



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

[Doktora Tezi]

***BLASTOCYSTIS HOMINIS*'İN KOLOREKTAL KANSERLER İLE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yaser Ali Hussein MUSAWA
ORCID: 0000-0002-0639-0893

Danışman

Doç. Dr. Fatma ESENKAYA TAŞBENT
ORCID: 0000-0003-4190-5095

Bu tez çalışması BAP tarafından 23DR18009 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Konya – 2025

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm çalışmalarımın yönlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında emeği geçen, Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden danışman hocam, sayın Doç. Dr. Fatma Esenkaya Taşbent'e,

Bu süreçte engin bilgi ve tecrübelerinden yararlanma imkânı bulduğum Prof. Dr. Mehmet ÖZDEMİR, Prof. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU, Prof. Dr. Metin DOĞAN ve Dr. Öğr. üyesi Selin UĞRAKLI hocalarıma,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Hakan SART, Hüseyin Ülker beyler nezdinde tüm teknisyen ve personelimize teşekkür ederim.

Bu çalışmada maddi destek sağlayan Necmettin Erbakan Üniversitesi BAP Birimine (23DR18009 no'lu proje) teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam süresince beni hep destekleyen, güvenen ve hayatımın her anında yanımda olan, hayatımın en önemlileri ve en değerlileri annem, babam, eşim ve sevgili çocuklarıma sonsuz teşekkür ederim.

Yaser Ali Hussein MUSAWA

Haziran 2025

İÇİNDEKİLER

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TEZ ONAY SAYFASI	v
TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	vi
BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ	vii
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1 Giriş	1
1.2 Amaç	2
2 GENEL BİLGİLER	2
2.1 <i>B. hominis</i> : Genel Bakış	2
2.2 Taksonomi ve Sınıflandırma	3
2.3 Yaşam Döngüsü	3
2.4 Morfoloji	4
2.5 Klinik Önemi	4
2.6 Epidemiyoloji ve Patojenite	5
2.7 Laboratuvar Tanısı	6
2.8 <i>B. hominis</i> ve Kolorektal Kanser: Ortaya Çıkan Kanıtlar	8
2.9 Genetik Çeşitlilik ve Alt Türler	8
2.10 İnflamasyon Yanıtı ve TNF- α	8
3 GEREÇ VE YÖNTEM	9
3.1 Çalışma Tasarımı ve Örneklerin Toplanması	9
3.2 Mikroskopik İnceleme	9
3.2.1 Giemsa boyama	9
3.3 Moleküler Analiz	11
3.3.1 DNA izolasyonu	11
3.3.2 PZR çalışması	12
3.4 Yeni Nesil Dizileme ve Biyoinformatik Analiz	15
3.5 TNF- α ELISA Çalışması	17
3.6 İstatistiksel Analiz	18
4 BULGULAR	20
4.1 Demografik Bulguların Değerlendirilmesi	20
4.2 Mikroskopik Değerlendirme Sonuçları	20

4.3 PZR Analiz Sonuçları.....	20
4.4 Dizileme analizi sonuçları	21
4.5 Serum TNF- α test sonuçları	23
5 TARTIŞMA.....	24
5.1 <i>B. hominis</i> Sıklığı	24
5.2 Alt Tip Dağılımı ve Potansiyel Patojenite.....	28
5.3 TNF- α Seviyeleri ve İnflamasyon Yanıtı	29
5.4 Sınırlılıklar ve Gelecek Çalışmalar İçin Öneriler	29
6 SONUÇ VE ÖNERİLER	30
6.1 Sonuç	30
6.2 Öneriler.....	30
7 KAYNAKLAR.....	31
8 EKLER.....	36
8.1 Etik Kurul Kararı.....	36

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **YASER ALİ HUSSEİN MUSAWA**'nın "***Blastocystis hominis***'in Kolorektal Kanserler ile İlişkisinin Araştırılması" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya / 11.07.2023

Tez Danışmanı	Doç. Dr. Fatma ESENKAYA TAŞBENT Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD.
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Metin DOĞAN Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD.
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Bahar KANDEMİR Necmettin Erbakan Üniversitesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Mahmut BAYKAN Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Muhammed Güzel KURTOĞLU Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 16/07/20.25 tarih ve 17/17 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasibe VURAL

Enstitü Müdürü

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

***Blastocystis hominis*'in Kolorektal Kanserler ile İlişkisinin Araştırılması** başlıklı tez çalışmamın toplam **35** sayfalık kısmına ilişkin, 20.06.2025 tarihinde tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı **%10** olarak belirlenmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Tez kabul sayfası hariç
2. Tez çalışması orijinallik raporu sayfası hariç
3. Bilimsel etik beyannamesi sayfası hariç
4. Ön söz hariç
5. İçindekiler hariç
6. Simgeler ve kısaltmalar hariç
7. Materyal ve metot hariç
8. Kaynaklar hariç
9. Alıntılar dahil
10. 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tez Çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve tez çalışmamın, bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranının (%20) altında olduğunu ve intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

14.07.2023

Yaser Ali Hussein MUSAWA

Doç. Dr. Fatma Esenkaya Taşbent

BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini, tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez hazırlama kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel kurallara uygun olarak atıf yapıldığını ve bu kaynakların kaynaklar listesine eklendiğini beyan ederim.

14.07.2025

Yaser Ali Hussein MUSAWA

KISALTMALAR

AOM	Azoxymethane
<i>B. hominis</i>	<i>Blastocystis hominis</i>
KRK	Kolorektal Kanser
Ct	Döngü eşiği
<i>D. fragilis</i>	<i>Dientamoeba fragilis</i>
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
DPX	Dibutylphthalate Polystyrene Xylene
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi
<i>G. intestinalis</i>	<i>Giardia intestinalis</i>
HCl	Hidroklorik asidin
HTC116	İnsan Kolorektal Tümörü 116
IFA	İmmünofloresan testi
NGS	Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing)
NTC	Şablonsuz Kontroller
OD	Optik yoğunluk
pH	Hidrojen potansiyeli
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
RT-qPZR	Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RUO	Araştırma Kullanımı İçin
SSU rRNA	Küçük alt birim ribosomal ribonükleik asit
ST	Alt tip
TNF- α	Tümör nekroz faktörü alfa

TABLULAR LİSTESİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. PZR reaksiyonu bileşenleri.	15
Tablo 4.1. <i>B. hominis</i> pozitifliğinin çalışma ve kontrol grubunda dağılımı.	21
Tablo 4.2. Kolorektal kanserli hastaların alt tip sonuçları ve gen bank erişim numaraları (Genbank ID).....	22
Tablo 4.3. Kontrol grubuna ait alt tip sonuçları ve gen bank erişim numaraları (Genbank ID).	22
Tablo 4.4. TNF- α pozitifliğinin <i>B. hominis</i> pozitifliğine göre dağılımı.....	23

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 3.1. Roche LightCycler® 96 Gerçek Zamanlı PZR cihazı	13
Şekil 3.2. qPZR analizinde pozitif kontrol örneklerine ait amplifikasyon eğrileri	14
Şekil 3.3. qPZR analizinde negatif kontrole (No-Template Control, NTC) ait amplifikasyon eğrileri.	14
Şekil 3.4. qPZR analizinde kullanılan internal kontrol (IC) örneklerine ait amplifikasyon eğrileri.	15
Şekil 4.1. <i>B. hominis</i> enfeksiyon yaygınlığı ve alt tip dağılımı.	21
Şekil 4.2. TNF- α düzeylerinin gruplar arasında dağılımı.....	23

ÖZET

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tıbbi Mikrobiyoloji
[Doktora Tezi]

***BLASTOCYSTIS HOMINIS*'İN KOLOREKTAL KANSERLER İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yaser Ali Hussein MUSAWA

Konya-2025

Blastocystis hominis dışkı incelemelerinde karşılaşılan en sık parazit olarak bildirilmektedir. Kommensal mi yoksa patojen mi olduğu son yıllarda çokça tartışılan parazit, literatürde farklı hasta gruplarında araştırılmıştır. Sağlıklı bireylerde oldukça yaygın bulunmasından dolayı insan mikrobiyotasının bir ögesi olduğunu ileri süren çalışmaların yanı sıra son yıllarda patojen potansiyelini araştıran çalışmalar da dikkat çekmektedir. Bu çalışmada; kolorektal kanserler ile *B. hominis* enfeksiyonu arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlandı. Çalışmaya toplamda 70 kolorektal kanser tanılı hasta ve 30 sağlıklı kontrol bireyi dahil edildi. Dışkı örneklerinde mikroskopik inceleme ve gerçek zamanlı kantitatif PZR (RT-qPZR) kullanılarak *B. hominis* varlığı araştırıldı. *B. hominis* pozitif bulunan örneklerde Oxford Nanopore yeni nesil dizileme yöntemiyle alt tip tayini ve biyoinformatik analiz yapıldı. Ayrıca hasta ve kontrol grubu serumlarında, sistemik inflamasyon sitokinlerinden tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) düzeyleri araştırıldı.

Mikroskopik incelemede çalışma grubunun %28,6'sında, kontrol grubunun %20'sinde *B. hominis* pozitifliği saptandı. RT-qPZR sonuçları daha yüksek duyarlılık gösterdi; çalışma hastalarında %42,9 ve kontrol grubunda %66,7 oranında *B. hominis* pozitifliği tespit edildi. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,029$). Alt tip analizlerinde ST1, ST3, ST5, ST7 ve ST9 izolatları tespit edildi. Her iki grupta da en sık tespit edilen alt tip ST3 oldu. Alt tip dağılımları irdelendiğinde, kolorektal kanser hastalarına özgü herhangi bir alt tip öne çıkmadı. TNF- α pozitifliği yalnızca kolorektal kanser grubunda tespit edilmiş olup sağlıklı kontrollerin tamamında TNF- α negatif bulundu. Ancak *B. hominis* pozitifliği ile TNF- α pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi.

Sonuç olarak, bu çalışmada *B. hominis* sıklığı kolorektal kanser hastalarında, sağlıklı kontrollere göre anlamlı oranda düşük bulundu ve parazitin TNF- α aracılığıyla inflamasyonu artırıcı bir etkisi tespit edilmedi. Çalışma sonuçları, *B. hominis*'in kommensal bir protozoon olabileceği görüşünü desteklemektedir. Kontrol grubunun sınırlı örnek sayısı, bu çalışmanın istatistiksel gücünü etkileyebilecek temel bir kısıtlılık olarak öne çıkmaktadır. Özellikle alt tipler arası etkileşimler ve uzun vadeli immünolojik tepkiler açısından daha büyük hasta gruplarını kapsayan ileri prospektif çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alt tip, *Blastocystis hominis*, Kolorektal kanser, RT-qPZR, TNF- α , Yeni nesil dizileme.

ABSTRACT

Necmettin Erbakan University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Microbiology
Medical Microbiology
[Doctoral Thesis]

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP OF *BLASTOCYSTIS HOMINIS* WITH COLORECTAL CANCERS

Yaser Ali Hussein MUSAWA

Konya-2025

Blastocystis hominis is the most common parasite in stool examinations. Whether it is commensal or pathogenic has been widely debated in recent years, and studies have examined the parasite in different patient groups. While some studies suggest that *B. hominis* is a component of the human microbiota due to its prevalence in healthy individuals, other studies investigating its pathogenic potential have also attracted attention. This study aimed to investigate a possible association between colorectal cancer and *B. hominis* infection.

The study included a total of 70 patients diagnosed with colorectal cancer and 30 healthy control individuals. The presence of *B. hominis* was investigated in stool samples using microscopic examination and real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Subtype identification and bioinformatic analysis were performed on *B. hominis*-positive samples using the Oxford Nanopore next-generation sequencing method. Additionally, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) levels, a cytokine associated with systemic inflammation, were investigated in the serum of both groups.

Microscopic examination revealed *B. hominis* positivity in 28.6% of the patient group and 20% of the control group. RT-qPCR results showed higher sensitivity, with *B. hominis* positivity detected in 42.9% of study patients and 66.7% of the control group. The difference between the two groups was statistically significant ($p = 0.029$). ST1, ST3, ST5, ST7 and ST9 isolates were detected in subtype analyses. The most frequently detected subtype in both groups was ST3. However, no specific subtype showed a clear predilection for cancer patients. TNF- α positivity was only detected in the colorectal cancer group, and all healthy controls tested negative for TNF- α . However, no significant correlation was observed between *B. hominis* positivity and TNF- α positivity.

In conclusion, this study found that the frequency of *B. hominis* was significantly lower in patients with colorectal cancer than in healthy controls, and no TNF- α -mediated inflammatory effect of the parasite was detected. The results of the study support the view that *B. hominis* may be a commensal protozoan. However, the limited sample size of the control group is a significant limitation that could affect the statistical power of this study. Further prospective studies involving larger patient groups are needed, particularly with regard to interactions between subtypes and long-term immunological responses.

Keywords: *Blastocystis hominis*, Colorectal cancer, Next-generation sequencing, RT-qPCR, TNF- α .

1 GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 Giriş

Kolorektal kanser (KRK), etyopatogeneizde hem genetik hem de çevresel faktörlerin önemli rol oynadığı, en yaygın ve ölümcül kanser türlerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, KRK tüm dünyada üçüncü en sık teşhis edilen kanser türü olup, kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır. 2020 yılında 1,9 milyondan fazla yeni vaka ve 935.000 ölüm bildirilmiştir (Bray ve ark., 2024). Diyet, sigara kullanımı, kronik kabızlık ve fiziksel inaktivite gibi yaşam tarzı faktörleri KRK için iyi bilinen riskler olsa da artan kanıtlar mikrobiyal enfeksiyonların bu hastalığın gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynayabileceğini göstermektedir (Garrett, 2019). Bu mikrobiyal ajanlar arasında, insan gastrointestinal sisteminde yaygın olarak bulunan bir protozoon olan *B. hominis*, kolorektal kanserle potansiyel ilişkisi nedeniyle son yıllarda dikkat çekmektedir.

