

Enterotoksijenik *Bacteroides fragilis* ve *Fusobacterium nucleatum* Bağırsak Kolonizasyonunun Kolorektal Kanser ile İlişkisi: Kolon Biyopsileri ile Yapılan Bir Olgu Kontrol Çalışması

The Relationship of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Fusobacterium nucleatum* Intestinal Colonization with Colorectal Cancer: A Case-Control Study Performed with Colon Biopsies

Yeşim ÖZTÜRK BAKAR¹(ID), Süleyman DEMİRYAS²(ID), Ayşe CEYLAN KILINÇARSLAN³(ID), Mehmet DEMİRCİ⁴(ID), Nuray KEPİL⁵(ID), Murat Tuğberk BAKAR⁶(ID), Zeynep TANER⁷(ID), Edip TOKUÇ³(ID), Muhuyedin Abdırâhman ZİYAD³(ID), İhsan TAŞÇI²(ID), Bekir Sami KOCAZEYBEK³(ID), Hrisi BAHAR TOKMAN^{3*}(ID)

¹ Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Kartal Dr. Lütfi Kırdar Şehir Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Birimi, İstanbul.

¹ University of Health Sciences, Kartal Dr. Lütfi Kırdar City Hospital, Department of Medical Microbiology, İstanbul, Türkiye.

² İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul.

² İstanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Department of General Surgery, İstanbul, Türkiye.

³ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

³ İstanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İstanbul, Türkiye.

⁴ Kırklareli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırklareli.

⁴ Kırklareli University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kırklareli, Türkiye.

⁵ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

⁵ İstanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Department of Medical Pathology, İstanbul, Türkiye.

⁶ Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, İstanbul.

⁶ Marmara University Faculty of Medicine, Department of Public Health, İstanbul, Türkiye.

⁷ Altınbaş Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

⁷ Altınbaş University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İstanbul, Türkiye.

*Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2018-31658 numaralı proje ile desteklenmiş olup Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlanmıştır. Bu çalışmaya ait veriler, ANAEROBE 2022 Kongresi (28-31 Temmuz 2022 Seattle, WA, ABD)'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Makale Atfı: Öztürk Bakar Y, Demiryas S, Ceylan Kılınçarslan A, Demirci M, Kepil N, Bakar MT ve ark. Enterotoksijenik *Bacteroides fragilis* ve *Fusobacterium nucleatum* bağırsak kolonizasyonunun kolorektal kanser ile ilişkisi: Kolon biyopsileri ile yapılan bir olgu kontrol çalışması. Mikrobiyol Bul 2023;57(3):353-364.

ÖZ

Son yıllarda bazı bakterilerin kolorektal kanser (KRK) ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Çalışmada KRK'li hastaların ve sağlıklı bireylerin kolon biyopsi dokularında *Fusobacterium nucleatum* ve enterotoksijenik *Bacteroides fragilis* (ETBF) miktarlarını karşılaştırarak bu bakterilerin KRK etiolojisindeki rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Otuz beş KRK'li ve 35 sağlıklı bireyden alınan kolon biyopsi örneklerinde kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu [quantitative polymerase chain reaction (qPCR)] ile *F.nucleatum* ve ETBF miktarları be-

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Hrisi Bahar Tokman, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye. **Tel (Phone):** 0(212) 414 3000 (68309), **E-posta (E-mail):** hrisib@iuc.edu.tr

İrilenerek sonuçlar hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırılmıştır. *F.nucleatum* saptanma oranı ve miktarları KKK'li kadın hastalara ait dokularda erkek hastalardakine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p=0.003$, $p=0.013$). ETBF saptanma oranı ve miktarı bakımından KKK'li kadın ve erkek hasta dokuları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla $p=0.521$, $p=0.515$). Elli-74 yaş grubunda KKK'li kadınlarda ve erkeklerde kontrollere göre ETBF miktarlarının istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu (sırasıyla $p=0.005$, $p=0.047$), bunun yanı sıra *F.nucleatum* miktarı bakımından kadın hastalarda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu ancak erkek hasta ve kontroller arasında fark bulunmadığı saptanmıştır ($p=0.009$, $p=0.083$). Yaş ve cinsiyete bakılmaksızın KKK'li hastaların dokularında, *F.nucleatum* saptanma oran ve miktarının kontrollere göre istatistiksel olarak farklı olmadığı (sırasıyla $p=0.473$, $p=0.995$), buna karşın ETBF saptanma oranı ve ETBF miktarının istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (sırasıyla $p=0.002$, $p=0.004$). KKK yönünden rutin taramaların yapıldığı 50-74 yaş aralığında ETBF'nin hem erkeklerde hem de kadınlarda, *F.nucleatum*'un ise yalnız kadınlarda KKK etiolojisinde rol oynayabileceği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kolorektal kanser; *Fusobacterium nucleatum*; enterotoksijenik *Bacteroides fragilis*; qPCR.

