağırsak Mikrobiyotasının İşlevleri

Bağırsak mikrobiyotası, konak bağırsak mukozası ile bir uyum içindedir ve çok önemli metabolik, immünolojik ve koruyucu işlevleri mevcuttur.

Metabolizma

İnsan bağırsağındaki mikrobiyal topluluk, karaciğer ve bağırsak mukozasındaki enzimlerinin aktivitesinden farklıdır fakat onları tamamlayan ve konakçı sindirimi için gerekli fonksiyonları içeren geniş bir metabolik repertuvara

sahiptir. Mikrobiyota, karbonhidrat, protein, safra asidi, vitamin ve bitki polifenollerinin metabolizması ile oldukça yakından ilişkilidir.

Kısa zincirli yağ asitleri

Kolondaki bakteriler, çoğunlukla diyet karbonhidratlarını besin olarak kullanmaktadır. Diyetteki karbonhidratların fermantasyonu sonucunda kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) ve gazlar oluşmaktadır.

Gaitada en bol tespit edilen SCFA'lar asetat, propiyonat ve bütiratır. Bütirat, insan sağlığı için en önemli SCFA'dır. Bütirat, kolonositlerin temel enerji kaynağıdır ve ayrıca kolon kanseri hücrelerinin apoptozunu indükleyerek ve histon deasetilazları inhibe ederek gen ekspresyonunu düzenlemektedir, böylece potansiyel anti-kanser aktivitesine sahip olmaktadır (58). Aynı zamanda bütirat, cAMP bağımlı bir mekanizmayla bağırsak glukoneogenezini aktive ederek glukoz-enerji homeostazı üzerinde olumlu bir etkisi vardır. Propiyonat, epitel hücreleri için enerji kaynağıdır ve karaciğere de aktararak glukoneogenezde rol oynamaktadır. Aynı zamanda glukoneogenezini aktive edip GPR 41 ve GPR 43 gibi bağırsak reseptörleri ile etkileşime girerek tokluk sinyalinde önemli bir rol oynamaktadır. Glukoneogenezde propiyonatın glukozla dönüşümüyle hepatik glukoz üretimi azalmakta ve bunun sonucunda yağlanma azalmaktadır. Asetat en bol bulunan SCFA'dır ve diğer bakterilerin büyümesi için gerekli bir kofaktördür. Örneğin, *Faecalibacterium prausnitzii* asetatsız bir kültürde ürememektedir (59). Asetat, insan vücudunda periferik dokulara taşınır ve kolesterol metabolizması ile lipogenezde kullanılır. Aynı zamanda asetat merkezi iştah düzenlemesinde de önemli bir rol oynamaktadır (60).

Bakteriler fumarat, süksinat ve laktat gibi ara fermantasyon ürünleri de üretmektedir, fakat bunlar diğer bakteriler tarafından yoğun şekilde kullanıldıkları için sağlıklı bir bireyin gaitasında düşük seviyede tespit edilmektedir. Mesela, laktat bakteriler tarafından propiyonat veya bütirata dönüştürülür ve bu nedenle yetişkin gaitasında çok düşük bir seviyede bulunmaktadır. Fakat ülseratif kolit hastalarında laktat daha yüksek miktarlarda tespit edilebilmektedir (59).

Asetat birçok bakteri tarafından üretilir fakat bütirat ve propiyonat belirli bakteriler tarafından üretilmektedir. Bütirat, özellikle *Lachnospiraceae* ailesi ve *F. prausnitzii* türü başta olmak üzere *Firmicutes* filumu tarafından üretilmektedir. Propiyonat ise *Bacteroides* türleri ve bazı *Clostridium* türleri tarafından üretilmektedir

(59). Propiyonat ve bütirat, *Bacteroidetes* ve *Firmicutes*'in sadece karbonhidrat değil aynı zamanda peptit ve aminoasit fermantasyonuyla da oluşabilmektedir. Yapılan in-vitro çalışmalarda, aspartat, alanin, treonin ve metiyoninin fermantasyonuyla propiyonat; glutamat, lizin, histidin, sistein, serin ve metiyoninin fermantasyonuyla bütirat oluştuğu saptanmıştır (61).

Bakteriyel gaz üretimi

Gaz, anaerobik ekosistemlerdeki bakteriyel fermantasyonun bir ürünüdür. Fakat tüm anaerobik bakterilerde gaz oluşumu görülmemektedir. *Lactobacillus* ve *Bifidobacteria* gaz oluşturmamakta ve bu nedenle probiyotik ve prebiyotik olarak kullanıldıklarında gaz ve kötü kokuyu azalttığı öngörülmektedir (59). Yapılan araştırmalarda sağlıklı bir insanda günlük atılan gaz hacminin ortalama birkaç litre olduğu saptanmıştır. Bakteriyel olarak üretilen gazın çoğunluğu kokusuz gazlar olan hidrojen, karbondioksit ve metandan oluşmaktadır. %1'den az kısmı ise kokulu gazlar olan NH₃, hidrojen sülfür, indol, skatol ve uçucu aminlerden oluşmaktadır (62).

Hidrojen, toplam gazın yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır ve sadece mikrobiyota fermantasyonu ile üretilmektedir. Esas olarak *Bacteroides* ve *Clostridium* tarafından üretilmektedir. Üretilen hidrojenin bir kısmı ise bağırsak bakterileri tarafından tekrar kullanılabilir (59).

Karbondioksit, toplam gaz hacminin %5-50'sini oluşturmaktadır. Hidrojenin aksine karbondioksit sadece bağırsak bakterileri tarafından üretilmez. Üretilmesi için üç ana yol vardır; kandan kolon lümenine difüzyonu, üst GİS'te bikarbonatın asitlenmesi ve bakteriyel metabolizma. Bazı *Clostridium* türlerinin metabolizması sonucu hem karbondioksit hem de hidrojen üretilmektedir (62).

Vitamin sentezi

Bağırsak mikrobiyotası, başta K vitamini olmak üzere biyotin, kobalamin, folat, nikotinik asit, pantotenik asit, piridoksin, riboflavin ve tiamin gibi B grubu vitaminlerini sentezleyebilmektedir. Yapılan hayvan deneylerinde, mikrobiyotayı baskılamak için antibiyotik tedavisi verilerin farelerin plazma protrombin düzeylerinde düşüş saptanmıştır (59). *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* ve *Proteobacteria* filumundaki tüm bakteriler riboflavin ve biyotin sentezleyebilmektedir. *Firmicutes* ve *Actinobacteria*'ların ise daha az bir kısmı B vitamini biyosentezi yapabilmektedir. B12

vitamini sentezini ise tüm *Fusobacteria*'lar yapabilmektedir. *Bacteroidetes*'ler B12 hariç tüm B vitaminlerinin %90'ından fazlasının sentezleyebilmektedir (63).

Safra asitleri

Safra asitleri ile bağırsak mikrobiyotası arasında trans-genomik bir ilişki mevcuttur. Karaciğerde kolesterolden birincil safra asitleri olan kolik asit ve kenodeoksikolik asit sentezlenmektedir. Safraya salgılanmadan önce de taurin ve glisin ile konjugasyon meydana gelmektedir. Yemek yenilmesiyle safra kesesindeki safra asitleri, lipit sindirim ve Emilimi için ince bağırsağa salgılanmaktadır. Salgılanan safra asitlerinin çoğu distal ileumda tekrar emilir ve enterohepatik sıklusa girer ancak çok az bir kısmı ise kolona doğru ilerlemektedir. Buradaki bağırsak mikrobiyotası ile safra asitleri etkileşime girmektedir (59, 64).

Bakterilerde bulunan enzimlerle safra asitlerinde dekonjugasyon, 7 α -dehidroksilasyon ve 7 α -dehidrojenasyon gibi değişiklikler meydana gelmektedir. Bu üç ana işlem sonucunda, birincil safra asitlerini deoksikolik asit ve litokolik asit olarak ikincil safra asitlerine dönüşmektedir (64). Dekonjugasyon işlemi, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* ve *Lactobacillus* gibi mikrobiyotanın ana bakteri türlerinde bulunan safra tuzu hidrolaz enzimi ile yapılmaktadır. 7 α -dehidroksilasyon işlemi ise, *Clostridium* ve *Eubacterium* gibi türler tarafından yapılmaktadır. İkincil safra asitlerinin güçlü antimikrobiyal etkileri mevcuttur. Bunlar, bakteri membranında hasar ile beraber DNA hasarı ve protein yapılarında bozulmaya neden olabilmektedir. Safra asitlerinin antimikrobiyal özelliğinden dolayı bakteri popülasyonlarını kontrol altında tutan bir feedback etkisi mevcuttur (59).

Polifenoller

Meyve sebzelerden gelen polifenollerin çoğu, ince bağırsakta zayıf olarak emilip kalanı kolona geçmektedir. Yapılan çalışmalarda bağırsak mikrobiyotasının polifenollerini metabolize ettiği saptanmıştır. Birçok polifenol, konjuge ve polimerik formda bulunmaktadır. Bu formların biyoyararlanımı çok düşüktür ve emilmeden önce aglikonlara dönüştürülmesi gerekmektedir. Hidrolize edilme işlemi *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides ovatus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Eubacterium cellulosolvens*, *Lachnospiraceae* CG19-1 ve *Eubacterium ramulus* gibi bağırsak bakterileri tarafından yapılmaktadır. Equol, hidrolize olmuş bir soya polifenolüdür ve östrojenik/anti-östrojenik aktivite, antioksidan ve anti-kanser üzerine

etkileri ana izoflovundan daha fazladır. Bu nedenle, bağırsak mikrobiyotasının kişiler arası varyasyonu polifenollerin sağlık üzerindeki etkisini değiştirmektedir (59).

Kolin, hücre ve mitokondri membranının önemli bir bileşeni olan fosfotidilkolin sentezi için gereklidir. Fosfotidilkolin ayrıca trigliseritin organlara taşınmasından sorumlu çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) için gereklidir. VLDL’de meydana gelen bir kusur trigliseritin hepatositlerde depolanmasına neden olmaktadır. Bağırsak mikrobiyotası, kolini trimetilamine dönüştürerek kolin biyoyararlanımını düzenlemektedir ve dolayısıyla karaciğerde trigliserit depolanmasını etkilemektedir (65).

İmmünolojik işlevler

Bağırsak mikrobiyotası, bağırsak mukozal ve sistemik immünitinin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Mikrobiyotasız hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, bu hayvanların dalak ve mezenterik lenf düğümlerinin kusurlu olduğu, olgunlaşmış lenfoid foliküllerinin azaldığı ve hipoplastik Peyer plaklarının olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca plazma hücrelerinin, IgA ve IgG gibi immünoglobulin düzeylerinin ve CD4+ T hücre sayısının azaldığı saptanmıştır (30, 66).

Bağırsak mikrobiyotası, immünomodülatör ve antiinflamatuvar özelliklere sahip moleküllerin üretimi ile immün sistemi etkilemektedir. Bakteriler tarafından üretilen SCFA’ların bağırsak mukozası üzerinde antiinflamatuvar etkisi mevcuttur. SCFA’lar, G protein bağlı reseptörler (GRP) aracılığıyla enteral olmayan hücrelere sinyal göndermektedir. Bütirat, GPR109A/HCA2 reseptörünü aktive ederek özellikle Treg gelişmesi ve immün tolerans oluşmasında rol oynamaktadır. Bütirat ve daha zayıf olarak propiyonat, histon deasetilazları inhibe ederek gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Histon deasetilaz inhibisyonu ise Treg gelişimi ve aktivitesini artırmaktadır. SCFA’lar bu mekanizmalarla aynı zamanda dentritik hücre aktivitesini inhibe ederek antijen sunumunu da düzenlemektedir (66).

Mikrobiyotasız hayvanların bağırsakları *Bacteroides fragilis* ile kolonize edildiğinde bakteride bulunan polisakkarit A antijeninin, CD4+ T hücrelerinin proliferasyonunu indüklediği ve dalakta lenfosit gelişiminin yeniden başladığı saptanmıştır. *Lactobacillus* türleri, dentritik hücre aktivitesini düzenleyerek bağırsak mukozasındaki Th1/Th2/Th3 dengesini ve NK hücrelerinin aktivitesini etkilemektedir

(30). *Clostridium* türleri ise serum amiloid üretimiyle Th17 aktivitesini ve SCFA üretimiyle de Treg hücre aktivitesini düzenlemektedir (66).

Gastrointestinal sistemin aşırı bir immün reaksiyonu indüklemekten üzerini kaplayan yoğun bakteri florası ile birlikte var olması gerekmektedir. Bağırsak mukozasındaki dentritik hücreler, T hücrelerinin Th2 ve Treg'e farklılaşmasını sağlayarak bağırsakta daha toleranslı bir ortam oluşturmaktadır (30). Bazı *Lactobacillus* türleri bağırsak epitel hücrelerinden TGF- β salgılatarak bağırsaktaki immün toleransa katkı sağlamaktadır (67). *Bacteroides thetaiotaomicron* ise farklı bir mekanizma ile proinflamatuvar bir transkripsiyon faktörü olan NF κ B'yi inhibe ederek tolerans gelişimini sağlamaktadır. Yapılan bir çalışmada, bazolateral bölgedeki TLR9 aktivasyonun NF κ B'yi aktive ettiği fakat bağırsak mikrobiyotası tarafından indüklenen apikal bölgedeki sinyallenmenin ise NF κ B'yi inhibe ettiği ve böylece bakterilere karşı toleransı artırdığı saptanmıştır. Bağırsak mukozasındaki aşırı immün reaksiyonunun önlenmesinin başka bir yolu da mikrobiyota ile mukozal immün sistemin fiziksel olarak ayrılmasıdır. Kolon mukozasını kaplayan mukus tabakası kolonu iki farklı bölgeye ayırır; bakterilerden yoksun olan alt katman ve bakteriler tarafından kolonize edilmiş dinamik olan üst katman (30).

Bağırsak mukozasındaki plazma hücreleri tarafından bağırsak mikrobiyotasını kaplayan salgısal IgA (sIgA) üretilmektedir. Bunlar dentritik hücreler tarafından aktive edilmekte ve sistemik bir immün reaksiyon oluşmaması için lokal yanıt olarak kalmaktadır (30). Yapılan çalışmalarda sIgA üretimini, *Bacteroides* türleri gibi gram negatif bakterilerin gram pozitif bakterilerden daha fazla uyardığı saptanmıştır (68). sIgA1 ve sIgA2 olmak üzere iki çeşit sIgA mevcuttur. sIgA2 diğerinin aksine sadece mukozal yüzeylerde üretilmekte ve bakteriyel proteazlar tarafından parçalanmaya daha dirençli olmaktadır (69). Bakteriyel antijenlerin algılanmasıyla bağırsak epitel hücreleri tarafından proliferasyonu indükleyen ligand (APRIL) üretilir ve sonucunda sIgA1, sIgA2'ye dönüşmektedir (70). sIgA, bağırsak mikrobiyotasının aşırı çoğalmasını önler ve mukozal immün sistem ile etkileşimi en aza indirerek konağın yerleşik mikroplara karşı reaksiyonunu azaltmaktadır (71).

Lipopolisakkaritler (LPS), gram negatif hücre duvarında bulunan, sistemik dolaşıma geçtiğinde sepsise neden olan, endotoksin olarak da adlandırılan bileşiklerdir. LPS, lipid A içermektedir ve zonula okludens yoluyla veya diyetteki trigliserit ve kolesterolün bağırsaktan plazmaya emilmesini sağlayan şilomikronlara

sızarak gastrointestinal mukozayı geçebilmektedir. LPS, sistemik dolaşıma geçince karaciğer ve yağ dokusuna sızarak doğal bağışıklık tepkisini tetiklemektedir (65). Makrofajların plazma zarında bulunan CD14 reseptör proteinini aktive eden LPS bağlayıcı proteini (LBP) ile bir kompleks oluşturmaktadır. Bu kompleks, makrofajdaki TLR4'e bağlanır ve NF- κ B ve aktivatör protein gibi inflamatuvar efektörleri kodlayan genlerin ekspresyonunu aktive etmektedir (72). LPS ayrıca, NF- κ B'yı indüklemek için makrofaj ve dendritik hücrelerde bulunan NOD-like reseptörleri de düzenlemektedir (73). Tüm bu etkileşimler sonucunda sistemik bir immün reaksiyon oluşmakta hatta tablo sepsik şoka kadar ilerlemektedir (65).

Lipopolisakkaritin toksik potansiyelinin en aza indirilmesi gerekmektedir. Bağırsaktaki alkalın fosfotazların yaptığı endotoksin bileşimin fosforilasyonu bu toksik potansiyeli azaltmaktadır. Hayvanlarda yapılan çalışmalarda bağırsak alkalın fosfataz aktivitesinin, MyD88 ve TNF- α aracılı nötrofillerin bağırsak epiteline toplanmasını azalttığı, bağırsak mikrobiyotasına karşı inflamatuvar yanıtı en aza indirdiği ve toleransı arttırdığı saptanmıştır. Gram negatif bakterilerle ilişki, MyD88 sinyali indüklemekte ve böylece bağırsak alkalın fosfataz aktive edilmektedir (30). LPS, farklı bir mekanizma ile de detoksifiye olmaktadır; bağırsak epitel hücreleri, TLR4 yoluyla endotoksin sinyali için gerekli IRAK-1 aktivitesini azaltarak endotoksine karşı tolerans sağlamaktadır. Yapılan hayvan çalışmalarında bu toleransın sadece vajinal yolla doğan, doğum kanalında eksojen LPS'ye maruz kalan hayvanlarda kazanıldığı saptanmıştır (74).

Koruyucu işlevler

Bağırsak mikrobiyotası, dışarıdan gelen patojenlere karşı fiziksel bir bariyer sağlamakta ve konakçının çeşitli antimikrobiyal bileşikler üretmesini teşvik etmektedir. Defensinler, katelisidinler ve C tipi lektinler gibi çok sayıda antimikrobiyal peptit (AMP), bağırsakta üretilmektedir; bunlar hem komensal hem de patojenik bakterilerin yüzey yapılarını bozarak, bağırsak mikrobiyotasının bileşim ve sayısını düzenlemektedir. İnce bağırsak kriptalarında bulunan Paneth hücreleri, TLR-MyD88 sinyali ile çeşitli AMP'leri eksprese etmektedir. Yapılan çalışmalarda AMP indüklenmesi için tüm mikrobiyal topluluğun gerekli olduğu, tek türlerin varlığında indüklenmenin azaldığı tespit edilmiştir. Mikrobiyal hücrelere ek olarak SCFA ve litokolik asit gibi mikrobiyal metabolitler de AMP indüksiyonu yapmaktadır (75).

Defensin gibi bazı AMP'ler, aktif olmayan bir formda üretilirler, aktifleşmeleri için proteolitik bir bölünme gerçekleşmesi gerekmektedir. Paneth hücreleri, defensinleri aktive eden bir matriks metaloproteinaz olan matrilisin üretmektedir. Yapılan bir çalışmada, mikrobiyotasız farelerin *B. thetaiotaomicron* ile kolonizasyonu sonucunda matrilisin ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Bağırsak mikrobiyotası ve metabolitleri, AMP ekspresyonunu indükleyerek hem istilacı patojenlere karşı konak savunmasına katkıda bulunur hem de aşırı çoğalmayı önlemektedir (30).

Bağırsakta mikrobiyotanın fiziksel varlığı, patojen mikroorganizmaların kolonizasyonuna karşı caydırıcı bir etkiye sahiptir. Yapılan çalışmalarda, enterik patojenlerin kolonizasyonunu inhibe etme etkisi, gram pozitif bakterilerde gram negatif bakterilere göre daha yüksek bulunmuştur (76). Kullanılan probiyotikler, çeşitli bakteriyel patojenlerin tutunmasını ve istilasını önlemektedir. Yapılan bir çalışmada, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* probiyotik olarak kullanıldığında, epitel hücrelerinde *Listeria* enfeksiyonunun önlendiği, patojenik *E. coli* ve *S. enteritidis* kolonizasyonunun azaldığı saptanmıştır. *Lactobacillus* türleri, bakterilerin büyümesini engelleyen ortam oluşturmanın yanı sıra laktik asit üreterek konakçı lizoziminin antimikrobiyal aktivitesini güçlendirmektedir (30).

Bağırsak mikrobiyotası, hücre-hücre bağlantılarının korunması ve yaralanma sonrasında epitel onarımının desteklenmesi ile bağırsak epitel bariyer bütünlüğünü korumaktadır. *B. thetaiotaomicron*, desmozom bakımında önemli olan sprr2a ekspresyonunu indüklemektedir. Bazı *Lactobacillus* türleri, bağırsak epitelindeki sıkı bağlantıları korumakta ve patojen saldırısı veya bağırsak hasarında koruyucu bir etki sağlamaktadır. Ayrıca, mikrobiyal peptidoglikan tarafından uyarılan TLR2 sinyalinin, sıkı bağlantıları korunduğu ve apoptozun azaltılmasıyla bağırsak epitel bütünlüğünü desteklediği gösterilmiştir (30).

1.3.5. Bağırsak Mikrobiyotasının Hastalıklar ile İlişkisi

Sağlıklı insanların GİS'teki mikrobiyal topluluğu; çeşitlilik, zenginlik, stabilite, dayanıklılık ve esneklik ile karakterizedir. Mikrobiyotadaki direnç ve esneklik kabiliyetini aşan fonksiyonel dengesizlikler disbiyoz olarak adlandırılmaktadır. Çevresel ve konakçı ile ilgili faktörler disbiyozu neden olabilmektedir. Yapılan birçok çalışmada hastalık sürecinde bağırsakta disbiyozun meydana geldiği saptanmıştır. Disbiyoz, taksonomik disbiyoz ve fonksiyonel disbiyoz olarak iki kategoriye ayrılmaktadır. Taksonomik disbiyoz, mikrobiyal türdeki

denge­siz­li­ği ifade etmektedir. Bu, patojen artışı, temel takson kaybı veya alfa çeşitliliğinin azalmasına neden olabilmektedir. Mikrobiyal çeşitliliğin azalması filum, sınıf, cins ve tür düzeyi gibi farklı taksonomik sınıflarda gözlenebilmektedir. Obezitede, filum seviyesindeki dengesizliğe örnek olarak *Firmicutes* filumunun baskın hale geldiği gösterilebilir. Fonksiyonel disbiyozda ise taksonomik değişiklikten ziyade mikrobiyal metabolit seviyelerinde farklılıklar gözlenmektedir. Örneğin, çölyak hastalarının bağırsak mikrobiyotasında belirgin bir mikrobiyal dengesizlik gözlenmez fakat SCFA ve glutamin gibi metabolitlerin seviyeleri, sağlıklı bireylerden oldukça farklıdır (43). Yapılan birçok çalışmada mikrobiyotanın, kardiyovasküler, solunum yolu, beyin, kronik böbrek ve karaciğer hastalıkları, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve diyabet gibi hastalıkların gelişimi ile ilgili olduğu saptanmıştır (42).

Kronik hastalıklar

Yaşamın erken dönemlerindeki bağırsak mikrobiyotasındaki disbiyozun, bağırsak-akciğer eksenini etkilediği ve bunun sonucu olarak ilerleyen dönemlerde astım riskindeki artışla ilişkili olduğu saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada, kronik gastrointestinal hastalığı olan bireylerde belirsiz bir mekanizma ile astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) dahil kronik solunum yolu hastalıklarının prevalansı daha yüksek bulunmuştur. Akut KOAH alevlenmelerinde bağırsak geçirgenliği artmakta, bu da akut alevlenmelerde bağırsak mikrobiyotasının rol aldığını düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda, astım riski taşıyan çocuklarda *Veillonella*, *Faecalibacterium*, *Lachnospira* ve SCFA'ların önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır. Fakat bazı veriler, bağırsak-akciğer ekseninin çift yönlü olabileceğini göstermektedir; bununla alakalı farelerde yapılan bir çalışmada pnömoninin bağırsak epitelyal apoptozunu indüklediği gösterilmiştir (42).

Bağırsak ve böbrek arasındaki çapraz işlevsellik nedeniyle son zamanlarda bağırsak mikrobiyotasındaki disbiyozun kronik böbrek hastalığına (KBH) yol açtığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, KBH hastalarında *Actinobacteria* ve *Akkermansia*'nın azaldığı ve *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Weissella* gibi filotiplerin baskın hale geldiği gözlenmiştir. KBH hastalarında bağırsak mikrobiyotası değişikliğinin üremik toksinlerin birikimini artırdığı, bunun da oksidatif stres ve inflamasyonu artıran önemli bir faktör olduğu ortaya çıkmıştır (42, 77). Yapılan bir meta-analizde KBH hastalarının üçte birinde *E. coli* ve *Enterobacter* gibi patojen bakteri kolonizasyonunun artışı saptanmıştır (78).

Bağırsak-karaciğer ekseninde bağırsak mikrobiyotası, patojen ve metabolitleri portal ven aracılığıyla karaciğere taşıyarak karaciğer hastalıklarının gelişimine neden olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda, non-alkolik steatohepatit hastalarında düşük *Bacteroidetes*, artmış *Lactobacillus* ve *Firmicutes* seviyeleri, karaciğer siroz hastalarında ise düşük *Bacteroidetes*, artmış *Proteobacteria* ve *Fusobacteria* seviyeleri saptanmıştır (42). Karaciğer hastalıklarına genel olarak bakıldığında *Enterobacteriaceae*'de artma ve *Bifidobacterium*'da azalma eşlik etmektedir. Bağırsak disbiyozu, bakteriyel translokasyon yoluyla hastalarda endotoksemiye neden olabilmektedir, bu da immün sistemde fonksiyon bozukluğuna neden olabilmekte ve dolayısıyla karaciğer hücre nekrozunda artışa ve karaciğer yetmezliğine yol açabilmektedir (79).

Bağırsak mikrobiyotası ile tip 2 diyabet arasındaki bağlantı son yıllarda yavaş yavaş ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda, çeşitlilik ve dayanıklılığı düşük olan bağırsak mikrobiyotasının diyabetle ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır. Mikrobiyotanın bağırsaktan dokulara yer değiştirmesi ve bu nedenle inflamasyonun tetiklenmesi ile diyabetin oluştuğu düşünülmektedir. Kısa zincirli yağ asitleri çeşitli mekanizmalar ile insülin sekresyonunu artırarak glukoz metabolizmasını etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda, kontrol grubuyla kıyaslandığında tip 2 diyabet hastalarında *Firmicutes*, *Clostridia* ve SCFA düzeylerinin düştüğü bulunmuştur. Bağırsak disbiyozu nedeniyle artan LPS, periferde makrofaj toplanması ile inflamatuvar faktörlerin salınmasına neden olarak insülin sekresyonu inhibisyonuna yol açmaktadır (42, 79).