B. hominis, insan bağırsağını kolonize eden bir protozoon olup, dışkı örneklerinde sıkça tespit edilmektedir. Birçok çalışma, *B. hominis*'in KRK hastalarındaki yaygınlığını araştırmıştır. KRK hastalarında *Blastocystis* enfeksiyonunun yaygınlığı %2,8-%46,7 arasında değişmektedir (Kumarasamy ve ark., 2022). Esteghamati ve ark., (2019), 39'u KRK tanılı olan 85 kanserli hasta üzerinde yapmış oldukları çalışmada, KRK grubunun %28,2'sinde *B. hominis* pozitif bulmuşlardır. Benzer şekilde, Çin'de yapılan bir başka çalışmada KRK hastalarında %8,1'lik bir yaygınlık bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2017). Suudi Arabistan'da yapılan bir çalışmada, araştırmacılar KRK hastalarının %29,7'sinin *B. hominis* ile enfekte olduğunu gözlemlemiş ve bu popülasyonda en yaygın alt tipin alt tip 1 olduğunu belirlemişlerdir (Mohamed ve ark., 2017).

B. hominis'in patojenik rolü uzun süredir tartışılmakta olup, bazı çalışmalar irritabl bağırsak sendromu ve artan bağırsak geçirgenliği gibi durumlara katkıda bulunabileceğini öne sürmektedir (Guard, 2024). Daha da ilginç son in vitro çalışmalar, *Blastocystis* antijenlerinin kolorektal kanser hücre hattı üzerinde sitopatik ve immunolojik etkileri olduğunu göstermiştir. Bu etkilere bağlı olarak, kanser hücrelerinin büyümesinin, invazyon yeteneğinin ve metastaz potansiyelinin artabileceği bildirilmektedir. Bu çalışmalar, *Blastocystis*'in konak bağışıklık tepkisinde değişiklik ve artan oksidatif hasar yoluyla mevcut KRK'yı şiddetlendirebileceğine dair destekleyici veriler sağlamıştır. *B. hominis*'in kolorektal kanser gelişiminde veya ilerlemesindeki rolü, tartışma konusu olmaya devam etmektedir (Kumarasamy ve ark., 2022).

1.2 Amaç

Bu tez, *B. hominis* ile kolorektal kanser arasındaki potansiyel ilişkiyi araştırmayı amaçlamaktadır ve bu amaca ulaşmak için aşağıdaki hedefleri ele almaktadır:

1. *B. hominis*'in kolorektal kanser hastalarındaki sıklığını sağlıklı bireylerle karşılaştırmak.
2. *B. hominis*'in genetik alt tiplerinin kolorektal kanserle ilişkili olup olmadığını incelemek.
3. *B. hominis* enfeksiyonuna sahip kolorektal kanser hastalarında pro-inflamatuar sitokin olan Tümör Nekroz Faktörü alfa (TNF- α) pozitifliğini sağlıklı kontrollerle karşılaştırmak.

Bu sorulara yanıt verilerek, bu çalışma *B. hominis*'in kolorektal kanserdeki potansiyel rolüne ışık tutmayı ve mikrobiyal enfeksiyonlar ile kanser arasındaki etkileşime dair büyüyen bilimsel literatüre katkıda bulunmayı ummaktadır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 *B. hominis*: Genel Bakış

B. hominis, insanlar da dahil olmak üzere çeşitli konaklarda bulunan bir enterik protozondur. İnsan bağırsağında yerleşik olan bu protozoon, insan dışkı örneklerinde en sık tespit edilen mikroorganizmalardan biridir (Stensvold ve ark., 2007). *B. hominis*, birden fazla morfolojik formda bulunan tek hücreli, anaerobik ve ökaryotik bir protisttir; her bir form farklı boyutlarda görülebilmektedir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde insan dışkı örneklerinde sıklıkla tespit edilmektedir (Tan, 2008). *B. hominis*, ilk olarak 1870 yılında Rus bilim insanı Fedor Aleksandrovich Lesh (Lösch) (1840–1903) tarafından rapor edilmiştir; ancak taksonomik konumunun belirsizliği nedeniyle uzun süre görmezden gelinmiştir (Lesh, 1975).

İlk olarak bir dışkı örneğinde zararsız bir maya olarak keşfedilmiş ve 1912 yılında Brumpt tarafından adlandırılmıştır (Brumpt, 1912). Morfolojik özellikleri nedeniyle başlangıçta bir maya olarak sınıflandırılan bu organizma, daha sonra 1996 yılında moleküler çalışmalarla protozoon olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Zierdt, 1991). Bilim insanı Zierdt, bu organizmayı morfolojik özelliklerine dayanarak ökaryotik tek hücreli bir organizma olarak tanımlamıştır (Zierdt & Tan, 1976b). 1976 yılında Zierdt ve Tan, *B. hominis*'in sporozoa alt filumu içerisinde bir protozoon olarak yeniden sınıflandırılmasını önermişlerdir (Zierdt & Tan, 1976'a). Daha sonra, SSUrRNA gen dizisiyle elde edilen genetik özelliklere dayanarak, bu organizmanın taksonomik konumu başka bir organizma olan stramenopil dışında yeni bir alef

olarak belirlenmiş ve sonraki revizyonlarda chromista adı verilmiştir (CAVALIER-SMITH, 1998). Son filogenetik çalışmalar, cins içindeki genetik çeşitlilik nedeniyle *B. hominis*'in *Blastocystis türleri* olarak yeniden adlandırılmasını önermektedir (Stensvold ve ark., 2007). *Blastocystis*, 17 alt tipe (ST1-ST17) sahip olup, bunlardan ST1-ST9 insanlarda bulunmaktadır (Alfellani ve ark., 2013). İnsanda en yaygın görülen alt tip ST3 iken, ST1 özellikle gastroenterit vakalarında patojenite ile ilişkilendirilmiştir (Scanlan ve ark., 2014).

2.2 Taksonomi ve Sınıflandırma

Blastocystis'in mevcut taksonomik sınıflandırması şu şekildedir:

- Domain: Eukaryota
- Süpergrup: Stramenopiles
- Filum: Bigyra
- Sınıf: Blastocystea
- Takım: Blastocystida
- Cins: Blastocystis
- Tür: *B. hominis*

Stramenopiles grubundaki diğer üyelerden farklı olarak, *Blastocystis*'in kamçı veya yan saçakları yoktur (Silberman ve ark., 1996). Bu organizma, oksijenden yoksun bağırsak ortamında yaşayabilen zorunlu anaerob bir canlıdır ve insanlar, böcekler, sürüngenler, kuşlar ve memeliler gibi geniş bir konakçı yelpazesine sahiptir (Jantermtor ve ark., 2013). Ayrıca, alt tipler arasında konakçı özgüllüğü bulunur. Örneğin, ST1-ST8 hem insanlarda hem de hayvanlarda bulunabilirken, ST9 yalnızca insanlarda tespit edilmiştir ve ST10-ST17 ise insan dışı konakçılara özeldir (Zhang ve ark., 2017).

2.3 Yaşam Döngüsü

B. hominis'in yaşam döngüsü tam olarak aydınlatılamamıştır, ancak şu aşamalar kabul edilir:

Alınım: Kist formları, kontamine su veya gıdalarla alınır.

Ekzistasyon: Gastrointestinal sistemde kistler açılır ve vakuoler, granüler veya ameboid formlara dönüşür.

Çoğalma: Parazit, esas olarak ikiye bölünme yoluyla aseksüel çoğalır.

Enkistasyon: Belirli koşullarda kist oluşturarak dışkıyla atılır.

Bulaş: Kistler yeni bir konakçı tarafından alınarak döngü tekrarlanır (Jeremiah & Parija, 2013).

Kist formu, çok katmanlı kalın bir duvara sahiptir ve çevresel stres faktörlerine dirençlidir. Yeni oluşan kistler, vakuoler formun yüzey kalıntılarını taşıyabilir veya "çıplak" görünebilir (X. Zhang ve ark., 2003). Bu kistler genellikle 3–6 µm çapındadır ve bir ila dört çekirdek, mitokondri ve lipid/glikojen vakuolleri içerir (Stenzel & Boreham, 1991).

2.4 Morfoloji

B. hominis çeşitli morfolojik formlar sergiler:

1. **Vakuoler Form:** Dışkı örneklerinde ve laboratuvar kültürlerinde en sık görülen formdur. Hücre hacminin %90'ını kaplayan büyük bir merkezi vakuol içerir. Sitoplazma, çekirdekler (genellikle bir veya iki) ve diğer organeller ince bir periferik tabakada toplanmıştır. Boyutları 2–200 µm arasında değişir (Stenzel & Boreham, 1996).
2. **Granüler Form:** Vakuoler forma benzer, ancak sitoplazma veya vakuol içinde granüller bulunur. Antibiyotik tedavisi görmüş eski kültürlerde daha sık görülür (Jeremiah & Parija, 2013). Elektron mikroskopu çalışmaları metabolik, üreme ve lipid granülleri tanımlamıştır (Tan & Stenzel, 2003).
3. **Ameboid Form:** Nadir görülen bu form, psödopodia benzeri uzantılar içerir ve ishalleri vakalarla ilişkilendirilir (X. Zhang ve ark., 2012).
4. **Multivakuoler Form:** Taze dışkı örneklerinde sık görülür, çoklu küçük vakuoller içerir (Stenzel ve ark., 1991).
5. **Kist Form:** En dayanıklı formdur, kalın duvarlı ve 3–6 µm boyutundadır (X. Zhang ve ark., 2003).

2.5 Klinik Önemi

B. hominis'in klinik önemi tartışmalıdır. Bazı çalışmalar ishal, karın ağrısı ve şişkinlik gibi semptomlarla ilişkilendirirken, bazıları asemptomatik taşıyıcılık olduğunu bildirmiştir (Tan, 2008). Literatürde klinik prezentasyonu etkileyen faktörler aşağıda sunulan başlıklarda özetlenebilir:

1. **Alt Tip Farklılıkları:** ST1'in gastroenteritle bağlantılı olabileceği bildirilirken, ST3 insanlarda en yaygın alt tiptir (Stensvold, 2013).

2. **Konakçı Faktörleri:** Bağışıklık durumu, bağırsak mikrobiyotası ve genetik yatkınlık etkili olabilir (Jeremiah & Parija, 2013).

3. **Ko-enfeksiyonlar:** Diğer patojenlerin varlığı semptomları şiddetlendirebilir (Tan, 2008).

B. hominis, diğer patojenik parazitler, bakteriler veya virüsler olmadan mevcut olduğunda, ishal, kramplar, mide bulantısı, ateş, kusma ve karın ağrısının nedeni olabilir ve tedavi gerektirebilir. İrritabl bağırsak sendromu olan hastalar üzerinde yapılan yakın tarihli bir çalışmada, *B. hominis*'in varlığının tesadüfi olmadığı görülmüştür. *B. hominis* ile bağırsak tıkanıklığı ve hatta enfeksiyöz artrit arasında olası ilişkiler öne sürülmüştür. Diğer altta yatan rahatsızlıkları olan hastalarda semptomlar daha belirgin olabilir (Xu ve ark., 2021). Bu organizmanın insidansı, parazit incelemesi için gönderilen dışkılarda şüphelenilenden daha yüksek görünmektedir. Diğer yakın tarihli çalışmalar, semptomatik bir *B. hominis* enfeksiyonunun tedaviye yanıt vermesi durumunda, iyileşmenin tespit edilemeyen başka bir patojenik organizmanın (*E. histolytica*, *G. intestinalis* veya *D. fragilis*) ortadan kaldırılması nedeniyle olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bazı çalışmalardan elde edilen veriler, dışkı örneklerinde yaygın olarak görülmesine rağmen, *B. hominis*'in patojenik olmadığı yönündedir (Duda ve ark., 2015). Bağışıklık sistemi zayıflamış hastalar, psikiyatri hastaları, yaşlı kişiler, gelişmekte olan ülkelere gelen göçmenler, gelişmekte olan tropikal ülkelere seyahat edenler ve kontroller dahil olmak üzere 1 216 yetişkin üzerinde yapılan bir çalışma, tüm risk gruplarında *B. hominis*'in en sık tespit edilen parazit olduğunu göstermiştir. *B. hominis*, yalnızca şiddetli immünsüpresyonu olan kişileri içeren grupta tespit edildiğinde gastrointestinal semptomlarla anlamlı bir korelasyon göstermiştir (Beyhan ve ark., 2015).

2.6 Epidemiyoloji ve Patojenite

B. hominis küresel olarak dağılmış olup hem semptomlu hem de asemptomatik bireylerde bulunabilir (Safadi ve ark., 2014). Sağlıklı bireylerde yüksek oranda görülmesi, bazı araştırmacıları bu organizmayı normal bağırsak mikrobiyotasının bir parçası olarak değerlendirmeye yöneltmiştir (Scanlan & Stensvold, 2013b). Ancak, son çalışmalar özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde veya önceden var olan gastrointestinal hastalığı bulunan kişilerde *Blastocystis* 'in patojenik potansiyele sahip olabileceğini giderek daha fazla önermektedir (Ajampur & Tan, 2016).

B. hominis enfeksiyonunun olası klinik bulguları arasında ishal, karın ağrısı, şişkinlik, bulantı, kabızlık, kilo kaybı ve rektal kanama yer almaktadır (Tan, 2008). Bu protozoon, aynı

zamanda artmış bağırsak geçirgenliği ve irritabl bağırsak sendromu ile daha yüksek bir sıklıkta ilişkilendirilmiştir (Yason ve ark., 2019). Bununla birlikte, *Blastocystis*'in patojenitesi hala tartışmalı olup, bazı araştırmacılar semptomların ortak enfeksiyonlara veya bulaşıcı olmayan nedenlere bağlı olabileceğini savunmaktadır (Stensvold ve ark., 2009).

2.7 Laboratuvar Tanısı

B. hominis'in tanısında en sık kullanılan yöntem ışık mikroskopisi ile değerlendirmedir. Bu aşamada yapılan nativ-lugol inceleme kolay ve en sık kullanılan yöntemdir. Rutin dışkı incelemeleri *B. hominis*'i izole etmede ve tanımlamada oldukça etkilidir, ancak direkt preparatların incelenmesi organizmayı kolayca ortaya çıkaramayabileceğinden kalıcı boyalı yayma tercih edilir. En sık trikrom boyama kullanılır, ancak hematoksilen, Gram boyama, Giemsa ve Wright boyama yöntemlerinin de başarılı olduğu tespit edilmiştir. Taze dışkı fiksasyondan önce suyla seyreltildiğinde (konsantrasyon yöntemi için), kistler dışındaki *Blastocystis* organizmaları yok edilir ve böylece muhtemelen yanlış negatif bir sonuç elde edilir. Organizmalar rapor formunda nadir, az, orta veya çok olarak kantite edilmelidir (Jeremiah & Parija, 2013).