ABSTRACT

In recent years, it has been shown that some bacteria may be associated with colorectal cancer (CRC). In this study, it was aimed to investigate the role of *Fusobacterium nucleatum* and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) in the etiology of CRC by comparing the amounts of these bacteria in colon biopsy tissues of patients with CRC and healthy individuals. The amounts of *F.nucleatum* and ETBF were determined by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in colon biopsy samples taken from 35 CRC and 35 healthy individuals, and the results were compared in the patient and control groups. The detection rate and amounts of *F.nucleatum* were found to be statistically significantly higher in tissues of female patients with CRC compared to male patients ($p=0.003$, $p=0.013$, respectively). There was no statistically significant difference between the tissues of female and male patients with CRC in terms of detection rate and amount of ETBF ($p=0.521$, $p=0.515$, respectively). It was found that in the 50-74 age group, the amount of ETBF was statistically significantly higher in women and men with CRC compared to the controls ($p=0.005$, $p=0.047$, respectively), while the amount of *F.nucleatum* was statistically significantly higher in female patients compared to controls. However, no difference was found between male patients and controls ($p=0.009$, $p=0.083$). It was determined that the detection rate and amount of *F.nucleatum* in the tissues of patients with CRC, regardless of age and gender, were not statistically different from the controls ($p=0.473$, $p=0.995$, respectively), however, the detection rate of ETBF and the amount of ETBF were found to be statistically significantly higher ($p=0.002$, $p=0.004$, respectively). It has been determined that ETBF can play a role in the etiology of CRC in both men and women, and *F.nucleatum* only in women, in the age range of 50-74 years, when routine screenings for CRC are performed.

Keywords: Colorectal cancer; *Fusobacterium nucleatum*; enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*; qPCR.

GİRİŞ

Yetişkin bir insanın bağırsak mikrobiyotasında, 100 trilyon kadar mikroorganizma bulunur. Bu değer vücudumuzdaki somatik ve germ hücrelerimizin toplam sayısından yaklaşık 10 kat daha fazladır¹. Doğum öncesinde bakteri içermeyen bu ortam, doğumla başlayan ve yetişkinliğe kadar devam eden bir kolonizasyon süreci sonunda karmaşık mikrobiyal bir topluluğa dönüşmektedir². Bağırsaktaki mikroorganizmalar, kısa zincirli yağ asitlerinin sentezi, bazı vitaminlerin sentezi ve karbonhidratların yıkımı gibi metabolik aktivitelerde, immün sistem modülasyonunda, antimikrobiyal özellikte hidrojen peroksit, nitrojen oksit salgılayarak patojenlere karşı korunmada görevler üstlenmektedir³.

Bazı kanser türleri ile mikroorganizmalar arasındaki ilişki üzerine yapılan çalışmalarda bu ilişkinin doğru olduğu kanıtlanmıştır. Bu çalışmaların sonucunda da Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı bildirimine göre *Helicobacter pylori* grup 1 kesin karsinojen olarak tanımlanmıştır⁴. Kolorektal kanser (KRK) ile *Streptococcus bovis* bakteriyemisi, *Clostridium septicum* sepsisi arasındaki ilişki, daha önceki yıllarda ortaya konmuştur^{5,6}. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bunlara ek olarak *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* ve *Fusobacterium nucleatum* gibi bakterilerin de KRK patogenezinde rol oynayabileceği belirtilmiştir^{7,8}.

B. fragilis insanların bağırsak mikrobiyotasında yaygın olarak bulunmakta, kolon mikrobiyotasının < %1'ini oluşturmaktadır⁹. Bu bakterinin insanlarda diyare hastalığına yol açan enterotoksijenik *Bacteroides fragilis* (ETBF) suşu ve toksik olmayan suş olmak üzere iki moleküler alt tipi vardır. Bft geni tarafından kodlanan *B. fragilis* toksini (BFT), frajilizin olarak da anılır. Bu toksin kolonik epitel hücrelerine bağlanarak zonula adherenslerin hücreler arası bağlanmasına katkıda bulunan E-kaderin proteininin yıkılmasını indükler ve epitel hücrelerinin yüksek geçirgenliğine neden olur¹⁰. *B. fragilis* toksini E-kaderin'i ayırır ve Wnt/ β -Katenin yol sinyalini aktive eder. Ayrıca BFT tirozin kinazlar, mikrotübül ilişkili protein kinazlar (MAPK) ve NF- κ B sinyal yollarının aktivasyonunda yer alır ve cell-miyelositomatozis (c-Myc) onkogeninin yüksek ekspresyonunun aracılık ettiği hücresel proliferasyonu arttırabildiği gösterilmiştir¹¹. Bunların sonucunda frajilizin toksini üreten *B. fragilis* KRK'nin başlaması ve ilerlemesi için pro-kanserojen bir ortamı destekleyerek patogeneze katkıda bulunabilir.

Bağırsak mikrobiyotasında bulunan bir diğer bakteri olan *F. nucleatum*'da önemli bir virülans faktörü olan yağ asidi bağlayıcı protein-2 (Fap2) bulunur¹². Fap2 proteini ile *F. nucleatum*'un konak immün hücre yanıtını engellediği, buna ek olarak tümör hücrelerini konağın savunma mekanizmalarından koruduğu belirtilmiştir¹². Konakçı hücre adezyonu ise *Fusobacterium* adhesin (FadA) adı verilen yeni tanımlanmış bir adezin tarafından düzenlenmektedir. Adenomatöz polipozis koli (APC) fare modeli oluşturularak yapılan bir çalışmada kanser hücrelerinin büyümesinde E-kaderin/beta katenin sinyal yolağını *F. nucleatum*'un FadA adezini ile aktive edebileceği gösterilmiştir. Ayrıca Fap2 proteini yanı sıra diğer virülans faktörlerinin de KRK ile ilişkisi üzerinde çalışmalar yapılmıştır¹³.

F. nucleatum ve *B. fragilis*'in KRK patogenezindeki rolü üzerine yapılmış olan çalışmalar sonucunda bazı ilişkiler gözlenmiş olsa da kanser gelişimine etkisini net olarak açıklamak için daha fazla veri ve çalışma gerekmektedir. Ülkemizde bu konuda yapılmış çalışmalar sınırlıdır, özellikle kolondan alınan sağlıklı doku ve tümör dokusu örnekleriyle yapılmış bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Bu çalışmada hasta ve kontrol grubundaki bireylerin kolon biyopsi örneklerinde *F. nucleatum* ve ETBF miktarlarını karşılaştırarak, bu bakterilerin KRK etiyojisindeki rolünü belirlemeye yönelik bir pilot çalışma yapılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 20.06.2018 ve Karar no:11256/2018).

Hasta Seçimi ve Örnek Alımı

Bu çalışma, İ.Ü.C Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında kolonoskopi işlemi sonucu alınan biyopsi örnekleriyle gerçekleştirildi. İ.Ü.C Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalından temin edilen histopatolojik değerlendirme sonuçlarına göre hasta ve kontrol grupları oluşturuldu.

Çalışmaya dahil edilen kişiler Eylül 2018-Eylül 2019 tarihleri arasında, fakültenin genel cerrahi anabilim dalına dışkı hacminde azalma, dışkıda kan, kilo kaybı, dışkılama alışkanlığında değişiklik, iştahsızlık gibi çeşitli şikayetlerle başvuran hastalardan seçildi. Kolorektal kanser dışında herhangi bir kanser tanısı bulunan, kemoterapi veya radyoterapi alan bireyler (son iki ayda) ve kolonoskopi öncesi antibakteriyel tedavi alan bireyler (son bir ayda) çalışmaya dahil edilmedi. Histopatolojik inceleme sonucu KRK tanısı alan 35 erişkin hasta ve KRK tanısı almamış 35 erişkin birey kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Kolorektal kanser için Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri [Centers for Disease Control and Prevention (CDC)] üç farklı yaş grubunda tarama yapılmasını önermektedir. Buna göre KRK için özellikle 50-75 yaşları arasında tarama yapılmasının önemini vurgulamaktadır. Birinci derece yakınlarında KRK tanısı alan kişilerin bulunması halinde ise 40 yaşından itibaren KRK yönünden taranması gerektiğini belirtmektedir¹⁴. Ayrıca 75-85 yaş arası kişilerin de hekimlerinin isteği üzerine tarama kapsamına alınabileceği bildirmektedir¹⁵. Bu önerilere göre hasta ve kontrol grupları 40-49 yaş, 50-74 yaş, ≥ 75 yaş olmak üzere üç grupta incelendi. Hasta grubu 17'si kadın, 18'i erkek hastadan oluşturuldu. Kontrol grubu, hasta grubundaki kadın ve erkek sayısı ile eşleştirme yapılarak 15'i kadın, 20'si erkek bireylerden oluşturuldu (Tablo I).

Kolonoskopi sırasında alınan biyopsi örnekleri Dnase/Rnase içermeyen distile su ile mikrosantrifüj tüpü içerisinde muhafaza edilerek hızlı bir şekilde laboratuvara ulaştırıldı. Çalışmaya alınincaya kadar -80°C'de saklandı.

Tablo I. Grupların Yaş ve Cinsiyete Göre Dağılımı

	Hasta Grubu Sayısı (%)		Kontrol Grubu Sayısı (%)	
	Kadın	Erkek	Kadın	Erkek
Yaş Grupları				
40-49 yaş	3 (8.5)	2 (5.8)	4 (11.4)	5 (14.2)
50-74 yaş	10 (28.6)	13 (37.2)	10 (28.6)	14 (40)
75 yaş	4 (11.4)	3 (8.5)	1 (2.9)	1 (2.9)
Toplam	17 (48.5)	18 (51.5)	15 (42.8)	20 (50.2)

DNA İzolasyonu

Bir kez çözündürülen dokulardan DNA ekstraksiyonu, “High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya)” ile firmanın önerdiği protokol uygulanarak gerçekleştirildi. 100 µl DNA elde edilerek nanodrop spektrofotometre ile kontrol edildi. İkinci işleme kadar DNA’lar steril mikrosantrifüj tüplerinde -20°C’de saklandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Bakteri Miktarlarının Belirlenmesi

Doku örneklerindeki bakteri türlerinin miktarının hesaplanması için ETBF’ye özgül forward, revers ve *F.nucleatum*’a özgül forward, revers1, revers2 primerleri (sırasıyla ETBF, F: 5'- GAC GGT GTA TGT GAT TTG TCT GAG AGA- 3', R: 5'- ATC CCT AAG ATT TTA TTA TCC CAA GTA- 3', *F.nucleatum*, F: 5'- CGG GTG AGT AAC GCG TAA AG- 3', R1: 5'- GCC GTG TCT CAG TCC CCT- 3', R2: 5'- GCA TTC GTT TCC AAA TGT TGT CC- 3') “Fast Start Essential Sybr Green Master Mix Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya)” içindeki Rnaz/Dnaz içermeyen distile su kullanılarak sulandırıldı. Primerlerin konsantrasyonu, qPCR reaksiyonu için son konsantrasyon 0.5 µMol olacak şekilde ayarlandı. Her bir reaksiyon için; primerler, Sybr Green karışımı, tampon çözeltiler miktar hesaplaması yapılarak master karışım haline getirilip 15 µl mikropłaktaki kuyucuklara eklendi. -20°C’de saklanan DNA’lar bir kez çözündürüldü. Çözündürülen DNA’lardan 5 µl, plazmit standartlardan 5 µl ve negatif kontrolden 5 µl olacak şekilde uygun kuyucuklara eklendi. Ardından toplam 20 µl DNA ve qPCR miks karışımı pipetleme ile homojenize edildi. Üretici firma önerileri doğrultusunda mikropłakların üzeri folyo ile kapatılarak 1500 xg’de iki dakika boyunca santrifüj edildi. LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) qPCR cihazında çalışmaya alındı (Tablo II).

Bakteri saptanan pozitif numunelerin içerisindeki miktarlar, plazmit standartları ile oluşturulan standart eğrilerle göre sistem yazılımı kullanılarak hesaplandı. Hasta ve kontrol grubu bu sonuçlarla karşılaştırıldı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizlerde “Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)” versiyon 21 kullanıldı. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi kul-

Tablo II. Gerçek Zamanlı PCR Çalışma Protokolü

	Preinkübasyon	Amplifikasyon	Erime	Soğuma
Aşama	Preinkübasyon	Denatürasyon/ Bağlanma ve Uzama	Denatürasyon/Bağlanma/ Erime ve Soğuma	Soğuma
Döngü Sayısı	1 Döngü	45 Döngü	1 Döngü	1 Döngü
Sıcaklık	95°C	95°C/60°C	95°C/65°C/95°C	40°C
Süre	10 dk	5 sn/45 sn	1 dk/1 dk/--	30 sn
Analiz Modu	Yok	Yok/Tek Nokta Okuma	Yok/Yok/Sürekli Okuma	Yok

lanılarak değeriendirildi. Normal dağılım olmadığı durumlarda, iki kategorili niteliksel grupların (*F.nucleatum* ve ETBF varlığı/yokluğu gibi) sürekli değışkenler açısından karşılaştırılması Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı. Kategorik verilerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi uygulandı. Çalışmada $p < 0.05$ saptanan değerieler istatistiksel açıdan anlamlı olarak değeriendirildi.

BULGULAR

Doku örneklerinden yapılan moleküler çalışma sonucunda *F.nucleatum* varlığı, hasta grubunda 35 bireyin 20'sinde, kontrol grubunda 35 bireyin 17'sinde saptanmıştır. *F.nucleatum* saptanma oranı ve miktarları açısından hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo III). Hasta grubu cinsiyete göre incelendiğinde, *F.nucleatum* saptanma oranı ve ortalama miktarları kadınlarda erkeklere göre anlamlı yükseklikte bulunmuştur (sırasıyla $p = 0.003$, $p = 0.013$, Tablo III).

Yaş grupları dikkate alındığında *F.nucleatum* miktarı bakımından kadın hasta ve kontrollerde, 40-49 yaş grubunda ve ≥ 75 yaş grubunda anlamlı bir fark saptanmamışken, 50-74 yaş aralığındaki hasta kadınlarda kontrollerine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p = 0.009$). Hasta ve kontrol grubundaki erkekler *F.nucleatum* miktarı açısından incelendiğinde, tüm yaş gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo IV).

Hasta ve kontrol grupları incelendiğinde 35 hastanın 25'inde, kontrol grubunda 12'sinde ETBF varlığı saptanmıştır. Hasta grubu ve kontrol grubu ETBF saptanma oranı ve miktarı bakımından karşılaştırıldığında hasta grubunda her iki değeri de yüksek bulunmuş ve istatistiksel açıdan anlamlı olduğu gözlemlenmiştir (sırasıyla $p = 0.002$, $p = 0.004$, Tablo III). Hasta grubu cinsiyete göre incelendiğinde ETBF saptanma oranı ve ortalama miktarları bakımından erkek ve kadın hastalar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo III).

Tablo III. *Fusobacterium nucleatum* ve Enterotoksijenik *Bacteroides fragilis* Varlığının Saptanma Oranı ve Miktarlarının Karşılaştırılması

<i>F.nucleatum</i>				ETBF			
	Hasta (s= 35)	Kontrol (s= 35)	p	Hasta (s= 35)	Kontrol (s= 35)	p	
Saptanma oranı (%)	20 (57.1)	17 (48.6)	0.473*	25 (71.4)	12 (34.3)	0.002*	
Miktarı	3.67 ± 0.548	3.04 ± 0.544	0.995**	2.98 ± 0.350	1.40 ± 0.348	0.004**	
(log10bakteri/25 mg)							
	Hasta (s= 35)	Kadın (s= 17)	Erkek (s= 18)	p	Kadın (s= 17)	Erkek (s= 18)	p
Saptanma oranı (%)	14 (82.4)	6 (33.3)	0.003*	13 (76.5)	12 (66.7)	0.521*	
Miktarı	5.30 ± 0.624	2.13 ± 0.731	0.013**	3.17 ± 0.466	2.81 ± 0.528	0.515**	
(log10bakteri/25 mg)							
*Pearson Ki-Kare testi.							
**Mann-Whitney U testi.							

Tablo IV. *F.nucleatum* Miktarlarının ($\log_{10}$ bakteri/25 mg) Hasta ve Kontrol Grubunda Kadın ve Erkeklerin Yaş Gruplarına Göre Karşılaştırılması

<i>Fusobacterium nucleatum</i>						
	Hasta Grubu Kadın	Kontrol Grubu Kadın	p*	Hasta Grubu Erkek	Kontrol Grubu Erkek	p*
40-49 yaş	4.32 ± 2.162	4.90 ± 1.636	0.212	3.22 ± 3.227	3.91 ± 1.597	0.421
50-74 yaş	5.78 ± 0.674	2.05 ± 0.858	0.009	2.45 ± 0.896	2.40 ± 0.895	0.911
≥ 75 yaş	4.83 ± 1.610	6.54**	0.157	0.30 ± 0.30	6.53**	0.083
Tüm yaşlar	5.30 ± 0.624	3.11 ± 0.800	0.250	2.13 ± 0.731	2.98 ± 0.758	0.246

*Mann-Whitney U testi

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

Tablo V. *ETBF* Miktarlarının ($\log_{10}$ bakteri/25 mg) Hasta ve Kontrol Grubunda Kadın ve Erkeklerin Yaş Gruplarına Göre Karşılaştırılması

<i>Enterotoksijenik Bacteroides fragilis</i>						
	Hasta Grubu Kadın	Kontrol Grubu Kadın	p*	Hasta Grubu Erkek	Kontrol Grubu Erkek	p*
40-49 yaş	2.66 ± 1.333	2.58 ± 1.590	0.714	1.59 ± 1.598	2.69 ± 1.128	0.421
50-74 yaş	4.19 ± 0.268	1.45 ± 0.604	0.005	2.51 ± 0.614	0.77 ± 0.420	0.047
≥ 75 yaş	0.98 ± 0.989	0.30**	0.617	4.93 ± 0.815	0.30**	0.180
Tüm yaşlar	3.17 ± 0.466	1.66 ± 0.576	0.044	2.81 ± 0.528	1.21 ± 0.437	0.054

*Mann-Whitney U testi.

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

Hasta ve kontrol gruplarındaki kadınlar ve erkekler yaş gruplarına göre incelendiğinde ETBF miktarı yalnızca 50-74 yaş grubundaki hasta kadınlarda ve hasta erkeklerde kontrollerine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0.005$, $p=0.047$, Tablo V).

TARTIŞMA

Son yıllarda bağırsak mikrobiyotasındaki disbiyozis ile enflamatuvar bağırsak hastalığı, kolit, obezite, KRK, vb. gibi birçok hastalığın ilişkisi araştırılmıştır. KRK için yapılan çalışmalarda, kolonda bulunan farklı bakteri türlerinin disbiyozis oluşturarak prekanseröz mekanizmalara neden olabileceğine değinilmiştir^{5-8,16-18}.

F.nucleatum'un KRK etiolojisindeki rolü üzerine yapılan çalışmaların hemen hemen hepsinde KRK tanılı hasta grubunun doku veya gaita örneklerinde *F.nucleatum*'un kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunduğu belirtilmiştir¹⁹⁻²³. Mima ve arkadaşları¹⁹, yaptıkları çalışmada 598 kanserli doku örneği ve 558 bitişik sağlam doku örneğinde *F.nucleatum*'u karşılaştırmışlar ve kanserli dokularda anlamlı derecede yüksek olduğunu saptamışlardır. İki yüz doksan altı prekanseröz lezyon ve 225 KRK'li olguyla İto ve arkadaşları²⁰ tarafından yapılan bir başka çalışmada kanserli dokularda, prekanseröz lezyonlara göre *F.nucleatum* miktarı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Suehiro ve arkadaşları²¹

11 adenom, 19 geç dönem adenom, 158 KRK tanılı hastanın ve 60 sağlıklı bireyin gaita örneklerinde *F.nucleatum* miktarını karşılaştırmışlar ve hasta gruplarında *F.nucleatum*'un sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Shariati ve arkadaşları²², 30 KRK'li hastanın ilk rezeksiyon ameliyatı sırasında alınan tümör dokularında *F.nucleatum* miktarını bitişik sağlam doku örneklerindeki miktara göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Perichon ve arkadaşları²³, 81 farklı evredeki KRK'li, 23 kolorektal adenomalı (KA) hastanın ve 25 kolonoskopisi normal (NK) olan bireyin gaita örnekleriyle yaptıkları çalışmada *F.nucleatum* varlığının NK'de %48, KA'lı hasta grubunda %56.5, KRK'li hasta grubunda %70.4 oranında olduğunu gözlemlemişler ve sadece üçüncü evre KRK'li hastalarda *F.nucleatum* varlığını anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Bunun yanı sıra, araştırmacılar total bakteri yoğunluğuna göre *F.nucleatum* miktarının göreceli bolluğunu qPCR yöntemiyle araştırmışlar ve NK ve KA'lı hastalara göre KRK'li hastalarda bakteriyi anlamlı derecede daha yüksek miktarda bulmuşlardır.

Bu çalışmada, yaş gruplarına bakılmaksızın, *F.nucleatum* saptanma oranı ve miktarı hasta ve kontrol grubunda karşılaştırıldığında anlamlı bir fark belirlenmemiştir (Tablo III). Bundgaard-Nielsen ve arkadaşları²⁴, 99 kanser, 96 adenom, 104 divertikül tanılı hastanın ve 99 sağlam bireyin doku örnekleriyle gerçekleştirdikleri çalışma sonucunda, bu bulgulara benzer şekilde, hasta grupları ve sağlıklı bireyler arasında *F.nucleatum* miktarının istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olmadığını belirtmişlerdir.

Çalışmanın sonuçları yaş grupları ve cinsiyet dikkate alınarak incelendiğinde durumun değiştiği, 50-74 yaş grubundaki kadın hastalarda *F.nucleatum* miktarlarının kontrollerdekine göre anlamlı derecede yüksek olduğu, ancak erkek hastalarda anlamlı fark göstermediği bulunmuştur (Tablo IV). Ayrıca sadece cinsiyet yönünden incelendiğinde, çalışmadaki gruplarda *F.nucleatum*'un saptanma oranı ve miktarları kadın hastalarda, erkek hastalara göre yüksek bulunmuş ve bu sonucun istatistiksel açıdan anlamlı olduğu saptanmıştır (Tablo III). İto ve arkadaşları²⁰, yaptıkları çalışmada *F.nucleatum*'u cinsiyet yönünden karşılaştırmışlar ancak gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulamamışlardır. Bir başka çalışmada ise Viljoen ve arkadaşları²⁵, erkek hastaların KRK'li doku örneklerinde *F.nucleatum* miktarını, kadınlara göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Sonuçlarımızı destekleyen çalışmalar bulunsa da karşıt verilerin de bildirildiği çalışmalar görülmektedir. Bu çelişkili sonuçların, coğrafik bölge farklılığı ve beslenme alışkanlıklarının mikrobiyota üzerindeki etkisinden, ayrıca çalışmadaki kadın ve erkek sayısındaki farklılıklardan kaynaklanmış olabileceği kanaatine varılmıştır.

Enterotoksijenik *B.fragilis*'in KRK etiolojisindeki rolü üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında bu türün, miktar bakımından KRK'li hastaların doku veya gaita örneklerinde sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirtilmiştir²⁶⁻³¹. Kolorektal neoplazili 49 hastaya ait tümör dokusu ve bitişik sağlam doku örneklerinde çalışma yapan Boleij ve arkadaşları²⁶, dokular arasında ETBF miktarı açısından anlamlı bir fark olmadığını ancak geç evredeki hasta grubuna ait KRK doku örneklerinde ETBF miktarının kontrollere göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksek olduğunu belirt-

mişlerdir. Yetmiş bir KRK'li hasta ve 71 sağlıklı bireyin gaita örneğini karşılaştıran çalışmada Keenan ve arkadaşları²⁷, hasta grubunda ETBF miktarını istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Yetmiş üç KRK'li hasta ve 59 sağlıklı bireyin gaita örneğiyle yaptıkları çalışmada Ulger Toprak ve arkadaşları²⁸, ETBF'ye ait bft genini hastaların %38'inde, kontrollerin ise %12'sinde saptayarak hastalarda bu oranın istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Altmış KRK'li hasta ile 60 sağlıklı bireye ait gaita örnekleriyle Haghi ve arkadaşlarının²⁹ gerçekleştirdikleri çalışmada, hastalarda ETBF miktarını istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Altmış sekiz kolorektal lezyonda (prekanseröz veya kanseröz) ve 52 sağlıklı bireye ait doku biyopsi örneklerinde araştırma yapan Zamani ve arkadaşları³⁰, çalışmalarındaki istatistiksel analizler sonucunda ETBF miktarının sağlıklılara göre kanseröz lezyonlarda artmış olduğunu, ancak prekanseröz lezyonlar ile kanseröz lezyonlar karşılaştırıldığında ETBF miktarının anlamlı bir farklılık göstermediğini saptamışlardır. Khodaverdi ve arkadaşları³¹, 40 KRK'li hastaya ait biyopsi örneğinin 18 (%45)'inde ve 40 sağlıklı kontrole ait biyopsinin 6 (%15)'sında ETBF varlığını saptamışlar, ayrıca ETBF miktarının da KRK'li hastalarda istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Perichon ve arkadaşları²³ tarafından 81 farklı evredeki KRK'li, 23 KA'lı hastanın ve 25 kolonoskopisi normal olan bireyin gaita örneklerinde yapılan çalışmada, ETBF'nin varlığı KA'lı hastalarda %56.5, KRK'li hastalarda %31 olarak bulunmuş, sadece KA'lı hastaların oranı kontrol grubundaki orana (%24) göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

Bu araştırmada da diğer çalışmaları destekler şekilde ETBF saptanma oranı ve miktarı hastaların doku örneklerinde sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (Tablo III). Yaş grupları ve cinsiyetler dikkate alınarak incelendiğinde 50-74 yaş aralığında bulunan kadın ve erkek hastalarda saptanan ETBF miktarlarının aynı yaş aralığındaki kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo V). Ayrıca çalışmada tüm yaş gruplarındaki KRK'li kadın hastaların doku örneklerinde saptanan ETBF miktarı kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Tablo V). Sadece cinsiyet dikkate alınarak hasta grupları karşılaştırıldığında ise ETBF saptanma oranı ve miktarı açısından kadın ve erkek hastalar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.

Sonuç olarak, çalışmada araştırılan ETBF saptanma oranı/miktarı önceden yapılan diğer çalışmalarla uyum göstererek hasta grubunda sağlıklılara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Buna ek olarak 50-74 yaş aralığındaki kadın ve erkek hasta gruplarında da ETBF miktarı aynı yaş aralığındaki kontrollerine göre anlamlı yükseklikte bulunmuştur. Çalışmada araştırılan diğer bakteri türü olan *F.nucleatum*'un saptanma oranı/miktarı açısından diğer çalışmalardan farklı olarak hasta ve sağlıklı bireyler arasında anlamlı fark bulunamamış ancak bu türün, 50-74 yaş aralığındaki kadın hasta grubunda kontrollere göre artmış olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca KRK'li kadın hastalarda erkek hastalara göre *F.nucleatum* türünün yüksek bulunması da diğer çalışmalardan farklı bir sonuç olarak

dikkat çekmiştir. Bu sonuçlar, özellikle 50-74 yaş aralığındaki kadın ve erkek hastalarda ETBF'nin, ayrıca 50-74 yaş grubundaki kadın hastalarda *F.nucleatum*'un KRK etiyojisinin de rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

Birçok araştırmada belirtildiği gibi bu çalışmanın da bazı sınırlılıkları vardır. Olgu ve kontrol gruplarındaki birey sayılarının azlığı, kanser oluşumunu etkileyecek birçok çevresel faktörün bulunduğu ve beslenme alışkanlıklarının, coğrafik bölge farklılıklarının da göz ardı edilemeyecek olması bunlar arasında sayılabilir. Ülkemizde ilk defa doku biyopsi örneklerinde yapılan bu pilot çalışmayla elde edilen verilerin ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2018-31658). Destek için çok teşekkür ederiz.

ETİK KURUL ONAYI

Çalışma, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 20.06.2018 ve Karar no:11256/2018).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Kaur H, Ali SA, Yan F. Interactions between the gut microbiota-derived functional factors and intestinal epithelial cells-implication in the microbiota host mutualism. *Front Immunol* 2022; 13: 1006081. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1006081>
2. Xiao L, Zhao F. Microbial transmission, colonisation and succession: From pregnancy to infancy. *Gut* 2023; 72(4): 772-86. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-328970>
3. Fukugaiti MH, Ignacio A, Fernandes MR, Ribeiro Júnior U, Nakano V, Avila-Campos MJ. High occurrence of *Fusobacterium nucleatum* and *Clostridium difficile* in the intestinal microbiota of colorectal carcinoma patients. *Braz J Microbiol* 2015; 46(4): 1135-40. <https://doi.org/10.1590/S1517838246420140665>
4. Njenga P, Njau A, Moloo Z, Revathi G, Tshibangu E, Yamaoka Y. Pattern and trends of *Helicobacter pylori* genotypes in gastric cancer: A kenyan 8-year study. *Front Med (Lausanne)* 2023; 17(10): 1119513. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1119513>
5. Pasquereau-Kotula E, Martins M, Aymeric L, Dramsi S. Significance of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* association with colorectal cancer. *Front Microbiol* 2018; 9: 614. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00614>
6. Justesen US, Nielsen SL, Jensen TG, Dessau RB, Møller JK, Coia JE, et al. Bacteremia with anaerobic bacteria and association with colorectal cancer: a population-based cohort study. *Clin Infect Dis* 2022; 75(10): 1747-53. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac259>
7. Li S, Liu J, Zheng X, Ren L, Yang Y, Li W, et al. Tumorigenic bacteria in colorectal cancer: Mechanisms and treatments. *Cancer Biol Med* 2021; 19(2): 147-62. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0651>
8. Mira-Pascual L, Cabrera-Rubio R, Ocon S, Costales P, Parra A, Suarez A, et al. Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *J Gastroenterol* 2015; 50(2): 167-79. <https://doi.org/10.1007/s00535-014-0963-x>

9. Huang JY, Lee SM, Mazmanian SK. The human commensal *Bacteroides fragilis* binds intestinal mucin. *Anaerobe* 2011; 17(4): 137-41. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.05.017>
10. Mohammadi M, Mirzaei H, Motalebi M. The role of anaerobic bacteria in the development and prevention of colorectal cancer. *Anaerobe* 2022; 73: 102501. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102501>
11. Snezhkina AV, Krasnov GS, Lipatova AV, Sadritdinova AF, Kardymon OL, Fedorova MS, et al. The dysregulation of polyamine metabolism in colorectal cancer is associated with overexpression of c-Myc and C/EBP β rather than enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 2353560. <https://doi.org/10.1155/2016/2353560>
12. de Andrade KQ, Almeida-da-Silva CLC, Coutinho-Silva R. Immunological pathways triggered by *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*: Therapeutic possibilities? *Mediators Inflamm* 2019; 2019: 7241312. <https://doi.org/10.1155/2019/7241312>
13. Sun CH, Li BB, Wang B, Zhao J, Zhang XY, Li TT, et al. The role of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer: From carcinogenesis to clinical management. *Chronic Dis Transl Med* 2019; 5(3): 178-87. <https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2019.09.001>
14. US Preventive Services Task Force; Davidson KW, Barry MJ, Mangione CM, Cabana M, Caughey AB, Davis EM, et al. Screening for colorectal cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *JAMA* 2021; 325(19): 1965-77. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.6238>
15. CDC. What Should I Know About Screening. Available from: https://www.cdc.gov/cancer/colorectal/basic_info/screening/index.htm (Accessed date: 26.03.2023).
16. Lakhan SE, Kirchgessner A. Gut inflammation in chronic fatigue syndrome. *Nutr Metab (Lond)* 2010; 7: 79. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-79>
17. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JL. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444(7122): 1027-31 <https://doi.org/10.1038/nature05414>
18. Sadrekarimi H, Gardanova ZR, Bakhshesh M, Ebrahimzadeh F, Yaseri AF, Thangavelu L, et al. Emerging role of human microbiome in cancer development and response to therapy: Special focus on intestinal microflora. *J Transl Med* 2022; 20(1): 301. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03492-7>
19. Mima K, Cao Y, Chan AT, Qian ZR, Nowak JA, Masugi Y, et al. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue according to tumor location. *Clin Transl Gastroenterol* 2016; 7(11): e200. <https://doi.org/10.1038/ctg.2016.53>
20. Ito M, Kanno S, Noshio K, Sukawa Y, Mitsuhashi K, Kurihara H, et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *Int J Cancer* 2015; 137(6): 1258-68. <https://doi.org/10.1002/ijc.29488>
21. Suehiro Y, Sakai K, Nishioka M, Hashimoto S, Takami T, Higaki S, et al. Highly sensitive stool DNA testing of *Fusobacterium nucleatum* as a marker for detection of colorectal tumours in a Japanese population. *Ann Clin Biochem* 2017; 54(1): 86-91. <https://doi.org/10.1177/0004563216643970>
22. Shariati A, Razavi S, Ghaznavi-Rad E, Jahanbin B, Akbari A, Norzaee S, et al. Association between colorectal cancer and *Fusobacterium nucleatum* and *Bacteroides fragilis* bacteria in Iranian patients: A preliminary study. *Infect Agent Cancer* 2021; 16(1): 41. <https://doi.org/10.1186/s13027-021-00381-4>
23. P  richon B, Lichtl-H  fele J, Bergsten E, Delage V, Trieu-Cuot P, Sansonetti P, et al. Detection of *Streptococcus gallolyticus* and four other CRC-associated bacteria in patient stools reveals a potential "driver" role for enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Front Cell Infect Microbiol* 2022; 12: 794391. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.794391>
24. Bundgaard-Nielsen C, Baandrup UT, Nielsen LP, S  rensen S. The presence of bacteria varies between colorectal adenocarcinomas, precursor lesions and non-malignant tissue. *BMC Cancer* 2019; 19(1): 399. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5571-y>
25. Viljoen KS, Dakshinamurthy A, Goldberg P, Blackburn JM. Quantitative profiling of colorectal cancer-associated bacteria reveals associations between *Fusobacterium* spp., enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) and clinicopathological features of colorectal cancer. *PLoS One* 2015; 10(3): e0119462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119462>

26. Boleij A, van Gelder MMHJ, Swinkels DW, Tjalsma H. Clinical importance of *Streptococcus gallolyticus* infection among colorectal cancer patients: Systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis 2011; 53(9): 870-8. <https://doi.org/10.1093/cid/cir609>
27. Keenan JI, Aitchison A, Purcell RV, Greenlees R, Pearson JF, Frizelle FA. Screening for enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in stool samples. Anaerobe 2016; 40: 50-3. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.05.004>
28. Ülger Toprak N, Yağcı A, Güllüoğlu BM, Akın ML, Demirkalem P, Çelenk T, et al. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. Clin Microbiol Infect 2006; 12(8): 782-6. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01494.x>
29. Haghi F, Goli E, Mirzaei B, Zeighami H. The association between fecal enterotoxigenic *B.fragilis* with colorectal cancer. BMC Cancer 2019; 19(1): 879. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6115-1>
30. Zamani S, Taslimi R, Sarabi A, Jasemi S, Sechi LA, Feizabadi MM. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: A possible etiological candidate for bacterially-induced colorectal precancerous and cancerous lesions. Front Cell Infect Microbiol 2020; 9: 449. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00449>
31. Khodaverdi N, Zeighami H, Jalilvand A, Haghi F, Hesami N. High frequency of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Enterococcus faecalis* in the paraffin-embedded tissues of Iranian colorectal cancer patients. BMC Cancer 2021; 21(1): 1353. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-09110-x>