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH)

Crohn hastalığı ve ülseratif koliti içeren İBH, konakçının bağırsak mikrobiyotasına karşı geliştirdiği anormal bir tepkiden kaynaklanmaktadır. Mikrobiyota ile İBH arasındaki ilişki son yıllarda oldukça fazla incelenmiştir fakat anormal mikrobiyota ile İBH gelişimi arasındaki sebep-sonuç ilişkisi her zaman tartışma konusu olmuştur. İBH patogenezinde bakteriyel-konakçı taklitinden kaynaklanan otoimmün reaksiyonun rol oynadığı öne sürülmekte ve bu potansiyel taklitçilerin çoğunluğunu *Mycobacterium*, *Campylobacter* ve *Klebsiella* gibi patojenik bakteriler oluşturmaktadır (80). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, T hücreleri tarafından tanınan belirli bir bakterinin farelere transferi gerçekleştiğinde alıcıda kolit oluştuğu gözlenmiştir. Çalışmanın sonraki aşamalarında, bağırsak mukozasında

inflamatuvar değişiklikleri başlatmak için mikrobiyotanın birden fazla üyesinin eş zamanlı tanınmasının gerekli olduğu saptanmıştır (30).

Yapılan birçok çalışmada, Crohn hastalarından yapılan ileum biyopsilerinde yüksek düzeyde patojenik *E. coli* saptanmıştır. Saptanan suşlar, bağırsağı muhtemelen yatay gen transferi ile gelmiş üropatojenik *E. coli* suşları olarak raporlanmıştır. Crohn etyolojisi ile ilişkilendirilen bir başka bakteri ise *Mycobacterium paratuberculosis* 'tır (81). Yapılan çalışmaların çoğunda İBH hastalarında *Enterobacteriaceae*'de göreceli bir artış ve *F. prausnitzii* sayısında azalmanın ileumda lokalize Crohn ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bağırsak mikrobiyotasının İBH patogenezeine katkıda bulunduğu gibi bazı durumlarda bunu önleyebileceği ileri sürülmüştür. Mikrobiyota tarafından üretilen D vitamininin, kolitli bir hayvan modelinde dekstran sodyum sülfat kaynaklı bağırsak iltihabının şiddetini azaltıcı etki gösterdiği gözlenmiştir. Bağırsak mikrobiyotası ile İBH arasındaki ilişki değerlendirildiğinde İBH'yi tedavi etmek ve önlemek için pre veya probiyotik kullanımı denenmiş ve oldukça başarılı bulunmuştur (30). Özellikle *F. prausnitzii* uygulamasının, trinitrobenzenesülfonik asit kolitinin şiddetini azalttığı, proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını azalttığı ve kolitli farelerin disbiyozunu iyileştirdiği saptanmıştır (82).

Kanserler

Bağırsak mikrobiyotasının bazı yönleri konakçıda istenmeyen bir kanserojen sürece neden olabilmektedir. Mikrobiyotanın alternatif üç farklı mekanizma ile karsinogenezi tetiklediği düşünülmektedir. İlk mekanizma, bağırsak disbiyozu nedeniyle tetiklenen GİS mukozasındaki orantısız proinflamatuvar sinyaller, bağırsak epitelinin dökülmesi ve onarımının artmasına neden olmaktadır; bu süreç de malignite ile sonuçlanabilmektedir. İkinci mekanizma, bazı mikrobiyal türler, bağırsak mukozası üzerinde sitotoksik etkiye sahiptir; bu toksisite ve onarım sürecinde ise neoplazi tetiklenebilmektedir. Üçüncü mekanizmada ise, bazı besinlerin belirli mikrobiyal üyeler tarafından metabolizması, bağırsak epiteli için toksik olan yan ürünlerin oluşmasına neden olabilmektedir; sonucunda ise yaralanan epitelin kusurlu onarımı sonrasında neoplastik dönüşüme neden olabilmektedir (30).

Mikrobiyota kaynaklı GİS malignitesinin en iyi bilinen ve üzerinde en çok çalışılan örneği *Helicobacter pylori* aracılı mide kansinomudur. Dünya nüfusunun yaklaşık yarısı *H. pylori* taşıyıcısıdır ve bu bakterinin mide mikrobiyotasının bir üyesi olduğu kabul edilmektedir (83). Varlığında, konakçıdaki kalıcı bir bağışıklık tepkisi

ile mide mukozasında inflamasyona neden olarak sonucunda da mide epitelinde malign bir dönüşüme neden olabilmektedir. *H. pylori*, hem Th1 sitokin salınımıyla iflamasyonu artırarak hem de reaktif nitrojen ara ürünlerin üretimini indükleyerek kansorejen DNA hasarına neden olabilmektedir (30).

Bağırsak mikrobiyotası ve kolorektal kanser

Mikrobiyal disbiyozun kolorektal adenom ve KRK etyolojisinde rol oynadığı son zamanlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bağırsak mikrobiyota bileşimi KRK hastalarında değişmektedir. Kolorektal kanser hastalarında *Clostridium*, *Bacteroides* ve *Bifidobacterium* düzeylerinin arttığı saptanmıştır. Bunun tersine KRK gelişme ihtimali düşük hastaların mikrobiyotasında ise, *Lactobacillus* ve *Eubacterium aerofaciens* düzeylerinin yüksek olduğu saptanmıştır (84). Polipozis hastalarının mikrobiyotası KRK hastalarına benzer bulunmuştur. Bu da bağırsak mikrobiyota değişikliğinin muhtemelen malign dönüşümden önce olduğunu göstermektedir fakat disbiyozun karsinogenezi mi tetiklediği yoksa karsinojenik dönüşümün eşzamanlı olarak yerleşik mikrobiyota değişikliğine mi neden olduğu henüz belirlenememiştir (30, 85).

Diyetin kolorektal malignite gelişimi üzerinde önemli bir etkisi vardır. Diyet bileşikleri nedeniyle mikrobiyal metabolitler, bağırsak mukozasında sitoprotektif ve sitotoksik bir etkiye neden olabilmektedir. Bununla alakalı ana hipotezlerden biri, SCFA konsantrasyonu ve bileşiminin kanserojen kolonlarda değiştiği ve sonucunda kolon epitelinin korunmasında olumsuz etkilere neden olduğudur (86). Yapılan çalışmalarda, bütiratın kolon neoplazisine karşı koruyucu olduğu ve yüksek lif alımının, bütirat üretimini artırarak kolonda malignite gelişme riskini azalttığı saptanmıştır. Yine in vitro bir çalışmada, bütiratın apoptozu indüklediği, proliferasyonu inhibe edip gen ekspresyonunda değişikliğe neden olarak ve inflamatuvar yanıt ve sitokin seviyelerini düzenleyerek tümör baskılayıcı bir etkiye neden olduğu saptanmıştır (79). Başka bir hipotez ise, mikrobiyota tarafından üretilen hidrojen sülfid gibi toksik bileşiklerin artması ile sitotoksite nedenli kanserojen etki oluşturabileceğidir. Hidrojen sülfid, diyet protein fermantasyon ürünü olan aminoasitlerin metabolizması ile üretilmektedir ve yüksek proteinli diyet ise KRK ile ilişkilendirilmektedir (86).

Diyetteki besinlerin toksik metabolitlerine ek olarak, bazı mikrobiyota üyelerinin metabolizması ile de toksik elementler üretilmektedir. *E. faecalis*, *E. coli*, *B. fragilis*, *S. bovis* ve *F. nucleatum* gibi bazı bakterilerin de KRK gelişimi ile ilişkili olduğu saptanmıştır (42). *E. faecalis*, kolon epitel hücrelerinde DNA hasarını indükleyen hücre dışı reaktif oksijen türlerini üretmektedir (30). Kolon epitel hücresinin reaktif oksijen türleri ile maruziyeti ile kolibaktin üreten enzimatik mekanizma kodlanarak DNA hasarı ve sonrasında malignite oluşmaktadır. Hastalığın adenomdan kansere doğru ilerlediği süreçte periodontal bir patojen olan *Fusobacterium nucleatum*'un arttığı saptanmıştır. Kolorektal kanserin adenomatöz polipozis koli fare modelinde, *F. nucleatum*'un, bağırsak tümörlerinin miyeloid infiltrasyonunu ve IL-6, IL-8, TNF-a ve COX-2 gibi proinflatuar sitokinlerin gen ekspresyonunu artırarak tümör-immün mikro ortamını düzenlediği saptanmıştır (79).

B. fragilis, toksin üreterek STAT-3'ün aktive olmasını sağlar ve Th17 üretimini artırır. Sonrasında Wnt/ β -katenin sinyal yolu ve NF- κ B aktive olur; sonuçta inflammatuar maddelerin üretimi indüklenir ve hücre çoğalması artarak tümör oluşuma neden olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda kolon adenomu ve KRK hastalarında *B. fragilis*'in belirgin bir şekilde arttığı görülmüştür (79, 87). *S. bovis* ise COX-2 ekspresyonunu indükler ve bu sayede üretilen prostaglandinler hücre anjiyogenezini artırarak apoptozis inhibe eder; böylece kanser yolu uyarılmaktadır. *E. coli*'nin dört filogenetik grubundan biri olan B2 grubundaki bazı *E. coli* suşları KRK ile ilişkilidir. Mukozadaki herhangi bir bozulma *E. coli* invazyonunda artışa neden olur ve kolibaktin üretimiyle kolon epitel hücrelerinde DNA hasarı tetiklenir ve süreç sonucunda malignite oluşumu gözlenmektedir (87).

1.3.6. Mikrobiyota Analiz Yöntemleri

Mikrobiyota analizi için kullanılan yöntemler kültür temelli ve kültür bağımsız yöntemler olarak iki kategoride incelenmektedir.

Kültür temelli yöntemler

Kültür temelli yöntemler, mikroorganizmanın besiyerinde üremesi, boyanma özelliği, koloni morfolojisi ve ürettiği-tükettiği metabolitlerin özelliklerine dayanmaktadır (88).

İlk bakteriyel kültür ortamı 18. yüzyılda geliştirilmiş olup, 19. yüzyılda Pasteur tarafından saflaştırılarak insanlardan alınan klinik örneklerdeki bakterilerin laboratuvar ortamında üretilmesi sağlanmıştır. Robert Koch, bakteri kolonilerinin morfolojik özelliklerine tanımlanması için patates dilimlerini kullanmış ve bunlar üzerinde ilk bakteri koloni oluşumunu tanımlamıştır. Fakat patates dilimleri üzerinde sadece belirli mikroorganizmaların ürediği saptanmıştır ve ilk kez in-vitro kültürde üremeyen mikroorganizma tanımı ortaya çıkmıştır. 20. yüzyılın sonlarında jel mikrodamları ve mikrobiyal kültür çipleri gibi yöntemler geliştirilerek kültür temelli yöntemlerin duyarlılığı artırılmıştır. Kültür temelli yöntemlerde bakteri tanımlanması ucuz olmasına rağmen oldukça zahmetli olması ve var olan bakterilerin yalnızca çok az bir kısmının laboratuvar ortamında üretilmesi nedeniyle kullanışlı değildir. Yapılan çalışmaların çoğunda GİS mikrobiyal üyelerinin neredeyse %99'unun kültüre edilemediği saptanmıştır (89).

Kültür bağımsız yöntemler

21. yüzyılda kültür temelli analizler haricinde 16S rRNA gen dizilemesi gibi gelişmelerin ardından canlı bakteri hücrelerine ihtiyaç duyulmayan kültür bağımsız yöntemler ön plana çıkmaya başlamıştır. Moleküler yöntemlerde mikroorganizmanın tanımlanması spesifik DNA ve RNA tespiti ile yapılmaktadır. Duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan bu yöntemler kültürde üretilmeyen mikroorganizmaları tanımlayabilmesi ve analiz işlemini kısa sürede yapabilmesi nedeniyle oldukça avantajlıdır. Kullanılan ilk DNA temelli yöntemler, incelenen gene spesifik problemlerin kullanıldığı hibridizasyon teknikleri ve dizileme öncesi hedeflenen genin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmasıdır (89).

Bakteriyel 16S ribozomal RNA

Tüm canlıların ribozomları büyük ve küçük olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır. Küçük ribozomal alt birimler, prokaryotlarda 16S ve ökaryotlarda ise 18S boyutunda bir RNA molekülü içermektedir. Bakteriyel rRNA, yaklaşık 1500 nükleotid içermekte ve türler arasında farklılıklar mevcuttur. Bu genin sabit dizileri tüm bakteri gruplarında yüksek oranda benzerdir. Sabit diziler, varyasyon gösteren 'hiperdeğişken bölge' olarak adlandırılan bölgeler arasında dizilmiştir. V1-V9 olarak toplamda dokuz hiperdeğişken bölge tanımlanmıştır. Bu hiperdeğişken bölgelerdeki nükleotid farklılıkları bakteri türlerinin tanımlanması ve filogenetik sınıflandırılmasında kullanılmaktadır. Nükleotid sekansına dayalı bakteriyel

tanımlama yöntemleri, kültürde üremeyen bakterileri de tespit edebildiği için oldukça avantajlıdır. Son yıllardaki nükleik asit dizileme teknolojisindeki hızlı gelişmeler nedeniyle bu teknikler, bağırsak mikrobiyotası araştırılmasında altın standart hale gelmiştir (88). Bu yöntemle elde edilen 16S rRNA gen dizileri çeşitli veri tabanlarına kayıt edilmekte ve karşılaştırma yapılarak analizler yapılmaktadır. Bir tür tanımlanırken 16S rRNA dizi benzerliğinin %98, aynı cins içindeki farklı türlerin benzerliğinin ise %93,3-%99,9 olması beklenmektedir (89).

Dizileme dışı yöntemler

Bu tekniklerde, ilk önce analiz edilecek numuneden bakteriyel nükleik asit ekstrakte edilmektedir. Sonrasında bunu, 16S rRNA geninin tümü veya belirlenen hiperdeğişken bölgenin bir kısmının amplifikasyonu takip etmektedir. Bu işlem, seçilmiş bölgeleri çevreleyen korunmuş bölgelere karşılık gelen primerler ile PCR kullanılarak yapılabilir. Örnekteki bakteriyel 16S rRNA gen veya hiperdeğişken bölgelerin amplifiye karışımları sonrasında çeşitli teknikler kullanılarak çözülmektedir. Bu yöntemler; floresan in-situ hibridizasyon, pulse field jel elektroforezi, ısı gradient jel elektroforezi ve denatürasyon gradient jel elektroforezidir. Bazı yakın ilişkili bakterilerin 16S rRNA gen dizimleri arasındaki farkın çok küçük olması nedeniyle tanımlama, bu tekniklerle bazen güç olabilmektedir. Böyle bir dezavantaj nedeniyle zamanla bu yöntemlerin yerini yeni nesil dizileme teknikleri almıştır (88).

Dizileme dışı yöntemlerden ilk uygulanan yöntem olan Floresan in-situ hibridizasyonda (FISH), DNA izolasyonu yapılmadan hedef genlere özel floresan işaretli oligonükleotid probalar kullanılmaktadır. FISH'in, tek başına kullanıldığında duyarlılığı düşük iken flow sitometri gibi yöntemlerle kombine edildiğinde duyarlılığı artmaktadır. Yarı kantitatif ve hızlı olmasına rağmen en büyük dezavantajı, tür veya filuma özel probalar kullanıldığı için hiç bilinmeyen türlerin tanımlanması mümkün olmamasıdır. Bu yöntemde, 16S rRNA genine ek olarak topluluğa özgü enzimleri tanımlayan fonksiyonel probalar da kullanılabilir. Fakat bu yöntemle yapılan bağırsak mikrobiyota analiz çalışmaları henüz yeterli sayıda değildir (89).

Isı gradient jel elektroforezi ve denatürasyon gradient jel elektroforezi, örnekteki DNA kısımlarını karşılaştıran parmak izi yöntemlerdir. Bu yöntemlerde, farklı boyuttaki PCR ürünleri jel üzerindeki hareketleriyle tanımlanmaktadır. 16S rRNA gen ampikonu doğrusal artış gösteren poliakrilamid bir jele uygulanmaktadır.

Bu jel formamid-üre gibi denatüre edici bir ajan veya sıcaklık gradyanı içermektedir. Elektroforetik akım uygulandığında ampliconlar moleköl ağırlığına göre hareket etmekte ve kimyasallar veya sıcaklığın da etkisiyle DNA denatüre olmaya başlamaktadır. Denatürasyon bittiğinde DNA dizilimine göre farklı erime sıcaklığı oluşarak gradyanın farklı noktalarında hareket durmaktadır. Bu şekilde farklı DNA kısımları birbirinden ayrılarak bant oluşturmaktadır. Oluşan her bandın farklı bir türü temsil ettiği düşünülmektedir. Sekans veya prob hibridizasyonda kullanabilmek için jel boyanıp bandların görüntülenmesi sağlanmaktadır. Bu yöntemler ile hızlı ve çok sayıda örnek eşzamanlı analiz edilebilmektedir (89).

Dizileme yöntemleri

Bir numunedeki 16S rRNA gen ampliconunun tanımlanması, baz çifti sırasının farklı yöntemlerle tahmin edilmesi yani dizilemesiyle yapılmaktadır. Tür düzeyi identifikasyonu için dizileme yöntemleri altın standart kabul edilmektedir. Geleneksel yöntemlerde, 3'-hidroksil grubu çıkarılmış nükleotid baz analogları olan dideoksinükleotidler kullanılmaktadır. Zincir sonlandırma işleminde ise, DNA polimeraz enziminin nükleotid eklemesini engelleyen modifiye nükleotidler kullanılmaktadır. Pratikte bakıldığında bu yöntemlerde benzerliğin eşik değeri %95-99 olarak alınmaktadır. Tanımlama için tür düzeyindeki benzerlik yaklaşık %99, cins düzeyindeki benzerlik ise yaklaşık %97 olarak kullanılmaktadır. Bazı bakterilerin ise aile düzeyinde filogenetik tanımlaması yapılabilmektedir (89).

Dizileme temelli yöntemler; klonlanmış 16S rRNA gen ampliconların dizilemesi, yeni nesil dizileme, 16S rRNA gen ampliconların direkt dizilemesi, mikrobiyom shotgun dizileme ve metagenomik olarak dört ana gruba ayrılmaktadır.

Klonlanmış 16S rRNA gen ampliconların dizileme yöntemi olan sanger tekniği, nükleik asit dizilimi için kullanılan geleneksel ilk yöntemdir ve başlangıç materyali olarak saf DNA kullanarak deney başına sadece bir dizi oluşturmaktadır. Bu nedenle, birçok nükleik asit içeren bir örnekten gen dizilimi yapmak oldukça zor ve maliyetlidir. Bağırsak mikrobiyotası da birden fazla genomu sahip bir bakteri karışımı içerdiği için, bu teknikle dizileme yapılması çok mümkün değildir. Son yıllardaki yeni dizileme teknolojilerinin gelişmesiyle, bir örneğin DNA karışımındaki her molekölün eş zamanlı olarak dizilemesi mümkün olmuştur. Bu tekniklerde büyük miktarda veri üretildiği için analiz zor olmaktadır, fakat geliştirilen çeşitli hesaplamalı yazılım

araçları ile çok sayıdaki nükleotid dizisi eş zamanlı büyük bir veri tabanı ile eşleşerek analiz edilebilmektedir (88).

Yeni nesil dizileme yöntemlerinde diziler, diğer dizileme yöntemlerine göre daha az maliyetli ve daha hızlı bir şekilde elde edilmektedir. Bu yöntemlerde klonlanmış DNA amplikonları yerine total DNA veya direkt DNA amplikonu kullanılmaktadır. Ticari olarak Pyrosequencing 454, Illumina ve SOLiDTM versiyonları bulunmaktadır (89). Piyasaya sürülen ilk yeni nesil dizileme teknolojisi Pyrosequencing 454'dir ve emülsiyon PCR olarak da adlandırılmaktadır. Emülsiyon PCR'da, DNA fragmanı taşıyan streptavidin boncukları yakalanır ve bunlar bireysel amplifikasyon reaktörü olarak görev yaparak DNA şablonlarının kopyasını çıkarmaktadır. Elde edilen kopyalar, inorganik pirofosfat salınımını ölçen pirosekanslama tekniğiyle analiz edilmektedir. Pyrosequencing ile 500 milyon baz, %99 doğrulukla tek seferde dizilenebilmektedir. Illumina teknolojisinde ise köprü amplifikasyonu kullanılmaktadır ve her nükleotid ekleme adımında bazlardaki farklı renk ışımaların ölçülmesiyle analiz yapılmaktadır. Fakat Illumina, daha kısa sekans okuması ürettiği için pirosekansa göre kısa sekans tekrarını çözmede daha zayıftır. SOLiDTM versiyonu ise çok yakın zamanda piyasaya sürülmüştür ve hibridizasyon-ligasyon yoluyla sekanslama yapmaktadır (90).

Mikrobiyom shotgun dizileme ve metagenomik yöntemlerinde, belirli bir DNA fragmanının dizilenmesi yerine tüm DNA parçalarının bir örneği dizilenmektedir. Metagenomik yöntemde genlerin fonksiyonel analizi yapılabildiği için hastalık ve mikrobiyota arasındaki neden-sonuç ilişkisi daha iyi anlaşılabilir. Bu yöntem ilk olarak 1998 yılında toprak mikrobiyotası araştırılması için kullanılmıştır ve bu tarihten sonra insan mikrobiyota projesi ile birçok çalışmada kullanılmaya başlanmıştır (89).

Örnek toplanması ve hazırlama

Bağırsak mikrobiyota analizi için gaita, bağırsak doku biyopsisi ve bağırsak mukozal lavaj örneği kullanılmaktadır. Doku biyopsi örneğinde bağırsağın belli bir bölümünün doku özellikleri ile mikrobiyotası değerlendirilebilmektedir. Fakat bağırsağın her bölümü biyopsi için uygun değildir ve biyopsi ve lavaj örneği için mikrobiyotayı değiştirecek bir ön hazırlığın olması gerekmektedir. Gaita örneği ise, özellikle bakteri yoğunluğunun en fazla olduğu kolondaki bakteriler için iyi bir belirteçtir (88). Tüm gen sekansı yapılacaksa en az 1 gr gaita örneği gerekmektedir.

Alınan örnekler, anaerob ortamda +4°C'de 24 saat, anaerob/aerob ortamda -20°C'de 2-3 gün ve 80°C'de 1-2 yıla kadar saklanabilmektedir. Örneği saklamak için önerilen referans yöntem, hızlıca şoklayarak dondurmaktır. Yapılan çalışmalarda, şoklayarak dondurulan örnek ile taze örnekten yapılan DNA izolasyonunda anlamlı bir fark bulunamamıştır (91).

Dizileme yapılmadan önce örneklerden DNA ekstraksiyonu işlemi yapılmalıdır. Bu işlem için birkaç farklı protokol mevcuttur. Uygulanan yöntemler analiz için kullanılan örneğe göre değişmektedir. Örnek toplama ve DNA ekstraksiyonu yöntemlerini standartlaştırmak için, Uluslararası İnsan Mikrobiyomu Standartları Konsorsiyumu tarafından standart prosedürler belirlenmiştir. Ekstraksiyon genel olarak; homojenizasyon, lizis, DNA dışı maddelerin uzaklaştırılması ve DNA'yı saflaştırma gibi basamaklar içermektedir (88).

1.4. Zonulin

Zonulin, bağırsaktaki fizyolojik sürecin devam etmesi için gerekli olan hücreler arası sıkı bağlantıları tersine çevirebilen 47-kDa'lık bir insan proteinidir (92).

1990'lı yıllarda *Vibrio cholerae* tarafından salgılanan ve zonula occludens toksini (Zot) olarak adlandırılan bir toksin tanımlanmıştır. Zot, bağırsak ve beyinde spesifik hücre yüzey reseptörleri ile etkileşime girip, aktin mikrofilamentlerinin protein kinaz C bağımlı polimerizasyonunu indükleyerek sıkı bağlantıları düzenlemekte ve epitel geçirgenliğini artırmaktadır (93). 2000 yılında Wang ve arkadaşları tarafından insan bağırsağından Zot'a benzeyen bir protein izole edilmiştir. Zonulin olarak isimlendirilen bu protein *V. cholerae*'dan salgılanmaktadır (94). Aynı yıl Fasano ve arkadaşları aktif çölyak hastalarının bağırsak dokularında yüksek düzey zonulin saptamıştır (95). Sonrasında yapılan çalışmalarda zonulin ile pre-haptoglobin 2'nin (haptoglobinin aktif olmayan öncü formu) aslında aynı olduğu gösterilmiştir (96).

Haptoglobin, plazma akut faz proteinidir. Normal fizyolojide serumda bulunabilen haptoglobinlerin, IL-1, IL-6 ve TNF-a gibi inflamatuvar sitokinlerin etkisiyle salgılanması artmaktadır. Birincil görevi, doku hasarına neden olabilecek parçalanmış eritrositlerden salınan hemoglobini ortadan kaldırmaktır. Haptoglobin 1 ve haptoglobin 2 olmak üzere iki varyantı mevcuttur. Pre-haptoglobin 2, endoplazmik retikulumda çeşitli translasyon işlemleri sonrası aktif formuna ulaşmaktadır (93).

1.4.1. Zonulinin Düzenlenmesi

Karaciğer, haptoglobinlerin ana kaynağı olmasına rağmen zonulin bağırsaktan da salgılanmaktadır. Bağırsaktaki zonulin salgılanmasının ana düzenleyicisi inflamatuvar CXC kemokin reseptörü 3'tür (CXCR3). İnflamatuvar bağırsak hastalığı, besinler ve mikrobiyota, CXCR3'e bağlı zonulin salınımını aktive etmektedir (93). Zonulin salınımını takiben de bağırsak geçirgenliği artmaktadır. Zonulin salınımı tetikleyen iki önemli etken gluten ve mikrobiyal aşırı çoğalmadır (97).

Son zamanlarda mikrobiyotanın zonulin salınımı üzerine etkisi ortaya çıkmıştır fakat altta yatan mekanizma kısmen belirsizdir. Yapılan çalışmalarda, *E. coli*'den salınan LPS'nin kolon epitel hücrelerinden zonulin salgısını indüklediği ve LPS ile tedavinin epitel hücrelerinde in-vivo ve in-vitro CXCR3 ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca yapılan farklı bir çalışmada, gaitadaki artmış zonulin düzeyleri ile mantar ve parazit düzeyleri arasında doğrusal bir bağlantı bulunmuştur. *E. coli*, *Prevotella*, *Pseudomonas* ve *Salmonella* spp. gibi gram negatif bakteriler bağırsaktan zonulin salınımını artırırken, *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* spp. gibi gram pozitif bakteriler ise zonulin salınımını azaltmaktadır (93). Tüm veriler göz önüne alındığında zonulinin aslında, mikroorganizmaları temizleyen bir savunma mekanizması olarak görev yaptığı düşünülmektedir (97).

1.4.2. Zonulinin Hastalıklar ile İlişkisi

Zonulinin hastalıklar ile ilişkisini aydınlatmak için en çok çölyak hastalığı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bağırsak, bakteriyel bileşenlere veya gliadine maruz kaldığında zonulin salınımı artmakta ve buna bağlı olarak bağırsak geçirgenliğinde de artışa neden olmaktadır. Sonuçta ise çölyak hastalarında klinik alevlenmelere neden olmaktadır. Çölyak dışı gluten duyarlılığı, irritabl bağırsak sendromu, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve nekrotizan enterokolit gibi bağırsak hastalıklarına ek olarak karaciğer hastalıkları, tip 2 diyabet, bazı romatolojik hastalıklar, şizofreni, bipolar bozukluk, depresyon, anksiyete, Alzheimer, Parkinson gibi sinir sistemi hastalıklarında da zonulin seviyelerinde artış saptanmıştır (93). Ön çalışmalarda gliom, oral squamöz hücreli karsinom, akciğer kanseri, pankreas kanseri ve KRK gibi bazı kanserlerde de serum/plazma zonulin seviyelerinde artış saptanmıştır. Özellikle KRK hastalarında evreleme artışıyla zonulin düzeylerinin korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Fakat KRK'da gastrointestinal tümörlerin bir belirteci olarak zonulinin klinik değeri hakkında bir bilgi yayınlanmamıştır (98).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışma Gruplarının Seçilmesi

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Polikliniğinde, Mart 2023 ile Aralık 2023 tarihleri arasında yeni KRK tanısı alıp henüz tedavi edilmemiş 16 hasta çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubu olarak, aynı polikliniğe periyodik kontrol amaçlı başvurup KRK taramasında negatif çıkan 16 sağlıklı birey dahil edildi. Çalışmaya, 18 yaşından büyük olan, gebeliği olmayan, son 3 ayda antibiyotik tedavisi almamış ve cerrahi bir girişim yapılmamış olan, kronik bir hastalığı ve aktif enfeksiyon tablosu olmayan bireyler dahil edildi.

2.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Çalışmaya dahil edilen bireylerden, rutin tetkikler için biyokimya laboratuvarına gönderilen gaita örneklerinin artık kısımları 1 gr olacak şekilde 2 ayrı steril burgu kapaklı gaita kabına aktarıldı ve üzeri barkodlandı. Ayrılan gaita örnekleri mikrobiyota ve kısa zincirli yağ asitleri analizi çalışmalarına kadar -80°C’ de saklandı. Aynı bireylerden rutin tetkikler için biyokimya ve mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen serum örneklerinin artık kısımları eppendorf tüplerine en az 1 ml olacak şekilde aktarıldı ve üzeri barkodlandı. Serum örnekleri lipopolisakkarit bağlayıcı protein ve zonulin analizi çalışmalarına kadar -80°C’ de saklandı.

2.3. Mikrobiyota Analizi

2.3.1. Gaita Örneklerinden DNA İzolasyonu

Çalışmamızda gaita örneklerinden DNA izolasyonu için Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Zymo Research, USA) kullanıldı ve üretici firma talimatları doğrultusunda DNA izolasyonu gerçekleştirildi. DNA izolasyonu için aşağıda belirtilen protokol aşamaları sırasıyla izlenmiştir.

1. ZR BashingBead™ lizis tüplerine 150 mg gaita örneği eklendi.
2. Her tüpe 750 µl buffer eklendi. Tüpler 1 dakika vortekslenerek örneklerin homojenizasyonu sağlandı.
3. DNA izolasyonunun verimini artırmak için tüpler 90°C’de 10 dakika inkübe edildi.
4. Tüpler, > 10 000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi.
5. 400 µl süpernatant, ayrı bir toplama tüpündeki Zymo-Spin™ III-F filtresine aktarıldı. Tüpler 8 000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi.

6. Toplama tüpündeki filtrata 1200 µl genomik lizis bufferı eklendi ve iyice karıştırıldı.
7. Elde edilen karışımdan 800 µl farklı bir toplama tüpündeki Zymo-Spin™ IICR Column'a aktarıldı ve 10 000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Tüplere 200 µl DNA ön yıkama bufferı eklendi ve 10 000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Tüplere 500 µl DNA yıkama bufferı eklendi ve 10 000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Zymo-Spin™ IICR Column temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 100 µl DNA elüsyon bufferı doğrudan kolon matrisine eklendi. DNA'yı ayırtmak için 10 000 x g'de 30 saniye santrifüj edildi.
11. Temiz bir toplama tüpüne Zymo-Spin™ III-F filtresi yerleştirildi ve 600 µl hazırlama solüsyonu eklendi. 8 000 x g'de 3 dakika santrifüj edildi.
12. Elüsyona tabi tutulan DNA, temiz bir mikrosantrifüj içindeki filtreye aktarıldı ve 16 000 x g'de 3 dakika santrifüj edildi.
13. Elde edilen DNA ekstraktları çalışılan güne kadar -20°C'de saklandı.

2.3.2. 16S Hiperdeğişken Bölgelerin Amplifikasyonu

İzolasyonu yapılan genomik DNA'lardan 2 µl alınarak temiz PCR tüplerine aktarıldı. Son hacim 8 µl olana kadar ddH₂O eklendi. Tüplere 2 µl 16S primer çifti eklendi. Kullanılan primer çifti, 16S rRNA geninin V1-V9 bölgesini kapsayan yaklaşık 1500 bp'lik bir bölgeyi hedeflemektedir ve dizileri Tablo 2.1'de belirtilmiştir. Daha sonra HF515 2x HiFi Taq Master Mix (MobiomX) enziminden her tüpe 10 µl enzim pipetlendi. Tüp içeriği yavaşça karıştırıldı ve kısa spin atılarak tüp çeperlerindeki sıvı altta toplandı. Hazırlanan örnekler Tablo 2.2'de belirtilen şekilde termal döngülere ayarlanmış MyGene™ L Series Peltier Thermal Cycler (LongGene, China) PCR cihazına yüklendi ve 16S ampifikasyonu gerçekleştirildi.

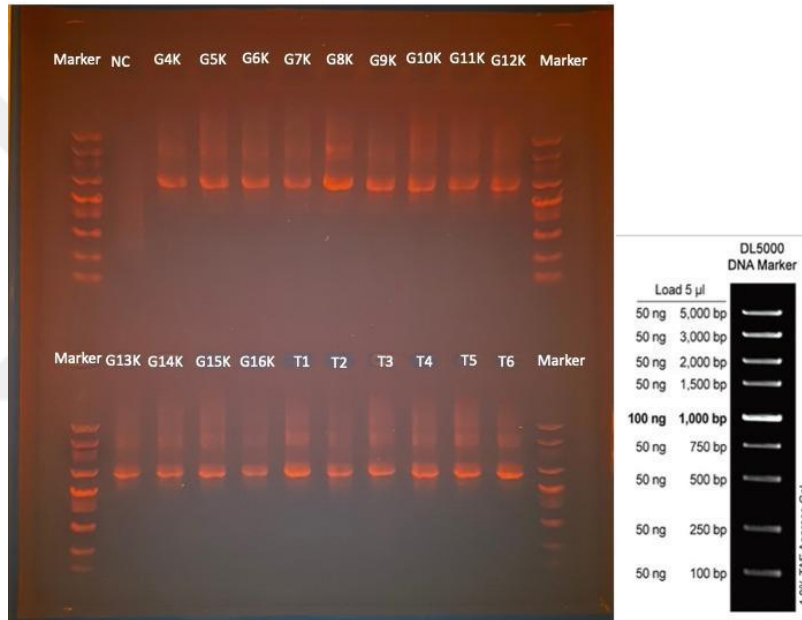
Tablo 2.1. Kullanılan 16S primer dizileri

	Pozisyon	Primer dizisi
16S Forward Primer	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
16S Reverse Primer	1492R	CGGTTACCTTGTACGACTT

Tablo 2.2. Kullanılan termal döngüleyici program

Evre		Sıcaklık	Süre
Ön denaturasyon	1 döngü	94 °C	30 saniye
Denaturasyon	35 döngü	94 °C	20 saniye
Annealing		58 °C	1 dakika
Ekstansiyon		72 °C	1 dakika
Final ekstansiyon	1 döngü	72 °C	10 dakika

PCR ile amplifikasyonu yapılan ürünlerden 3 µl alınarak %1'lik agaroz jelde 100 V'da 30 dakika yürütüldü. 1-1,5 kb aralığında amplicon boyutları teyit edildi. (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Agaroz jelde yürütülen amplicon boyutları

2.3.3. DNA Fragmanlarının Uç Tamiri

Uç tamiri ve DNA onarım adımı için, tüplere 2 µl amplicon ve 9 µl nükleazsız su eklenerek 11 µl son hacim hazırlandı. Ardından reaksiyona; 1 µl seyreltilmiş DNA kontrol örneği, 1,75 µl Ultra II uç-tamir reaksiyon bufferı ve 0,75 µl uç-tamir enzimi eklendi. Örnekler pipet yardımı ile karıştırıldı. 20°C'de 5 dakika ardından 65°C'de 5 dakika inkübe edildi.

2.3.4. Örneklerle Barkod Bağlanması

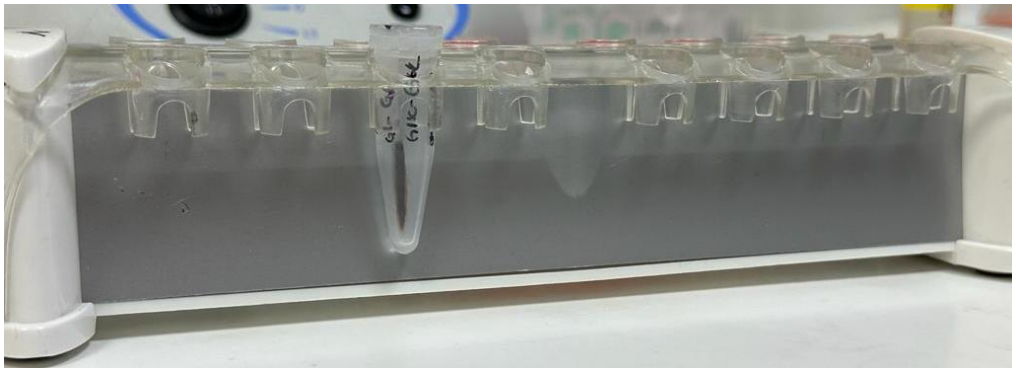
Onarılan DNA'ya barkodların bağlanması için tüplere, 0,75 µl uç tamiri yapılmış DNA örneği, 3 µl nükleazsız su, 1,25 µl native barkod ve 5 µl Blunt/TA ligaz

master mix eklendi. Elde edilen örnekler oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda reaksiyonu durdurmak için 2 µl EDTA eklendi ve barkod bağlanmış olan tüm örnekler tek bir tüpte toplandı.

2.3.5. Ürünlerin Saflaştırılması

Saflaştırma işlemi aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

1. Havuzlanmış örneğe AMPure XP boncukları eklendi. Bir karıştırıcıda 37°C'de 10 dakika inkübe edildi.
2. Hazırlanan örneğin bulunduğu tüp manyetik rafa koyuldu ve örnek berrak ve renksiz olana kadar yaklaşık 5 dakika beklendi. (Şekil 2.2)
3. Tüp manyetik rafın üzerindeyken, pellete dokunmadan süpernatant çekildi ve 700 µl taze hazırlanmış %80'lik etanol eklenerek manyetik boncukların yıkanması sağlandı. Bu işlem tekrar edildi.
4. Manyetik raf üzerinde pellete dokunmadan etanol pipetlenerek atıldı ve pellet 30 saniye kurumaya bırakıldı.
5. Tüp manyetik raftan çıkarıldı ve 35 µl nükleazsız su eklenerek yavaşça karıştırıldı.
6. 37°C'de 10 dakika inkübe edildi ve tüp tekrar manyetik rafın üzerine koyulup örnek berrak ve renksiz olana kadar beklenildi.
7. Pellete dokunmadan alınan 35 µl süpernatant, 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine aktarıldı.



Şekil 2.2. Manyetik rafta saflaştırılan örnek

2.3.6. Adaptör Reaksiyonu Kurma

Saflaştırılan örneğin native adaptöre bağlanması için tüpe; 30 µl havuzlanmış barkodlu örnek, 5 µl native adaptör, 10 µl NEBNext Quick ligasyon reaksiyon bufferı

ve 5 µl T4 DNA ligaz eklendi. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Sonraki aşamalar aşağıdaki adımlara uygun yapıldı.

1. Reaksiyona AMPure XP boncukları eklendi ve bir karıştırıcıda oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
2. Tüp manyetik rafa koyularak örneğin rengi berraklaşana kadar beklendi. Daha sonra pellete dokunmadan süpernatant alındı ve yıkamak için tüpe 125 µl uzun fragman bufferı ve kısa fragman bufferı eklendi.
3. Tüp tekrar manyetik rafa koyuldu ve örneğin rengi berraklaşınca süpernatant kısmı pipetlenerek atıldı. Bu yıkama işlemi tekrarlandı.
4. Tüp manyetik raftan çıkarılarak içine 15 µl elüsyon bufferı eklendi. 37°C'de 10 dakika inkübe edildi ve tüp tekrar manyetik rafa koyularak örneğin rengi berraklaşana kadar beklendi.
5. Pellete dokunmadan DNA kütüphanesini içeren örnekten 15 µl pipetlendi ve temiz 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine aktarıldı.

2.3.7. DNA Miktarının Ölçülmesi

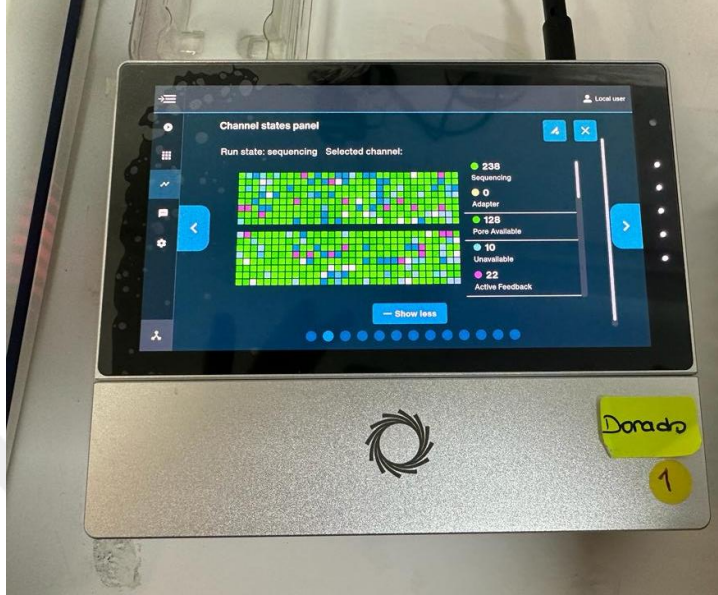
Örneğin içerdiği toplam nükleik asit miktarının ölçümü florometrik yöntem (Qubit 4, ThermoFisher, USA) ile yapıldı. Bir Qubit assay tüpüne, 199 µl Quant-iT buffer ile 1 µl Quant-iT dsDNA HS reagent karıştırıldı. Üzerine ölçüm yapılacak DNA' dan 3 µl eklendi ve 3 saniye vortekslendi. Oda ısısında 2 dakika inkübasyondan sonra Qubit ile ölçümü yapıldı. Örneğin nükleik asit miktarı 470 ng/ml olarak ölçüldü ve çalışmaya dahil edildi.

2.3.8. SpotON Akış Hücrelerini Hazırlama ve Yükleme

Sekanslama işlemi için MinION (Oxford Nanopore, UK) cihazı kullanıldı. (Şekil 2.3) Akış hücre hazırlama karışımı için bir tüpe; 5 µl serum albümini, 30 µl flow cell tether ve 1 170 µl flow cell flush eklenerek karıştırıldı. Cihazın kapağı açıldıktan sonra kapağın altında hava kabarcığı olup olmadığı kontrol edildi. Hava kabarcıkları bir pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Hava kabarcığının girmesi önlenerek 800 µl akış hücre hazırlama karışımı, port aracılığıyla akış hücrelerine yüklendi ve 5 dakika beklendi.

Temiz bir eppendorf tüpüne yüklenecek kütüphane hazırlığı için; 37,5 µl sekans bufferı, 25,5 µl kütüphane solüsyonu ve 12 µl hazırlanan DNA kütüphanesi eklendi. Hava kabarcığının girmesi önlenerek kalan akış hücre hazırlama karışımından

200 µl, port aracılığıyla akış hücreğine yüklendi. Hazırlanan kütüphanenin 75 µl'si, SpotON örnek portu aracılığıyla damla damla akış hücreğine eklendi. Işık kalkanı akış hücreğine yerleştirildi ve cihazın kapağı kapatıldı. Her örnekten minimum 10.000 okuma alınana kadar sekans sürdürüldü.



Şekil 2.3. MinION (Oxford Nanopore,UK) sekans cihazı

Sekanslama için 3. nesil dizileme tekniklerinden olan Oxford Nanopore teknolojisi kullanıldı. Bu teknoloji, DNA'nın nano boyuttaki porlardan geçerken nükleotidlerin oluşturduğu elektrofizyolojik değişiklikleri analiz ederek DNA dizisini ortaya çıkarmaktadır.

2.3.9. Biyoinformatik Analiz

Sekanslama işleminden sonra fast5 formatında elde edilen sonuçlar, Guppy yazılımı (basecalling ve multiplexing) kullanılarak fastq formatına dönüştürüldü. 16S rRNA bölgesi ortalama 1500 bp olduğundan dolayı, 1250-1750 bp uzunluğundaki okumalar Trimmomatic kullanılarak filtrelendi ve geri kalan okumalar analizin dışında tutuldu. Temizlenen okumalar, Python programlama dili kullanılarak özelleştirilmiş bir iş akışıyla analiz edildi. Bu iş akışı ile filtreleme işlemi sırasında her sekans BLAST algoritması ile eşleştirildi. Eşleştirme sonuçlarında %60'tan fazla referansı kapsama ve %80 ikili benzerliğe sahip dizilerin taksonomik verileri alınarak Operasyonel taksonomik birimler (OTU) oluşturuldu. Oluşturulan OTU (.biom) dosyası ile filogenetik analizlerin yapılabilmesi için qiime2 platformunun sağladığı araçlarla birlikte farklı indexler kullanılarak; alfa çeşitlilik analizi, PCA, PCoA, beta çeşitlilik

analizleri, biyobelirteç ve fenotip analizleri yapıldı. Taksonomik sınıflandırmaları düzenlemek ve dinamik krona çizelgeleri hazırlamak için Mothur platformu kullanıldı. Analizlerde yer alan grafik ve tablolar python programlama dilinin kütüphaneleri ile yapılmıştır.

2.4. Lipopolisakkarit Bağlayıcı Protein ve Zonulin Analizi

Lipopolisakkarit bağlayıcı protein ve zonulin serum düzeyleri, sandviç ELISA prensibi ile Elabscience ticari ELISA kitleri kullanılarak üretici firma talimatları doğrultusunda aşağıdaki protokole göre çalışılmıştır.

1. İnsan LBP/zonuline spesifik antikor ile kaplı mikro ELISA platelerindeki ilk iki kuyucuğa 100 µl standart çalışma solüsyonu, üçüncü kuyucuğa 100 µl pozitif kontrol solüsyonu, dördüncü kuyucuğa 100 µl negatif kontrol solüsyonu, diğer kuyucuklara 100 µl serum örneği eklendi ve 37°C'de 90 dakika inkübe edildi.
2. Her kuyucuğa 100 µl biyotinlenmiş tespit antikor solüsyonu eklendi ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Ardından yıkama tamponu ile 3 kere yıkandı.
3. Her kuyucuğa 100 µl Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatı eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Ardından yıkama tamponu ile 5 kere yıkandı.
4. Her kuyucuğa 90 µl substrat reaktifi eklendi ve 37°C'de 15 dakika karanlıkta inkübe edildi.
5. Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi ve enzim-substrat reaksiyonu sonlandırıldı.
6. Her kuyucuğun optik dansite (OD) değeri, 450 nm $\pm$ 2 nm dalga boyuna ayarlanmış Clariostar mikropate okuyucu ile ölçüldü.
7. Konsantrasyonları bilinen standart çalışma solüsyonlarının OD değerleriyle standart eğri elde edildi. Numunelerin OD'si standart eğriyle karşılaştırılarak zonulin/LBP konsantrasyonları hesaplandı.

2.5. Kısa Zincirli Yağ Asidi Analizi

Kısa zincirli yağ asitleri analizi, bir alev iyonizasyon dedektörü ve bir DB-FFAP kolonu ile donatılmış GC-MS/MS (Agilent 8860 serisi, USA) cihazı ile çalışıldı. (Şekil 2.4) GC-MS/MS cihazının çalışma prensibi, analiz edilecek numunenin cihazda buharlaştırılarak elde edilen gaz formunun kromatografi kolonuna enjekte edildiği ve burada moleküllerine ayrılarak kantitatif analizi esasına dayanmaktadır.



Şekil 2.4. GC-MS/MS cihazı

1. 1 gram gaita örneğine 2 ml su eklenerek 10 dk vorteksledi.
2. Karışım, oda sıcaklığında 10 000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
3. Örneğin süpernatant kısmı temiz bir vial tüpüne aktarıldı.
4. Elde edilen süpernatanttan 1 µl alındı ve cihazın septum denilen kısmından bir odacığa enjekte edildi. Örneğin sıcaklığı yaklaşık 25 °C iken enjekte edilen odanın sıcaklığı yaklaşık 250 °C olduğu için örnek bu aşamada hızla buharlaştı.
5. Taşıyıcı gaz olarak kullanılan hidrojenin etkisiyle buharlar kolona doğru sürüklendi. Bu aşamada, kolona gelen numunenin karbon zincir uzunluğuna göre bileşenler kolonda tutulmaktadır.
6. Kolondan sırayla ayrılan yağ asitleri dedektöre geldi ve burada küçük bir pilot alev olduğu için bileşenler yanarak iyonlaştı.
7. Oluşan iyonlar, yağ asidi miktarına göre elektrik sinyali oluşturdu ve oluşan bu sinyal kablolar aracılığı ile bir OpenLAB CDS veri işlemcisine (Agilent Technologies Inc.,Wilmington, USA) gönderildi. Meydana gelen sinyal büyüklüğüne göre oluşan grafikten kromatogram elde edildi.
8. Kromatogramdaki pik alanları ve yağ asitlerinin kolonda tutulma süreleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar ile standart numunelerin sonuçları kıyaslanarak yağ asitlerinin yüzdesi hesaplandı.

2.6. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler R version 4.2.1. programı yardımıyla gerçekleştirildi. Sayısal değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma, kategorik değişkenler ise sıklık (n) ve yüzdelik (%) olarak sunuldu. Kolorektal kanser hastaları ile sağlıklı kontrollerin yaş ortalamaları student's t-testi, cinsiyet dağılımları ise Yates süreklilik düzeltmeli ki-kare dağılımı ile kıyas edildi. Ayrıca, KRK hastaları ile sağlıklı kontrollerin filum, sınıf, aile, cins ve tür düzeyinde taksonların saptanma oranları ve yağ asitleri, zonulin, LBP düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığı ise Mann-Whitney U test ile karşılaştırıldı. Anlam düzeyi %5 alındı.

Etik Kurul Kararı

Çalışmamız Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Yerel Etik Kurulu tarafından 14.02.2023 tarihinde 2023/104 karar sayısı ile onaylanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Demografik Bulgular

Çalışmaya 16 KRK tanıli hasta (8 kadın, 8 erkek) ve 16 sağlıklı kontrol (8 kadın, 8 erkek) dahil edildi. Kolorektal kanser hastalarının yaş ortalaması 60.06 ± 15.67 , kontrol grubunun yaş ortalaması ise 60.75 ± 13.96 olarak saptandı. Çalışma gruplarının cinsiyet ve yaş dağılımları benzerdir (sırasıyla $p > 0.999$, $p = 0.897$). Çalışma gruplarının demografik özellikleri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışma gruplarının demografik özellikleri

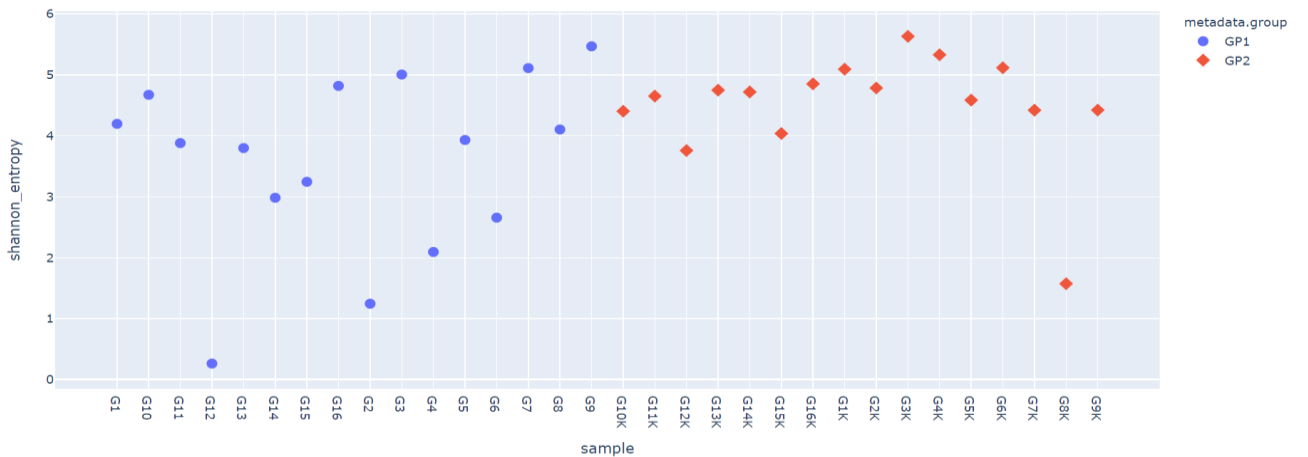
Demografik Özellik	Çalışma Grupları		p değeri
	Kontrol (n=16)	KRK (n=16)	
Yaş	60.06 ± 15.67	60.75 ± 13.96	0.897
Cinsiyet (E/K)	8/8	8/8	>0.999

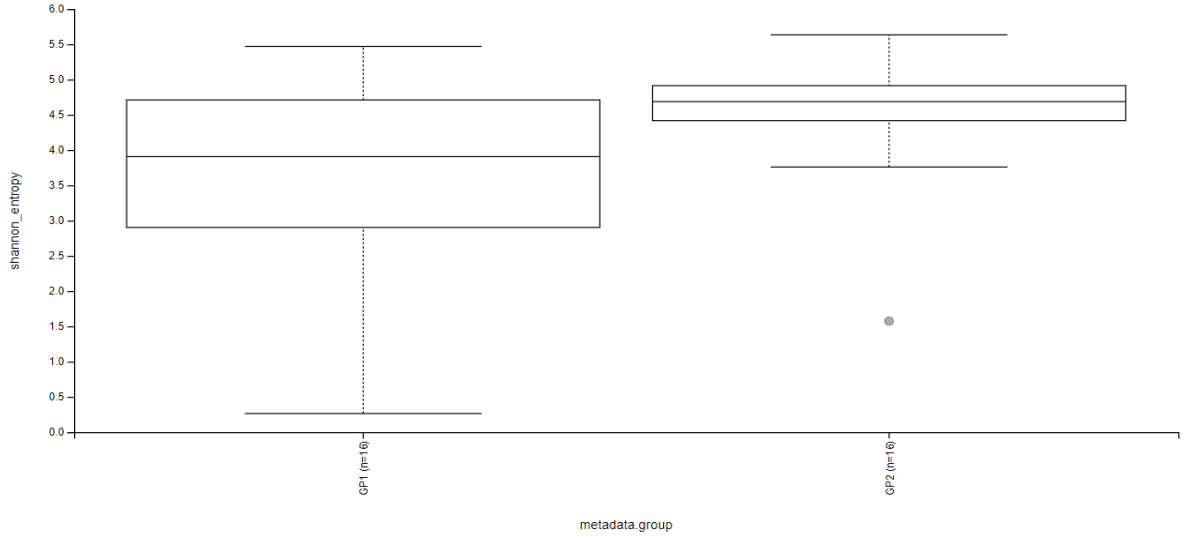
3.2. Bağırsak Mikrobiyota Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

3.2.1. Alfa Çeşitlilik

Alfa çeşitlilik belirli bir örnekte bulunan türlerin çeşitliliğini ifade etmektedir. Çalışmamızda alfa çeşitliliğin hesaplanması için Shannon, Simpson ve Chao-1 indeksleri kullanıldı.

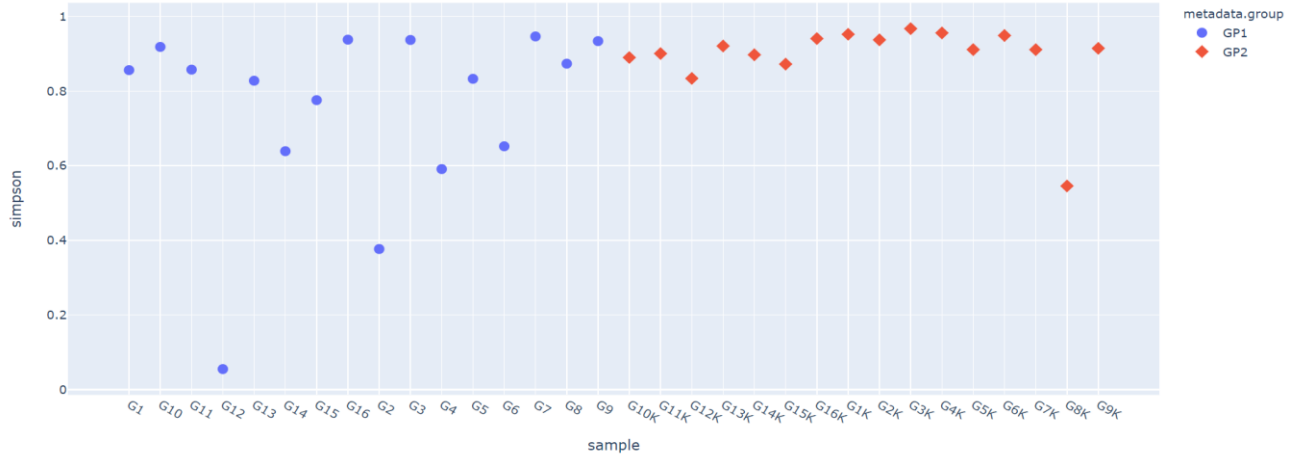
Shannon indeksi, örneğin tür zenginliği ve çeşitliliğini hesaplamak için kullanıldı. Çalışmamızda Shannon indeksine göre, gruplar arasında bağırsak mikrobiyal alfa çeşitliliği açısından anlamlı bir farklılık saptandı ($p = 0.045$). (Şekil 3.1)

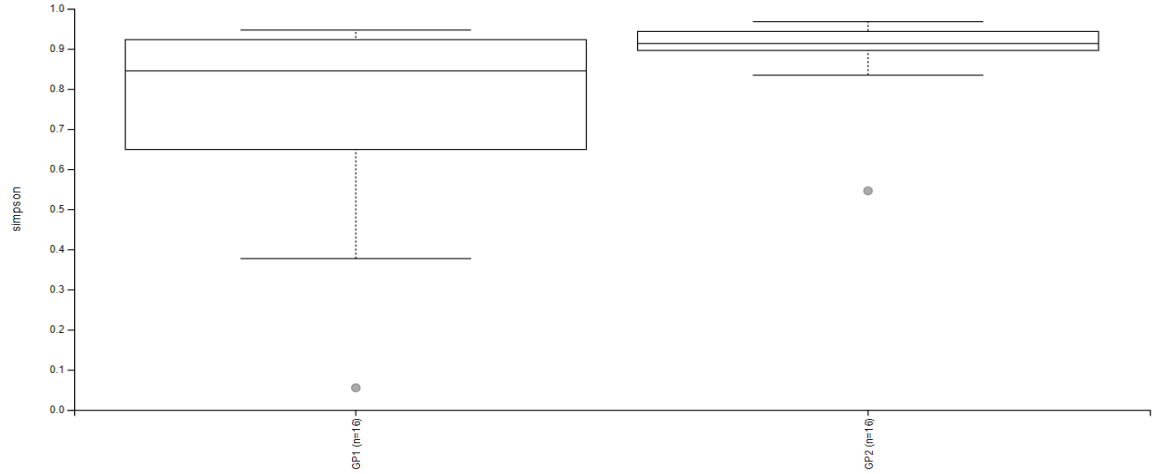




Şekil 3.1. Shannon indeks dağılım ve ortalama grafikleri (GP1: hasta grubu, GP2: kontrol grubu)

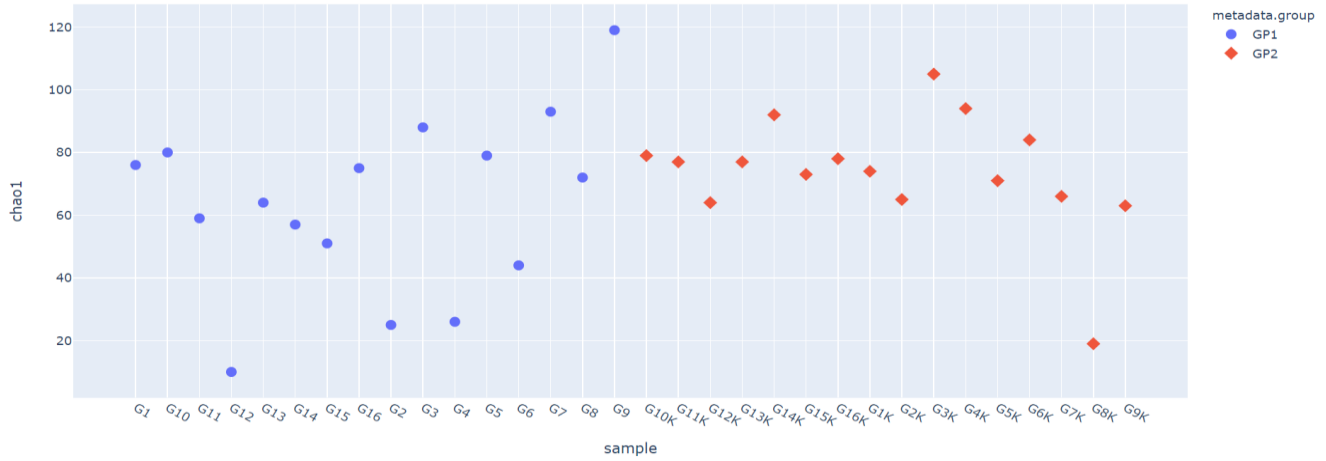
Simpson indeksi, örneği oluşturan farklı türlerin göreceli bolluğu ile örneğin zenginliğini hesaplamaktadır. Çalışmamızda Simpson indeksine göre, gruplar arasında bağırsak mikrobiyal alfa çeşitliliği açısından anlamlı bir farklılık saptandı ($p=0.017$). (Şekil 3.2)

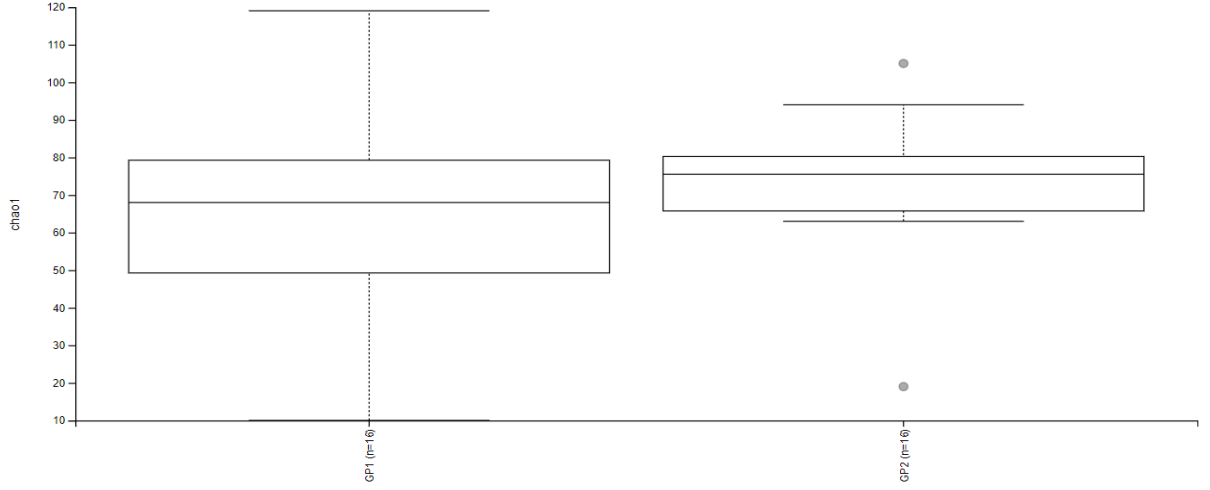




Şekil 3.2. Simpson indeksi dağılım ve ortalama grafikleri (GP1: hasta grubu, GP2: kontrol grubu)

Chao-1 indeksi, bulunan verideki çeşitliliği ve yetersiz veri nedeniyle gözden kaçabilecek türleri tahmin etmektedir. Çalışmamızda Chao-1 indeksine göre, gruplar arasında bağırsak mikrobiyal alfa çeşitliliği açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p = 0,24$). (Şekil 3.3)

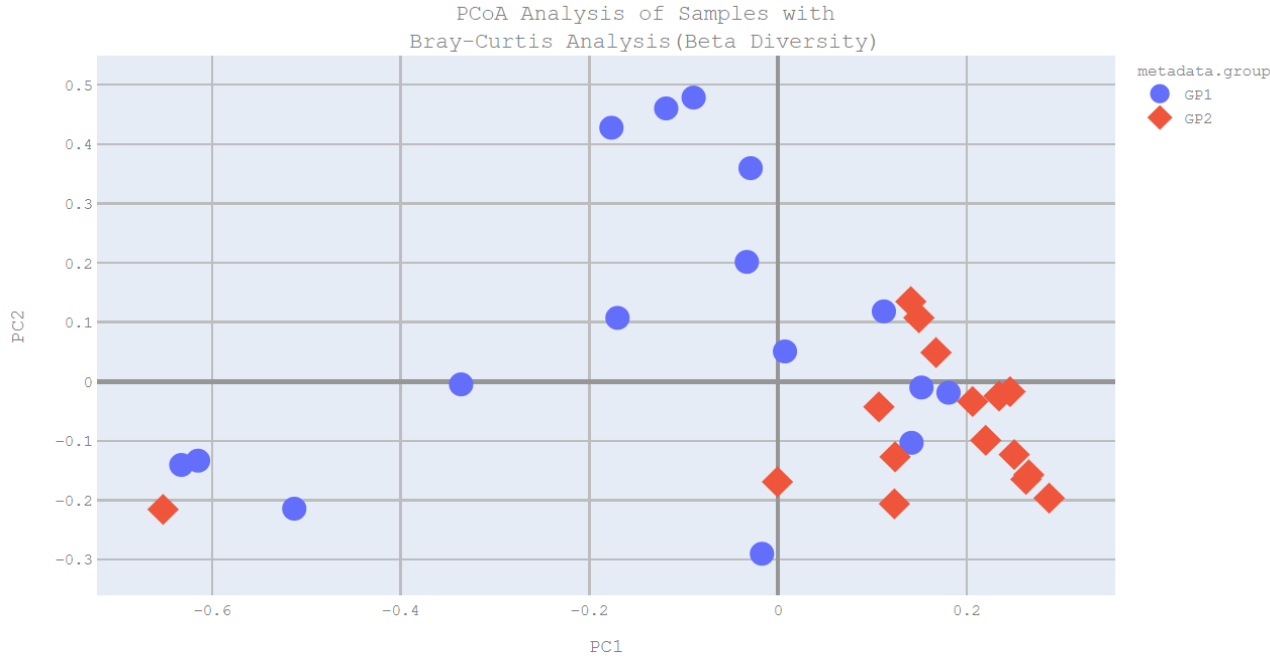




Şekil 3.3. Chao-1 indeks dağılım ve ortalama grafikleri (GP1: hasta grubu, GP2: kontrol grubu)

3.2.2. Beta Çeşitlilik

Beta çeşitlilik analizinin temel amacı, örnekleri kendi içinde ve bulundukları grupları birbiriyle karşılaştırarak, grup veya örnekler arası yapısal durumu gözlemlemektir. Çalışmamızda beta çeşitliliğin hesaplanması için temel koordinat analizlerinden (PCoA) biri olan Bray-Curtis analizi kullanıldı. Bray-Curtis PCoA analizi, örneklerdeki bakterilerin oranlarını dikkate alarak ortak paylaşılan bakterilerin bulunma hesabına dayalı bir istatistik kullanılarak oluşturuldu. Çalışmamızda Bray-Curtis PCoA analizine göre, gruplar arasında bağırsak mikrobiyal beta çeşitliliği açısından anlamlı bir farklılık saptandı ($p=0.004$). (Şekil 3.4)

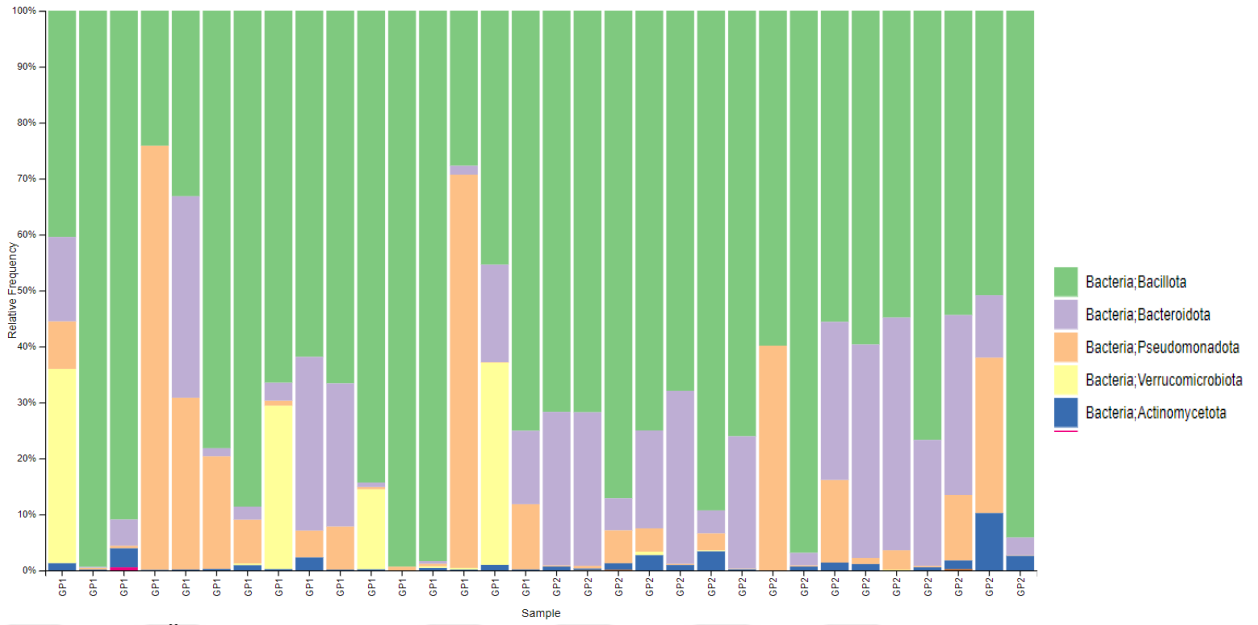


Şekil 3.4. Bray-Curtis PCoA analizi grafiği (GP1: hasta grubu, GP2: kontrol grubu)

3.2.3. Operasyonel Taksonomik Birimlerin Dağılımları

Bağırsak mikrobiyotasına ait örneklerde OTU'ların taksonomik dağılımları filum düzeyinde incelendiğinde her iki grupta da mikrobiyotanın 5 temel filumdan oluştuğu görüldü. Bunlar; *Bacillota* (*Firmicutes*), *Bacteroidota*, *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*), *Verrucomicrobiota* ve *Actinomycetota* filumlarıdır (Şekil 3.4). Gruplar arasında bağırsak mikrobiyota kompozisyonu filum düzeyinde incelendiğinde, KRK hastalarında *Bacteroidota* saptanma oranı sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük bulundu ($9,56 \pm 12,09$ 'a karşı $19,74 \pm 13,65$, $p=0.027$). İstatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşmamış olmasına rağmen *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*) saptanma oranının KRK hastalarında artmış olduğu tespit edildi ($p=0.258$). Fakat KRK hastaları ile sağlıklı kontrollerin *Bacillota* (*Firmicutes*), *Verrucomicrobiota* ve *Actinomycetota* saptanma oranlarının benzer olduğu tespit edildi (sırasıyla $p=0.985$, $p=0.074$, $p=0.067$).

Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun filum düzeyinde değerlendirme verileri Tablo 3.2' de verilmiştir.



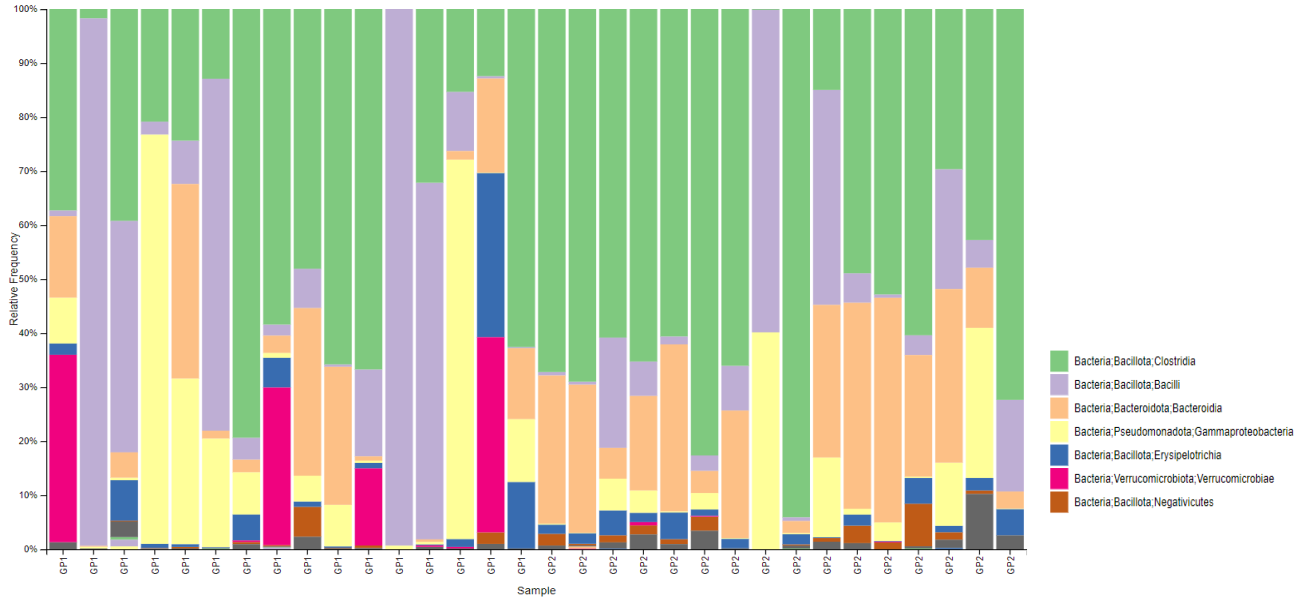
Şekil 3.4. Örneklerin mikrobiyota analizi filum düzeyi grafiği (GP1: hasta grubu, GP2:kontrol grubu)

Tablo 3.2. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun filum düzeyinde incelenmesi

Filum	Çalışma Grupları		p değeri
	Kontrol (n=16)	KRK (n=16)	
<i>Bacillota (Firmicutes)</i>	71,36 ± 14,87	67,49 ± 26,24	0.985
<i>Bacteroidota</i>	19,74 ± 13,65	9,56 ± 12,09	0.027
<i>Pseudomonadota (Proteobacteria)</i>	7,11 ± 11,56	15,05 ± 24,16	0.258
<i>Verrucomicrobiota</i>	0,05 ± 0,15	7,19 ± 13,5	0.074
<i>Actinomycetota</i>	1,72 ± 2,48	0,68 ± 0,95	0.067

Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonu sınıf düzeyinde incelendiğinde her iki grupta da en çok bulunan sınıflar; *Clostridia*, *Bacilli*, *Bacteroidia*, *Gammaproteobacteria*, *Erysipelotrichia*, *Verrucomicrobiae* ve *Negativicutes* sınıflarıdır (Şekil 3.5). Kolorektal kanser hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla *Clostridia* ($36,07 \pm 25,09$ 'a karşı $55,48 \pm 24,08$, $p=0.035$), *Bacteroidia* ($9,55 \pm 12,1$ 'e karşı $19,73 \pm 13,66$, $p=0.027$) ve *Negativicutes* ($0,59 \pm 1,42$ 'ye karşı $1,52 \pm 1,95$, $p=0.016$) saptanma oranları istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük bulundu. Fakat KRK hastaları ile sağlıklı kontrollerde *Bacilli*, *Gammaproteobacteria*, *Erysipelotrichia* ve *Verrucomicrobiae* saptanma oranlarının benzer olduğu tespit edildi (sırasıyla $p=0.616$, $p=0.196$, $p=0.637$, $p=0.074$).

Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun sınıf düzeyinde değerlendirme verileri Tablo 3.3’ de verilmiştir.



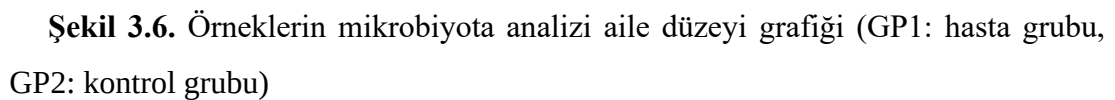
Şekil 3.5. Örneklerin mikrobiyota analizi sınıf düzeyi grafiği (GP1: hasta grubu, GP2: kontrol grubu)

Tablo 3.3. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun sınıf düzeyinde incelenmesi

Sınıf	Çalışma Grupları		p değeri
	Kontrol (n=16)	KRK (n=16)	
<i>Clostridia</i>	55,48 ± 24,08	36,07 ± 25,09	0.035
<i>Bacilli</i>	12,18 ± 16,66	26,51 ± 35,71	0.616
<i>Bacteroidia</i>	19,73 ± 13,66	9,55 ± 12,1	0.027
<i>Gammaproteobacteria</i>	7,09 ± 11,58	15,05 ± 24,16	0.196
<i>Erysipelotrichia</i>	2,18 ± 1,69	4,23 ± 7,77	0.637
<i>Verrucomicrobiae</i>	0,05 ± 0,15	7,19 ± 13,5	0.074
<i>Negativicutes</i>	1,52 ± 1,95	0,59 ± 1,42	0.016

Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyotalarında aile düzeyinde *Peptostreptococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Enterococcaceae* ve *Enterobacteriaceae* taksonları incelendi (Şekil 3.6). Kolorektal kanser hastalarında *Lachnospiraceae* saptanma oranı sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük bulundu ($14,64 \pm 12,58$ 'e karşı $37,16 \pm 20,35$, $p < 0.001$). Kolorektal kanser hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla *Enterococcaceae* saptanma oranı ise

Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun aile düzeyinde değerlendirme verileri Tablo 3.4’ te verilmiştir.



Tablo 3.4. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun aile düzeyinde incelenmesi

Aile	Çalışma Grupları		p değeri
	Kontrol (n=16)	KRK (n=16)	
<i>Peptostreptococcaceae</i>	3,52 ± 5,87	5,46 ± 11,34	0.835
<i>Lachnospiraceae</i>	37,16 ± 20,35	14,64 ± 12,58	< .001
<i>Enterococcaceae</i>	4,11 ± 14,77	17,89 ± 34,31	0.043
<i>Enterobacteriaceae</i>	7,06 ± 11,57	15,02 ± 24,17	0.196

Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyotalarında cins düzeyinde *Enterococcus*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Roseburia*, *Prevotella*, *Escherichia*, *Segatella*, *Ruminococcus*, *Lachnoclostridium*, *Alistipes*, *Akkermansia*, *Faecalibacterium* ve *Blautia* taksonları incelendi (Şekil 3.7). Kolorektal kanser hastalarında *Enterococcus* saptanma oranı sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulundu (17,86 ± 34,23'e karşı 4,11 ± 14,77, $p=0.043$). Kolorektal kanser hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla *Roseburia* (0,64 ± 1,22'ye karşı 1,88 ± 1,27, $p=0.002$), *Lachnoclostridium* (0,16 ± 0,2'ye karşı 0,34 ± 0,19, $p=0.025$) ve *Blautia* (4,78 ± 5,46'ya karşı 15,84 ± 9,88, $p<0.001$) saptanma oranları ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük bulundu. Fakat cins düzeyinde *Salmonella*, *Clostridium*, *Prevotella*, *Escherichia*, *Segatella*, *Ruminococcus*, *Alistipes*, *Akkermansia* ve *Faecalibacterium* saptanma oranları benzer bulundu (sırasıyla $p=0.280$, $p=0.571$, $p=0.911$, $p=0.138$, $p=0.131$, $p=0.061$, $p=0.619$, $p=0.074$, $p=0.105$).

Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun cins düzeyinde değerlendirme verileri Tablo 3.5' te verilmiştir.



Şekil 3.7. Örneklerin mikrobiyota analizi cins düzeyi grafiği (GP1: hasta grubu, GP2: kontrol grubu)

Tablo 3.5. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun cins düzeyinde incelenmesi

Cins	Çalışma Grupları		p değeri
	Kontrol (n=16)	KRK (n=16)	
<i>Enterococcus</i>	4,11 ± 14,77	17,86 ± 34,23	0.043
<i>Salmonella</i>	0,09 ± 0,16	0,17 ± 0,25	0.280
<i>Clostridium</i>	2,52 ± 4,40	2,09 ± 3,56	0.571
<i>Roseburia</i>	1,88 ± 1,27	0,64 ± 1,22	0.002
<i>Prevotella</i>	0,12 ± 0,19	0,86 ± 2,20	0.911
<i>Escherichia</i>	5,21 ± 9,75	13,03 ± 21,18	0.138
<i>Segatella</i>	11,99 ± 12,22	4,08 ± 9,43	0.131
<i>Ruminococcus</i>	1,52 ± 1,14	1,33 ± 2,75	0.061
<i>Lachnoclostridium</i>	0,34 ± 0,19	0,16 ± 0,20	0.025
<i>Alistipes</i>	0,25 ± 0,30	0,44 ± 0,93	0.619
<i>Akkermansia</i>	0,05 ± 0,15	7,19 ± 13,50	0.074
<i>Faecalibacterium</i>	6,88 ± 8,32	2,94 ± 3,42	0.105
<i>Blautia</i>	15,84 ± 9,88	4,78 ± 5,46	< .001

Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyotalarında tür düzeyinde *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Ruminococcus bicirculans* (ex Wegman et al. 2014), *Segatella oris*, *Alistipes senegalensis*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Faecalibacterium prausnitzii* ve *Akkermansia muciniphila* türleri incelendi (Şekil 3.8). Kolorektal kanser hastalarında *Enterococcus faecium* ($15,40 \pm 31,48$ 'e karşı $3,95 \pm 14,63$, $p=0.04$) ve *Ruminococcus bicirculans* (ex Wegman et al. 2014) ($0,35 \pm 0,91$ 'e karşı $0,32 \pm 0,37$, $p=0.027$) saptanma oranları sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulundu. Kolorektal kanser hastalarında *Enterococcus gilvus* ($0,01 \pm 0,26$ 'ya karşı $0,00 \pm 0,00$, $p=0.039$), *Enterococcus casseliflavus* ($0,06 \pm 0,11$ 'e karşı $0,00 \pm 0,00$, $p=0.019$), *Segatella oris* ($0,11 \pm 0,2$ 'ye karşı $0,00 \pm 0,00$, $p=0.019$), ve *Alistipes senegalensis* ($0,03 \pm 0,05$ 'e karşı $0,00 \pm 0,00$, $p=0.039$) türleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek saptanırken sağlıklı konrollerde bu türler hiç tespit edilemedi.

Fakat KRK hastaları ile sağlıklı konrollerde *Bacteroides fragilis* ve *Faecalibacterium prausnitzii* saptanma oranları benzer bulundu (sırasıyla $p=0.20$, $p=0.113$). İstatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşmamış olsa da *Escherichia coli* ($12,28 \pm 19,79$ 'a karşı $5,08 \pm 9,46$, $p=0.138$) ve *Akkermansia muciniphila* ($7,19 \pm 13,50$ 'ye karşı $0,05 \pm 0,15$, $p=0.074$), türlerinin saptanma oranlarının KRK hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla artmış olduğu tespit edildi.

Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun cins düzeyinde değerlendirme verileri Tablo 3.6' da verilmiştir.



Şekil 3.8. Örneklerin mikrobiyota analizi tür düzeyi grafiği (GP1: hasta grubu, GP2: kontrol grubu)

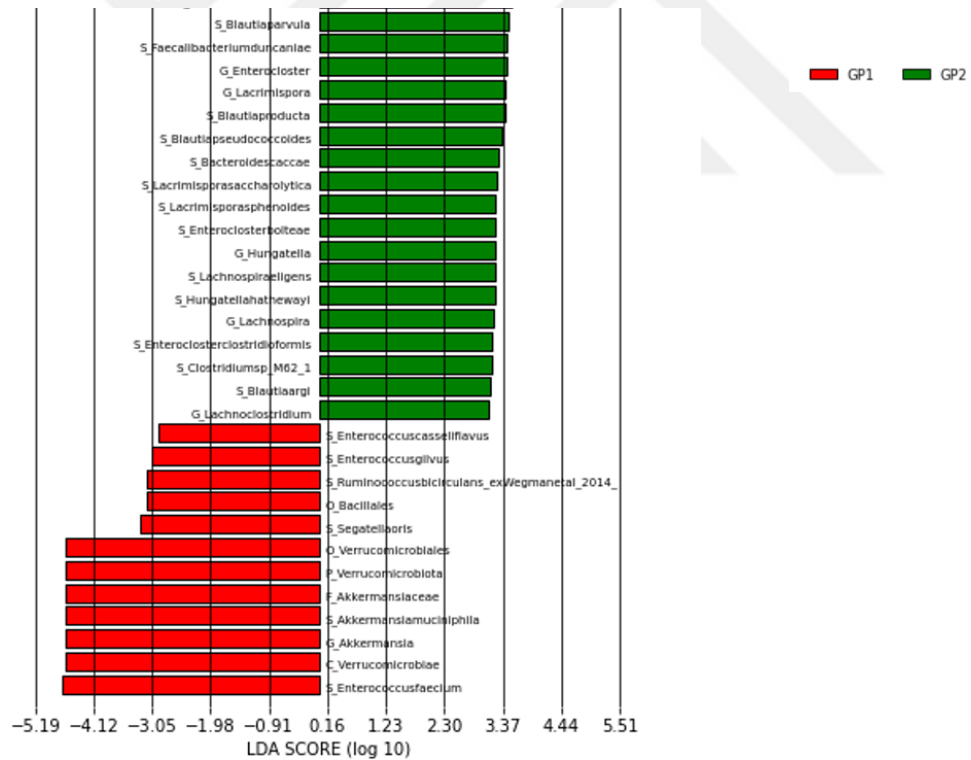
Tablo 3.6. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun tür düzeyinde incelenmesi

Tür	Çalışma Grupları		<i>p</i> değeri
	Kontrol (<i>n</i> =16)	KRK (<i>n</i> =16)	
<i>Enterococcus faecium</i>	3,95 ± 14,63	15,40 ± 31,48	0.040
<i>Enterococcus gilvus</i>	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,26	0.039
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,11	0.019
<i>Ruminococcus bicirculans</i> (ex Wegman et al. 2014)	0,32 ± 0,37	0,35 ± 0,91	0.027
<i>Segatella oris</i>	0,00 ± 0,00	0,11 ± 0,20	0.019
<i>Alistipes senegalensis</i>	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,05	0.039
<i>Bacteroides fragilis</i>	0,21 ± 0,51	0,29 ± 1,14	0.200
<i>Escherichia coli</i>	5,08 ± 9,46	12,28 ± 19,79	0.138
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	6,12 ± 7,92	2,66 ± 3,19	0.113
<i>Akkermansia muciniphila</i>	0,05 ± 0,15	7,19 ± 13,50	0.074

3.2.4. LEFse Analizi

LEFse, gruplar arasındaki farklılıkları karakterize eden genomik özellikleri tanımlayan, biyomarker keşfi için kullanılan bir algoritmadır. LEFse, önce gruplar arasında istatistiksel olarak farklı olan özellikleri sağlam bir şekilde tanımlar ve ardından, bu farklılıkların beklenen biyolojik davranışa göre tutarlı olup olmadığını değerlendirmek için ek testler gerçekleştirir. LEFse analizinde, diferansiyel olarak bol olan her özelliğin etki büyüklüğünü tahmin etmek için LDA (lineer diskriminant analiz) skoru kullanılmaktadır. Analiz sonucunda LDA skoru >2 olan taksonların potansiyel biyomarker olabileceği kabul edilmektedir.

Çalışmamızda yapılan LEFse analizi sonucunda LDA skoru >2 olan 6 farklı tür saptandı: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Ruminococcus bicirculans* (ex Wegman et al. 2014), *Segatella oris* ve *Akkermansia muciniphila* (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Taksonların cins ve tür düzeyinde LEFse grafiği (GP1: hasta grubu, GP2: kontrol grubu)

3.2.5. Biyokimyasal Bulgular

Çalışma gruplarının serum zonulin ve LBP düzeyleri incelendi. Kolorektal kanser hastalarında zonulin düzeyi sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulundu ($70,10 \pm 26,14$ 'e karşı $53,93 \pm 17,33$, $p=0.048$). Fakat KRK hastaları ile sağlıklı kontrollerin LBP düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0.171$).

Çalışma gruplarının serum zonulin ve LBP düzeylerinin inceleme verileri Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.7. Çalışma gruplarının serum zonulin ve LBP düzeylerinin incelenmesi

Marker	Çalışma Grupları		p değeri
	Kontrol (n=16)	KRK (n=16)	
Zonulin (ng/ml)	$53,93 \pm 17,33$	$70,10 \pm 26,14$	0.048
LBP (ng/ml)	$78,35 \pm 33,11$	$94,89 \pm 33,54$	0.171

Çalışma gruplarında gaita kısa zincirli yağ asitleri; asetat, propiyonat, isobütirik asit, bütirat, isovalerik asit, valerik asit, isokaproik asit, hekzanoik asit ve n-heptanoik asit olarak 9 yağ asidi düzeyi incelendi. Kolorektal kanser hastaları ile sağlıklı kontrollerin yağ asit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (sırayla $p= 0.128$, $p=0.086$, $p=0.509$, $p=0.423$, $p=0.250$, $p=0.610$, $p=0.072$, $p=0.436$, $p=0.576$).

Çalışma gruplarının gaita kısa zincirli yağ asidi düzeyi inceleme verileri Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8. Çalışma gruplarının gaita yağ asidi düzeylerinin incelenmesi

Yağ Asidi ml/mol	Çalışma Grupları		p değeri
	Kontrol (n=16)	KRK (n=16)	
Asetat	8,66 (7,14 – 13,77)	7,30 (5,28 – 8,72)	0.128
Propiyonat	2,22 (1,46 – 4,03)	1,26 (0,89 – 2,50)	0.086
Bütirat	1,01 (0,67- 2,27)	0,99 (0,50-1,85)	0.423
İsobütirik asit	0,30 (0,30- 0,40)	0,23 (0,17- 0,38)	0.509
İsovalerik asit	0,36 (0,26- 0,51)	0,25 (0,18- 0,47)	0.250
Valerik asit	0,14 (0,10-0,62)	0,12 (0,10- 0,38)	0.610
İsokaproik asit	0,10 (0,10- 0,10)	0,10 (0,10- 0,10)	0.072
Hekzanoik asit	0,10 (0,10- 0,18)	0,10 (0,10- 0,10)	0.436
n-heptanoik asit	0,10 (0,10- 0,10)	0,10 (0,10- 0,10)	0.576

4. TARTIŞMA

Kolorektal kanser, tüm dünyada en sık görülen kanserlerden biridir ve önemli bir küresel sağlık sorunudur (99). WHO 2020 verilerine göre yeni vaka sayısı 1,9 milyon olup 2040 yılında yeni vaka sayısının 3,2 milyona yükseleceği tahmin edilmektedir. Gaitada gizli kan testi ve kolonoskopi gibi tarama programlarının yaygınlaşmasıyla yaşlı insanlar arasında mortalite her yıl azalsa da, özellikle gelişmekte olan ülkelerde genç nüfusta (<50 yaş) KRK insidans ve mortalitesi artmaktadır (100). Dünyada genç nüfusun artış hızı nedeniyle bu eğilim oldukça endişe vericidir ve KRK'nın erken tespiti ve önlenmesi için yeni stratejilere acilen ihtiyaç vardır (99). KRK metastazları ölümün ana nedenidir ve en sık metastaz olan organ karaciğerdir. Primer tümör teşhis edildiğinde %14-18 hastada karaciğer metastazı zaten mevcuttur, KRK rezeksiyonu sırasında ise %10-25 hastada karaciğer metastazı tanımlanmaktadır. Uzak metastaz varlığında 5 yıllık sağkalım oranı %14'e düşmektedir (100).

Kolorektal kanser etyolojisinde birçok genetik ve çevresel faktörler yer almaktadır. Ailesel Adenamatöz Polipozis, Lynch sendromu ve Peutz-Jeghers sendromu hastaları KRK gelişimine genetik olarak yatkındır. Fakat çoğu KRK vakası sporodiktir, kalıtsal değildir. Beslenme alışkanlıkları, obezite, diyabet, aşırı alkol tüketimi gibi çevresel faktörler sporadik KRK gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Çevresel risk faktörleri arasında bağırsak mikrobiyotası da önemli bir role sahiptir. Artan kanıtlar bağırsak mikrobiyotasının, KRK'nın başlaması, ilerlemesi ve metastazında rol oynadığını göstermektedir (99).

İnsan bağırsak mikrobiyotası, bakteri, virüs, mantar ve protozoalar gibi çok sayıda mikroorganizmayı barındıran karmaşık bir ekosistemdir. Bağırsak mikrobiyotasının bileşimi embriyonik hayatımızdan itibaren şekillenmeye başlar ve çevresel faktörler ile yapısı giderek değişir (101). Bağırsak mikrobiyotası, insan hücrelerinden 10 kat fazla bakteri ve insan genomundan 100 kat fazla genom içermektedir. Sağlıklı bir insan bağırsak mikrobiyotası, patojenlere karşı koruma, bağırsak epitelinin şekillendirilmesi, enerji toplanması ve bağışıklığın sürdürülmesinde çok önemli rol oynamaktadır. Bağırsak mikrobiyotasındaki disbiyoz ise konakçının fizyolojik koşullarını değiştirerek çeşitli hastalıklara yol açmaktadır

(99). Özellikle tümör oluşumunda bağırsak mikrobiyotasının rolü araştırılmış ve 2019 yılında 'Uluslararası Kanseri Mikrobiyomu Konsorsiyumu' tarafından mikrobiyotanın insan karsinogenezi üzerindeki etkisine odaklanan bir belge yayınlanmıştır. Bu belgede yazarlar, disbiyozu kansere neden olan bir durum olarak tanımlamıştır. Onkolojik hastalarda bulunan, sağlıklı bireylerden farklı olan ve erken tanı için non-invaziv bir araç haline gelebilecek karakteristik mikrobiyota profilini tanımlamak için "onkomikrobiyom" terimi ortaya atılmıştır (100).

Bu çalışmada, KKK hastaları ile sağlıklı kontrol grubunun bağırsak mikrobiyota profilleri, gaita SCFA düzeyleri ile serum zonulin ve LBP düzeyleri incelenerek, KKK hastalarında meydana gelen bağırsak disbiyozu ve buna bağlı oluşan metabolit değişiklikler multifaktöriyel olarak değerlendirmiştir. Elde edilen veriler ile KKK tanısında kullanılabilecek olası biyobelirteç ve tedavide kullanılabilecek olası pro/prebiyotik adayları tanımlanarak sağlıkta maliyet-etkin bir oynayabileceği öngörülmektedir.

Sağlıklı koşullar altında bağırsak mikrobiyotası nispeten stabil kalmaktadır. Ancak yaşlanma süreci, mikrobiyota bileşimini etkilemekte ve mikrobiyal çeşitliliğin azalmasına neden olmaktadır (102). Çalışmamızda iki grubun da yaş ortalamaları ve cinsiyet dağılımları benzer seçildi (KKK: 60,75; 8K/8E, sağlıklı kontrol: 60,06; 8K/8E). Grupların yaş ve cinsiyet dağılımları benzer olması nedeniyle mikrobiyal analizimiz bu parametrelerden etkilenmemiştir.

Gao ve ark.'nın 31 KKK hastası ve 20 sağlıklı gönüllüde yaptığı bir çalışmada, çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota alfa çeşitliliği kıyaslanmıştır. Shannon ve Simpson indekslerine göre KKK hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla alfa çeşitliliğin anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir. Fakat Chao-1 indeksine göre iki grup arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (103). Tengfei ve ark.'nın yaptığı KKK ile bağırsak mikrobiyotasını araştıran farklı bir çalışmada, 61 KKK hastası ve 72 sağlıklı kontrollerin bağırsak mikrobiyotası araştırılmıştır. Gruplar arasındaki alfa çeşitliliğin hesaplanması için Shannon ve Chao-1 indeksleri kullanılmış ve bu iki indekste de KKK hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla alfa çeşitliliğin anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir (104). Bizim çalışmamızda alfa çeşitliliğin hesaplanması için Shannon, Simpson ve Chao-1 indeksleri kullanıldı. Literatüre benzer şekilde Shannon ve Simpson indekslerine göre KKK hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla alfa çeşitliliğin anlamlı derecede azaldığı tespit edildi. Fakat Chao-

1 indeksine göre, KRK hastalarında sağlıklı kontrollere göre alfa çeşitliliğin azaldığı saptanmış olsa da bu farkın istatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşmadığı tespit edildi. Bu sonuçlar, beklenildiği gibi kanserde bağırsak disbiyozu kaynaklı mikrobiyal çeşitliliğin azaldığını doğrulamaktadır.

ABD’de yapılan 14 çalışmayı kapsayan genişletilmiş bir metaanaliz çalışmasında KRK hastaları ile sağlıklı kontrollerin bağırsak mikrobiyotasında gruplar arasında beta çeşitlilik açısından anlamlı olarak farklılık saptanmıştır (105). Bizim çalışmamızda beta çeşitliliğin hesaplanması için Bray-Curtis analizi kullanıldı. Gruplar arasında bağırsak mikrobiyal beta çeşitliliğinin anlamlı ölçüde farklı olduğu tespit edildi.

İnsan bağırsak mikrobiyotasında 4 ana filum baskındır: *Bacillota* (*Firmicutes*), *Bacteroidota*, *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*) ve *Actinobacteria*. *Bacillota* (*Firmicutes*), ağırlıklı olarak *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* ve *Ruminococcus* cinslerini içeren gram pozitif bakteri grubudur ve SCFA sentezi ile konağın beslenmesi ve metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. *Bacteroidota* ise *Bacteroides*, *Alistipes*, *Parabacteroides* ve *Prevotella* cinslerini içeren gram negatif bakteri grubudur ve immünomodülasyonla ilişkilidir. Bileşenleri olan lipopolisakkaritler ve flagellin, hücre reseptörleri ile etkileşime girerek sitokin sentezi ile bağışıklık reaksiyonlarını arttırmaktadır (106). *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*), *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *V. cholerae* ve *H. pylori* gibi bilinen birçok patojeni içeren en büyük bakteri grubudur (104).

Bamola ve ark. tarafından KRK ve bağırsak mikrobiyota ilişkisini araştıran bir çalışmada (KRK *n*:12, sağlıklı kontrol *n*:12), her iki grupta da en bol bulunan filum *Bacillota* (*Firmicutes*) olmasına rağmen KRK hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı şekilde daha düşük bulunmuştur. KRK hastalarında *Bacteroidota* filumu sağlıklı kontrollere göre anlamlı şekilde daha yüksek saptanmıştır. Ayrıca istatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşmamış olsa da KRK hastalarında *Actinobacteria*’nın azaldığı, *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*)’nın arttığı tespit edilmiştir (107). Çin’de yapılan metagenomik bir çalışmada sağlıklı kontrollere kıyasla KRK hastalarında *Bacillota* (*Firmicutes*)’nın azaldığı tespit edilmiştir (108). Wang ve ark.’nın yaptığı farklı bir çalışmada (KRK *n*:46, sağlıklı kontrol *n*:56) KRK hastalarında en bol bulunan filumun *Bacillota* (*Firmicutes*) olduğu, bunu *Bacteroidota* ve *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*)’nın izlediği saptanmıştır. Ayrıca KRK hastalarında

sağlıklı kontrollere göre *Pseudomonadota (Proteobacteria)*'nın anlamlı şekilde arttığı, *Bacteroidota*'nın ise azaldığı tespit edilmiş fakat gruplar arasında *Bacillota (Firmicutes)* saptanma oranları benzer bulunmuştur (109). Bizim çalışmamızda benzer şekilde her iki grupta da en fazla saptanan filum *Bacillota (Firmicutes)* olurken bunu KRK hastalarında sırasıyla *Pseudomonadota (Proteobacteria)* ve *Bacteroidota*, sağlıklı kontrollerde ise sırasıyla *Bacteroidota* ve *Pseudomonadota (Proteobacteria)* izledi. Sağlıklı kontrollere kıyasla KRK hastalarında *Bacteroidota*'nın anlamlı şekilde daha düşük olduğu tespit edildi. Ayrıca KRK hastalarında sağlıklı kontrollere göre *Pseudomonadota (Proteobacteria)* daha fazla tespit edildi fakat bunun anlamlı seviyeye ulaşamadığı saptandı. Her iki grupta da *Bacillota (Firmicutes)* saptanma oranları benzer bulundu. Kolorektal kanserde bağırsak disbiyozu kaynaklı yararlı ve zararlı diye tanımlanan bakterilerin dengesi bozulmaktadır. Bozulan bu denge, fırsatçı patojenlerin çoğalması için bir zemin oluşturmakta ve sonucunda meydana gelen bir dizi immünolojik ve genetik olaylar neticesinde tümör oluşumu gözlenmektedir.

Sınıf düzeyinde değerlendirme yapıldığında, Hindistan'da Bamola ve ark.'nın yaptığı çalışmada, KRK hastalarının bağırsak mikrobiyotasında *Bacilli* ve *Actinobacteria* sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı şekilde düşük, *Bacteroidia* ve *Gammaproteobacteria* ise yüksek saptanmıştır. Aynı çalışmada gruplardaki *Clostridia* düzeyleri benzer bulunmuştur (107). Yapılan farklı bir çalışmada, (KRK *n*:61, sağlıklı kontrol *n*:72) KRK hastalarında sağlıklı kontrollere göre *Clostridia* seviyesinin daha düşük ancak *Gammaproteobacteria* ve *Negativicutes* seviyelerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (104). Bizim çalışmamızda ise sınıf düzeyinde, KRK hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla *Clostridia*, *Bacteroidia* ve *Negativicutes* anlamlı seviyede daha düşük saptandı. Fakat gruplardaki *Bacilli* ve *Gammaproteobacteria* düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı. *Clostridia*, bütirat üretim kapasiteleri ile bilinen tipik anaerob bakteri grubudur. Bütirat, çeşitli metabolik ve bağışıklık fonksiyonlarında yer alıp bağırsak homeostazisinin korunmasında aracı olarak görev yapmaktadır. Kolonositler için enerji kaynağı olmakla beraber antiinflamatuvar özelliklere de sahiptir. *Clostridia* ve *Negativicutes* gibi sağlıklı bağırsak mikrobiyal elemanlarının azalması ile denge patojen mikroorganizmalar lehine kaymakta, bu da disbiyozis ve tümör oluşumuna neden olabilmektedir (110).

Aile düzeyinde değerlendirme yapıldığında, Tengfei ve ark.'nın yaptığı çalışmada KRK hastalarının bağırsak mikrobiyotasında sağlıklı kontrollere kıyasla

anlamli düzeyde *Lachnospiraceae*'nin azaldığı, *Enterobacteriaceae*'nin ise arttığı saptanmıştır (104). Chen ve ark.'nin Çin'de yaptığı bir çalışmada (KRK *n*:46, sağlıklı kontrol *n*: 56), KRK hastalarının bağırsak mikrobiyotasında anlamli derecede *Peptostreptococcaceae* ve *Prevotellaceae*'nin zenginleştiği tespit edilmiştir (111). Çin'de yapılan farklı bir çalışmada KRK hastalarının bağırsaklarında *Bacillota* (*Firmicutes*) filumuna ait olan *Enterococcaceae* ile *Peptostreptococcaceae*'nin ve *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*) filumuna ait olan *Enterobacteriaceae*'nin arttığı tespit edilmiştir (109). Yapılan farklı çalışmalarda, KRK hastalarının bağırsak mukozasında bütirat üreten yararlı bakteriler olan *Bifidobacterium* ve *Faecalibacterium*'un azaldığı, buna karşılık fırsatçı patojenler olan *Peptostreptococcaceae* ve *Enterococcaceae*'nin ise arttığı saptanmıştır. Bu bulgular, KRK oluşmunun, bir proinflatuar süreçten ve konakçı ile mikrobiyota arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Tümör bölgesinin mikrobiyotası ile komşu tümörsüz mukozanın mikrobiyotası büyük ölçüde benzer bulunduğu için, disbiyozisin lokal etkiden ziyade sistemik bir değişiklik ile KRK oluşturduğuna dair hipotezler mevcuttur (101). Bizim çalışmamızda da literatüre benzer şekilde KRK hastalarının bağırsak mikrobiyotasında *Enterococcaceae*'nin arttığı, *Lachnospiraceae*'nin azaldığı tespit edildi. Bu bulgular tür düzeyindeki bulgularımızı desteklemektedir. Kolorektal kanser hastalarında *Peptostreptococcaceae* ve *Enterobacteriaceae* saptanma oranları da sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek tespit edildi fakat bunun anlamli seviyeye ulaşamadığı saptandı. *Peptostreptococcaceae*, bağırsak ve oral mikrobiyotada yaygın olarak bulunan gram pozitif anaerobik koklardır. Oral fırsatçı patojenler, kolon mukozasına invaze olarak buradaki nötr ortamı bozmaktadır. Kolondaki değişen mukozal ortam nedeniyle *Peptostreptococcaceae* gibi bazı ananerobların çoğalması artmaktadır. Fırsatçı oral patojenler, sağlıklı kolon metabolizmasını bozan, tümör hücrelerinin çoğalmasını sağlayan ve biyofilmler oluşturan metabolitler üretmektedir (112). Yapılan bir çalışmada KRK hastalarının bağırsaklarında anlamli derecede artışı saptandığı için *Peptostreptococcaceae*'nin bir biyobelirteç olabileceği üzerinde durulmuştur (113). *Clostridiales* takımının bir ailesi olan *Lachnospiraceae*, karmaşık polisakkaritleri SCFA'lara parçalayan, insan bağırsak mikrobiyotasının ana taksonomik gruplarından biridir. *Lachnospiraceae*, özellikle bütiratın ana üreticilerinden biri kabul edilir. Bütirat ise antiinflatuar etkiye neden olmakla beraber kanserli kolon hücrelerinin çoğalmasını engellemektedir (114, 115).

Enterococcaceae ailesi, bağırsaktaki en yaygın gram pozitif koklardan biridir. Bu aileye ait bazı türlerin, memeli hücrelerinde DNA hasarına ve KRK'ya yol açan süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri ürettiği bilinmektedir (116).

Cins düzeyinde değerlendirme yapıldığında, Wang ve ark.'nın KRK hastalarının bağırsak mikrobiyotasını araştırdığı çalışmada, KRK hastalarında *Enterococcus*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas* ve *Escherichia/Shigella* cinslerinin artışı oldukça dikkat çekmiştir. Aynı çalışmada bağırsak metabolizması için faydalı olan *Roseburia* ve *Alistipes* cinsleri KRK hastalarında daha düşük saptanırken, *Faecalibacterium* oranları arasında bir fark tespit edilmemiştir (109). Chen ve ark.'nın yaptığı KRK hastalarının bağırsak mukoza mikrobiyotasını araştırdığı bir çalışmada, tümör dokusunda sağlıklı kontrollere kıyasla *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas* ve *Fusobacterium* zenginleşirken, *Blautia* ve *Faecalibacterium*'un önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır (111). Zhao ve ark.'nın çeşitli çalışmaların verilerini toplayarak 353 hasta ile yaptığı geniş çaplı bir çalışmada, KRK hastalarında özellikle *Faecalibacterium*, *Alistipes* ve *Blautia* cinslerinin sağlıklı kontrollere kıyasla önemli ölçüde azaldığı, *Fusobacterium* ve *Campylobacter*'in ise arttığı tespit edilmiştir (110). Bizim çalışmamızda da literatürü destekleyen şekilde, KRK hastalarında sağlıklı kontrollere göre *Enterococcus*'un artışı dikkat çekmiştir. Kolorektal kanser hastalarında *Roseburia*, *Blautia* ve *Lachnoclostridium* cinslerinin azaldığı tespit edildi. İstatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşmamış olsa da KRK mikrobiyotasında sağlıklı kontrollere kıyasla *Akkermansia*'nın arttığı, *Faecalibacterium*'un ise azaldığı tespit edildi. *Enterococcus*'un bazı türlerinin, hücre dışı süperoksit salınımını artırarak hidrojen peroksit'e dönüştürüldüğü ve bunun da kromozom kararsızlığı ile DNA hasarına yol açarak karsinogenezi tetikleyebileceği bazı deneylerde gösterilmiştir (117). *Blautia*, *Lachnospiraceae* ailesinin bir üyesi olan anaerob bakteri grubudur. Bağırsak mikrobiyotasında baskın olarak obezite, diyabet, kanser ve çeşitli inflamatuvar hastalıklar gibi konakçının fizyolojik işlev bozukluklarıyla önemli bir korelasyona sahiptir. *Blautia*, bakteriyosin üreterek bağırsaktaki *C. perfringens* ve vankomisin dirençli Enterokok gibi patojen bakterilerin kolonizasyonunu engelleyerek bağırsak mikrobiyotasının bileşimini etkilemektedir. Bu cinsin ayrıca potansiyel probiyotik özelliği mevcuttur. Yapılan çalışmalarda KRK, obezite ve diyabet hastalarında *Blautia*'nın azaldığı, inflamatuvar bağırsak hastalıklarında ise arttığı tespit edilmiştir (118). *Lachnospiraceae* ailesinin bir üyesi

olan *Roseburia*, bağırsaktaki en önemli bütirat üreticilerinden biridir. Sahip olduğu Bütiril-CoA transferaz enzimi ile bütirat üretmektedir. Bütirat ise antiinflamatuvar ve metabolik modülasyon etkileri ile bağırsağı enfeksiyon ve kanser oluşumuna karşı korumaktadır. Bu özelliklerinden dolayı *Roseburia*'nın probiyotik olarak kullanılabileceği öngörülmektedir (119).

Tür düzeyinde değerlendirme yapıldığında, Tengfei ve ark.'nın yaptığı çalışmada KRK hastalarında *Faecalibacterium prausnitzii*'nin azaldığı, *Escherichia coli* ve *Prevotella copri*'nin arttığı tespit edilmiştir (104). Yapılan farklı bir çalışmada KRK hastalarının bağırsak mikrobiyotasında *Akkermansia muciniphila*'nın önemli derecede arttığı tespit edilmiştir (120). Feng ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada KRK hastalarında KRK ve adenom hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla *Alistipes putredinis*, *Bilophila wadsworthia* ve *E. coli* türlerinin arttığı saptanmıştır (100). İran'da KRK tümör dokusu ile yapılan bir çalışmada KRK hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla *Enterococcus faecalis* ve Enterotoksijenik *Bacteroides fragilis*'in arttığı, *F. prausnitzii*'nin azaldığı tespit edilmiştir (116). Yapılan çeşitli çalışmalarda *E. faecalis*, *E. coli*, Enterotoksijenik *Bacteroides fragilis* (ETBF) ve *Peptostreptococcus anaerobius*'un KRK hastalarındaki artışı dikkat çekmiştir (99). Wei ve ark.'nın yaptığı çalışmada prekanseröz mukozal lezyonlar gelişen sıçanların gaitasında *Ruminococcus obeum* ve *Allobaculum* benzeri bakterilerde artış saptanmıştır (111). Bizim çalışmamızda, istatistiksel olarak anlamlı sayılan 6 farklı tür tanımlandı. Kolorektal kanser hastalarında *Enterococcus faecium* ve *Ruminococcus bicirculans* (ex Wegman et al. 2014) türleri sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek saptandı. *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Segetella oris* ve *Alistipes senegalensis* türlerine ise sağlıklı kontrollerde hiç rastlanmazken KRK hastalarında göreceli olarak arttığı tespit edildi. İstatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşmamış olsa da KRK hastalarında *E. coli* ve *A. muciniphila* saptanma oranlarının arttığı, *F. prausnitzii* saptanma oranının ise azaldığı tespit edildi. Yaptığımız LEFse analizinde ise LDA skoru > 2 olan 6 farklı tür tanımlandı. Bunlar, istatistiksel olarak anlamlı sayılan *E. faecium*, *E. gilvus*, *E. casseliflavus*, *S. oris* ve *R. bicirculans* (ex Wegman et al. 2014) türleri ve *A. muciniphila* türüdür.

Kolorektal kanser oluşumu genel bağırsak mikrobiyota değişikliğinin yanı sıra bir veya daha fazla spesifik bakteri enfeksiyonu ile de ilişkilidir. Araştırmacılar, bağırsak mikrobiyotası ve KRK oluşumunun bağlantısı ile alakalı iki hipotez öne

sürmüşlerdir: Alfa-bug hipotezi ve sürücü yolcu modeli. Alfa-bug hipotezinde, bazı virülans özelliklerine sahip belirli mikrobiyom üyeleri, doğrudan proonkogenik etkiyle beraber aynı zamanda kolondaki bakteri topluluğu değişimine, bağırsak mukozal bağışıklık tepkisine ve kolon kanseri ile sonuçlanan kolon epitel hücre değişikliklerine neden olmaktadır. Ek olarak alfa-buglar, kansere karşı koruyucu olan bağırsak bakterilerini seçici olarak ortadan kaldırarak karsinogenezi artırabilmektedir. Potansiyel alfa-bug adayları arasında ETBF, *S. bovis*, süperoksit üreten *E. faecalis* ve *E. coli* yer almaktadır (99, 121). Sürücü yolcu modelinde ise mikroorganizmalar sürücü ve yolcu bakteriler olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu modelde, sürücü bakterilerin KRK'yı başlattığı ve bunların yerini daha sonra yolcu bakteriler yer aldığı varsayılmaktadır. Sürücü bakteriler olarak adlandırılan bazı yerli bağırsak bakterileri, epitel hücre DNA'sına zarar vermek için genotoksik maddeler üretmekte ve KRK'yı başlatmaktadır. Yolcu bakteriler olarak adlandırılan *Fusobacterium* gibi bazı fırsatçı bakterilerin çoğalmasını artıran tümör çevresinin değişikliği ise kolorektal tümör oluşumuna neden olmaktadır. Bu modelde alfa-bug modelinden farklı olarak, sürücü bakteriler KRK'yı başlatır fakat zamanla yerini yolcu bakterilere bırakmaktadır (99). Olası sürücü bakteriler; *E. coli*, ETBF, *Shigella* ve *Salmonella* iken, olası yolcu bakteriler; *Fusobacterium*, *Streptococcus gallolyticus*, *Clostridium septicum*, *Roseburia* ve *Faecalibacterium*'dur (122). Kolorektal karsinogenez genel olarak üç aşamaya ayrılabilir; İnisiyasyon, promosyon ve progresyon. İnisiyasyon aşaması, proliferatif özelliğe sahip karsinojenik ajanın neden olduğu DNA hasarı ile karakterizedir. Örneğin, kolibaktin üreten *E. coli*, başlangıç aşaması bakterisi olarak varsayılmaktadır. Promosyon aşaması, preneoplastik hücrelerin çoğalması, hücresel mutasyon ve DNA hasarının artmasını içermektedir. Örneğin, ETBF tarafından üretilen metabolitler kolon bütünlüğünü bozup protoonkogenik Th17 hücrelerini indüklemektedir. Son aşama olan progresyon ise, tümör büyümesi ve metastaz ile karakterizedir. Örneğin, *Fusobacterium* E-kaderinlere bağlanarak kanser hücre proliferasyonunu ve metastazı artırmaktadır (123).

Çeşitli *Enterococcus* türleri, immün sistemi uyarak bağırsak hemostazında önemli bir rol oynamaktadır. Bazı tür ve suşları yararlı iken bazıları hastalık ve KRK ile ilişkilendirilmiştir. *E. faecalis* esas olarak, reaktif oksijen bileşikleri ve hücre dışı süperoksit üreterek genomik instabilite ve kolonik DNA'da mutasyona neden olarak kolonu kansere yatkın hale getirir. Ayrıca bağırsak epitel bariyerini doğrudan bozup

enfeksiyonu tetikleyebilen metalloproteaz ürettiği gösterilmiştir. Kolorektal kanserde *E. faecalis*, bir sürücü bakterisi olmaktan ziyade yolcu bakterisi olarak kabul edilmektedir. Kolonda meydana gelen oksijen gerilimi, proteindeki değişiklikler, sitokin ve müsin artması gibi ana değişiklikler sonrasında patojenik olarak ortaya çıktığı varsayılmaktadır (124). Aksine *E. faecium*'un bazı suşlarının ise, kolesterol seviyelerini düşürmek, diyare ve irritabl bağırsak sendromunu tedavi etmek amaçlı probiyotik olarak kullanılabileceği öngörülmektedir. Ürettikleri bakteriyosin ile tek başına veya diğer antibiyotiklerle kombinasyon halinde bağırsaktaki fırsatçı gram negatif enfeksiyonları tedavi etmek amaçlı kullanılabilirler (125). *Enterococcus*'un kanser tedavisinde immünoterapiyi desteklediği kanıtlanmış ve kanser tedavisindeki rolüne ilişkin giderek artan sayıda rapor bulunmaktadır. Bu bakteriler antimikrobiyal ve antikanser özelliklere sahip çok çeşitli maddeler üretmektedir. Bu bakteriler, yaşamı tehdit eden bakteriyel enfeksiyonlara maruz kalan immün sistemi zayıflamış kanser hastalarının tedavisinde, önce bakterisidal etki ile enfeksiyonu kontrol altına alırlar daha sonra antitümöral sinerjik etki ile onkolojik tedaviye yardım ederler. *E. faecium*'un hematolojik malignitelerde nötropenik ateşi, KRK, serviks kanseri ve akciğer kanseri tümör hücrelerinin çoğalmasını önlediğine dair çalışmalar mevcuttur (126). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, KRK olan farelere *E. faecium* CRL-183 süspansiyonu uygulanmıştır. Sonucunda, *E. faecium* CRL-183 süspansiyonunun adenokarsinom insidansını %40 oranında azalttığı ve uygulanan KRK'lı farelerin ortalama tümör boyutunda azalma tespit edilmiştir (127). Bizim çalışmamızda da KRK hastalarında *Enterococcus* cinsinde önemli oranda artış saptandı. Tür düzeyine inildiğinde ise çalışmalarda çok değinilmemiş olan *E. gilvus* ve *E. casseliflavus* türlerine sağlıklı kontrollerde hiç rastlanmazken KRK hastalarında anlamlı olarak arttığı tespit edildi. *E. faecium* türü KRK hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Ayrıca yaptığımız analizler sonucunda bu 3 türün de olası biyobelirteç adayları olduğu saptanmıştır. *Enterococcus* türlerinin karsinogenez üzerindeki rolü henüz netliğe kavuşmamıştır. Sonuçlarımız cins düzeyinde literatürü desteklerken tür düzeyinde literatürden farklı çıkmıştır. Bunun sebepleri, saptanan türlerinin suşlarının tespit etmememiz, örneklem boyutunun çok küçük olması ve diyet faktörünü çalışmaya dahil etmememiz olabilir. Ayrıca olası biyobelirteç olarak saptadığımız ve literatürde çok değinilmemiş olan *E. gilvus* ve *E. casseliflavus* türleri ile KRK ilişkisini anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Ruminococcus bicirculans, insan bağırsağında en bol bulunan *Bacillota* (*Firmicutes*) filumundaki *Ruminococcus* grubuna aittir. Yakın bir tarihte genomik analizi tamamlanıp yeni bir tür olarak tanımlanmıştır (128). *Ruminococcus*, dirençli nişasta sindirimi, aminoasit biyosentezi ve lipid metabolizmasında görev almaktadır (129). *Ruminococcus*'un yararları ve zararları tartışmalıdır. Anti-PD-1 immünoterapisi alan hepatoselüler kanser (HCC) hastalarının kanser tedavisi ve nüksetmesiyle ilgili olumlu sonuçlar sağlayabilecek probiyotik olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür. Farklı bir yandan ise *Ruminococcus*, bazı hastalıklar ile ilişkili bulunmuştur. Tiroid kanseri, endometrial kanser ve berrak hücreli renal kanser hastalarında önemli ölçüde arttığı saptanmış ve prognoz için bir biyobelirteç olabileceği öngörülmüştür. HCC hastaları ile yapılan farklı bir çalışmada hastaların bağırsak mikrobiyotasında *R. bicirculans*'in arttığı tespit edilmiştir (130). Çalışmalarda KRK hastalarının gaitalarında triptofan düzeylerinin arttığı saptanmış ve triptofan indol yolunun bozulduğu, bunun da *R. bicirculans* ile negatif korelasyon gösterdiği raporlanmıştır (131). Farklı bir açıdan değerlendirildiğinde özellikle KRK hastalarında yaşlanmayla beraber *R. bicirculans*'in arttığı gösterilmiştir (132). Bizim çalışmamızda ise sağlıklı kontollere kıyasla KRK hastalarında *R. bicirculans*'in artışı dikkat çekmiştir ve analizimizde bunun olası bir biyobelirteç adayı olduğu saptanmıştır. Olası biyobelirteç adayı olarak ve *R. bicirculans* ile KRK arasındaki ilişkiyi daha iyi anlayabilmek için daha büyük örnekleme kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Segetella oris, esas olarak bağırsakta, ağızda ve alt solunum yolları mikrobiyotasında bulunan gram negatif anaerobik bir bakteridir. Önceden *Prevotella oris* olarak bilinen bakterinin adı 2022 yılında değişerek *S. oris* olmuştur. Başta ağız içi enfeksiyonlar olmak üzere bazı solunum yolu enfeksiyonları, menenjit ve ampiyeme neden olmaktadır (133). Çalışmalarda *S. oris*'in, immünoglobulin A proteaz, hiyalüronidaz ve β -laktamaz ürettiği gösterilmiştir; bu da bu faktörlerin organizmanın patojenik potansiyeline katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (134). *S. oris* gibi oral patojenlerin ağızdan bağırsağa translokasyonu ile ilgili iki hipotez mevcuttur. Bunlardan ilki, tükürükte bulunan oral patojenlerin yutularak GİS'e geçmesidir. Özellikle ağız içi enfeksiyonlarda artan spesifik patojenler, mide asidine dirençliyse veya çeşitli faktörler ile mide asiditesinin azaldığı durumlarda kolaylıkla kolona kolonize olabilmektedir. İkinci yol ise, kan dolaşımı yoluyla oral patojenlerin ağız dışındaki organlara yayılmasıdır. Oral mikrobiyotanın, dış fırçalama, dış çıkarma

ve çiğneme gibi diş aktiviteri sırasında veya ağız içi enfeksiyon varlığında doğrudan kan dolaşımına geçebildiğı gösterilmiştir. Oral yoldan kaynaklanan bağırsak disbiyozisi sonucunda doğal ve kazanılmış immün yanıt elemanlarının üretimi artmaktadır. Bu inflamatuvar yanıt sonucunda NF-κB ve STAT3 gibi spesifik epitelyal sinyalleri artarak reaktif nitrojen ve oksijen türleri üretilmektedir. Bu fenomenler ise oksidatif strese, DNA hasarına, düzensiz hücre çoğalmasına ve son olarak KRK oluşumuna yol açmaktadır (101). *Alistipes senegalensis*, *Bacteroidota* filumunda yer alan ve çok yakın bir tarihte genom dizisi tamamlanan gram negatif anaerob bakterilerdir. *A. senegalensis*, ilk olarak Senegal’de sağlıklı bir insanın gaitasından izole edilmiştir. *Alistipes* türleri, çoğunlukla sağlıklı insan bağırsak mikrobiyotasında bulunmaktadır ve aminoasitlerden SCFA üretebilirler. Bu türlerin çeşitli hastalıklarla bağlantısı saptandığı için fırsatçı patojen olarak nitelendirilmektedir. Kardiyovasküler hastalıklar, kolit, depresyon ve kronik yorgunluk gibi durumlarda *Alistipes*’in arttığı bilinmektedir. Ayrıca fırsatçı patojen olarak KRK patogeneze de katkı sağladığı bulunmuştur. Özellikle sağ kolon tümörlerinde daha fazla saptanmıştır ve bunun nedeni muhtemelen anaerob bakteri grubu olmasıdır (135). Antimikrobiyal savunma aracı olarak görev yapan ve immün sistem için çok kritik bir role sahip olan Lipokalin 2 (LCN2), kolonu enfeksiyon ve kanserden korumaktadır. LCN2 negatif farelerde, insan KRK’sı ile ilişkili en yaygın 10 türden biri olan *Alistipes*’in çok fazla bollaştığı gösterilmiştir. *Alistipes*’in IL6-STAT3 sinyalini indüklediğı ve bunun da tümör oluşumunu tetiklediğı varsayılmaktadır (136). Bizim çalışmamızda *S. oris* ve *A. senegalensis* türlerine sağlıklı kontrollerde hiç rastlanmazken KRK hastalarında artışı dikkat çekti. Analizimiz *S. oris*’in olası biyobelirteç adayı olduğunu öngörmektedir fakat bunun kanıtlanması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Akkermansia, *Verrucomicrobia* filumunda yer alan ve bağırsakta müsin parçalayan gram negatif bakteri grubudur. Son yıllarda, konakçının immün sistemi ile etkileşim mekanizması nedeniyle *A. muciniphila* "yıldız bağırsak bakterisi" olarak tanımlanmıştır. Müsin parçalanması ile ilgili birkaç gen tümör insidansı ile pozitif korelasyon göstermiştir. Yapılan çalışmalarda *Akkermansia*’nın müsin parçalaması ile bağırsak iltihabının ilişkili olduğu gösterilmiştir. Müsin parçalayıcı bakterilerin aşırı bolluğı, mukozal bariyer bütünlüğünün zayıflaması ve inflamasyonun artmasına yol açmaktadır. İnflamasyon ve bağırsak hemostazının bozulması ile KRK oluşum süreci başlamaktadır (137). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, farelere oral *A.*

muciniphila uygulandığında, sağlıklı kontrollere göre kolonun kısaldığı ve daha fazla vücut ağırlığı kaybı ile kolonda daha fazla tümör yükü tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, *A. muciniphila*'nın inflamasyonu şiddetlendirdiği ve KRK'nın erken evresinde bağırsak epitel hücrelerinin proliferasyonunu artırarak KRK oluşumuna neden olduğunu göstermektedir (138). Ancak *A. muciniphila*'nın KRK'daki etkisi üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda zıt sonuçlar ortaya çıkmıştır. Ortaya çıkan bazı kanıtlar, *A. muciniphila*'nın kolit ve KRK'yı iyileştirmek için potansiyel bir probiyotik ajan olabileceğini göstermektedir. *A. muciniphila* DSM 22959 suşunun sondayla verilmesi, kolitli farelerde hastalık aktivite indeksini azaltıp, mukus kalınlığını ve antiinflamatuvar etkinliği artırarak kolitten iyileşmeyi hızlandırmıştır (139). Bunun nedeni, probiyotik amaç için kullanılan bakterilerin farklı suşlarının farklı vücut bölgelerindeki mikrobiyota etkilerinin değişken olması ile açıklanabilir. Bu bakteri, sitokin üretimi ve adaptif bağışıklık tepkisini indüklemekte ve TLR yoluyla bağırsak ve mukozal bariyer fonksiyonunu iyileştirmektedir. Özellikle Wnt/ β -katenin sinyal yolunu aktive ederek hasarlı bağırsak bariyerini onarma yeteneğine sahip bağırsak kök hücrelerinin çoğalmasını indükleyebilmekte ve böylece bağırsak mukozal doku bariyerinin bütünlüğünü koruyabilmektedir (140). Bizim çalışmamızda ise anlamlı seviyeye ulaşmamış olsa da KRK hastalarında *A. muciniphila* saptanma oranının arttığı tespit edildi. Ayrıca analizimizde *A. muciniphila*'nın KRK için olası biyobelirteç adayı olduğu saptandı. Bununla birlikte insan ve fare modellerinde yapılan çeşitli çalışmalar, gıda alımının azaltılmasının, *A. muciniphila* veya ilgili bakterilerin önemli ölçüde artmasına neden olduğunu göstermiştir. Kolorektal kanser hastalarında da besin alımının azaldığı bilindiğinden artan *A. muciniphila*'nın anlamlı yorumu için analize diyet bilgilerinin de dahil edilmesi gerekmektedir (141). Tüm bu sonuçlar aslında, *A. muciniphila*'nın KRK'ya neden olmaktan ziyade ileri KRK vakalarında bozulan bağırsak bariyerini düzeltmek için tepki olarak arttığını düşündürmektedir. *A. muciniphila*'nın KRK ile ilişkisini anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

E. coli normal bağırsak florasında baskın olarak bulunan, *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*) filumunda yer alan gram negatif fakültatif anaerob bakterilerdir. Luminal mikrobiyal floranın stabilitesinin desteklenmesine ve normal bağırsak homeostazının korunmasına katkıda bulunurlar (142). A, B1, B2 ve D olmak üzere 4 ana filogenetik gruptan oluşmaktadır. Patojenik suşlar genellikle B2 ve D iken, gaitanın çoğunu A ve B1 suşları oluşturmaktadır. Patojenik *E. coli* suşları,

siklomodulinler adı verilen, sitoletal genişletici toksinler (CDT), sitotoksik nekrotizasyon faktörü, döngü inhibe edici faktör ve kolibaktin gibi çeşitli virülans faktörlerini sentezlemektedir. Özellikle *pks* geni tarafından kodlanan kolibaktin, ökaryotik hücrelerde DNA çift sarmal kırılmalarına ve kromozomal instabiliteye neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda B2 grubuna ait patojenik sikmodulin+ *E. coli* suşlarının KRK hastalarında bolluğunun arttığı tespit edilmiştir. Özellikle *pks* + *E. coli* (11G5) suşu, KRK'da tümörün boyut ve sayısındaki artışla tümör oluşumunu önemli ölçüde indüklediği gösterilmiştir. *Pks* geninden mRNA sentezi ile kolibaktin üretiminin, epitel hücrelerine yakın temasta olan bakterilerde en fazla üretildiği raporlanmıştır (143). Yapılan birçok çalışma *pks* gen ekspresyonunun, inflamasyon, mikrobiyal metabolitler, diyet oligosakkaritleri, demir ve oksijen varlığından etkilendiğini göstermiştir. Bu bulgular, diyet gibi değiştirilebilir risk faktörlerinin *pks* + *E. coli* ile kolonize olmuş bireylerde KRK gelişimini etkileyebileceğini göstermektedir. Bazı çalışmalar, normal doku ve erken adenomlarda *pks*+ *E. coli* prevalansının arttığını gösterirken, yakın zamanda bir Fransız kohortunda yapılan çalışmada, *pks* genlerinin yalnızca evre 4 tümörlerde zenginleştiği bulunmuştur (144). Bizim çalışmamızda anlamlı seviyeye ulaşmamış olsa da KRK hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla *E. coli*'nin artışı tespit edildi. Sürücü- yolcu modelindeki gibi KRK'ya neden olan bakteriler sonrasında ortadan kalkıp yerine kanser dokusuna daha iyi adapte olan bakteriler geçebilmektedir. *E. coli*'nin sürücü-yolcu bakterilerden hangisi olduğu belirsizliğini korumaktadır ve kolibaktinin tümör oluşumu ve kanser ilerlemesindeki rolünü anlamak için çok daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bacteroides fragilis, *Bacteroides* cinsinde yer alan gram negatif, sporsuz anaerob bakterilerdir. *B. fragilis*'in toksik olmayan *B. fragilis* (NTBF) ve enterotoksijenik *B. fragilis* (ETBF) olmak üzere iki tipi vardır. ETBF, NTBF'de bulunmayan *B. fragilis* toksini (BFT) üretebilen *bft* genine ve biyofilm oluşturabilme kapasitesine sahiptir (145). Birçok epidemiyolojik çalışma, KRK hastalarında ETBF enfeksiyonu insidansının daha yüksek olduğunu ortaya koymuş olup fare modellerinde, ETBF ile kolonizasyonun kolit ve distal kolon tümör oluşumunu artırdığı gösterilmiştir. BFT, Th17 ve NF- κ B sinyal yolunun aktivasyonu ile tümör oluşumuna neden olabilmektedir. Ayrıca kolon epitel hücrelerinde E-kadherini bozarak geçirgenliği artırır ve β katenin sinyal yolunu aktive ederek hücre çoğalmasına neden olmaktadır. Diğer yandan poliamin katabolizması ile DNA

hasarına neden olarak KRK oluşumunda rol oynamaktadır. İlginç bir şekilde BFT diğer prokarsinojenik bakterilerin çoğalmasına uygun ortam hazırlar ve müsin bozulması ile bağırsak geçirgenliğini bozarak lokal bağırsak disbiyozunu indüklemektedir (146). Yakın zamanda bir Fransız kohortunda yapılan çalışmada, KRK hastalarına göre erken adenomlu hastaların bağırsak mikrobiyotasında zenginleşen tek türün ETBF olduğu saptanmıştır. Özellikle erken adenomda bol bulunan ETBF'nin KRK'nın sonraki aşamalarında giderek azaldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ETBF tespitinin erken adenom ve hastalık gelişme riski yüksek bireylerde bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir (147). Bizim çalışmamızda KRK hastaları ile sağlıklı kontrollerde *B. fragilis* saptanma oranları benzer bulundu. Çalışma gruplarında bir fark bulunmamasının muhtemel sebebi, KRK grubuna dahil ettiğimiz hastalara karsinom evresinde tanı konulmuş olmasıdır.

Birçok çalışmada KRK ile en çok ilişkilendirilen ve biyobelirteç olarak kullanılması önerilen iki tür *Fusobacterium nucleatum* ve *Streptococcus bovis*'tir. Yaygın bir gram negatif anaerobik bakteri olan *F. nucleatum*, ağız boşluğundaki en bol türlerden biridir ve ağız içi enfeksiyonlar başta olmak üzere oral kanserler, pankreas kanseri, karaciğer absesi ve baş-boyun enfeksiyonlarıyla yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Artan kanıtlar, KRK hastalarında *F. nucleatum*'un önemli oranda arttığını göstermiş ve bu türün KRK gelişimi ve ilerlemesi için bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir. Kolorektal kanserdeki *F. nucleatum* bolluğunun, daha kısa hayatta kalma süresiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (148). Çalışmalarda KRK hastalarının tükürük ve gaita örneğinde bollaşan *F. nucleatum*'un aynı suş olduğu bulunmuştur ve bu da kolondaki bu türün ağız içinden kaynaklandığı göstermektedir. Epidemiyolojik çalışmalar ilginç bir şekilde, şiddetli periodontitisli hastaların KRK'ya yakalanma riskinin %50'ye kadar çıktığını göstermiştir (149). Kolorektal kanser hücrelerinin *F. nucleatum* ile enfeksiyonu, tümör hücresi proliferasyonu, invaziv aktivite ve ksenograft tümör oluşturma yeteneğini artırmaktadır. Ayrıca NF- κ B aktivasyonunu artırarak hem prokarsinojenik sitokin salınımını hem de Keratin7'yi düzenleyerek KRK'da metastazı artırmaktadır. *F. nucleatum* tarafından salgılanan FadA yapışma proteini, E-kadherine bağlanır ve bağırsak epitel hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyali aktive ederek inflamatuvar ve kanser genlerinin seviyesini artırmaktadır (146). *F. nucleatum* bolluğu azaldığında veya virülans faktörlerinin üretimi engellendiğinde kanser oluşumu da önlenmektedir. Örneğin basit bir

şekilde aspirin verilmesi, *F. nucleatum* FadA/Fap2 ekspresyonunu inhibe ettiğinden KRK'dan korunmak amaçlı profilaktik olarak kullanılabilir. Çok çeşitli çalışmalarda *F. nucleatum*'un, premalign lezyonlar ve ileri evre hastalık tanısı için bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği öngörülmüştür (144). *S. bovis*, insanlarda sistemik enfeksiyona neden olabilen gram pozitif düşük dereceli fırsatçı patojendir. Yetişkinlerin %16'sında normal bağırsak florasında yer almaktadır. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*S. bovis* biyotip 1) ile KRK ilişkisi ilk kez 1966 tarihinde tanımlanmıştır. *S. bovis*'ten salınan proteinler, KRK'larda daha fazla bulunan ve apoptozu engelleyip anjiyogenezi artırabilen COX-2'nin aşırı ekspresyonunu ve inflamasyonu uyarmaktadır. Yapılan çalışmalarda, *S. bovis* bakteriyemi vakalarının %6-71'inde kolon neoplazisinin görüldüğü bildirilmiştir. Bu bakteri, kolon mukozasındaki kollajen IV'le birleşen bir hücre duvarı antijenine sahiptir ve proinflamatuvar sitokinler olan IL-8, IL-1 ve COX-2'nin üretimini indükler, bu da malign hücrelerin apoptozunu azalması, anjiyogenez ve hücre çoğalmasıyla sonuçlanmaktadır. Yapılan bir çalışmada, sağlıklı dokuların %8'inde *S. gallolyticus* saptanırken KRK tümör örneklerinin %49'unda saptanmıştır (117).

Protein bileşiklerinden oluşan enterositler arasındaki sıkı bağlantılar, bağırsak duvar geçirgenliğinde önemli bir rol oynamaktadır. Düzgün çalışan sıkı bağlantı ve immün sistem, gıda, bakteriyel antijenler ve toksik maddelerin bağırsaktaki lamina propriaya akışını kontrol etmektedir. Aynı zamanda bağırsak mikrobiyotasının nitelik ve niceliksel bileşiminin doğru olması da bu dengenin korunmasında önemli rol oynamaktadır. Herhangi bir nedenle meydana gelen disbiyoz, iltihaplanmaya yol açarak bağırsak bariyerinin geçirgenliğinin artmasına neden olabilmekte, bu da bağırsak mukozasının antijenlerle aşırı yüklenmesine, enfeksiyonun artmasına, emilimin bozulmasına ve moleküllerin karaciğer gibi uzak organlara taşınmasına neden olmaktadır. *V. cholerae* tarafından üretilen Zot toksinin insandaki karşılığı olan zonulin proteininin keşfi ile bağırsak bariyer geçirgenliğinin bozulması ve hastalık patogenezi arasındaki bağlantı aydınlatılmaya başlanmıştır. Çok sayıda çalışma, mikroorganizmaların zonulin sekresyonunda değişikliklere neden olduğunu göstermiştir. Bağırsak mikrobiyota dengesinin fırsatçı mikroorganizmalara doğru değişmesi, serum zonulin düzeylerinde artışa neden olmaktadır. Yüksek zonulin seviyeleri, bağırsak bariyerinde bozulmanın yanı sıra, bağırsak lümeninden kan dolaşımına partikül geçişi üzerindeki kontrolün kaybedildiğini de göstermektedir.

Serum zonulin düzeyleri, bağırsak geçirgenliğini değerlendirmek için iyi bir belirteçtir. Çölyak başta olmak üzere Crohn, kolit, bağırsak enfeksiyonları, HCC, akciğer kanseri ve KRK gibi çok çeşitli hastalıklarda serum zonulin düzeyleri artmaktadır. Yapılan bir çalışmada KRK hastalarında mevcut obezite durumunda bağırsak mikrobiyotasında fırsatçı patojenlerin arttığı saptanmış ve sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında bu hastaların serum zonulin düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Yüksek zonulin düzeyleri, bağırsak mikrobiyotasındaki *Prevotella* bolluğuna atfedilmiştir. Çünkü *Prevotella*, müsin parçalanmasında önemli olan, bağırsak mukozal bariyeri ve fonksiyonunu bozabilen enzimler içermektedir (150). Kolorektal kanser ile zonulin düzey bağlantısının araştırıldığı bir çalışmada, KRK’da hastalığın evresi ilerledikçe zonulin düzeylerinin de arttığı saptanmıştır (98). Probiyotikler üzerine yapılan bir çalışma ise, KRK hastalarına probiyotik verilmesinin serum zonulin düzeylerinin düşürdüğünü göstermiştir. Özellikle ameliyat sonrası serum zonulin düzeylerinin, septiseminin erken bir biyolojik belirteci olabileceği öngörülmüştür (151). Bizim çalışmamızda da literatüre benzer şekilde sağlıklı kontrollere kıyasla KRK hastalarında serum zonulin düzeylerinin anlamlı derecede arttığı tespit edildi. Bu sonuçlar, zonulin düzeyleriyle korele bir şekilde bağırsak geçirgenliğinin arttığını gösterirken, muhtemelen bağırsak mikrobiyal disbiyozu sonucunda geçirgenlik artmakta ve bununla beraber eşzamanlı olarak çeşitli moleküllerin etkisiyle KRK oluşum süreci başlamaktadır. Serum zonulin düzeyleri, çeşitli hastalıklardan etkilendiği için KRK’nın tanısında kullanılmaktan ziyade, artan bağırsak geçirgenliği nedeniyle patojenler sistemik dolaşıma geçtiği için KRK’da sepsisin erken tanısında kullanılabileceği düşünülmektedir fakat bunun için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Lipopolisakkarit (LPS), gram negatif bakterilerin hücre duvar bileşenleri iken lipopolisakkarit bağlayıcı protein (LBP), bakteriler ve LPS’ye yanıt olarak hepatositler tarafından üretilen bir akut faz proteinidir. LPS, inflamatuvar yanıtı artırarak, bağırsak bariyer fonksiyonunu değiştirmektedir. Diyabet, İBH, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi çeşitli hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır. Çeşitli çalışmalarda, LPS maruziyetinin göstergesi olarak LPS ve LBP’nin azalmış apoptoz ve metastatik tümör hücrelerinde artan proliferasyonla ilişkili olduğu bulunmuştur. İn vitro çalışmalarda, LPS’nin, kanser hücrelerinin hayatta kalma ve çoğalmasını, anjiyogenezi, vasküler geçirgenliği ve tümör hücre adezyonunu desteklediği

gösterilmiştir. LPS'nin KRK ile ilişkili olduğu varsayılmaktadır ancak az sayıda insan çalışması ile bu ilişki incelenmiştir. Kolorektal adenomlu hastaların LPS düzeylerinin incelendiği bir çalışmada, adenomlu hastalarda sağlıklı kontrollere göre daha yüksek LPS seviyeleri tespit edilmiştir. Yapılan prospektif bir çalışmada ise LBP genindeki polimorfizmin artan KRK riskiyle ilişkili olduğu bulunmuştur. LPS diyet faktöründen de etkilenebilmektedir örneğin, yüksek yağlı diyet sonucunda postprandiyal LPS seviyelerinin çok arttığı gösterilmiştir (152). Bağırsak mikrobiyotası ile LBP arasındaki ilişkiye yönelik yapılan çalışmalarda, kan LBP seviyesinin *Clostridiales* takımıyla negatif korelasyon, *Bacteroidales* takımıyla ise pozitif korelasyon sergilediği bulunmuştur. *Clostridiales* takımındaki bakterilerin bütirat üretmesi, farelerde bağırsak bariyer fonksiyonunu güçlendirdiği ve LPS akışını baskıladığı gösterilmiştir. *Bacteroidales* takımındaki bakteriler ise genel olarak ürettiği metabolitlerden kaynaklı bağırsak bariyerine zarar vermektedir, bu da bağırsak disbiyozuna neden olmakta ve dengeyi gram negatif fırsatçı patojenler lehine kaydırarak LPS üretimini artırmaktadır (153). Bizim çalışmamızda anlamlı seviyeye ulaşmamış olsa da KRK hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla serum LBP seviyelerinde artış gözlemlendi. Kolorektal kanser hastalarında meydana gelen bağırsak disbiyozu nedeniyle *Bacillota* (*Firmicutes*) filumunda azalma ve *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*) filumunda artma ile denge, fırsatçı gram negatif bakteri grubu lehine kaymaktadır. Çalışmamızda, serum LBP seviyelerinin artmasının muhtemel sebebi ise KRK hastalarının mikrobiyotasında artan fırsatçı gram negatif bakterilerdir.

Kısa zincirli yağ asitleri (SCFA), anaerobik bağırsak mikrobiyotası tarafından liflerin fermentasyonu sonucu üretilen metabolitlerdir. Kısa zincirli yağ asitleri kolayca emilerek kolon hücrelerine enerji sağlarlar. Bütirat, propiyonat ve asetat bağırsaklardaki üç ana SCFA'dır (146). Asetat, propiyonat ve bütiratın kolon ve gaitada bulunma oranları sırasıyla ortalama 6:2:2'dir. Kısa zincirli yağ asidi konsantrasyonları en fazla proksimal kolonda bulunurken, proksimalden distal kolona doğru gittikçe azalmaktadır (154). Bütirat, temel olarak *Bacillota* (*Firmicutes*) tarafından üretilir ve inflamasyon ile tümör oluşumunu önlemektedir. Bütirat, protein kinazın aktivasyonu ile epitelyal sıkı bağlantıların korunmasına yardımcı olur, ayrıca müsin sekresyonunu artırarak bağırsak epitel bariyerinin korumaktadır. Ek olarak nöronal uyarılabilirliği düzenleyerek kolon hareketleri ve kasılmayı artırıp KRK gelişimini engellemektedir. Bütirat ayrıca, Wnt/ β -katenin sinyalini inhibe ederek

histon deasetilaz inhibitörü (HDAC) gibi işlev görür, KRK hücrelerinin apoptozunu düzenleyerek de bu hücrelerin çoğalmasını engellemektedir. Propiyonat, *Bacteroidota* filumunda yer alan bazı bakteriler tarafından üretilmektedir. Propiyonat, bütirata göre daha zayıf etkinliğe sahip olmasına rağmen malign dönüşümü engelleyen ve kanser öncesi kolon hücrelerin apoptozunu indükleyen HDAC inhibitörü olarak görev almaktadır. Yapılan çalışmalarda KRK hastalarında propiyonat bolluğunun azaldığı saptanmıştır (146). İn vitro yapılan deneylerde, tedaviye propiyonat eklenmesinin KRK ilerlemesini baskıladığı tespit edilmiştir (155). Asetat, *Propionibacterium* ve *Bacteroides* grupları tarafından üretilmektedir. Fermantasyonun son ürünü olarak asetat, bağırsakta *Roseburia* ve *F. prausnitzii* gibi bakteriler tarafından bütirata dönüştürülmektedir. Böylece bağırsak homeostazına katkıda bulunarak KRK'nın ilerlemesini inhibe etmektedir (146). Ayrıca asetat, DNA fragmentasyonu ve kaspaz 3 aktivasyonu ile apoptozu indüklemekte ve KRK hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Asetatın kanser hücre zarında taşınmasında monokarboksilat taşıyıcı-1 (MCT1) ve akuaporinler rol almaktadır (156). Dallanmış aminoasitlerden olan lösin fermantasyonu sonucunda isovalerik asit oluşmaktadır ve bunun bağırsaklar için zararlı olduğu düşünülmektedir. Çalışmalarda isovalerik asidin, kolon düz kasında cAMP/PKA yolu ile gevşemeye neden olduğu saptanmıştır (157). Ortaya çıkan kanıtlar ile isobütirik asitin ise, RACK1 aktivasyonu yoluyla KRK'da metastazı artırabileceği gösterilmiştir (158). Çin'de yapılan bir çalışmada, kolorektal adenom hastalarında SCFA düzeyleri araştırılmıştır. Adenomlu hastalarda anlamlı derecede bütirat, asetat ve propiyonatın azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca sebze açısından yüksek lifli diyet ile beslenen kişilerin SCFA düzeyleri daha yüksek saptanmıştır (159). Yapılan çok çeşitli çalışmalar değerlendirildiğinde KRK hastalarında SCFA (bütirat, asetat, propiyonat) düzeylerinin azalmış olduğu gözlenmiştir (160). İtalya'da yapılan bir çalışmada (KRK *n*:19 sağlıklı kontrol *n*:16) KRK hastalarında asetat ve propiyonatın azaldığı gözlenirken, valerik asit, isovalerik asit ve isobütirik asit düzeylerinin ise arttığı saptanmıştır. Çalışma gruplarında bütiratın saptanma oranları benzer bulunmuştur (161). Amerika'da yapılan bir çalışmada ise KRK hastalarının bağırsaklarında bütiratın azaldığı ancak valerik asit, isovalerik asit ve isobütirik asitin ise arttığı tespit edilmiştir (120) .

Bizim çalışmamızda gruplar arasında SCFA düzeyleri değerlendirildiğinde, her iki grupta da gaitada en bol bulunan SCFA'lar sırasıyla; asetat, propiyonat ve

bütirat olarak tespit edildi. Bütirat, asetat ve propiyonat anlamlı seviyeye ulaşmamış olsa da KRK hastalarında görece azaldığı saptandı. İsobütirik asit, isovalerik asit, valerik asit, isokaproik asit, hekzanoik asit ve n-heptanoik asit düzeyleri gruplar arasında benzer saptandı. Bu bulgular ile bağırsak mikrobiyotasının taksonomik dağılımıyla beraber değerlendirildiğinde de sonuçlar uyumlu çıkmıştır. En fazla bütirat üreticileri olan *Roseburia* ve *Faecalibacterium* seviyelerinin, çalışmamızda bütirata benzer şekilde KRK hastalarında azaldığı saptandı. Bu, bütirat azalmasının nedenini açıklarken, bütiratın KRK'da oldukça koruyucu bir role sahip olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda propiyonat ve asetat üreticisi olan *Bacteroidota* filumunun da hasta grubunda anlamlı seviyede azaldığı saptandı. Aynı şekilde propiyonat ve asetat üreticisi bakteri grubunun azalması nedeni SCFA seviyelerinin azaldığı görülmekte ve bunların KRK'daki koruyucu rolleri anlaşılmaktadır. Literatürde önerildiği gibi, çalışmamızdan elde edilen veriler göre hastalara bütirat başta olmak üzere asetat ve propiyonat verilmesinin KRK'da ilerlemeyi azaltacağı düşünülmektedir. Üç ana SCFA haricindeki SCFA'ların, KRK'daki rolü ile alakalı literatürde farklı sonuçlar mevcuttur. Bu SCFA'ların, KRK'da yararlı-zararlı rolünün anlaşılması için çok daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Yaptığımız çalışmanın mikrobiyota analizinde sağlıklı kontrol grubundaki 77 yaşında kadın hastanın alfa çeşitliliği anlamlı derecede düşük saptandı. Gaita örneğinin %59'unu *E. faecium* ve %33'ünü *E. coli* türlerinin oluşturduğu gözlemlendi. Serum LBP ve zonulin düzeyleri kontrol grubu ortalamasıyla benzer saptandı. Gaita SCFA analizinde, asetat, bütirat ve propiyonat düzeylerinin ise kontrol ve hasta grubu ortalamalarının altında kaldığı saptandı. Hastanın anamnezi incelendiğinde, polikliniğe rutin kontrol için başvurduğu, yapılan tetkiklerinde tümör markerlerinin (CA 125, CA 19.9 ve CEA) yüksek çıkması nedeniyle onkoloji bölümüne yönlendirildiği tespit edildi fakat hastanın sonrasında hastaneye başvurusunun olmadığı anlaşıldı. Elde edilen veriler ile hastada taksonomik disbiyoz ek olarak fonksiyonel disbiyoz varlığı gösterilmiştir. Bu hastanın kanserin başlangıç aşamasında olduğu varsayılırsa, kansere bağlı olarak bağırsak disbiyozunun meydana geldiği görülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamıza 16 yeni tanı KRK hastası ile 16 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Bu hastaların gaita örneklerine bağırsak mikrobiyota profilleri için yeni nesil dizileme yöntemi ve mikrobiyal fermentasyon ürünü olan SCFA düzeyleri için gaz kromatografi yöntemi uygulanırken serum zonulin ve LBP düzeyleri için ELISA yöntemi uygulanmıştır. Sonuçlarımızın yaş ve cinsiyetten etkilenmemesi için bu parametreler her iki grupta da benzer seçilmiştir. Shannon ve Simpson indekslerine göre bağırsak mikrobiyal alfa çeşitliliği KRK hastalarında anlamlı derecede düşük saptanırken, Chao1-1 indeksine göre gruplar benzer bulunmuştur. Bray-Curtis PCoA beta çeşitlilik analizine göre iki grubun mikrobiyal dağılımları anlamlı derecede farklı bulunmuştur. Bağırsak mikrobiyota kompozisyonu filum, sınıf, aile, cins ve tür düzeyinde incelenmiştir. Her iki grupta da en bol bulunan filum *Bacillota (Firmicutes)* saptanırken, bunu KRK hastalarında *Pseudomonadota (Proteobacteria)*, sağlıklı kontrollerde *Bacteroidota* takip etmiştir. *Bacteroidota* filumunun saptanma oranı, KRK hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur. Sınıf düzeyinde, *Clostridia*, *Bacteroidia* ve *Negativicutes* saptanma oranları KRK hastalarında anlamlı düzeyde daha düşük saptanmıştır. Bağırsak mikrobiyotası aile düzeyinde incelendiğinde, KRK hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla *Lachnospiraceae* daha düşük bulunurken, *Enterococcaceae* daha yüksek tespit edilmiştir. İstatiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşamamış olsa da *Enterobacteriaceae* saptanma oranının KRK hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla artmış olduğu tespit edilmiştir. Cins düzeyinde, KRK hastalarında *Enterococcus* saptanma oranı sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek, *Roseburia*, *Lachnoclostridium* ve *Blautia* saptanma oranları ise daha düşük tespit edilmiştir. Grupların bağırsak mikrobiyotası tür düzeyinde incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı sayılan 6 farklı tür tespit edilmiştir. Kolorektal kanser hastalarında *E. faecium* ve *R. bicirculans (ex Wegman et al. 2014)* saptanma oranları sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur. *E. gilvus*, *E. casseliflavus*, *S. oris* ve *A. senegalensis* türlerine sağlıklı kontrollerde hiç rastanmazken, KRK hastalarında anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşmamış olsa da *E. coli* ve *A. muciniphila* türlerinin saptanma oranlarının KRK hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla artmış olduğu tespit edilmiştir. Yapılan LEFse analizinde LDA skoru>2 olarak tespit edilen

türler ise; *E. faecium*, *E. gilvus*, *E. casseliflavus*, *S. oris*, *R. bicirculans* ve *A. muciniphila*’dır.

Biyokimyasal markerler incelendiğinde, KRK hastalarında serum zonulin düzeyleri sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşmamış olsa da KRK hastalarında serum LBP seviyeleri sağlıklı kontrollere oranla daha yüksek tespit edilmiştir. Gaita SCFA düzeyleri incelendiğinde, her iki grupta da gaitada en bol bulunan SCFA’ların sırasıyla; asetat, propiyonat ve bütirat olduğu tespit edilmiştir. Bütirat, asetat ve propiyonat anlamlı seviyeye ulaşmamış olsa da KRK hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla görece azaldığı saptanmıştır.

Bağırsak mikrobiyotası ile KRK arasında oldukça önemli bir ilişki mevcuttur. Fakat mevcut çalışmalar ile bağırsak disbiyozunun kanserin nedeni mi sonucu mu olduğu henüz netliğe kavuşmamıştır. Sebep-sonuç ilişkisine tek taraflı bakmaktan ziyade multifaktöriyel değerlendirip bu ikilinin birbiri ile etkileşimini incelemek en doğrusu olacaktır. Çeşitli çalışmalar ve bizim çalışmamızdan elde edilen veriler ışığında; KRK’da bağırsak geçirgenliğinin arttığı ve meydana gelen bağırsak disbiyozu nedeniyle dengenin fırsatçı patojenler lehine kaydığı görülmektedir. Koruyucu bakterilerin azalıp fırsatçı bakterilerin artması ise biyokimyasal markerlar ile desteklenmiştir. Kolorektal kanserde mortalite-morbidite oranlarının yüksek olması sağlık ekonomisinde maliyet yükünü artırmaktadır. Tanıda kullanılabilecek mevcut invaziv seçeneklere ek olarak non-invaziv olası biyobelirteçlerin ve tedavide kullanılabilecek olası pre/probiyotik adaylarının tanımlanması sağlık ekonomisinde maliyet-etkin bir rol oynayacaktır. Bu bağlamda çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, KRK’da olası biyobelirteç tanımlama ve yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilme çalışmalarına ışık tutacaktır.

Çalışmamızın bazı kısıtlamaları mevcuttur. Bağırsak mikrobiyotasını etkileyen en önemli faktörlerden biri olan diyet faktörü çalışmamıza dahil edilmemiştir. Bağırsak mikrobiyotası kişiler arasında oldukça değişken olduğu gibi biyocoğrafik dağılımdan da etkilenmektedir. Bazı verilerimizin mevcut çalışmalardan farklı çıkmasının nedeni, çalışmaların coğrafik dağılımlarının farklı olması ve diyet faktörünün gözardı edilmesi olabilir. Özellikle çalışmamızın örneklem büyüklüğünün küçük olması hem sonuçları etkilemekte hem de mevcut sonuçlar ile genelleme yapılmasını engellemektedir. Neden-sonuç ilişkisini daha iyi anlayabilmek için bağırsak

mikrobiyotasının KKK hastalık ve tedavi süresi boyunca izlenmesi gerekmektedir. Bağırsak mikrobiyotası ile KKK arasındaki ilişkiyi anlamak için mikrobiyotanın multifaktöriyel değerlendirildiği geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

1. Standing S. Gray's Anatomy: Elsevier; 2016. 1136-59 p.
2. Hall JE. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology: Elsevier; 2016. 789 p.
3. Globacan. www.gco.iarc.fr: WHO; 2022.
4. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians 2021;71:209-49.
5. Globacan. www.gco.iarc.fr: WHO; 2020.
6. Sears CL, Garrett WS. Microbes, microbiota, and colon cancer. Cell host & microbe 2014;15:317-28.
7. HSGM. Türkiye Kanser İstatistikleri: Sağlık Bakanlığı; 2018.
8. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. CA: a cancer journal for clinicians 2020;70:145-64.
9. Rock CL, Thomson C, Gansler T, et al. American Cancer Society guideline for diet and physical activity for cancer prevention. CA: a cancer journal for clinicians 2020;70:245-71.
10. Gandini S, Puntoni M, Heckman-Stoddard BM, et al. Metformin and cancer risk and mortality: a systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders. Cancer prevention research 2014;7:867-85.
11. Song M, Chan AT. Environmental factors, gut microbiota, and colorectal cancer prevention. Clinical Gastroenterology and Hepatology 2019;17:275-89.
12. Evans CC, LePard KJ, Kwak JW, et al. Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. PloS one 2014;9:e92193.
13. Donohoe DR, Holley D, Collins LB, et al. A gnotobiotic mouse model demonstrates that dietary fiber protects against colorectal tumorigenesis in a microbiota-and butyrate-dependent manner. Cancer discovery 2014;4:1387-97.
14. Cockbain A, Toogood G, Hull MA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer. Gut 2012;61:135-49.
15. Zakikhani M, Dowling RJ, Sonenberg N, Pollak MN. The effects of adiponectin and metformin on prostate and colon neoplasia involve activation of AMP-activated protein kinase. Cancer prevention research 2008;1:369-75.
16. Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Schernhammer ES, Curhan GC, Fuchs CS. Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. Jama 2005;294:914-23.
17. Giglia MD, Chu DI. Familial colorectal cancer: understanding the alphabet soup. Clinics in colon and rectal surgery 2016;29:185-95.
18. Leoz ML, Carballal S, Moreira L, Ocaña T, Balaguer F. The genetic basis of familial adenomatous polyposis and its implications for clinical practice and risk management. The application of clinical genetics 2015:95-107.
19. Frucht H, Lucas AL. Molecular genetics of colorectal cancer: www.uptodate.com; 2023.
20. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology. Philadelphia: Elsevier; 2018. 630-4 p.

21. Lopes G, Stern MC, Temin S, et al. Early detection for colorectal cancer: ASCO resource-stratified guideline. *Journal of global oncology* 2019;5:1-22.
22. Costas-Chavarri A, Temin S, Shah MA. Treatment of patients with early-stage colorectal cancer: ASCO resource-stratified guideline summary. *Journal of Oncology Practice* 2019;15:290-2.
23. Chiorean EG, Nandakumar G, Fadelu T, et al. Treatment of patients with late-stage colorectal cancer: ASCO resource-stratified guideline. *JCO Global Oncology* 2020;6:414-38.
24. HSGM. Türkiye Kanser Kontrol Programı. Ankara: Sağlık Bakanlığı; 2021. 362-73 p.
25. Wolf AM, Fontham ET, Church TR, et al. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. *CA: a cancer journal for clinicians* 2018;68:250-81.
26. Ontario HQ. Colon capsule endoscopy for the detection of colorectal polyps: an evidence-based analysis. *Ontario health technology assessment series* 2015;15:1.
27. Potter NT, Hurban P, White MN, et al. Validation of a real-time PCR-based qualitative assay for the detection of methylated SEPT9 DNA in human plasma. *Clinical chemistry* 2014;60:1183-91.
28. Johnson DA, Barclay RL, Mergener K, et al. Plasma Septin9 versus fecal immunochemical testing for colorectal cancer screening: a prospective multicenter study. *PloS one* 2014;9:e98238.
29. A framework for human microbiome research. *nature* 2012;486:215-21.
30. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews* 2010.
31. Farmer N, Maki KA, Barb JJ, et al. Geographic social vulnerability is associated with the alpha diversity of the human microbiome. *mSystems* 2023:e01308-22.
32. The integrative human microbiome project. *Nature* 2019;569:641-8.
33. Browne HP, Shao Y, Lawley TD. Mother–infant transmission of human microbiota. *Current Opinion in Microbiology* 2022;69:102173.
34. Wang S, Ryan CA, Boyaval P, Dempsey EM, Ross RP, Stanton C. Maternal vertical transmission affecting early-life microbiota development. *Trends in microbiology* 2020;28:28-45.
35. Pantazi AC, Balasa AL, Mihai CM, et al. Development of Gut Microbiota in the First 1000 Days after Birth and Potential Interventions. *Nutrients* 2023;15:3647.
36. Ferretti P, Pasolli E, Tett A, et al. Mother-to-infant microbial transmission from different body sites shapes the developing infant gut microbiome. *Cell host & microbe* 2018;24:133-45. e5.
37. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology* 2007;5:e177.
38. Sprockett D, Fukami T, Relman DA. Role of priority effects in the early-life assembly of the gut microbiota. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2018;15:197-205.
39. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010;107:11971-5.
40. Rey-Mariño A, Francino MP. Nutrition, Gut Microbiota, and Allergy Development in Infants. *Nutrients* 2022;14:4316.

41. Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *The American journal of clinical nutrition* 2012;96:544-51.
42. Hou K, Wu Z-X, Chen X-Y, et al. Microbiota in health and diseases. *Signal transduction and targeted therapy* 2022;7:135.
43. Das B, Nair GB. Homeostasis and dysbiosis of the gut microbiome in health and disease. *Journal of biosciences* 2019;44:1-8.
44. Simpson HL, Campbell BJ. dietary fibre–microbiota interactions. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2015;42:158-79.
45. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, et al. The firmicutes/bacteroidetes ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients* 2020;12:1474.
46. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC microbiology* 2009;9:1-6.
47. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010;107:14691-6.
48. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome medicine* 2016;8:1-11.
49. Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* 2014;63:1913-20.
50. Francino M. Antibiotics and the human gut microbiome: dysbioses and accumulation of resistances. *Frontiers in microbiology* 2016;6:1543.
51. Iizumi T, Battaglia T, Ruiz V, Perez GIP. Gut microbiome and antibiotics. *Archives of medical research* 2017;48:727-34.
52. Romero R, Hassan SS, Gajer P, et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome* 2014;2:1-19.
53. Afzaal M, Saeed F, Shah YA, et al. Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. *Frontiers in microbiology* 2022;13:999001.
54. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *nature* 2010;464:59-65.
55. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms* 2019;7:14.
56. Oren A, Garrity GM. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2021;71:005056.
57. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *nature* 2011;473:174-80.
58. Steliou K, Boosalis MS, Perrine SP, Sangerman J, Faller DV. Butyrate histone deacetylase inhibitors. *BioResearch open access* 2012;1:192-8.
59. Rowland I, Gibson G, Heinken A, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European journal of nutrition* 2018;57:1-24.

60. Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature communications* 2014;5:3611.
61. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental microbiology* 2017;19:29-41.
62. Suarez F, Furne J, Springfield J, Levitt M. Insights into human colonic physiology obtained from the study of flatus composition. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 1997;272:G1028-G33.
63. Magnúsdóttir S, Ravcheev D, de Crécy-Lagard V, Thiele I. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes. *Frontiers in genetics* 2015;6:148.
64. Begley M, Gahan CG, Hill C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS microbiology reviews* 2005;29:625-51.
65. Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas M-E. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome medicine* 2016;8:1-12.
66. D'Amelio P, Sassi F. Gut microbiota, immune system, and bone. *Calcified tissue international* 2018;102:415-25.
67. Zeuthen LH, Fink LN, Frokiaer H. Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor- β . *Immunology* 2008;123:197-208.
68. Yanagibashi T, Hosono A, Oyama A, et al. Bacteroides induce higher IgA production than Lactobacillus by increasing activation-induced cytidine deaminase expression in B cells in murine Peyer's patches. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2009;73:372-7.
69. Mestecky J, Russell M, Elson C. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. *Gut* 1999;44:2-5.
70. He B, Xu W, Santini PA, et al. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A2 class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* 2007;26:812-26.
71. Peterson DA, McNulty NP, Guruge JL, Gordon JI. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell host & microbe* 2007;2:328-39.
72. Neal MD, Leaphart C, Levy R, et al. Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *The Journal of Immunology* 2006;176:3070-9.
73. Tanti J-F, Ceppo F, Jager J, Berthou F. Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Frontiers in endocrinology* 2013;3:41442.
74. Lotz M, Gütle D, Walther S, Ménard S, Bogdan C, Hornef MW. Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *The Journal of experimental medicine* 2006;203:973-84.
75. Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105:20858-63.
76. Sanz Y, Nadal I, Sánchez E. Probiotics as drugs against human gastrointestinal infections. *Recent patents on anti-infective drug discovery* 2007;2:148-56.

77. Li F, Wang M, Wang J, Li R, Zhang Y. Alterations to the gut microbiota and their correlation with inflammatory factors in chronic kidney disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2019;9:206.
78. Chung S, Barnes JL, Astroth KS. Gastrointestinal microbiota in patients with chronic kidney disease: a systematic review. *Advances in Nutrition* 2019;10:888-901.
79. Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. The human microbiota in health and disease. *Engineering* 2017;3:71-82.
80. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008;134:577-94.
81. Packey CD, Sartor RB. Commensal bacteria, traditional and opportunistic pathogens, dysbiosis and bacterial killing in inflammatory bowel diseases. *Current opinion in infectious diseases* 2009;22:292-301.
82. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105:16731-6.
83. Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of Helicobacter pylori. *Gastroenterology* 2007;133:659-72.
84. Moore W, Moore LH. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Applied and environmental microbiology* 1995;61:3202-7.
85. Scanlan PD, Shanahan F, Clune Y, et al. Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis. *Environmental microbiology* 2008;10:789-98.
86. Sekirov I, Finlay BB. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. *The Journal of physiology* 2009;587:4159-67.
87. Dai Z, Zhang J, Wu Q, et al. The role of microbiota in the development of colorectal cancer. *International journal of cancer* 2019;145:2032-41.
88. Sarangi AN, Goel A, Aggarwal R. Methods for studying gut microbiota: a primer for physicians. *Journal of clinical and experimental hepatology* 2019;9:62-73.
89. Gürsoy NC, Barış O. Mikrobiyota çalışmalarında moleküler tanı yöntemleri. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research* 2017;1:56-67.
90. Morozova O, Marra MA. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* 2008;92:255-64.
91. Vandeputte D, Tito RY, Vanleeuwen R, Falony G, Raes J. Practical considerations for large-scale gut microbiome studies. *FEMS microbiology reviews* 2017;41:S154-S67.
92. Szymanska E, Szymanska S, Dadalski M, Kierkus J. Biological markers of disease activity in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology Review/Przegląd Gastroenterologiczny* 2023;18:141-7.
93. Veres-Székely A, Szász C, Pap D, Szebeni B, Bokrossy P, Vannay Á. Zonulin as a Potential Therapeutic Target in Microbiota-Gut-Brain Axis Disorders: Encouraging Results and Emerging Questions. *International Journal of Molecular Sciences* 2023;24:7548.
94. Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *Journal of cell science* 2000;113:4435-40.

95. Fasano A, Not T, Wang W, et al. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *The Lancet* 2000;355:1518-9.
96. Tripathi A, Lammers KM, Goldblum S, et al. Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009;106:16799-804.
97. Fasano A. All disease begins in the (leaky) gut: role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases. *F1000Research* 2020;9.
98. Kushlinskii N, Gershtein E, Zybina N, et al. Blood Serum Zonulin in Colorectal Cancer, Autoimmune Bowel Diseases, and Irritable Bowel Syndrome. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2022;173:376-9.
99. Cheng Y, Ling Z, Li L. The intestinal microbiota and colorectal cancer. *Frontiers in immunology* 2020;11:615056.
100. Mignini I, Piccirilli G, Galasso L, et al. From the Colon to the Liver: How Gut Microbiota May Influence Colorectal Cancer Metastatic Potential. *Journal of Clinical Medicine* 2024;13:420.
101. Koliarakis I, Messaritakis I, Nikolouzakakis TK, Hamilos G, Souglakos J, Tsiaoussis J. Oral bacteria and intestinal dysbiosis in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences* 2019;20:4146.
102. Mori G, Rampelli S, Orena BS, et al. Shifts of faecal microbiota during sporadic colorectal carcinogenesis. *Scientific reports* 2018;8:10329.
103. Gao Z, Guo B, Gao R, Zhu Q, Qin H. Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Frontiers in microbiology* 2015;6:20.
104. He T, Cheng X, Xing C. The gut microbial diversity of colon cancer patients and the clinical significance. *Bioengineered* 2021;12:7046-60.
105. Sze MA, Schloss PD. Leveraging existing 16S rRNA gene surveys to identify reproducible biomarkers in individuals with colorectal tumors. *MBio* 2018;9:10.1128/mbio. 00630-18.
106. Stojanov S, Berlec A, Štrukelj B. The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms* 2020;8:1715.
107. Bamola VD, Kapardar R, Lal B, Sharma A, Chaudhry R. A metagenomic assessment of gut microbiota in Indian colon cancer patients. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 2022;18:96-102.
108. Yu J, Feng Q, Wong SH, et al. Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. *Gut* 2017;66:70-8.
109. Wang T, Cai G, Qiu Y, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *The ISME journal* 2012;6:320-9.
110. Zhao L, Cho WC, Nicolls MR. Colorectal cancer-associated microbiome patterns and signatures. *Frontiers in Genetics* 2021;12:787176.
111. 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.
112. Flynn KJ, Baxter NT, Schloss PD. Metabolic and community synergy of oral bacteria in colorectal cancer. *Msphere* 2016;1:10.1128/msphere. 00102-16.
113. Hibberd AA, Lyra A, Ouwehand AC, et al. Intestinal microbiota is altered in patients with colon cancer and modified by probiotic intervention. *BMJ open gastroenterology* 2017;4:e000145.

114. Sasaki K, Inoue J, Sasaki D, et al. Construction of a model culture system of human colonic microbiota to detect decreased Lachnospiraceae abundance and butyrogenesis in the feces of ulcerative colitis patients. *Biotechnology journal* 2019;14:1800555.
115. Sagheddu V, Patrone V, Miragoli F, Puglisi E, Morelli L. Infant early gut colonization by Lachnospiraceae: high frequency of Ruminococcus gnavus. *Frontiers in pediatrics* 2016;4:57.
116. Khodaverdi N, Zeighami H, Jalilvand A, Haghi F, Hesami N. High frequency of enterotoxigenic Bacteroides fragilis and Enterococcus faecalis in the paraffin-embedded tissues of Iranian colorectal cancer patients. *BMC cancer* 2021;21:1-7.
117. Artemev A, Naik S, Pougno A, Honnavar P, Shanbhag NM. The association of microbiome dysbiosis with colorectal cancer. *Cureus* 2022;14.
118. Liu X, Mao B, Gu J, et al. Blautia—a new functional genus with potential probiotic properties? *Gut microbes* 2021;13:1875796.
119. Nie K, Ma K, Luo W, et al. Roseburia intestinalis: a beneficial gut organism from the discoveries in genus and species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2021;11:757718.
120. Weir TL, Manter DK, Sheflin AM, Barnett BA, Heuberger AL, Ryan EP. Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults. *PloS one* 2013;8:e70803.
121. Sears CL, Pardoll DM. Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. *Journal of Infectious Diseases* 2011;203:306-11.
122. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver–passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nature Reviews Microbiology* 2012;10:575-82.
123. Abdullah M, Sukartini N, Nursyirwan SA, et al. Gut microbiota profiles in early-and late-onset colorectal cancer: a potential diagnostic biomarker in the future. *Digestion* 2021;102:823-32.
124. de Almeida CV, Taddei A, Amedei A. The controversial role of Enterococcus faecalis in colorectal cancer. *Therapeutic advances in gastroenterology* 2018;11:1756284818783606.
125. Hanchi H, Mottawea W, Sebei K, Hammami R. The genus Enterococcus: between probiotic potential and safety concerns—an update. *Frontiers in microbiology* 2018;9:1791.
126. Grenda A, Grenda T, Domaradzki P, Kwiatek K. Enterococci—involvement in pathogenesis and therapeutic potential in cancer treatment: a mini-review. *Pathogens* 2022;11:687.
127. Sivieri K, Spinardi-Barbisan A, Barbisan LF, et al. Probiotic Enterococcus faecium CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. *European Food Research and Technology* 2008;228:231-7.
128. Wegmann U, Louis P, Goesmann A, Henrissat B, Duncan SH, Flint HJ. Complete genome of a new Firmicutes species belonging to the dominant human colonic microbiota (‘Ruminococcus bicirculans’) reveals two chromosomes and a selective capacity to utilize plant glucans. *Environmental microbiology* 2014;16:2879-90.
129. Zhao S-S, Chen L, Yang J, et al. Altered gut microbial profile accompanied by abnormal fatty acid metabolism activity exacerbates endometrial cancer progression. *Microbiology Spectrum* 2022;10:e02612-22.

130. Li X, Yi Y, Wu T, et al. Integrated microbiome and metabolome analysis reveals the interaction between intestinal flora and serum metabolites as potential biomarkers in hepatocellular carcinoma patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2023;13:1170748.
131. Du X, Li Q, Tang Z, et al. Alterations of the gut microbiome and fecal metabolome in colorectal cancer: Implication of intestinal metabolism for tumorigenesis. *Frontiers in Physiology* 2022;13:854545.
132. Wu Y, Zhuang J, Zhang Q, et al. Aging characteristics of colorectal cancer based on gut microbiota. *Cancer Medicine* 2023;12:17822-34.
133. Oris P. *Prevotella Oris*.
134. Sato T, Kamaguchi A, Nakazawa F. Purification and characterization of hemolysin from *Prevotella oris*. *Journal of Oral Biosciences* 2012;54:113-8.
135. Parker BJ, Wearsch PA, Veloo AC, Rodriguez-Palacios A. The genus *Alistipes*: gut bacteria with emerging implications to inflammation, cancer, and mental health. *Frontiers in immunology* 2020;11:906.
136. Moschen AR, Gerner RR, Wang J, et al. Lipocalin 2 protects from inflammation and tumorigenesis associated with gut microbiota alterations. *Cell host & microbe* 2016;19:455-69.
137. Baxter NT, Zackular JP, Chen GY, Schloss PD. Structure of the gut microbiome following colonization with human feces determines colonic tumor burden. *Microbiome* 2014;2:1-11.
138. Wang F, Cai K, Xiao Q, He L, Xie L, Liu Z. *Akkermansia muciniphila* administration exacerbated the development of colitis-associated colorectal cancer in mice. *Journal of Cancer* 2022;13:124.
139. Gu Z-Y, Pei W-L, Zhang Y, Zhu J, Li L, Zhang Z. *Akkermansia muciniphila* in inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Chinese Medical Journal* 2021;134:2841-3.
140. Fan S, Jiang Z, Zhang Z, Xing J, Wang D, Tang D. *Akkermansia muciniphila*: a potential booster to improve the effectiveness of cancer immunotherapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2023;149:13477-94.
141. Dingemanse C, Belzer C, van Hijum SA, et al. *Akkermansia muciniphila* and *Helicobacter typhlonius* modulate intestinal tumor development in mice. *Carcinogenesis* 2015;36:1388-96.
142. Buc E, Dubois D, Sauvanet P, et al. High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. *PloS one* 2013;8:e56964.
143. Bonnet M, Buc E, Sauvanet P, et al. Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clinical Cancer Research* 2014;20:859-67.
144. Dougherty MW, Jobin C. Intestinal bacteria and colorectal cancer: etiology and treatment. *Gut Microbes* 2023;15:2185028.
145. Cheng WT, Kantilal HK, Davamani F. The mechanism of *Bacteroides fragilis* toxin contributes to colon cancer formation. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS* 2020;27:9.
146. Qu R, Zhang Y, Ma Y, et al. Role of the Gut Microbiota and Its Metabolites in Tumorigenesis or Development of Colorectal Cancer. *Advanced Science* 2023;2205563.
147. Périchon B, Lichtl-Häfele J, Bergsten E, et al. Detection of *Streptococcus gallolyticus* and four other *crc*-associated bacteria in patient stools reveals a potential “driver” role for enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2022;12:186.

148. Shang F-M, Liu H-L. *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: A review. *World journal of gastrointestinal oncology* 2018;10:71.
149. Jiang Y, Huang Y, Hu Y, et al. Banxia Xiexin Decoction delays colitis-to-cancer transition by inhibiting E-cadherin/ β -catenin pathway via *Fusobacterium nucleatum* FadA. *Journal of Ethnopharmacology* 2024;117932.
150. Serek P, Oleksy-Wawrzyniak M. The effect of bacterial infections, probiotics and zonulin on intestinal barrier integrity. *International Journal of Molecular Sciences* 2021;22:11359.
151. Liu Z-H, Huang M-J, Zhang X-W, et al. The effects of perioperative probiotic treatment on serum zonulin concentration and subsequent postoperative infectious complications after colorectal cancer surgery: a double-center and double-blind randomized clinical trial. *The American journal of clinical nutrition* 2013;97:117-26.
152. Citronberg JS, Wilkens LR, Le Marchand L, et al. Plasma lipopolysaccharide-binding protein and colorectal cancer risk: a nested case–control study in the multiethnic cohort. *Cancer Causes & Control* 2018;29:115-23.
153. Fuke N, Yamashita T, Shimizu S, et al. Association of Plasma Lipopolysaccharide-Binding Protein Concentration with Dietary Factors, Gut Microbiota, and Health Status in the Japanese General Adult Population: A Cross-Sectional Study. *Metabolites* 2023;13:250.
154. Den Besten G, Van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud D-J, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research* 2013;54:2325-40.
155. Ryu TY, Kim K, Han T-S, et al. Human gut-microbiome-derived propionate coordinates proteasomal degradation via HECTD2 upregulation to target EHMT2 in colorectal cancer. *The ISME Journal* 2022;16:1205-21.
156. Fang Y, Yan C, Zhao Q, et al. The roles of microbial products in the development of colorectal cancer: a review. *Bioengineered* 2021;12:720-35.
157. Blakeney BA, Crowe MS, Mahavadi S, Murthy KS, Grider JR. Branched short-chain fatty acid isovaleric acid causes colonic smooth muscle relaxation via cAMP/PKA pathway. *Digestive diseases and sciences* 2019;64:1171-81.
158. Chen J, Tang J, Wang H, et al. Isobutyric acid promotes colorectal cancer metastasis through activating RACK1. *Cancer Science* 2023;114:3900-13.
159. Chen H-M, Yu Y-N, Wang J-L, et al. Decreased dietary fiber intake and structural alteration of gut microbiota in patients with advanced colorectal adenoma. *The American of Clinical Nutrition* 2013;97:1044-52.
160. Mirzaei R, Afaghi A, Babakhani S, et al. Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in cancer development and prevention. *Biomedicine & pharmacotherapy* 2021;139:111619.
161. Niccolai E, Baldi S, Ricci F, et al. Evaluation and comparison of short chain fatty acids composition in gut diseases. *World journal of gastroenterology* 2019;25:5543.

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

Kolorektal Kanserde Bağırsak Mikrobiyotası ile Mikrobiyota Fermantasyon Ürünü Gaita Kısa Zincirli Yağ Asitlerinin Rolünün İncelenmesi ve Tanıda Kullanılabilecek Olası Biyobelirteçlerin Araştırılması

Esra SAYLAM

Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü

Uzmanlık Tezi/Konya, 2024

Kolorektal kanser (KRK), tüm dünyada en sık görülen kanserlerden biridir ve önemli bir küresel sağlık sorunudur. Özellikle genç nüfusta (<50 yaş) KRK insidans ve mortalitesi artmaktadır. Bu nedenle KRK'nın erken tespiti ve önlenmesi için yeni stratejilere acilen ihtiyaç vardır. İnsan bağırsak mikrobiyotası, bakteri, virüs, mantar ve protozoalar gibi çok sayıda mikroorganizmayı barındıran karmaşık bir ekosistemdir. Bağırsak mikrobiyotasındaki disbiyoz, konakçının fizyolojik koşullarını değiştirerek çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. KRK'nın çevresel risk faktörleri arasında bağırsak mikrobiyotası önemli bir role sahiptir. Artan kanıtlar bağırsak mikrobiyotasının, KRK patogeneğinde rol oynadığını göstermektedir. Bu çalışmada, sağlıklı kontroller ile yeni tanı alan KRK hastalarının bağırsak mikrobiyota profilleri, kısa zincirli yağ asitleri, zonulin ve lipopolisakkarit bağlayıcı protein düzeyleri analiz edilerek KRK ile bağırsak mikrobiyotası arasındaki ilişkinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Polikliniğinde, Mart 2023-Aralık 2023 tarihleri arasında yeni tanı 16 KRK hastası ve aynı polikliniğe başvurup KRK taramasında negatif çıkan 16 sağlıklı birey dahil edildi. Mikrobiyota analizi için öncelikle Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Zymo Research, USA) kullanılarak gaita örneklerine DNA izolasyonu yapıldı. Sekanslama işlemi için MinION (Oxford Nanopore, UK) cihazı kullanıldı. Guppy yazılımı ve Python programlama dili kullanılarak veriler işlendi. LBP ve zonulin serum düzeyleri analizi için Elabscience ticari ELISA kiti kullanıldı. Gaitadan kısa zincirli yağ asitleri analizi için alev iyonizasyon detektörü ve DB-FFAP kolonu ile donatılmış GC-MS/MS (Agilent 8860 serisi, USA) cihazı kullanıldı.

Çalışma gruplarının yaş ve cinsiyet dağılımları benzer seçildi. Shannon ve Simpson indekslerine göre bağırsak mikrobiyal alfa çeşitliliği KRK hastalarında düşük saptanırken iki grubun mikrobiyal dağılımları beta çeşitlilik açısından anlamlı derecede farklı bulundu. KRK hastalarında filum düzeyinde *Bacteroidota* düşük saptanırken, sınıf düzeyinde *Clostridia*, *Bacteroidia* ve *Negativicutes* düşük saptandı. Aile düzeyinde KRK hastalarında *Lachnospiraceae* düşük, *Enterococcaceae* yüksek saptandı. Cins düzeyinde ise KRK hastalarında *Enterococcus* yüksek, *Roseburia*, *Lachnoclostridium* ve *Blautia* düşük saptandı. Tür düzeyinde, *Enterococcus faecium*, *Ruminococcus bicirculans*, *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Segatella oris* ve *Alistipes senegalensis* KRK hastalarında daha yüksek saptandı. Olası biyobelirteç adayları olarak, *Enterococcus faecium*, *Ruminococcus bicirculans*, *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Segatella oris* ve *Akkermansia muciniphila* türleri saptandı. Serum zonulin düzeyleri KRK hastalarında daha yüksek saptandı.

Bağırsak mikrobiyotası ile KRK arasında oldukça önemli bir ilişki mevcuttur. Bu ilişkinin multifaktöriyel olarak değerlendirilmesi, KRK'da olası biyobelirteç tanımlama ve yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilme çalışmalarına ışık tutabilir.

Anahtar sözcükler: Kolorektal Kanser, Biyobelirteç, Metagenom, Mikrobiyota, Zonulin

SUMMARY

Investigation of the Role of Intestinal Microbiota and Microbiota Fermentation Product Short-Chain Fatty Acids in Colorectal Cancer and Determination of Possible Biomarkers for Diagnosis

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers worldwide and is a significant global health issue. Particularly in the young population (<50 years old), the incidence and mortality of CRC are increasing. Therefore, there is an urgent need for new strategies for the early detection and prevention of CRC. The human gut microbiota is a complex ecosystem that harbors numerous microorganisms, including bacteria, viruses, fungi, and protozoa. Dysbiosis in the gut microbiota alters the physiological conditions of the host, leading to various diseases. Among the environmental risk factors for CRC, the gut microbiota plays a significant role. Increasing evidence indicates that the gut microbiota is involved in CRC pathogenesis. In this study, the gut microbiota profiles, short-chain fatty acids, zonulin, and lipopolysaccharide-binding protein levels of newly diagnosed CRC patients were analyzed along with healthy controls to elucidate the relationship between CRC and the gut microbiota.

The study included 16 newly diagnosed CRC patients and 16 healthy individuals who tested negative for CRC screening, all of whom were admitted to the General Surgery Outpatient Clinic at Selçuk University Faculty of Medicine between March 2023 and December 2023. For microbiota analysis, DNA isolation from stool samples was initially performed using the Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Zymo Research, USA). The MinION device (Oxford Nanopore, UK) was used for sequencing. Data processing was carried out using Guppy software and the Python programming language. Commercial ELISA kits from Elabscience were used for the analysis of LBP and zonulin serum levels. For the analysis of short-chain fatty acids from stool samples, a gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) system equipped with a flame ionization detector and a DB-FFAP column (Agilent 8860 series, USA) was employed.

The age and gender distributions of the study groups were selected to be similar. Intestinal microbial alpha diversity was found to be lower in CRC patients according to the Shannon and Simpson indices, while the microbial distributions of the two groups were significantly different in terms of beta diversity. At the phylum level, *Bacteroidota* was found to be lower in CRC patients, while at the class level, *Clostridia*, *Bacteroidia*, and *Negativicutes* were found to be lower. At the family level, *Lachnospiraceae* was lower and *Enterococcaceae* higher in CRC patients. At the genus level, *Enterococcus* was higher, while *Roseburia*, *Lachnoclostridium*, and *Blautia* were lower in CRC patients. At the species level, *Enterococcus faecium*, *Ruminococcus bicirculans*, *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Segatella oris*, and *Alistipes senegalensis* were found to be higher in CRC patients. Possible biomarker candidates identified include *Enterococcus faecium*, *Ruminococcus bicirculans*, *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Segatella oris*, and *Akkermansia muciniphila* species. Serum zonulin levels were higher in CRC patients.

There is a significant relationship between the gut microbiota and CRC. Evaluating this relationship multifactorially may shed light on biomarker identification in CRC and the development of new treatment options.

Keywords: Biomarker, Colorectal Cancer, Metagenome, Microbiota, Zonulin

EKLER

EK- A: ETİK KURUL KARARI

Evrak Tarih ve Sayısı: 15.02.2023-E.465196



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2023/04

Toplantı Tarihi :14.02.2023

Karar Sayısı 2023/104 S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Salih MAÇIN'ın "Kolorektal Kanserde Bağırsak Mikrobiyotası ile Mikrobiyota Fermantasyon Ürünü Gaita Kısa Zincirli Yağ Asitlerinin Rolünün İncelenmesi ve Tanıda Kullanılabilecek Olası Biyobelirteçlerin Araştırılması" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 07.02.2023 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Doç. Dr. Salih MAÇIN'ın "Kolorektal Kanserde Bağırsak Mikrobiyotası ile Mikrobiyota Fermantasyon Ürünü Gaita Kısa Zincirli Yağ Asitlerinin Rolünün İncelenmesi ve Tanıda Kullanılabilecek Olası Biyobelirteçlerin Araştırılması" adlı araştırmasının kabulüne oy birliği ile karar verildi.

Yardımcı Araştırmacılar: Esra SAYLAM, Uğur ARSLAN, Nurullah ÇİFTÇİ, Ruyiyya SAMADZADE, Fatma Hümeysra YERLİKAYA AYDEMİR, Abdullah SİVRİKAYA, Serdar YORMAZ, Mustafa TOPKAFA.

NOT: 3359 sayılı Sağlık Hizmetleri Temel Kanunu Ek 10.madde hükümleri uyarınca; bazı çalışmalar için etik kurul onayı alındıktan sonra, Sağlık Bakanlığı veya bağlı kuruluşlarından (çalışmanın yapılacağı kurum) izin alınması zorunlu olduğundan araştırmacıların bu hususa dikkat etmeleri gerekmektedir.