Hem ELISA hem de floresan antikor testleri, *B. hominis* enfeksiyonlarına karşı serum antikorunun tespiti için geliştirilmiştir. ELISA yöntemiyle yapılan bir çalışmada; 1/50'lik bir eşik seyreltme kullanılarak, 30 serum örneğinin 27'si 1/50 veya daha yüksekte pozitif; 42 kontrol kan bankası serum örneğinin hepsi 1/50'de negatif bulunmuştur (Zierdt ve ark., 1995). Güçlü bir antikor yanıtı, bu organizmanın semptomlara neden olma gücüne bağlıdır. Ayrıca, *B. hominis* semptomlu hastalık sırasında ve sonrasında serum antikor üretiminin gösterilmesi, bu protozoanın patojenik rolü için immünolojik kanıt sağlar, ancak kronik enfeksiyonlarda serolojik yanıt 2 yıl veya daha fazla sürebilir (Nagel ve ark., 2015). Tüm hücresele *B. hominis* antijenlerine karşı oluşmuş tavşan antiserumu kullanılarak, vakuoler, granüler ve amoeboid formlar IFA ile belirlenmiştir (AL & HÖKELEK, 2007).

B. hominis çeşitli kültür ortamlarında çoğaltılabilir. Ancak sonuçlar 48-72 saat sonra elde edilir. Kültürde *B. hominis*'in üremesi için anaerobik ortam ve 37°C'lik ısı sağlanmalıdır. Boeck ve Drbohlav'ın yoğunlaştırılmış yumurtalı besiyeri, Dobell ve Laidlaw besiyeri (Ringer solüsyonu +%20 insan serumu+streptomisin sülfat), Diamond's triptikaz serum monofazik besiyeri, Minimal Essential Medium +%10 at serumlu besiyeri, Iscove's Modified Dulbecco's Medium +%10 at serumu kullanılan besiyerleri olarak belirtilmektedir.

B. hominis için DNA tabanlı tanımlama teknikleri daha az sıklıkta kullanılmaktadır, hepsi kültürlenmiş *Blastocystis* spp izolatlarından DNA'yı içerir. Bu çalışmalar, insanlardan izole edilen en az yedi *B. hominis* genotipinin varlığını göstermiştir ve daha sonraki çalışmalar daha fazlasının muhtemel varlığını bildirmiştir. Potansiyel patojeniteyi genotip/izolata bağlamak için birkaç girişimde bulunulmuştur ancak sonuçlar belirsizdir (Stensvold ve ark., 2006).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), mikrobiyal patojenlerin tespiti ve karakterizasyonu için yaygın olarak kullanılan, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir moleküler tanısal tekniktir. Bu yöntem, klinik örneklerde düşük yoğunluktaki organizmaların tanımlanmasına olanak sağlayan hedef DNA dizilerinin çoğaltılmasına dayanır. PZR analizleri genellikle yüksek kopya sayısına sahip ve tür özel değişkenlik gösteren küçük alt birim ribozomal RNA (SSU rRNA) geni gibi korunmuş genetik bölgeleri hedef alır; bu da yöntemin duyarlılığını ve ayırt edici gücünü artırır (Persing ve ark., 2021).

Çeşitli PZR formatları geliştirilmiştir: konvansiyonel PZR, nested PZR ve gerçek zamanlı PZR gibi. Bunların her biri duyarlılık, özgüllük ve kantifikasyon açısından farklı avantajlar sunmaktadır. Özellikle gerçek zamanlı PZR, amplifikasyon süreci sırasında floresan sinyal tespiti ile patojenlerin hızlı tespitini ve nicelendirilmesini sağlamaktadır (Reischl & van Belkum, 2021).

Geleneksel tanı yöntemleri olan mikroskopi veya kültür sonuçlarının belirsiz olduğu ya da zor kültürlenebilen veya kültüre uygun olmayan organizmaların tespit edilemediği durumlarda PZR özellikle değerlidir. Patojeni tespit etmenin yanında PZR, amplifiye edilmiş ürünlerin sekans analizi aracılığıyla moleküler tiplenenin ve alt tiplendirmenin yapılmasını sağlayarak epidemiyolojik araştırmalar, bulaşım dinamikleri ve potansiyel zoolojik kaynakların belirlenmesine katkı sağlar (Hoorfar, 2022).

Ayrıca multipleks PZR yöntemleri, tek bir reaksiyonda çoklu patojenlerin eşzamanlı tespitini mümkün kılarak polimikrobik enfeksiyonlar veya sendromik prezantasyonlar söz konusu olduğunda tanısal verimliliği artırır. Yine de PZR yöntemi, örnekle ilgili dikkatli işlemeyi, uygun altyapıyı ve teknik uzmanlığı gerektirdiğinden, kaynak bakımından sınırlı ortamlarda kullanımı kısıtlanabilir. Ancak doğruluğu, hızı ve moleküler karakterizasyon kapasitesi nedeniyle modern tanısal mikrobiyolojinin temel taşıdır (Mahon ve ark., 2022).

2.8 *B. hominis* ve Kolorektal Kanser: Ortaya Çıkan Kanıtlar

Son çalışmalar, *B. hominis* ile kolorektal kanserler arasında potansiyel bir bağlantı olduğunu ortaya koymuştur (Chandramathi ve ark., 2010). İn vitro çalışmalar, *Blastocystis* antijenlerinin kolorektal karsinom hücreleri üzerinde sitopatik ve immünolojik etkileri indükleyerek hücre çoğalmasını, invazyon yeteneğini ve metastatik potansiyeli artırdığını göstermiştir (Chandramathi ve ark., 2014). Örneğin, HTC116 kolon kanseri hücre hatlarında *Blastocystis* antijenlerine maruz kalınması, hücre çoğalmasında artışa neden olmuştur (Chandramathi ve ark., 2010). Ayrıca, *Blastocystis* antijenlerinin katepsin B ve TGF- β ifadesini artırarak kanser ilerlemesiyle ilişkili bu moleküllerin rolünü güçlendirdiği gösterilmiştir (Chandramathi ve ark., 2014).

Hayvan çalışmalarının bu bulguları desteklediği bildirilmektedir. Bir fare modelinde, *Blastocystis* ile enfekte edilen ve karsinojen azoxymethane (AOM) ile muamele edilen farelerde, enfekte olmayan kontrol grubuna kıyasla kolonik kriplerde 1,6 kat artış gözlenmiştir. Ayrıca, *Blastocystis* ile enfekte olan fareler adenomlar geliştirmiş ve önemli displaziye sahip hiperplastik anormal kripler sergilemiştir. Bu bulgular, *Blastocystis*'in kolorektal karsinogenez sürecini teşvik etmede potansiyel bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Chandramathi ve ark., 2010).

2.9 Genetik Çeşitlilik ve Alt Türler

B. hominis, SSU-rDNA analizi temelinde 17 alt tipe sahip olacak şekilde önemli genetik çeşitlilik gösterir (Alfellani ve ark., 2013). ST1-ST9 alt tipleri insanlarda bulunur ve bunlar arasında en yaygın olanı ST3'tür. ST1 alt tipi, özellikle gastroenterit vakalarında patojenite ile ilişkilendirilmiştir (Scanlan ve ark., 2014). *Blastocystis*'in genetik heterojenliği, patojenik potansiyelindeki farklılıklara katkıda bulunabilir; bazı alt tiplerin diğerlerinden daha virülan olduğu düşünülmektedir (Alfellani ve ark., 2013).

2.10 İnflamasyon Yanıtı ve TNF- α

İnflamasyon, kolorektal kanserin gelişiminde ve ilerlemesinde merkezi bir rol oynar. TNF- α gibi pro-inflamatuar sitokinler, inflamasyon yanıtının ana düzenleyicileridir ve kanser gelişimiyle ilişkilendirilmiştir (Grivennikov ve ark., 2010; Terzić ve ark., 2010). *B. hominis* enfeksiyonunun konak immün yanıtını değiştirebildiği ve potansiyel olarak pro-inflamatuar sitokin seviyelerini etkileyebileceği gösterilmiştir (Yason ve ark., 2019).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulundan 16 Haziran 2023 tarihli ve 2023/4395 sayılı kararla onay alındı. Çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü tarafından 23DR18009 proje numarası ile desteklendi.

3.1 Çalışma Tasarımı ve Örneklerin Toplanması

Bu çalışma, Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yürütülen prospektif bir vaka-kontrol çalışmasıdır. Çalışmaya Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi kliniğince takip edilen ve kolorektal kanser tanısı konulan hastalar dahil edildi. Çalışma iki grup üzerinde gerçekleştirildi:

- **Grup 1:** 70 kolorektal kanser hastası.
- **Grup 2:** Kolorektal kanseri ve ishali olmayan 30 sağlıklı kontrol

Eylül 2023- Mayıs 2024 tarihleri arasında her iki gruptan da dışkı ve serum örnekleri toplandı. Dışkı örnekleri, *B. hominis* varlığını belirlemek için doğrudan mikroskopik inceleme ve Giemsa boyama yöntemi kullanılarak incelendi. Daha sonra serum ve dışkı örnekleri, ELISA ve PZR çalışması için epondorf tüplere alınarak çalışma zamanına kadar -80°C'ye kaldırıldı.

3.2 Mikroskopik İnceleme

Dışkı örneklerinde öncelikle serum fizyolojik ve lugolle direk mikroskopik inceleme yapıldı. Lugol boyama yöntemi, *B. hominis* kistlerinin ve vakuoler formlarının görünürlüğünü artırmak için kullanıldı. Pozitif örnekler kaydedildi.

Direkt mikroskopik inceleme için, küçük bir parça dışkı örneği lamın bir kenarında serum fizyolojik ile diğer kenarında lugol ile sulandırılarak hazırlandı. Daha sonra lamel ile kapatılan örnekler parazitik yapıları tespit etmek için ışık mikroskopunda 10X ve 40X büyütme altında incelendi.

3.2.1 Giemsa boyama

Dışkı örneklerinin tamamı *Blastocystis* yapılarını daha iyi görüntüleyip yakalayabilmek için Giemsa boyama ile değerlendirildi.

Gereken Malzemeler:

1. Dışkı Örnekleri: Taze veya korunmuş dışkı örneği.
2. Mikroskop Lamları: Temiz, yağsız cam lamlar.
3. Fiksasyon Maddesi: Fiksasyon için mutlak metanol.
4. Giemsa Boyası Çözeltisi: Ticari olarak temin edilebilir veya laboratuvarında hazırlanabilir.
5. Fosfat Tamponu (pH 6.8): Giemsa boyasını seyreltmek için kullanılır.
6. Distile Su: Yıkama ve çözelti hazırlamak için kullanılır.
7. İmmersiyon Yağı: Yüksek çözünürlüklü mikroskopi için.
8. Mikroskop: 100x immersiyon lensli mikroskop

Prosedür:**Adım 1: Yayma Hazırlama****1. Dışkı Örneklerini Toplama:**

- Temiz bir spatül veya uygulayıcı çubuk kullanarak küçük bir miktarda dışkı örneği alındı

2. İnce Yayma Hazırlama:

- Dışkı süspansiyonundan küçük bir damla (veya katı dışkıdan küçük bir parça) temiz bir mikroskop lamı üzerine yerleştirildi.
- Örnek, ince ve düzgün bir tabaka oluşturacak şekilde başka bir lam veya yayıcı kullanılarak eşit şekilde yayıldı.
- Oda sıcaklığında tamamen kurumaya bırakıldı.

Adım 2: Fiksasyon**Yaymayı Fikse Etme:**

- Kurumuş yayma, lamın üzerine metanol dökülerek 3-5 dakika boyunca bekletildi.

- Fiksasyon sonrası lam tekrar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Doğru fiksasyon, parazit yapılarının lam üzerinde sabit kalmasını ve boyama sırasında zarar görmemesini sağlamaktadır.

Adım 3: Giemsa ile Boyama

1. Çalışma Boyası Hazırlama:

- Stok Giemsa boyasını fosfat tamponu (pH 6.8) ile 1:20 oranında sulandırıldı (örneğin, 1 mL Giemsa + 20 mL tampon).
- Kabarcık oluşumunu önlemek için hafifçe karıştırıldı.

2. Boyanın Uygulanması:

- Fikse edilmiş yayma üzerine tüm yüzeyi kaplayacak şekilde sulandırılmış Giemsa çözeltisi döküldü.
- Lam, istenilen boyama yoğunluğuna bağlı olarak oda sıcaklığında 20–30 dakika bekletildi

Adım 4: Yıkama

- Lamlar, fazla boyayı uzaklaştırmak için distile su ile hafifçe yıkandı.
- Lamı eğik tutarak suyun akıp gitmesine izin vererek tamamen kurumaya bırakıldı.
- Kuruyan lam ışık mikroskopunda 100'lük büyütmede incelendi.

3.3 Moleküler Analiz

B. hominis genomik DNA'sı tüm dışkı örneklerinden izole edildi ve *B. hominis* varlığını doğrulamak için PZR analizi gerçekleştirildi. *Blastocystis* pozitif dışkı örnekleri, alt tipleri belirlemek amacıyla Oxford nanopore yeni nesil dizileme (NGS) kullanılarak analiz edildi.

3.3.1 DNA izolasyonu

PZR çalışması öncesinde dışkı örneklerinin DNA izolasyonu için QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Almanya) ticari kiti kullanıldı. Üretici firmanın önerilerine göre çalışma yürütüldü.

Çalışma Basamakları:

1. 180-220 mg dışkı örneği, 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde tartıldı ve tüp buz üzerinde bekletildi.
2. Her bir dışkı örneğine 1 ml İnhibitEX Tamponu eklendi. Örnekler, dışkı tamamen homojenize olana kadar 1 dakika süreyle vortex edildi.
3. Süspansiyon, 70°C'de 5 dakika boyunca ısıtıldı. Zor parçalanmış hücreler için sıcaklık 95°C'ye çıkarıldı. Ardından örnekler 15 saniye süreyle vortex edildi.
4. Örnekler, dışkı partiküllerini çöktürmek için 1 dakika santrifüj edildi.
5. Yeni bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne 15 µl Proteinaz K eklendi.
6. Adım 4'ten elde edilen süpernatantın 200 µl'si, Proteinaz K içeren 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
7. 200 µl Buffer AL eklendi ve karışım 15 saniye süreyle vortex edildi.
8. Örnekler, 70°C'de 10 dakika inkübe edildi.
9. Lizat içerisine 200 µl etanol (96-100%) eklendi ve karışım vortex edilerek homojenize edildi.
10. Adım 9'dan elde edilen 600 µl'lik lizat, dikkatlice QIAamp spin kolonuna uygulandı. Kapak kapatıldı ve 1 dakika santrifüj edildi. QIAamp spin kolonu, yeni bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve filtrat içeren tüp atıldı.
11. QIAamp spin kolonu dikkatlice açıldı ve 500 µl Buffer AW1 eklendi. 1 dakika santrifüj edildi. QIAamp spin kolonu, yeni bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve filtrat içeren tüp atıldı.
12. QIAamp spin kolonu dikkatlice açıldı ve 500 µl Buffer AW2 eklendi. 3 dakika santrifüj edildi. Filtrat içeren toplama tüpü atıldı.
13. QIAamp spin kolonu, yeni bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve eski toplama tüpü (filtrat ile birlikte) atıldı. 3 dakika daha santrifüj edildi.
14. QIAamp spin kolonu, yeni ve etiketli bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. 200 µl Buffer ATE, doğrudan QIAamp membranının üzerine pipetlendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra, DNA'yı elüsyon etmek için 1 dakika santrifüj edildi.

3.3.2 PZR çalışması

Çalışmada *B. hominis*'i kantitatif olarak tespit eden *B. hominis* RT-qPZR (Bioeksen, Türkiye) ticari kiti kullanıldı.

Çalışma Basamakları:

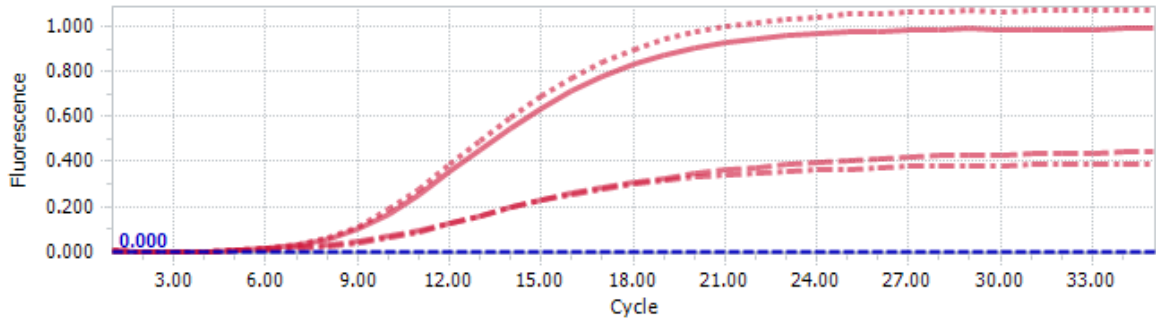
1. RT-qPZR reaksiyon karışımı, Bioeksen'in kiti için verdiği talimatlara uygun olarak hazırlandı. Bu süreç, QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit kullanılarak elde edilen DNA, *B. hominis* -spesifik primer ve proplar ile reaksiyon için gerekli enzimler ve nükleotidlerin eklenmesini içeriyordu.
2. Çalışma Roche LightCycler® 96 Gerçek Zamanlı PZR cihazı (Şekil 3.1.) ile yapıldı. PZR çalışma basamakları ve termal döngü parametreleri üretici firma önerileri doğrultusunda hazırlandı. Reaksiyon karışımı LightCycler cihazına yerleştirildi ve cihaz üreticinin talimatlarına göre programlandı.



Şekil 3.1. Roche LightCycler® 96 Gerçek Zamanlı PZR cihazı

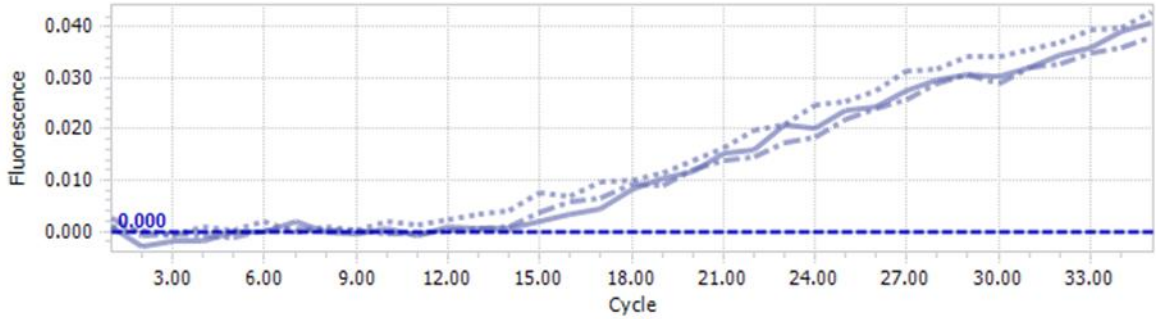
3. Sonuçlar, cihazın yazılımı kullanılarak analiz edildi. *B. hominis* varlığı, hedef DNA'nın amplifikasyonunun tespitiyle belirlendi. Gerçek zamanlı kantitatif PZR (qPZR) analizinin doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlamak için her çalışmada pozitif kontroller, negatif kontroller ve internal kontrol kullanıldı.

4. Pozitif kontroller, beklenen sigmoidal amplifikasyon eğrileriyle karakterize olup tutarlı döngü eşiği (Ct) değerlerini göstermektedir. Şekil 3.2.'te pozitif kontrollere ait amplifikasyon eğrileri gösterilmiş olup bu eğriler PZR reaksiyonunun başarıyla gerçekleştiğini ve hedef DNA'nın amplifiye edildiğini göstermektedir. Sigmoidal amplifikasyon eğrilerinin varlığı testin doğru çalıştığını göstermektedir.



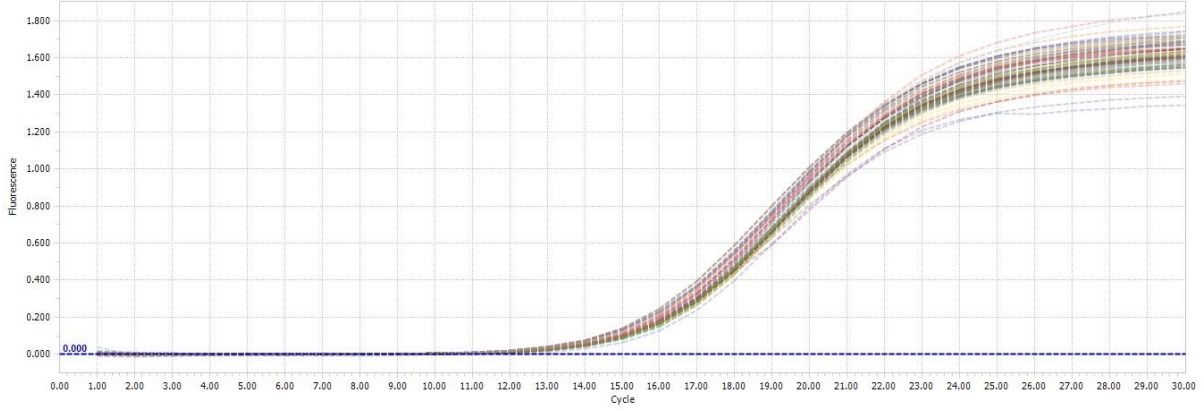
Şekil 3.2. qPZR analizinde pozitif kontrol örneklerine ait amplifikasyon eğrileri

5. Negatif kontroller (Şablonsuz Kontroller, NTC), tüm döngüler boyunca herhangi bir amplifikasyon göstermemiştir, bu da kontaminasyon olmadığını ve özgül olmayan amplifikasyonların meydana gelmediğini kanıtlamıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. qPZR analizinde negatif kontrole (No-Template Control, NTC) ait amplifikasyon eğrileri.

6. İnternal kontroller, tüm reaksiyonlarda düzenli olarak amplifiye olmuş, bu da nükleik asit ekstraksiyonunun etkinliğini ve PZR inhibisyonunun bulunmadığını göstermiştir (Şekil 3.4.). İç kontrol eğrilerinin eksikliği, örneklerin PZR inhibisyonuna uğradığını veya ekstraksiyonun başarısız olduğunu gösterebilir. Bu kalite kontrol önlemleri, PZR testinin optimal şekilde çalıştığını ve örnek analizlerinin güvenilir olduğunu doğrulamıştır.
7. PZR çalışmasında *B. hominis* pozitif olarak tespit edilen örneklerin DNA'ları sekans çalışması için ayrıldı.



Şekil 3.4. qPZR analizinde kullanılan internal kontrol (IC) örneklerine ait amplifikasyon eğrileri.

3.4 Yeni Nesil Dizileme ve Biyoinformatik Analiz

PZR ile pozitif bulunan örnekler sekans çalışmasına alındı. *B. hominis* alt tiplerini belirlemek için yeni nesil dizileme yöntemlerinden Oxford Nanopore Teknolojileri kullanıldı. Öncelikle ekstraksiyonu yapılan DNA örneklerinin konsantrasyonları iQuant dsDNA HS Assay Kiti (#N011) kullanılarak Invitrogen Qubit 4 cihazıyla ölçüldü. Örnekler daha sonra 18S rRNA analizi için ayrıldı. 10 µL hacimde 18S PZR kuruldu. Örneklerden PZR reaksiyonunda 1 ng/µL olacak şekilde eklendi. Hazırlanan mixler tüplere 6 µL olacak şekilde dağıtıldı. PZR detayları Tablo 3.1.'de gösterildi. PZR çalışmasında kullanılan primerler Tablo 3.2.'de belirtildi.

Tablo 3.1. PZR reaksiyonu bileşenleri.

	1X
Enzim: 2X Hi-fi MobiomX (#HF101)	5 µL
Primer: 566F –1289R Tailsiz Primer Mix	1 µL

Tablo 3.2. PZR'de kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Dizisi (5'→3')
18S-566F	CAGCAGCCGCGGTAATTCC
18S-1289R	ACTAAGAACGGCCATGCACC

Örneklere uygulanan PZR programında, öncelikle 95 °C'de 3 dakika süren bir başlangıç denatürasyonu uygulandı. Daha sonra, 30 döngü boyunca 95 °C'de 15 saniye, 58 °C'de 15 saniye ve 72 °C'de 45 saniyelik aşamalar gerçekleştirildi. Döngülerin tamamlanmasının ardından, 72 °C'de 5 dakika süren bir final uzatma adımı uygulandı ve program 4 °C'de süresiz bekletme ile sonlandırıldı.

Jel Elektroforez:

PZR sonrası amplifikasyon, %1 agaroz jel elektroforezi ile teyit edildi. MobiomX DL5000 (#DL5-01) DNA Marker kullanılarak, Bento Lab Pro (#BLM1B2P) cihazında 80 voltta 25 dakika yürütüldü.

Kütüphane Hazırlığı:

Jel elektroforez sonrası SQK-LSK109 ve EXP-NBD196 kitleriyle 50 örnek için kütüphane hazırlığı yapıldı. Öncelikle NEB Ultra II End-Prep dA Tailing Module (#E7647L) kullanılarak end-prep reaksiyonu 20°C 5 dakika, 65°C 5 dakika inkübe edilerek gerçekleştirildi. Ardından, örneklerin barkod ligasyonu, Blunt/TA ligase master mix (#M0367L) kullanılarak protokol uyarınca 20°C 20 dakika, 65°C 10 dakika inkübe edilerek gerçekleştirildi. Barkod ligasyonu reaksiyonu sonrasında örnekler tek bir temiz eppendorf tüpte toplandı. Ardından AMPure manyetik boncuk ile pürifikasyon gerçekleştirildi ve pürifikasyonun ardından ddH₂O ile elüsyon yapılarak barkodlu poollanmış örneklerin konsantrasyonu iQuant dsDNA HS Assay Kiti (#N011) kullanılarak invitrogen Qubit 4 cihazıyla ölçüldü ve DNA konsantrasyonu adaptör aşamasına geçmeden önce kontrol edildi. Ardından, adaptör ligasyonu MobiomX T4 DNA Ligase (#M0202) kullanılarak 30°C'de 10 dakika inkübe edilerek gerçekleştirildi. Sonrasında, adaptör bağlı kütüphane AMPure Manyetik boncuklar ile pürifiye edildi. Bu aşamada yıkamalar Short Fragment Buffer ile yapıldı. Pürifikasyon aşamasının ardından EB ile elüsyon yapıldı. Elüsyon aşaması sonrası sekans için yüklemeye hazır kütüphanenin konsantrasyonu Qubit ile ölçülerek DNA konsantrasyonu tekrar kontrol edildi. Hazırlanan bu kütüphaneden FLO-MIN106D akış hücresine 115 fmol yüklendi ve sekans MK1D cihazında gerçekleştirildi. Sekans, barkod başına en az 10.000 okuma alındığında durduruldu.

Biyoinformatik Analiz:

Örnekler için subtyping referans veri tabanından (<http://entamoeba.lshtm.ac.uk/blastorefseqs.htm>) elde edilen tam uzunluktaki *Blastocystis* referans nükleotid dizileriyle en iyi eşleşmeye dayalı hizalama yöntemiyle gerçekleştirildi. Bu işlemde, GenBank'ta bulunan diğer tam uzunluktaki alt tip dizileri de kullanıldı ve CENTRIFUGE algoritması şu parametrelerle uygulandı:

-k 1 --min-totallen 800 --qc-filter. CENTRIFUGE algoritması, herhangi bir eşleşme tespit edemediği durumlarda bir rapor (report) dosyası oluşturmaz ve sonuç çıktısı (result) dosyasını da boş olarak verir.

Teyit amacıyla BLAST algoritması, %95 benzerlik oranı (-perc_identity 95), e-değeri 0.01 (-evalue 0.01) ve maksimum hedef sayısı 1 (-max_target_seqs 1) parametreleriyle çalıştırıldı. Veritabanı olarak ise CENTRIFUGE için oluşturulan tam uzunluktaki Blastocystis referans nükleotid dizileri kullanıldı.

3.5 TNF- α ELISA Çalışması

İnsan serumundaki TNF- α varlığı, sandviç enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA) kullanılarak ticari bir kitle (Human TNF- α ELISA Kit, A.B.T. Laboratory Industry, Ankara, Türkiye) üretici firmanın protokolüne göre çalışılarak araştırıldı.

Kit Özellikleri

- Tespit Aralığı: 15.63–1000 pg/mL
- Duyarlılık: 6.5 pg/mL

Çalışma Prensibi:

TNF- α ile kaplanmış mikroplyetler, anti-TNF- α antikorunu kullanılarak analiti (TNF- α) yakalamaktadır. Analit, biyotin ile işaretli antikor ve avidin-HRP konjugatı kullanılarak tespit edildi. Optik yoğunluk (OD), 450 nm dalga boyunda ölçüldü ve OD değerleri TNF- α konsantrasyonu ile orantılı olarak değerlendirildi.

Bu ELISA kiti, "Sandviç-ELISA" metodunu kullanmaktadır. Kite dahil edilen mikroplyetler insan TNF- α 'ya özgü bir antikorla önceden kaplanmıştır. Örnekler veya standartlar, mikroplyetin kuyucuklarına eklenir ve burada spesifik antikora bağlanırlar. Daha sonra her kuyucuğa sırasıyla insan TNF- α 'ya özgü biyotinle işaretli tespit antikorunu ve Avidin-Katılaştırılmış Peroksidaz (HRP) konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Bağlanmayan bileşenler yıkama işlemiyle uzaklaştırılır.

Daha sonra her kuyucuğa bir substrat çözeltisi ilave edilir. Sadece insan TNF- α , biyotinle işaretli tespit antikorunu ve Avidin-HRP konjugatını içeren kuyucuklar mavi renk geliştirir. Enzim-substrat reaksiyonu, stop solüsyonun eklenmesiyle durdurulur ve renk sarıya döner. Optik dansite (OD) değeri, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür.

OD değeri, insan TNF- α konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Örneklerin OD değerleri standart eğri ile karşılaştırılarak, örneklerdeki insan TNF- α konsantrasyonu belirlenir.

Çalışma Basamakları:

1. Standartlar ve örnekler (100 µL/kuyu), çift olarak eklenerek inkübe edildi (70 dakika, 37°C).
2. Her kuyuya biyotin ile işaretli dedeksiyon antikoru (100 µL/kuyu) eklendi ve inkübe edildi (50 dakika, 37°C).
3. Kuyular, yıkama tamponu ile 3 kez yıkanarak temizlendi.
4. HRP konjugatı (100 µL/kuyu) eklendi ve inkübe edildi (30 dakika, 37°C).
5. Yıkamadan sonra, substrat reaktifi (100 µL/kuyu) eklendi ve karanlıkta inkübe edildi (15 dakika, 37°C).
6. Tepkime, durdurma çözeltisi (50 µL/kuyu) ile sonlandırıldı ve optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda ölçüldü. TNF- α konsantrasyonları, ortalama alınmış çift OD değerleri kullanılarak 4-parametrelili lojistik standart eğri (log-log grafiği) üzerinden hesaplandı.

3.6 İstatistiksel Analiz

Bu tez kapsamında toplanan verilerin analizi için SPSS (v27) kullanıldı. Verilerin değerlendirilmesinde kullanılan analiz adımları aşağıda açıklanmıştır:

1. Veri Normalizasyonu ve Dağılım Analizi

- Toplanan veriler (örneğin, *B. hominis* enfeksiyon sıklığı, TNF- α düzeyleri ve genetik alt tip dağılımı) öncelikle normal dağılıma uygunlukları açısından incelenmiştir.

- Verilerin normal dağılım gösterip göstermediğini belirlemek için Shapiro-Wilk testi ve Kolmogorov-Smirnov testi gibi normallik testleri kullanılmıştır.

- Verilerin normal dağılım göstermediği durumlarda parametrik olmayan testler tercih edilmiştir.

2. Gruplar Arası Karşılaştırmalar

- *B. hominis* Sıklığı: Kolorektal kanser hastaları (Grup 1) ile sağlıklı kontrol bireyleri (Grup 2) arasındaki *B. hominis* enfeksiyon oranlarını karşılaştırmak için Ki-Kare Testi kullanılmıştır.

- TNF- α Düzeylerinin Karşılaştırılması: Kolorektal kanser hastaları ile sağlıklı kontroller arasında serum TNF- α düzeylerini karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi (normalde dağılmayan veriler için) uygulandı.

- Alt Tip Dağılımı: Kolorektal kanser hastalarında ve sağlıklı kontrollerde farklı genetik alt tiplerin (ST1-ST9) dağılımı Ki-Kare Testi ile değerlendirildi.

3. Veri Görselleştirme

İstatistiksel analizin sonuçları grafikler ve tablolar aracılığıyla görselleştirildi:

- Bar Grafikler: *B. hominis* enfeksiyon yaygınlığı ve alt tip dağılımı.
- Çubuk Grafikler: TNF- α düzeylerinin gruplar arasında dağılımı.

4. Önem Düzeyi

Tüm istatistiksel analizlerde, önem düzeyi (p değeri) 0,05 olarak kabul edildi. $P < 0,05$ olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4 BULGULAR

4.1 Demografik Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen 100 örnekten 70'i kolorektal kanser hastalarına, 30'u ise sağlıklı kontrollere (kolorektal kanser tanısı olmayan ve ishali olmayan) aitti. Çalışma hastaları grup 1, kontrol grubundaki hastalar grup 2 olarak tanımlandı. Grup 1'deki hastaların %52,9 (n=37)'u kadın ve %47,1 (n=33)'i erkek iken grup 2'deki kontrol hastalarının %60 (n=18)'i kadın ve %40 (n=12)'i erkekti. Tüm hastalar 22-89 yaş aralığında olup yaş ortalaması 56,97 olarak hesaplandı. Kolorektal kanserli hastaların yaş ortalaması 61,27 olup yaşları 22-89 arasında değişmektedir. Kontrol grubunun yaş ortalaması ise 45,60 olup yaşları 22-78 arasında değişmektedir.

Kolorektal kanserli hastalarda *B. hominis* pozitif bulunan hastaların %50'si erkek, %50 kadın iken kontrol grubunda pozitif bulunan hastaların %40'ı erkek, %60'ı kadın idi. Her iki grupta da cinsiyet ile *B. hominis* pozitifliği arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (p=0,841).

Yaş ortalaması ile *B. hominis* pozitifliğinin dağılımına baktığımızda, kolorektal kanserli hastalarda *B. hominis* pozitif olanların yaş ortalaması 62,33, negatif olanların yaş ortalaması 60,48 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ise pozitif olanların yaş ortalaması 44,10, negatif olanların yaş ortalaması 48,60'dır. Her iki grupta da yaş ile *B. hominis* pozitifliği arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (p=0,639).

Tüm örneklerde mikroskopik inceleme, PZR ile moleküler çalışma, NGS analiziyle alt tip araştırma, biyoinformatik analiz ve serumda TNF- α ELISA çalışması yürütüldü.

4.2 Mikroskopik Değerlendirme Sonuçları

Mikroskopik değerlendirmede kolorektal kanserli hastaların %28,6'sında (n=20), kontrol grubunun %20'sinde (n=6) *B. hominis* tespit edildi.

4.3 PZR Analiz Sonuçları

RT-qPZR ile kolorektal kanserli hastaların %42,9'unda (n=30), kontrol grubunun %66,7'sinde (n=20) *B. hominis* tespit edildi (Tablo 4.1.). Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p = 0,029).

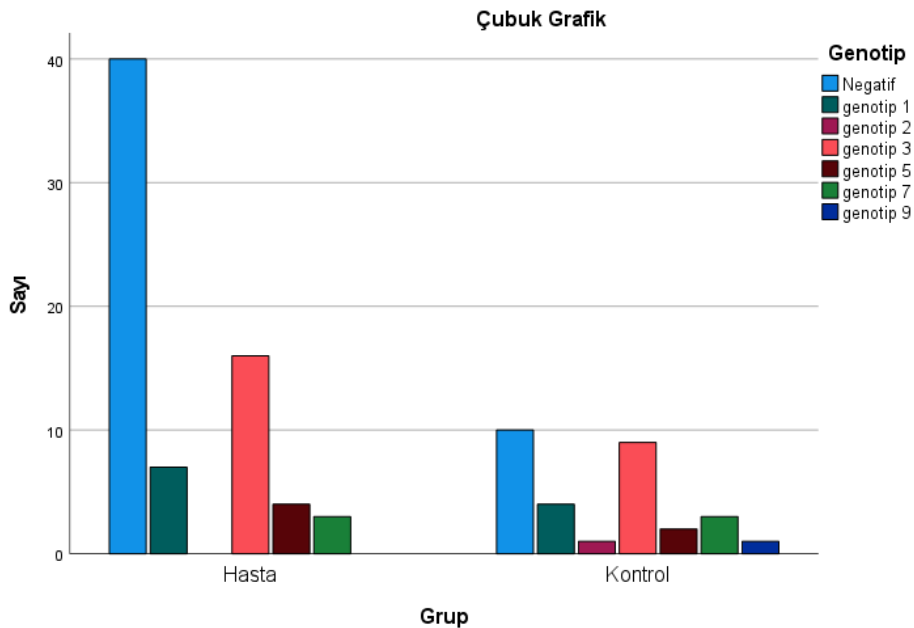
Tablo 4.1. *B. hominis* pozitifliğinin çalışma ve kontrol grubunda dağılımı.

		Grup 1	Grup 2	Toplam	χ^2	P	
<i>B. hominis</i> PZR sonuçları	Pozitif	Sayı	30	20	50	4.762	0.029
		Oran (%)	%42,9	%66,7	%50		
	Negatif	Sayı (n)	40	10	50		
		Oran (%)	%57,1	%33,3	%50		
Toplam	Sayı (n)	70	30	100			
	Oran (%)	%100	%100	%100			

4.4 Dizileme analizi sonuçları

NGS yöntemlerinden Oxford Nanopore Teknolojileri kullanılarak yapılan dizileme analizinde her bir örnek, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI)'dan indirilmiş olan *B. hominis* 18S rRNA gen bölgelerine hizalandı. En iyi hizalamaya sahip referans seçilerek alt tip belirlendi. Tablo 4.2. ve Tablo 4.3.'de hasta ve kontrollere ait en iyi hizalama veren türler ve gen bankası erişim numaraları yer almaktadır.

Alt tip dağılımına baktığımızda kolorektal kanserli grup ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p = 0.181$). Kolorektal kanserli hastalarda ST3, ST1, ST5 ve ST7 alt tipleri tespit edilirken; kontrol grubunda ST3, ST1, ST7, ST5, ST2 ve ST9 alt tipleri bulundu. Her iki grupta da en sık tespit edilen alt tip ST3 oldu. Kolorektal hasta grubunda %53,3 (n=16) ST3 varken, kontrol grubunda %45 (n=9) ST3 bulundu. İkinci sıklıkta tespit edilen ST1 olup, hasta grubunda (%23,3) ve kontrol grubunda (%20) birbirine yakın oranlarda tespit edildi (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. *B. hominis* enfeksiyon yaygınlığı ve alt tip dağılımı.

Tablo 4.2. Kolorektal kanserli hastaların alt tip sonuçları ve gen bank erişim numaraları (Genbank ID).

Örnek No	En yakın tür	Alt tip	Genbank ID
4	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS61.1	ST 5	AM275384.1
5	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
7	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
8	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
9	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
11	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
12	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS342.2	ST 7	AM275391.1
16	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
18	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
22	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
26	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
30	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
32	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS141.1	ST 1	AM275354.1
33	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS17.1	ST 7	AM275393.1
39	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
42	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS74.1	ST 1	AM275348.1
44	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
45	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS342.2	ST 7	AM275391.1
46	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS74.1	ST 1	AM275348.1
49	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS74.1	ST 1	AM275348.1
51	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS141.1	ST 1	AM275354.1
52	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS61.1	ST 5	AM275384.1
54	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS74.1	ST 1	AM275348.1
57	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
60	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS196.1	ST 5	AM275381.1
61	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
62	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS61.1	ST 5	AM275384.1
63	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
66	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS74.1	ST 1	AM275348.1
71	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1

Tablo 4.3. Kontrol grubuna ait alt tip sonuçları ve gen bank erişim numaraları (Genbank ID).

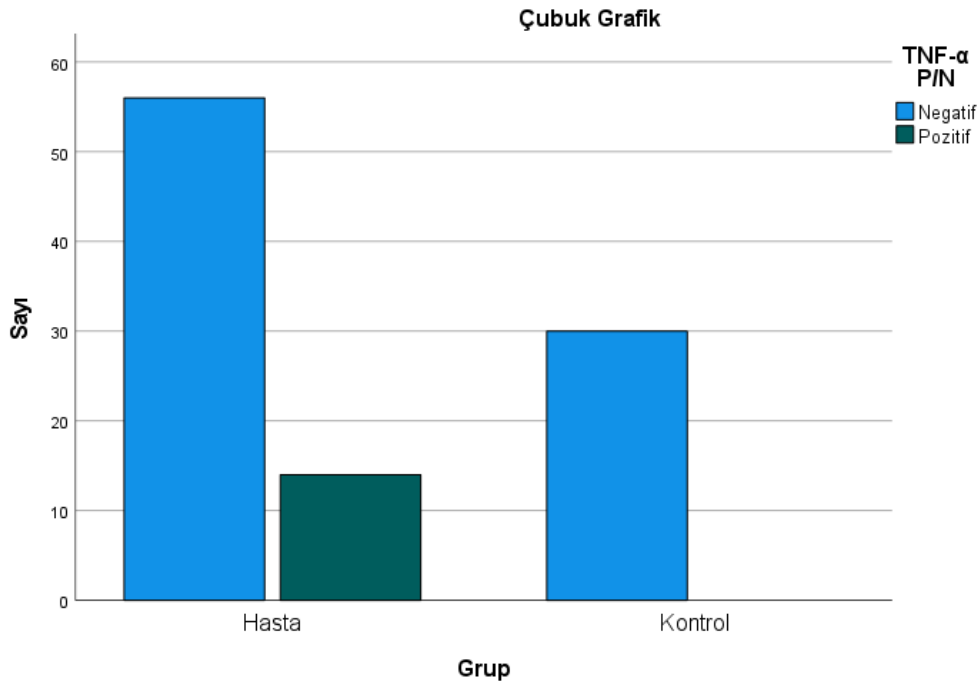
Örnek Adı	En yakın tür	Alt tip	Genbank ID
K1	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
K2	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
K3	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
K7	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS195.1	ST 9	AM275392.1
K10	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
K23	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS342.2	ST 7	AM275391.1
K24	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS61.1	ST 5	AM275384.1
K26	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS61.1	ST 5	AM275384.1
K27	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
K28	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
K29	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
K41	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS74.1	ST 1	AM275348.1
K42	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS74.1	ST 1	AM275348.1
K44	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS146.3	ST 2	AM275364.1
K45	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
K46	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS158.2	ST 3	AM275365.1
K47	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS17.1	ST 7	AM275391.1
K48	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS74.1	ST 1	AM275348.1
K51	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS74.1	ST 1	AM275348.1
K52	<i>B. hominis</i> izolat 05/RS17.1	ST 7	AM275391.1

4.5 Serum TNF- α test sonuçları

ELISA yöntemiyle hasta ve kontrol grubunda TNF- α kantitatif olarak araştırıldı. Tamamı kolorektal hasta grubunda olmak üzere 14 hastada TNF- α pozitifliği saptandı. Kontrol grubunun serum örneklerinde TNF- α tespit edilmedi (Şekil 4.2.). Hasta grubu ile TNF- α tespiti arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.008$). TNF- α pozitif bulunan 14 örneğin 6'sı *B. hominis* pozitif bulunan hastalara ait iken, 8'i *B. hominis* negatif hastalara aitti (Tablo 4.4.) *B. hominis* pozitif ve *B. hominis* negatif hastalar arasında TNF- α pozitifliği açısından anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0,564$).

Tablo 4.4. TNF- α pozitifliğinin *B. hominis* pozitifliğine göre dağılımı

	Kolorektal Kanserli Grup		Kontrol Grubu	P değeri
	<i>B. hominis</i> Pozitif	<i>B. hominis</i> Negatif		
TNF- α Pozitif Sayısı (%)	6 (%8,6)	8 (%11,4)	0	0,564
TNF- α Negatif Sayısı (%)	24 (%34,3)	32 (%45,7)	30	
Toplam	30	40		



Şekil 4.2. TNF- α düzeylerinin gruplar arasında dağılımı.

5 TARTIŞMA

5.1 *B. hominis* Sıklığı

B. hominis, insan ve hayvan bağırsaklarını etkileyen ve spesifik konağı olmayan zoonotik bir protozodur. *B. hominis* enfeksiyonlarının ve baskın alt genotiplerin yaygınlığı ülkeler ve aynı ülkenin bölgeleri arasında değişmektedir. Bu parazitin yaygınlığı gelişmekte olan ülkelerde %60'tan fazla iken, gelişmiş ülkelerde %5 ila %20 arasında bildirilmiştir (Salehi ve ark., 2021).

B. hominis seroprevalansındaki farklılık, *Blastocystis* epidemiyolojisindeki bölgesel varyasyonları, konak immünitesini ya da çevresel faktörleri yansıtabilir. Türkiye'de *B. hominis*'in hem semptomatik hem de asemptomatik bireylerde oldukça yaygın olduğu bilinmektedir (Özçakır ve ark., 2007; Seyer ve ark., 2017). Bu durum, sulak ortamlar aracılığıyla bulaşma ve bazı bölgelerde yetersiz sanitasyon koşulları nedeniyle açıklanabilir (Ertuğ, Okyay, Gülmez, & Göktaş, 2015).

Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti üniversite hastanesinde yapılan bir çalışmada mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen dışkı örneklerinde %76,2 oranında *B. hominis* pozitifliği rapor edilmiştir (Güler & Süer, 2021). İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na başvuran hastalarda geriye dönük olarak parazit dağılımları incelenmiş ve %63,23 sıklıkla en sık tespit edilen parazit *B. hominis* olmuştur (Polat ve ark., 2020). Ankara'da yapılan bir diğer retrospektif çalışmada %63,5 oranla dışkı örneklerinde en sık tespit edilen parazit *B. hominis* olarak rapor edilmiştir (Selek ve ark., 2016). Van'da yapılan 11 yıla ait sonuçların tarandığı retrospektif bir diğer çalışmada parazitoloji laboratuvarına gönderilen örneklerde %26,5 pozitiflik saptanmış ve parazit en sık etken olarak bildirilmiştir (Yılmaz et al., 2019)

Türkiye'den bildirilen bazı çalışmalarda ise *B. hominis* sıklığı %10'un altındadır. Van'da yapılan bir çalışmada gastrointestinal şikayetlerle başvuran 300 hasta incelenmiş ve *B. hominis* sıklığı %5,7 olarak saptanmıştır (Ekici ve ark., 2023). İzmir'de yapılan bir diğer çalışmada, parazitoloji laboratuvarına gönderilen örnekler retrospektif taranmış ve en sık tespit edilen parazit %4,8 ile *B. hominis* olmuştur (Gürbüz ve ark., 2020). Ankara'da yapılan bir çalışmada yerli ve mülteci hastalarda rutin dışkı incelemesinde paraziter etkenler araştırılmıştır. Çalışmada her iki grupta da en sık rastlanan parazit *B. hominis* iken yerli grupta pozitiflik oranı %1,8, diğer grupta %6,8 olarak bildirilmiştir (Demirel & Dinç, 2022).

Literatürde KRK hastalarında *B. hominis* sıklığını araştıran epidemiyolojik çalışmalar birbirinden farklı veriler sunmaktadır. Farklı hasta gruplarında bağırsak parazitlerinin sıklığını araştıran bir çalışmada 39 KRK hastasında %28,2 oranında *B. hominis* tespit edilmiştir (Esteghamati ve ark., 2019). Çin'de yapılan başka bir çalışmada 49 KRK hastalarında %8,1 oranında *Blastocystis* prevalansı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2017). Mide kanseri hastaları ile kontrol grubunun karşılaştırmalı değerlendirildiği bir çalışmada, kanserli grupta %14 oranında *B. hominis* pozitifliği bulunurken, kontrol grubunda %2 oranında pozitiflik bulunmuştur. İki grup arasındaki *B. hominis* pozitifliği açısından farklılık istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur (Gezici ve ark., 2023). Özbekistan'da yürütülen bir çalışmada, KRK hastalarında kontrol popülasyonuna kıyasla bağırsak kurtları ve protozoaların daha yüksek prevalansı gözlemlenmiştir. *Blastocystis*'in kolorektal kanser hastalarındaki yaygınlığı, kontrol popülasyonuna göre dört kat daha yüksek bulunmuştur (Toychiev ve ark., 2018). Suudi Arabistan'da yürütülen başka bir çalışmada, KRK hastaları arasında *Blastocystis* prevalansı %29,7, GİS dışı kanser hastalarında %25, sağlıklı kişilerde %15 olarak bildirilmiştir. KRC hastaları arasında ST1 baskınken, GİS dışı kanser hastalarında ST2 baskın olarak bulunmuştur (Mohamed ve ark., 2017). Malezya'da yapılan bir çalışmada, 221 kontrol hastası ve 204 KRK arasında *B.hominis*'in genel yaygınlığı %15,29'dur. Kolorektal kanser hastalarında %21,08, kontrol grubunda %9,95 pozitiflik saptanmıştır. KRK hastalarında parazit anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($P < 0,01$). ST3, her iki grupta da en sık bulunan subtip olup kolorektal kanser hastalarında kontrol hastalarına kıyasla daha yüksek oranda tespit edilmiştir (Kumarasamy ve ark., 2014).

Mısır'da yapılan bir çalışmada, KRK ve kontrol grubunda sırasıyla %52 ve %42 pozitiflik tespit edilmiş ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Ali ve ark., 2022). Audebert ve ark.'ları *Blastocystis* kolonizasyonu olan ve olmayan hastalarda mikrobiyotal karşılaşma yaptıkları çalışmalarında; kolonizasyonunun disbiyozla ilişkili bağırsak bozuklukları, kanser veya inflamasyondan ziyade sağlıklı bir bağırsakla bağlantılı olduğunu göstermişlerdir (Audebert ve ark., 2016). Yakın tarihli bir çalışma, ST4'ün (Singapur'daki sağlıklı Wistar sıçanından izole edilen aksenli izolat ST4-WR1) faydalı bir kommensal olduğunu göstermiştir. Söz konusu çalışmada ST4'ün; kısa zincirli yağ asitlerinin üretimini artırdığı, Th 2 ve T-reg hücreleri düzenlediği, anti-inflamatuar IL-10 sitokinlerinin salınımını artırdığı ve kolitten iyileşmeyi desteklediği bildirilmiştir. Bu nedenle, *Blastocystis* ST4'ün bağırsak mikrobiyotasının stabilitesini iyileştirdiği raporlanmıştır (Deng et al., 2022). Bir başka çalışmada *Blastocystis*'in, bağırsak epitel hücrelerinin antimikrobiyal peptitlerden

LL-37 salgılamasını uyardığı bildirilmiştir (Yason ve ark., 2016). Benzer şekilde, Billy ve ark.'ları, sıçanlarda uzun vadeli *Blastocystis* ST3 kolonizasyonunun bağırsak iltihabını ve koliti hafiflettiğini ve bağırsak ekosistemini etkileyerek, inflamatuvar sitokinleri (TNF- α ve IL-1 β) azaltarak ve IL-17 (IL17re/IL17C) transkriptlerini uyararak iyileşmelerini hızlandırdığını bildirmişlerdir (Billy ve ark., 2021). Deng ve ark.'ları ST1'in *Alloprevotella* ve *Akkermansia* gibi yararlı bakterileri aktive ederek, T hücresi tepkilerini etkileyerek ve kısa zincirli yağ asitlerinin üretimini artırarak farelerde kolitin şiddetini azalttığını bildirmişlerdir. Söz konusu çalışmada literatürde ST1 patojeniteyle ilişkilendirilmesine rağmen, ST1 ile kolonizasyonun bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu olumlu yönde etkileyerek insan bağırsağı için faydalı olabileceği raporlanmıştır (Deng ve ark., 2023).

Bu çalışmada kolorektal kanser hastalarında %42,9, kontrol grubunda %66,7 oranında pozitiflik bulundu. Sonuçlar, bu çalışmada, *B. hominis*'in sağlıklı bireylerdeki yaygınlığının KRK hastalarına göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğunu göstermektedir. Bu bulgu, daha önceki bazı çalışmalarda bildirilen, parazitin KRK hastalarında sağlıklı kontrollere göre daha sık bulunduğu hipotezini kısmen sorgulatmaktadır (Ali ve ark., 2022; Hawash ve ark., 2021).

Pozitiflik oranı kontrol grubunda daha yüksek olmasına rağmen bu durum, parazitin genel popülasyonda yaygın olarak bulunmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu bulgular, *B. hominis* 'in yalnızca varlığıyla kanser gelişimi arasında doğrudan bir ilişki kurulamayacağını ve ileri çalışmalarda alt tipler ile bağışıklık yanıtlarının da değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Sistemik bir derlemede, KRK'ler arasında *B. hominis*'in prevalansının %2 ile %28 arasında değiştiği bildirilmiştir (Kumarasamy ve ark., 2022; Taghipour ve ark., 2022). Çalışmamızda, daha önceki çalışmalara kıyasla KRK'li hastalarda çok daha yüksek bir sıklık kaydedilmiştir, ancak Türkiye'den bildirilen çalışmalardaki oranlara benzerdir (Güler & Süer, 2021; Polat ve ark., 2020b).

B. hominis'in patojenitesine dair ortaya atılan bir diğer hipotez, *B. hominis*'in bağırsak mikrobiyotası içinde faydalı ya da kommensal bir rol oynayabileceğidir (Stensvold & Clark, 2016). Buna göre bizim çalışmamızda KRK hastalarında *B. hominis*'in azalmasının sebebi, tümöre bağlı inflamasyon veya bağışıklık modülasyonu sonucunda meydana gelen mikrobiyota değişiklikleri olabilir kanaatindeyiz. Bu hipotez, *Blastocystis* türlerinin doğrudan patojenik

olmadıkları, konakçıya göre ilişkilerinin mutualistten fırsatçıya kadar değişebileceğini öne süren son bulgularla uyumludur (Scanlan & Stensvold, 2013; C. R. Stensvold & Clark, 2016).

Çalışmamızda *B. hominis* 'in kolorektal kanser (KRK) hastalarında sağlıklı kontrollere göre daha düşük sıklıkta bulunması, mikrobiyotal elaman olabileceği ihtimalini güçlendirmektedir.

Çeşitli çalışmalarda *Blastocystis*'in coğrafi olarak farklı bölgelerde yaşayan sağlıklı bireylerde yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir. Türkiye gibi bölgelerde de hem gastrointestinal yakınmaları olan hem de asemptomatik bireylerde yüksek oranda tespit edilmiştir (Beyhan ve ark., 2015; Ertuğ ve ark., 2015) . Gastrointestinal semptomları olmayan bireylerde sık rastlanması, bu organizmanın normal bağırsak florasının bir parçası olduğunu ve klasik bir patojenden ziyade dengeli bir bağırsak ekosisteminin göstergesi olabileceğini desteklemektedir. Hatta bazı araştırmacılar, *Blastocystis* kolonizasyonunun mikrobiyal dengenin korunmasında ve intestinal homeostazda rol oynayabileceğini öne sürmektedirler (H. E. Guard ve ark., 2024).

Çalışmamızda sağlıklı kontrollerde daha yüksek tespit oranı, *B. hominis*'in KRK ile ilişkili olan bozulmuş bağırsak ortamından negatif şekilde etkilenebileceğini düşündürmektedir. Tümör mikroçevresi kronik inflamasyon, bağışıklık aktivasyonu ve besin maddelerinin değişimini içerir; tüm bu faktörler *B. hominis* 'in hayatta kalması için gerekli olan ekolojik nişi olumsuz etkileyebilir (Grivennikov ve ark., 2010b; Terzić ve ark., 2010b). Bu bulgular, *B. hominis* 'in doğrudan kanserojenezde rol oynamadığını, ancak yokluğunun hastalık ilerlemesiyle ilişkili daha geniş mikrobiyal bozulmaların bir göstergesi olabileceğini desteklemektedir.

Ayrıca, *B. hominis* enfeksiyonu ile serum TNF- α seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmaması da bu organizmanın KRK hastalarında sistemik inflamasyonu tetiklemediğini destekleyen önemli bir veridir. *B. hominis* 'in in vitro koşullarda pro-inflamatuar sitokin üretimini artırabildiği gösterilmiş olsa da (Yason ve ark., 2019), in vivo durum çok daha karmaşıktır ve muhtemelen bağırsak mikrobiyotasının diğer bileşenleriyle ve konakçı immünitisiyle olan etkileşimleri içerir.

Sonuç olarak, bu gözlemler *B. hominis*'in kararlı ve inflamasyon olmayan bir bağırsak ekosisteminin bir göstergesi olabileceğini, ancak doğrudan bir hastalık etkeni olmadığını göstermektedir. Gelecekte yapılması gereken çalışmalar, *B. hominis* dinamiklerinin bağırsak

sağlığı, bağışıklık durumu ve mikrobiyal çeşitlilik açısından uzun vadeli değerlendirmesini içermelidir. Böylece bu organizmanın hem sağlık hem de hastalık süreçlerindeki ekolojik önemi daha iyi anlaşılabilir.

5.2 Alt Tip Dağılımı ve Potansiyel Patojenite

Alt tip analizi, ST3'ün en sık görülen genotip olduğunu göstermiştir. Jantermtor ve ark., (2013) tarafından yapılan çalışmada da Tayland'daki bir hastaneye kayıtlı hastalar arasında genotip 3'ün en yaygın olduğu ortaya konmuştur.

Çalışmamızda toplam altı farklı *B. hominis* alt tip (ST1, ST2, ST3, ST5, ST7 ve ST9) belirlendi. Her iki grupta da en sık görülen alt tip ST3 (%53,3 hasta grubunda, %45 kontrol grubunda) idi. Bu bulgular küresel verilerle uyumludur; çünkü ST3 insan popülasyonlarında en yaygın alt tiplerden biri olarak kabul edilmektedir (Yan ve ark., 2021). Ancak alt tip dağılımı açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Bu sonuç, herhangi bir alt tipin KRK ile doğrudan ilişkili olmadığını düşündürmektedir.

ST3 genellikle non-patojenik olarak değerlendirilse de bazı çalışmalarda intestinal geçirgenliği artırdığı ve irritabl bağırsak sendromu ile ilişkilendirildiği gösterilmiştir (Yason ve ark., 2019b). Hasta ve kontrol grubunun her ikisinde de ST5 ve ST7 alt tiplerinin bulunması, bu alt tiplerin ishal hastalıkları ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları ile zaman zaman ilişkilendirilmiş olmasıyla örtüşmektedir (Ramírez ve ark., 2020). ST2 ve ST9 yalnızca kontrol grubunda tespit edilmiştir. Bu durum, bu alt tiplerin immünolojik olarak değiştirilmiş ortamlarda (örneğin KRK) devam etmekte zorlanıyor olabileceğini düşündürmektedir.

Malatyalı ve ark., (2023) tarafından Türkiye'de yapılan bir çalışmada, genel popülasyon örneklerinde ST3 ve ST1'in en yaygın alt tipler olduğu gösterilmiştir. Ancak bu çalışmada KRK hastaları özel olarak değerlendirilmemiştir. Çalışmamız, bu eksikliği gidererek KRK ve kontrol gruplarındaki alt tip dağılımlarını karşılaştırarak, bazı alt tiplerin KRK ile potansiyel ilişkisini değerlendirmeye katkı sunmaktadır.

Alt tiplerin konak immün cevabı veya mikrobiyota ile nasıl etkileştiğine dair bilgilerin sınırlı olması nedeniyle, bu bulguların alt tip özgüllüğü açısından kesin bir yargıya varmak mümkün değildir. Gelecekte yapılacak uzun vadeli izlem çalışmalarıyla alt tiplerin dominansındaki değişimlerin hastalık ilerlemesiyle ilişkisi incelenebilir.

5.3 TNF- α Seviyeleri ve İnflamasyon Yanıtı

Serum TNF- α düzeyleri KRK hastalarında (%20 prevalans) anlamlı biçimde yüksek bulunmuştur ($p=0.008$), ancak *B. hominis* enfeksiyonu ile TNF- α pozitifliği arasında istatistiksel bir ilişki saptanmamıştır. *B. hominis* pozitif bireylerin yalnızca %12'sinde TNF- α pozitifliği tespit edilmiştir. Bu bulgular, *B. hominis*'in bu çalışma grubunda sistematik inflamasyonu doğrudan tetiklemediğini düşündürmektedir.

TNF- α , kolorektal kanser patogenezinde önemli bir pro-inflamatuar sitokin olarak bilinmektedir (Grivennikov ve ark., 2010b). KRK hastalarında bu sitokin düzeylerindeki artış, kronik inflamasyonun tümör oluşumuna katkı sunduğu hipotezini desteklemektedir. Ancak *B. hominis* ile TNF- α arasındaki bağlantı kurulamaması, bu organizmanın bu süreçte merkezi bir rol oynamadığını gösterebilir.

Bu sonuçlar, Yason ve ark., (2019) tarafından in vitro yapılan çalışmayla çelişmektedir. Bu çalışmada *B. hominis*'in konak immün yanıtını modüle ettiği ve TNF- α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini artırdığı gösterilmiştir. Farklılık, çalışmanın tasarımıyla açıklanabilir: biz serum düzeylerini değerlendirirken, diğer çalışma lokal immün stimülasyona odaklanmıştır. Ayrıca in vivo ortamda, çok sayıda mikrobiyal ajan, genetik yatkınlık ve diyet gibi faktörler sitokin profillerini etkileyebilir.

B. hominis'in mukozal inflamasyonu artırıp artırmadığı henüz net değildir. Bu nedenle gelecekteki çalışmalarda mukozal sitokin profili ve histopatolojik analizler yapılmalıdır. Böylece *B. hominis*, inflamasyon ve KRK arasındaki ilişki daha iyi anlaşılabilir.

5.4 Sınırlılıklar ve Gelecek Çalışmalar İçin Öneriler

Bu çalışmanın temel sınırlılığı, kontrol grubunun nispeten küçük olmasıdır ($n=30$), bu da istatistiksel gücün sınırlı olmasına yol açmıştır. Ayrıca kesitsel yapıdan dolayı *Blastocystis* ile kanser gelişimi arasında nedensellik kurulamamıştır.

Gelecekte yapılacak çalışmalarda:

- Kontrol grubu genişletilmeli,
- Daha uzun süreli izlem yapılmalı,
- Alt tiplerin moleküler mekanizmaları incelenmeli.

6 SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1 Sonuç

1. *B. hominis*'in saptanmasında PZR, mikroskobiye göre çok daha hassas sonuç vermiştir.
2. Kolorektal kanserli hastalarda kontrol grubuna göre *B. hominis* sıklığı azalmıştır. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. Bu durum *B. hominis*'in kommensal olup patojenite durumlarında azalabileceğini destekler bir veridir.
3. Her iki grupta da yaş ve cinsiyet ile *B. hominis* pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.
4. Kolorektal kanserli grup ve kontrol grubu arasında *B. hominis*'in alt tip dağılımlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Her iki grupta da en sık tespit edilen iki alt tip, sıklık sırasına göre ST3 ve ST1'dir.
5. *B. hominis* pozitifliği ile serum TNF- α düzeyleri arasında ise istatistiksel bir ilişki saptanmamıştır.

6.2 Öneriler

- 1) Daha Büyük Hasta Gruplarıyla Çalışmalar: Gelecekte yapılacak çalışmalarda örnek sayısı özellikle kontrol grubu için artırılmalı ve istatistiksel gücün artırılması sağlanmalıdır. Bu sayede *B. hominis* ile kolorektal kanser arasında daha net ilişkiler kurulabilir.
- 2) Uzun Süreli İzlem Çalışmaları: *Blastocystis* ile kanser gelişimi arasındaki ilişkinin zaman içinde nasıl değiştiği konusunda kesitsel yapıdan öteye geçerek uzun süreli izlem çalışmaları yapılmalıdır. Bu tür çalışmalar, parazitin kanser gelişiminden önce mi yoksa sonra mı görüldüğünü belirlemede önemli veriler sağlayacaktır.
- 3) Moleküler Mekanizmaların İncelenmesi: *Blastocystis*'in kolorektal kanser gelişimindeki rollerini anlamak için in vitro ve in vivo deney modelleriyle bu organizmanın bağışıklık sistemi, epitel hücresi fonksiyonları ve tümör mikroçevresi dinamikleri üzerindeki etkileri araştırılmalıdır.
- 4) Metagenomik ve Mikrobiyota Analizlerinin Entegrasyonu: Bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonu ve *Blastocystis* ile olan etkileşimleri, metagenomik yaklaşımlarla incelenmelidir. Bu analizler, *Blastocystis*'in bağırsak ekosistemi ve kanser gelişimi üzerindeki dolaylı etkilerini ortaya koyacaktır.

7 KAYNAKLAR

- Ajjampur, S. S. R., & Tan, K. S. W. (2016). Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. — Interpreting results from in vitro and in vivo studies. In *Parasitology International* (Vol. 65, Issue 6, pp. 772–779). <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.007>
- AL, D. F., & HÖKELEK, M. (2007). *Blastocystis hominis* fırsatçı bir patojen mi? <https://research.ebsco.com/linkprocessor/plink?id=b21bd003-8b81-3e20-9791-d6c2de5867c0>
- Alfellani, M. A., Taner-Mulla, D., Jacob, A. S., Imeede, C. A., Yoshikawa, H., et al., (2013). Genetic Diversity of *Blastocystis* in Livestock and Zoo Animals. In *Protist* (Vol. 164, Issue 4, pp. 497–509). <https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.05.003>
- Ali, S. H., Ismail, M. A. M., El-Badry, A. A., Abu-Sarea, E. Y., Dewidar, A. M., et al., (2022). An Association Between *Blastocystis* Subtypes and Colorectal Cancer Patients: A Significant Different Profile from Non-cancer Individuals. *Acta Parasitologica*, 67(2), 752–763. <https://doi.org/10.1007/S11686-021-00508-Y/FIGURES/3>
- Audebert, C., Even, G., Cian, A., Loywick, A., Merlin, S., et al., (2016). Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Scientific Reports*, 6(1), 25255.
- Beyhan, Y. E., Yilmaz, H., Cengiz, Z. T., & Ekici, A. (2015a). Clinical significance and prevalence of *blastocystis hominis* in Van, Turkey. In *Saudi Medical Journal* (Vol. 36, Issue 9, pp. 1118–1121). <https://doi.org/10.15537/smj.2015.9.12444>
- Beyhan, Y. E., Yilmaz, H., Cengiz, Z. T., & Ekici, A. (2015b). Clinical significance and prevalence of *Blastocystis hominis* in Van, Turkey. *Saudi Medical Journal*, 36(9), 1118 LP – 1121. <https://doi.org/10.15537/smj.2015.9.12444>
- Billy, V., Lhotská, Z., Jirků, M., Kadlecová, O., Frgelecová, L., et al., (2021). *Blastocystis* colonization alters the gut microbiome and, in some cases, promotes faster recovery from induced colitis. *Frontiers in Microbiology*, 12, 641483.
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., et al., (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In *CA: A Cancer Journal for Clinicians* (Vol. 74, Issue 3, pp. 229–263). <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Brumpt, E. (1912). *Blastocystis hominis* n. sp. et forms voisines. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, 56, 725–730.
- Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews*, 73(3), 203–266. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0006323198005167>
- Chandramathi, S., Suresh, K., & Kuppasamy, U. R. (2010). Solubilized antigen of *Blastocystis hominis* facilitates the growth of human colorectal cancer cells, HCT116. *Parasitology Research*, 106, 941–945.
- Chandramathi, S., Suresh, K., Sivanandam, S., & Kuppasamy, U. R. (2014). Stress exacerbates infectivity and pathogenicity of *Blastocystis hominis*: In vitro and in vivo evidences. In *PLoS ONE* (Vol. 9, Issue 5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094567>
- Demirel, F., & Dinç, B. (2022). Comparison of Intestinal Parasites in Native and Refugee Patients Admitted to a Territory Hospital in Turkey. *Türkiye Parazitol Derg*, 46(3), 184–188.
- Deng, L., Wojciech, L., Png, C. W., Kioh, Y. Q. D., Ng, G. C., et al., (2023). Colonization with ubiquitous protist *Blastocystis* ST1 ameliorates DSS-induced colitis and promotes beneficial microbiota and immune outcomes. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 9(1), 22.
- Deng, L., Wojciech, L., Png, C. W., Koh, E. Y., Aung, T. T., et al., (2022). Experimental colonization with *Blastocystis* ST4 is associated with protective immune responses and modulation of gut microbiome in a DSS-induced colitis mouse model. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(5), 245.
- Duda, A., Kosik-Bogacka, D., Lanocha-Arendarczyk, N., Kołodziejczyk, L., & Lanocha, A. (2015). The prevalence of *Blastocystis hominis* and other protozoan parasites in soldiers returning from peacekeeping missions. In *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (Vol. 92, Issue 4, pp. 805–806). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0344>
- Ekici, A., Günay, C., Şahin, M., Aydemir, S., & Yılmaz, H. (2023). Gastrointestinal Şikayetlerle Başvuran Hastalarda Bağırsak Parazitlerinin Yayılışı. *Türkiye Parazitol Derg*, 47(4), 224–228.

- Ertuğ, S., Okyay, P., Gülmez, D., & Göktaş, P. (2015). Prevalence of *Blastocystis hominis* in stool samples of healthy people in Ankara, Turkey. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 39(1), 31–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.5152/tpd.2015.3785>
- Esteghamati, A., Khanaliha, K., Bokharaei-Salim, F., Sayyahfar, S., & Ghaderipour, M. (2019). Prevalence of intestinal parasitic infection in cancer, organ transplant and primary immunodeficiency patients in Tehran, Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 20(2), 495.
- Garrett, W. S. (2019). The gut microbiota and colon cancer. In *Science* (Vol. 364, Issue 6446, pp. 1133–1135). <https://doi.org/10.1126/science.aaw2367>
- Gezici, A., Cengiz, Z. T., Yılmaz, H., & Aydemir, S. (2023). Mide Kanserli Hastalarda Blastocystosis ve Fırsatçı Parazitlerin Önemi: Kontrol Gruplu Bir Çalışma. *Türkiye Parazit Derg*, 47(4), 220–223.
- Grivennikov, S., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. In *Cell* (Vol. 140, Issue 6, pp. 883–899). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140(6), 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Guard, G. (2024). *Blastocystis hominis*; Friend or Foe. In *Integrative Medicine* (Vol. 23, Issue 5, pp. 28–33).
- Guard, H. E., Vaselkiv, J. B., Ecsedy, E., Kuechen, F., Minassian, N., et al., (2024). Examining state-and race-specific five-year prostate cancer mortality rates (2016-2020) and their association with prostate-specific antigen screening. *Cancer Research*, 84(6_Supplement), 4858.
- Güler, E., & Süer, K. (2021). Epidemiology of intestinal parasites in a university hospital in Northern Cyprus: a 4-year retrospective experience. *Epidemiology*, 45(2), 128–132.
- Gürbüz, C. E., Gülmez, A., Özkoç, S., İnceboz, T., Miman, Ö., ve ark., (2020). Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2011-2018 yılları arasında saptanan bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazit Derg*, 44(2), 83–87.
- Hawash, Y. A., Ismail, K. A., Saber, T., Eed, E. M., Khalifa, A. S., et al., (2021). Predominance of Infection With *Blastocystis hominis* in Patients With Colorectal Cancer and Its Association With High Mucin Content, Infiltration of Inflammatory Cells and Elevated Serum Tumor Necrosis Factor α . *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 29(1), E32–E38. <https://doi.org/10.1097/IPC.0000000000000931>
- Hoorfar, J. (2022). *Molecular Detection of Foodborne Pathogens*. CRC Press.
- Jantermtor, S., Pinlaor, P., Sawadpanich, K., Pinlaor, S., Sangka, A., et al., (2013). Subtype identification of *Blastocystis* spp. isolated from patients in a major hospital in northeastern Thailand. *Parasitology Research*, 112(4), 1781–1786. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3218-x>
- Jeremiah, S., & Parija, S. (2013). *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Tropical Parasitology*, 3(1), 17. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.113894>
- Kumarasamy, V., Atroosh, W. M., Anbazhagan, D., Abdalla, M. M. I., & Azzani, M. (2022). Association of *Blastocystis hominis* with colorectal cancer: A systematic review of in vitro and in vivo evidences. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 14(3), 734–745. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v14.i3.734>
- Kumarasamy, V., Roslani, A. C., Rani, K. U., & Kumar Govind, S. (2014). Advantage of using colonic washouts for *Blastocystis* detection in colorectal cancer patients. *Parasites & Vectors*, 7(1), 1–5.
- Lesh, F. A. (1975). Massive development of amebas in the large intestine. Fedor Aleksandrovich Lesh (Lösch). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 24(3), 383–392. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1975.24.383>
- Mahon, C. R., Lehman, D. C., & Manuselis, G. (2022). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Elsevier.
- Malatyali, E., Ertabaklar, H., & Ertuğ, S. (2023). Subtype distribution of *Blastocystis* in Türkiye. *Türkiye Parazit Derg*, 47(3), 184–189.
- Mohamed, A. M., Ahmed, M. A., Ahmed, S. A., Al-Semany, S. A., Alghamdi, S. S., et al., (2017). Predominance and association risk of *Blastocystis hominis* subtype I in colorectal cancer: a case control study. *Infectious Agents and Cancer*, 12, 1–8.
- Nagel, R., Traub, R. J., Kwan, M. M. S., & Bielefeldt-Ohmann, H. (2015). *Blastocystis* specific serum immunoglobulin in patients with irritable bowel syndrome (IBS) versus healthy controls. In *Parasites and Vectors* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1069-x>

- Özçakır, O., Güreşer, S., Ergüven, S., Akyön Yılmaz, Y., Topaloğlu, R., ve ark., (2007). Türkiye'deki bir üniversite hastanesinde *Blastocystis hominis* enfeksiyonunun karakteristiği. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*, 31(4), 277–282.
- Persing, D. H., Tenover, F. C., Tang, Y.-W., Nolte, F. S., Hayden, R. T., et al., (2021). *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. ASM Press.
- Polat, E., Özdemir, S., & Sirekbasan, S. (2020a). İstanbul'da Bir Üniversite Hastanesine başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı: Yedi yıllık retrospektif analiz. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*, 44(3), 139–142.
- Polat, E., Özdemir, S., & Sirekbasan, S. (2020b). İstanbul'da Bir Üniversite Hastanesine başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı: Yedi yıllık retrospektif analiz. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*, 44(3), 139–142.
- Ramírez, J. D.; Sánchez, A.; Hernández, C.; Flórez, C.; Ponte, E.; et al., (2020). Multilocus sequence typing of *Blastocystis* isolates from symptomatic and asymptomatic individuals in Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, 84, 104393. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104393>
- Reischl, U., & van Belkum, A. (2021). *Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization*. Caister Academic Press.
- Safadi, D. El, Gaayeb, L., Meloni, D., Cian, A., Poirier, P., & ... (2014). *Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of*.
- Salehi, M., Mardaneh, J., Niazkari, H. R., Minoeianhaghighi, M., Arshad, E., et al., (2021). Prevalence and Subtype Analysis of *Blastocystis hominis* Isolated from Patients in the Northeast of Iran. In *Journal of Parasitology Research* (Vol. 2021). <https://doi.org/10.1155/2021/8821885>
- Scanlan, P. D., & Stensvold, C. R. (2013a). *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest. *Trends in Parasitology*, 29(11), 523–529. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.08.006>
- Scanlan, P. D., & Stensvold, C. R. (2013b). *Blastocystis*: Getting to grips with our guileful guest. In *Trends in Parasitology* (Vol. 29, Issue 11, pp. 523–529). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.08.006>
- Scanlan, P. D., Stensvold, C. R., Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H. G. H. J., De Vos, W. M., et al., (2014). The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. In *FEMS Microbiology Ecology* (Vol. 90, Issue 1, pp. 326–330). <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12396>
- Selek, M. B., Bektöre, B., Karagoz, E., Baylan, O., & Ozyurt, M. (2016). *Distribution of parasites detected in stool samples of patients admitted to our parasitology laboratory during a three-year period between 2012 and 2014*.
- Seyer, A., Karasartova, D., Ruh, E., Güreşer, A. S., Turgal, E., ve ark., (2017). Epidemiology and Prevalence of *Blastocystis* spp. in North Cyprus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(5), 1164–1170. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0706>
- Sienzel, D. J., Boreham, P. F. L., & McDougall, R. (1991). Ultrastructure of *Blastocystis hominis* in human stool samples. *International Journal for Parasitology*, 21(7), 807–812. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(91\)90149-2](https://doi.org/10.1016/0020-7519(91)90149-2)
- Silberman, J. D., Sogin, M. L., Leipe, D. D., & Clark, C. G. (1996). Human parasite finds taxonomic home. In *Nature* (Vol. 380, Issue 6573, p. 398). <https://doi.org/10.1038/380398a0>
- Stensvold, C. R. (2013). *Blastocystis*: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Tropical Parasitology*, 3(1), 26–34. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.113896>
- Stensvold, C. R., Alfellani, M. A., Nørskov-Lauritsen, S., Prip, K., Victory, E. L., et al., (2009). Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. In *International Journal for Parasitology* (Vol. 39, Issue 4, pp. 473–479). <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.07.006>
- Stensvold, C. R., & Clark, C. G. (2016). Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitology International*, 65(6, Part B), 763–771. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.015>
- Stensvold, C. R., Suresh, G. K., Tan, K. S. W., Thompson, R. C. A., Traub, R. J., et al., (2007). Terminology for *Blastocystis* subtypes - a consensus. *Trends in Parasitology*, 23(3), 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.01.004>
- Stensvold, R., Brillowska-Dabrowska, A., Nielsen, H. V., & Arendrup, M. C. (2006). Detection of *Blastocystis hominis* in Unpreserved Stool Specimens by Using Polymerase Chain Reaction. *The Journal of*

- Parasitology*, 92(5), 1081–1087. <https://research.ebsco.com/linkprocessor/plink?id=299ca434-91b3-3aa5-ac6f-3bc8c3f48ed9>
- Stenzel, D. J., & Boreham, P. F. (1996). Blastocystis hominis revisited. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(4), 563–584. <https://doi.org/10.1128/CMR.9.4.563>
- Stenzel, D. J., & Boreham, P. F. L. (1991). A cyst-like stage of Blastocystis hominis. *International Journal for Parasitology*, 21(5), 613–615. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(91\)90069-J](https://doi.org/10.1016/0020-7519(91)90069-J)
- Taghipour, A., Rayatdoost, E., Bairami, A., Bahadory, S., & Abdoli, A. (2022). Are Blastocystis hominis and Cryptosporidium spp. playing a positive role in colorectal cancer risk? A systematic review and meta-analysis. *Infectious Agents and Cancer*, 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13027-022-00447-x>
- Tan, K. S. W. (2008). New insights on classification, identification, and clinical relevance of Blastocystis spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 639–665. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-08>
- Tan, K. S. W., & Stenzel, D. J. (2003). Multiple reproductive processes in Blastocystis: proceed with caution. In *Trends in parasitology* (Vol. 19, Issue 7, pp. 290–292). [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(03\)00119-3](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(03)00119-3)
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010a). Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2101–2114.e5. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2010.01.058>
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010b). Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2101–2114.e5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.058>
- Toychiev, A., Abdujapparov, S., Imamov, A., Navruzov, B., Davis, N., et al., (2018). Intestinal helminths and protozoan infections in patients with colorectal cancer: prevalence and possible association with cancer pathogenesis. *Parasitology Research*, 117, 3715–3723.
- Xu, N., Jiang, Z., Liu, H., Jiang, Y., Wang, Z., et al., (2021). Prevalence and genetic characteristics of Blastocystis hominis and Cystoisospora belli in HIV/AIDS patients in Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. In *Scientific Reports* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94962-3>
- Yan, Y.; Su, J.; Ye, J.; Lai, X.; Liao, L.; et al., (2021). Genetic diversity of Blastocystis sp. in China and its relationship with clinical symptoms. *Parasites & Vectors*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04657-7>
- Yason, J. A., Ajampur, S. S. R., & Tan, K. S. W. (2016). Blastocystis isolate B exhibits multiple modes of resistance against antimicrobial peptide LL-37. *Infection and Immunity*, 84(8), 2220–2232.
- Yason, J. A., Liang, Y. R., Png, C. W., Zhang, Y., & Tan, K. S. W. (2019a). Interactions between a pathogenic Blastocystis subtype and gut microbiota: In vitro and in vivo studies. In *Microbiome* (Vol. 7, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0644-3>
- Yason, J. A., Liang, Y. R., Png, C. W., Zhang, Y., & Tan, K. S. W. (2019b). Interactions between a pathogenic Blastocystis subtype and gut microbiota: in vitro and in vivo studies. *Microbiome*, 7, 1–13.
- Yılmaz, H., Beyhan, Y. E., & Çiçek, M. (2019). *A comprehensive retrospective study: intestinal parasites in human in Van Province*.
- Zhang, W., Ren, G., Zhao, W., Yang, Z., Shen, Y., et al., (2017). Genotyping of Enterocytozoon bienersi and subtyping of Blastocystis in cancer patients: relationship to diarrhea and assessment of zoonotic transmission. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1835.
- Zhang, X., Qiao, J., Dong, X., Li, Y., Li, X., & Li, C. (2003). [Study on morphology of Blastocystis hominis in culture and from diarrhea patients]. *Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi = Chinese journal of parasitology & parasitic diseases*, 21(2), 116–118.
- Zhang, X., Zhang, S., Qiao, J., Wu, X., Zhao, L., et al., (2012). Ultrastructural insights into morphology and reproductive mode of Blastocystis hominis. *Parasitology Research*, 110(3), 1165–1172. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2607-x>
- Zierdt, C. H. (1991). *Blastocystis hominis-Past and Future*. 4(1), 61–79.
- Zierdt, C. H., & Tan, H. (1976a). Endosymbiosis in Blastocystis hominis. *Experimental Parasitology*, 39(3), 422–430. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(76\)90046-1](https://doi.org/10.1016/0014-4894(76)90046-1)
- Zierdt, C. H., & Tan, H. K. (1976b). Ultrastructure and light microscope appearance of Blastocystis hominis in a patient with enteric disease. In *Zeitschrift für Parasitenkunde* (Vol. 50, Issue 3, pp. 277–283). <https://doi.org/10.1007/BF02462972>

Zierdt, C. H., Zierdt, W. S., & Nagy, B. (1995). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Serum Antibody to *Blastocystis hominis* in Symptomatic Infections. *The Journal of Parasitology*, *81*(1), 127–129. <https://doi.org/10.2307/3284026>

8 EKLER

8.1 EK1 Etik Kurul Kararı

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı: 178

Toplantı Tarihi: 16 Haziran 2023

Karar Sayısı: 2023/4395: (Başvuru ID: 14682) N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Fatma ESENKAYA TAŞBENT'in "Blastocystis Hominis'in Kolorektal Kanserler İle İlişkisinin Araştırılması" başlıklı doktora tez çalışması ile ilgili dilekçesi ve ekleri görüşüldü. Yaser Ali Hussein MUSAWA'nın doktora tez çalışmasının N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Fatma ESENKAYA TAŞBENT'in sorumluluğunda yürütülmesinin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izinlerin alınması ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Fatma ESENKAYA TAŞBENT

Yardımcı Araştırmacılar: Doktora Öğrencisi Yaser Ali Hussein MUSAWA

ASLI GİBİDİR
16.06.2023

Prof. Dr. Saim AÇIKGÖZOĞLU
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı