



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**ÜLSERATİF KOLİT HASTALIĞINDA
FUSOBACTERIUM NUCLEATUM MİKTARININ
TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR (TNF) ALFA TEDAVİSİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Bilge ŞENYÜZ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**ÜLSERATİF KOLİT HASTALIĞINDA
FUSOBACTERIUM NUCLEATUM MİKTARININ
TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR (TNF) ALFA TEDAVİSİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bilge ŞENYÜZ

Danışman
Doç. Dr. Sunde Yılmaz Süslüer

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Programı

İzmir
2023

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül DALMIZRAK

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

1. Önsöz

“Dünyada her şey için, maddiyat için, maneviyat için, hayat için, başarı için en hakiki yol gösterici ilimdir, fendir. İlim ve fennin haricinde yol gösterici aramak gaflettir, cehalettir, sapkınlıktır.”

Mustafa Kemal Atatürk

Bilimin ve Mustafa Kemal Atatürk’ün yolundan ayrılmamanız dileğiyle.

İzmir, 24.07.2023

Bilge ŞENYÜZ



2. Özet

Ülseratif Kolit Hastalığında *Fusobacterium nucleatum* Miktarının Tümör

Nekroz Faktör (TNF) Alfa Tedavisi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması

İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH), gastrointestinal sistemde kronik inflamasyona sebep olan bir hastalıktır. İBH' nin iki ana formu, crohn hastalığı (CH) ve ülseratif kolit (ÜK) olarak bilinir. İBH' nin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte genetik yatkınlık, sigara kullanımı, düzensiz mikrobiyota gibi çeşitli faktörlerin hastalığı tetikleyebileceği bilinmektedir. İBH, sadece Batı dünyasında değil, Orta Doğu, Asya ve Güney Amerika gibi yeni sanayileşmiş ülkelerde de artış göstermektedir.

İBH' nin patofizyolojisinin, genetik ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık etkileşimlerden, bağışıklık sistemi tepkilerindeki düzensizliklerden ve bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ülseratif kolit, kolonda sürekli olarak mukozal inflamasyonla karakterizedir, Crohn hastalığı ise gastrointestinal sistemdeki bölümlerden herhangi birini etkileyebilen enflamasyona neden olabilir.

İBH tedavisinde, antiinflamatuvar ilaçlar, immünosupresif ilaçlar, steroidler ve TNF antagonistleri gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Anti-TNF ajanları, İBH hastalarında inflamasyonun azaltılmasında etkilidir. TNF- α , İBH' nin patogenezinde merkezi bir rol oynayan bir sitokindir ve anti-TNF tedavisi İBH hastalarında etkili olabilmektedir.

İnsan bağırsak mikrobiyotası, İBH' nin patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. İBH hastalarında, sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında mikrobiyotanın dengesinde değişiklikler ve azalmış biyoçeşitlilik gözlenmektedir. *F. nucleatum*, insanda ağız ve bağırsakta ortak bulunan bir bakteridir. Patojenik potansiyeline göre İBH gelişiminde görev aldığı bilinen fırsatçı bir patojendir. ÜK' li dokulardan elde edilen *F. nucleatum* suşu, insanda kolon epiteline yapışarak kolonu istila edebilir ve TNF- α sitokin ifadesini arttırabilir.

Çalışmanın amacı; Bu proje, İBH ile bu bakteri türü arasındaki ilişkiyi ve hastalık aktivitesi ile ilişkisini sorgulamayı hedeflemektedir. Aynı zamanda ÜK ile ilişkilendirilen *F. nucleatum*' un TNF faktörüyle birlikte hastalığın seyrindeki öneminin belirlenmesi ve ÜK' deki hastalık aktivitesine ışık tutulması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem; Çalışmada ÜK teşhisi ile biyopsi yapılan hasta dokularından izole edilen DNA ve RNA örneklerinden *F. nucleatum* yoğunluğu ve TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri RT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir.

Bulgular; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *F. nucleatum* yoğunluğu hastalarda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Anti TNF tedavisinde remisyona giren ve tedaviye cevap vermeyen hasta grubu kendi aralarında karşılaştırıldıklarında *F. nucleatum* yoğunluğu tedaviye cevap vermeyen hasta grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Her iki hasta grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Remisyona giren ve tedaviye cevap vermeyen hasta grubu kendi aralarında karşılaştırıldığında TNF- α mRNA ekspresyon seviyelerinde artış bulunmuştur ancak anlamlı değildir.

Sonuç olarak; *Fusobacterium nucleatum*, ülseratif kolit hastalarının bağırsak dokularında artmış düzeyde bulunur. Ülseratif kolit hastalığının kontrol edilmesi için *F. nucleatum* ve TNF- α ile ilişkili yolların ölçülmesi ve hedeflenmesi, aynı zamanda ülseratif kolit tedavisi için yeni yaklaşımların geliştirilmesine olanak sağlayabilir. Bu mikroorganizma, bağırsak inflamasyonu ve hastalığın tedavisi üzerinde etkili olabilir. *F. nucleatum*' un bağırsakta artış göstermesi, hastalığın şiddetiyle ilişkilendirilebilir ve bu nedenle hedeflenmesi potansiyel bir terapötik strateji olabilir. *F. nucleatum* ve TNF- α ' yı hedefleyen ilaçlar veya tedaviler, ülseratif kolitin semptomlarının azaltılmasına, bağırsak inflamasyonunun kontrol altına alınmasına ve hastalığın ilerlemesinin durdurulmasına yardımcı olabilir. Bu nedenle, *F. nucleatum* ve ilişkili yollarının araştırılması, ülseratif kolitin daha iyi anlaşılması ve daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için önemlidir.

Anahtar Kelimeler; Ülseratif Kolit, TNF- α , *Fusobacterium nucleatum*, İnflamatuar Bağırsak Hastalığı

3. Abstract

Investigating the Effects of *Fusobacterium nucleatum* Levels on Tumor Necrosis Factor (TNF) Alpha Therapy in Ulcerative Colitis Disease

Introduction: Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic inflammatory conditions affecting the gastrointestinal system. The two main forms of IBD are known as Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). Although the exact cause of IBD is not fully understood, it is known that various factors such as genetic predisposition, smoking, and disrupted microbiota can trigger the disease. The incidence of IBD is increasing not only in the Western world but also in newly industrialized countries such as the Middle East, Asia, and South America.

The pathophysiology of IBD is believed to arise from complex interactions between genetic and environmental factors, dysregulation of immune system responses, and alterations in the gut microbiota. Ulcerative colitis is characterized by continuous mucosal inflammation in the colon, while Crohn's disease can cause transmural inflammation that can affect any part of the gastrointestinal system.

In the treatment of IBD, medications such as anti-inflammatory drugs, immunosuppressants, steroids, and TNF antagonists are used. Anti-TNF agents are effective in reducing inflammation in IBD patients. TNF-alpha is a cytokine that plays a central role in the pathogenesis of IBD, and anti-TNF therapy can be effective in IBD patients.

The human gut microbiota plays a significant role in the pathogenesis of IBD. In IBD patients, alterations in the microbiota's balance and decreased biodiversity compared to healthy individuals are observed. *F. nucleatum* forms a common bacterial group in the human oral and intestinal microbiota and is a recognized opportunistic pathogen implicated in IBD due to its pathogenic potential. It has been shown that *F. nucleatum* isolates from UC patients can adhere to and invade human colonic epithelial cells and increase TNF-alpha cytokine expression.

The aim of this study is to investigate the relationship between this bacterial species and IBD and its association with disease activity. Additionally, the importance of *F. nucleatum* associated with UC in conjunction with the TNF factor and its impact on the course of the disease will be determined, shedding light on disease activity in UC.

Materials and Methods: The density of *F. nucleatum* and the expression levels of TNF-alpha mRNA were determined using RT-PCR in DNA and RNA samples isolated from biopsy tissues of patients diagnosed with UC.

Results: The density of *F. nucleatum* was found to be significantly higher in patients compared to the control group. When comparing the group of patients who achieved remission and the group that did not respond to treatment, the density of *F. nucleatum* was significantly higher in the non-responsive group. Both patient groups showed significantly higher TNF-alpha mRNA expression levels compared to the control group. Although an increase in TNF-alpha mRNA expression levels was observed when comparing the group achieving remission and the non-responsive group, it was not statistically significant.

Conclusion, *Fusobacterium nucleatum* is increased in the intestinal tissues of ulcerative colitis patients. Measuring and targeting *F. nucleatum* and its associated pathways may provide new approaches for controlling ulcerative colitis and developing novel treatment strategies. This microorganism may have a significant impact on intestinal inflammation and the treatment of the disease. The increased presence of *F. nucleatum* in the intestine may be associated with the severity of the disease, making it a potential therapeutic target. Drugs or treatments targeting *F. nucleatum* and TNF-alpha can help reduce the symptoms of ulcerative colitis, control intestinal inflammation, and halt disease progression. Therefore, investigating *F. nucleatum* and its associated pathways is crucial for better understanding of ulcerative colitis and the development

Keywords; Ulcerative Colitis, TNF- α , *Fusobacterium nucleatum*, Inflammatory Bowel Disease

4. İçindekiler

1. Önsöz.....	II
2. Özet.....	III
3. Abstract.....	V
4. İçindekiler	VII
5. Tablolar Dizini.....	IX
6. Şekiller Dizini	X
7. Kısaltma Listesi	XI
1. Giriş	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	2
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	2
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	2
1.6. Araştırmanın Amacı	2
2. Genel Bilgiler	4
2.1. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları.....	4
2.2. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı Epidemiyolojisi	4
2.2.1. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı Patogenezi.....	5
2.2.2. Crohn Hastalığı	5
2.2.3. Ülseratif Kolit	5
2.2.3.1. Ülseratif Kolit Patofizyolojisi.....	6
2.2.3.2. Ülseratif Kolit Tedavi Yöntemleri.....	7
2.2.3.3. Anti-TNF.....	7
2.2.4. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı ve Mikrobiyota.....	8
2.2.4.1. <i>Fusobacterium nucleatum</i> (<i>F. nucleatum</i>)	9
3. Gereç ve Yöntem	10
3.1. Araştırma Evreni ve Örneklem	10
3.2. Araştırmanın Değişkenleri.....	10
3.3. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	11
3.4. Veri toplama Araçları ve Uygulamaları	11
3.5. Veri analizi.....	11
3.6. Araştırma etiği.....	12

3.7. Olgu Grubu.....	12
3.8. Total DNA Ekstraksiyonu	13
3.9. Total RNA İzolasyonu	16
3.10. DNA ve RNA Miktar ve Saflık Ölçümü.....	19
3.11. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	19
3.12. <i>Fusobacterium nucleatum</i> RT-PCR Analizi.....	20
3.13. TNF Alfa cevaplılığı /cevapsızlığının <i>F. nucleatum</i> üzerindeki ekspresyonlarının qRT-PCR analizi	22
3.14. İstatistiksel Analiz	24
4. Bulgular.....	25
4.1. Olguların Demografik Dağılımları.....	25
4.2. <i>Fusobacterium nucleatum</i> Yoğunluğu	28
4.3. TNF- α mRNA Düzeyleri.....	30
4.4. Korelasyon Analizi.....	33
5. Tartışma	35
6. Sonuç ve Öneriler.....	42
7. Kaynaklar	43
8. Ekler	50
9. Teşekkür	55
10. Özgeçmiş	56

5. Tablolar Dizini

Tablo 1. Ülseratif kolit ve crohn hastalığı karşılaştırması	4
Tablo 2. Olgu ve kontrol grubu dışlama kriterleri	13
Tablo 3. Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu bileşenleri	19
Tablo 4. Reverse- transkripsiyon reaksiyon bileşenleri	20
Tablo 5. PCR reaksiyon bileşenleri.....	21
Tablo 6. PCR reaksiyon koşulları	21
Tablo 7. PCR reaksiyon bileşenleri.....	23
Tablo 8. PCR reaksiyon koşulları	23
Tablo 9. Olgu grubu cinsiyet dağılımı	27
Tablo 10. <i>F. nucleatum</i> Yoğunluğu	28
Tablo 11. TNF- alfa mRNA ekspresyon düzeyleri	31

6. Şekiller Dizini

Şekil 1. Kolon tutulum derecesine göre ülseratif kolit (Ungaro vd., 2017)	6
Şekil 2. Ülseratif kolit patofizyolojisi (Kobayashi vd., 2020)	7
Şekil 3. DNA izolasyonu aşamaları	15
Şekil 4. Total RNA izolasyonu aşamaları	18
Şekil 5. LightCycler 480 (Roche) cihazı ile gerçekleştirilen RT-PCR analiz görüntüsü	22
Şekil 6. TNF-alfa tedavisine yanıt veren hasta grubunun cinsiyet dağılım grafiği....	25
Şekil 7. TNF-alfa tedavisine yanıt vermeyen hasta grubunun cinsiyet dağılım grafiği	26
Şekil 8. Kontrol grubunun cinsiyet dağılım grafiği	26
Şekil 9. Cevaplı ve cevapsız hasta grubunun yaş ortalaması grafiği	27
Şekil 10. TNF- α tedavisine cevap veren, TNF- α tedavisine cevap vermeyen ve kontrol grubunun <i>F. nucleatum</i> DNA miktarlarının karşılaştırılması (***: 0,0002, **: 0,0028, ns: “non-significant”)	29
Şekil 11. <i>F. nucleatum</i> ısı haritası	30
Şekil 12. TNF- α tedavisine cevap veren, TNF- α tedavisine cevap vermeyen ve kontrol grubunun TNF- α mRNA ekspresyon profillerinin karşılaştırılması (****: anlamlı, ns: non-significant)	31
Şekil 13. TNF- ısı haritası	32
Şekil 14. TNF- α tedavisine cevap veren hasta grubunun <i>F. nucleatum</i> yoğunluğu ve TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri korelasyon analizi	33
Şekil 15. TNF- α tedavisine cevap vermeyen hasta grubunun <i>F. nucleatum</i> yoğunluğu ve TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri korelasyon analizi.....	34

7. Kısaltma Listesi

İBH	: İnflamatuvar bağırsak hastalığı
CH	: Crohn hastalığı
ÜK	: Ülseratif kolit
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
APC	: Antijen sunan hücreleri
IL	: İnterlökin
TH1	: Tip 1 T helper
Treg	: Düzenleyici T
TH9	: IL-9 üreten T helper
NK	: Doğal öldürücü
FFPE	: Formalinle fikse edilmiş parafine gömülü
IEC	: Bağırsak epitelyal hücre
LPS	: Lipopolisakkarid
CQ	: Klorokin
3-MA	: 3-metiladenin
DSS	: Dekstran sülfat sodyum
IL-1 β	: İnterlökin bir-beta
KRK	: Kolorektal kanser
IBS	: İrritabl bağırsak sendromu
PBS	: Fosfat tamponlu salin

DAI	: Hastalık aktivite indeksleri
RIPK1	: Reseptör etkileşen protein kinaz 1
RIPK3	: Reseptör etkileşen protein kinaz 3
Nec-1	: Necrostatin-1



1. Giriş

İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH), gastrointestinal sistemdeki kronik inflamasyona sebep olan bir grup bağırsak bozukluğudur. Bu hastalıkta Ülseratif Kolit (ÜK) ve Crohn Hastalığı (CH) alt tiplerdir. İBH, otoinflamatuvar bir hastalık olup relaps ve remisyon dönemleriyle seyredir. Mikrobiyal dengeyi sağlayan bağırsak bakterilerindeki değişikliklerin İBH' ın ortaya çıkmasında rol oynadığı düşünülmektedir. *Fusobacterium nucleatum*, anaerobik ve gram-negatif bir bakteri türü olup insan ağız ve bağırsaklarında bulunan bir fırsatçı patojendir. Bu bakteri İBH' nin patogeneğinde rol oynayabilir. İBH' nin doğal seyrini değiştirmek, komplikasyonları önlemek için gereklidir. ÜK' nin inflamatuvar ve şiddetli formlarında, Tümör Nekroz Faktörü alfa (TNF- α) sitokin üretimi önemlidir. İnflamatuvar sitokinler hedef alınarak bağırsak içinde etkileşim halinde olan bakteri grupları tanımlanabilir ve bu yolaktaki aktivite düzenlenebilir. ÜK' li dokulardan izole edilen *F. nucleatum*' un patojenik suşlarının, kolon epiteline yapıştığı, kolon epitel hücrelerine istila ettiği ve TNF- α sitokin ekspresyonunun artmasına sebep olduğu gösterilmiştir. Bu proje, İBH ile bu bakteri türü arasındaki ilişkiyi ve hastalık aktivitesi ile ilişkisini sorgulamayı hedeflemektedir. Aynı zamanda, kültüre edilen normal kolon hücre hatlarına *F. nucleatum* uygulanarak bu bakterinin TNF üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. ÜK ile ilişkilendirilen *F. nucleatum*' un TNF faktörüyle birlikte hastalığın seyrindeki öneminin belirlenmesi ve ÜK' deki hastalık aktivitesine ışık tutulması amaçlanmıştır.

1.1. Araştırmanın Problemi

Ülseratif kolitle ilişkilendirilen *F. nucleatum*' un TNF faktörüyle birlikte hastalığın seyrindeki öneminin ne olduğu tam olarak bilinmemektedir. Bu durumun aydınlatılması için *F. nucleatum* yoğunluğu ve TNF-alfa ekspresyon seviyelerinin korelasyon gösterip göstermediği belirlenmeye çalışılmıştır.

1.2. Araştırmanın Sorusu

Ülseratif kolitle ilişkilendirilen *F. nucleatum*' un TNF faktörüyle birlikte hastalığın seyrindeki öneminin ne olduğu ve tedaviye verilen yanıtların nedenlerini *F. nucleatum*' un TNF faktörüyle birlikte etkileyip etkilemediği sorularına yanıt aranmıştır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH), çevresel faktörlerin etkisiyle genetik yatkınlığı olan bireylerde ortaya çıkan bir bağırsak bozukluğudur. Ülseratif kolit ise bağırsağın iltihaplanmasıyla kendini gösteren bir İBH türüdür. *F. nucleatum*, bağırsakta yaşayan bir fırsatçı patojendir. Yapılan çalışmalarda, ülseratif kolit hastalarından izole edilen *F. nucleatum*' un, bağırsak hücrelerine yapıştığı, istila ettiği ve iltihaplanmayı artırdığı görülmüştür. İBH' nin patogenezi, pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler arasındaki dengenin bozulmasıyla ilişkilidir. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), inflamatuvar bağırsak hastalıklarında önemli bir rol oynar. Elde edilen sonuçlar, ülseratif kolitle ilişkilendirilen *F. nucleatum*' un TNF faktörüyle birlikte hastalığın seyrindeki önemini ve tedaviye verilen yanıtların nedenlerini aydınlatmamıza yardımcı olacak, inflamatuvar bağırsak hastalıklarının tedavisine yanıt veya yanısızlık nedenlerini anlamamızı sağlayacak ve klinik uygulamalara ışık tutacak veriler sunacaktır.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

F. nucleatum' un miktarı ve TNF- α ekspresyon seviyelerindeki artış ülseratif kolit tedavisine yanıt oluşturma durumunda etkilidir.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmaya sadece ülseratif kolit tanısı almış hastalar dahil edilecektir.

1.6. Araştırmanın Amacı

Güncel literatür ışığında inflamatuvar bir hastalık olan ülseratif kolitin, bağırsak içerisinde yer alan *Fusobakterium nucleatum* ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir. İn vitro ve in vivo deneylerde TNF- α miktarı ile ilişkisi çalışılmıştır.

Sunulan bu tez projesi ile beraber; karmaşık, inatçı, remisyon gösteren ve/veya nükseden bir kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı olan ülseratif kolitin, hasta örnekleri ile çalışılması ve anti-TNF tedavisine yanıt veren ve yanıt vermeyen hasta grupları ve sağlıklı kontrol grubunun *F. nucleatum* ile ilişkisi bakımından karşılaştırılması planlanmıştır. Bu hastalığın gidişatındaki ve tedavinin seyri bakımından rollerinin anlaşılması ve tedavi hususunda yeni yaklaşım sunulması projenin amaçlarından biridir.

Elde edilen sonuçların ışığında inflamatuvar bağırsak hastalıklarının tedaviye yanıt veya yanıtızlığının nedenini sorgulamak ve kliniğe ışık tutan veriler saptamak hedeflenmiştir.

Bu proje ile ülseratif kolit ile ilişkilendirilen *F. nucleatum*' un TNF- α ile birlikte ÜK' nin seyrindeki öneminin ortaya çıkartılması ve tedavi yanıtına olumlu ve olumsuz cevabın nedenlerine ışık tutması projenin diğer amacını oluşturmaktadır.



2. Genel Bilgiler

2.1. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları

İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH), kronik inflamasyon ile karakterize edilen bir gastrointestinal sistem hastalığıdır (Hodson, 2016). Genetik yatkınlık, sigara kullanımı, düzensiz mikrobiyota gibi çeşitli sebeplerin hastalığı tetiklediği bilinmesine rağmen asıl nedeni hala tam olarak bilinmemektedir (Ananthakrishnan, 2015). İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının iki ana formu bulunur; crohn hastalığı (CH) ve ülseratif kolit (ÜK). Crohn hastalığı (CH), yaygın olarak terminal ileum veya perianal bölgeyi etkileyebilen transmural enflamasyona sebep olabilir. CH, ÜK ile karşılaştırıldığında farklı bir seyir gösterir. CH, apseler, fistüller ve darlıklar gibi komplikasyonlarla ilişkilidir. Bununla birlikte, ÜK, kolonda sürekli olarak mukozal inflamasyonla karakterize edilir ve genellikle sadece kolon bölgesinde sınırlıdır (Tablo1) (Abraham & Cho, 2009).

Tablo 1. Ülseratif kolit ve crohn hastalığı karşılaştırması

Ülseratif Kolit	Crohn Hastalığı
• Sadece kolonu etkiler • Sürekli inflamasyon paterni, kolonun iç epitel tabakasını etkiler • Semptomlar: yorgunluk, ateş, rektal kanama, tenesmus, acil proktit, ishal, karın krampı, yapısal semptomlar	• Gastrointestinal sistemin herhangi bir bölümünü etkileyebilir • Sürekli olmayan, yamalı inflamasyon, bağırsak duvarının herhangi bir katmanını etkileyebilir • Semptomlar: karın ağrısı, ateş, bağırsak tıkanıklığının klinik belirtileri veya kan veya mukus geçişi ile ishal

2.2. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı Epidemiyolojisi

İBH' nin patogenezinin, konağın genetik duyarlılığı, bağırsak mikrobiyotası, diğer çevresel faktörler (diyet, sigara ve fizyolojik stres) ve immünolojik anormallikler ile

ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Guan, 2019). Geleneksel olarak İBH, Batı dünyasının bir hastalığı olarak kabul edilmiştir; ancak, son yirmi yılda yapılan araştırmalar, Orta Doğu, Asya ve Güney Amerika' daki yeni sanayileşmiş ülkelerde insidansın hızla arttığını göstermiştir (Ng vd., 2017).

İBH son yıllarda küresel olarak artış göstermektedir. 1990 yılında 3,32 milyon tahmini vakaya ve 2019 yılında 4,90 milyon vakaya ulaşmıştır ve bu 1990 ile 2019 arasında %47,45' lik bir artışa karşılık gelmiştir (Wang vd., 2023).

2.2.1. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı Patogenezi

İBH' nin patogenezinde çevresel faktörlerin önemli bir rol oynadığına şüphe yoktur. Sigara, diyet, ilaçlar, coğrafya, stres dahil bir çok faktör İBH için risk faktörü olarak kabul edilir (Zhang & Li, 2014).

İBH ile ilişkili 200' den fazla duyarlı gen lokusu belirlenmiş olup bu genlerin 30 tanesi ülseratif kolite özgü, 41 tanesi crohn hastalığına özgü ve yaklaşık 137 tanesi hem crohn hastalığı hem de ülseratif kolit ile ilişkilidir (Flynn & Eisenstein, 2019) .

İBH' nin genetik ve çevresel unsurlar arasındaki son derece karmaşık bir etkileşimden, düzensiz bağışıklık tepkilerinden ve mikrobiyomdaki değişikliklerden kaynaklandığı ve bu faktörlerin hiçbirinin tek başına hastalığa neden olamayacağı şeklinde yaygın bir inanç mevcuttur. (Zhang & Li, 2014).

2.2.2. Crohn Hastalığı

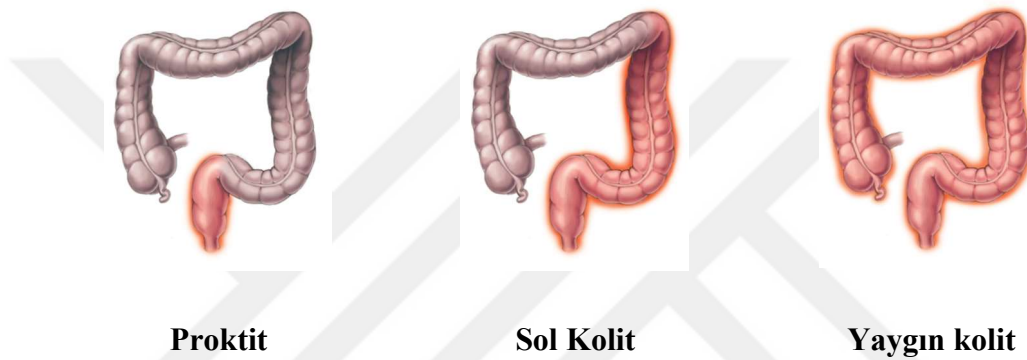
Crohn hastalığı (CH), gastrointestinal sistemin herhangi bir bölümünü etkileyebilir. Kronikleşen ve tekrarlayan bir inflamatuvar bağırsak hastalığıdır. CH, genellikle 15 – 30 yaşları arasında ortaya çıkar. CH semptomları karın ağrısı, kanlı veya kansız ishal, ateş, kilo kaybı olabilir. (Laass vd., 2014).

2.2.3. Ülseratif Kolit

Ülseratif kolit (ÜK) İBH' nin başlıca iki formundan biridir. ÜK rektumda başlayarak kolonda proksimal sürekli şekilde uzanan mukozal inflamasyon ile karakterize edilir (Hibi & Ogata, 2006; Ungaro vd., 2017). ÜK' de inflamasyon tipik olarak mukozal tabaka ile sınırlıdır, bağırsak duvarında yüzeysel hasara sebep olur. ÜK' de kesin patogenezi hala bilinmese de düzensiz bağışıklık tepkisi, bağırsak mikrobiyotası,

genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerin hastalığın patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir (Hibi & Ogata, 2006).

ÜK, kolon tutulumunun derecesine göre 3 ana formu vardır: proktit, sol kolit ve yaygın kolit. Proktit hastaların %30 – 60' ını etkiler ve semptomlar arasında rektal kanama, tenesmus ve sıkışma yer alır. Sol kolit hastaların %16 – 45' ini etkiler ve bu hastalarda ishal ve karın kramplarına ek olarak proktit semptomları görülür. ÜK' nin en travmatik şekli, hastaların %15 – 35' ini etkileyen yaygın kolittir. Bu form, yapısal semptomlar, yorgunluk ve ateşe ek olarak sol kolitin tüm semptomlarını gösterebilir (D. Liu vd., 2022). (Şekil 1)

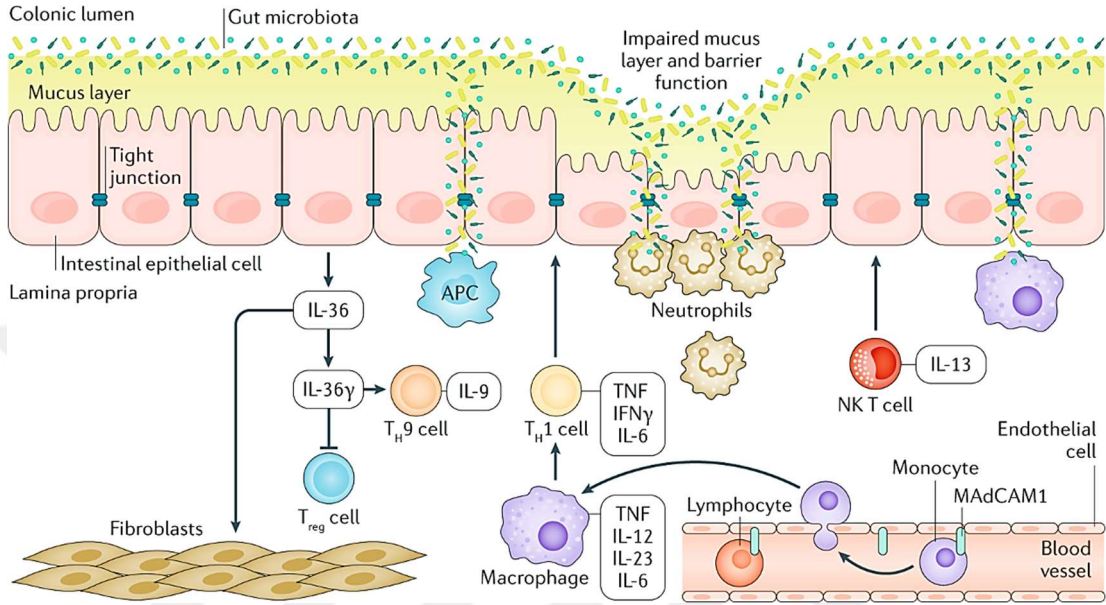


Şekil 1. Kolon tutulum derecesine göre ülseratif kolit (Ungaro vd., 2017)

2.2.3.1. Ülseratif Kolit Patofizyolojisi

Ülseratif kolitin (ÜK) patofizyolojisine birçok faktör katkıda bulunur. Bağırsak mikrobiyotası, kısa zincirli yağ asitlerinde bir azalma ile gösterilen, azalmış çeşitlilik ve metabolik profilde bir değişiklik gösterir. Mikrobiyotadaki değişiklikler ve azalan mukus tabakası, mikrobiyotanın epiteliyal bariyere yaklaşmasını kolaylaştıran bir bariyer ihlali ile sonuçlanır. Bağırsak epiteli, apoptotik odaklar ve sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunun değişmesi nedeniyle bozulur, böylece daha fazla mikrobiyotanın bariyeri geçmesine izin vererek makrofajları ve antijen sunan hücreleri (APC' ler) aktive eder ve sonuçta nötrofilleri çeken kemokinlerin ekspresyonu ile sonuçlanır. Nötrofiller, hücre dışı nötrofil tuzakları oluşturarak hücresel tepkinin ilk sırasını oluştururlar ve bağışıklık hücreleri, kan damarı endoteli tarafından ifade edilen adezyon molekülüne bağlanarak sızar. Makrofajlara olgunlaşan sızan monositler, tümör nekroz faktörü (TNF), interlökin (IL) ailesinden IL-12, IL-23 ve IL-6 üreterek tip 1 T helper (TH1) hücrelerinin polarizasyonuna neden olur. Ek olarak, epitelden

türetilen IL-36 γ , düzenleyici T (Treg) hücrelerini inhibe eder ve IL-9 üreten T helper (TH9) hücrelerinin polarizasyonunu indükler ve IL-36' nın fibrojeniz genlerini indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca, doğal öldürücü (NK) T hücreleri tarafından salınan IL-13' ün bariyer işlev bozukluğuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Kobayashi vd., 2020). (Şekil 2)



Şekil 2. Ülseratif kolit patofizyolojisi (Kobayashi vd., 2020)

2.2.3.2. Ülseratif Kolit Tedavi Yöntemleri

Ülseratif kolitte tıbbi tedavide ulaşılabilmek istenen esas konu, kısa sürede remisyonu gerçekleştirmek, yaşam kalitesini bir standarda oturtmak, uzun zamana yayılan steroid kullanım ihtiyacını düşürmek, hastalığın ve tedavide tercih edilen ilaçların istenmeyen durum ve yan etkilerini gidermektir (Rubin vd., 2019).

2.2.3.3. Anti-TNF

Crohn hastalığında (CH) yükselen ve bu hastalıkta granülom gelişiminden sorumlu olan anahtar bir sitokin olan TNF, ÜK' li hastalarda da yükselir. Ek olarak, TNF' nin bağırsak bariyer direncinde önemli bir düşüşe neden olduğu gösterilmiştir ve bu nedenle, lamina propriada üretilen TNF, ÜK için karakteristik olan bir bariyer kusuruyla sonuçlanır. Gerçekten de çalışmalar, anti-TNF tedavisinin CH' li bir hasta alt grubunda ve ÜK' li hastalarda etkili olduğunu göstermiştir (Kobayashi vd., 2020). Proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin dengesi, inflamatuvar barsak hastalıklarının patogeneziindeki en merkezi mekanizmadır. Tümör nekroz faktörü alfa

(TNF α), inflamatuvar bağırsak hastalıklarının patogeneğinde çok önemli rol oynayan bir sitokindir. Hastalığın seyrininin değiştirilmesi ile hastalık komplikasyonlarının önlenmesi mümkündür. İnflamatuvar ve ağır ÜK hastaları için mevcut tedaviler, inflamasyon önleyici ajanlar, immünosupresif ilaçlar, steroidler ve inflamatuvar sitokinleri (öncelikle TNF) hedefleyen biyolojik maddeleri kullanarak inflamasyonu kademeli olarak azaltmayı amaçlar (Allez vd., 2010). TNF antagonistlerinin (anti-TNF) şiddetli aktif ülseratif koliti olan hastalarda etkili olduğu gösterilmiştir.

TNF, programlı inflamasyon sürecinin bir parçası olan hücre sinyal proteinlerinden biridir ve bağışıklık hücrelerinin düzenlenmesinde görev alır. Endojen bir pirojen olarak, TNF ateşi tetikleyebilir, apoptotik hücre ölümünü uyarabilir, kaşeksi gelişimine neden olabilir, inflamasyonu indükleyebilir ve tümörogenezi ve viral replikasyonu engelleyebilir. Ayrıca, sepsis gibi durumlarda IL-1 ve IL-6 üreten hücreler aracılığıyla sepsise yanıt oluşturabilir. (Swardfager vd., 2010). Aynı zamanda TNF alzheimer, kanser, sedef hastalığı ve İBH gibi çeşitli hastalıklarda görev almaktadır (Brynskov vd., 2002).

TNF- α 'nın özellikle İBH immünotatogeneğinde merkezi bir rolü vardır. Bu sitokin, birçok gram negatif ve pozitif bakteri, lipopolisakaritler, IL-2 gibi uyarıcılarla birlikte büyük ölçüde makrofajlar tarafından üretilir (Danese, 2008) ve reseptöre bağlanarak etki gösterir (Watts, 2004). İBH tedavisinde yararlanılan anti-TNF ajanlar, TNF'ye karşı hedeflenen monoklonal antikorlar olarak genetik mühendislik yöntemiyle üretilir. Anti-TNF ajanları, remisyon başlatma sürecinde ve remisyonun sürdürülmesinde önemli bir yere sahiptir (Clark vd., 2007).

2.2.4. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı ve Mikrobiyota

İnsan bağırsak mikrobiyotası, bakteri, mantar, virüs vb. dahil olmak üzere yaklaşık 100 trilyon farklı mikrobiyal organizmadan oluşur (Nishida vd., 2017). Bağırsak mikrobiyotasının bileşimindeki ve işlevindeki değişiklikler, bağırsak mikrobiyomu disbiyozu olarak adlandırılan ve İBH dahil çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilen dengesiz bir mikrobiyotaya yol açar (Khan vd., 2019). Şimdiye kadar İBH'nin kesin nedeni tam olarak anlaşılamamıştır (Somineni & Kugathasan, 2019), ancak önceki çalışmalar, bağırsak mikrobiyota değişikliklerinin bununla ilişkili olduğunu öne sürmüştür (Hyun, 2021).

İBH' li hastalar ile sağlıklı bireyler karşılaştırıldığında, hasta grubunda antiinflamatuvar kapasiteye sahip bakterilerin azalması ve inflamatuvar kapasiteye sahip bakterilerin artışı gözlenmektedir (Frank vd., 2007).

CH ve ÜK' deki bağırsak florası hem iltihaplı hem de iltihapsız segmentlerde incelenmiş ve İBH hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla dışkı mikrobiyomunda önemli ölçüde azalmış biyoçeşitlilik olduğunu belirlenmiştir. Aynı zamanda İBH hastalarında mikrobiyotanın sağlıklı bireylere göre daha kararsız olduğu bulunmuştur (Andoh vd., 2011).

İnsan bağırsak mikrobiyotasının 500-1000 farklı bakteri türü içerdiği tahmin edilmektedir; Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria ve Actinobacteria en belirgin dört filumdur (Mentella vd., 2020). Tür düzeyinde, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Veillonella spp.* ve *Streptococcus spp.* ince bağırsakta zengindir ve İBH ile ilişkilidir (Ruigrok vd., 2021). İBH hastalarının remisyonu ve alevlenmesi sırasında, *Clostridium coccoides*, *Faecalibacterium prausnitzii* ve *Clostridium leptum*' da önemli azalmalar gözlemlenmiştir (Duboc vd., 2013). Ayrıca araştırmalar *Roseburia hominis*' in azaldığını, *Clostridium ramosum*, *Ruminococcus gnavus* ve *Escherichia coli*' nin (E. coli) İBH hastalarında arttığını göstermektedir (S. Liu vd., 2021; Yang vd., 2021).

Bir periodontal patojen olan *Fusobacterium nucleatum* da bağırsakta rezervuarlara sahiptir ve bağırsak hastalıklarında rol oynayabilir. Bununla birlikte, ÜK patogenezindeki rolü belirsizdir (Lin vd., 2023).

2.2.4.1. *Fusobacterium nucleatum* (F. nucleatum)

Bağırsak içindeki mikrobiyal dengeyi düzenleyen bakterilerdeki değişikliklerin, İBH gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. *F. nucleatum* anaerobik ve gram-negatif bir bakteri türüdür ve insan ağız ve bağırsaklarında ortak olarak bulunur. Bu bakterinin, vücutta patojenik potansiyele sahip olan bir fırsatçı patojen olarak İBH' de rol oynadığı bilinmektedir. (Polak vd., 2009). *F. nucleatum*, E-cadherin' e bağlanır ve kanser başlangıcını, proliferasyonunu, istilasını, nüksünü ve kemorezistansını desteklemek için TLR4/MYD88 yolunu, NF-κB, otofaji veya Wnt yollarını aktive eder (Chen vd., 2017; Rubinstein vd., 2013a). Bununla birlikte, ülseratif kolitteki *F. nucleatum*' un potansiyel etkileri ve mekanizmaları henüz incelenmemiştir (Lin vd., 2023).

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Araştırma Evreni ve Örneklem

Günümüzde önemli bir inflamatuvar bağırsak hastalığı olan ülseratif kolit 10 yetişkinde bir ortaya çıkabilme potansiyeli olan multifaktoriyel bir hastalık niteliğindedir. Yapılan çalışmalar neticesinde *F. nucleatum* seviyesinin, söz konusu hastalıkla bağlantısı gösterilmiştir. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Anabilim Dalı polikliniği' ne başvuran ve gastroenteroloji hekimleri tarafından TNF- α cevabına göre kategorize edilen TNF- α cevap veren ve TNF- α cevap vermeyen hastaların ve sağlıklı kontrol grubunun ilgili biyopsi örneklerinden formalinle fikse edilerek hazırlanmış parafine gömülü (FFPE) dokular elde edilmiş ve *F. nucleatum* genomik DNA' sını QIAamp DNA FFPE Doku Kiti (Qiagen) kullanılarak elde edilmiştir. TNF- α pozitif ve TNF- α negatif hastaların ve kontrol grubunun ilgili biyopsi örneklerinden FFPE dokulardan "RNeasy FFPE Kit" aracılığı ile total RNA elde edilmiş ve miktar ve saflıkta belirlenmiş, istenen kalitedeki RNA' lardan cDNA çevrimi "QuantiTect Reverse Transcription Kit" ile gerçekleştirilmiş ve anlatım profilleri Roche LightCycler 480 II qRT-PCR cihazında çalışılarak değerlendirilmiştir. $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalizasyon değerleri baz alınarak değerlendirildikten sonra, reaksiyon sonuçları uygun aralıklar dahilinde ve *F. nucleatum* ile bağlantılı TNF grupları saptanması hedeflenmiş ve buradan elde edilen veriler ve bulguların tanı ve tedavi için literatüre ve uygulamaya ilişkin biyobelirteç sunabileceği öngörülmüştür.

3.2. Araştırmanın Değişkenleri

Çalışmamızda yer alan TNF tedavisine yanıt gösteren hastalar çalışmanın "bağımsız değişkeni" ni, söz konusu olgulardan incelenen anti-TNF ekspresyonu ve *F. nucleatum* miktarı "bağımlı değişken" grubunu oluşturmaktadır.

TNF- α tedavisine yanıt göstermeyen hastalar çalışmanın "bağımsız değişkeni" ni, söz konusu olgulardan incelenecek olan anti-TNF ekspresyonu ve *F. nucleatum* miktarı "bağımlı değişken" grubunu oluşturmaktadır.

Kontrol grubumuz çalışmanın "bağımsız değişkeni" ni, söz konusu olgulardan incelenecek olan anti-TNF ekspresyonu ve *F. nucleatum* miktarı "bağımlı değişken" grubunu oluşturmaktadır.

3.3. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Ekim 2022- Ekim 2023

3.4. Veri toplama Araçları ve Uygulamaları

Çalışmada Ülseratif Kolit (ÜK) ile ilişkili hasta grupları olarak TNF- α tedavisine cevap veren (n=10), TNF- α tedavisine cevap vermeyen (n=10) ve gastroenteroloji anabilim dalına gelen rutin biyopsileri gerçekleştirilen ülseratif kolit bakımından sağlıklı kontrol grubu (n=10) olmak üzere, üç grup şeklinde toplanmıştır.

Parafine gömülü bloklar şeklinde alınan ülseratif kolitli TNF- α cevap veren, ülseratif kolitli TNF- α cevap vermeyen ve kontrol grubu örneklerinden *Fusobacterium nucleatum* DNA izolasyonları QIAamp DNA FFPE Doku Kiti (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ÜK TNF cevabı için RNA izolasyonları “RNeasy FFPE Kit” aracılığı ile kit protokolüne göre gerçekleştirilmiş, elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları Nanodrop cihazında ölçülerek uygun konsantrasyonda bulunan RNA’ların cDNA’ ya dönüştürülmesi “QuantiTect Reverse Transcription Kit” ile gerçekleştirilmiştir. Custom RT² Profiler PCR Arrays vasıtası ile qRT-PCR yöntemiyle seçilen TNF- α geninin mRNA ekspresyon değişimleri LightCycler 480 cihazında tespit edildikten sonra “Qiagen GeneGlobe Data Analysis Center/ PCR/ gene expression analysis” (*GeneGlobe Data Analysis Center | NGS & PCR Analysis Tools | GeneGlobe, t.y.*) sistemi kullanılarak anlamlı olanlar belirlenmiş ve *Student’s t* testi ile analiz edilmiştir. Bu çalışmalar ile Ülseratif Kolit hastalığına sahip olgularda *F. nucleatum* varlığında TNF- α etkinliğinin Ülseratif kolitle olan ilişkisinin açıklanması planlanmıştır.

3.5. Veri analizi

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarından ülseratif kolitin aydınlatılabilmesi için çalışma grubumuz TNF- α cevap veren (n=10) ve TNF- α cevap vermeyen (n=10) ülseratif kolit tanılı olgularda ve ülseratif kolit bakımından sağlıklı kontrol grubu (n=10) gruplarından oluşmuştur. Söz konusu 3 değişkenli hasta grupları “Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Anabilim Dalı polikliniği” ne başvuran ve gastroenteroloji hekimleri tarafından TNF- α cevabına göre kategorize edilen TNF- α cevap veren ve

TNF- α cevap vermeyen hastaların ve kontrol grubunun ilgili dokuları formalinle fikse edilmiş parafine gömülü biyopsi örneklerinden alınmıştır.

Çalışmada kullanılan hastalardan ve kontrol grubundan alınan biyopsi örnekleri, parafin bloklarından *F. nucleatum* genomik DNA' sı, qPCR testi ile tayin edilmiştir. TNF- α mRNA ekspresyon düzeylerini incelemek adına qRT-PCR yöntemiyle LightCycler 480 kullanılmıştır. qRT-PCR analizlerinin etkinliğini teyit etmek için 4 logaritmik fazda standart seri ve erime eğrisi analizleri yapılmıştır.

Gen anlatım profilleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalizasyon değerlerine göre yorumlanmıştır. Reaksiyon sonuçları incelenerek anlamlı aralıklar ve *F. nucleatum* ile ilişkilendirilebilir TNF grupları tespit edilmesi hedeflenmiş ve bunun için web bazlı yazılım olan “Qiagen GeneGlobe Data Analysis Center/ PCR/ gene expression analysis” (*GeneGlobe Data Analysis Center | NGS & PCR Analysis Tools | GeneGlobe*, t.y.) sistemi kullanılmıştır. Olguların karşılaştırılması için Student's t testi yapılmış ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

3.6. Araştırma etiği

Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu' undan (TAEK) 20-4.1T/17 numaralı izin belgesi bulunmaktadır.

3.7. Olgu Grubu

Ülkemizde inflamatuvar bağırsak hastalıklarından ülseratif kolitin aydınlatılabilmesi için çalışmamızda hasta grupları olarak TNF- α tedavisine cevap veren ($n=10$), TNF- α tedavisine cevap vermeyen ($n=10$) ve gastroenteroloji anabilim dalına gelen rutin biyopsileri gerçekleştirilen ülseratif kolit bakımından sağlıklı kontrol grubu ($n=10$) çalışma grubumuzu oluşturmuştur. Söz konusu 3 değişkenli hasta grupları Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Anabilim Dalı Polikliniği' ne başvuran ve gastroenteroloji uzmanları tarafından TNF- α cevabına göre kategorize edilen TNF- α cevap veren ve TNF- α cevap vermeyen hastaların ve kontrol grubunun ilgili dokuları formalinle fikse edilmiş parafine gömülü biyopsi örneklerinden alınmıştır.

Histopatolojik ve endoskopik olarak Ülseratif Kolit tanısı konmuş ve en az 6 ay takip olan, tedavi cevapsızlığı nedeniyle biyolojik tedavi başlanmış ve kontrol amaçlı kolonoskopi yapılarak biyopsi alınmış hastalara ilişkin daha önce alınmış parafine gömülü doku örnekleri çalışmaya alınmıştır.

Kontrol grubuna kollajenöz kolit, anemi etiyo, polip sürveyans nedeniyle kolonoskopi yapılmış ve biyopsi alınmış herhangi bir patoloji saptanmamış hastalar dahil edilmiştir. Olguların dışlanma kriterleri Tablo 2’ e verilmiştir.

Tablo 2. Olgu ve kontrol grubu dışlama kriterleri

Olgu Grubu Dışlanma Kriterleri	Kontrol Grubu Dışlanma Kriterleri
× 18 yaş altı × 80 yaş üstü × Crohn hastalığı veya indetermine kolit tanısı olmak × ÜK için biyolojik tedavi harici tedaviler alıyor olmak × 6 aydan kısa hastalık süresi × Kolonoskopik işlem öncesi bilinen antibiyotik kullanımı × Çalışmaya katılmaya gönüllü olmamak	× 18 yaş altı × 80 yaş üstü × Kolonoskopik işlem öncesi bilinen antibiyotik kullanımı × Tarama amaçlı yapılan kolonoskopide alınan biyopside patoloji saptanmış olmak × Çalışmaya katılmaya gönüllü olmamak

3.8. Total DNA Ekstraksiyonu

Olguların ve kontrol grubunun formalinle fikse edilmiş parafine gömülü biyopsi örneklerinden 5 µm’lik 5 – 8 kesitin total DNA izolasyonları “QIAamp DNA FFPE Doku Kiti (Qiagen)” ile kit manueline göre gerçekleştirilmiştir (Şekil 3).

Uygulanan basamaklar şu şekildedir;

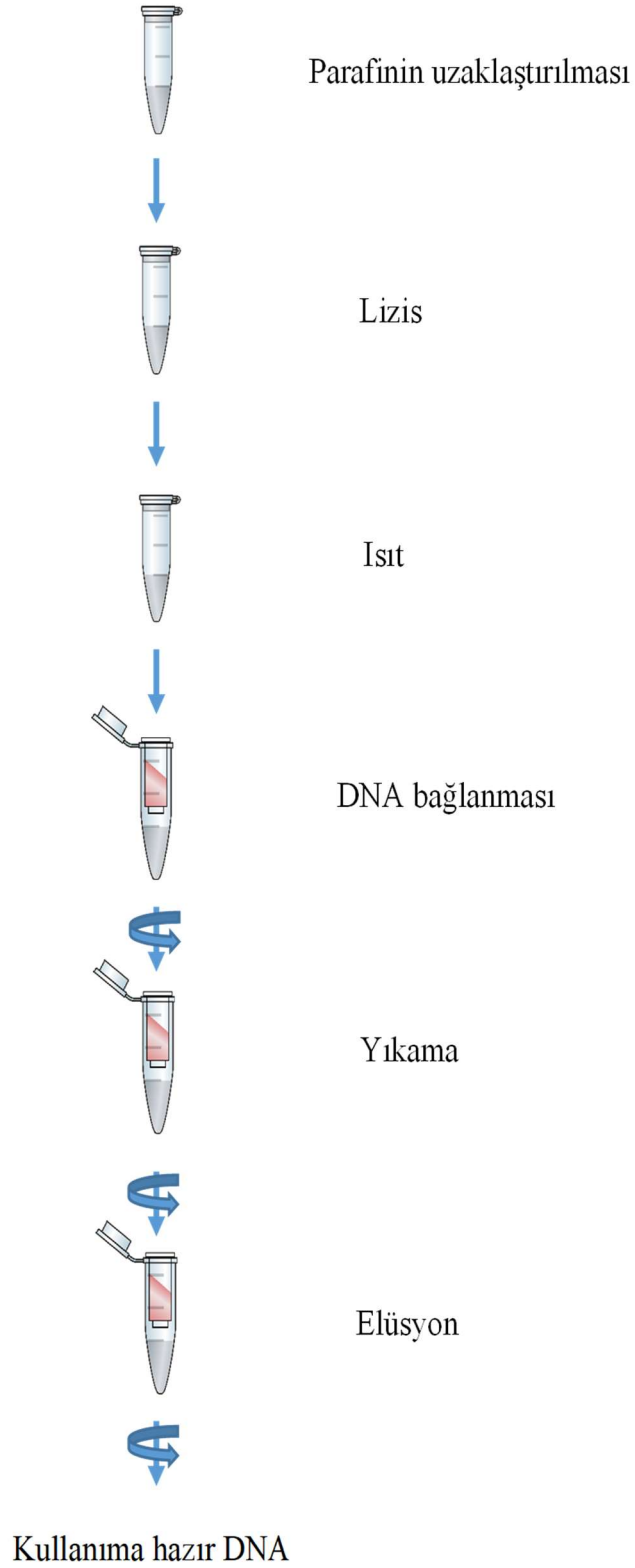
Başlamadan önce ksilol 60°C’ ye ısıtılır.

1. Dokuya 1000 µL ksilen eklenir, vortex yapılır.
2. 3500 rpm’ de 5 dakika santrifüj yapılır.
3. Supernatant atılır.

4. Pelletin üzerine 500 µL ksilen, 500 µL etil alkol (%96lık) eklenir, vorteks yapılır.
5. 3500 rpm' de 5 dakika santrifüj yapılır.
6. Supernatant atılır.
7. Pelletin üzerine 1000 µL etil alkol eklenir, vorteks yapılır.
8. Tam hızda (14000 rpm) 2 dakika santrifüj yapılır.
9. Supernatantı atılır, oda sıcaklığında etil alkolün uçmasını beklenir.
10. Pellete 180 µL Buffer ATL ve 20 µL proteinaz K eklenir, vorteks yapılır.
11. 56°C' de 90 dakika inkübasyona bırakılır.
12. 90°C' de 90 dakika inkübasyona bırakılır.
13. İnkübasyondan sonra damlaları temizlemek için kısa bir santrifüj yapılır.
14. Örneğe 200 µL AL tamponu eklenir, vorteks yapılır. Ardından 200 µL etanol eklenir ve tekrar vorteks yapılır.
15. Kısa bir santrifüj yapılır.
16. Lizatın tamamı QIAamp MinElute kolonuna aktarılır. Kapak kapalı 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılır. Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
17. QIAamp MinElute kolonuna 500 µl Buffer AW1 eklenir. 10.000 rpm' de 1 dakika santrifüj yapılır. Kolon yeni toplama tüpüne yerleştirilir.
18. QIAamp MinElute kolonuna 500 µl Buffer AW2 eklenir. 10.000 rpm' de 1 dakika santrifüj yapılır. Kolonu yeni toplama tüpüne yerleştirilir.
19. Membranı tamamen kurutmak için 3 dakika 14.000 rpm' de santrifüj yapılır.
20. Kolon temiz ependorfa yerleştirilir. Kolona 40 µL ATE buffer eklenir. Kapağı kapalı 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
21. 1 dakika 14.000 rpm' de santrifüj yapılır.

İzolasyon tamamlandıktan sonra örneklerin DNA konsantrasyonları nanodrop (Spectrophotometer ND-1000) cihazında ölçülmüştür.

QIAamp DNA FFPE doku prosedürü



Şekil 3. DNA izolasyonu aşamaları

3.9. Total RNA İzolasyonu

Olguların ve kontrol grubunun formalinle fikse edilmiş parafine gömülü biyopsi örneklerinden 5 µm' lik 5 – 8 kesitin total RNA izolasyonları “RNeasy FFPE Kit” ile kit manueline göre gerçekleştirilmiştir (Şekil 4).

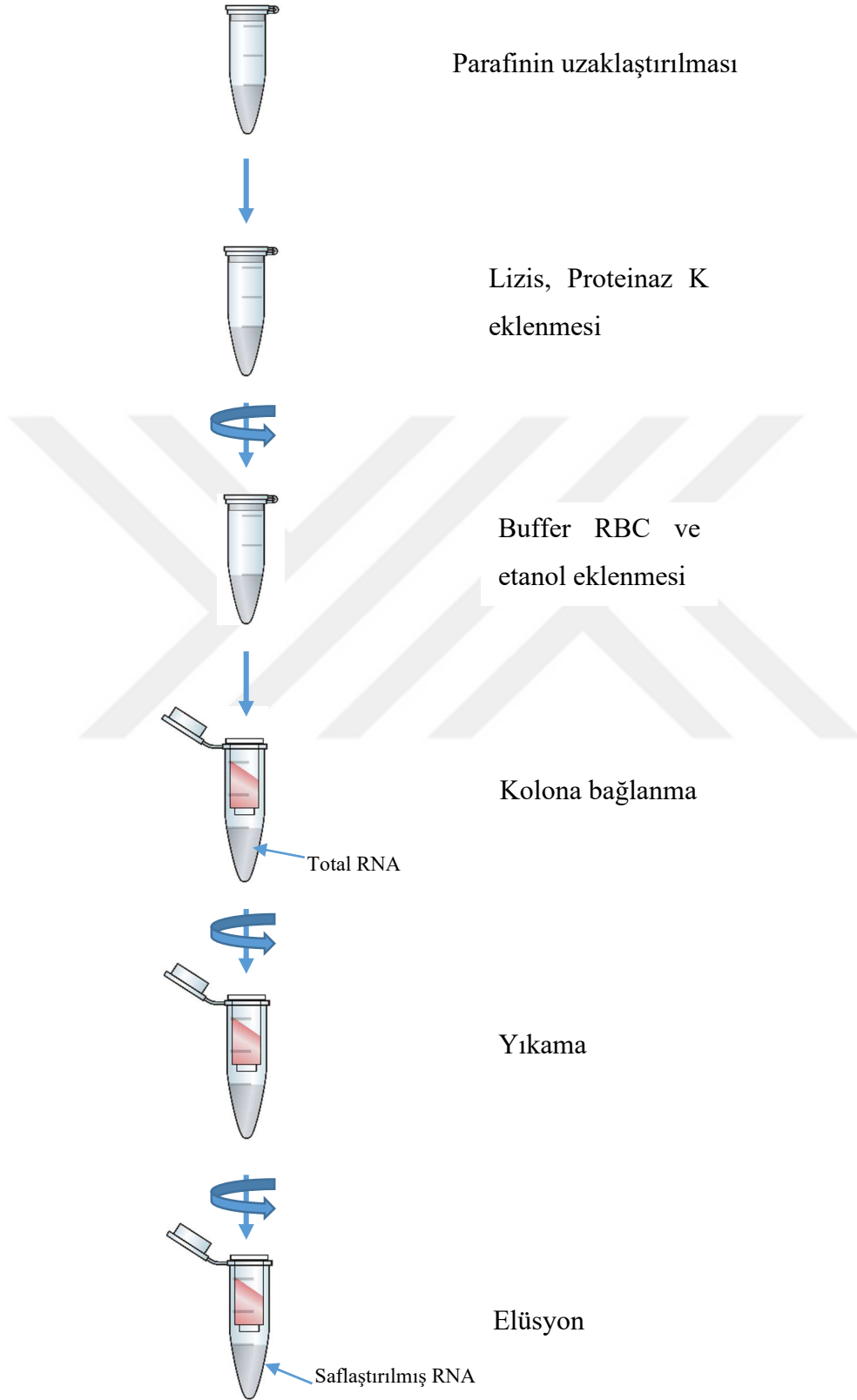
Uygulanan basamaklar şu şekildedir;

Başlamadan önce ksilolü 60°C' ye ısıtılır.

1. Dokuya 1000 µL ksilen eklenir, vorteks yapılır.
2. 10.000 rpm 2 dakika santrifüj yapılır.
3. Supernatant atılır.
4. Pelletin üzerine 500 µL ksilen, 500 µL etil alkol (%96lık) eklenir, vorteks yapılır.
5. 10.000 rpm' de 2 dakika santrifüj yapılır.
6. Supernatant atılır.
7. Pelletin üzerine 1000 µL etil alkol eklenir, vorteks yapılır.
8. 14.000 rpm' de 2 dakika santrifüj yapılır.
9. Supernatant atılır, oda sıcaklığında etil alkolün uçması beklenir.
10. Daha sonra 150 µL Buffer PKD eklenir ve vorteks yapılır.
11. 10.000 rpm 1 dakika santrifüj yapılır.
12. Pellet uzaklaştırılır, supernatant ile devam edilir. Supernatanta 10 µL proteinaz K eklenir ve pipetaj yapılır.
13. 56°C' de 15 dakika inkübasyona bırakılır. Daha sonra 80°C' de 15 dakika inkübasyona bırakılır.
14. Numune buz üzerinde 15 dakika inkübasyona bırakılır. Daha sonra 13.500 rpm' de 15 dakika santrifüj yapılır.
15. Süpernatant yeni temiz santrifüj tüpüne aktarılır, üzerine 16 µL DNase Booster Buffer ve 10 µL DNase eklenir.
17. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra üzerine 320 µL Buffer RBC eklenir.

19. Numuneye 720 μ L %100' lük etanol eklenir ve pipetaj yapılır.
 20. 700 μ L' lik numune kolona aktarılır. 10.000 rpm' de 15 sn santrifüj yapılır. Ependorftaki numune bitene kadar bu adımı tekrarlanır.
 21. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılıp yeniden kullanılır. Kolona 500 μ L Buffer RPE eklenir. 10.000 rpm 1 dakika santrifüj yapılır. Sıvı atılır toplama tüpünü yeniden kullanılır.
 22. Kolona tekrar 500 μ L Buffer RPE eklenir. 10.000 rpm 1 dakika santrifüj yapılır. Toplama tüpünü atılır.
 23. Kolon yeni toplama tüpüne yerleştirilir. Döndürme kolonunun kapağı açık olacak şekilde 14.500 rpm' de 5 dakika santrifüj yapılır.
 24. Kolon 1.5 ml toplama ependorfa yerleştirilir. Kolon membranına 10 μ L RNaz free water eklenir ve 14.500 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılır.
- İzolasyon tamamlandıktan sonra örneklerin RNA konsantrasyonları nanodrop (Spectrophotometer ND-1000) cihazında ölçülmüştür.

RNeasy FFPE Prosedürü



Şekil 4. Total RNA izolasyonu aşamaları

3.10. DNA ve RNA Miktar ve Saflık Ölçümü

Elde edilen DNA ve RNA izolasyon örneklerinin konsantrasyonları ve saflıkları 260/280 nm dalga boyu ve 230/260 nm dalga boyunda absorbanslarının ölçülmesi ile saptanmıştır. Saflık ölçümleri örneklerden 1-1,5 µL kullanılarak Nanodrop cihazında yapılmıştır.

3.11. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Uygun kalitedeki RNA' lardan cDNA sentezi "QuantiTect Reverse Transcription Kit" ile kit manueline göre yapılmıştır.

Uygulanan basamaklar şu şekildedir;

1. Şablon RNA buz üzerinde çözülür.
2. Tabloya göre soğuk blok üzerinde genomik DNA eliminasyon reaksiyonu hazırlanır (Tablo 3).

Tablo 3. Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu bileşenleri

Bileşenler	Hacim
gDNA Wipeout Buffer, 7x	2 µl
Şablon RNA (1 µg'a kadar)	Değişken
RNAz free water	Değişken
Toplam Reaksiyon Hacmi	14 µl

3. Elde edilen miks 42°C' de 2 dakika inkübe edilir, ardından hemen soğuk blok üzerine alınır.
4. Ters transkripsiyon ana karışımını Tabloya göre buz üzerinde hazırlanır.

Tablo 4. Reverse- transkripsiyon reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Hacim/reaksiyon
Reverse- transkripsiyon master mix	
Quantiscript Reverse Transkriptase	1 µl
Quantiscript RT Buffer, 5x	4 µl
RT Primer Mix	1 µl
Şablon RNA	
Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu	14 µl
Toplam reaksiyon hacmi	20 µl

5. Ters transkripsiyon ana karışımını içeren her tüpe adım 3' te elde edilen karışımdan (14 µl) eklenir.

6. 42°C' de 15 dakika inkübe edilir. Ardından Quantiscript Ters Transkriptazı inaktive etmek için 95°C' de 3 dakika inkübe edilir.

Elde edilen komplementer DNA'lar PCR reaksiyonu için -20°C' de saklanır.

3.12. *Fusobacterium nucleatum* RT-PCR Analizi

Gerçek zamanlı PCR 10 µL toplam hacimde bir araya getirilerek gerçekleştirilmiştir. Genin anlatımları, “Sybr-Green I” boya kullanılarak belirlenmiştir. RT-PCR analizi LightCycler 480 (Roche) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan primer sekansları aşağıdaki gibidir:

F. nucleatum ileri primer, 5'- ATTTACACCATGTTGTCCTAATGC-3'

F. nucleatum ters primeri, 5'- CCAGCAGGTAAAGCGAACC-3'

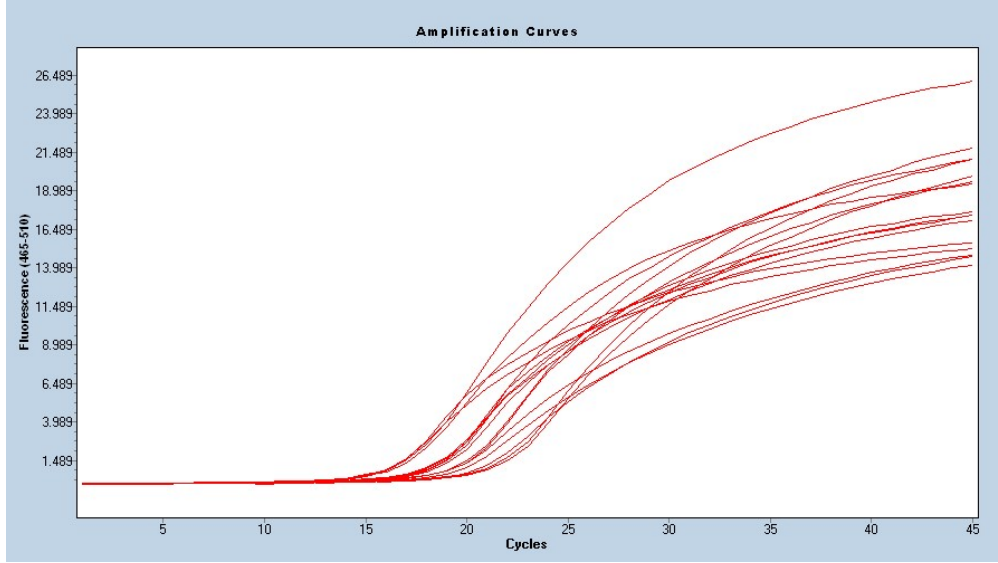
F. nucleatum RT-PCR analizi PCR reaksiyon bileşenleri Tablo 5'te, PCR koşulları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 5. PCR reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Hacim
Sybr-Green I	5 µL
Ileri primer	1 µL
Geri primer	1 µL
Nükleaz içermeyen su	1 µL
DNA	2 µL
Toplam	10 µL

Tablo 6. PCR reaksiyon koşulları

İşlem basamağı	LC480 cihaz ayarları	Ramp Rate (°C/s)
Denatürasyon	95°C 10 dk	4,40
Amplifikasyon	45 amplifikasyon döngüsü içinde; 95°C 10 saniye 57°C 15 saniye 72°C 15 saniye	4,40 2,20 4,40
Erime eğrisi analizi	95°C 10 saniye 50°C 10 saniye 50°C (Acquisition Mode:Devamlı) 80°C (Acquisition Mode:Devamlı)	4,40 2,20 0,3 0,3
Soğutma	40°C 30 saniye	2,2



Şekil 5. LightCycler 480 (Roche) cihazı ile gerçekleştirilen RT- PCR analiz görüntüsü

3.13. TNF Alfa cevaplılığı /cevapsızlığının *F. nucleatum* üzerindeki ekspresyonlarının qRT-PCR analizi

Gerçek zamanlı PCR 10 µL toplam hacimde bir araya getirilerek gerçekleştirilmiştir. Genin anlatımları, “Sybr-Green I” boya kullanılarak belirlenmiştir. RT-PCR analizi LightCycler 480 (Roche) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan primer sekansları aşağıdaki gibidir:

TNF- α ileri primeri, 5'- CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT -3 '

TNF- α ters primeri, 5'- GCCAGAGGGCTGATTAGAGA -3 '

RNU6 ileri primeri, 5'- CTCGCTTCGGCAGCACATATAC -3 '

RNU6 ters primeri, 5'- AATGGAACGCTTCACGAATTTGC -3'

GAPDH ileri primeri, 5'- TGACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG -3 '

GAPDH ters primeri, 5'- CCAGTAGAGGCAGGGATGATGTTC -3'

TNF Alfa cevaplılığı /cevapsızlığının *F. nucleatum* üzerindeki ekspresyonlarının qRT-PCR analizi PCR reaksiyon bileşenleri Tablo 7’de, PCR koşulları Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 7. PCR reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Hacim
Sybr-Green I	5 µL
İleri primer	1 µL
Geri primer	1 µL
Nükleaz içermeyen su	1 µL
cDNA	2 µL
Toplam	10 µL

Tablo 8. PCR reaksiyon koşulları

İşlem basamağı	LC480 cihaz ayarları	“Ramp Rate” (°C/s)
Denatürasyon	95°C 10 dk	4,40
Amplifikasyon	45 amplifikasyon döngüsü içinde; 95°C 10 saniye 57°C 15 saniye 72°C 15 saniye	4,40 2,20 4,40
Erime eğrisi analizi	95°C 10 saniye 50°C 10 saniye 50°C (Acquisition Mode:Devamlı) 80°C (Acquisition Mode:Devamlı)	4,40 2,20 0,3 0,3
Soğutma	40°C 30 saniye	2,2

3.14. İstatistiksel Analiz

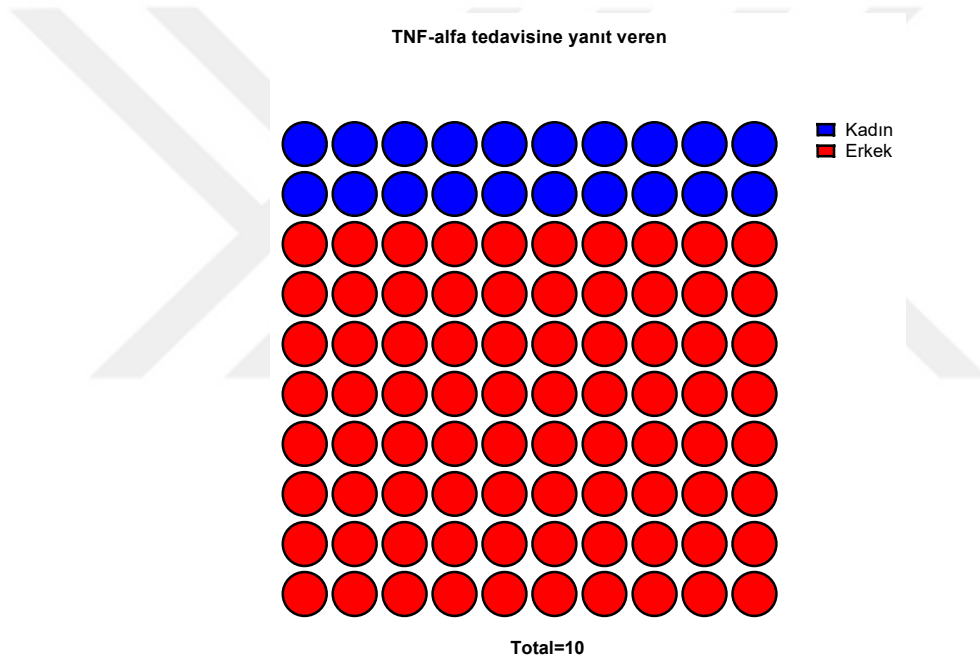
qRT-PCR analizlerinin etkinliğini teyit etmek için 4 logaritmik fazda standart seri ve erime eğrisi analizleri yapılmıştır. Gen anlatım profillleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalizasyon değerlerine göre yorumlanmıştır. Reaksiyon sonuçları incelenerek anlamlı aralıklar ve *F. nucleatum* ile ilişkisi incelenmiştir ve bunun için web bazlı yazılım olan “Qiagen GeneGlobe Data Analysis Center/ PCR/ gene expression analysis” (*GeneGlobe Data Analysis Center | NGS & PCR Analysis Tools | GeneGlobe, t.y.*) sistemi kullanılmıştır. Olguların karşılaştırılması için Student’ s t testi yapılacak ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



4. Bulgular

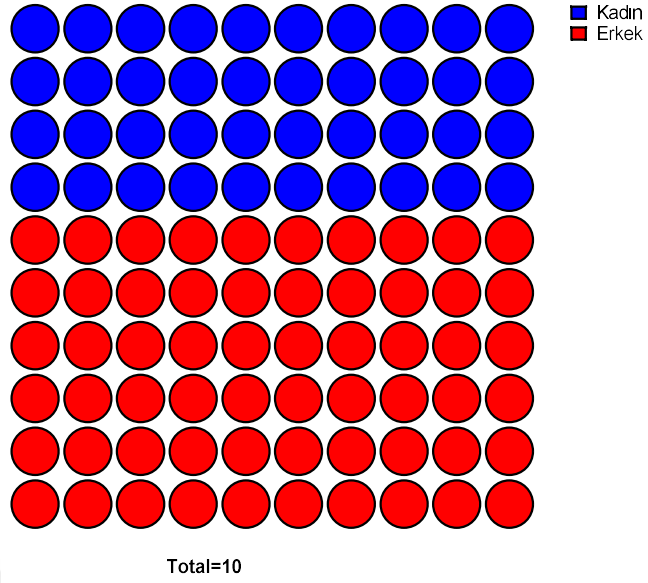
4.1. Olguların Demografik Dağılımları

Çalışmaya Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Anabilim Dalı polikliniğine başvuran ve gastroenteroloji uzmanları tarafından TNF- α cevabına göre kategorize edilen TNF- α cevap veren 10 hasta, TNF- α cevap vermeyen 10 hasta ve 10 kontrol grubu dahil edilmiştir. TNF- α tedavisine cevap veren (Şekil 6), cevap vermeyen hasta grubunun (Şekil 7) ve kontrol grubunun (Şekil 8) cinsiyet dağılım grafiği aşağıda verilmiştir.



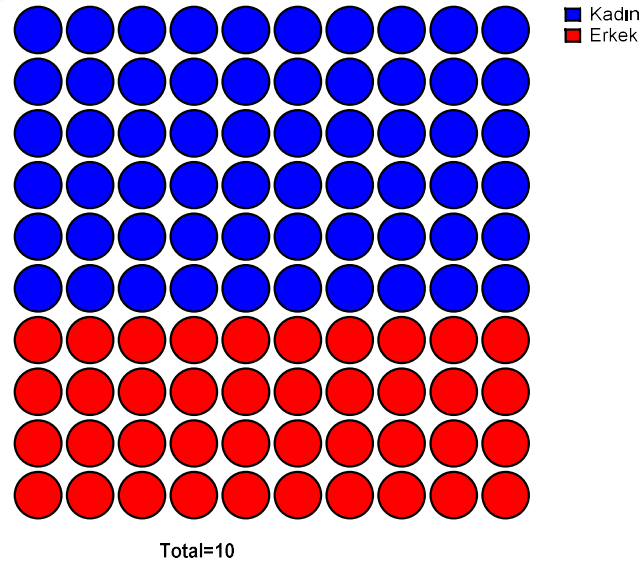
Şekil 6. TNF-alfa tedavisine yanıt veren hasta grubunun cinsiyet dağılım grafiği

TNF-alfa tedavisine yanıt vermeyen



Şekil 7. TNF-alfa tedavisine yanıt vermeyen hasta grubunun cinsiyet dağılım grafiği

Kontrol



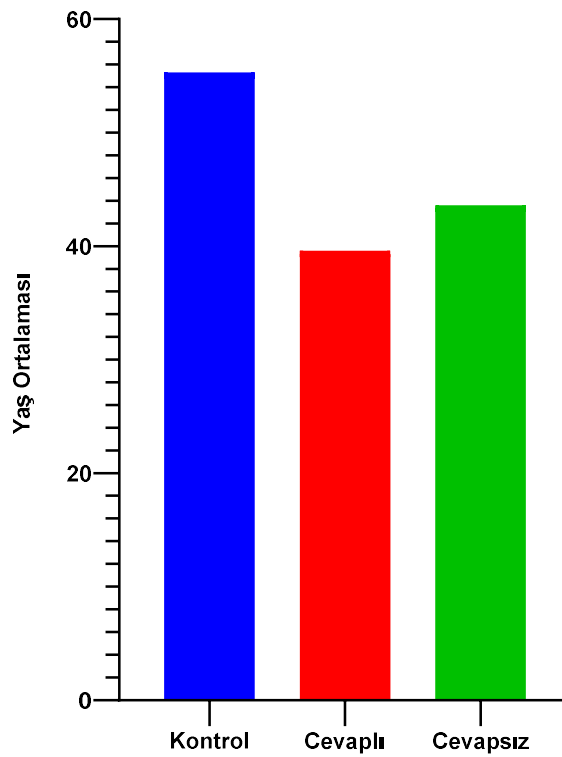
Şekil 8. Kontrol grubunun cinsiyet dağılım grafiği

Çalışmada toplamda 30 olgu çalışılmış olup cinsiyet dağılımı aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 9).

Tablo 9. Olgu grubu cinsiyet dağılımı

OLGU GRUBU	KADIN	ERKEK
TNF-A tedavisine cevap veren	2	8
TNF-A tedavisine cevap vermeyen	4	6
Kontrol grubu	6	4

Çalışmaya katılan hasta gruplarından kontrol grubunun yaş ortalaması 55,3, TNF- α tedavisine cevap veren grubun yaş ortalaması 39,6 ve TNF- α tedavisine cevap vermeyen hasta grubunun yaş ortalaması 43,6 olarak belirlenmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. Cevaplı ve cevapsız hasta grubunun yaş ortalaması grafiği

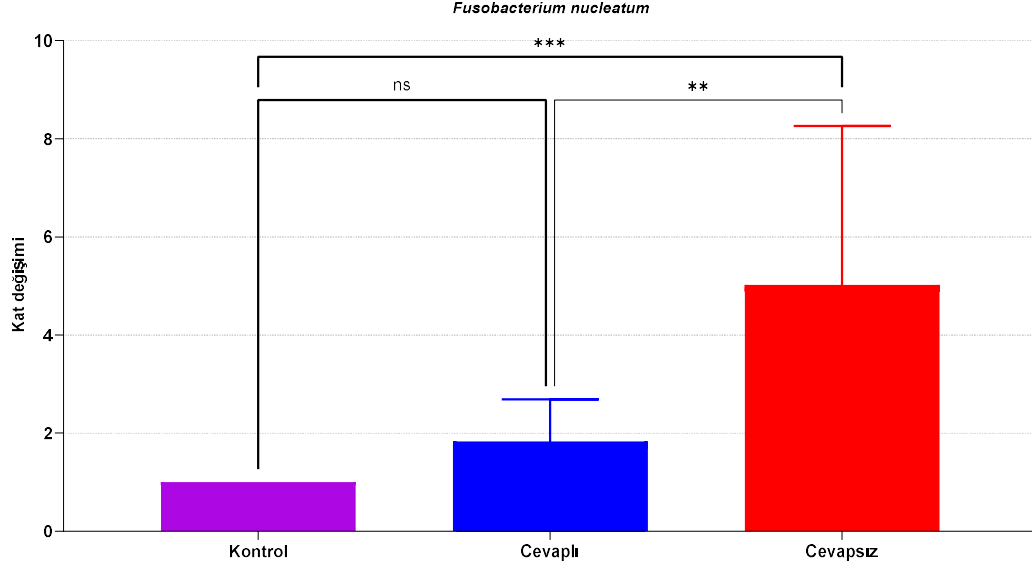
4.2. *Fusobacterium nucleatum* Yoğunluğu

TNF- α tedavisine cevap veren ve TNF- α tedavisine cevap vermeyen hasta grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TNF- α tedavisine cevap vermeyen hasta grubu *F. nucleatum* yoğunluğu kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında beş kat anlamlı ($p < 0,05$) olarak yüksek bulunmuştur. TNF- α tedavisine cevap veren hasta grubu kontrole göre karşılaştırıldığında 1,8 kat artmış olmakla birlikte anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$). Aynı zamanda TNF- α tedavisine cevap veren grup ile TNF- α tedavisine cevap vermeyen grup kendi aralarında karşılaştırıldıklarında TNF- α tedavisine cevap vermeyen hasta grubunun *F. nucleatum* yoğunluğu TNF- α tedavisine cevap veren hasta grubuna göre karşılaştırıldığında 3,2 kat anlamlı ($p < 0,05$) olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 10, Şekil 10).

Tablo 10. *F. nucleatum* Yoğunluğu

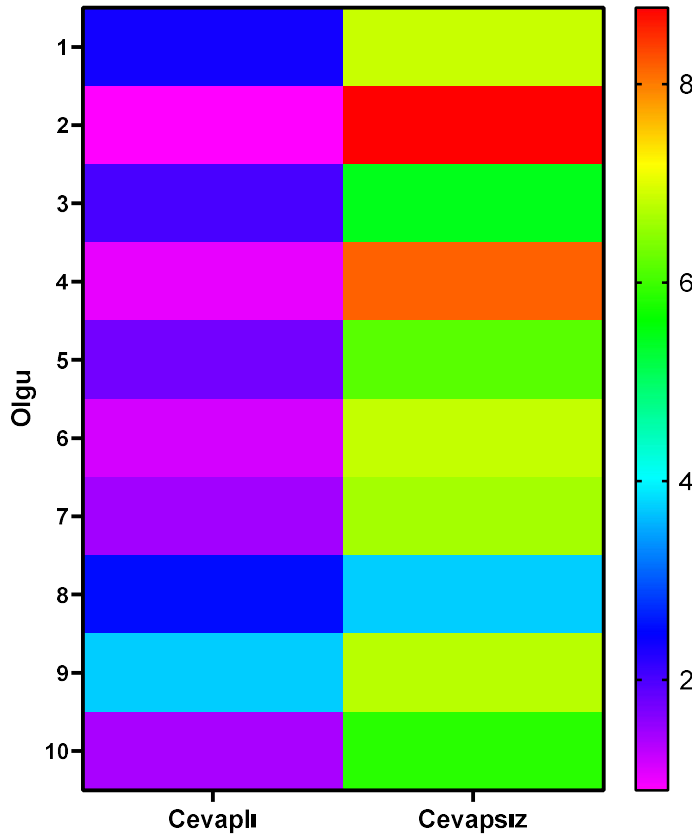
	$2^{\Delta\text{CT}}$	Kat Değişimi	Standart Sapma	p değeri
Kontrol	0,000472816	1,00	0,00	0,6088 ¹ 0,0002 ²
Cevaplı	0,002032983	1,83	2,13	0,0028 ³
Cevapsız	0,072659607	5,02	3,24	

1: Kontrol/ cevaplı p değeri, 2: Kontrol/cevapsız p değeri, 3: cevaplı/cevapsız p değeri



Şekil 10. TNF- α tedavisine cevap veren, TNF- α tedavisine cevap vermeyen ve kontrol grubunun *F. nucleatum* DNA miktarlarının karşılaştırılması (***: 0,0002, **: 0,0028, ns: “non-significant”)

Kat değışim değeriğine göre oluşturulan ısı haritasında TNF tedavisine cevap veren grubun *F. nucleatum* yoğunluğu kontrole göre daha az artış göstermiştir. Kontrol grubuna göre TNF tedavisine cevap vermeyen grubun *F. nucleatum* yoğunluğunun tedaviye cevap veren gruba göre daha fazla artış gösterdiği görülmektedir (Şekil 11).



Şekil 11. *F. nucleatum* ısı haritası

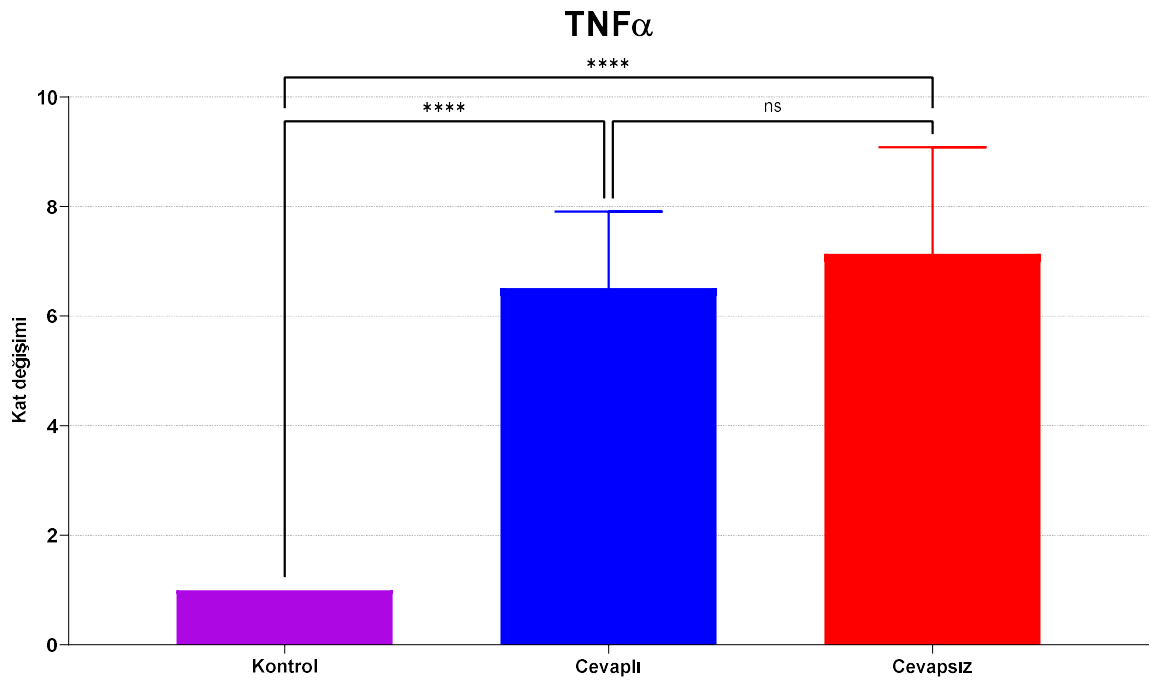
4.3. TNF- α mRNA Düzeyleri

TNF- α tedavisine cevap veren ve TNF- α tedavisine cevap vermeyen hasta grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TNF- α tedavisine cevap veren hasta grubu TNF- α mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında altı kat anlamlı ($p < 0,05$) olarak yüksek bulunmuştur. TNF- α tedavisine cevap vermeyen hasta grubu kontrole göre karşılaştırıldığında yedi kat anlamlı ($p < 0,05$) olarak yüksek bulunmuştur. Aynı zamanda TNF- α tedavisine cevap veren grup ile TNF- α tedavisine cevap vermeyen grup kendi aralarında karşılaştırıldıklarında TNF- α tedavisine cevap vermeyen hasta grubunun TNF- α mRNA ekspresyon düzeyleri TNF- α tedavisine cevap veren hasta grubuna göre karşılaştırıldığında 1,1 kat artmış olmakla birlikte anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$) (Tablo 11, Şekil 12).

Tablo 11. TNF- alfa mRNA ekspresyon düzeyleri

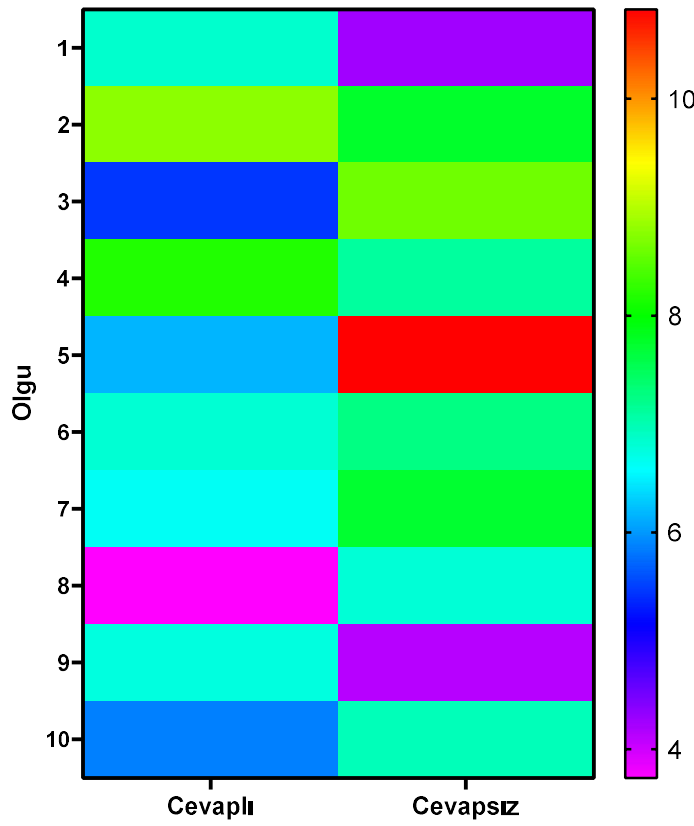
	$2^{\Delta CT}$	Kat Değişimi	Standart Sapma	p değeri
Kontrol	0,000147746	1	0	$<0,0001^1$ $<0,0001^2$
Cevaplı	0,019821124	6,51	1,39	$0,5765^3$
Cevapsız	0,047144594	7,14	1,94	

1: Kontrol/ cevaplı p değeri, 2: Kontrol/ cevapsız p değeri, 3: cevaplı/ cevapsız p değeri



Şekil 12. TNF- α tedavisine cevap veren, TNF- α tedavisine cevap vermeyen ve kontrol grubunun TNF- α mRNA ekspresyon profillerinin karşılaştırılması (****: anlamlı, ns: non-significant)

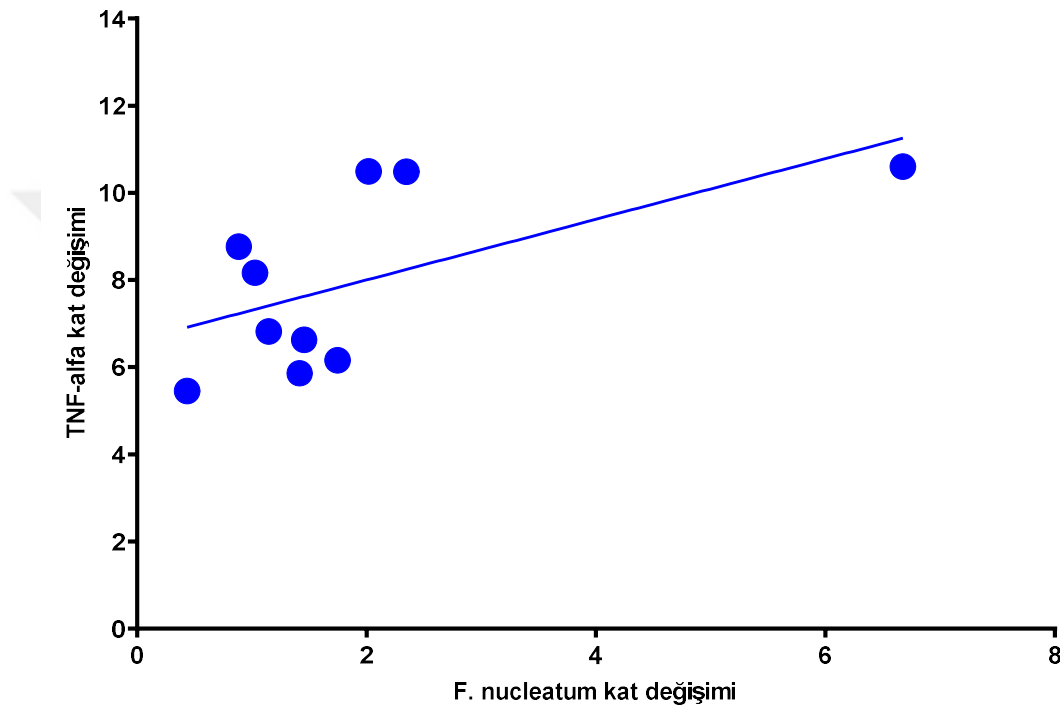
Kat değişim değerlerine göre oluşturulan ısı haritasında TNF tedavisine cevap veren grubun TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre daha az artış göstermiştir. Kontrol grubuna göre TNF tedavisine cevap vermeyen grubun TNF- α mRNA ekspresyon seviyelerinin tedaviye cevap veren gruba göre daha fazla artış gösterdiği görülmektedir (şekil 13).



şekil 13. TNF- ısı haritası

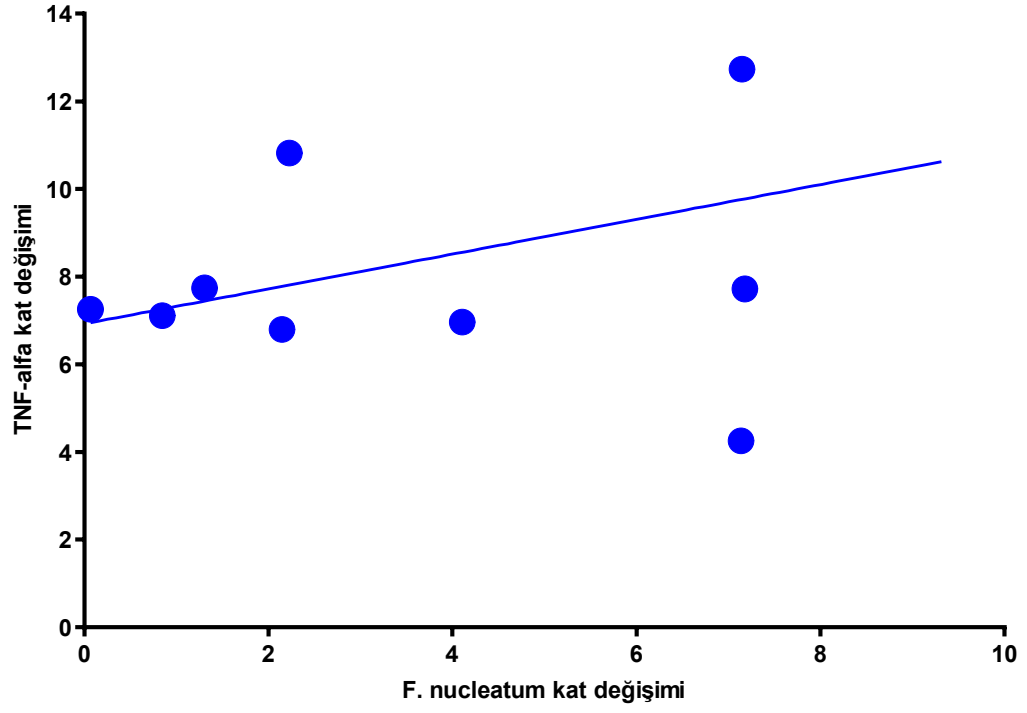
4.4. Korelasyon Analizi

Anti-TNF tedavisine cevap veren hasta grubunun *F. nucleatum* yoğunluğu ve TNF- α mRNA ekspresyon seviyelerinin kat değişimleriyle korelasyon analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda % 36 korelasyon görölmüştür. $p > 0.05$ olduğu için sonuç anlamlı değildir (Şekil 14).



Şekil 14. TNF- α tedavisine cevap veren hasta grubunun *F. nucleatum* yoğunluğu ve TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri korelasyon analizi

Anti-TNF tedavisine cevap vermeyen hasta grubunun *F. nucleatum* yoğunluğu ve TNF- α mRNA ekspresyon seviyelerinin kat değişimleriyle korelasyon analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda % 17 korelasyon görölmüştür. $p > 0.05$ olduğu için sonuç anlamlı değildir (Şekil 15).



şekil 15. TNF- α tedavisine cevap vermeyen hasta grubunun *F. nucleatum* yoğunluğu ve TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri korelasyon analizi

5. Tartışma

Son zamanlarda, özellikle *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) gibi bağırsak mikrobiyotasının, ülseratif kolit (ÜK) gibi bağırsak bağışıklık hastalıklarıyla ilişkili olduğunu gösteren ve giderek artan kanıtlar bulunmaktadır. *F. nucleatum*' un bağırsak epitelyal hücre (IEC) ölümünü nasıl teşvik ettiği mekanizması henüz belirlenmemiştir.

Su ve ark.' ların yaptığı çalışmada, *F. nucleatum*' un ÜK' de IEC ölümünü nasıl kötüleştirebileceği potansiyel mekanizmaları araştırılmıştır. İlk olarak, ÜK dokularında *F. nucleatum*' un bolluğunu tespit etmişler ve klinik özelliklerle olan ilişkisini analiz etmişlerdir. Ardından, *F. nucleatum*' un in vitro ve in vivo olarak bağırsak epitelyal hücre ölümünü teşvik edip etmediğini araştırmışlardır. Ayrıca, *F. nucleatum*' un lipopolisakkaritini (LPS) çıkarmışlar ve *F. nucleatum*' un LPS aracılığıyla ÜK' yi kötüleştirip kötüleştirmedeğini incelemişlerdir. Sonuçlar, *F. nucleatum*' un ÜK dokularında bol miktarda bulunduğunu ve klinik özelliklerle ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, *F. nucleatum* ve LPS' nin IEC ölümünü, IEC' yi otofajiye teşvik ederek kötüleştirdiğini göstermişlerdir. Dahası, otofaji inhibitörleri olan klorokin (CQ), 3-metiladenin (3-MA) veya Atg5 sessizleştirme, *F. nucleatum* tarafından iletilen IEC ölümünü engellemiştir; bu da *F. nucleatum*' un aşırı IEC otofajisini ve otofajik hücre ölümünü aktive ederek ÜK' ye katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (Su vd., 2020).

Aynı zamanda bir periodontal patojen olan *F. nucleatum* bağırsakta da bulunabilir ve bağırsak hastalıklarında rol oynayabilir. Bununla birlikte, ÜK' nin patogenezindeki rolü henüz net değildir.

Lin ve ark' ları yaptıkları çalışmada deneysel modeller oluşturmak için farelere oral olarak dekstran sülfat sodyum (DSS) çözeltisi ve *F. nucleatum* vermişlerdir. Farelerin hayatta kalma oranı, ağırlığı ve hastalık aktivitesi izlenmiştir. Kolonda *F. nucleatum* bolluğunu, kolon uzunluğunu ve histopatolojik değerlendirme ile inflamatuvar sitokinleri saptamışlardır. Bağırsak epitel hücrelerinin apoptozu TUNEL testi ve proapoptotik gen *Bax* ile değerlendirilmiştir. Epitelyal bariyer fonksiyonunu, sıkı bağlantı proteinleri ile değerlendirmişlerdir. 16S rRNA gen dizilimi ve LC-MS tabanlı yöntemlerle farelerde bağırsak mikrobiyotasının ve metabolitlerinin bileşimini analiz etmişlerdir.

Deney sonuçları analiz edildiğinde *F. nucleatum*' un alveoler kemik kaybını kolaylaştırdığını ve sadece enfekte kolon dokusunda kolonize olduğunu bulmuşlardır. DSS ile beslenen farelerde, bağırsak yapısında yıkım, interlökin bir-beta (IL-1 β) ve TNF- α ifadelerinde artış, IL-10' da azalma, IEC' lerde daha yüksek apoptoz ve mikrobiyota disbiyozu olduğunu bulmuşlardır. *F. nucleatum*, bağırsak iltihabını ve epitel bariyer hasarını daha da şiddetlendirmiştir. *F. nucleatum*' un yanında başka bakteriler de incelenmiş ve *Bifidobacterium* ve *Faecalibacterium* gibi probiyotiklerin azaldığını, fırsatçı patojenler *Escherichia-Shigella*' nın arttığını ve inflamatuvar parametreler ve metabolitlerle yüksek oranda ilişkili farklı mikroorganizmaların ortaya çıktığını görmüşlerdir.

Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde *F. nucleatum*' un ÜK' yi kötüleştirmek için bağırsak iltihabını, epitelyal bariyer bozukluğunu, mikrobiyota disbiyozunu ve metabolizma bozukluğunu teşvik ettiği sonucuna ulaşmışlardır (Lin vd., 2023).

F. nucleatum' un konak epitelyal hücrelerin yüzeyine yapışması, invazyon, enfeksiyon ve patojenlik oluşturması için bir önkoşuldur. *FadA*, *F. nucleatum* için tanımlanan tek yapışkan molekül olan yeni bir adezin olup, 129 amino asit kalıntısı ve 8 amino asitlik bir sinyal peptidi içerir (Han vd., 2005). *FadA*, *F. nucleatum* ilişkili hastalıklar için önemli bir virülans faktörü olup, konak hücrelere yapışmasında, invazyonunda ve biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (Xu vd., 2007). Araştırmalar, *F. nucleatum*' un benzersiz *FadA* adezin aracılığıyla β -katenin sinyallemesini aktive ederek onkogenik etkiler oluşturduğunu, kolorektal kanser hücrelerinin büyümesini uyardığını ve bağırsak iltihabını kötüleştirdiğini göstermiştir (Guo vd., 2020; Rubinstein vd., 2013). Ayrıca, *FadA* yalnızca bir adezin değil aynı zamanda bir invazivdir. *FadA*, hücre bağlantı molekülleri olan kadherinlere bağlanarak *F. nucleatum*' un epitelyal ve endotel hücrelere invaze olabilmesi için bir önkoşul sağlar.

Li ve ark.' ları yapmış oldukları çalışmada sağlıklı grup, ÜK hastaları, kolorektal kanser (KRK) hastaları ve irritabl bağırsak sendromu (IBS) hastalarında *F. nucleatum*' u karşılaştırmışlardır. Aynı zamanda dört grup içindeki pozitif örneklerden *F. nucleatum*' un varlığını ve *FadA* geninin varlığını da tespit etmişlerdir.

ÜK hastalarının ve KRK hastalarının *F. nucleatum* için 16s rRNA temelli PCR tespit oranlarını, sağlıklı grup ve IBS hastalarıyla karşılaştırdıklarında önemli ölçüde daha yüksek bulmuşlardır. Ayrıca, ÜK hastalarının 39 pozitif *F. nucleatum* örneğinden 19

tanesinde *FadA* pozitif saptanmıştır bu oranı sağlıklı grup ile karşılaştırdıklarında önemli derecede yüksek bulmuşlardır. Bununla birlikte, ciddi ÜK' li hastalarda *F. nucleatum*' un virülans geni *FadA*' nın tespit oranını, hafif ve orta şiddetli kolitli hastalara göre önemli derecede daha yüksek bulmuşlardır (Li vd., 2021).

F. nucleatum' un ÜK' de bağırsak iltihabını nasıl desteklediği mekanizması henüz tam olarak belirlenememiştir. Chen ve ark' ları yaptığı çalışmada *F. nucleatum*' un ÜK dokularında bolluğunu ve hastalık aktivitesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. ÜK dokularından *F. nucleatum* suşu izole etmiş ve *F. nucleatum*' un *in vitro* ve *in vivo* olarak bağırsak iltihaplanmasını nasıl kötüleştirdiğini araştırmışlardır. Kolon epitel hücre hatlarını enfekte etmek için *E. coli* (DH5 α ; kontrol bakteri) ve *F. nucleatum* kullanmışlar ve *F. nucleatum*' un, *E. coli*' ye (DH5 α) göre, *in vitro* koşullarda kanonik NF- κ B yolağını aktive edebildiğini göstermişlerdir. Ardından, DSS fare modelini kullanarak *F. nucleatum*' un, *E. coli*' ye (DH5 α) göre, canlı ortamda proinflatuar sitokinlerin (örneğin IL-1 β , IL-6, IL-17F ve TNF- α) ifadesini artırabildiğini ve mukozal bariyeri kanonik NF- κ B yolağı aracılığıyla bozabildiğini doğrulamışlardır. Sonuçları, *F. nucleatum*' un ÜK dokularının %51.78' inde zenginleştiğini ve klinik seyir, klinik aktivite ve dirençli davranış ile ilişkili olduğunu göstermiştir ($p < 0.05$). Ayrıca, *F. nucleatum*' un bağırsak epitelyal hasarı ve IL-1 β , IL-6, IL-17F ve TNF- α gibi inflammatuar sitokinlerin ekspresyonunu artırdığını da göstermişlerdir (Chen vd., 2020).

Yamashita ve ark' ları yaptıkları çalışmada ise *F. nucleatum*' un dekstran sülfat sodyum (DSS) ile indüklenen kolitin remisyonundaki rolünü araştırmışlardır. Bunun için öncelikle kullanacakları dişi fareleri DC (DSS kontrolü) ve DF (DSS + *F. nucleatum*) olarak iki gruba ayırmışlardır. Fosfat tamponlu salin (PBS) içindeki *F. nucleatum* (1.0×10^{10} cfu/fare/gün), DF' ye oral olarak verilirken DC' ye sadece PBS verilmiştir. Kolit oluşturmak için tüm farelerin içme suyuna DSS eklenmiştir. Deney 1' de fareler 2 inflamasyon aşamasından geçmiş, ara iyileşme aşamasına sahip olmuş ve hastalık aktivite indeksleri (DAI) hesaplanmıştır. Deney 2 benzer şekilde gerçekleştirilmiştir, ancak fareleri iyileşmenin ardından 3 gün sonra diseke etmişler ve kan ve kolon mukozal örneklerini toplamışlardır. Deney 1' de DF grubu, iyileşme ve ikinci inflamasyon aşamalarında DC grubuna göre anlamlı olarak ($P < 0.05$) daha yüksek DAI' ye sahip bulunmuştur. Deney 2' de DF' nin çekum mukozası ile ilişkili mikrobiyotada *Bacteroides* cinsi anlamlı olarak ($P < 0.05$) yüksek, *Lachnospiraceae* familyasını ise DC grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulmuşlardır.

Araştırmacıların sonuçları *F. nucleatum*' un kolit iyileşmesini engelleyebileceğini düşündürmektedir (Yamashita vd., 2021).

Yine İBH' nin patogenezi araştırmak amacıyla yapılan farklı bir çalışmada Liu ve ark. İBH' li 91 hastanın ve 43 sağlıklı bireyin dışkı örneklerinde İBH veya kolorektal kanserle ilişkili olduğu bildirilen birkaç bakteri ölçmüşlerdir. *F. nucleatum*' un patojenitesini araştırmak için DSS kaynaklı kolit ve Caco-2 hücre dizisine sahip fareler kullanmışlardır. Bariyer hasarı, bir transmisyon elektron mikroskobu, floresan izotiyosiyanat-dekstran geçirgenliği, transepitelyal elektrik direnci ve immüno floresan ile değerlendirilmiştir. Hücre-hücre bağlantısının protein seviyeleri ve STAT3 sinyal yolunun aktivasyonu, immünohistokimya ve immüno blot ile tespit edilmiştir. Sitokin salgılanması ve T-hücre farklılaşması, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ve akış sitometrisi ile ölçülmüştür. Deney sonucunda *F. nucleatum*' u, İBH' li hastaların dışkısında önemli ölçüde daha fazla bulmuşlardır. Ayrıca *F. nucleatum*' un bolluğu hastalık aktivitesi ile korele bulunmuştur. *F. nucleatum* uyguladıkları DSS fare modelinde kolit belirgin şekilde şiddetlenmiştir. Mekanik olarak *F. nucleatum*' un, sıkı bağlantı proteinleri zonula occludens-1 ve okludin' in ekspresyonunu ve dağılımını düzenleyerek epitel bütünlüğüne zarar verdiğini ve geçirgenliği arttırdığını bulmuşlardır. Ayrıca, *F. nucleatum* sitokinlerin (tümör nekroz faktör- α , interferon- γ , interleukin [IL]-1 β , IL-6 ve IL-17) salınımını teşvik etmiş, STAT3 sinyal yolunu aktive etmiş ve CD4+T hücre proliferasyonunu ve Th1 ile Th17 alt küme diferansiyasyonunu indüklemiştir. Sonuç olarak *F. nucleatum*' un bağırsak bariyerine zarar verebileceği ve koliti şiddetlendiren anormal inflamasyonu indükleyebileceği görülmüştür (H. Liu vd., 2020).

Başka bir çalışmada ise çocukluk çağı kronik inflamatuvar barsak hastalığında TNF- α serum konsantrasyonları incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada 31 sağlıklı çocukta, 65 klinik remisyonda olan çocukta ve 54 nüks dönemindeki çocukta serum tümör TNF- α konsantrasyonlarını enzim bağlı immünoadsorbans testi ile ölçmüşlerdir. Anlamlı TNF- α artışını sadece ülseratif kolit ve kolonik Crohn hastalığı nüksünde olan çocuklarda bulmuşlardır. Nüks dönemindeki Crohn hastalığı olan çocuklar, hastalık indeksindeki eşdeğer artışa rağmen, kontrol konsantrasyonlarının üzerinde bir TNF alfa artışı göstermemiştir. Kalın bağırsak Crohn hastalığı ve ülseratif kolit nüksü olan çocuklarda büyüme hızı, remisyondaki eşdeğer duruma kıyasla düşük bulmuşlardır. Büyüme hızındaki bozulma, kalın bağırsak Crohn hastalığı ve ülseratif kolit nüksünde, yalnızca

ince bağırsak Crohn hastalığına kıyasla önemli ölçüde daha fazla çıkmış, ancak evre 1 ergenlik alt grupları için farklar anlamlı bulunamamıştır. Kronik inflamatuvar bağırsak hastalığında yetersiz büyüme şu anda yetersiz beslenmeye bağlanırken, TNF- α ' da kaşeksi oluşturan etkileri yoluyla buna katkıda bulunabilir olarak yorumlamışlardır. Bu sonuçlar, TNF- α üretiminin kolonik inflamatuvar bağırsak hastalığı nüksünde büyüme başarısızlığıyla ilişkili olabileceğini göstermektedir. TNF- α ' da anlamlı artışı sadece ÜK ve CH nüksetmiş çocuklarda bulmuşlardır (Murch vd., 1991).

Dharmani ve ark' ların yaptığı çalışmada, Crohn hastalığı olan hastaların inflamasyonlu bağırsaklarından elde edilen çok invaziv *F. nucleatum* izolatlarının, noninflamasyonlu bağırsaktan elde edilen daha az invaziv suşlara kıyasla insan kolon epitel hücrelerinde ve sıçan bağırsak enfeksiyon modelinde MUC2 ve TNF- α gen ifadesini önemli ölçüde artırdığını göstermişlerdir. Sadece canlı *F. nucleatum*, kolon hücreleriyle doğrudan temas halinde veya kolon hücrelerini invaze ederken mukus salgılanmasını ve TNF- α ifadesini uyarabilmektedir. Sıçan kolonlarında, mukus salgılanması yüksek invaziv bir *F. nucleatum* izolatına yanıt olarak artarken, düşük invaziv suşla tedavi edildiğinde etkilenmemiştir. Bu çalışma, *F. nucleatum*' un bağırsak inflamatuvar hastalıkların etiyolojisinde zorlayıcı bir patojen olabileceğini ve hastalık patogenezinde aday bakteri türlerinin farklı patotiplerinin önemini göstermektedir (Dharmani vd., 2011).

Aynı zamanda onkobakteri olan *F. nucleatum*, bağırsakta zararlı moleküller taşıyan hücre dışı veziküller salgılar ve bu moleküller ÜK' de mikroorganizma-konak etkileşimini, özellikle de epitelyal homeostazı değiştirebilir. Ancak bu mekanizma henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Liu ve ark.' ları önce, *F. nucleatum* kültür ortamından ultrasonik santrifüjle hücre dışı veziküller izole etmiş ve bunları pro-inflamatuvar sitokinlerin güçlü indükleyicisi olarak karakterize etmişlerdir. Mekanizmayı detaylı olarak incelemişlerdir. Makrofaj/Caco-2 birlikte kültürlerinde, *F. nucleatum* hücre dışı vezikülleri önemli ölçüde epitelyal bariyer kaybını ve oksidatif stres hasarını teşvik etmiş ve bunlar, reseptör etkileşen protein kinaz 1 (RIPK1) ve reseptör etkileşen protein kinaz 3 (RIPK3) tarafından neden olunan epitelyal nekroptozaya ilişkili bulunmuştur. Ayrıca, *F. nucleatum* hücre dışı vezikülleri, RIPK1 ve RIPK3' ün Caco-2 hücrelerinde nekrozoma göçünü teşvik etmiştir. Özellikle, bu etkiler, TNF- α nötralizan antikoru veya RIPK1 inhibitörü olan Necrostatin-1 (Nec-1) ile tersine çevrilmiştir. Bu, FADD-RIPK1-kaspaz-3 sinyalinin sürece dahil olduğunu

düşündürmektedir. Dahası, *F. nucleatum* hücre dışı veziküllerle tedavi edilen fare kolit modelinde veya *F. nucleatum* hücre dışı veziküllerle eğitilmiş makrofajların adoptif transferiyle gözlemlenen etkiler doğrulanmıştır. Bu sonuçlar, RIPK1 aracılı epitelyal hücre ölümünün ÜK' de *F. nucleatum* hücre dışı veziküller tarafından indüklenen bağırsak bariyerinin bozulmasını teşvik ettiğini düşündürmektedir (L. Liu vd., 2021).

F. nucleatum' un aynı zamanda kolorektal kanser metaztasında etkili olduğu da düşünülmektedir. Yin ve ark' ları yaptıkları çalışmada farelerde KRK' nin mikrobiyota-karaciğer eksenini üzerine *F. nucleatum*' un katkısını araştırmış ve karaciğer bağışıklığı ile bağırsak mikrobiyota değişiklikleri arasındaki ilişkiye bakmışlardır. *F. nucleatum*' u farelere oral olarak verdiklerinde, KRK karaciğer metastazı belirgin bir şekilde artmış ve aynı zamanda vücut ağırlığı, çekum ağırlığı ve genel sağkalım süresi üzerinde fark edilir derecede negatif etkiler görmüşlerdir. Bağışıklık yanıtının ve sitokin profilinin daha fazla değerlendirilmesi ile *F. nucleatum* ile enfekte edilen farelerin plazmasında IL6, IL12, IL9, IL17A, CXCL1, MCP-1, TNF- α ve IFN- γ gibi pro-inflamatuvar sitokin düzeylerinde belirgin bir artış olduğunu bulmuşlardır. Bunlar kontrol grubundaki enfekte edilmemiş farelere kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Aynı zamanda, sürekli *F. nucleatum* maruziyeti fare bağırsak mikrobiyota çeşitliliğini azaltmış ve dengesiz ve yeniden yapılandırılmış bir bağırsak mikrobiyotası oluşturmuştur. Özellikle, fareler *F. nucleatum* ile enfekte edildikten sonra *Enterococcus* ve *Escherichia/Shigella* gibi KRK teşvik edici bakterilerin de arttığını görmüşlerdir. Tüm bu bulgular, *F. nucleatum*' un bağırsak mikrobiyota yapısı ve kompozisyonunun düzenlenmesi yoluyla karaciğer bağışıklığını tetikleyerek KRK karaciğer metastazını teşvik eden önemli bir faktör olabileceğini göstermektedir (Yin vd., 2022).

Tüm bu çalışmalarda *F. nucleatum*' un TNF- α ekspresyonunu arttırdığı gösterilmektedir. Ancak ÜK' de kullanılan anti-TNF tedavisine hastaların verdiği yanıt durumunun *F. nucleatum* ve TNF- α ile ilişkisi incelenmemiştir.

Çalışmamızda ÜK' li hastalardan anti-TNF tedavisine başlamadan önce alınan dokular incelenmiştir. Daha sonra hastalar anti-TNF tedavisine başlamış olup tedaviye cevap verip vermediklerini belirlemek için takip edilmiştir. Alınan dokulardan *F. nucleatum* miktar analizi yapılmış ve TNF- α mRNA ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. *F. nucleatum* yoğunluğu incelendiğinde literatür ile uyumlu olarak kontrol grubuna karşılık ÜK' li hastalarda *F. nucleatum* miktarının artmış olduğu bulunmuştur.

Bununla birlikte anti-TNF tedavisine cevap vermeyen hastalarda cevap veren hastalara karşılık *F. nucleatum* yoğunluğu fazla bulunmuştur.

TNF- α mRNA ekspresyon düzeylerine bakıldığında kontrol grubuna kıyasla anti-TNF tedavisine cevap veren ve cevap vermeyen hasta grubunun TNF- α mRNA ekspresyon düzeyleri anlamlı olarak fazla bulunmuştur. Hasta grupları kendi aralarında karşılaştırıldıklarında artış görülmüştür ancak anlamlı değildir ($p > 0.05$).

Bu sonuçlar *F. nucleatum* yoğunluğu ile anti-TNF tedavisine verilecek cevabın orantılı olduğunu düşündürmektedir.



6. Sonuç ve Öneriler

F. nucleatum' un TNF- α ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Ancak, anti-TNF tedavisine yanıt verme durumuyla *F. nucleatum* ve TNF- α arasındaki ilişki, ülseratif kolit hastalarında incelenmemiştir. Bu çalışmada, anti-TNF tedavisine başlamadan önce ÜK' li hastalardan alınan dokular incelenmiştir. Daha sonra hastalar anti-TNF tedavisine başlamış ve tedaviye verdikleri yanıt izlenmiştir. Alınan dokulardan *F. nucleatum* yoğunluğu analiz edilmiş ve TNF- α mRNA ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. *F. nucleatum* yoğunluğu incelendiğinde, literatürle uyumlu olarak, ÜK' li hastalarda kontrol grubuna kıyasla *F. nucleatum* miktarının arttığı bulunmuştur. Bunun yanı sıra, anti-TNF tedavisine yanıt vermeyen hastalarda, yanıt veren hastalara kıyasla *F. nucleatum* yoğunluğu daha yüksek bulunmuştur.

TNF- α mRNA ekspresyon düzeylerine bakıldığında, anti-TNF tedavisine yanıt veren ve vermeyen hasta grupları kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek TNF- α mRNA ekspresyon düzeylerine sahiptir. Ancak, hasta grupları arasında yapılan karşılaştırmalarda bu artış olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$).

Bulduğumuz sonuçlar, *F. nucleatum* yoğunluğunun anti-TNF tedavisine verilen yanıtla orantılı olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda anti-TNF tedavisine başlanmadan önceki doku örnekleri kullanılmıştır. İleri çalışma olarak tedavi başladıktan sonraki doku örnekleri ile karşılaştırılması önerilmektedir.

Yine ileri çalışma olarak anti-TNF tedavisine cevap veren ve cevap vermeyen hasta gruplarından elde edilecek *F. nucleatum* suşlarının invazyon düzeylerine bakılması önerilmektedir.

7. Kaynaklar

- Abraham, C., & Cho, J. H. (2009). Inflammatory Bowel Disease. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804647>, 361(21), 2066-2078. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA0804647>
- Allez, M., Karmiris, K., Louis, E., Van Assche, G., Ben-Horin, S., Klein, A., Van der Woude, J., Baert, F., Eliakim, R., Katsanos, K., Brynskov, J., Steinwurz, F., Danese, S., Vermeire, S., Teillaud, J. L., Lémann, M., & Chowers, Y. (2010). Report of the ECCO pathogenesis workshop on anti-TNF therapy failures in inflammatory bowel diseases: Definitions, frequency and pharmacological aspects. *Journal of Crohn's and Colitis*, 4(4), 355-366. <https://doi.org/10.1016/J.CROHNS.2010.04.004>
- Ananthakrishnan, A. N. (2015). Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: A Review. *Digestive Diseases and Sciences*, 60(2), 290-298. <https://doi.org/10.1007/S10620-014-3350-9/METRICS>
- Andoh, A., Imaeda, H., Aomatsu, T., Inatomi, O., Bamba, S., Sasaki, M., Saito, Y., Tsujikawa, T., & Fujiyama, Y. (2011). Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Gastroenterology*, 46(4), 479-486. <https://doi.org/10.1007/S00535-010-0368-4/TABLES/3>
- Brynskov, J., Foegh, P., Pedersen, G., Ellervik, C., Kirkegaard, T., Bingham, A., & Saermark, T. (2002). Tumour necrosis factor α converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 51(1), 37-43. <https://doi.org/10.1136/GUT.51.1.37>
- Chen, Y., Chen, Y., Cao, P., Su, W., Zhan, N., & Dong, W. (2020). *Fusobacterium nucleatum* facilitates ulcerative colitis through activating IL-17F signaling to NF- κ B via the upregulation of CARD3 expression. *The Journal of Pathology*, 250(2), 170-182. <https://doi.org/10.1002/PATH.5358>
- Chen, Y., Peng, Y., Yu, J., Chen, T., Wu, Y., Shi, L., Li, Q., Wu, J., Fu, X., Chen, Y., Peng, Y., Yu, J., Chen, T., Wu, Y., Shi, L., Li, Q., Wu, J., & Fu, X. (2017). Invasive *Fusobacterium nucleatum* activates beta-catenin signaling in colorectal cancer via a TLR4/P-PAK1 cascade. *Oncotarget*, 8(19), 31802-31814. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.15992>

- Clark, M., Colombel, J. F., Feagan, B. C., Fedorak, R. N., Hanauer, S. B., Kamm, M. A., Mayer, L., Regueiro, C., Rutgeerts, P., Sandborn, W. J., Sands, B. E., Schreiber, S., Targan, S., Travis, S., & Vermeire, S. (2007). American Gastroenterological Association Consensus Development Conference on the Use of Biologics in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease, June 21–23, 2006. *Gastroenterology*, 133(1), 312-339. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2007.05.006>
- Danese, S. (2008). Mechanisms of action of infliximab in inflammatory bowel disease: an anti-inflammatory multitasker. *Digestive and Liver Disease*, 40(SUPPL. 2), S225-S228. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(08\)60530-7](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(08)60530-7)
- Dharmani, P., Strauss, J., Ambrose, C., Allen-Vercos, E., & Chadee, K. (2011). *Fusobacterium nucleatum* infection of colonic cells stimulates MUC2 mucin and tumor necrosis factor alpha. *Infection and Immunity*, 79(7), 2597-2607. <https://doi.org/10.1128/IAI.05118-11/ASSET/6F27C076-A7C3-40E9-9159-FA3C155A583C/ASSETS/GRAPHIC/ZII9990992170005.JPEG>
- Duboc, H., Rajca, S., Rainteau, D., Benarous, D., Maubert, M. A., Quervain, E., Thomas, G., Barbu, V., Humbert, L., Despras, G., Bridonneau, C., Dumetz, F., Grill, J. P., Masliah, J., Beaugerie, L., Cosnes, J., Chazouillères, O., Poupon, R., Wolf, C., ... Seksik, P. (2013). Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut*, 62(4), 531-539. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2012-302578>
- Flynn, S., & Eisenstein, S. (2019). Inflammatory Bowel Disease Presentation and Diagnosis. *Surgical Clinics of North America*, 99(6), 1051-1062. <https://doi.org/10.1016/J.SUC.2019.08.001>
- Frank, D. N., St. Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., & Pace, N. R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(34), 13780-13785. https://doi.org/10.1073/PNAS.0706625104/SUPPL_FILE/06625TABLE2.PDF
- GeneGlobe Data Analysis Center | NGS & PCR Analysis Tools | GeneGlobe. (t.y.).
Geliş tarihi 21 Haziran 2023, gönderen <https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze>

- Guan, Q. (2019). A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Immunology Research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7247238>
- Guo, P., Tian, Z., Kong, X., Yang, L., Shan, X., Dong, B., Ding, X., Jing, X., Jiang, C., Jiang, N., & Yu, Y. (2020). FadA promotes DNA damage and progression of *Fusobacterium nucleatum*-induced colorectal cancer through up-regulation of chk2. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 39(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/S13046-020-01677-W/FIGURES/7>
- Han, Y. W., Ikegami, A., Rajanna, C., Kawsar, H. I., Zhou, Y., Li, M., Sojar, H. T., Genco, R. J., Kuramitsu, H. K., & Deng, C. X. (2005). Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral fusobacteria. *Journal of Bacteriology*, 187(15), 5330-5340. <https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5330-5340.2005/ASSET/D0EE72DD-87BB-454E-9488-232FA7780590/ASSETS/GRAPHIC/ZJB0150549460007.JPEG>
- Hibi, T., & Ogata, H. (2006). Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology*, 41(1), 10-16. <https://doi.org/10.1007/S00535-005-1744-3/METRICS>
- Hodson, R. (2016). Inflammatory bowel disease. *Nature* 2016 540:7634, 540(7634), S97-S97. <https://doi.org/10.1038/540s97a>
- Hyun, C. K. (2021). Molecular and Pathophysiological Links between Metabolic Disorders and Inflammatory Bowel Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 9139, 22(17), 9139. <https://doi.org/10.3390/IJMS22179139>
- Khan, I., Ullah, N., Zha, L., Bai, Y., Khan, A., Zhao, T., Che, T., & Zhang, C. (2019). Alteration of Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease (IBD): Cause or Consequence? IBD Treatment Targeting the Gut Microbiome. *Pathogens* 2019, Vol. 8, Page 126, 8(3), 126. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS8030126>
- Kobayashi, T., Siegmund, B., Le Berre, C., Wei, S. C., Ferrante, M., Shen, B., Bernstein, C. N., Danese, S., Peyrin-Biroulet, L., & Hibi, T. (2020). Ulcerative colitis. *Nature Reviews Disease Primers* 2020 6:1, 6(1), 1-20. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0205-x>

- Laass, M. W., Roggenbuck, D., & Conrad, K. (2014). Diagnosis and classification of Crohn's disease. *Autoimmunity Reviews*, 13(4-5), 467-471. <https://doi.org/10.1016/J.AUTREV.2014.01.029>
- Li, D. H., Li, Z. P., Yan Zhang, Zhou, G. Z., Ren, R. R., Zhao, H. J., Zhang, N. N., Li, J. F., Peng, L. H., & Yang, Y. S. (2021). Fecal *Fusobacterium nucleatum* harbored virulence gene *fadA* are associated with ulcerative colitis and clinical outcomes. *Microbial Pathogenesis*, 157, 104964. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2021.104964>
- Lin, S., Zhang, X., Zhu, X., Jiao, J., Wu, Y., Li, Y., & Zhao, L. (2023). *Fusobacterium nucleatum* aggravates ulcerative colitis through promoting gut microbiota dysbiosis and dysmetabolism. *Journal of Periodontology*, 94(3), 405-418. <https://doi.org/10.1002/JPER.22-0205>
- Liu, D., Saikam, V., Skrada, K. A., Merlin, D., & Iyer, S. S. (2022). Inflammatory bowel disease biomarkers. *Medicinal Research Reviews*, 42(5), 1856-1887. <https://doi.org/10.1002/MED.21893>
- Liu, H., Hong, X. L., Sun, T. T., Huang, X. W., Wang, J. L., & Xiong, H. (2020). *Fusobacterium nucleatum* exacerbates colitis by damaging epithelial barriers and inducing aberrant inflammation. *Journal of Digestive Diseases*, 21(7), 385-398. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12909>
- Liu, L., Liang, L., Yang, C., Zhou, Y., & Chen, Y. (2021). Extracellular vesicles of *Fusobacterium nucleatum* compromise intestinal barrier through targeting RIPK1-mediated cell death pathway. *Gut Microbes*, 13(1), 1-20. https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1902718/SUPPL_FILE/KGMI_A_1902718_SM2363.XLSX
- Liu, S., Zhao, W., Lan, P., & Mou, X. (2021). The microbiome in inflammatory bowel diseases: from pathogenesis to therapy. *Protein & Cell*, 12(5), 331-345. <https://doi.org/10.1007/S13238-020-00745-3>
- Mentella, M. C., Scaldaferri, F., Pizzoferrato, M., Gasbarrini, A., & Miggiano, G. A. D. (2020). Nutrition, IBD and Gut Microbiota: A Review. *Nutrients* 2020, Vol. 12, Page 944, 12(4), 944. <https://doi.org/10.3390/NU12040944>
- Murch, S. H., Lamkin, V. A., Savage, M. O., Walker-Smith, J. A., & MacDonald, T. T. (1991). Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood

- chronic inflammatory bowel disease. *Gut*, 32(8), 913-917. <https://doi.org/10.1136/GUT.32.8.913>
- Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., & Kaplan, G. G. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, 390(10114), 2769-2778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0)
- Nishida, A., Inoue, R., Inatomi, O., Bamba, S., Naito, Y., & Andoh, A. (2017). Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical Journal of Gastroenterology* 2017 11:1, 11(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/S12328-017-0813-5>
- Polak, D., Wilensky, A., Shapira, L., Halabi, A., Goldstein, D., Weiss, E. I., & Hourihaddad, Y. (2009). Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(5), 406-410. <https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.2009.01393.X>
- Rubin, D. T., Ananthakrishnan, A. N., Siegel, C. A., Sauer, B. G., & Long, M. D. (2019). ACG Clinical Guideline: Ulcerative Colitis in Adults. *American Journal of Gastroenterology*, 114(3), 384-413. <https://doi.org/10.14309/AJG.0000000000000152>
- Rubinstein, M. R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., & Han, Y. W. (2013a). Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell host & microbe*, 14(2), 195. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2013.07.012>
- Rubinstein, M. R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., & Han, Y. W. (2013b). Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell host & microbe*, 14(2), 195. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2013.07.012>
- Ruigrok, R. A. A., Collij, V., Sureda, P., Klaassen, M. A. Y., Bolte, L. A., Jansen, B. H., Voskuil, M. D., Fu, J., Wijmenga, C., Zhernakova, A., Weersma, R. K., & Vich Vila, A. (2021). The Composition and Metabolic Potential of the Human Small Intestinal Microbiota Within the Context of Inflammatory Bowel Disease.

- Journal of Crohn's and Colitis*, 15(8), 1326-1338.
<https://doi.org/10.1093/ECCO-JCC/JJAB020>
- Somineni, H. K., & Kugathasan, S. (2019). The Microbiome in Patients With Inflammatory Diseases. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 17(2), 243-255. <https://doi.org/10.1016/J.CGH.2018.08.078>
- Su, W., Chen, Y., Cao, P., Chen, Y., Guo, Y., Wang, S., & Dong, W. (2020). *Fusobacterium nucleatum* Promotes the Development of Ulcerative Colitis by Inducing the Autophagic Cell Death of Intestinal Epithelial. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 594806. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.594806/BIBTEX>
- Swardfager, W., Lancett, K., Rothenburg, L., Wong, A., Cappell, J., & Herrmann, N. (2010). A Meta-Analysis of Cytokines in Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry*, 68(10), 930-941. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2010.06.012>
- Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B., Peyrin-Biroulet, L., & Colombel, J. F. (2017). Ulcerative colitis. *The Lancet*, 389(10080), 1756-1770. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32126-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32126-2)
- Wang, R., Li, Z., Liu, S., & Zhang, D. (2023). Global, regional and national burden of inflammatory bowel disease in 204 countries and territories from 1990 to 2019: a systematic analysis based on the Global Burden of Disease Study 2019. *BMJ Open*, 13(3), e065186. <https://doi.org/10.1136/BMJOPEN-2022-065186>
- Watts, T. H. (2004). TNF/TNFR FAMILY MEMBERS IN COSTIMULATION OF T CELL RESPONSES. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115839>, 23, 23-68. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.23.021704.115839>
- Xu, M., Yamada, M., Li, M., Liu, H., Chen, S. G., & Han, Y. W. (2007). FadA from *Fusobacterium nucleatum* utilizes both secreted and nonsecreted forms for functional oligomerization for attachment and invasion of host cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(34), 25000-25009. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611567200>
- Yamashita, T., Tai, S., Tsukahara, T., & Inoue, R. (2021). *Fusobacterium nucleatum* impedes remission of colitis in a mouse model. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 85(5), 1235-1242. <https://doi.org/10.1093/BBB/ZBAB029>

- Yang, M., Gu, Y., Li, L., Liu, T., Song, X., Sun, Y., Cao, X., Wang, B., Jiang, K., & Cao, H. (2021). Bile Acid–Gut Microbiota Axis in Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside. *Nutrients* 2021, Vol. 13, Page 3143, 13(9), 3143. <https://doi.org/10.3390/NU13093143>
- Yin, H., Miao, Z., Wang, L., Su, B., Liu, C., Jin, Y., Wu, B., Han, H., & Yuan, X. (2022). *Fusobacterium nucleatum* promotes liver metastasis in colorectal cancer by regulating the hepatic immune niche and altering gut microbiota. *Aging*, 14(4), 1941-1958. <https://doi.org/10.18632/AGING.203914>
- Zhang, Y. Z., & Li, Y. Y. (2014). Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(1), 91-99. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.91>



8. Ekler

➤ Etik Kurul Belgesi



T.C. EGE ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
 Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
 Tel : 0 232 390 2134 e-mail: tibbietik@yahoo.com.
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

Microsoft Teams Programı ile Teletoplantı gerçekleştirilmiştir.

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Üseratif Koilitte Fuscobacterium nucleatum Miktarının Hastalık Aktivitesi Üzerine Etkisi
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Sunde Yılmaz Süslüer
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Uzm. Dr. Nalan Gülşen Ünal, Prof. Dr. Ataç Uzel, Prof. Dr. Başak DOĞANAVŞARGİL YAKUT, Yüksek Öğrencisi Mehmet Erasian
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
	DESTEKLEYİCİ	Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi
	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	-
	BİLGİLENDİRME FORMU	-
	VERİ İZLEME FORMU/ ANKET	☐
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒
	DİĞER	☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 20-4.1T/17	Tarih: 15.04.2020
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler: araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğu toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

EGE ÜNİVERSİTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU Başkan	Halk Sağlığı AD	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	UYGUNDUR
Prof. Dr. Şafak DAĞHAN Başkan Yardımcısı	Halk Sağlığı Hemşireliği AD.	Ege Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	UYGUNDUR
Prof. Dr. Zeliha KERRY Üye	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU	İMZA	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi		Sayfa 1/2
---	------	----------------------------------	--	--------------



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
Tel: 0 232 390 2134 e-mail: tbbietik@yahoo.com.
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Ülseratif Kollitide Fusobacterium nucleatum Miktarının Hastalık Aktivitesi Üzerine Etkisi
-----------------------	---

KARAR BİLGİLERİ		Karar Nu: 20-4.1T/17				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Eyüp Sabri ERCAN Üye	Çocuk Ruh Sağlığı	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Ayhan DÖNMEZ Üye	İç Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Murat ULUKUŞ Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Ceyda KABAROĞLU Üye	Klinik Biyokimya BD.	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD. Klinik Biyokimya BD.	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	UYGUNDUR
Prof. Dr. Özen Önen SERTÖZ Raportör Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	UYGUNDUR
Prof. Dr. H. Oya TÜRKOĞLU ÇAKAL Üye	Periodontoloji	Ege Üniversitesi Diş Hek. Fakültesi Periodontoloji AD	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	UYGUNDUR
Doç. Dr. Recı MESERİ Üye	Beslenme ve Diyetetik AD	Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik AD	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	UYGUNDUR
Doç. Dr. Tahir ATİK Üye	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları AD Çocuk	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	UYGUNDUR
Doç. Dr. Tolga AKŞİT Üye	Antrenörlük Eğitimi - Hareket ve Antrenman Bilimleri	Ege Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi Hareket ve Antrenman Bilimleri AD	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	UYGUNDUR

* Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Aliye MANDRACIOĞLU	İMZA	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
			22	28.09.2011/05	2/2

➤ **Bilgilendirilmiş Onam Formu**

EGE ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA ve YAYIN ETİĞİ KURULLARI (EGEBAYEK)

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

LÜTFEN BU DÖKÜMANI DİKKATLİCE OKUMAK İÇİN ZAMAN AYIRINIZ

Sizi Doç. Dr. Sunde Yılmaz Süslüer tarafından yürütülen “Ülseratif Kolitte *Fusobacterium nucleatum* Miktarının Hastalık Aktivitesi Üzerine Etkisi” başlıklı **araştırmaya** davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz.

Bu çalışmaya katılmak tamamen **gönüllülük** esasına dayanmaktadır. Çalışmaya **katılmama** veya katıldıktan sonra herhangi bir anda çalışmadan **çıkma** hakkında sahipsiniz. **Çalışmayı yanıtlamanız, araştırmaya katılım için onam verdiğiniz** biçiminde yorumlanacaktır. Size verilen **formlardaki** soruları yanıtlarken kimsenin baskısı veya telkini altında olmayın. Bu formlardan elde edilecek kişisel bilgiler tamamen gizli tutulacak ve yalnızca araştırma amacı ile kullanılacaktır.

1. Araştırmayla İlgili Bilgiler:

- Araştırmanın Amacı: Sizin gibi ülseratif kolit (ÜK) hastası olanlarda bir barsak bakterisi olan *Fusobacterium nukleatum* düzeylerinin ölçülerek, hastalığınızın aktivitesi üzerine olan etkisi araştırılacaktır.
- Araştırmanın İçeriği: İnflamatuar bağırsak hastalıklarında ve bunun iki temel alt tiplerinden biri olan ülseratif kolit atak ve remisyonlarla seyreden bir hastalıktır. Hastalık aktivitesine sebep olan faktörler net olarak bilinmemektedir. *Fusobacterium nukleatum* adlı bir bakterinin ürettiği bazı maddeler aracılığıyla ÜK’de hastalığın aktifleşmesine ve iltihap oluşumuna katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle sizin ve sizin gibi hastaların alınmış doku örneklerinde bu bakterinin miktar tayinini yapıp karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu nedenle sizin ve sizin gibi ÜK tanısı olan hastaların gönüllü olarak çalışmaya katılmaya onay vermeleri durumunda, sizden alınmış parafine gömülü biyopsi örneklerinden çalışılması planlanmıştır.
- Araştırmanın Nedeni: Özgün araştırma **X** Tez çalışması
- Araştırmanın Öngörülen Süresi (*Araştırma takviminde öngörülen süredir*):12 ay
- Araştırmaya Katılması Beklenen Katılımcı/Gönüllü Sayısı: 30
- Araştırmanın Yapılacağı Yer(ler): Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Polikliniği, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

2. Çalışmaya Katılım Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce katılımcıya/gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve katılmam istenen çalışmanın kapsamını ve amacını, gönüllü olarak üzerime düşen sorumlulukları tamamen anladım. **Çalışma hakkında yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı, soru sorma ve tartışma imkanı buldum ve tatmin edici yanıtlar aldım. Bana, çalışmanın muhtemel riskleri ve faydaları sözlü olarak da anlatıldı.** Bu çalışmayı istediğim zaman ve herhangi bir neden belirtmek zorunda kalmadan bırakabileceğimi ve bıraktığım takdirde herhangi bir olumsuzluk ile karşılaşmayacağımı anladım.

Bu koşullarda söz konusu araştırmaya kendi isteğimle, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Katılımcının (Kendi el yazısı ile)

Adı-Soyadı:.....

İmzası:

(Varsa) Velayet veya Vesayet Altında Bulunanlar İçin:

Veli veya Vasisinin (kendi el yazısı ile)

Adı-Soyadı:.....

İmzası:

Not: Bu form, iki nüsha halinde düzenlenir. Bu nüshalardan biri imza karşılığında gönüllü kişiye verilir, diğeri araştırmacı tarafından saklanır.

➤ Olgu Rapor Formu

Hasta kodu:

Tarih:

OLGU RAPOR FORMU (sağlıklı gönüllüler için)

Olgu Numarası :	Meslek:
Cinsiyeti : Kadın ☐ Erkek ☐	
Tanı:	
D.Tarihi: / /	D. Yeri:
Medeni durum:	
Ailede İBH öyküsü var ☐ (kimde:) yok ☐	
Özgeçmiş:	
Alkol:	Miktar: Süre:
Sigara:	Miktar: Süre:
Diğer Hastalık Öyküsü:	
Kullandığı Diğer İlaçlar:	
Örnek Alınma Tarih:	
Parafine gömülü blok alınma tarihi:	
Parafine gömülü blok alınma lokalizasyon: ☐ proksimal kolon	

9. Teşekkür

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisini, deneyimini ve desteğini esirgemeyen, her zaman ilgiyle yanımda olan sevgili danışman hocam ***Sn. Doç. Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER'*** e,

Hem yüksek lisans eğitim sürecimde hem tez sürecimde karşılaştığım her sorunda çözüm bulan, deneyimi ve bilgisiyle her zaman yardımcı olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanımız ***Sn. Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ'*** e,

Yüksek lisans eğitimimde bilgilerini esirgemeyen Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın değerli hocaları ***Sn. Doç. Dr. Zuhale EROĞLU'***na, ***Sn. Doç. Dr. Buket KOSOVA'***ya, ***Sn. Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI'***ya, ***Sn. Doç. Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ'***a, ***Sn. Doç. Dr. Burçin TEZCANLI KAYMAZ'***a, ***Sn. Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL'***e ve ***Sn. Doç. Dr. Aslı TETİK VARDARLI'***ya,

Tez çalışmamda gerekli hasta örneklerinin toplanması sürecini ilgisiyle takip eden ***Sn. Doç. Dr. Nalan Gülşen ÜNAL'*** a ve ***Prof. Dr. Başak DOĞANAVŞARGİL YAKUT'***a,

Tez çalışmama katkılarından dolayı ***Prof. Dr. Ataç UZEL'***e

Tez çalışmamın her şamasında yanımda olan arkadaşlıklarını esirgemeyen sevgili ekip arkadaşlarım ***Dok. Öğr. Burcu BÖLÜK'*** e ve ***Yük. Lis. Öğr. Hilal BAŞYEĞİT'*** e,

Hayatımın her anında desteklerini ve sonsuz sevgilerini her zaman hissettiğim hayattaki en büyük şansım ve en büyük destekçim olan canım aileme,

Desteğini ve sevgisini her dakika hissettiğim canım sevgilim ***Özkan BİLİR'***e

Tez çalışmamı destekleyen Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' ne teşekkür ederim.

İzmir, 24.07.2023

Bilge ŞENYÜZ

10. Özgeçmiş

Bilge ŞENYÜZ

Kişisel Bilgiler

Doğum Tarihi

Doğum Yeri

İletişim Bilgileri

E-mail

Eğitim Bilgileri

Lisans

Uludağ Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik

Yüksek Lisans

Ege Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji