

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

NAZAL POLİPLİ KRONİK RİNOSİNÜZİT
HASTALARINDA NAZAL MİKROBİYOM
ARAŞTIRILMASI VE NAZAL MİKROBİYOMUN
HASTALIK ŞİDDETİ İLE İLİŞKİSİNİN
BELİRLENMESİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ERAY UZUNOĞLU

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SÜLEYMAN SABRİ USLU

ANKARA
MART 2021

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

NAZAL POLİPLİ KRONİK RİNOSİNÜZİT
HASTALARINDA NAZAL MİKROBİYOM
ARAŞTIRILMASI VE NAZAL MİKROBİYOMUN
HASTALIK ŞİDDETİ İLE İLİŞKİSİNİN
BELİRLENMESİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ERAY UZUNOĞLU

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. SÜLEYMAN SABRİ USLU

Bu Tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından

01/2020-17 Proje Numarası ile Desteklenmiştir

ANKARA
MART 2021

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının hazırlanmasında bilgi ve tecrübesi ile bana her zaman destek olan, uzmanlık eğitimime ilgi ve deneyimleri ile büyük katkı sağlayan çok değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Süleyman Sabri USLU'ya ve tezin hazırlık sürecinde her zaman yol gösterici olan, yardımını asla esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ayşe KALKANCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimimde bilgi ve tecrübeleri ile emekleri olan ve bundan sonraki meslek hayatım boyunca da benden desteklerini esirgemeyecek tüm değerli Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı hocalarıma teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Asistanlık hayatım boyunca ameliyathanede, poliklinikte ve nöbetlerde beraber mesai ve emek harcadığım, başta eş kıdemim Dr. Burak HAZIR olmak üzere tüm değerli araştırma görevlisi arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Kulak Burun Boğaz servis, poliklinik ve ameliyathane hemşire ve personellerine çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim, başta annem Gülten UZUNOĞLU ve ablam Doç. Dr. Emel UZUNOĞLU ÖZYÜREK olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

Varlıklarıyla her zaman bana en büyük destek olan sevgili eşim Berna ve biricik kızım Doğa'ya teşekkür ederim.

Dr. Eray Uzunoğlu

Mart 2021 Ankara

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLOLAR DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
GRAFİKLER DİZİNİ.....	vi
KISALTMALAR.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Rinosinüzitler	4
2.1.1. Akut Rinosinüzitler	6
2.1.2. Kronik Rinosinüzitler	7
2.2. Nazal Polipli Kronik Rinosinüzitler	12
2.2.1. Tanım ve Tarihçe.....	12
2.2.2. Epidemiyoloji	14
2.2.3. Histopatoloji.....	15
2.2.4. Etiyoloji	16
2.2.5. Evreleme	29
2.3. İnsan Mikrobiyomu	33
2.3.1. Terminoloji.....	34
2.3.2. İnsan Mikrobiyom Projesi	35
2.3.3. Nazal Mikrobiyom ve ilişkili hastalıklar	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Örnekler ve Verilerin Toplanması	42
3.2. Kullanılan Gereçler ve Cihazlar	44
3.3. Araştırma Yöntemi	48
3.3.1. DNA izolasyonu	48
3.3.2. Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing: NGS)	49
3.4. Biyoinformatik Analiz.....	50
3.5. İstatistiksel Yöntem.....	51
4. BULGULAR.....	52
4.1. DNA Ekstraksiyonu Sonrası Elde Edilen DNA Saflığının Değerlendirilmesi	52

4.2. Demografik Bilgiler.....	53
4.3. Sinonasal Outcome Test (SNOT-22) Sonuçları	55
4.4. Lund-Mackay Evrelemesi Sonuçları	56
4.5. Sigara ve Klinik Özelliklerin İlişkisi.....	58
4.6. Mikrobiyom Analiz Sonuçları	59
4.6.1. Alfa-Çeşitlilik	59
4.6.2. Beta-çeşitlilik.....	62
4.6.3. Bakterilerin Şube Dağılımları	66
4.6.4. Bakterilerin Cins Dağılımları.....	69
4.6.5. Mantarların Şube Dağılımı	72
4.6.6. Mantarların Cins Dağılımı.....	73
4.6.7. Bakteri Şubeleri ile Hastalık Şiddeti ilişkisi.....	74
4.6.8. Bakteri Cinsleri ile Hastalık Şiddeti ilişkisi	75
4.6.9. Mantar Cinsleri ile Hastalık Şiddeti ilişkisi.....	79
4.6.10. Cins Düzeyinde Bakterilerin Korelasyonu	79
4.6.11. Cins Düzeyinde Mantarların Korelasyonu.....	80
4.6.12. Cins Düzeyinde Mantar-Bakteri Korelasyonu	81
5. TARTIŞMA	83
6. ÖZET	98
7. ABSTRACT.....	100
8. KAYNAKÇA.....	102

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Lund Mackay Evreleme Sistemi	30
Tablo 2. Sinonasal Outcome Test (SNOT-22) (Sinüs-Burun Sonuç Testi).....	32
Tablo 3. Örneklerin işaretlenmesinde kullanılan primerler	50
Tablo 4. Elde edilen DNA'nın konsantrasyon ve saflık ölçümü	52
Tablo 5. Demografik bilgiler, SNOT-22 ve LM skorları özet tablosu	55
Tablo 6. SNOT-22 soruları ve yanıtların ortalamaları.....	57
Tablo 7. Örnek alınan tarafta, anatomik bölgelere göre LM skoru.....	58
Tablo 8. En baskın 8 şubenin gruplara göre ortalama rölâtif bolluğu.....	67
Tablo 9. Cinslerin gruplara göre MRA ve Prevalansı	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Rinosinüzit patogenezi	5
Şekil 2. Primer rinosinüzit sınıflandırması (AFRS: alerjik fungal rinosinüzit).....	8
Şekil 3. Sekonder rinosinüzit sınıflandırması	9
Şekil 4. Tip 2 inflamasyon amplifikasyonunda potansiyel mekanizmalar.....	11
Şekil 5. KRS patofizyolojisi.....	18
Şekil 6. Vortex cihazı (Combi-Spin FVL-2400N, Biosan, Letonya)	45
Şekil 7. Kuru blok ısıtıcı (Thermo Block TDB-120, Thermofisher, Almanya)	46
Şekil 8. Mikro santrifüj (Mikro 120, Hettich, Almanya)	46
Şekil 9. Spektrofotometre (Nanodrop-1000, Therm ofisher, Almanya)	47
Şekil 10. QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Almanya)	47

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Nanodrop-1000 ile örneklerin spektrofotometrik ölçümü	53
Grafik 2. Shannon indeksi çizgi çubuk grafiği.....	59
Grafik 3. Faith indeksi kutu çizgi grafiği	60
Grafik 4. Pielou indeksi kutu çizgi grafiği	61
Grafik 5. KRS+NP hastaları ile Kontrol grubunun Bray-Curtis farklılık indeks karşılaştırması.	63
Grafik 6. Bray-Curtis farklılığı indeksine göre hesaplanan PCoA.....	63
Grafik 7. Jaccard indeksine göre hesaplanan PCoA	64
Grafik 8. Ağırlıksız unifrac indeksine göre hesaplanan PCoA.....	66
Grafik 9. Şube seviyesindeki bakterilerin gruplara göre ortalama rölatif bollukları.	67
Grafik 10. Şube seviyesindeki bakterilerin her bir örnek için rölatif bolluğu.....	68
Grafik 11. Actinobacteria'nın rölatif bolluğunun gruplara göre değişimi	68
Grafik 12. Cins seviyesindeki bakterilerin her bir örnek için rölatif bollukları	71
Grafik 13. Cins seviyesindeki bakterilerin gruplara göre MRA'ları	71
Grafik 14. Corynebacterium, Streptococcus, Moraxella, Neisseria, Prevotella, Staphylococcus rölatif bolluğunun gruplara göre değişimi	72
Grafik 15. Her bir örnek için mantar şube dağılımı.....	73
Grafik 16. Cins seviyesindeki mantarların her bir örnek için rölatif bollukları.....	74
Grafik 17. Şube seviyesindeki bakteriler ile SNOT-22 ve Lund Mackay skorlarının korelasyon ısı haritası	75
Grafik 18. Cins seviyesindeki bakterilerin rölatif bollukları ile yaş, SNOT-22 ve Lund Mackay skorlarının korelasyonu	76
Grafik 19. Cins düzeyinde bakterilerin rölatif bollukları ile sinüs opasifikasyonlarının korelasyonu.....	77
Grafik 20. SNOT-22 maddeleri ile cins düzeyindeki bakterilerin rölatif bolluk korelasyon grafiği	78
Grafik 21. Hayat kalitesi ve BT ölçekleri ile alfa çeşitlilik indekslerinin korelasyonu.	78
Grafik 22. Cins düzeyinde mantarların rölatif bollukları ile SNOT-22 ve Lund Mackay skorlarının korelasyonu.....	79
Grafik 23. Cins seviyesindeki bakterilerin OTU sayılarının korelasyonu	80
Grafik 24. Cins seviyesinde Mantarların OTU sayısı korelasyonu	81
Grafik 25. Cins düzeyinde mantar ve bakterilerin OTU sayıları korelasyonu.....	82

KISALTMALAR

ALOX15: Arachidonate 15-Lipoxygenase

ALOX5AP: Arachidonate 5-Lipoxygenase Activating Protein

Ang-1: Anjiyontensin 1

Ang-2: Anjiyontensin 2

Anti-BP180: anti-Büllüz pemfigoid 180

Anti-dsDNA: Anti-double stranded deoksiribo nükleik asit

AOAH: Acyloxyacyl Hydrolase

AFRS: Alerjik Fungal Rinosinüzit

ATPaz: Adenozin Trifosfataz

BAFF: B-cell activating factor

BDKRB2: Bradykinin Receptor B2

bFGF: basic fibroblast growth factor

BICD2: bicaudal D homolog 2

BMP: Bone morphogenetic protein

BT: Bilgisayarlı Tomografi

CACNA1I: Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 I

CACNA2D1: Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Alpha2delta 1

CACNG6: Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Gamma 6

CBP: Kolin bağlayıcı protein

CC16: Clara cell protein 16

CCL: chemokine ligand

CD4: Cluster of differentiation 4

CD8: Cluster of differentiation 8

CDH23: Cadherin Related 23

CNTN5: Contactin 5

CRP: C reaktif protein

CFTR: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

DNA: Deoksiribo nükleik asit

EBV: Epstein-Barr virüs

EGPA: Eosinophilic Granulomatosis with Polyangiitis

EMD: Epitelyal-mezenkimal değişim

EMP1: Epithelial Membrane Protein 1

EPOS: European Position Paper on Rhinosinusitis

GFRA1: Glial cell-derived neurotrophic factor Family Receptor Alpha 1

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GÖRH: Gastroözefagial reflü hastalığı

GPA: Granulomatosis with Polyangiitis

HHV: Human herpesvirüs

HIF1: Hypoxia-inducible factor 1

HSV-1: Herpes simplex virüs 1

IFN- γ : İnterferon gama

Ig: İmmünglobulin

IGFBP7: Insulin-like growth factor-binding protein 7

IL: İnterlökin

ILC: Doğal lenfoid hücreler

IRAK-4: İnterlökin-1 reseptör-ilişkili (associated) kinaz 4

ITS: Dahili kopyalanmış aralayıcı (Internal transcribed spacer)

İMP: İnsan Mikrobiyom Projesi

K6IRS2: Anti-keratin K72

KF: Kistik Fibrozis

KRS-NP: nazal polipsiz kronik rinosinüzit

KRS: Kronik Rinosinüzit

KRS+NP: Nazal polipli kronik rinosinüzit

LAMA2: Laminin Subunit Alpha 2

LAMB1: Laminin Subunit Beta 1

LM: Lund Mackay

ml: Mililitre

MMP: matriks metalloproteinaz

MÖ: Milattan Önce

MRA: Mean relative abundance (ortalama rölatif bolluk)

mRNA: Mesajcı ribonükleik asit

MS: Milattan Sonra

MSK: Mukosiliyer klirens

ng: Nanogram

NGS: Next Generation Sequencing (Yeni Nesil Dizileme)

NK hücreleri: Natural killer hücreleri

NOS1: Nitric Oxide Synthase 1

NP: Nazal Polip

OTU: Operasyonel Taksonomik Birimler (Operational Taxonomic Units)

PCoA: Principal coordinate analysis

PDGFD: Platelet Derived Growth Factor D

PGD2: Prostaglandin D2

PGE2: Prostaglandin E2

PRKCH: Protein Kinase C Eta

PSD: Primer Siliyer Diskinezi

qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction

rpm: Route per minute (dakikadaki devir sayısı)

rRNA: Ribozomal ribonükleik asit

SNOT-22: Sinonasal outcome test-22- Sinüs-Burun Sonuç Testi

t-PA: Doku plazminojen aktivatörü

TGF- β : Transforming growth factor beta

Th: T helper (yardımcı) lenfositler

TIMP-2: Tissue inhibitor of metalloproteinases 2

TLR: Toll-like reseptör (toll benzeri reseptör)

TNF- α : Tümör nekroz faktör alfa

Treg: Regülatör (düzenleyici) T hücreleri

VAS: Vizüel Analog Skala

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VEGFR-1: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptör 1

μ l: Mikrolitre

1. GİRİŞ

Rinosinüzitler nazal ve paranasal sinüs mukozasının inflamasyonu ile karakterize bir hastalık grubudur (1). Burun tıkanıklığı, burun akıntısı, koku kaybı, yüz ağrısı gibi semptomların endoskopik muayene ya da radyolojik görüntüleme bulguları ile desteklenmesi ile tanı sağlanır. Semptomların 12 haftadan uzun sürmesi halinde hastalık kronik rinosinüzit olarak adlandırılır (2).

Kronik rinosinüzit tanısına ek olarak endoskopik nazal muayene ile her iki orta meatus yerleşimi polip saptanması halinde hastalık nazal polipli kronik rinosinüzit (KRS+NP) olarak isimlendirilir. Nazal polipli veya nazal polipsiz kronik rinosinüzit ayrımı hastalığın patogenezi açıklamaktan ziyade morfolojik bir ayrımdır. EPOS2020’de kronik rinosinüzitler predispozan sebeplere, hastalığın anatomik yaygınlığına ve inflamasyon alt tiplerine göre sınıflandırılmıştır (2). Predispozan hastalık olmaksızın gelişen, yani primer kronik rinosinüzitler inflamasyon tipine göre tip 2 veya tip 2 dışı olarak adlandırılır. Nazal polipler genellikle primer, tip 2 kronik rinosinüzitlere eşlik etmektedir (2, 3).

Nazal polipli kronik rinosinüzit prevalansı %0,5-4,3’tür (4, 5). Erkeklerde kadınlara göre daha sık görülür ve insidansı yaş ile artar (6, 7). Çocuklarda oldukça nadir izlenir (%0,1) ve bu yaş grubunda KRS+NP genellikle Kistik Fibrozis ile birliktelik gösterir (8).

Nazal polipli kronik rinosinüzit gelişiminde birden fazla inflamatuvar mekanizma dinamik olarak etkileşim halinde yer alır. İnflamasyonun gelişiminde

mukozal yüzeyde konak ve çevresel faktörler arasındaki ilişkinin bozulması sebep olmaktadır. Konak faktörleri doğal immünite, kazanılmış immünite ve doku yeniden şekillenmesidir ve genellikle genetik veya epigenetik olarak düzenlenir. Çevresel faktörlerin en önemlileri mikroorganizmalardır (2). Bazı virüsler, bakteriler ve mantarlar hastalık gelişimi ile ilişkili bulunmuştur. Viral enfeksiyonlara karşı ortaya çıkan TLR9 aracılı defans mekanizmasındaki disregülasyon sonucu nazal polip gelişimi olabileceği bildirilmiştir (9). *Staphylococcus aureus* hastalık ile en çok ilişkilendirilen mikroorganizmadır (10, 11). *S. aureus* süper antijen ile poliklonal IgE salınımını arttırmakta ve Tip 2 immün yanıt gelişimine neden olmaktadır (11, 12). Mantarların hastalık patogenezindeki yeri aydınlatılamamış olsa da *Aspergillus*'un nazal polipli kronik sinüzit hastalığı ile ilişkili olabileceği tespit edilmiştir (13, 14).

İnsan vücudu içerisinde veya üzerinde yaşayan kommensal, simbiyotik ve patojen mikroorganizmaların bütününe mikrobiyota denir. Mikrobiyom terimi ise tüm habitatı, yani mikroorganizmalar ve genomlarına ek olarak birbirleri ve çevre ile olan ilişkilerini de kapsar (15). Yeni nesil dizileme tekniklerindeki gelişmeler ve mikroorganizmaların genom düzeyinde tanımlanabilmesi sayesinde mikrobiyom araştırmaları hız kazanmıştır (16). İnsan mikrobiyomu sağlık halinin sürdürülmesinin ve immünite gelişiminin önemli bir parçasıdır (17-19). Hasta bireyde; sağlıklı kontrol grupları ile kıyaslandığında mikrobiyomda görülen kompozisyonel veya fonksiyonel olarak ortaya çıkan farklılık disbiyozis olarak adlandırılır ve disbiyozisin bazı hastalıkların patogenezinde yer aldığı gösterilmiştir

(20). Kronik rinosinüzit gelişiminin nazal mikrobiyomda gelişen disbiyozis ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (21, 22).

Nazal mikrobiyom doğum sırasında oluşmaya başlar, beslenme, hijyen, sigara, yaşanılan coğrafya, hava kirliliği, antibiyotik kullanımı vb. koşullar ile şekillenir (23-25). Nazal mikrobiyomda fırsatçı patojenler bulunmaktadır. Bunlar uygun koşullarda solunum yolunun diğer kısımlarına yayılabilir ve alerjik rinit, kronik rinosinüzit, akut solunum yolu enfeksiyonları, astım, otitis media gibi hastalıkların gelişimine katkıda bulunabilir (26, 27).

Nazal polipli kronik rinosinüzitin patogenezinde mikrobiyal etkenlerin rolü henüz netleşmemiş olup hala önemli bir araştırma konusudur. Bu tez çalışmasında nazal mikrobiyomda yer alan bakteri ve mantar kompozisyonunun sağlıklı kontrol grubu ve nazal polipli kronik rinosinüzit hastaları arasında nasıl bir değişim gösterdiği; daha önce KRS+NP tedavisi amacıyla fonksiyonel endoskopik sinüs cerrahisi uygulanan ve hastalığı nüks eden hastalar ile cerrahi olarak tedavi edilmemiş hastalar arasında mikrobiyom farklılıkları sorgulanmıştır. Ek olarak hastalığın evrelemesinde kullanılan SNOT-22 ve Lund-Mackay skorları ile ilişkili olabilecek bakteri ve mantar cinsleri belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Rinosinüzitler

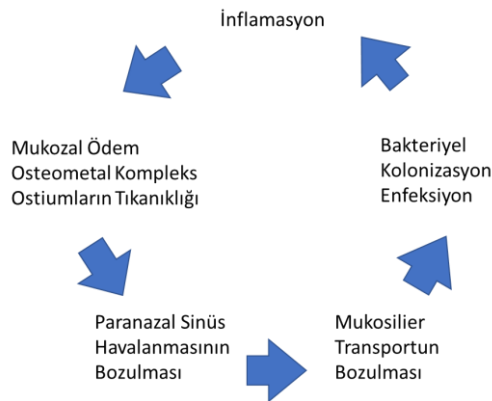
Sinüzit terimi paranasal sinüslerde izlenen inflamatuvar ve enfeksiyöz süreçleri ifade etmekle beraber, burun mukozası inflamasyonu yani rinit hemen her zaman sinüzite eşlik ettiğinden son zamanlarda yerini rinosinüzit terimine bırakmıştır (1). Rinosinüzitler burun ve paranasal sinüs mukozasının inflamasyonu ile seyreden hastalık grubudur.

Rinosinüzit tanısı klinik bulguların endoskopik veya radyolojik bulgular ile desteklenmesi ile konulur. Tanı kriterleri “European Position Paper on Rhinosinusitis” (EPOS) 2020’de belirtildiği üzere şu şekildedir: En az bir tanesi burun tıkanıklığı/konjesyonu ya da burun akıntısı olmak üzere; burun tıkanıklığı, burun akıntısı, yüz ağrısı, yüzde basınç hissi ve koku kaybı semptomlarından iki veya daha fazlasına sahip olmak ve ek olarak nazal endoskopide nazal polip ya da özellikle orta meatusta mukopürülan akıntı ve mukozal ödem görülmesi veya bilgisayarlı tomografide (BT) sinüslerde veya osteomeatal komplekslerde mukozal değişiklikler saptanması tanı koydurucudur (2). Semptomların yüksek duyarlılıklarına rağmen düşük özgüllük göstermeleri tanının endoskopi veya BT gibi objektif bulgular ile desteklenmesini gerekli kılmıştır.

Rinosinüzitler hastalık semptomlarının görülme sürelerine göre akut ve kronik rinosinüzitler olarak iki gruba ayrılır. Rinosinüzit semptomlarının ani olarak başlaması ve 12 haftadan kısa sürede kaybolması akut rinosinüzit (ARS) olarak adlandırılır. Yılda dört veya daha fazla ARS epizodu izlenmesi halinde rekürren

akut rinosinüzitten söz edilir. Kronik rinosinüzit (KRS) ise semptomların 12 hafta veya daha uzun sürdüğü durumu ifade eder.

Sinonazal mukozanın çeşitli etkenlere bağlı (alerji, enfeksiyon, yabancı cisim...) inflamasyonu sonucu gelişen ödem sinüs osteumlarının ve osteomeatal kompleksin tıkanmasına sebep olabilmektedir. Bu tıkanıklık rinosinüzit patogenezinde rol oynamaktadır. Osteum tıkanıklıklarını takiben paranazal sinüslerdeki oksijen basıncı düşmekte ve nazal mukosiliyer klirens bozulmaktadır. Mukus salgısı daha az akışkan hale gelir ve bu durum osteum tıkanıklıklarını destekler. Oksijen basıncının azalması ve mukus stazı paranazal sinüsleri bakteriyel kolonizasyon için elverişli hale getirir. Bakteriyel kolonizasyonun artması enfeksiyona ve dolayısı ile inflamasyona sebebiyet vererek mukozal ödemin artmasına ve osteumlardaki tıkanıklığın devamına neden olur. Bu döngü immün sistem inflamasyonu baskılayana veya inflamasyon sebebi ortadan kalkana kadar devam eder (**Şekil 1**) (28). İnflamasyon kaynağı konağa ait ya da çevresel olabilir. Konağa ait faktörler; genetik yatkınlık, immünsupresyon, siliyer fonksiyon bozuklukları, tümör ve alerjidir. Çevresel faktörler ise bakteriyel, fungal, viral enfeksiyonlar, sigara, hava kirliliği, yabancı cisimlerdir (29).



Şekil 1. Rinosinüzit patogenezi

2.1.1. Akut Rinosinüzitler

Soğuk algınlığı, akut post-viral rinosinüzit, akut bakteriyel rinosinüzit olarak 3 gruba ayrılır. Semptom süresi 10 günü aşmayan akut viral rinosinüzitler soğuk algınlığı olarak adlandırılır. Semptomların başlangıcından itibaren 5. günde şiddetlenmesi veya 10. günde hala devam etmesi halinde akut post-viral rinosinüzit düşünülmelidir. Akut bakteriyel sinüzit tanısı ise değişik renkli mukus, şiddetli lokal ağrı, $>38^{\circ}\text{C}$ ateş, CRP/sedimantasyon yüksekliği ve semptomların kötüye gidişi (çift hastalık) özelliklerinden en az 3 tanesi varlığında konulur ve akut bakteriyel sinüzit birçok vakada tek taraflı izlenmektedir (2).

Akut rinosinüzitler genellikle kendi kendini sınırlayan bir hastalık grubu olmakla birlikte, hayat kalitesini olumsuz etkilemektedirler. Yüz elli hasta ile yapılan prospektif bir çalışmada ARS hastalarının %43'ünün günlük yaşam aktivitelerini sürdürmekte güçlük çektiği belirtilmiştir (30).

Akut rinosinüzitler oldukça sık görülmekle beraber hastalık insidansı tam olarak bilinmemektedir. Erişkinlerin yılda 2-5 defa, çocukların ise 7-10 defa ARS geçirdiği tahmin edilmektedir (31). Genellikle viral kökenli olarak izlenmektedir. Viral kökenli ARS'lerin %0,5-2'si akut bakteriyel rinosinüzite dönüşmektedir (32). Diş enfeksiyonları ve dental girişimler, sinüs cerrahisi, nazogastrik tüp uygulaması, nazal tamponlar, mekanik ventilasyon, immün yetmezlikler, siliyer diskineziler, Kistik Fibrozis (KF), nazal septum deviasyonu, nazal kaviteyi tıkayan polip, konka, yabancı cisim, tümör vb. yapılar, Granülomatozisli Polianjitis (GPA), mukozal ödem (geçirilmiş viral ARS, alerjik rinit, vazomotor rinit) bakteriyel rinosinüzit

sıklığını arttırmaktadır (33). Hastalığın görülme sıklığı sonbahar ve kış aylarında artış göstermektedir (34). ARS etiyojisinde paranazal sinüs anomalilerin önemi ispatlanamamıştır (35). Aktif ve pasif sigara içiciliğinin ARS sıklığını arttırdığı izlenmiştir (36). Rinovirüs ve Koronavirüsler ARS de en sık karşılaşılan patojenlerdir (37).

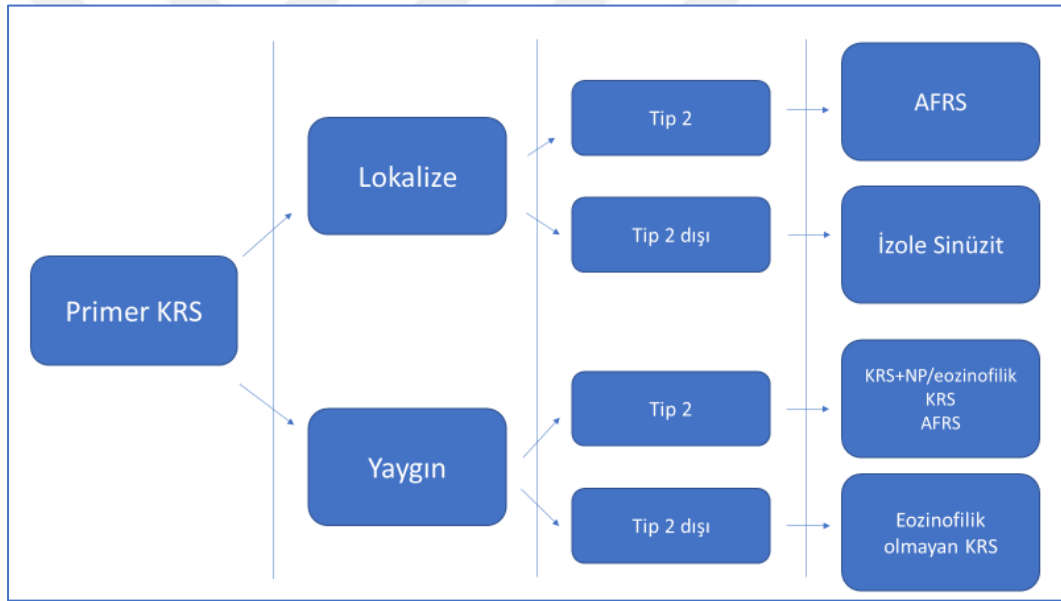
ARS’de tedavi semptomatik olup hastalık kendisini sınırlamaktadır. Burun akıntısı ve tıkanıklığı için antihistaminikler ve dekonjestanlar kullanılabilir. Antibiyotik tedavisi akut bakteriyel rinosinüzit varlığında verilebilir. Soğuk algınlığı ve akut post-viral rinosinüzitte antibiyotik tedavisinin yeri yoktur (2).

Akut rinosinüzit komplikasyonları nadir görülmekle beraber, potansiyel olarak ciddi komplikasyonlardır. Orbital, endokraniyel ve osseos komplikasyonlar olarak üç grupta incelenir. Antibiyotik tedavisinin komplikasyon gelişimini önlemede etkili olmadığı gösterilmiştir. Bu yüzden komplikasyonların erken tanınması, komplikasyon düşündürecek semptomlara yüksek şüphe ile yaklaşılması önemlidir (38, 39).

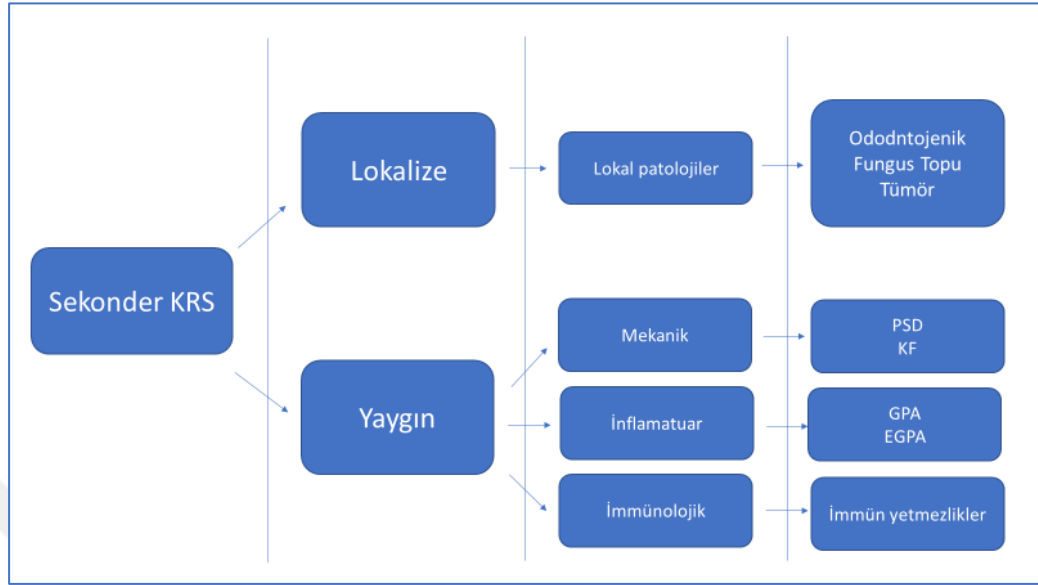
2.1.2. Kronik Rinosinüzitler

EPOS2020’de kronik rinosinüzitler predispozan sebeplere, hastalığın anatomik yaygınlığına ve inflamasyon alt tiplerine göre sınıflandırılmıştır (2). KRS’ler başka bir hastalık sebebiyle ortaya çıkma durumuna göre primer ve sekonder olarak iki grupta incelenir. Her iki grup ise yine kendi içlerinde anatomik olarak, yaygın ve lokalize hastalık olarak ayrılmaktadır. Primer lokalize KRS, alerjik fungal rinosinüzit ve izole rinosinüzit olarak iki gruba ayrılır. Primer yaygın

KRS ise eozinofilik olan ve olmayan (Tip 2 immünte aracılı olan ve olmayan) KRS olarak gruplanır. Sekonder lokalize KRS, odontojenik patolojiler, tümörler ve fungus topu sebebi ile gelişen hastalık grubunu kapsar. Sekonder yaygın KRS ise mekanik (siliyer diskinezi, kistik fibrozis), inflamatuvar (vaskülitler) ve immünte kaynaklı olmak üzere 3 grupta incelenir. KRS sınıflaması **Şekil 2 ve Şekil 3**'te özetlenmiştir.



Şekil 2. Primer rinosinüzit sınıflandırması (AFRS: alerjik fungal rinosinüzit)



Şekil 3. Sekonder rinosinüzit sınıflandırması

Geleneksel olarak kronik rinosinüzit; nazal polipli kronik rinosinüzit (KRS+NP) ve nazal polipsiz kronik rinosinüzit (KRS-NP) olmak üzere iki grupta incelenir. KRS+NP, KRS tanı kriterlerine ek olarak her iki orta meatusta, endoskopik olarak görülebilen polip varlığını ifade etmektedir.

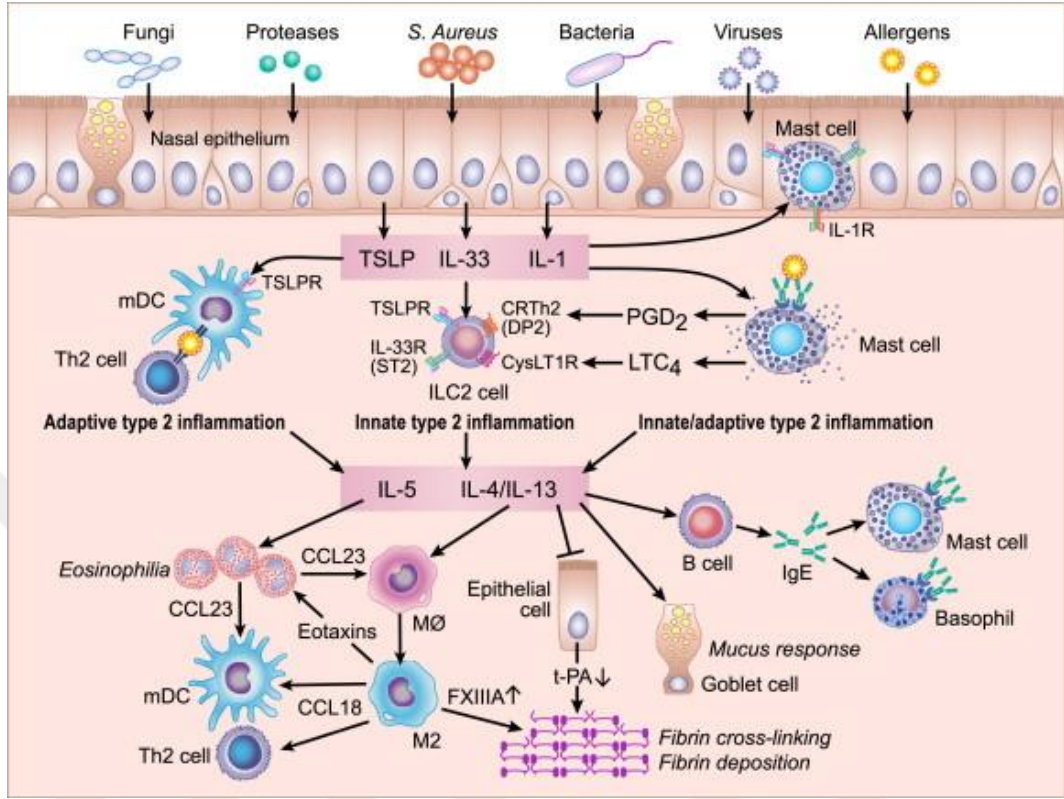
Hastalık semptomlarını araştıran anketler ile yapılan toplumsal çalışmalarda KRS sıklığı 15-75 yaş arası popülasyonda %10,9 olarak bulunmuştur (40). Ancak KRS semptomlarının akut rinosinüzit, alerjik ve alerjik dışı rinit semptomları ile örtüşmesi sebebiyle anket çalışmalarında prevalansın daha yüksek bulunduğu düşünülmektedir. Hastalık semptomlarına ek olarak BT ve nazal endoskopi ile desteklenen çalışmalarda KRS prevalansı %1,2-6,8 olarak görülmektedir (41, 42).

KRS+NP hastalarının %44,9’unda, KRS-NP hastalarının %21,2’sinde astım izlenmektedir (43). KRS+NP’nin özellikle geç başlangıçlı ve yetişkinlik dönemi başlangıçlı astım ile birlikteliği yüksekken, KRS-NP erken yaşta görülen astım ile

daha sık birliktelik gösterir (44). Atopi ve alerji varlığının KRS gelişimi ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. KRS+NP hastalarında inhalan alerjisi sıklığı %20,3, KRS-NP hastalarında ise %13,1 olarak izlenmiştir (45).

Kronik rinosinüzitlerin etyopatolojisinde temelde konak ve çevre etkileşiminde ortaya çıkan düzensizliklerin yer aldığı düşünülmektedir. Çevresel faktörlere karşı konağın verdiği immün yanıtın düzenlenmesindeki problemler sonucunda gelişen inflamasyon hastalığın zeminini oluşturmaktadır. KRS gelişiminde 3 çeşit immünolojik yanıt yer almaktadır. Bu immün yanıt çeşitleri tek başlarına veya birlikte izlenebilir (2).

Tip 1 immün yanıt virüsler ve diğer hücre içi yerleşim gösteren patojenlere karşı gelişen immün yanıttır ve yanıtın gelişimindeki temel sitokinler IFN- γ , IL-12'dir. Th1 lenfositler yanıtın gelişiminden sorumlu olan lenfosit grubudur. Tip 2 immün yanıt gelişiminde IL-4, IL-5 ve IL-13 temel sitokinlerdir ve sitokinlerin salınımından Th2 lenfositler sorumludur. Anti-helmintik yanıt ve doku yenilenmesinde görev alır. Tip 3 immün yanıt ise IL-17A ve IL-22 sitokinleri aracılı olup hücre dışı yerleşimli bakteri ve funguslara karşı gelişmektedir. Yanıtın gelişmesi Th17 lenfositler aracılığıdır. Baskın immün yanıt tipine göre kronik rinosinüzitleri 3 grupta incelemek mümkündür. Tip 2 KRS, doku yeniden düzenlenmesinin ve fibrin birikiminin en yoğun olduğu tiptir. Nazal polipler en sık bu tip KRS ile ilişkilidir (2). Tip 2 KRS gelişimi **Şekil 4**'te özetlenmiştir.



Şekil 4. Tip 2 inflamasyon amplifikasyonunda potansiyel mekanizmalar (Kato 2015-izin alınarak kullanılmıştır) (3)

İmmün yetmezliklerin KRS gelişimi için kolaylaştırıcı olduğu bilinmektedir. KRS hastalarında en sık karşılaşılan immün yetmezlikler yaygın değişken immün yetmezlik ve selektif IgA eksikliğidir (46). Gastroözefagial reflü hastalığı (GÖRH) ile KRS birlikteliği sık olmakla beraber GÖRH'nin hastalığı kolaylaştırıcı bir etken mi olduğu, yoksa KRS tedavisinde kullanılan ilaçlar sebebiyle ortaya çıkan ikincil bir durum mu olduğu henüz netleşmemiştir (47).

Mukosiliyer klirens (MSK) mekanizmasında ortaya çıkan bozukluklarda da KRS'ye sebep olmaktadır. MSK solunum vasıtası ile alınan patojenlerin hapsedilip atılmasını sağlayarak nazal ve paranasal sinüs mukozası için çok önemli bir koruyucu fonksiyon göstermektedir. Sağlıklı bireylerde MSK iki önemli faktöre

bağlıdır: mukus üretilmesi ve üretilen mukusun koordine bir siliyer hareket ile taşınması. Bu iki aşamadan herhangi birinde ortaya çıkan bozukluk, sinüs drenaj yollarında tıkanıklık ve enfeksiyona sebep olmaktadır. Kartagener, Young sendromu gibi durumlarda siliyer hareket bozulmuşken, KF’de mukus üretimi bozulmuştur. Ayrıca hava kirliliğinin ve çeşitli patojenlerin siliyer hasara sebep olarak MSK fonksiyonunu bozduğu gösterilmiştir (48). Sigara dumanının silyalar üzerinde toksik etki gösterdiği, ayrıca proinflatuar sitokin salınımına sebep olması ve oksidatif stres yaratması sebebiyle sekresyon artışı, tıkanıklık ve mukoza kuruluşuna sebep olduğu, bu sayede KRS gelişimine zemin hazırladığı gösterilmiştir (49).

2.2. Nazal Polipli Kronik Rinosinüzitler

2.2.1. Tanım ve Tarihçe

Polip sözcüğü eski Yunancadan köken almakta ve çok ayaklı anlamına gelmektedir. Nazal polip, nazal kavite ve paranasal sinüslerin kronik inflamasyonu sonucu gelişen iyi huylu mukoza kabartılarıdır. Genellikle orta meatus ve ön etmoid hücrelerin mukozasından köken alır ve nazal kavite içine doğru gelişir. Makroskopik olarak parlak ve düzgün yüzeyli, hareketli, yumuşak, ağrısız üzüm benzeri yapılardır. Polip dokusu histolojik olarak ödem, fibromatöz doku ve inflamatuvar hücreler içermektedir (50).

Nazal polipler ile ilgili en eski bilgiler antik Mısır uygarlığına ait olan M.Ö 4000 yılına dayanan kayıtlarda yer almaktadır. Tarihteki ilk rinolog olarak bilinen Ni-Ankh Sekhmet isimli saray hekiminin nazal polipleri tanımladığı ve tedavi

ettiğini belirten hiyeroglifler bulunmuştur (51). Antik Yunan döneminde, Hipokrat (MÖ 460-370) nazal polipleri tanımlamış; sünger, halka ve sıcak demirler ile koterizasyon kullanarak tedavi etmiştir. Nazal kaviteyi dolduracak büyüklükte bir süngerin nazofarinksten nazal kaviteye çekilerek poliplerin dışarı çıkarılması yöntemi 19.yy. sonlarına kadar kullanılmıştır. (52). Aeginalı Paulus, Aetius, Oribasius, Celsus ve Galen gibi hekimler Antik Yunan ve Roma İmparatorluğu dönemlerinde nazal polip tanı ve tedavi yöntemleri tanımlamışlardır (53).

Türk tıp tarihine bakıldığında İbn-i Sina (MS 980-1037), günümüzde kullanılan cerrahi aletler ile oldukça benzer aletler kullanarak polipektomi uygulamış ve kızgın demirler ile koterizasyon uygulayarak kanama kontrolü sağlamıştır. Ayrıca tedavide bir takım aromatik bitkiler de kullanmıştır (52). Sabuncuoğlu Şerefeddin'in (1385-1468) Cerrahiyyetül-Haniyye (İmparatorluk cerrahisi) isimli kitabında nazal polipler tanımlanmış ve tedavi yöntemleri belirtilmiş; tedavi yöntemleri minyatürler ile resmedilmiştir. Kitapta ayrıca nazal fraktüre, mandibula dislokasyon ve fraktürlerine cerrahi yaklaşımlar tanımlanmıştır (54).

Cerrahi yöntemler 17.yy. da forsepslerin gelişimine kadar fazla değişiklik göstermemiştir. Forseps ilk olarak Fabricius tarafından ucunda kıvrık uçlu makas yer alacak şekilde geliştirilmiştir. John Van Horne ise daha iyi tutucu yüzey hedefleyerek forseps ucunu dişli olarak tasarlamıştır (55).

18. ve 19. yy. da primer ve rekürren nazal polipozis tedavisinde Caldwell-Luc radikal antrostomisi, intranasal etmoidektomi, eksternal frontoetmoidektomi

gibi daha invaziv yaklaşımlar da kullanılmıştır. Ancak bu yaklaşımlar sinonazal mukozaya ve önemli anatomik köşe taşlarına zarar vermelerine rağmen nükslerin önüne geçememişlerdir (56). Endoskopi sistemlerinin gelişmesi ile tedavide önemli gelişmeler yaşanmıştır. Hirshmann ilk olarak 1901’de sistoskop kullanarak maksiller sinüs ve osteomeatal kompleksi değerlendirmiştir. 1960’lardan sonra Messerklinger’in çalışmaları ile endoskopik sinüs cerrahisi popülerlik kazanmıştır (57).

Steroidlerin keşfine kadar etkili bir medikal tedavi bulunmamaktaydı. 1970li yıllarda sistemik ve topikal steroidler nazal polip tedavisinde kullanılmaya başlanmış ve Van Camp ameliyat öncesi oral steroid kullanımını tanımlayan ilk isim olmuştur (58).

2.2.2. Epidemiyoloji

Nazal polipli kronik rinosinüzit prevalansı yaklaşık %0,5-4,3’tür (4, 5). Erkeklerde kadınlara göre daha sık görülmektedir (6). KRS+NP insidansı yaş ile artmaktadır (7). Görülme sıklığı 5. ve 6. dekatta pik yapmaktadır. Kırk yaş üstü astım hastalarında KRS+NP görülme oran 40 yaş altı hastalara göre 4 kat fazladır (7). Seksen yaş üzerinde nadir izlenir (6). Çocuklarda oldukça nadir izlenir (%0,1) ve bu yaş grubunda KRS+NP genellikle KF ile birliktelik gösterir (8). KRS+NP hastalarının %14’ünde ailede nazal polip öyküsü ile karşılaşmıştır (59). KRS+NP, astım ve asetilsalisilik asit hipersensitivitesi birlikteliği yani Samter triadı olanlarda aile öyküsü %36’ya çıkmaktadır (60). Irksal ve coğrafik dağılımda da farklılıklar izlenmektedir. Beyaz ırkta nazal poliplerde eozinofilik inflamasyon baskındır. IL-

5, eozinofilik katyonik protein ve eotaksin artış göstermiştir (61). Sarı ırkta nötrofilik inflamasyonun daha baskın olduğu izlenmekle beraber klinik bulgularda beyaz ırka göre fark izlenmemektedir (62). Siyah ırkta ise eozinofil sayısı yüksektir ve hastalık beyaz ırka göre daha agresif seyretmektedir (63).

2.2.3. Histopatoloji

Polipler genellikle hareketlidir ve mukozaya bir sap ile bağlıdır. Genellikle orta meatus ve sfenoetmoidal reses kaynaklıdır. Hemen her zaman bilateral olarak izlenirler. Mikroskopik olarak normal mukoza ile kıyaslandığında 1) epitel, submukoza bazen de kemikte yapısal değişiklikler, 2) inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlenmektedir. Nazal polipler yalancı çok katlı solunum epitelini ile kaplıdır. Bazal membran kalınlığı değişiklik gösterebilir. Stroma yapısı ve stromadaki inflamatuvar hücre popülasyonuna göre 3 gruba ayrılır: 1) ödematöz, eozinofilik, alerjik polipler, 2) kronik inflamatuvar polipler ve 3) seromüsinöz glandüler polipler.

Ödematöz, eozinofilik polipler en sık görülen çeşit olup ülserasyon, granülasyon, mukozit, goblet hücre hiperplazisi ve skuamöz metaplazi ile birliktelik gösterirler. Bazal membran genellikle kalınlaşmıştır ve stromada belirgin ödem izlenmektedir. Eozinofiller ve plazma hücrelerinden zengin inflamasyon izlenir (50).

Kronik inflamatuvar polip (fibrinoinflamatuvar polip) genellikle ödematöz polipte oluşan travmalara bağlı olarak stromada sekonder inflamasyon ve myofibroblastik proliferasyon gelişmesi ile ortaya çıkar. Stromal fibrozis ve

lenfosit infiltrasyonu izlenir. Sıklıkla yüzeyde skuamoz metaplazi de vardır. Yumuşak doku neoplazmaları ile karıştırılabilir. Mukoseröz bezlerin korunması ayrımda yardımcıdır. Serömüsinöz glandüler tip polipler çok nadir izlenmekte olup epitelyal neoplazilerle ve hamartomlarla ilişkilidirler (50).

2.2.4. Etiyoloji

2.2.4.1. Genetik ve Epigenetik

KRS+NP çok faktörlü gelişim gösteren karmaşık bir hastalıktır ancak hastalığın kalıtsal bir zemini olduğu bilinmektedir. Oakley ve ark. genel popülasyonda KRS+NP kalıtımını araştırdıkları çalışmada, KRS+NP aile öyküsü olan kişilerde hastalık gelişme riskini genel popülasyona göre 4,1 kat fazla bulmuşlardır (64). Hastalığın genetik alt yapısı genellikle astım, diyabet vb. hastalıklar gibi farklı genlerden kaynaklanan hafif değişikliklerin bir araya gelmesi sonucu oluşmakla beraber, KF gibi Mendelian kalıtım gösteren hastalıklar da KRS+NP etiyojisinde yer almaktadır. KF, CFTR genindeki homozigot mutasyon sonucu klor transportunda bozulma ile gelişen otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalık olup genellikle maksiller sinüsleri etkiler. Ayrıca silyaların yapısal bileşenlerini oluşturan proteinlerin anormal kodlanması ile KRS+NP gelişimine sebep olan 31 farklı gen mutasyonu gösterilmiştir (65).

Hastalık patogeneğinde araştırılan genler genellikle immünite ve mukozal bariyer fonksiyonu ile ilgili genler ve tek gen polimorfizmleridir. *IL-1A*, *IL-1B*, *IL-10*, *IL-33*, *TGFB1*, *TNFA*, *NOS1*, *ALOX5AP*, *ALOX15*, *AOAH*, *IRAK-4*, gibi immün fonksiyonları düzenleyen genlerin ve *BICD2*, *CACNA1I*, *CACNA2D1*, *CACNG6*,

CDH23, *LAMA2*, *LAMB1* gibi bariyer fonksiyonlarının düzenlenmesinde görev alan genlerin KRS+NP patofizyolojisinde rol aldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (2).

Epigenetik, DNA sekansında değişiklik olmaksızın gen ekspresyonunun değişimi ile ortaya çıkan fenotipik farklılıkları ifade etmektedir (66). *S. aureus* ve sigaranın epigenetik değişiklikler ile hastalık patogenezinde yer aldığı düşünülmektedir (67, 68).

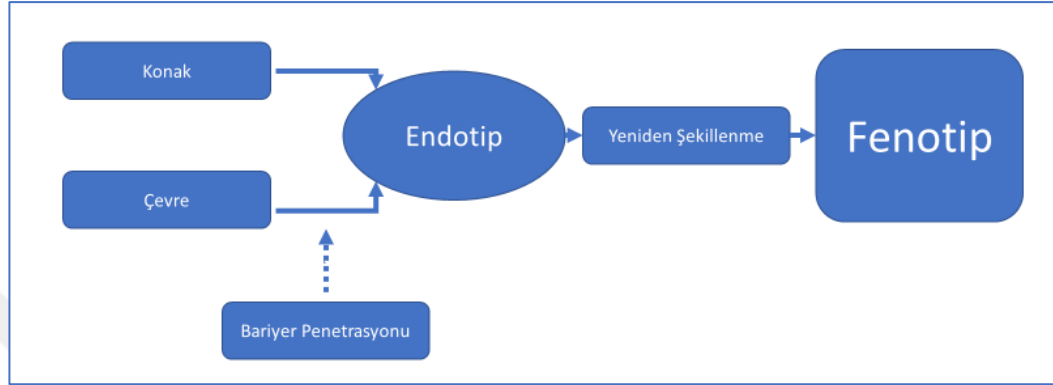
KRS+NP hastalarının bir kısmında, *S. aureus* kolonizasyonunu kolaylaştıran genetik polimorfizmler olabileceğini gösterilmiştir. Bu polimorfizmlere *BDKRB2*, *CNTN5*, *IGFBP7*, *PDGFD*, *PRKCH*, *GFRA1*, *K6IRS2* örnek verilebilir (69).

Genetik ve epigenetiğin hastalık patogenezindeki yeri giderek aydınlatılsa da henüz hastalığı öngörmeye ve prognoz belirlemede yeri yoktur.

2.2.4.2. İnflamasyon

Kronik rinosinüzit patogenezinde yer alan inflamatuvar mekanizmalar, mukozal inflamasyon ve doku yeniden şekillenmesi ile sonuçlanarak hastalığın karakteristik özelliklerini ortaya çıkarmaktadır. Birden fazla inflamatuvar mekanizma, dinamik olarak etkileşim halindedir ve ortaya çıkan doku inflamasyonu şiddeti klinik bulguların şiddeti ile kabaca ilişkilidir. Bu inflamatuvar mekanizmalara mukozal yüzeyde, konak ve çevresel faktörler arasındaki bozulmuş ilişkinin sebep olduğu düşünülmektedir (**Şekil 5**). Konak faktörleri genellikle

epigenetik ve genetik faktörler ile düzenlenirken çevresel faktörler sigara, bakteri, mantar, virüsler, hava kirliliği ve alerjenlerdir.



Şekil 5. KRS patofizyolojisi

Konak ve çevresel faktör ilişkisi yaşamın erken döneminde başlasa da KRS+NP yetişkin dönemi hastalığıdır. Bu durum çevre faktörleri ile temasın süresi ve yoğunluğunun hastalık patogenezinde etkili olduğunu düşündürmektedir.

Çevresel Faktörler

Mikrobiyal ajanlar KRS gelişimindeki en önemli çevresel faktörlerdir.

Virüsler

Virüslerin KRS+NP patogenezindeki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. Rinovirüs enfeksiyonlarının KRS akut alevlenmesi, sekonder bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlık, epitelyal bariyer geçirgenliğinde artış, epitel nekrozu, siliyer disfonksiyon, mukosiliyer aktivitede azalma ve mukus üretiminde artışa sebep olduğu gösterilmiştir (70-74).

Viral enfeksiyonlar solunum epitelinde TLR3 ve TLR7-9 sinyalini aktive etmektedir. TLR9 aracılı mikrobiyal defans mekanizmasındaki anomalinin polip

gelişimine sebep olduğu gösterilmiştir (9). Ioannidis ve ark. nazal polip örneklerinde EBV ve HHV-6 görülme sıklığının kontrol grubuna göre daha fazla olduğunu belirtmiştir (75). HSV-1 ve *S. aureus* birlikteliği olan enfeksiyonlarda daha fazla epitelyal hasar ve daha şiddetli hastalık ortaya çıktığı gösterilmiştir (76).

Bakteriler

S. aureus KRS+NP ile en fazla ilişkilendirilen bakteridir. Kültür teknikleri ile popülasyonun 1/3'ünde kolonizasyonu gösterilmişken KRS+NP hastalarında özellikle de astımın eşlik ettiği grupta bu oran daha yüksektir (10, 11). Ayrıca *S. aureus*'un süperantijen salınımı ile lokal olarak poliklonal IgE salınımını arttırdığı ve immün yanıt üzerinde doğrudan etkisi olduğu bilinmektedir. Özellikle Tip 2 KRS+NP hastalarında *S. aureus* süperantijenlerinin rolü gösterilmiştir (12).

S. aureus, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Enterobacter* ve *Corynebacterium*'un KRS+NP ile ilişkili olabileceği gösterilmiş; eozinofilik olmayan KRS+NP grubunda ise gram negatif aerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerde artış izlenmiştir (77). Başka bir çalışmada KRS+NP hastalarında *Citrobacter* baskınlığında artış olduğu ve eozinofilik KRS+NP grubunda *S. aureus* artışı tespit edilmiştir (78).

Bakteriler aynı zamanda biyofilm oluşturarak da hastalık patogenezinde yer almaktadır. Biyofilm, ekstraselüler matriste yer alan polimer yapılar ile bakterilerin konak savunmasına, antimikrobiyal tedaviye ve çevresel strese direnç kazanmasını sağlayan yapıdır (79). *H. influenza*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *M. catarrhalis*, *S. aureus* gibi patojenler biyofilm oluşturabilmektedir. Biyofilim oluşumu

genellikle kötü prognoz ile ilişkilidir. KRS+NP hastalarında biyofilm varlığı mukozal inflamasyonda artışa sebep olmaktadır (80). Ancak biyofilm varlığının sağlıklı bireylerde de olabileceği bilinmektedir.

Funqi

Kommensal mantarlar tüm mukozal yüzeylerde yer almaktadır. Bakteriler gibi mantarlar da biyofilm oluşumu ve toksin salımı yapabilmektedirler. ITS bölgesi dizileme ile mantarlar moleküler yöntemlerle tanımlanmaya başlanmıştır. Hoggard ve ark. çalışmalarında *Malassezia*'nın nazal kavitede baskın mantar cinsi olduğunu ancak hastalarla kontrol grupları arasında fark olmadığını göstermiştir (81). Başka bir çalışmada ise KRS+NP hastalarında *Aspergillus* baskınlığının yüksek olduğu izlenmiştir (13). Fungus zenginliğinin hayat kalitesi ve hastalık şiddeti ile ilişkisi gösterilememiştir (82). Hirotsu ve ark. ise KRS+NP hastalarının yaklaşık yarısında fungal DNA amplifikasyonu göstermişler ve daha şiddetli doku eozinofilisi ile ilişkili bulmuşlardır (83).

Mantarların konak immünitesini belirgin olarak uyardığı *in vitro* olarak gösterilmiştir. *Aspergillus niger* TNF- α , GM-CSF ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinleri arttırmaktadır (84). *Cladosporium sphaerospermum*, *Alternaria alternata* ve *Penicillium notatum* ise proinflamatuvar sitokinleri azaltmış ancak TGF- β 1 ve bFGF gibi doku yeniden düzenleyicisi sitokinleri arttırmıştır. Bu bulgular mantarların hastalık modifiye edici etkisi olabileceğini göstermektedir (84). Rai ve ark. 40 KRS+NP hastasının serumdaki IL-1 β , IL-17, IL-21 ve TGF- β seviyelerini kontrol grubu ile karşılaştırmış ve KRS+NP hastalarında daha yüksek

bulmuştur. KRS+NP hastalarında *Aspergillus flavus* görülme oranı %78 olarak bulunmuş ve *A. flavus*'un IL-17 sekresyonunu arttırdığı belirtilmiştir (14).

Mantarların inflamasyon yanıtını tetiklediği *in vitro* olarak gösterilse de KRS+NP patogenezindeki yeri tartışmalıdır. Anti-fungal terapilerin KRS+NP tedavisinde etkinliği ve yeri yoktur (85).

Diğer Çevresel Faktörler

Sigara dumanı sinonazal mukozada değişikliğe sebep olmaktadır. Sigara içen KRS+NP hastaları ile içmeyen hastaların karşılaştırıldığı bir çalışmada sigara içen grupta PGE2, IL-8 ve TNF- α üretimi daha fazla izlenmiştir (86). Başka bir çalışmada sigara içenlerde mukozadaki dentritik hücre kompozisyonunda kontrol grubuna göre değişiklik izlenmiştir (87). Yamin ve ark. polip mukozası ile elde edilen hücre kültürünü sigara dumanı ile uyarmış ve uyarı sonucu TGF- β 1 ve aktivin A artışı izlemiştir (88). Bu bulgular ışığında sigaranın hastalık patogenezi ile ilişkisi gösterilemese de hastalığın seyrini etkileyebileceği, doku yeniden düzenlenmesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

“Clara cell protein 16” (CC16) Clara hücrelerinden üretilen ve üst ve alt hava yollarının eozinofilik inflamasyonlarında anti-inflamatuar etki gösteren bir proteindir. KRS+NP, astım, alerjik rinitte düzeyleri azalmıştır. Ayrıca hava kirliliğine maruz kalınması durumunda da düzeyinin azaldığı izlenmiştir (89).

Nazal polipler ile normal doku arasında spektrometri ile ağır metal ölçümü yapan bir çalışmada polip dokusunda daha fazla ağır metale rastlanmıştır. Bu da

ağır metal birikiminin de hastalık patogenezinde yer alabileceğini düşündürmektedir (90).

Konak Faktörleri

İmmün sistemin temel görevi homeostasisi sağlamak ve enfeksiyonları ortadan kaldırmaktır. Ancak immün sistemin kronik aktivasyonu sonucu hastalıklar oluşmaktadır. İmmün sistem, doğal ve kazanılmış olarak iki grupta ele alınmaktadır. Doğal immünite mikrobiyal invazyon karşısında hızlı fakat özgül olmayan bir yanıt verirken, kazanılmış immünite daha yavaş ancak özgül bir yanıt sağlar. İmmün yanıt iki farklı grupta incelense de fonksiyonel olarak hemen her zaman doğal ve kazanılmış immünite iç içe geçmiştir.

Doğal İmmünite

Epitelyal bariyer, sentinel mukoza hücreleri (makrofaj, dentritik hücreler, mast hücreleri...), nötrofiller, monositler, NK hücreleri, doğal lenfoid hücreler (ILC), kompleman sistemi doğal immüniteyi oluşturmaktadır.

Epitelyal Bariyer, silli hücreler, olfaktör hücreler, goblet hücreleri, bazal hücreler ve daha yakın dönemde keşfedilen ve IL-25 üreterek tip 2 inflamasyonu tetikleyen soliter kemosensör hücreleri içermektedir (91). Polip dokusu epitelinde kontrol dokuya göre MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 ekspresyonunun arttığı ve TIMP-2 ve E-kaderin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (2). Epitelde sıkı bağlantı bölgelerinde yer alan ve hücre proliferasyonunu düzenleyen EMP1 proteini ekspresyonunun nazal polip dokusunda gen ve protein düzeyinde azaldığı gösterilmiştir (92). Ayrıca KRS+NP

hastalarında sıkı bağlantı bölgelerinin daha zayıf olduğu ve epitelyal geçirgenliğin arttığı gösterilmiştir (93).

Silli hücrelerin yapı ve fonksiyonundaki bozukluklar da hastalık ile ilişkili bulunmuştur. IFN- γ ve IL-13 sitokinlerinin silli hücre farklılaşmasını bozdukları ve sil hareket frekansını düşürdüğü izlenmiştir (94).

Viral patojenlere karşı savunmada yer alan TLR9 aracılı mikrobiyal defansın KRS+NP hastalarında kusurlu olduğu ve bu durumun virüsle indüklenen polip gelişimine sebep olabileceği gösterilmiştir (9). Ayrıca polip dokusunda TLR-2, TLR-4 ekspresyonunun arttığı bu durumun nazal poliplerde artan fibroblast aktivitesi ile ilgili olduğu belirlenmiştir (95-97).

Doğal lenfoid hücreler, antijen reseptörü olmayan lenfositlerdir. Aktive edildiklerinde hızlı bir şekilde sitokin üretirler. ILC-1, ILC-2 ve ILC-3 olarak 3 gruba ayrılır ve sırasıyla tip 1, tip 2 ve tip 3 inflamasyonun gelişiminde yer alırlar ve her inflamasyon çeşidindeki önemli bir role sahiptir. Tip 2 inflamasyondaki sitokinlerin önemli bir kısmı ILC-2 hücrelerinden salınmaktadır (98).

Nötrofiller, dolaşımda baskın lökosit grubu olup fagositoz ve hücre dışı mikroorganizmalara karşı savunmada görev alırlar. KRS+NP patogenezindeki rolü açık olmasa da özellikle KF ilişkili KRS+NP’de dokuda nötrofil infiltrasyonu artmıştır (99). Eozinofil infiltrasyonu göreceli olarak düşük olan KRS+NP hastalarında nötrofillerin hastalığın majör yönlendiricisi olduğu düşünülmektedir (100).

Monositler, inflamasyon sırasında dokuya geçip, dokuda yıllarca yaşayabilen **makrofajlara** dönüşürler. Makrofajlar M1 ve M2 olarak iki grupta incelenirler. M1 makrofajlar tip 1 inflamasyon ile ilişkili olup hücre içi mikroorganizmalara karşı savunmada etkili iken M2 makrofajlar tip 2 inflamasyon ile ilişkilidir. M2 makrofaj aktivasyonu humoral immünite, helmintlere karşı savunma ve doku onarımında görev alır (101). Tip 2 KRS+NP gelişimini esnasında, M2 makrofajların polip dokusunu infiltre ettiğı ve bu göçte CCL23 sitokininin anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (102). Bu makrofajların polip dokusunda, Th2 ve dentritik hücreler için kemotaktik olan CCL18 sitokininin salınımına sebep olduğu ve bu sayede KRS+NP patogenezinde yer aldığı görülmüştür (103). Ayrıca M2 makrofajlar, faktör 13 salınımı ile polip dokusunda fibrin birikimine ve ödeme sebep olmaktadır (104, 105).

Bazofillerin, KRS+NP gelişimindeki önemi bilinmese de Th2 yanıtının ve dolayısı ile tip 2 inflamasyonun gelişimini desteklediğı bilinmektedir (106).

Mast hücreleri, antijen ile tetiklenen IgE yanıtı neticesinde alerjinin erken semptomlarından sorumludur. Eozinofilik inflamasyon yanıtını uyarması ve devamını sağlaması nedeniyle eozinofilik KRS+NP patogenezinde yeri vardır (107). Klinik önemi anlaşılamamış olmakla beraber polip dokusunda glandüler yapıların yakınlığında mast hücresi infiltrasyonu artmıştır (108). Anti-IgE tedavisinin KRS+NP hastalarında etkinliğinin gösterilmesi, mast hücrelerinin hastalık patogenezindeki yerini destekler niteliktedir (109).

Eozinofiller, doku onarımı ve özellikle parazitlere karşı immünite sağlanmasında önemli rol üstlenmektedirler (101). Sinonazal mukozada eozinofiller tarafından oluşturulan hasarın KRS+NP patofizyolojisindeki temel mekanizma olduğu düşünülmektedir (110). Nazal polip varlığı için mutlak gerekli olmasa da eozinofilinin daha kötü prognoz ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır (111, 112). Eozinofilik inflamasyon Tip 2 immün yanıtta, dolayısı ile Th2 ve ILC-2 hücrelerinden salınan sitokinlere bağlı gelişmektedir (98). KRS+NP'deki eozinofil degranülasyon mekanizması netlik kazanmamakla beraber, IgA reseptörlerinin önemli bir uyarı olabileceği düşünülmektedir (113). Nazal poliplerde yüksek düzeyde IgA saptanması bu savı desteklemektedir (114). Batı toplumundaki KRS+NP vakalarının büyük kısmı tip 2 immünite ve eozinofili ile gelişmesine karşın, anti-IL5 tedavisi hastaların sadece yarısında poliplerde küçülme sağlamıştır (115). Ayrıca, anti-eozinofilik ilaçlar ile polip ve kan eozinofil miktarı %90'dan fazla azaltılsa da semptomlarda ve polip boyutlarında iyileşme sağlanamamıştır (116). Bu bilgiler eozinofillerin patogeneizde yer alan ve hatta hastalık şiddetini belirleyen önemli bir hücre olmalarına karşın, KRS+NP patofizyolojisinde kısmi rol oynadığını göstermektedir.

NK hücreleri, hücre içi mikroorganizmalara karşı savunmada rol üstlenmektedir. Astım ve eozinofili birlikteliği olan KRS+NP hastalarında NK hücrelerinin azalmış degranülasyon kabiliyeti, azalmış IFN- γ ve TNF- α üretimi olduğu gösterilmiştir (117). Ayrıca KRS hastalarında NK aracılı eozinofil apoptozunun azaldığı izlenmiştir (118).

Plateletler ise özellikle aspirin ile tetiklenen hava yolu hastalığına eşlik eden KRS+NP patogeneğinde granülositler ile etkileşime girerek proinflatuar sitokinlerin salınmasını artırır (119).

Kazanılmış İmmünite

Epitel hücreleri, ILC ve dentritik hücreler arasındaki sitokin aracılı iletişim kazanılmış immün yanıt gelişiminde temel faktördür. Kazanılmış immünite gelişimi ile alerjen ve kommensal mikroorganizmalara tolerans gelişir ve patojenlere karşı kronik inflamasyon gelişmesi engellenir. Böylece mukozal homeostasis sağlanmış olur. Kazanılmış immünite T lenfosit ve B lenfosit yanıtları olarak iki temel gruba ayrılır.

T hücre aktivasyonu “naive” T hücrelerine **dentritik hücreler** tarafından antijen sunulması ile başlar. Antijen sunumu doğal immüniteden kazanılmış immüniteye geçiş basamağıdır (101). Polip dokusunda yer alan dentritik hücrelerde IL-17RB ekspresyonu artmış olarak izlenmiştir (120). Ayrıca eozinofilik KRS+NP ve eozinofilik-olmayan KRS+NP tiplerinde sırası ile Th2 ve Th1/Th17 yönünde farklılaşmayı sağlayan farklı tipte dentritik hücre çeşitleri tespit edilmiştir (121).

T hücreleri hem hücre dışı hem de hücre içi mikroorganizmalara karşı savunmada görev alırlar. CD4+ ve CD8+ olarak iki alt gruba ayrılırlar, CD4+ T lenfositler ise Th1, Th2, Th17 ve foliküler Th ve Treg olarak gruplandırılır (101). Batı toplumlarında görülen KRS+NP artmış Th2 seviyeleri ile ilişkiliyken Asya toplumlarında Th1/Th17 artışı görülmektedir (122).

Humoral immünite, B lenfositler ve plazma hücrelerince sentezlenen ve salınan antikorlar aracılığı ile hem dokuda hem de dolaşımda etkili olan kazanılmış immünite sistemidir (101). Aşırı lokal immünglobulin salınımı ile birlikte olan B hücre aktivasyonunun KRS+NP ile ilişkili olduğu görülmüştür (123-125). KRS+NP hastalarından alınan polip dokusu örneklerinde B hücreleri, plazma hücreleri, germinal merkez benzeri foliküller ve yüksek düzeyde IgA, IgM, IgG ve IgE saptanmıştır (123-125). Ayrıca polip dokusunda B hücre aktivasyonunu sağlayan BAFF sitokini de yüksek düzeylerde (126). BAFF sitokini ayrıca IgA ve IgE izotip sınıf değişimini ve otoimmün antikorların salınımını desteklemektedir. Anti-dsDNA IgG, IgA ve Anti BP180 antikorlarının polip dokusunda artmış bulunması otoimmünitenin polip gelişiminde yeri olabileceğini düşündürmektedir (122, 127).

Nazal poliplerdeki yüksek IgE seviyesi sistemik atopiden bağımsızdır. Artmış IgE seviyesi kötü prognoz ve stafilokokal süperantijene karşı gelişen poliklonal IgE ile ilişkilidir (128). Bu bilgiler ışığında Anti-IgE ajanların KRS+NP tedavisinde kullanılması gündeme gelmiştir ve tedavide etkinlikleri gösterilmiştir (109, 129).

Yeniden Şekillenme

Yeniden şekillenme “*Remodelling*” hasarlı dokunun anormal iyileşmesi sürecine denir. KRS patogenezinde yeniden şekillenme de sürecin bir parçasıdır. Fibrozis, bazal membran kalınlaşması, goblet hücre hiperplazisi, epitelyal bariyer anomalileri, polip formasyonu, osteit ve anjioneogenez izlenen değişikliklerdir

(130, 131). KRS patogeneğinde bazı sitokinler ve doku işaretleyicileri yeniden dñzenlenme ile ilişkilendirilmiştir. Periostinin fibrozis ve bazal membran kalınlaşması için bir işaretleyici olduğu tespit edilmiştir (132). TGF- β , Osteopontin ve IL-13'ñn de fibrozis ve bazal membranda kalınlaşmaya sebep olduğu gñsterilmiřtir (132-135).

Bir diğer yeniden şekillenme, özellikle Tip 2 KRS gelişimi sırasında, inflamasyon sonucu oluşan epitelyal hasarın anormal iyileşmesi ile ortaya çıkan Epitelyal-mezenkimal değişimdir (EMD) (136, 137). EMD bariyer geçirgenliğini arttırmakta ve dokuya antijen geçişini hızlandırmakta, bu sayede “*feed-forward*” etkisi ile inflamasyonu hızlandırmaktadır (138). WNT, reaktif oksijen tñrleri, proteazlar, periostin, HIF1, IL-13, epiregulin, oncostatin M ve IL-1, EMD sñrecini destekleyen faktörlerdir (88, 139-143).

Koagñlasyon kaskadındaki anomalilerin de polip dokusu oluşumuna katkıda bulunduğu gñsterilmiřtir (144-146). Polip dokusunun ana iskeletini fibrin bir matriksin oluşturduğu ve bu matriksin sıvı toplanmasına sebep olarak polip kitlesinin oluştuğu dñřñnñlmektedir (147). İnfiamasyon sonucu fibrinojen ve diğer plazma proteinleri dokuya geçmekte ve koagñlasyon kaskatının aktifleşmesi sonucu fibrin matriks oluşumu gerçekleşmektedir (147). Doku plazminojen aktivatrñ (t-PA) plazminojeni plazmine dñnñřtñrerek fibrinin enzimatik yıkımını sağlamaktadır. Tip 2 inflamasyonda salınan sitokinler t-PA aktivitesini inhibe ederek fibrin matriksin korunması ve gelişmesini desteklemektedir (104, 148).

Anjioneogenez yeni damar gelişimi anlamına gelmektedir. KRS+NP hastalarında anjiogenezi düzenleyen VEGF, VEGFR-1, Ang-1, Ang-2 mRNA ekspresyonu kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (149). Osteit enfeksiyon ve biyofilm üretimi sonucu ortaya çıkar ve eozinofilik KRS+NP de görülmektedir (150). Proosteoblastik mukozal BMP aşağı regülasyonu artmış osteit ile ilişkilidir (151).

Nöral disfonksiyonun da nazal polip gelişimine katkısı olduğu düşünülmektedir. Nöral disfonksiyon genellikle enfeksiyon ve immün yanıt sonucu ortaya çıkar (152). Eozinofilik KRS+NP hastalarında nöral büyüme faktörü yolağındaki proteinler baskılanmıştır (153).

2.2.5. Evreleme

Görüntüleme Yöntemleri

Kronik rinosinüzitin radyolojik değerlendirmesinde altın standart yöntem bilgisayarlı tomografidir (154). Klinik bulgular KRS'i desteklediğinde tanı için BT gerekliliği tartışmalı olmakla beraber, uygun medikal veya cerrahi tedaviye rağmen semptomlarda düzelme olmaması, fonksiyonel endoskopik sinüs cerrahisi planlanması ve komplikasyondan şüphelenilmesi halinde BT gereklidir (2).

BT görüntülemesi ile hastalık şiddetini değerlendirmek için skorlama sistemleri geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan sinüslerin ve osteomeatal ünitenin opasifikasyonuna göre derecelendirmenin yapıldığı Lund Mackay (LM) sistemidir (155). LM skorlaması **Tablo 1**'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Lund Mackay Evreleme Sistemi

Sinüs	Sağ	Sol
Frontal	0-1-2	0-1-2
Sfenoid	0-1-2	0-1-2
Etmoid	0-1-2	0-1-2
Maksiller	0-1-2	0-1-2
Osteomeatal ünite	0-2	0-2
Sinüslerde; Tam opasifikasyon: 2, Kısmi opasifikasyon: 1, Opasifikasyon yok: 0 Osteomeatal ünite: Kapalı:2 Açık:0		

Viral rinosinüzit gibi inflamatuvar süreçler, sinüslerde haftalar süren mukozal kalınlaşmalara sebep olabilmektedir (156). Bu durum hastalıksız, asemptomatik erişkinlerin BT görüntülemelerinde sıklıkla karşılaşılan mukozal kalınlaşmayı açıklamaktadır (157). KRS hastaları ile asemptomatik mukozal değişiklikleri olan hastalıksız bireyleri ayırabilen LM skoru erişkinler için 4,26 olarak belirlenmiştir ve özgüllüğü %59'dur (158). Pediatrik popülasyonda ise LM skorunun 2 altında olması yüksek negatif prediktif değere sahipken >5 olması yüksek pozitif prediktif değere sahiptir (159). Ayrıca KRS+NP hastalarında LM skorunun hastalığın hayat kalitesi üzerine etkilerini değerlendiren SNOT-22 (*Sinonasal outcome test-22*) ve VAS (*vizüel analog skala*) skorları ile korelasyon gösterdiğini belirten çalışmalar mevcuttur (160, 161). Öte yandan korelasyon göstermediğini savunan yazarlar da vardır (162). LM skoru yüksekliğinin cerrahi sonrası prognoz ile ilişkisi yine tartışmalıdır; yüksek ve düşük skorların prognozu etkilemediğini gösteren çalışmalar olduğu gibi, yüksek skorların daha düşük

postoperatif hayat kalitesi ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (161, 163).

Sağlık İlişkili Hayat Kalitesi Ölçekleri

Kronik rinosinüzitin hayat kalitesi üzerine önemli etkisi vardır. Ayrıca nazal semptomlar dışında, yorgunluk, halsizlik, sinirlilik, anksiyete gibi fiziksel ve ruhsal problemlere neden olabilmektedir.

SNOT-22 KRS hastalarında hastalık ilişkili hayat kalitesini değerlendirmede yaygın kullanılan bir ölçektir (164). Ölçek 22 madde içermektedir ve her maddeye 0-5 arası bir puan verilmesi beklenmektedir. Toplam sonuç 0-110 arasındadır ve yüksek skorlar daha kötü hayat kalitesi anlamına gelir. Ölçekte yer alan maddeler ve puanlama **Tablo 2**'de verilmiştir. Ölçeğin Türkçe doğrulaması mevcuttur (165). SNOT-22 skoruna göre hastalık şiddeti, 8-20 arası hafif, 20-50 arası orta, 50 yukarısı ise ağır olarak sınıflandırılmaktadır (166).

Tablo 2. Sinonasal Outcome Test (SNOT-22) (Sinüs-Burun Sonuç Testi)

	Sorun yok	Çok hafif sorun	Hafif sorun	Orta derecede sorun	İleri derecede sorun	Olabilecek en kötü durumda
1. Burnu sümürme ihtiyacı	0	1	2	3	4	5
2. Burun tıkanıklığı	0	1	2	3	4	5
3. Hapşırma	0	1	2	3	4	5
4. Burun akıntısı	0	1	2	3	4	5
5. Öksürük	0	1	2	3	4	5
6. Geniz akıntısı	0	1	2	3	4	5
7. Katı burun akıntısı	0	1	2	3	4	5
8. Kulakta dolgunluk	0	1	2	3	4	5
9. Sersemlik hissi	0	1	2	3	4	5
10. Kulak ağrısı	0	1	2	3	4	5
11. Yüzde ağrı ve basınç hissi	0	1	2	3	4	5
12. Koku veya tat alma kaybı	0	1	2	3	4	5
13. Uykuya dalmakta zorluk	0	1	2	3	4	5
14. Gece uyanma	0	1	2	3	4	5
15. İyi gece uykusu yokluğu	0	1	2	3	4	5
16. Yorgun uyanma	0	1	2	3	4	5
17. Yorgunluk	0	1	2	3	4	5
18. Verimliliğin düşmesi	0	1	2	3	4	5
19. Konsantrasyon azalması	0	1	2	3	4	5
20. Sinirlilik, huzursuzluk, asabilik	0	1	2	3	4	5
21. Üzüntülü durum	0	1	2	3	4	5
22. Sıkılganlık	0	1	2	3	4	5

2.3. İnsan Mikrobiyomu

İnsan vücudu içerisinde veya üzerinde (cilt, süt bezleri, plasenta, seminal sıvı, uterus, over folikülleri, akciğer, tükürük, ağız mukozası, burun mukozası, konjunktiva, biliyer kanal, gastrointestinal kanal...) yaşayan kommensal, simbiyotik ve patojen mikroorganizmaların (bakteriler, arkaea, ökaryotlar, virüsler) bütünü mikrobiyota; mikrobiyotayı oluşturan mikroorganizmaların genom ve genlerinin bütünü metagenom olarak isimlendirilir. Mikrobiyom terimi ise tüm habitatı, yani mikroorganizmalar ve genomlarına ek olarak birbirleri ve çevre ile olan ilişkilerini de kapsar. Bununla beraber sıklıkla mikrobiyom, metagenom terimi yerine kullanılmaktadır (15).

İnsan vücudu birçok mikroorganizma tarafından kolonize edilmiştir. Eskiden insan mikrobiyotasındaki toplam bakteri hücresi sayısının insan vücudundaki hücre sayısının 10 katı olduğu düşünülmekteydi. Yakın dönem çalışmalarda bakteri hücrelerinin insan hücrelerine oranının yaklaşık 1,3 olduğu gösterilmiştir (167). Hücre sayısındaki fark büyük olmasa da mikrobiyotada 500-1000 civarı bakteri türünün bulunduğu ve her bir bakteri türünün yaklaşık 2000 protein kodlayan geni olduğu hesaba katılırsa bakterilere ait yaklaşık 2.000.000 protein kodlayan gen bulunduğu söylenebilir. Bu da insan genomundaki protein kodlayan gen sayısının yaklaşık 100 katıdır (168). İnsan ve mikrobiyotanın bütünü, ortak bir evrimsel sürece ve metabolizmaya sahip tek bir canlı organizma olarak kabul etme düşüncesi, insan genomundan daha geniş bir protein kodlayan gen havuzuna sahip olan mikrobiyomun araştırılması fikrini gündeme getirmiştir (169).

İnsan mikrobiyomu sağlık halinin sürdürölmesinin ve immünite gelişiminin önemli bir parçasıdır (17-19).

2.3.1. Terminoloji

Zenginlik (richness): Bir ekosistemdeki farklı türlerin sayısı olarak ifade edilir (170).

Eşitlik (evenness): Bir ekosistemde yer alan her bir türe ait birey sayısının birbirlerine olan yakınlığını ifade eder (170).

Bolluk (abundance): Ekosistemde bulunan türlerin birey sayıları olarak ifade edilir. Rölatif (göreceli) bolluk ise her tür için, türdeki birey sayısının ekosistemdeki birey sayısına göre değerlendirilmesidir (170).

Çeşitlilik (diversity): Ekosistem içerisinde etkili türlerin sayısı olarak ifade edilmektedir. Etkili tür olarak kastedilen bolluk seviyesi yüksek olan türlerdir. Zenginlik ve eşitlik arttıkça çeşitlilik artmaktadır (171). Alfa çeşitlilik, lokal bir habitat (mikrobiyom çalışmaları için tek bireydeki ilgili lokalizasyon) içerisindeki türlerin çeşitliliğı anlamına gelir (172). Alfa çeşitliliğı sayısal olarak ifade edebilmek için çeşitli indeksler kullanılır. Shannon çeşitlilik indeksi ve Simpson çeşitlilik indeksi literatürde sıklıkla kullanılan çeşitlilik indeksleridir (173, 174). Beta çeşitlilik farklı habitatlar arasındaki çeşitliliğı ifade eder (175). Sayısal olarak ifade edilebilmek için yine belirli indeksler kullanılır. Bray-Curtis ve Jaccard en sık kullanılan indekslerdir. Bray-Curtis indeksi 0-1 arası değişmektedir. 0 ilgili habitatların tüm türleri paylaştığı, 1 ise hiçbir ortak tür paylaşmadıkları anlamına gelir (176).

Operasyonel Taksonomik Birimler “Operational Taxonomic Units”

(OTU): 16S rRNA gen dizileme bakteriyel toplulukların tanımlanmasında kullanılmaktadır. Türleri tayin etmek için benzer sekanslar kümelenmektedir. Bu kümelerin her biri, dizi benzerlik eşiğine bağlı olarak bir bakteri türünün veya cinsinin bir taksonomik birimini temsil etmeyi amaçlamaktadır. Bu kümelenme “Operasyonel Taksonomik Birim” (Operational Taxonomic Units, OTU) olarak isimlendirilir. Sekanslar kümelenirken genel kabul olarak, %97'lik bir benzerlik oranı aranmaktadır (177).

Disbiyozis: Hasta bireyde; sağlıklı kontrol grupları ile kıyaslandığında mikrobiyomda görülen kompozisyonel veya fonksiyonel olarak ortaya çıkan farklılık olarak tanımlanır. Faydalı mikroorganizmaların azalması; potansiyel patolojik mikroorganizmaların artışı, toplam mikrobiyal çeşitliliğin azalması olarak ortaya çıkabilir (20).

2.3.2. İnsan Mikrobiyom Projesi

İnsan Mikrobiyom Projesi (İMP), İnsan Genom Projesinin bir uzantısı olarak 2007 yılında başlatılmıştır (169). DNA dizileme yöntemlerindeki gelişmeler ve mikroorganizmaların genom düzeyinde tanımlanabilmesi ile mikrobiyom araştırmaları hız kazanmıştır (16). İMP, sağlık ve hastalık durumlarındaki mikrobiyom özelliklerini, mikrobiyom araştırmaları ile hastalıkların gelişimini öngörmeyi ve insan fizyolojisini optimum hale getirebilecek mikrobiyom manipülasyon stratejileri geliştirmeyi hedeflemektedir (169). İMP iki fazdan oluşmaktadır.

İnsan Mikrobiyom Projesi ilk fazında, referans olabilecek bir mikrobiyal genom dizi verisi elde etmeyi ve insan mikrobiyomunun karakterizasyonunu gerçekleştirmeyi, hastalıklar sırasında ortaya çıkan mikrobiyom değişikliklerini, analizler için yeni teknolojiler geliştirmeyi ve insan mikrobiyom araştırmalarının etik, yasal ve sosyal sonuçlarını araştırmıştır (169).

İnsan Mikrobiyom Projesinin ilk verileri 2012’de açıklanmıştır (178). İki yüz kırk iki sağlıklı gönüllüden toplam 4788 örnek incelenmiştir. Her bir gönüllüden oral kavite ve orofarinksten 9 (tükürük, bukkal mukoza, gingiva, damak, tonsiller, dil, orofarinks, alt ve üst dental plaklar) ciltten 4 (her iki retroauriküler sulkus ve antekübital fossa) anterior naresten bir örnek ve gaita örneği alınmış. Kadınlarda ek olarak vajina giriş orta ve posterior forniks kısımlarından 3 örnek daha alınmış. Ayrıca 131 hastadan 2. kez örnek alınarak bireylerin kendi içlerindeki mikrobiyom değişimleri araştırılmış.

Bireyler arası mikrobiyom farklılığı bireylerin kendi içerisinde zamana bağlı değişen farklılıktan daha yüksek olarak bulunmuştur. Tükürük örneğinde alfa farklılığı en yüksek tespit edilirken beta farklılığı en düşük seviyede izlenmiştir. Antekübital fossa cildi ise en yüksek beta farklılığı görülen bölge olmuştur. Hemen her vücut bölgesinde bireyler arası fazla değişiklik göstermeyen baskın bir bakteri cinsi tespit edilmiştir. Örneğin anterior nareste *Corynebacterium* ve *Propionibacterium*, oral kavitede *Streptococcus*, gaitada *Bacteroides* baskın izlenmiştir (178).

Bireyler arası mikrobiyom farklılığının kişiye özel ve fonksiyonel olduğunun altı çizilmiştir. Örneğin oral florada sıklıkla bulunan *Streptococcus mitis* türünün V-tipi ATPaz ve kolin bağlayıcı protein cbp6 ve cbp12 ekspresyonu bireyler arasında farklılık göstermektedir. Başka bir örnek olarak *Bacteroides fragilis*'in kapsüler polisakkarid A ligandı T-hücre aktivasyonu yapmaktadır ve bu tür popülasyonun %16'sında %0,1 den fazla %3'ünde %1'den fazla baskınlıkta izlenmiştir (179). Mikrobiyom konak metabolizmasına, yaşa, ırka, cinsiyete, beden-kitle indeksine, pH'a göre değiştiği belirtilmiştir (178).

2017 yılında Nature dergisinde yayımlanan yayın ile İMP verileri genişletilmiş ve güncellenmiştir (180). Mikrobiyomdaki, ökaryotlar, archaea, virüsler ve yeni 54 bakteri türü ilk çalışmaya ek olarak tespit edilmiştir. İzole edilen genomlarında yetersiz temsil edilen türler, izolasyon ve dizileme için önceliklendirilerek tanımlanmıştır. Yeni fonksiyonel profillemeye yöntemleri insan vücudunun mikrobiyal kolonizasyonu için gerekli yolları belirlenmiştir. Bakteri dışı mikroorganizmaların beraber bulunabilirliği araştırılmıştır. Gastrointestinal sistemde baskın archaeon olan ve polisakkarid sindiriminde önemli bir rol üstlenen *Methanobrevibacter smithii*'nin Clostridiales sınıfı ile birlikteliğinin sık olduğu izlenmiştir (181). Yine virüs türlerinin genellikle faj tipi olduğu ve ilgili bakteri ile birlikteliğinin artmış olduğu izlenmiştir (182). Genişletilmiş verilerde ayrıca mikrobiyomun zamansal değişimi daha kapsamlı araştırılmıştır. Bağırsak mikrobiyomunda *Bacteroides* şubesindeki bakteriler zaman içerisinde fazla değişiklik göstermezken Firmicutes zamansal olarak daha dinamik bir seyir göstermektedir. Ek olarak ağız ve cilt mikrobiyomunun aynı bireyde zaman

içerisinde dinamik bir seyir gösterebileceği belirtilmiştir. Vücutta birden fazla lokasyonda tespit edilen mikroorganizmaların bir kısmı zaman içerisinde her lokalizasyonda aynı anda değişim gösterirken bir kısmı ise bazı lokalizasyonlarda değişip diğerlerinde sabit seyretmektedir (180).

İnsan mikrobiyom projesi ikinci fazı “Bütünleştirilmiş İnsan Mikrobiyom Projesi olarak isimlendirilmiştir ve bu fazda 3 ana konu üzerinden mikrobiyom araştırması genişletilmiştir (183). İlk konu vajinal mikrobiyomun gebelik sırasında değişimi ve preterm doğum ile ilişkisinin araştırılmasıdır. Bazı erken doğum vakalarının mikrobiyom ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. İkinci konu ise gastrointestinal sistem mikrobiyomu ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları ilişkisidir. Çalışmanın bu ayağında hastalığın aktif olduğu ve kontrol altında olduğu dönemlerde bağırsak mikrobiyomu incelenmiş ve mikrobiyomun dinamik bir süreç izlediği tespit edilmiştir. Aktif hastalık dönemlerinde şiddetli disbiyozis ile karşılaşılmıştır. Üçüncü konu ise prediyabetik hastaların, solunum yolu viral hastalıkları ve stres sırasında nazal ve gastrointestinal mikrobiyomlarındaki değişim araştırılmıştır. İnsülin direnci olan bireylerde solunum yolu viral enfeksiyonlarına daha az inflamatuvar yanıt, daha çok kronik inflamasyon ve nazal mikrobiyomda daha az dinamik seyir izlenmiştir (183).

2.3.3. Nazal Mikrobiyom ve İlişkili hastalıklar

Nazal mikrobiyom doğum sırasında oluşmaya başlar ve doğum şekline etkilenir (23). Daha sonra beslenme, hijyen, sigara, yaşanan coğrafya, hava kirliliği, antibiyotik kullanımı vb. koşullar ile şekillenir (24, 25). Nazal

mikrobiyomda fırsatçı patojenler bulunmaktadır ve uygun koşullarda solunum yolunun diğer kısımlarına yayılabilir ve alerjik rinit, KRS, akut solunum yolu enfeksiyonları, astım, otitis media gibi hastalıkların gelişimine katkıda bulunabilir (26, 27). Nazal kavitede bulunan kommensal bakteriler, sınırlı alan ve besinler için rekabet ederek ya da toksin üreterek fırsatçı patojen kolonizasyonunu engeller (184).

Yan ve ark. anterior naresin orta meatusa ve sfenoetmoid resese göre azalmış çeşitliliğe sahip olduğunu belirtmiştir (185). Ancak orta meatus ve sfenoetmoid reses arasında çeşitlilik açısından fark yoktur. Bu durumun anterior nares çok katlı yassı epitel ile kaplıyken orta meatus ve sfenoetmoid resesin solunum yolu epiteli ile kaplı olması sebebiyle ortaya çıktığı düşünülmüştür (185). Anterior nareste baskın üç filum vardır: Actinobacteria, Firmicutes ve Proteobacteria (186). Cins olarak ise *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium* ve *Moraxella* baskındır (187). Orta meatusta ise en sık izlenen türler *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes* olmuştur (188).

Alerjik Rinit ve Nazal Mikrobiyom

Mevsimsel alerjik rinit hastalarında polen sezonunda bakteriyel çeşitliliğin arttığı ve orta meatustaki eozinofili ile korelasyon gösterdiği izlenmiştir (189). Başka bir çalışmada ise kırsal ve şehirsal kesim arasında alerjik rinit görülme sıklığı ve nazal mikrobiyom incelenmiş ve şehirde yaşayanların belirgin olarak daha az

bakteriyel çeşitliliğe ve daha çok alerjik rinit sıklığına sahip olduğu izlenmiştir (190).

Kronik Rinosinüzit ve Nazal Mikrobiyom

KRS ile belli bir bakteri grubu arasında ilişki kesin olarak sağlanamamış olmakla beraber genellikle disbiyozis ve azalmış çeşitlilik ile karşılaşılmaktadır (191). Rom ve ark. çalışmalarında KRS de inflamasyon şiddeti arttıkça mikrobiyom çeşitliliğinin azaldığını tespit etmişler ve inflamasyonun şiddetli olduğu grupta *Staphylococcus* bolluğunun inflamasyon düşük gruba göre daha yüksek olduğu belirtmişlerdir (192). KRS+NP hastalarında KRS-NP hastalarına göre daha fazla *S. aureus* bolluğu izlenmiştir (193). Koeller ve ark. KRS-NP hastalarının mikrobiyom kompozisyonlarının KRS+NP ve sağlıklı kişilerden belirgin farklı olduğunu ve disbiyozisin KRS-NP gelişiminde KRS+NP gelişimine göre daha etkili olduğunu savunmuşlardır (194). Ayrıca nazal mikrobiyomun KRS için yapılacak cerrahinin soncunu etkileyebileceği belirtilmiştir. Sinüs cerrahisi sırasında *Actinobacteria* şubesi ve *Corynebacterium* cinsi bakterilerin bolluğunun yüksek oluşu daha iyi cerrahi sonuç ile ilişkili bulunmuştur (195).

Nörolojik Hastalıklar ve Nazal Mikrobiyom

Olfaktör vektör hipotezine göre olfaktör bulb mikroorganizma geçişi ve santral sinir sistemine yayılımı için bir geçit görevi görmektedir ve olfaktör bulbda oluşan hasar santral sinir sisteminde protein katlanma bozukluğu meydana getirerek Alzheimer ve Parkinson hastalıklarına sebep olmaktadır (196, 197). Multipl sklerozis patogenezinde stafilokokal sfingomyelinazın yer aldığı ve bu toksini

salgılayan *S. aureus*'un, posterior sinüsleri etkileyen KRS'nin santral sinir sistemine yayılımı sonrası geliştiği hipotezi vardır (198). Ayrıca nazal mikrobiyomda *Chlamydia pneumoniae* bulunması artmış Alzheimer riski ile ilişkilidir (199).

Nazal polipli kronik rinosinüzitin patogenezinde mikrobiyal etkenlerin rolü henüz netleşmemiş olup hala önemli bir araştırma konusudur. Yeni nesil dizileme alanındaki gelişmeler mikrobiyom araştırmalarına imkân sağlamaktadır. Bu tez çalışmasında nazal mikrobiyomda yer alan bakteri ve mantar kompozisyonunun sağlıklı kontrol grubu ve KRS+NP hastaları arasında nasıl bir değişim gösterdiği araştırılmıştır. Ayrıca daha önce KRS+NP tedavisi amacıyla fonksiyonel endoskopik sinüs cerrahisi uygulanan ve hastalığı nüks eden hastalar ile cerrahi olarak tedavi edilmemiş hastalar arasında mikrobiyom farklılıkları sorgulanmıştır. Ek olarak hastalığın evrelemesinde kullanılan SNOT-22 ve Lund-Mackay skorları ile ilişkili olabilecek bakteri ve mantar cinsleri belirlenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örnekler ve Verilerin Toplanması

Araştırma Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 22.05.2020 tarihli toplantıda 350 karar numarası ile onay almış ve bütçesi Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından 01/2020-17 proje numarası ile sağlanmıştır. Araştırma Gazi Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı ve Gazi Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı merkezlerinde yürütülmüştür.

Gazi Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalına Temmuz 2020-Aralık 2020 arası dönemde başvuran ve klinik öyküye ek olarak nazal endoskopi veya BT ile nazal polipli kronik rinosinüzit tanısı doğrulanan erişkin hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Kistik fibrozis, primer siliyer diskinezi hastalığı olan, son 4 hafta içerisinde antibiyotik ve intranazal kortikosteroid kullanmış olan, immünsüpresyona sebep olabilecek ek hastalık ya da ilaç kullanımı olan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Kontrol grubu ise aynı dönemde polikliniğe başvuran ve rinolojik yakınması olmayan, fizik muayene ile KRS tanısı dışlanmış olan gönüllülerden oluşturulmuştur.

Çalışma iki hasta grubu ve bir kontrol grubu ile planlanmıştır. İlk hasta grubunu KRS+NP olup cerrahi ile tedavi edilmemiş kişiler oluşturmaktadır. İkinci hasta grubu ise daha önce KRS+NP sebebiyle fonksiyonel endoskopik sinüs cerrahisi yapılan (en az unsinektomi, anterior ve posterior etmoidektomi yapılmış) ve hastalığı yinelemiş olan kişilerden oluşmaktadır. Ameliyata bağlı olabilecek

uzun süreli etkiler araştırıldığından endoskopik sinüs cerrahisi üzerinden bir yıldan az süre geçen hastalar çalışmanın dışında tutulmuştur. Hasta grupları ve kontrol grubuna dahil edilen hastalar çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve onamları alınarak çalışmaya dahil edilmişlerdir.

Hastalara başvuru gününde SNOT-22 ölçeği araştırmacı tarafından uygulanmıştır. BT görüntüleri mevcut olan hastaların görüntüleri incelenerek LM skorlaması yapılmıştır. Her hastanın yaş, cinsiyet, astım ve alerjik rinit varlığı, sigara içiciliği bilgileri öğrenilmiş ve kaydedilmiştir.

Her hastadan, kontaminasyonu engellemek amacıyla, direkt endoskopik bakı altında, orta meatustan sürüntü örneği alındı. Örnekler steril pamuk uçlu swab kullanılarak alındı. Örnek alınırken anatomik olarak örnek alınması daha konforlu olan taraf tercih edildi. Swab ucu gözle görülür şekilde sature olana kadar çevrilerek (en az 10 tur) örnek alındı. Swab uçları kesilerek steril kaba aktarıldı ve buz üzerine konuldu. Örnekler en kısa sürede -80°C dondurucuya yerleştirildi ve DNA ekstraksiyonu prosedürüne kadar -80°C de muhafaza edildi.

Çalışma her grubun 10 kişiden oluşması şeklinde planlandı. Ancak 16S rRNA V1-2-3 bölgesi amplifikasyonu ile mikroorganizma tespit edilemeyen iki örnek çalışmadan çıkartıldı. Nüks hastalık grubu 8, diğer hasta grubu 10, kontrol grubu 10 kişiden oluşturuldu.

Gerekli kitlerin ve laboratuvar malzemelerinin temini sonrası Gazi Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında DNA elde edilmesi işlemi gerçekleştirildi.

3.2. Kullanılan Gereçler ve Cihazlar

1. Eppendorf tüpü 1,5 ml
2. Eppendorf tüpü 2 ml
3. Otomatik pipet 0,5-10 µL ve pipet uçları
4. Otomatik pipet 5-50 µL ve pipet uçları
5. Otomatik pipet 20 -200 µL ve pipet uçları
6. Otomatik pipet 100 -1000 µL ve pipet uçları
7. Vortex cihazı (Combi-Spin FVL-2400N, Biosan, Letonya) **(Şekil 6)**
8. Kuru blok ısıtıcı (Thermo Block TDB-120, Thermofisher, Almanya)

(Şekil 7)

9. Mikro santrifüj (Mikro 120, Hettich, Almanya) **(Şekil 8)**
10. Spektrofotometre (Nanodrop-1000, Thermofisher, Almanya) **(Şekil 9)**
11. QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) **(Şekil 10)**

- QIAamp Mini Spin Columns 50 adet
- Koleksiyon tüpü (2 ml) 150 adet
- Buffer AL 12 ml
- Buffer ATL 14 ml
- Buffer AW1 (konsantre) 19 ml
- Buffer AW2 (konsantre) 13 ml
- Buffer AE 2 x 15 ml
- Proteinaz K 1.25 ml

12. Etanol %96

13. Swift Amplicon 16S+ITS Panel (Swift BioSciences, ABD)

- Reagent G1 106µL
- Reagent G2 160µL
- Enzim G3 600µL
- Pre-PCR TE 1200µL
- Index D50X 33µL
- Index D7XX 44µL
- Buffer Y1 1637µL
- Enzim Y2 53µL
- Enzim Y3 53µL
- Enzim Y4 106µL
- Post PCR TE 1200µL

14. Qubit 1x dsDNA hs assay (Thermofisher, Almanya)

15. Illumina Miseq System (Illumina, ABD)



Şekil 6. Vortex cihazı (Combi-Spin FVL-2400N, Biosan, Letonya)



Şekil 7. Kuru blok ısıtıcı (Thermo Block TDB-120, Thermofisher, Almanya)



Şekil 8. Mikro santrifüj (Mikro 120, Hettich, Almanya)



Şekil 9. Spektrofotometre (Nanodrop-1000, Thermofisher, Almanya)



Şekil 10. QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Almanya)

3.3. Araştırma Yöntemi

3.3.1. DNA izolasyonu

Örnekler -80°C soğutucudan çıkartılarak bir saat oda sıcaklığında çözdürüldü. Sonraki işlemler laminar akımlı biyogüvenlik kabininde gerçekleştirildi. Swab uçları steril bisturi ve penset yardımı ile küçük parçalara ayrılarak 2 ml Eppendorf tüplerine aktarıldı. Tüpün üzerine 180 µL Buffer ATL solüsyonu ve 20 µL Proteinaz K eklendi. Tüpler on beş saniye vortekslenerek karışım sağlandı ve 56°C’de bir gece boyunca kuru ısıtma bloğunda inkübasyonda bırakıldı. Tüpler hafifçe santrifüjlenerek kapakta biriken damlacıklar iade edildi. Örneğe 200 µL Buffer AL eklendi. On beş saniye vortekslenerek karıştırıldı. 70°C ayarlı kuru ısıtma bloğunda 10 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Takiben örneğe 200 µL %96’lık Etanol eklendi ve 15 saniye vortekslendi. Önceki basamaktaki karışım mini spin kolonuna aktarıldı. 8000 rpm devirde 1 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Filtratı içeren toplayıcı tüp atıldı. Kolonlar yeni toplayıcı tüpe aktarıldı. Mini spin kolonuna 500 µL AW1 eklendi. Bir dakika boyunca 8000 rpm devirde santrifüj yapıldı. Filtratı içeren tüp atılarak kolon yeni tüpe aktarıldı. Daha sonra Mini spin kolonuna 500 µL AW2 eklendi. Üç dakika boyunca 14000 rpm devirde santrifüj yapıldı. Filtrat uzaklaştırılarak bir dakika daha santrifüj yapıldı. Mini spin kolonu 1,5 ml Eppendorf’a aktarıldı. Kolonlar içerisindeki swab artıkları çıkartıldı. DNA elüsyonu için kolonlara 50 µL AE solüsyonu eklendi. Bir dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 8000 rpm devirde bir dakika boyunca santrifüj yapıldı. Önceki basamakta elde edilen filtrat yeniden mini spin kolonuna

aktarılarak bir dakika daha santrifüj yapıldı. Mini spin kolonları uzaklaştırılarak Eppendorf tüplerinin kapakları kapatıldı.

Elde edilen filtrattaki DNA konsantrasyon ölçümü Nanodrop 1000 (Thermofisher, Almanya) cihazı ile yapıldı. AE solüsyonu ile blank yapılarak ölçüme geçildi. A260/A280 ve A260/A230 değerleri kaydedildi.

3.3.2. Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing: NGS)

Qubit ile ölçüm yapılarak her bir örnek için maksimum hacimde stok konsantrasyonu kullanıldı. SWIFT Amplicon 16S+ ITS paneli kullanılarak 16S rRNA geninin değişken bölgeleri (V1-V9 u kapsayan 5 bölge) ve Fungal ITS1, ITS2 bölgeleri amplifiye edildi. Multiplex PCR basamağında 10µL DNA örneği ile 20 µL reaksiyon karışımı (Reagent G1, Reagent G2, Enzyme G3) birleştirilerek termocycler'a yerleştirildi. Termocycler, 30 sn. 98°C'de, takiben 4 siklus boyunca 10 sn. 98°C'de, 5 dk. 63°C'ta, 1 dk. 65°C'de, daha sonra 22 siklus boyunca 10 sn. 98°C'de, 1 dk. 64°C'de ve son olarak 1 dk. 65°C olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra manyetik bead kullanılarak saflaştırma yapılarak indeksleme basamağına geçildi. Bir önceki aşamada elde edilen çöktürülmüş materyal üzerine 5 µl Index D50x + 10 µl IndexD7xx (x:1-8 xx:1-2 aralığında değişmektedir, her örnek için farklı olup örneklerin ayırt edilmesinde kullanılmaktadır. Adaptörlerin detayları Tablo 3'te verilmiştir) ve ek olarak 35 µl reaksiyon karışımı (Buffer Y1, Enzyme Y2, Enzyme Y3, Enzyme Y4) eklendi. Karışım termocyclera alındı, cihaz 37 °C'de 20 dk. çalıştırıldı. İkinci saflaştırma aşamasında karışıma 42.5 µl PEG NaCl eklendi. Manyetik rak kullanılarak yeniden pellet oluşturuldu. Supernatant alındı

ve kalan materyal etanol ile yıkandı. 20 µl of Post-PCR TE buffer ile elüsyon yapıldı. Elüsyon sonrası elde edilen materyalde qPCR ile kanitatif ölçüm yapıldı. Ölçümde bazı örneklerin Illumina Miseq cihazı için önerilen konsantrasyonun altında kaldığı görüldü. Bu yüzden kütüphane, KAPA Library Amplification Kits kullanılarak amplifiye edildi.

Sekanslama Miseq reagent Kits v2 kartuşu kullanılarak Illumina Miseq cihazında yapıldı.

Tablo 3. Örneklerin işaretlenmesinde kullanılan primerler

D5 Adaptörü	Sekans	D7 Adaptörü	Sekans
D501	TATAGCCT	D701	ATTACTCG
D502	ATAGAGGC	D702	TCCGGAGA
D503	CCTATCCT	D703	CGCTCATT
D504	GGCTCTGA	D704	GAGATTCC
D505	AGGCGAAG	D705	ATTCAGAA
D506	TAATCTTA	D706	GAATTCGT
D507	CAGGACGT	D707	CTGAAGCT
D508	GTACTGAC	D708	TAATGCGC
		D709	CGGCTATG
		D710	TCCGCGAA
		D711	TCTCGCGC
		D712	AGCGATAG

3.4. Biyoinformatik Analiz

Analiz Qiime2 toolkit (200) kullanılarak yapılmış olup verilerin işlenmesi ve grafiklerin çıkarılması konusunda Python 3 programlama dili kullanılmıştır. Okumaların filtrelenmesi için deblur programı, >250 bp ve kalite skorları> 30 PHRED parametreleri kullanılarak yapılmıştır. Taksonomik eşleştirmeler için OTU tablosu oluşturulmuş ve 16s rRNA ve ITS veri tabanı kullanılarak eşleştirmeler gerçekleştirilmiştir. 16S veri tabanı olarak Silva v138 (201) ve ITS veri tabanı

olarak ise UNITE v8.2 (202) kullanılmıştır. OTU tablosu oluşturulurken kümelenme eşik değeri olarak %97 benzerlik oranı kullanılmıştır. Ardından örneklerin taksonomik içeriği, yüzdesel bakteri miktarı ve metadata bilgileri kullanılarak alfa çeşitlik analizleri, beta çeşitlilik analizleri fastTee kullanılarak qiime2 platformu içerisinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerden benzerlik matriksi oluşturmak için özelleştirilmiş python kodları kullanılmıştır.

3.5. İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel incelemeler için IBM SPSS Statistic v22 kullanıldı. Bağımsız gruplarının karşılaştırılmasında sayısal veriler için Mann Whitney-U ve Kruskal-Wallis testleri kullanıldı. Nitel veriler ise ki-kare testi ile değerlendirildi. Sayısal verilerin korelasyonunun değerlendirilmesinde Spearman'ın sıralama korelasyon katsayısı kullanıldı. Beta çeşitlilik indekslerinin değerlendirilmesinde *Permutational Multivariate Analysis of Variance* (PERMANOVA) testi kullanıldı. Tüm karşılaştırmalar için p değerinin 0,05'ten küçük olması anlamlı olarak kabul edildi. Korelasyon ısı haritalarının ve çubuk grafiklerinin oluşturulmasında Excel (Microsoft, USA) programı kullanıldı.

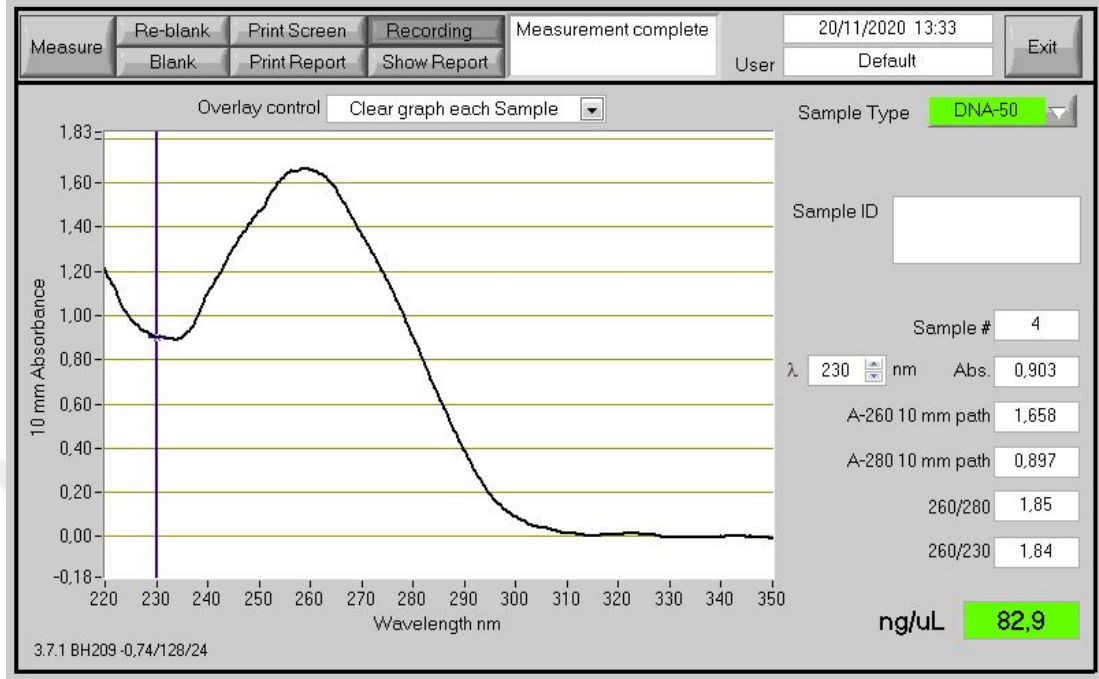
4. BULGULAR

4.1. DNA Ekstraksiyonu Sonrası Elde Edilen DNA Saflığının Değerlendirilmesi

Her bir örneğin spektrofotometre (Nanodrop-1000, Thermofisher, Almanya) ile ölçülen DNA konsantrasyonları (ng/μL), A260/A280 ve A260/A230 değerleri **Tablo 4**'te gösterilmiştir. **Grafik 1**'de ise spektrofotometre ölçüm örneği görülmektedir.

Tablo 4. Elde edilen DNA'nın konsantrasyon ve saflık ölçümü

Örnek	DNA ng/μL	A260/A280	A260/A230
R1	31	1,88	2,21
R2	37	1,84	1,41
R3	41,1	1,83	1,94
R4	20	1,93	2,27
R5	63,8	2,08	2,05
R6	47,1	1,71	1,1
R7	38	1,79	1,19
R8	99,9	1,89	2,47
P1	106,1	1,91	2,28
P2	100,9	1,86	1,86
P3	8,1	1,72	1,9
P4	8	1,87	1,47
P5	13,9	1,86	2,12
P6	69,3	1,99	1,72
P7	28,8	2,08	2,03
P8	5,9	2,25	4,6
P9	23,8	1,9	1,55
P10	18,6	1,6	0,95
K1	123,4	2,00	0,96
K2	12,5	1,84	0,75
K3	32,1	1,86	2,08
K4	14,8	1,93	1,09
K5	32,1	1,95	1,57
K6	15,1	1,78	1,61
K7	16,2	1,92	4,65
K8	32,6	1,66	0,85
K9	27,5	1,68	0,92
K10	23,6	1,83	2,44



Grafik 1. Nanodrop-1000 ile örneklerin spektrofotometrik ölçümü

4.2. Demografik Bilgiler

Çalışmaya, Temmuz 2020-Aralık 2020 arası dönemde Gazi Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalına başvuran, klinik öyküye ek olarak nazal endoskopi veya BT ile nazal polipli kronik rinosinüzit tanısı doğrulanan erişkin hastalar ve rinolojik yakınması olmayan, fizik muayene ile KRS tanısı dışlanmış olan gönüllüler dahil edilmiştir. Kistik fibrozis, primer siliyer diskinezi hastalığı olan, son 4 hafta içerisinde antibiyotik, sistemik ve intranazal kortikosteroid kullanmış olan, immünsüpresyona sebep olabilecek ek hastalık ya da ilaç kullanımı olan hastalar çalışma dışında tutulmuştur. Hasta grubu 18, kontrol grubu 10 kişiden oluşturulmuş; hasta grubu da kendi içerisinde daha önce fonksiyonel endoskopik sinüs cerrahisi yapılanlar ve yapılmayanlar olarak ikiye ayrılmıştır.

Katılımcıların %64,3'ü erkek (n=18) %35,7'si kadındı (n=10). En genç katılımcı 23 en yaşlı katılımcı 59 yaşındaydı ve katılımcıların yaş ortalaması $36,96 \pm 11,0$ 'dı Katılımcılar arasında sigara içiciliği oranı %35,7'ydi (n=10). Beş hastada (%17,9) eşlik eden astım hastalığı mevcuttu.

Primer hastalık grubundaki katılımcıların yaş ortalaması ve standart sapması $36,6 \pm 11,7$, nüks hastalık grubundakilerin yaş ortalaması ve standart sapması $40,6 \pm 11,9$, kontrol grubundakilerin ise $34,4 \pm 9,7$ olarak tespit edildi. Nüks hastalık grubundaki katılımcıların yaş ortalaması daha diğer gruplara göre fazla olmakla beraber, gruplardaki katılımcıların yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($p=0,49$).

Primer hastalık grubunda kadın katılımcıların oranı %40 (n=4), nüks hastalık grubunda %37,5 (n=3), kontrol grubunda %30 idi (n=3). Erkek katılımcıların oranı primer hastalık nüks hastalık ve kontrol grubunda sırasıyla %60 (n=6), %62,5 (n=5) ve %70 (n=7) olarak izlendi. Grupların cinsiyet dağılımları arasında istatistiksel anlamlı fark yoktu ($p=0,89$).

Primer hastalık grubunda 3 hastada (%30), nüks hastalık grubunda 2 hastada (%25) eşlik eden astım hastalığı vardı. Kontrol grubunda komorbid astım hastalığı yoktu. Hastalık grupları arasında komorbid astım görülme oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,62$).

Sigara içiciliği oranları ise primer hastalık, nüks hastalık ve kontrol hastalık gruplarında sırasıyla %30 (n=3), %37,5 (n=3) ve %40 (n=4) idi. Gruplar arasında

sigara içiciliği dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,89$).

Tablo 5'te demografik bilgiler, SNOT-22 ve LM skorları özetlenmiştir.

Tablo 5. Demografik bilgiler, SNOT-22 ve LM skorları özet tablosu

	Primer Hastalık	Nüks Hastalık	Kontrol	Genel	p
Hasta sayısı	10	8	10	28	
Yaş ortalaması	36,6±11,7	40,6±11,9	34,4±9,7	36,96±11,0	0,49
Cinsiyet: E	6(%60)	5(%62,5)	7(%70)	18(%64,3)	0,89
K	4(%40)	3(%37,5)	3(%30)	10(%35,7)	
Astım	3 (%30)	2 (%25)	0	5 (%17,9)	0,18
Sigara	3 (%30)	3 (%37,5)	4 (%40)	10 (%35,7)	0,89
SNOT-22	42,6±19,5	32,0±11,4	N/A	37,9±16,9	0,10
LMS-toplam	18,6±4,7	16,5±5,1	N/A	17,7±4,8	0,41
LMS-Örnek tarafı	9,3±2,3	8,6±2,7	N/A	9,0±2,5	0,69

4.3. Sinonasal Outcome Test (SNOT-22) Sonuçları

SNOT-22 ölçeği primer hastalık ve nüks hastalık gruplarındaki katılımcılara uygulandı. Katılımcılar arasında en düşük SNOT-22 skoru 10 en yüksek skor 66'ydı. Ortalama skor 37,9±16,9'du. Primer hastalık grubunda en düşük ve en yüksek skor sırasıyla 10 ve 66'ydı. Skorların ortalaması ise 42,6±19,5'ti. Nüks hastalık grubunda en düşük skor 16, en yüksek skor 52 ve skor ortalaması 32,0±11,4 olarak bulundu. Primer hastalık grubundaki skor ortalaması daha yüksek olmakla beraber bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,10$). SNOT-22 testinin kronik rinosinüzit semptomlarını sorgulayan ilk 12 soruluk kısmına verilen yanıtlar incelendiğinde ise primer hastalık grubunun ortalaması 23,2±8,7, nüks hastalık

grubunun ortalaması $22,1\pm4,6$ olarak bulundu. Grupların ortalamasının benzer olduğu izlendi. Ölçeğin her bir sorusuna verilen yanıtların ortalamaları **Tablo 6**'da verilmiştir. Primer hastalık grubunda koku ve tat kaybı 4,1 puan ortalaması ile katılımcıların en fazla rahatsızlık duyduğu şikâyet olurken bunu 3,5 puan ortalaması ile burun tıkanıklığı izlemiştir. Nüks hastalık grubunda ise en fazla rahatsızlık duyulan şikâyet 3,5 puan ortalaması ile burun akıntısı olmuştur. İkinci sırada ise 3,37 puan ortalaması ile burun tıkanıklığı gelmiştir. Koku kaybı ise 2,87 ile üçüncü sıradadır. Tüm hastalara bakıldığında koku ve tat kaybı 3,55 puan ortalaması ile en yüksek skoru alan şikâyet olmuştur. Bunu 3,44 puan ile burun tıkanıklığı izlemiştir.

SNOT-22 skorlarına göre hastalık şiddeti gruplandığında hastaların 4'ü (%22) hafif hastalık (SNOT-22 skoru 8-20), 9'u (%50) orta şiddette hastalık (SNOT-22 skoru 21-50), 5'i (%28) ise ağır hastalık (SNOT-22 skoru >50) grubunda yer almıştır.

4.4. Lund-Mackay Evrelemesi Sonuçları

Primer hastalık grubunda LM skoru ortalaması $18,6\pm4,7$, nüks hastalık grubunda ise $16,5\pm5,1$ idi. Gruplar arasında LM skor ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ($p=0,408$). Primer hastalık grubunda en yüksek ve en düşük skorlar sırasıyla 24 ve 10'du. Nüks Hastalık grubunda ise en yüksek ve en düşük puanlar sırasıyla 23 ve 9'du. Sürüntü örneği alınan tarafın LM skorları ise primer hastalık grubunda $9,3\pm2,3$, nüks hastalık grubunda $8,6\pm2,7$ 'ydi. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,696$). Örnek alınan tarafın LM skorlarının anatomik bölgeye göre puanlaması **tablo 7'de** gösterilmiştir.

Tablo 6. SNOT-22 soruları ve yanıtların ortalamaları

Sorular	Primer hastalık Grubu	Nüks Hastalık Grubu	Genel
1. Burnu sümkürme ihtiyacı	2,70	3,25	2,94
2. Burun tıkanıklığı	3,50	3,37	3,44
3. Hapşıрма	1,90	1,75	1,83
4. Burun akıntısı	1,90	3,50	2,61
5. Öksürük	0,90	0,87	0,88
6. Geniz akıntısı	2,10	2,12	2,11
7. Katı burun akıntısı	1,10	1,75	1,39
8. Kulakta dolgunluk	1,90	1,12	1,55
9. Sersemlik hissi	0,80	0,87	0,83
10. Kulak ağrısı	0,60	0,12	0,38
11. Yüzde ağrı ve basınç hissi	1,70	0,50	1,16
12. Koku veya tat alma kaybı	4,10	2,87	3,55
13. Uykuya dalmakta zorluk	2,20	0,87	1,61
14. Gece uyanma	2,40	1,25	1,88
15. İyi gece uykusu yokluğu	2,50	1,50	2,05
16. Yorgun uyanma	2,20	1,25	1,77
17. Yorgunluk	2,10	1,50	1,83
18. Verimliliğin düşmesi	1,50	0,87	1,22
19. Konsantrasyon azalması	1,60	0,50	1,11
20. Sinirlilik, huzursuzluk, asabilik	1,90	0,75	1,38
21. Üzüntülü durum	1,60	0,75	1,22
22. Sıkılganlık	1,40	0,62	1,05

Tablo 7. Örnek alınan tarafta, anatomik bölgelere göre LM skoru

Anatomik Bölge	Primer Hastalık	Nüks Hastalık	Genel
----------------	-----------------	---------------	-------

Maksiller Sinüs	1,30	1,50	1,38
Ön etmoid hücreler	1,70	1,87	1,77
Arka etmoid hücre	1,70	1,37	1,55
Frontal Sinüs	1,60	1,25	1,44
Sfenoid Sinüs	1,20	0,87	1,05
Osteomeatal Ünite	1,80	1,75	1,77

Lund-Mackay skorları ve SNOT-22 skorları arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,058$). Öte yandan LM skorları SNOT-22 ölçeğinin sinüzit semptomlarını içeren ilk 12 soruluk kısmından alınan skorlar ile anlamlı bir korelasyon göstermekteydi ($r=0,583$, $p=0,011$).

4.5. Sigara ve Klinik Özelliklerin İlişkisi

Sigara içen hastalarda SNOT-22 skoru ortalama 38,0, sigara içmeyenlerde ise 37,8 olarak bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p=0,892$). Lund-Mackay skorlarına bakıldığında ise sigara içen hastalarda ortalama skor 15,2 iken sigara içmeyen hastalarda 18,9'dur. Fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,180$).

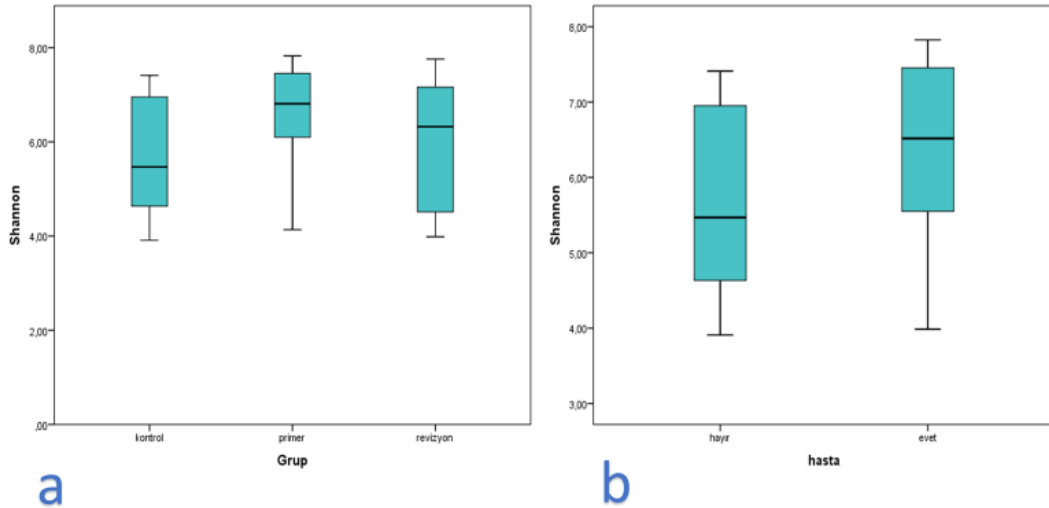
4.6. Mikrobiyom Analiz Sonuçları

4.6.1. Alfa-Çeşitlilik

Shannon Çeşitlilik İndeksi

Shannon çeşitlilik indeksi, bir topluluktaki tür çeşitliliğini karakterize etmek için kullanılan bir indekstir. Yüksek değerler artmış çeşitliliği ifade eder.

Çalışmamızda primer hastalık, nüks hastalık ve kontrol gruplarında Shannon indeksi medyan değerleri sırası ile 6,8; 6,3 ve 5,4'tü. Tüm hasta grup için ise 6,5 idi. Hastalık gruplarında kontrol grubuna göre daha yüksek çeşitlilik izlenmekle beraber bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,190$). **Grafik 2**'de Shannon indeksinin primer hastalık, nüks hastalık ve kontrol grubu arasındaki ve hasta ve sağlıklı bireyler arasındaki karşılaştırması görülmektedir.

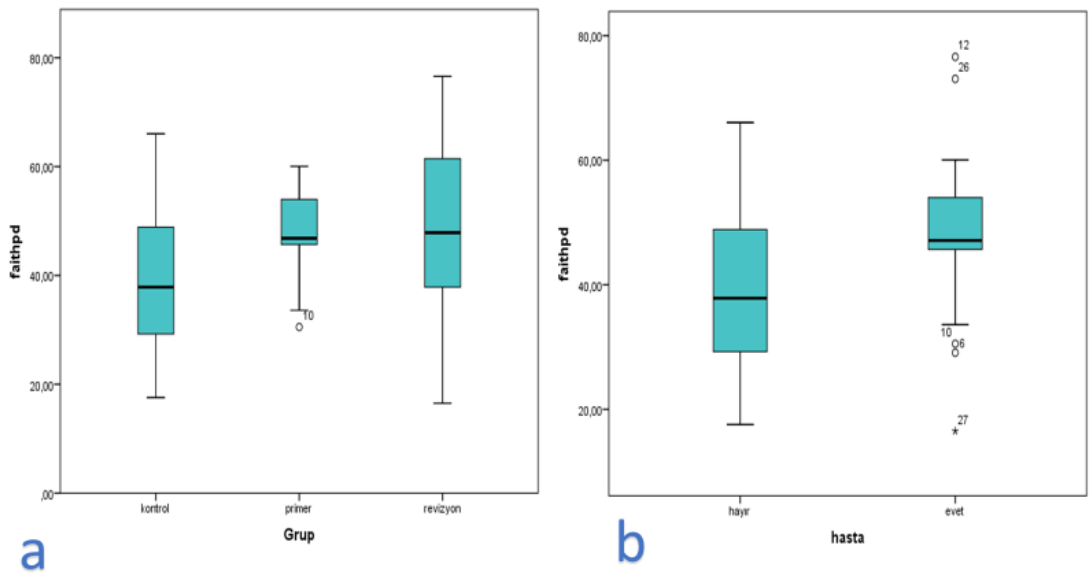


Grafik 2. Shannon indeksi çizgi çubuk grafiği a. primer hastalık, nüks hastalık ve kontrol grubu arasındaki karşılaştırılması b. hasta ve sağlıklı bireyler arasındaki karşılaştırılması

Faith'in Filogenetik Çeşitlilik İndeksi

Filogenetik çeşitlilik, türler arasındaki biyolojik çeşitliliğin filogenetik ağaçlara dayalı olarak ölçülmesidir. En yaygın olarak kullanılan filogenetik çeşitlilik indeksi, Faith'in filogenetik çeşitliliğidir. Faith'in çeşitliliği, takson zenginliğinin filogenetik analogudur. İndeksin yüksekliği takson zenginliğini ifade eder.

Primer hastalık, nüks hastalık ve kontrol gruplarında Faith indeksi medyan değerleri sırası ile 46,8; 47,8 ve 37,8 olarak bulundu. Faith indeksi hasta gruplarında daha yüksek izlenmekle beraber fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,377$) (Grafik 3).

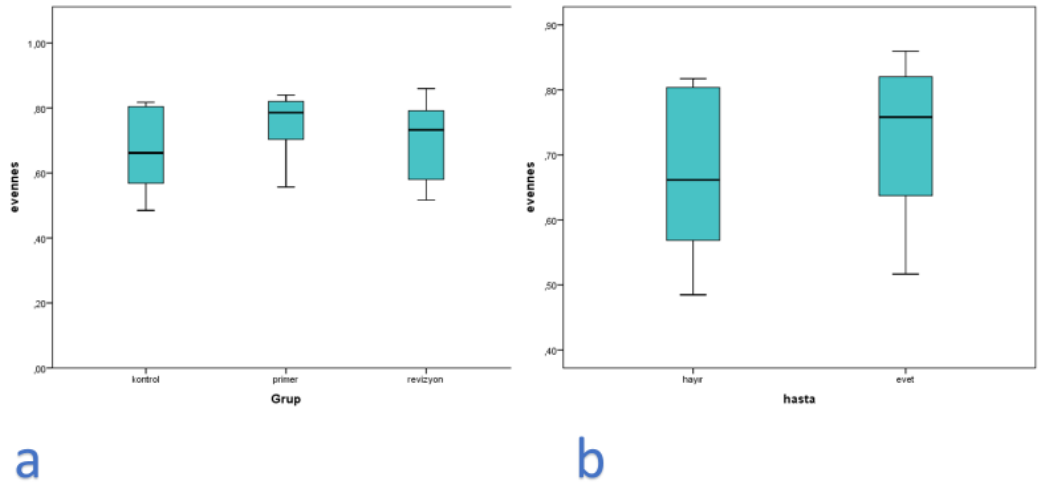


Grafik 3. Faith indeksi kutu çizgi grafiği a. primer hastalık, nüks hastalık ve kontrol grupları arasında karşılaştırılması b. hasta ve sağlıklı bireyler arasında karşılaştırılması

Pielou Eşitlik İndeksi

Türlerin eşitliği, bir ekosistemde yer alan her bir türe ait birey sayısının birbirlerine olan yakınlığını ifade eder. Bir topluluktaki iki farklı türün bulunma sayısı ne kadar birbirine yakın ise grup o kadar eşittir. Eşitlik ölçüsü Pielou'nun eşitlik indeksi ile temsil edilebilir. Yüksek Pielou indeksi değeri, yüksek eşitlik ifade etmektedir.

Çalışmamızdaki primer hastalık, nüks hastalık ve kontrol grubunda Pielou indeksi medyan değerleri sırası ile 0,79; 0,73 ve 0,66 idi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,312$) (**Grafik 4**)



Grafik 4. Pielou indeksi kutu çizgi grafiği a. primer hastalık, nüks hastalık ve kontrol grupları arasında karşılaştırılması b. hasta ve sağlıklı bireyler arasında karşılaştırılması

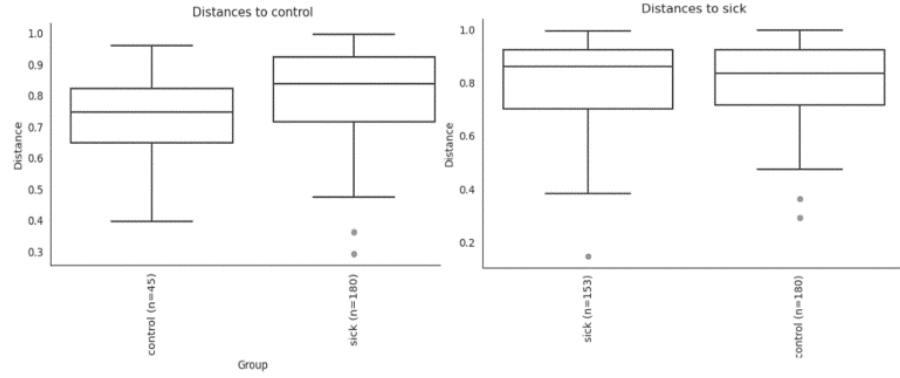
4.6.2. Beta-çeşitlilik

Beta çeşitlilik farklı habitatlar arasındaki çeşitliliği ifade eder. Sayısal olarak ifade edilebilmek için belirli indeksler kullanılır. Bray-Curtis, Jaccard ve Unifrac en sık kullanılan indekslerdir.

Bray-Curtis İndeksi

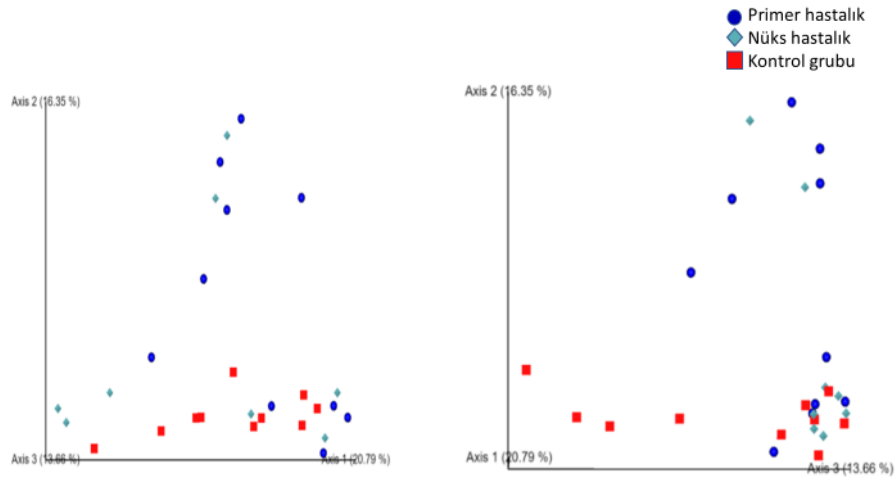
Bray-Curtis farklılık indeksi, her bir sistemdeki türlerin sayılarına dayalı olarak iki farklı sistem arasındaki kompozisyonel farklılığı ölçmek için kullanılan bir istatistiktir. İki örnek arasındaki türlerin bollukları arasındaki farklılık düzeyinde sonuç verir. Bray-Curtis indeksi 0 ile 1 arasında değer alır. 0, iki örneğin aynı kompozisyona sahip olduğu 1 ise iki bölgenin hiçbir türü paylaşmadığı anlamına gelir.

Primer hastalık, nüks hastalık ve kontrol grubu Bray-Curtis indekslerinin PERMANOVA yöntemi ile değerlendirilmesi sonucu kontrol grubu ile primer hastalık grubunun beta çeşitliliği arasında anlamlı fark izlenirken ($p= 0,009$), kontrol-nüks hastalık grupları ve nüks hastalık-primer hastalık grupları arasında anlamlı fark izlenmedi (sırasıyla $p= 0,055$ ve $p= 0,261$). Tüm KRS+NP hastaları kontrol grubu ile kıyaslandığında beta çeşitlilikte anlamlı fark vardı ($p=0,012$) **(Grafik 5)**.



Grafik 5. KRS+NP hastaları ile Kontrol grubunun Bray-Curtis farklılık indeks karşılaştırması.

Bray-Curtis ölçümleri kullanılarak hesaplanan temel koordinat analizi (*Principal coordinate analysis-PCoA*) grafiğinde, örnekler arasındaki uzaklık örneklerin kompozisyon olarak birbirlerinden ne kadar farklı olduğunu ifade etmektedir. Grafikte kontrol grubunu oluşturan örneklerin daha yakın, hasta grubunun ise daha geniş dağılım gösterdiği izlenmektedir (**Grafik 6**).



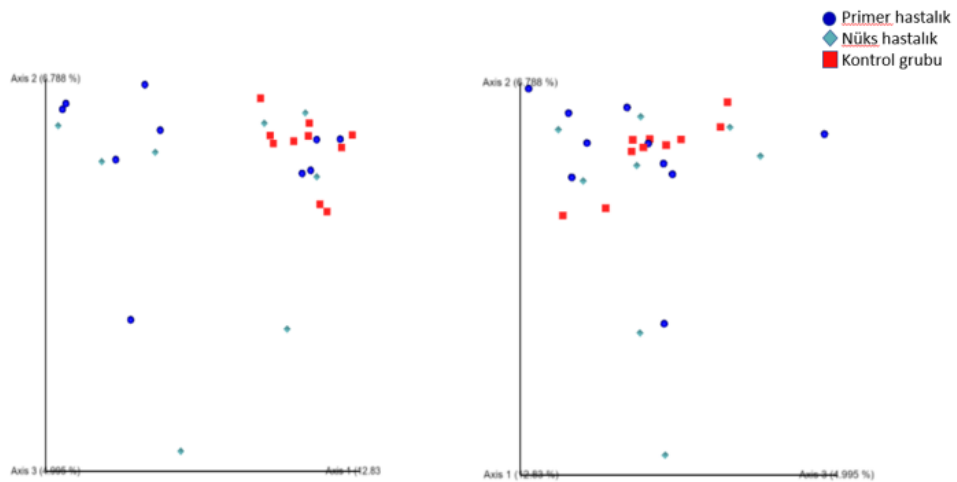
Grafik 6. Bray-Curtis farklılığı indeksine göre hesaplanan PCoA

Jaccard İndeksi

Jaccard indeksi bolluk bilgisine bakılmaksızın türün varlığına veya yokluğuna bağlı olarak örnekler arasındaki mikrobiyal kompozisyon farklılığını ifade eder. İndeks değeri 0-1 arası değişir. 0 iki örneğin aynı kompozisyonda, 1 ise tamamen farklı kompozisyonda olduklarını belirtir.

Primer hastalık, nüks hastalık ve kontrol hastalık grubunun Jaccard indeksleri arasındaki farklılık PERMANOVA ile değerlendirildiğinde, kontrol grubu beta çeşitliliği primer hastalık ve nüks hastalık gruplarından istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı bulunmuştur (sırasıyla $p=0,008$ ve $p=0,005$). Primer hastalık ile nüks hastalık grupları arasında fark izlenmemiştir ($p=0,726$).

Jaccard ölçümleri kullanılarak hesaplanan PCoA grafiğinde, kontrol grubunu oluşturan örneklerin daha yakın, hasta grubunun ise daha geniş dağılım gösterdiği izlenmektedir (**Grafik 7**).



Grafik 7. Jaccard indeksine göre hesaplanan PCoA

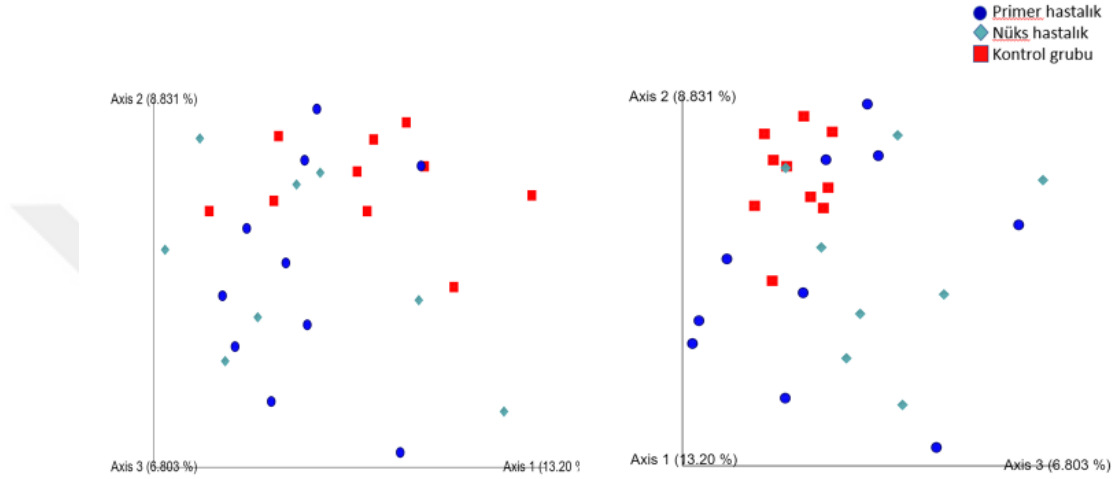
Unifrac İndeksi

UniFrac, biyolojik toplulukları karşılaştırmak için kullanılan bir mesafe metriğidir. İndeks hesaplanırken türler arasındaki filogenetik yakınlık da göz önünde bulundurulması ile Bray-Curtis ve Jaccard indekslerinden ayrılır. Ağırlıklı unifrac indeksi Bray-Curtis farklılık indeksine benzer şekilde türlerin bolluğunu da inceler. Ağırlıksız unifrac indeksi ise Jaccard indeksi ile benzer şekilde türlerin varlığı veya yokluğu ile ilgilenir. İndeks, örnek çiftleri arasında hesaplanır. Örneklerden herhangi birinde bulunan taksonların tamamı bir filogenetik ağaca yerleştirilir. Belirli taksona her iki örnekten birden giden dal "paylaşılan" yalnızca bir örnekte görülen dal "paylaşılmamış" olarak işaretlenir. Paylaşılmamış olanların tüm dallara oranı ile indeks hesaplanır.

Çalışmamızda gruplar arasındaki beta çeşitlilik PERMANOVA ile ağırlıksız unifrac indeksi kullanılarak değerlendirildiğinde kontrol grubunun beta çeşitlilik olarak primer hastalık ve nöks hastalık gruplarından farklı olduğu izlenmiştir (sırası ile $p=0,027$ ve $p=0,023$). Ancak primer hastalık ve nöks hastalık grupları arasında anlamlı fark görülmemiştir ($p=0.608$).

Ağırlıksız unifrac ölçümleri kullanılarak hesaplanan PCoA grafiğinde, Bray-Curtis ve Jaccard indekslerinde de olduğu gibi kontrol grubunu oluşturan

örneklerin kompozisyon olarak daha yakın, hasta grubunun ise daha geniş dağılım gösterdiği izlenmektedir (**Grafik 8**).



Grafik 8. Ağırlıksız unifrac indeksine göre hesaplanan PCoA

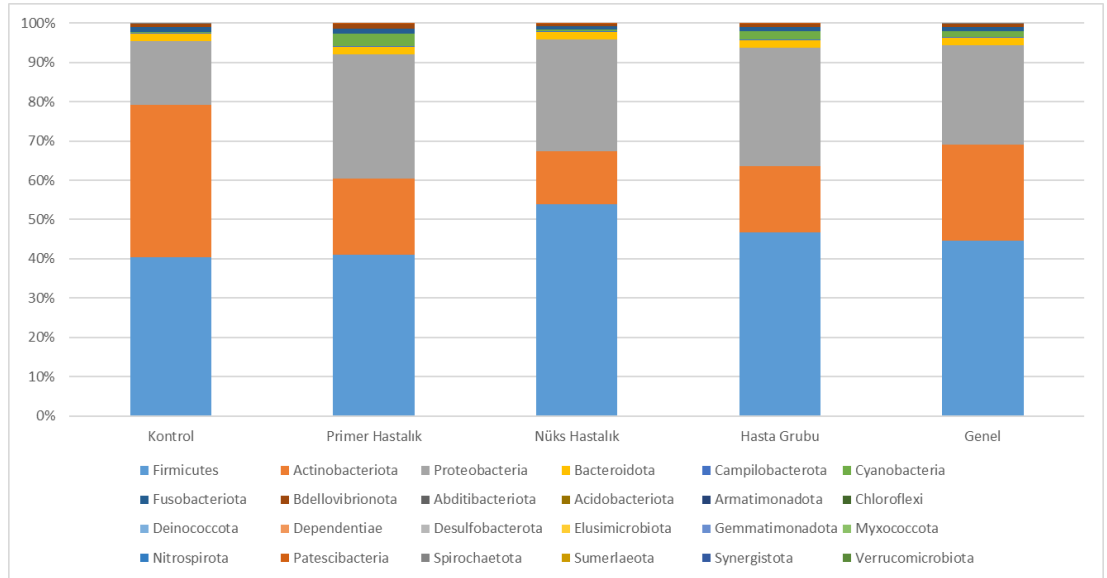
4.6.3. Bakterilerin Şube Dağılımları

Örneklerde toplam 25 farklı şube tespit edildi. Katılımcıların bütününe bakıldığında ortalama rölatif bolluk (mean relative abundance- MRA) göz önünde bulundurularak en baskın üç şube sırası ile Firmicutes (%44,5), Proteobacteria (%25,2), Actinobacteria (%24,6) idi. Kontrol grubu için bu sıralama ile Firmicutes (%40,4), Actinobacteria (%38,7) Proteobacteria (%16,2), primer hastalık grubu için Firmicutes (%41,0), Proteobacteria (%31,5), Actinobacteria (%19,4) ve nüks hastalık grubu için Firmicutes (%53,9), Proteobacteria (%28,6), Actinobacteria (%13,4) idi. Çalışmamızdaki tüm KRS+NP hastaları göz önünde bulundurulduğunda ise sıralama Firmicutes (%46,7), Proteobacteria (%30,2),

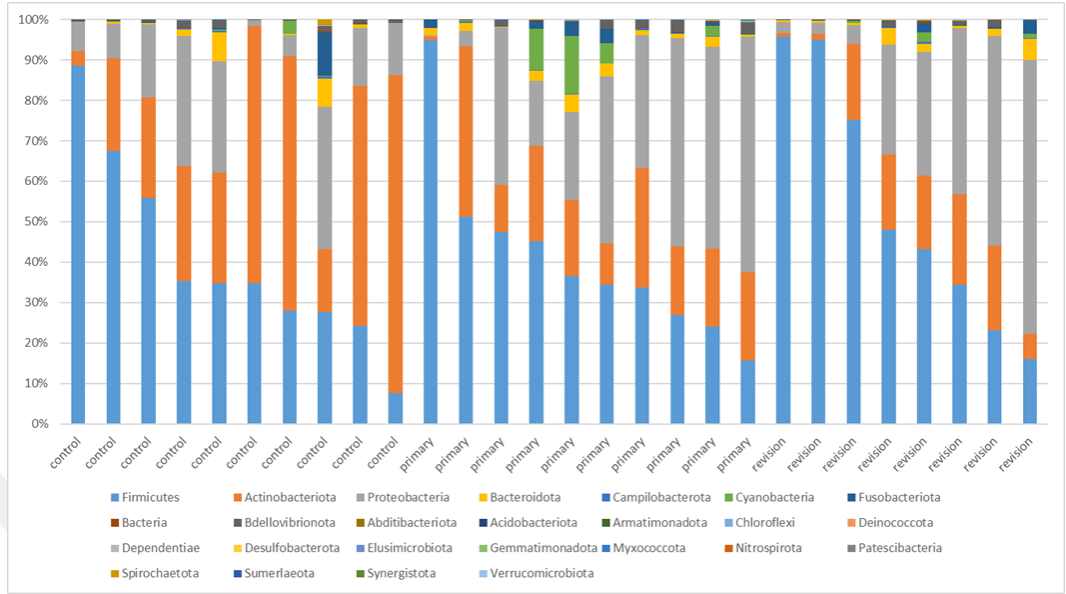
Actinobacteria (%16,7) şeklindeydi (Tablo 8). Grafik 9’da kontrol, primer hastalık, nüks hastalık gruplarının, tüm KRS+NP hastalarının ve tüm örneklerin şube seviyesindeki bakteri MRA dağılımı görülmektedir. Grafik 10’da ise her bir örnek için şube seviyesinde bakterilerin rölatif bollukları yer almaktadır.

Tablo 8. En baskın 8 şubenin gruplara göre ortalama rölatif bolluğu

Şube	Kontrol (%)	Primer Hastalık (%)	Nüks Hastalık (%)	Tüm Hastalar (%)	Genel (%)
Firmicutes	40,4	41,0	53,9	46,7	44,5
Proteobacteria	16,2	31,5	28,6	30,2	25,2
Actinobacteriota	38,7	19,4	13,4	16,7	24,6
Bacteroidota	1,8	1,9	1,9	1,9	1,9
Cyanobacteria	0,4	3,2	0,5	2,0	1,4
Fusobacteriota	1,2	1,3	0,8	1,1	1,1
Bdellovibrionota	0,8	1,1	0,5	0,8	0,8
Campilobacterota	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2

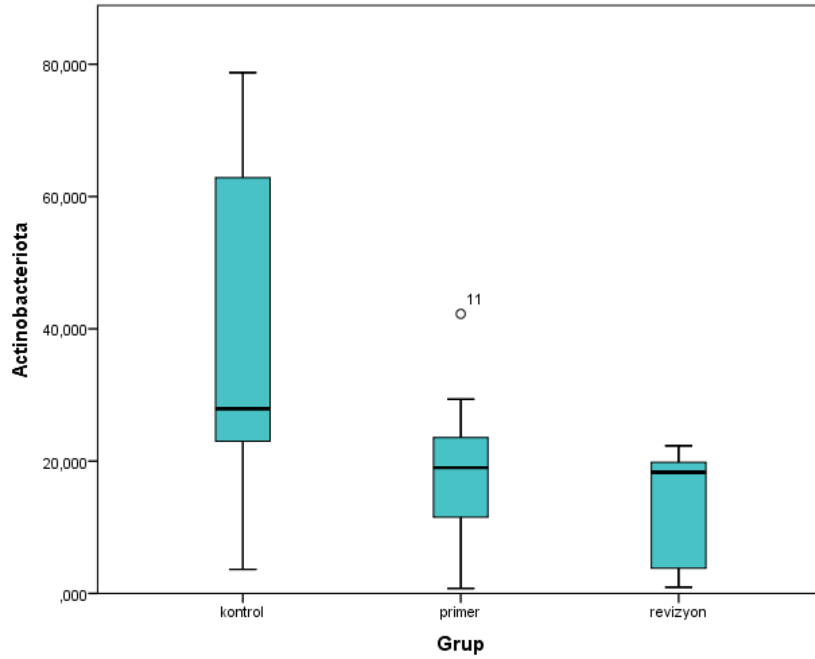


Grafik 9. Şube seviyesindeki bakterilerin gruplara göre ortalama rölatif bollukları.



Grafik 10. Şube seviyesindeki bakterilerin her bir örnek için rölatif bolluğu

Kontrol grubundaki Actinobacteria bolluğu, nüks hastalık ve primer hastalık grubuna göre fazlaydı ($p=0,021$) (**Grafik 11**). Cyanobacteria bolluğu ise primer hastalık grubunda fazlaydı ($p=0,042$).



Grafik 11. Actinobacteria'nın rölatif bolluğunun gruplara göre değişimi

4.6.4. Bakterilerin Cins Dağılımları

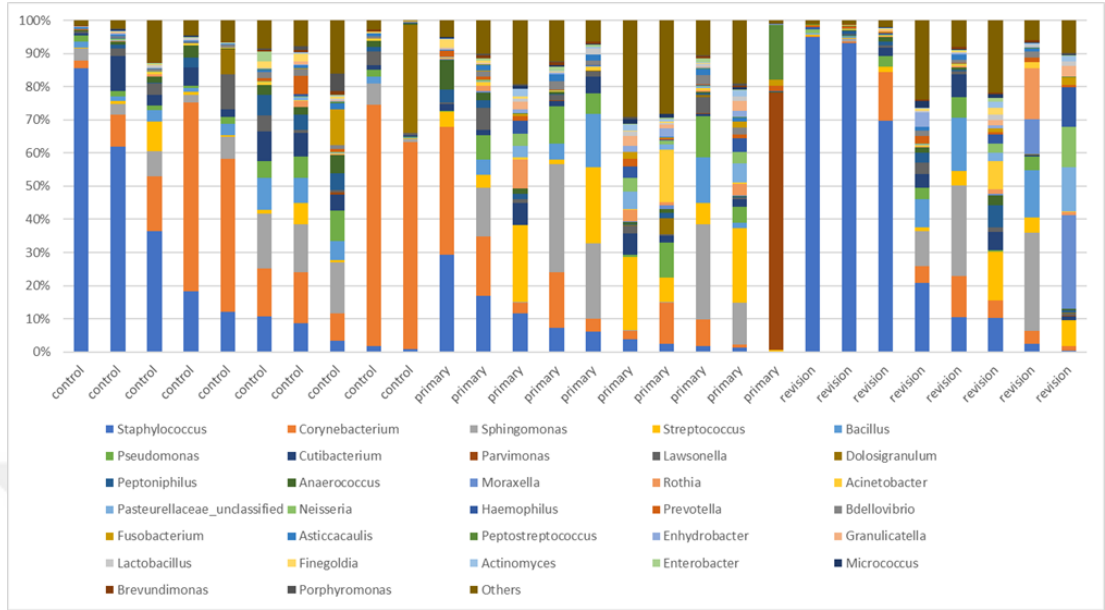
Örneklerde toplam 518 cins tespit edildi. Tüm katılımcılarda MRA'ya göre en baskın beş cins sırası ile *Staphylococcus* (%22,2), *Corynebacterium* (%16,2), *Sphingomonas* (%9,2), *Streptococcus* (%6,1), *Bacillus* (%4,2) idi. Sıralama, kontrol grubunda *Corynebacterium* (%30,5), *Staphylococcus* (%24,0), *Sphingomonas* (%7,7), *Cutibacterium (Propionibacterium)* (%4,5) ve *Dolosigranulum* (%4), primer hastalık grubunda *Streptococcus* (%11,5), *Sphingomonas* (%11,2), *Corynebacterium* (%10,5), *Staphylococcus* (%8,1) ve *Parvimonas* (%7,8), nüks hastalık grubunda *Staphylococcus* (%37,8), *Sphingomonas* (%8,6), *Corynebacterium* (%5,4), *Bacillus* (%4,9), *Streptococcus* (%4,3) şeklindeydi. Tüm KRS+NP hastaları göz önünde bulundurulduğunda MRA, *Staphylococcus* (%21,3), *Sphingomonas* (%10,0), *Streptococcus* (%8,3), *Corynebacterium* (%8,2), *Bacillus* (%4,5) sırasıyla idi. Tüm katılımcılar göz önünde bulundurularak hesaplanan MRA'sı en yüksek olan 31 cinsin gruplara göre MRA dağılımları ve gruplardaki prevalansları **Tablo 9**'da özetlemiştir. **Grafik 12**'de her bir örnek için cins seviyesinde bakterilerin rölatif bollukları, **Grafik 13**'te ise bakteri MRA'larının gruplara göre dağılımı görülmektedir.

Corynebacterium rölatif bolluğu kontrol grubunda hastalara göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0,007$). *Streptococcus*, *Moraxella*, *Prevotella*, *Pasteurellaceae unclassified*, *Peptostreptococcus* ve *Micrococcus* ise hasta gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bollukta izlenmiştir (sırasıyla $p=0,025$, $p=0,015$, $p=0,040$, $p=0,001$, $p=0,045$, $p=0,021$). *Neisseria* rölatif bolluğu hastalarda kontrol grubuna göre yüksekti ($p=0,051$). *Staphylococcus*

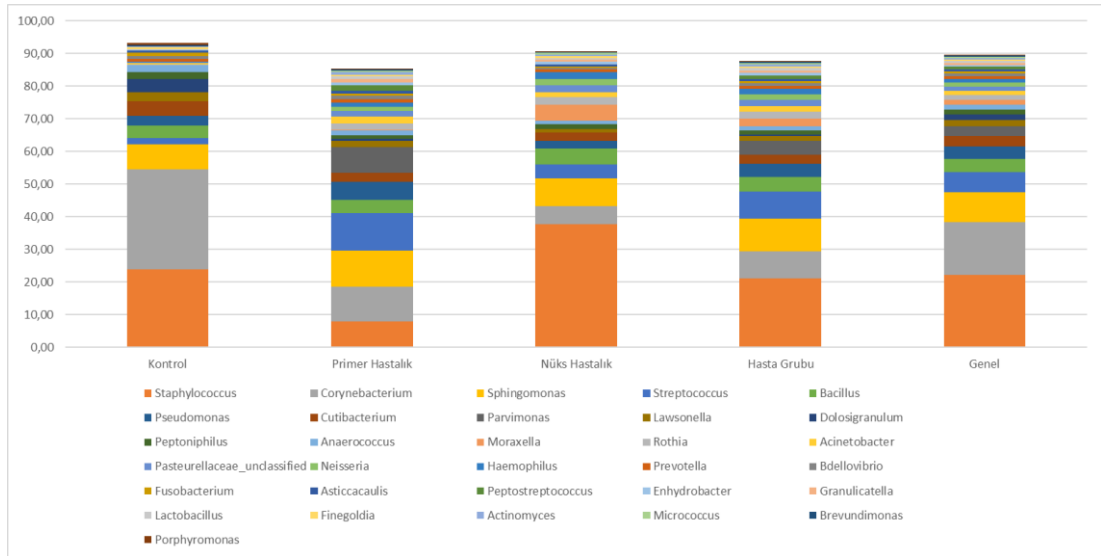
rölatif bolluğu nüks hastalık grubunda daha fazla olmakla beraber fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,203) (Grafik 14).

Tablo 9. Cinslerin gruplara göre MRA ve Prevalansı

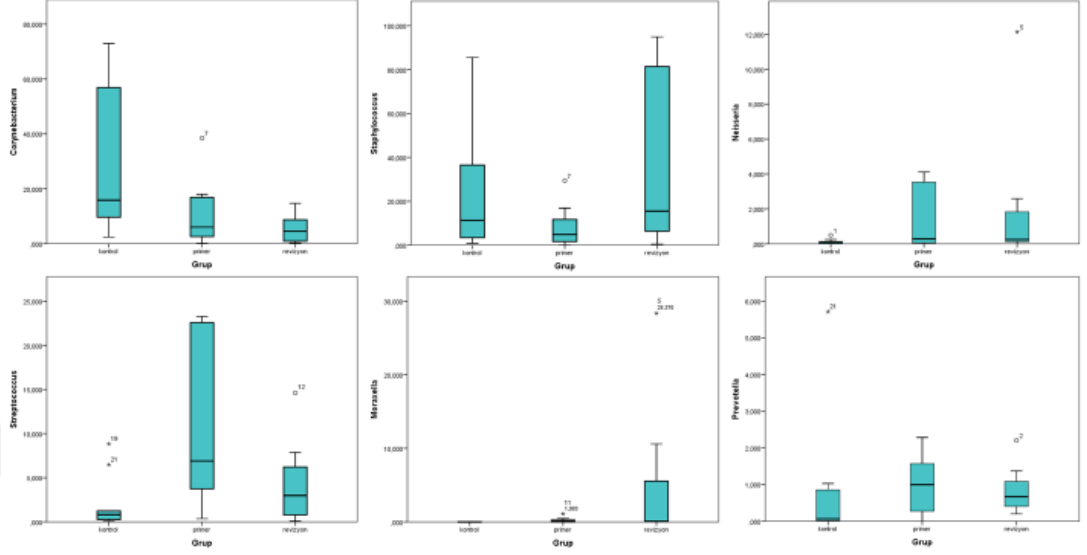
Cins	Kontrol		Primer Hastalık		Nüks Hastalık		Tüm Hastalar		Genel	
	MRA (%)	Prevalans (%)	MRA (%)	Prevalans (%)	MRA (%)	Prevalans (%)	MRA (%)	Prevalans (%)	MRA (%)	Prevalans (%)
<i>Staphylococcus</i>	24,0	100,0	8,1	100,0	37,8	100,0	21,3	100,0	22,2	100,0
<i>Corynebacterium</i>	30,5	100,0	10,5	100,0	5,4	100,0	8,2	100,0	16,2	100,0
<i>Sphingomonas</i>	7,7	100,0	11,2	90,0	8,6	87,5	10,0	88,9	9,2	92,9
<i>Streptococcus</i>	2,0	100,0	11,5	100,0	4,3	100,0	8,3	100,0	6,1	96,4
<i>Bacillus</i>	3,6	100,0	4,1	50,0	4,9	50,0	4,5	50,0	4,2	67,9
<i>Pseudomonas</i>	3,0	100,0	5,4	90,0	2,2	87,5	4,0	88,9	3,6	92,9
<i>Cutibacterium</i>	4,5	100,0	2,9	100,0	2,6	100,0	2,7	100,0	3,4	100,0
<i>Parvimonas</i>	0,1	30,0	7,8	60,0	0,0	50,0	4,3	55,6	2,8	46,4
<i>Lawsonella</i>	2,8	100,0	2,0	100,0	0,9	87,5	1,5	94,4	2,0	96,4
<i>Dolosigranulum</i>	4,0	50,0	0,6	50,0	0,0	50,0	0,3	50,0	1,7	50,0
<i>Peptoniphilus</i>	2,2	90,0	1,1	90,0	1,6	87,5	1,3	88,9	1,6	89,3
<i>Anaerococcus</i>	2,0	100,0	1,6	90,0	0,9	87,5	1,3	88,9	1,5	92,9
<i>Moraxella</i>	0,0	30,0	0,2	70,0	5,0	75,0	2,3	72,2	1,5	57,1
<i>Rothia</i>	0,3	80,0	1,9	90,0	2,3	100,0	2,1	94,4	1,5	89,3
<i>Acinetobacter</i>	0,4	100,0	2,1	90,0	1,4	90,0	1,8	88,9	1,3	92,9
<i>Pasteurellaceae_ unclassified</i>	0,1	60,0	1,7	100,0	2,1	100,0	1,9	100,0	1,3	85,7
<i>Neisseria</i>	0,1	90,0	1,3	90,0	2,1	87,5	1,7	88,9	1,1	89,3
<i>Haemophilus</i>	0,1	90,0	1,2	100,0	2,0	62,5	1,6	83,3	1,1	85,7
<i>Prevotella</i>	0,8	90,0	1,0	90,0	0,8	100,0	0,9	94,4	0,9	92,9
<i>Bdellovibrio</i>	0,8	100,0	1,1	80,0	0,5	50,0	0,8	66,7	0,8	78,6
<i>Fusobacterium</i>	1,1	60,0	0,7	90,0	0,5	75,0	0,6	83,3	0,8	75,0
<i>Asticcacaulis</i>	0,6	100,0	0,9	70,0	0,5	62,5	0,7	66,7	0,7	78,6
<i>Peptostreptococcus</i>	0,1	30,0	1,7	60,0	0,1	100,0	1,0	77,8	0,7	60,7
<i>Enhydrobacter</i>	0,2	90,0	0,8	80,0	0,8	100,0	0,8	88,9	0,6	89,3
<i>Granulicatella</i>	0,1	50,0	1,0	90,0	0,6	50,0	0,8	72,2	0,6	64,3
<i>Lactobacillus</i>	0,2	90,0	0,8	90,0	0,6	100,0	0,7	94,4	0,5	92,9
<i>Finegoldia</i>	0,6	90,0	0,5	100,0	0,5	75,0	0,5	88,9	0,5	89,3
<i>Actinomyces</i>	0,1	100,0	0,8	100,0	0,5	75,0	0,7	88,9	0,5	92,9
<i>Micrococcus</i>	0,1	70,0	0,5	90,0	0,5	75,0	0,5	83,3	0,4	78,6
<i>Brevundimonas</i>	0,4	100,0	0,4	60,0	0,3	87,5	0,3	62,2	0,4	82,1
<i>Porphyromonas</i>	0,7	60,0	0,2	90,0	0,1	75,0	0,2	83,3	0,4	75,0



Grafik 12. Cins seviyesindeki bakterilerin her bir örnek için rölatif bollukları



Grafik 13. Cins seviyesindeki bakterilerin gruplara göre MRA'ları



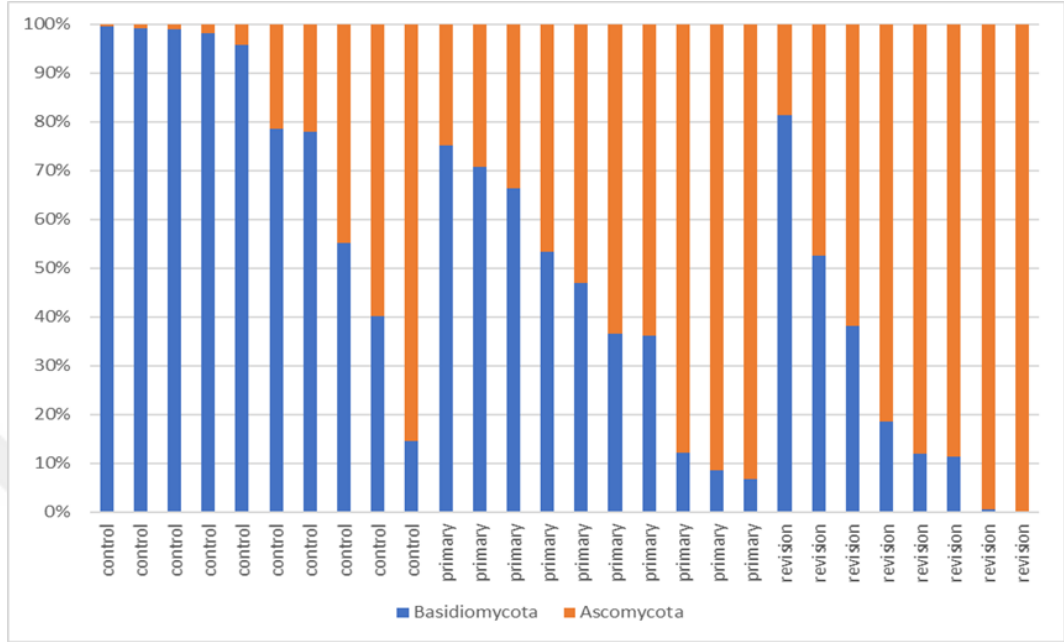
Grafik 14. Corynebacterium, Streptococcus, Moraxella, Neisseria, Prevotella, Staphylococcus rölatif bolluğunun gruplara göre değişimi

Eşlik eden astımı olmayan hastalarda astımı olanlara göre *Porphyromonas* cinsi bakterilerde anlamlı bir fazlalık tespit edilmiştir ($p=0,035$).

Sigara içiciliğinin cins dağılımına etkisine bakıldığında ise sigara içen grupta *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Finegoldia* cinsi bakterilerin sigara içmeyen gruba göre daha yüksek MRA gösterdikleri görülmüştür (sırasıyla $p=0,012$, $p=0,045$, $p=0,021$).

4.6.5. Mantarların Şube Dağılımı

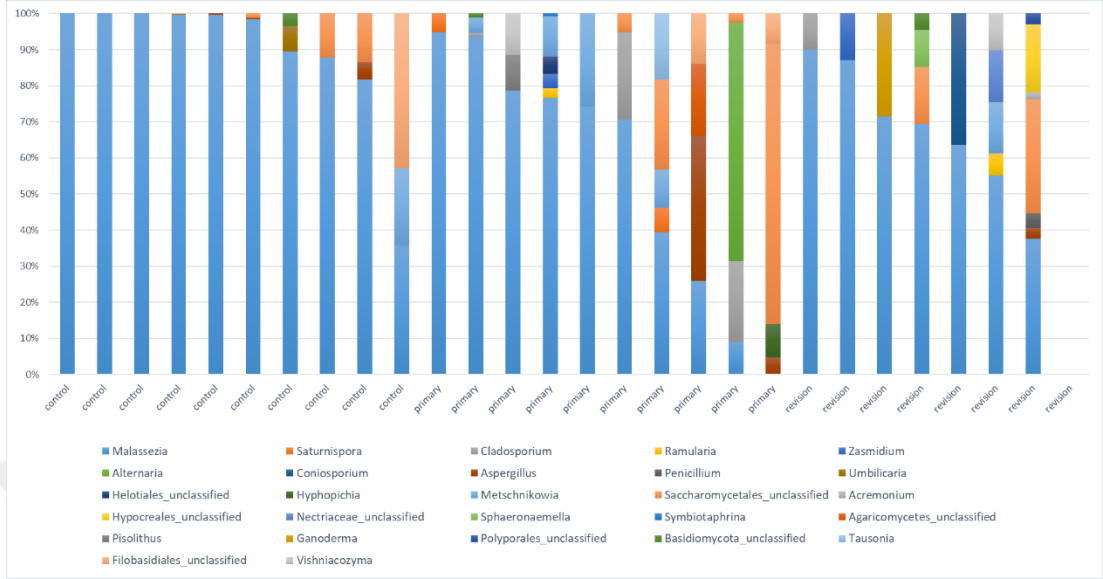
Örneklerde tespit edilen mantar şubeleri Basidiomycota ve Ascomycota idi. Basidiomycota MRA'sı kontrol grubunda %75,8, primer hastalık grubunda %41,2, nüks hastalık grubunda %26,8 idi. Her bir örnek için mantar şube dağılımı **Grafik 15**'te görülmektedir.



Grafik 15. Her bir örnek için mantar şube dağılımı

4.6.6. Mantarların Cins Dağılımı

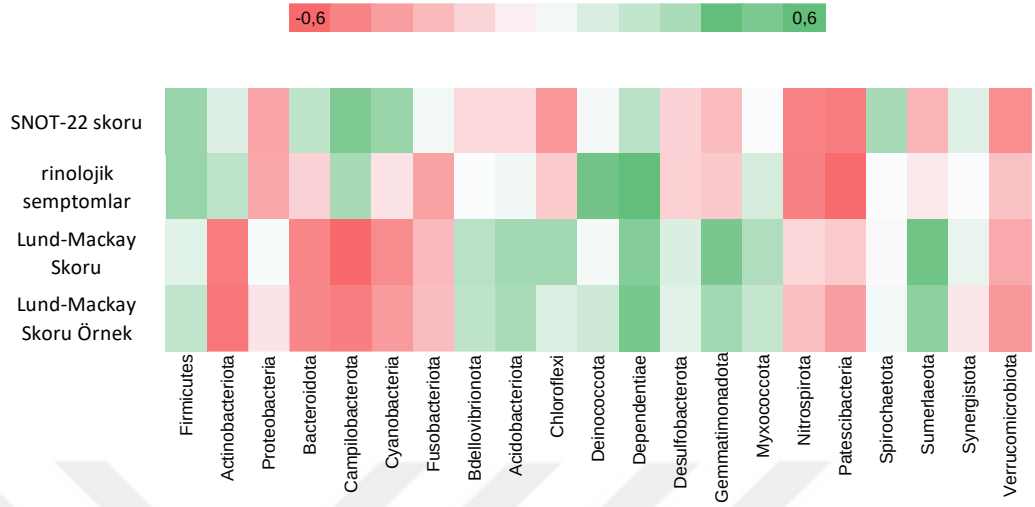
Örneklerde 29 mantar cinsi saptandı. Tüm gruplarda baskın cins *Malassezia* idi. MRA'sı kontrol grubunda %89,2, primer hastalık grubunda %56,3, nüks hastalık grubunda %59,3 olarak bulundu. Kontrol grubundaki MRA'sı hasta gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti ($p=0,001$). Örneklerin birinde cins seviyesinde mantar saptanmadı. **Grafik 16'**da her bir örnek için cins seviyesindeki mantarların rölatif bollukları izlenmektedir.



Grafik 16. Cins seviyesindeki mantarların her bir örnek için rölatif bollukları

4.6.7. Bakteri Şubeleri ile Hastalık Şiddeti ilişkisi

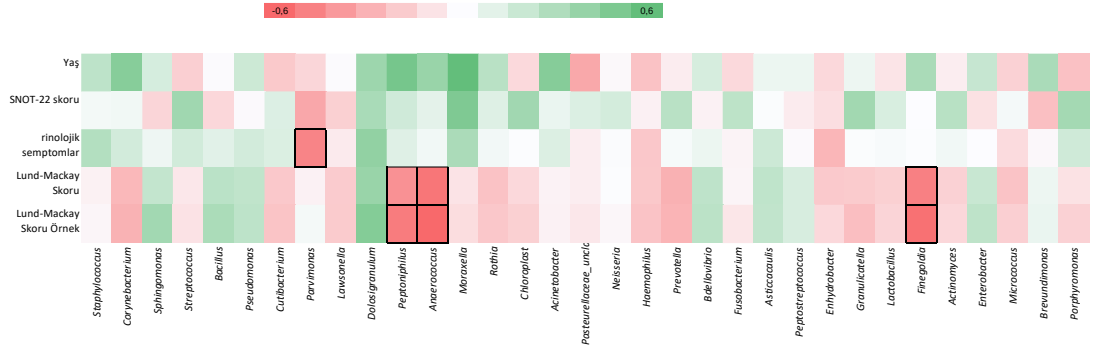
Firmicutes'in rölatif baskınlığının SNOT-22 ve Lund Mackay skorları ile pozitif korelasyon gösterdiği izlenmiştir. Proteobacteria şubesi ise daha düşük SNOT-22 ve Lund Mackay skorları ile ilişkilidir. Ancak bu korelasyonlar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Şube seviyesindeki bakterilerin rölatif bollukları ile SNOT-22 ve Lund Mackay skorları arasındaki korelasyon Spearman Korelasyon katsayısı kullanılarak düzenlenen ısı haritası ile **Grafik 17'**de verilmiştir.



Grafik 17. Şube seviyesindeki bakteriler ile SNOT-22 ve Lund Mackay skorlarının korelasyon ısı haritası. (Lund Mackay Skoru örnek: örnek alınan tarafın skorunu ifade etmektedir)

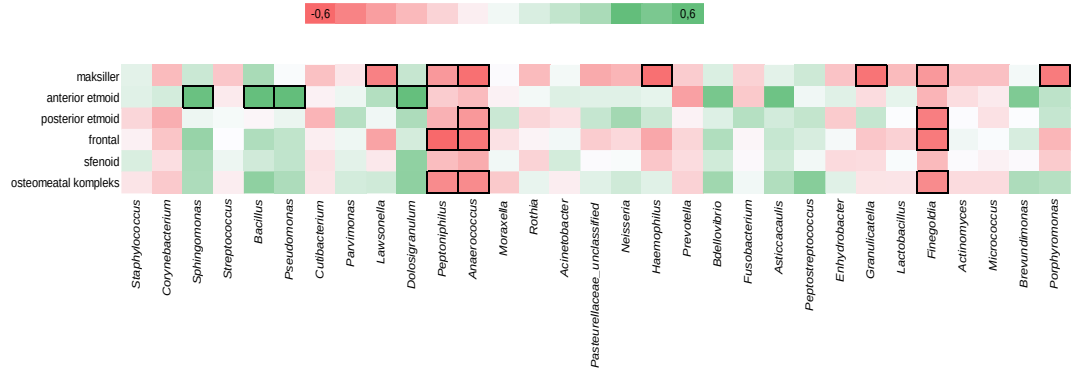
4.6.8. Bakteri Cinsleri ile Hastalık Şiddeti ilişkisi

Peptoniphilus, *Anaerococcus* ve *Finegoldia*'nın rölatif bolluğu ile Lund Mackay skorları arasında negatif korelasyon izlenmiştir (sırasıyla $p=0,005$, $p=0,001$, $p=0,002$). *Parvimonas* ise SNOT-22 ölçeğinin rinolojik semptomları sorgulayan ilk 12 maddesinden alınan toplam skorla negatif korelasyon göstermiştir ($p=0,01$). Cins seviyesindeki bakterilerin rölatif bollukları ile SNOT-22 ve Lund Mackay skorları arasındaki korelasyonu Spearman korelasyon katsayısı kullanılarak düzenlenen ısı haritası ile **Grafik 18**'de gösterilmektedir.



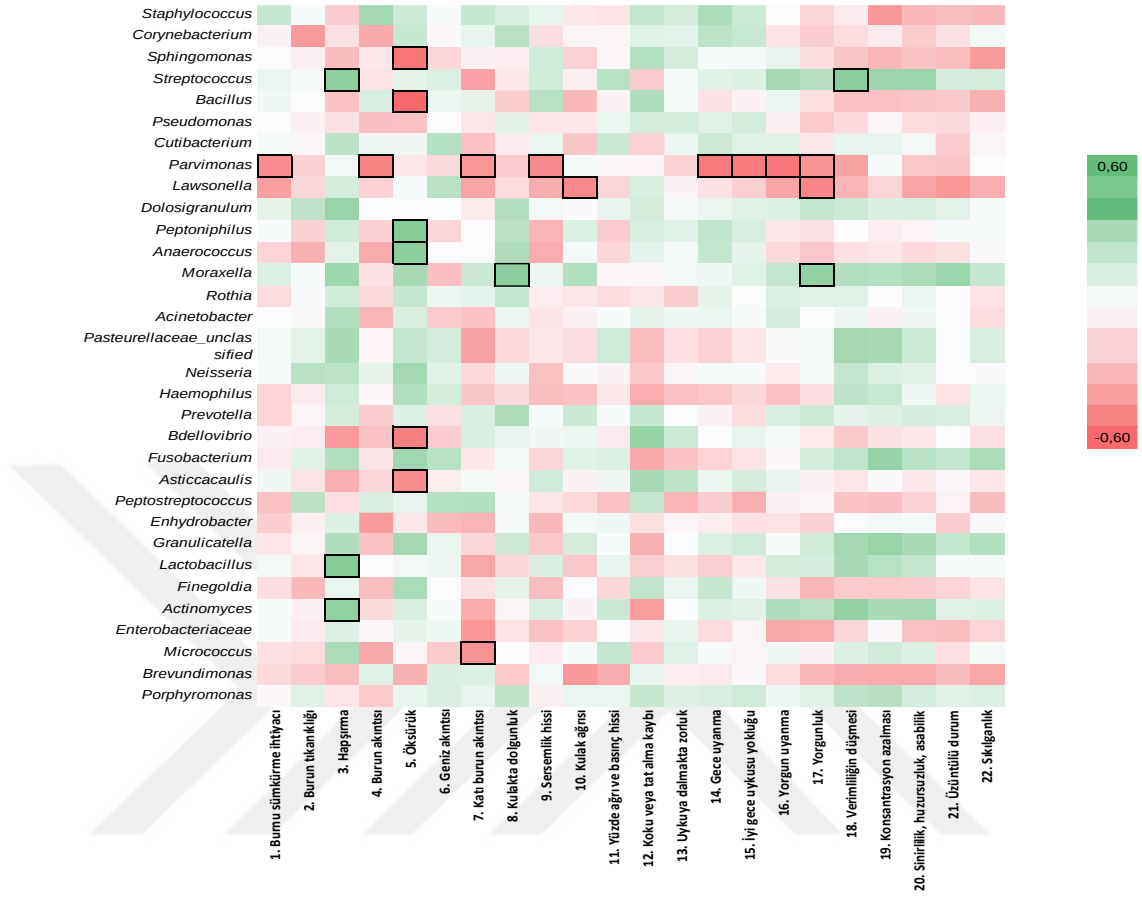
Grafik 18. Cins seviyesindeki bakterilerin rölatif bollukları ile yaş, SNOT-22 ve Lund Mackay skorlarının korelasyonu. İşaretler istatistiksel olarak anlamlı Spearman korelasyonunu ifade etmektedir.

Lund Mackay skorlamasında kullan sinüs opasifikasyon dereceleri ile bakteri cinslerinin rölatif bollukları arasındaki korelasyona bakıldığında *Peptoniphilus*, *Anaerococcus*, *Granulicatella*, *Porphyromonas*, *Finegoldia* ve *Lawsonella*'nın azalmış maksiller sinüs opasifikasyonu ile ilişkili olduğu izlenmiştir ($p<0,05$). *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Dolosigranulum* artmış anterior etmoid opasifikasyonu ile ilişkili bulunmuştur ($p<0,05$). *Finegoldia* ek olarak frontal sinüs, posterior etmoid ve osteomeatal ünite opasifikasyonu ile negatif korelasyon göstermiştir ($p<0,05$). *Peptoniphilus* ve *Anaerococcus* ise frontal sinüs ve osteomeatal ünite opasifikasyonu ile negatif olarak korele bulunmuştur ($p<0,05$). Diğer cinslerin sinüs opasifikasyonları ile korelasyonları Spearman korelasyon katsayısı kullanılarak düzenlenen ısı haritası ile **Grafik 19'**da gösterilmiştir.



Grafik 19. Cins düzeyinde bakterilerin rölatif bollukları ile sinüs opasifikasyonlarının korelasyonu. İşaretler istatistiksel olarak anlamlı korelasyonları göstermektedir

Hastaların SNOT-22 ölçeğindeki her bir madde için verdikleri puanların bakteri cinslerinin rölatif bollukları ile korelasyonu incelenerek, cinslerin rinolojik semptomlar ve hayat kalitesi üzerine etkisi detaylandırılmıştır. *Parvimonas* rölatif bolluğu “burun sümkürme ihtiyacı”, “burun akıntısı”, “katı burun akıntısı”, “sersemlik”, “gece uyanma”, “iyi gece uykusu yokluğu”, “yorgun uyanma”, “yorgunluk” skorları ile negatif korelasyon göstermiştir ($p<0,05$). *Peptoniphilus* ve *Anaerococcus* artmış; *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Bdellovibrio*, *Asticcacaulis* ise azalmış “öksürük” skorları ile ilişkili bulunmuştur ($p<0,05$). Cins düzeyindeki bakterilerin rölatif bollukları ile SNOT-22 madde skoru korelasyonları Spearman Korelasyon katsayısı kullanılarak düzenlenen ısı haritası ile **Grafik 20**'de gösterilmiştir.



Grafik 20. SNOT-22 maddeleri ile cins düzeyindeki bakterilerin rölatif bolluk korelasyon grafiği. İşaretler istatistiksel olarak anlamlı korelasyonları göstermektedir

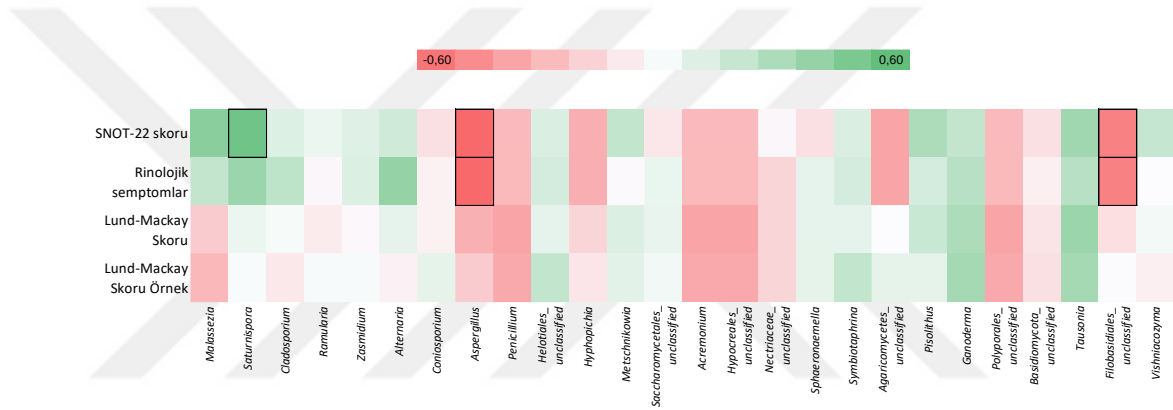
Alfa çeşitliliği indeksleri ile SNOT-22 ve LM skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon yoktu. Spearman korelasyon katsayıları **Grafik 21**'de gösterilmiştir.

	SNOT-22	Rinolojik semptomlar	LMS-örnek tarafı	LMS bilateral
faithpd	-,412	-,415	-,357	-,452
pielou	-,121	-,200	-,192	-,255
Shannon	-,135	-,251	-,218	-,259

Grafik 21. Hayat kalitesi ve BT ölçekleri ile alfa çeşitlilik indekslerinin korelasyonu.

4.6.9. Mantar Cinsleri ile Hastalık Şiddeti ilişkisi

Aspergillus rölatif bolluğu SNOT-22 skorları ile negatif korelasyon göstermiştir ($p<0,05$). *Saturnispora* rölatif bolluğu ise SNOT-22 skorları ile pozitif korelasyon göstermiştir ($p<0,05$). Mantar cinslerinin rölatif bolluklarının Lund Mackay ve SNOT-22 skorları ile korelasyonu Spearman korelasyon katsayısı kullanılarak düzenlenen ısı haritası ile **Grafik 22**'de gösterilmiştir.

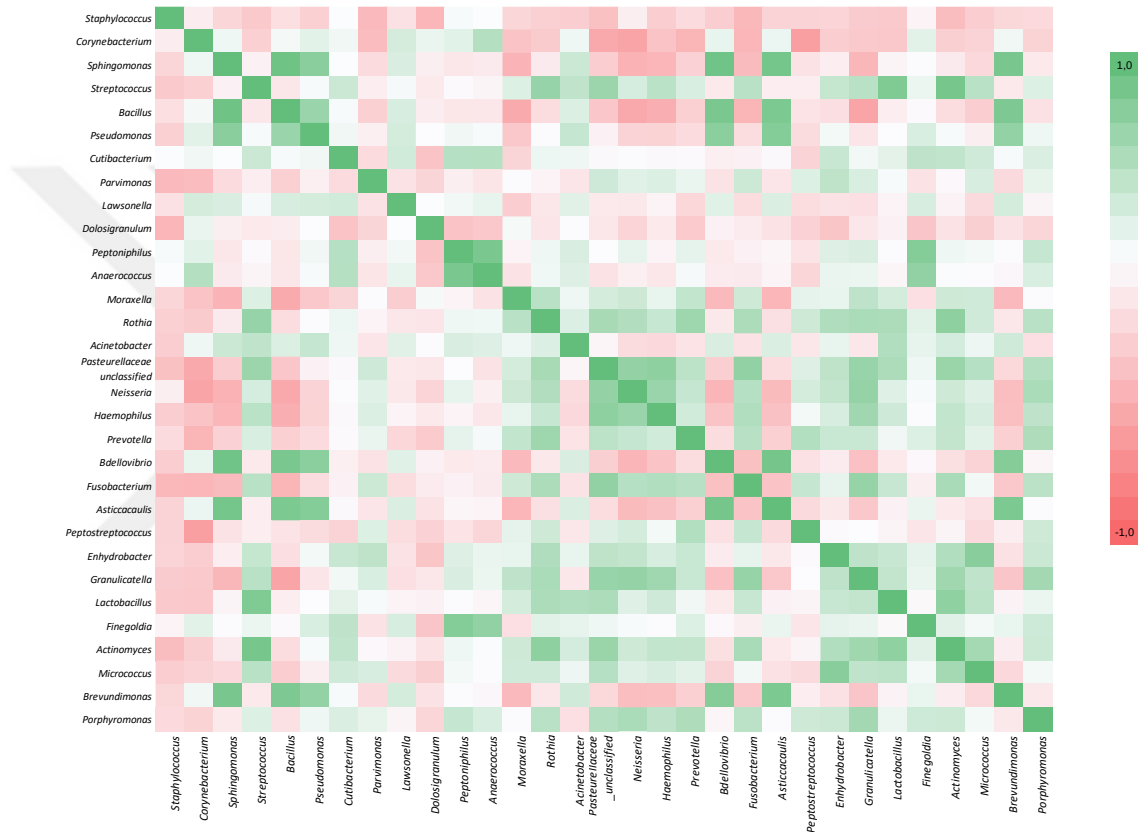


Grafik 22. Cins düzeyinde mantarların rölatif bollukları ile SNOT-22 ve Lund Mackay skorlarının korelasyonu. İşaretler istatistiksel olarak anlamlı korelasyonları göstermektedir.

4.6.10. Cins Düzeyinde Bakterilerin Korelasyonu

Bakterilerin OTU sayılarının diğer bakteriler ile korelasyonu cins düzeyinde incelendi. *Staphylococcus*; *Dolosigranulum* ve *Fusobacterium* ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde negatif korelasyon göstermiştir ($p<0,05$). *Corynebacterium*; *Lawsonella* ve *Anaerococcus* ile pozitif, *Neisseria*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Pasteurellaceae_unclassified* ve *Peptostreptococcus* ile negatif korelasyona sahipti ($p<0,05$). *Sphingomonas*; *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* ile pozitif, *Neisseria*, *Haemophilus* ve *Moraxella* ile negatif korelasyon içerisinde olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). *Streptococcus*; *Rothia*, *Acinetobacter*, *Neisseria*,

Haemophilus ile negatif korelasyon göstermiştir ($p<0,05$). Cins düzeyinde bakterilerin birbirleri ile olan korelasyonu Spearman korelasyon katsayısı kullanılarak düzenlenen ısı haritası ile **Grafik 23**'te gösterilmiştir.

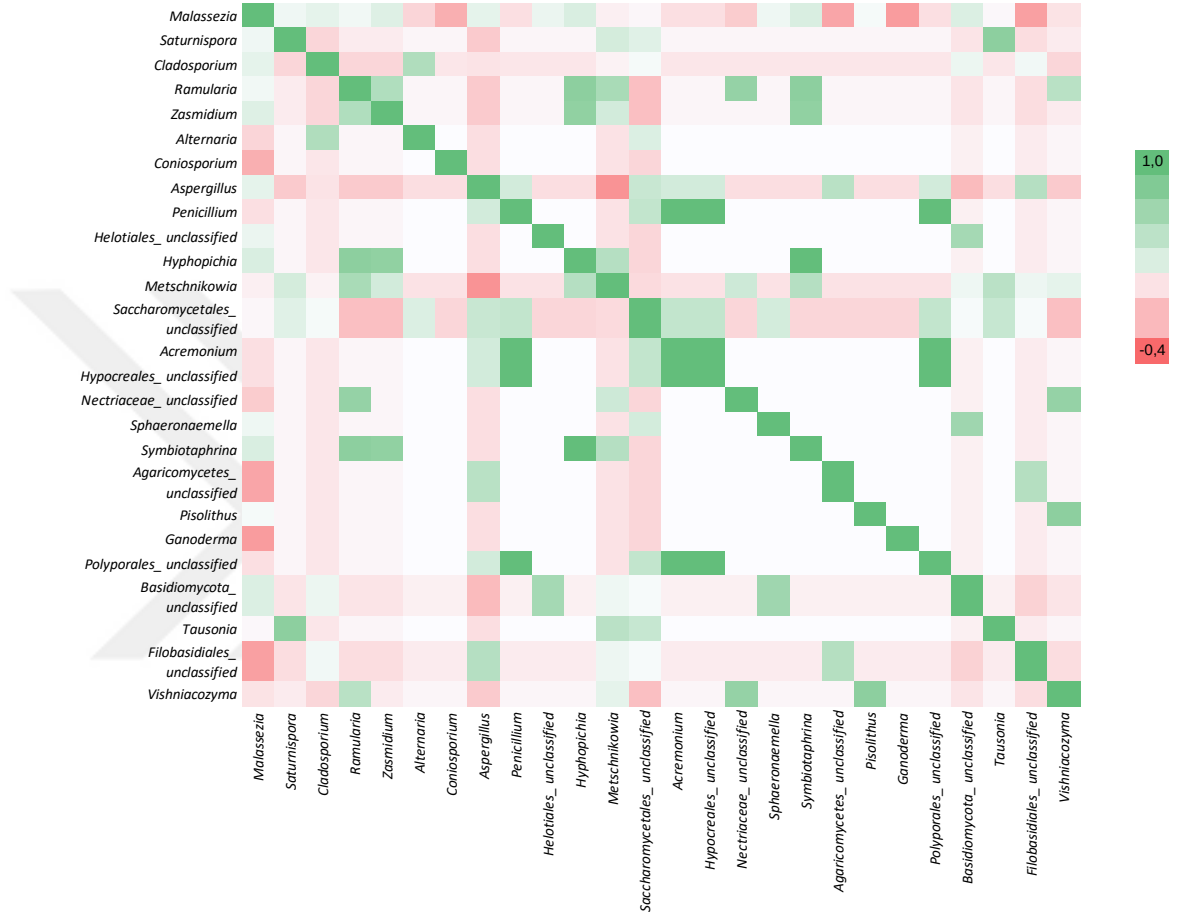


Grafik 23. Cins seviyesindeki bakterilerin OTU sayılarının korelasyonu

4.6.11. Cins Düzeyinde Mantarların Korelasyonu

Cins düzeyinde mantarların birbirleri ile olan korelasyonuna bakıldığında, *Cladosporium*, *Alternaria* ile pozitif korelasyon göstermiştir ($p<0,05$). *Ramularia*; *Zasmidium*, *Metschnikowia* ve *Vishniacozyma* ile pozitif korelasyon içerisinde olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Cins düzeyindeki mantarların korelasyonu

Spearman Korelasyon katsayısı kullanılarak düzenlenen ısı haritası ile **Grafik 24**'te gösterilmiştir.

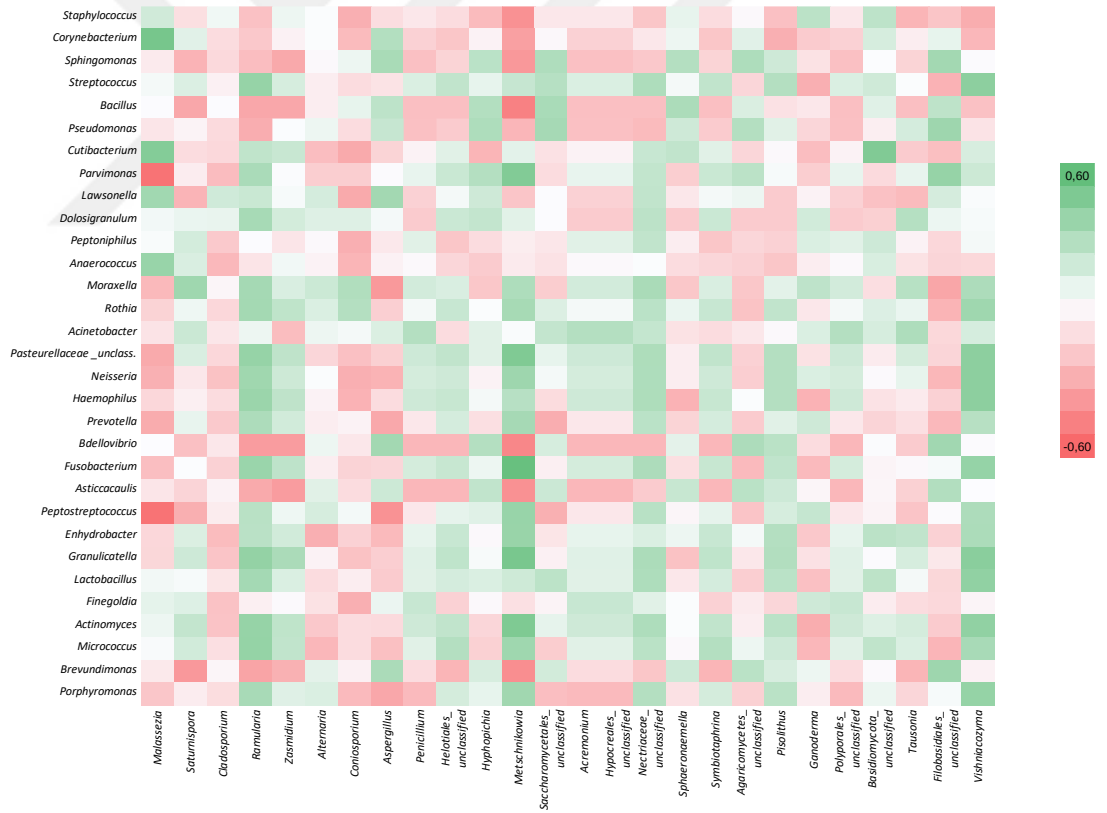


Grafik 24. Cins seviyesinde Mantarların OTU sayısı korelasyonu

4.6.12. Cins Düzeyinde Mantar-Bakteri Korelasyonu

Cins düzeyinde mantarların ve bakterilerin OTU sayıları arasındaki korelasyon Spearman korelasyon katsayısı kullanılarak araştırılmıştır. *Malassezia*; *Corynebacterium*, *Cutibacterium* ve *Anaerococcus* ile pozitif, *Parvimonas* ve *Peptostreptococcus* ile negatif korelasyon göstermiştir ($p < 0,05$). *Aspergillus* cinsi mantarlar *Moraxella* ve *Peptostreptococcus* ile negatif korelasyon içerisinde

olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$). *Ramularia*; *Streptococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Micrococcus*, *Fusobacterium* ve *Granulicatella* ile pozitif, *Bdellovibrio* ile negatif korelasyon göstermiştir ($p < 0,05$). *Metschnikowia* cinsi mantarlar *Parvimonas*, *Neisseria*, *Fusobacterium* ve *Peptostreptococcus* ile pozitif, *Staphylococcus*, *Sphingomonas* ve *Bacillus* ile negatif korelasyon göstermiştir ($p < 0,05$). **Grafik 25**'te cins düzeyinde bakteri ve mantarların OTU sayıları korelasyonu Spearman korelasyon katsayıları ile oluşturulmuş ısı haritasında gösterilmiştir.



Grafik 25. Cins düzeyinde mantar ve bakterilerin OTU sayıları korelasyonu

5. TARTIŞMA

Rinosinüzitler burun ve paranasal sinüs mukozasının inflamasyonu ile seyreden hastalık grubudur. Kronik rinosinüzit, Kulak-Burun-Boğaz hastalıkları hekimliği pratiğinde sık karşılaşılan, hastaların hayat kalitesini olumsuz etkileyen ve toplum için ekonomik yük oluşturan önemli bir hastalıktır. En az bir tanesi burun tıkanıklığı/konjesyonu ya da burun akıntısı olmak üzere; burun tıkanıklığı, burun akıntısı, yüz ağrısı, yüzde basınç hissi ve koku kaybı semptomlarından iki veya daha fazlasının 12 haftadan uzun sürmesi ve ek olarak nazal endoskopide nazal polip, özellikle orta meatusta mukopürülan akıntı ve mukozal ödem görülmesi veya bilgisayarlı tomografide sinüslerde veya osteomeatal komplekslerde mukozal değişiklikler saptanması tanı koydurucudur (2).

EPOS2020’de kronik rinosinüzitler predispozan sebeplere göre primer ve sekonder olarak, hastalığın anatomik yaygınlığına göre lokalize ve yaygın olarak, ayrıca inflamasyon alt tiplerine göre Tip 2 ve Tip 2 dışı olarak sınıflandırılmıştır (2). Geleneksel ayrıma göre KRS’e orta meatusta nazal polip varlığının eşlik etmesi halinde hastalık nazal polipli KRS olarak anılmaktadır. Bu etyopatogeneze yönelik bir ayırımdan ziyade daha çok morfolojik bir ayırımdır. Bununla birlikte nazal poliplerin sıklıkla primer, yaygın, tip 2 inflamasyon zemininde gelişen KRS ye eşlik ettiği bilinmektedir (2).

Nazal polipli kronik rinosinüzit prevalansı yaklaşık %0,5-4,3’tür (4, 5). Erkeklerde kadınlara göre daha sık izlenmektedir (6). Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak erkek hasta sayısı kadın hastalara göre daha fazlaydı (E:K=1,57).

Çalışmamızdaki KRS+NP hastalarının yaş ortalaması $38,4 \pm 11,7$ (23-59) idi. Hastaların yaş ortalaması literatüre göre daha azdı (7, 203). Bu durumun COVID-19 pandemisi sebebiyle ileri yaştaki hastaların polikliniğe daha az başvurması sonucu ortaya çıkmış olabileceğini düşünmekteyiz. Nüks hastalık grubunun yaş ortalaması istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber primer hastalık grubuna göre daha fazlaydı (sırasıyla $40,6 \pm 11,9$ ve $36,6 \pm 11,7$). Bu fark nüks hastalık grubundaki hastaların daha uzun bir hastalık ve tedavi süreci olması ile açıklanabilir. Çalışmamızdaki KRS+NP hastalarının %27,8'inde eşlik eden astım hastalığı vardı. Literatüre bakıldığında KRS+NP hastalarında astım görülme sıklığını %20-70 arasında belirten vaka serileri mevcuttur (8, 204).

Kronik rinosinüzitin radyolojik değerlendirmesinde altın standart yöntem bilgisayarlı tomografidir (154). Lund Mackay (LM) skorlaması BT görüntülemesi ile hastalık şiddetini değerlendirmek için en yaygın kullanılan sistemdir (155). KRS hastaları ile asemptomatik mukozal değişiklikleri olan sağlıklı bireyleri ayırabilen LM skoru erişkinler için 4,26 olarak belirlenmiştir (158). Çalışmamızdaki tüm hastaların LM skoru 4,26'dan büyüktü; en küçük LM skoru primer hastalık grubunda 10, nüks hastalık grubunda 9'du. Hopkins ve ark. 992 nazal polipli hastaya (%53,3'ünün endoskopik sinüs cerrahisi öyküsü mevcut) yaptıkları pre-operatif değerlendirmede ortalama LM skorunu $13,6 \pm 6,3$ olarak bulmuşlardır (162). Mikrobiyom çalışmalarında, Gan ve ark. KRS+NP hastalarında LM skoru ortalamasını 15,0, Jain ve ark ise KRS hastalarında LM skoru ortalamasını 17 ± 1 olarak bulmuşlardır (205, 206). Çalışmamızda primer hastalık ve nüks hastalık

gruplarında LM skor ortalamaları sırasıyla $18,6 \pm 4,7$ ve $16,5 \pm 5,1$ olup literatür ile uyumlu bulunmuştur.

SNOT-22 KRS hastalarında hastalık ilişkili hayat kalitesini değerlendirmede yaygın kullanılan bir ölçektir (164). Yüksek skorlar azalmış hayat kalitesini ifade etmektedir. Hopkins ve ark. serilerinde KRS+NP hastalarında ortalama SNOT-22 skorunu $43,0 \pm 20,0$ olarak bulmuşlardır (162). Benzer şekilde çalışmamızda SNOT-22 skoru primer hastalık grubunda $42,6 \pm 19,5$, nüks hastalık grubunda $32,0 \pm 11,4$, tüm hastalara bakıldığında ise $37,9 \pm 16,9$ idi.

Literatürde LM skoru ile hayat kalitesi skorlarının korelasyonu hakkında farklı görüşler mevcuttur. Zheng ve ark. KRS+NP hastalarında LM skoruyla SNOT-20 skorları arasında düşük ancak anlamlı bir korelasyon bulmuşlardır (160). Brooks ve ark. da KRS hastalarında LM ve SNOT-22 skorlarının korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir (161). Hopkins ve ark. ise SNOT-22 skoru ile LM skoru arasında korelasyon saptamamışlardır (162). Çalışmamızda Lund-Mackay skorları ve SNOT-22 skorları arasındaki korelasyon izlenmedi. Öte yandan LM skorları, SNOT-22 ölçeğinin rinosinüzit semptomlarını kapsayan ilk 12 soruluk kısmından alınan skorların toplamı ile anlamlı bir korelasyon göstermekteydi. Brooks ve ark. da LM ve SNOT-22 skorları arasındaki korelasyonun özellikle rinolojik semptomlara bağlı olduğunu belirtmişlerdir (161).

Mikrobiyom çalışması için nazal sürüntü örneklerini endoskopik bakı altında orta meatustan almayı tercih ettik. Ramakrishnan ve ark. endoskopik sinüs cerrahisi sırasında sinüslerin içinden, anterior naresten ve orta meatustan örnekler

almış ve mikrobiyom analizi yapmışlar; sonuç olarak orta meatusun paranazal sinüs mikrobiyomunu temsil etmekte yeterli olduğunu belirtmişlerdir (207). Bassiouni ve ark. ise örnek alma metodu olarak orta meatus sürüntü örneği ile mukozal biyopsiyi kıyaslamışlar ve her iki yöntemle benzer sonuçlar elde etmişlerdir (208). Non-invaziv bir yöntem olması ve poliklinik şartlarında dahi kolaylıkla örnek alınabilmesi sebebiyle orta meatusun “swab” ile alınan sürüntü örneği nazal mikrobiyom çalışmaları için ideal yöntem olarak görünmektedir.

Alfa çeşitlilik, lokal bir habitat (mikrobiyom çalışmaları için tek bireydeki ilgili lokalizasyon) içerisindeki türlerin çeşitliliğini ifade eder (172). Çalışmamızda alfa çeşitliliğinin değerlendirilmesinde Shannon çeşitlilik indeksini ve Faith'in filogenetik çeşitlilik indeksini kullandık. Kontrol grubunun alfa çeşitliliği hasta gruplarına göre daha düşüktü ancak gruplar arasında alfa çeşitlilik açısından anlamlı fark yoktu. Choi ve ark. çalışmalarında KRS+NP ve KRS-NP hastalarında kontrol grubuna göre azalmış alfa çeşitlilik izlendiğini raporlamışlardır (209). Chalermwatanachai ve ark. KRS+NP hastalarında kontrol grubuna göre daha düşük alfa çeşitlilik olduğunu belirtmiştir (210). Rom ve ark. da benzer şekilde, çoğunluğu KRS+NP hastalarından oluşan KRS grubunda kontrol grubuna göre alfa çeşitliliğinin azalmış olduğunu ve hastalık şiddeti ile çeşitliliğin negatif korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir (192). Öte yandan Copeland ve ark. KRS+NP hastalarında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol grubuna göre daha yüksek alfa çeşitlilik saptamışlardır (22). Cleland ve ark. da kontrol ve KRS grupları arasında alfa çeşitlilik açısından fark olmadığını belirtmiştir (211).

Beta çeşitlilik ise farklı habitatlar (mikrobiyom çalışmaları her bir birey) arasındaki çeşitliliği (mikrobiyom kompozisyon farklılığı) ifade eder (175). Çalışmamızda gruplar arası beta çeşitliliği Bray-Curtis farklılık indeksi, Jaccard mesafesi ve Unifrac indeksi kullanılarak değerlendirildi. Her üç indeks ile yapılan analizde de kontrol grubu ve KRS+NP hastalarının mikrobiyom kompozisyonları arasında anlamlı fark görüldü. Öte yandan primer hastalık ve nöks hastalık grupları arasında anlamlı fark izlenmedi. Her üç indeks ile hazırlanan temel koordinat analizi grafiğinde ise kontrol grubundaki bireylerin birbirlerine daha yakın kümелendiği, KRS+NP'li hastaların ise birbirlerine ve kontrol grubuna daha uzak yerleşim gösterdiği görüldü. Çalışmamıza benzer şekilde Ramakrishnan ve ark. ve Hoggard ve ark çalışmalarında da KRS+NP ve kontrol hastalarının beta çeşitliliğini inceledikleri temel koordinat analizinde, KRS+NP hastalarında bireyler arası varyasyonun kontrol grubuna göre daha fazla olduğu izlenmektedir (21, 195). Bu bulgular KRS+NP hastalığının mikrobiyal kompozisyondaki değişimden yani disbiyozisten kaynaklandığını işaret etmektedir.

Literatüre göre nazal mikrobiyomda ortalama rölâtif bolluk bakımından en baskın bakteri şubeleri Actinobacteria, Firmicutes ve Proteobacteria'dır (22, 212, 213). Bizim çalışmamızda da kontrol grubunda en baskın üç şube sırasıyla Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, idi. Çalışmamızda kontrol grubundaki Actinobacteria ortalama rölâtif bolluğu, nöks hastalık ve primer hastalık gruplarından fazlaydı. Literatürde de Actinobacteria'nın kontrol grubunda KRS grubuna göre daha fazla görüldüğü belirten çalışmalar mevcuttur (22, 205). Çalışmamızda Firmicutes'in ortalama rölâtif bolluğu istatistiksel olarak anlamlı

olmasa da nüks hastalık grubunda (%53,9) primer hastalık grubuna (%41) göre yüksekti. Jain ve ark. KRS hastalarında endoskopik sinüs cerrahisi öncesinde ve cerrahiden 4 ay sonrasında mikrobiyom değişimini inceledikleri çalışmada sinüs cerrahisi sonrası Firmicutes ortalama rölatif bolluğunda artış olduğunu belirtmişlerdir (206). Bu bulgular ile sinüs cerrahisinin Firmicutes bolluğunu arttırdığı yorumu yapılabilir.

Çalışmamızda kontrol grubunda *Corynebacterium* (%30,5), primer hastalık grubunda *Streptococcus* (%11,5), nüks hastalık grubunda *Staphylococcus* (%37,8) ve KRS+NP hastalarının toplamında yine *Staphylococcus* (%21,3) en baskın bakteri cinsiydi. *Staphylococcus*, *Corynebacterium* ve *Cutibacterium* (*Propionibacterium*) prevalansı tüm gruplarda %100 idi. Mackenzie ve ark. meta-analiz raporlarında nazal mikrobiyomda en baskın cinslerin *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium* olduğunu belirtmişlerdir (214). Rom ve ark. benzer şekilde prevalansı ve ortalama rölatif bolluğu en yüksek olan cinslerin *Corynebacterium* ve *Staphylococcus* olduğunu bildirmişlerdir (192).

Çalışmamızda *Corynebacterium* ortalama rölatif bolluğu kontrol grubunda hastalara göre anlamlı şekilde yüksekti. *Cutibacterium* ve *Dolosigranulum* da kontrol grubunda hasta gruplarına göre daha yüksek ortalama rölatif bolluğa sahipti ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Gan ve ark. kontrol grubunda *Corynebacterium* ve *Dolosigranulum* rölatif bolluğunun KRS+NP hastalarına göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (205).

Bu çalışmada, *Streptococcus*, *Moraxella*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus* ve *Micrococcus*, *Pasteurellaceae_unclassified* cinsi bakteriler KRS+NP hastalarında kontrol grubuna göre daha yüksek bollukta izlendi. Gan ve ark KRS+NP hastalarında *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Moraxella*, *Haemophilus*, *Fusobacterium* ve *Prevotella* cinsi bakterilerin kontrol grubuna göre daha yüksek ortalama rölatif bolluk gösterdiğini belirtmişlerdir (205). *Streptococcus*, *Moraxella*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus* KRS hastalarının sinüs aspiratları ile yapılan kültür çalışmalarında sıklıkla izole edilen mikroorganizmalardır (215). Bu bulgular KRS etyopatogenezinin polimikrobiyal doğası ile uyumludur.

Ramakrishnan ve ark. nazal polipli veya polipsiz olarak ayırmaksızın KRS hastalarında endoskopik sinüs cerrahisi öncesi *Corynebacterium* rölatif bolluğundaki fazlalığın cerrahi başarıyı arttırdığını, *Staphylococcus* fazlalığının ise daha kötü cerrahi sonuç ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (195). Çalışmamızdaki gruplar arasında en düşük *Corynebacterium* ve en yüksek *Staphylococcus* ortalama bolluğu nüks hastalık grubunda izlendi. Çalışmamızın kesitsel yapısı sebebiyle nüks hastalık grubunun cerrahi öncesi mikrobiyal kompozisyonu bilinmese de artmış *Staphylococcus* ve azalmış *Corynebacterium* bolluğunun nükslerle ilişkili olabileceği düşünülebilir. Öte yandan geçirilmiş endoskopik sinüs cerrahisi de mikrobiyom kompozisyonundaki bu değişikliğe neden olmuş olabilir. Jain ve ark. boylamsal çalışmalarında KRS hastalarında cins düzeyindeki bakterilerin baskınlık sırasını ameliyat öncesi *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Haemophilus* ve *Staphylococcus*, ameliyat sonrası *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Haemophilus* ve *Streptococcus* olarak bildirmişlerdir (206). Bu bulgu primer hastalık grubu ile

nüks hastalık grubu arasındaki mikrobiyal kompozisyon farkını açıklamaya yardımcı olabilir. Çalışmamızda bu bulgu ile uyumlu şekilde primer hastalık grubunda *Streptococcus* ortalama rölatif bolluğu en yüksek bakteri cinsiyken nüks hastalık grubunda yerini *Staphylococcus* 'a bırakmaktadır.

Kronik rinosinüzit olsun veya olmasın nazal kavite ve paranasal sinüslerde mantar varlığı hem kültüre dayalı hem de moleküler teknikler kullanılarak gösterilmiştir (216). Çalışmamızdaki bireylerde şube seviyesinde Basidiomycota ve Ascomycota tespit edildi. Basidiomycota şubesindeki mantarların ortalama rölatif bolluğu kontrol grubunda %75,8, primer hastalık grubunda %41,2, nüks hastalık grubunda %26,8 idi. Hoggard ve ark. da çalışmalarında Basidiomycota ve Ascomycota tespit etmiş ve hem KRS+NP hem de kontrol grubunda Basidiomycota baskınlığı saptamışlardır (81). Cins düzeyinde ise çalışmamızdaki tüm gruplarda ortalama rölatif bolluğu ve prevalansı en yüksek mantar *Malassezia* idi. *Malassezia* kontrol grubunda primer hastalık ve nüks grubuna göre belirgin olarak daha yüksek ortalama rölatif bolluk gösteriyordu. Hastalık gruplarında tespit edilen cins sayısı kontrol grubundan fazla olmakla beraber etyopatogenezele ilişkilendirilebilecek bir cins saptanmadı.

18S rRNA ve ITS dizileme tekniklerinin kullanımından öncesi nazal kavite ve paranasal sinüslerde mantar izolasyonu ve tanımlaması kültür, mikroskopi gibi metotlar ile yapılmıyordu ve mantar izolasyonu birçok vakada gerçekleşmiyordu (216). *Malassezia* kültüre edilmesindeki zorluklar nedeniyle klasik yöntemlerle yapılan izolasyonlarda göz ardı ediliyordu (217). Gelber ve ark. çalışmalarında qPCR yöntemi ile sağlıklı bireylerde ve KRS hastalarında *Malassezia* izole

edebilmiş ve *Malassezia'nın* kommensal oluşunu vurgulamışlar; ancak katılımcıların sadece %68'inde *Malassezia* izole edebilmişlerdir (218). Yeni nesil dizileme yöntemlerini kullanan iki çalışmada (bir çalışmada ITS2 değerinde 18S rRNA dizilenmiş) *Malassezia'nın* nazal kavite ve paranazal sinüslerdeki baskın mantar cinsi olduğu belirtilmiş ve iki çalışmada da katılımcıların tamamında *Malassezia* izole edilmiştir (81, 82). ITS1 dizileme ile nazal mikrobiyomda mantar araştıran bir diğer çalışma ise en baskın mantar cinsi olarak *Aspergillus'u* işaret etmiş ancak bu çalışmada katılımcıların %44,4'ünden mantar izole edilememiştir (13). Hoggard ve ark. başka bir çalışmada ITS2'nin nazal mikrobiyomda mantar belirlemede daha ideal bir işaretçi olduğunu belirtmişlerdir (219). Biz çalışmamızda hem ITS1 hem de ITS2 dizileme uyguladık.

Bakterilerin rölatif bolluğunun SNOT-22 skoru ile korelasyonunu araştırıldığında, Copeland ve ark. SNOT-22 skorlarının ile *Escherichia* ortalama rölatif bolluğu ile pozitif, *Corynebacterium* rölatif bolluğu ile negatif korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir (22). Mahdavinia ve ark. Prevotella ile SNOT-22 skorları arasında anlamlı bir negatif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir (220). Cleland ve ark. ise *Pseudomonas* bolluğunun yüksek SNOT-22 skorları ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (211). Çalışmamızda SNOT-22 skoru ile anlamlı korelasyon gösteren bakteri cinsi saptanmadı. Literatürdeki az sayıda çalışmada birbirini destekleyen bulgu olmaması söz konusu korelasyonların tesadüfi olabileceğini düşündürmektedir. Daha geniş vaka serileri ile yapılacak çalışmalar konuyu aydınlatmaya yardımcı olabilir. Çalışmamızda *Parvimonas*'ın rölatif bolluğu SNOT-22 ölçeğinin rinosinüzit semptomlarını kapsayan ilk 12 soruluk

kısmı ile anlamlı şekilde negatif korelasyon gösteriyordu. SNOT-22 ölçeğinin maddeleri tek tek incelendiğinde *Parvimonas* 'ın neredeyse tüm maddeler ile negatif korelasyon gösterdiği izlendi. *Sphingomonas* ve *Bacillus* ortalama rölatif bollukları “öksürük” ile negatif korelasyon gösteriyordu. *Streptococcus*, *Moraxella* ve *Porphyromonas* ise SNOT-22 ölçeğinin büyük kısmı ile pozitif korelasyon gösteriyordu. Ancak istatistiksel olarak *Moraxella* için sadece “kulak dolgunluğu” ve “yorgunluk” *Streptococcus* için ise sadece “hapşırma” ve “verimliliğin düşmesi” anlamlıydı.

Mantarların hayat kalitesi ölçeklerine olan etkisine bakacak olursak, *Aspergillus* ve *Filobasilidioles_unclassified* rölatif bolluğu SNOT-22 skorları ile negatif korelasyon gösteriyordu. *Saturnispora* rölatif bolluğu ise SNOT-22 skorları ile pozitif korelasyon göstermekteydi. Cleland ve ark. *Ceratostomella* 'nın SNOT-22 skoru ile pozitif korelasyon gösterdiğini, *Cladosporium* ve *Pleistophora* 'nın ise SNOT-22 ile negatif korelasyon içerisinde olduğunu belirtmişlerdir (82).

Çalışmamızda kullandığımız bir diğer evreleme sistemi olan Lund-Mackay skorunun mikrobiyom ile ilişkisi incelendiğinde, Abbas ve ark. çalışmasında KRS+NP hastalarında *Moraxella*, *Parvimonas* rölatif bolluğu ile LM skorlarının pozitif korelasyon gösterdiği, *Succinivibrio* ve *Exiguobacterium* 'un azalmış LM skorlarıyla ilişkili olduğu görülmektedir (221). Mahdavinia ve ark. ise *Enterobacteriaceae* bolluğu ve LM skoru arasında pozitif ilişki saptamışlardır (220). Bizim araştırmamızda ise *Peptoniphilus*, *Anaerococcus* ve *Finegoldia* 'nın rölatif bolluğu ile Lund Mackay skorları arasında negatif korelasyon bulundu. Bakterilerin rölatif bolluğunun paranazal sinüsleri etkileme şeklini ortaya

koyabilmek için örnek alınan taraf LM skoru maddeleri ile bakterilerin rölatif bollukları arasındaki korelasyonu değerlendirdik. *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Dolosigranulum* ve *Pseudomonas* rölatif bolluğu anterior etmoidlerde opasifikasyon artışı ile pozitif korelasyon gösteriyordu. *Haemophilus*, *Porphyromonas* ve *Granulicatella* ise maksiller sinüste azalmış opasifikasyon ile ilişkilidiler. Çalışmamızda mantar cinsleri ile LM skorları arasında anlamlı bir korelasyon izlenmedi. Cleland ve ark. *Davidiella* cinsi mantarlar ile LM skorları arasında negatif korelasyon olduğunu ancak cinsin çok düşük rölatif bolluk gösterdiğini belirtmişlerdir (82).

Mikrobiyom içerisindeki mikroorganizmaların kompetitif veya kooperatif olarak birbirlerini etkileyebileceği bilinmektedir. Mikroorganizmaların etkileşimini değerlendirmek için korelasyon matrisi basit bir yöntemdir. Ancak korelasyon matrisleri mikroorganizmaların birbirlerini nasıl etkilediklerinden ziyade birlikte görülme ihtimallerini değerlendirmektedir. Örneğin pozitif korelasyon gösteren iki bakteri cinsi birbirlerini metabolik yollar ile destekliyor olabilecekleri gibi her ikisi için de elverişli bir ortamda bulunmaları sebebiyle herhangi bir etkileşim olmaksızın korelasyon göstermiş de olabilirler (222). Biz de çalışmamızda nazal mikrobiyomdaki bakteri ve mantarların etkileşimini analiz edebilmek için Spearman'ın sıralama korelasyon katsayı kullanılarak bakteri-bakteri, mantar-mantar ve bakteri-mantar korelasyon matrisleri tasarladık.

Bakterilerin birbirleri ile etkileşimlerinde dikkat çekici bulgular şu şekildeydi: *Corynebacterium*; *Lawsonella* ve *Anaerococcus* ile pozitif, *Neisseria*, *Prevotella*, *Pasteurellaceae_unclassified*, *Fusobacterium* ve *Peptostreptococcus*

ile negatif korelasyona sahipti. *Dolosigranulum*; *Staphylococcus* ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde negatif korelasyon gösteriyordu. *Corynebacterium*'un gerek kontrol grubunda daha yüksek MRA'ya sahip oluşu gerekse *Prevotella*, *Fusobacterium* ve *Peptostreptococcus* gibi KRS hastalarının pürülan akıntılarında sık izole edilen mikroorganizmalar ile negatif korelasyon göstermesi, söz konusu bakteri cinsinin nazal mikrobiyomda düzenleyici bir fonksiyona sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bazı *Corynebacterium* cinsi bakteriler ile *S. aureus* kompetitif ilişki içerisindedir, örneğin *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*'un nazal *S. aureus* kolonizasyonunun eliminasyonunda probiyotik olarak etki ettiği gösterilmiştir (223, 224). Copeland ve ark. çalışmalarında bakterilerin birbirleri ile etkileşimlerini ve hastalık şiddeti ile ilişkilerini araştırmışlar; *Dolosigranulum* ve *Corynebacterium* 'un birbirleriyle pozitif korelasyon gösterdiğini ve her ikisinin de hastalık şiddeti ile negatif korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir (22). Brugger ve ark. *in vitro* olarak *Dolosigranulum pigrum*'un *S. aureus* gelişimini inhibe ettiğini, ayrıca *Corynebacterium* ile kombine edildiğinde *Streptococcus pneumoniae* gelişimini de inhibe ettiğini göstermişlerdir (225). Bizim çalışmamızda da *Dolosigranulum* *Corynebacterium* ile pozitif korelasyon gösterirken *Staphylococcus* ile negatif korelasyon gösteriyordu. Ayrıca istatistiksel olarak anlamlı olmasa da *Dolosigranulum* kontrol grubunda daha yüksek MRA'ya sahipti ve birçok üst solunum yolu patojeni ile negatif korelasyon gösteriyordu. Öte yandan çalışmamızda *Dolosigranulum* daha yüksek LM ve SNOT-22 skorları ile ilişkiliydi. Ayrıca prevalansı hem kontrol hem de hasta grubunda düşüktü. Mikrobiyomdaki düzenleyici rolünü ve hastalıktan koruyucu etkisini değerlendirebilmek için yeterli

veriye ulaşamadık. *Corynebacterium* ve *Dolosigranulum*’un ekolojide “Kilit taşı” tür olarak tabir edilen; ekosistem üzerinde rölatif bolluğuna kıyasla daha büyük etkiler yaratan ve tür dengesini sağlayan bakteriler olup olmadığı gelecek çalışmalar için araştırma konusu olabilir. Literatür bulguları da göz önünde bulundurulduğunda bu bakterilerin KRS+NP tedavisinde probiyotik olarak kullanılabilirliği araştırılmalıdır.

Pasteurellaceae_unclassified (Pasteurellaceae ailesinden tanımlanamayan bir cins) *Corynebacterium* ile negatif korelasyon göstermenin yanı sıra, KRS+NP hastalarında daha fazla rölatif bolluğa sahipti. Dahası kontrol grubunda prevalansı %60’ken hasta gruplarının ikisinde de %100 idi. Öte yandan SNOT-22 ve LMS ile çok zayıf korelasyon gösteriyordu. Hastalık patogenezindeki yerinin anlaşılabilmesi için ileri araştırmalar faydalı olacaktır.

Bakteri ve mantar etkileşimlerine bakıldığında *Malassezia*’nın *Corynebacterium*, *Cutibacterium* ve *Anaerococcus* ile pozitif, *Parvimonas* ve *Peptostreptococcus* ile negatif korele olduğu izlendi. *Ramularia* cinsi mantarlar *Streptococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Micrococcus*, *Fusobacterium* ve *Granulicatella* ile pozitif, *Bdellovibrio* ile negatif korelasyon gösteriyordu. *Metschnikowia* cinsi mantarlar ise *Parvimonas*, *Neisseria*, *Fusobacterium* ve *Peptostreptococcus* ile pozitif, *Staphylococcus*, *Sphingomonas* ve *Bacillus* ile negatif korelasyon içerisindeydi. Hoggard ve ark. çalışmalarında *Malassezia*’nın *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Finegoldia* ve *Anaerococcus* cinsi bakteriler ile pozitif, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Davidiella*, *Leptosphaerulina* cinsi mantarlar ile negatif korelasyon gösterdiği belirtmişlerdir (81).

Malassezia’nın *Corynebacterium* ile gösterdiği pozitif korelasyon ve kontrol grubunda anlamlı olarak yüksek rölatif bolluğa sahip oluşu nedeniyle KRS+NP’ye karşı koruyucu olabileceği düşünülebilir. Daha geniş vaka serileri ile yapılacak boylamsal fungal mikrobiyom araştırmaları aydınlatıcı olacaktır.

Çalışmamız bildiğimiz kadarıyla KRS+NP hastalarında 16S rRNA ve ITS yeni nesil dizilemesini tek bir kit ile aynı örnek üzerinden yapan ilk çalışmadır. Bu durum çalışmamıza bakteri-mantar etkileşimini değerlendirebilmek adına önemli katkı sağlamıştır. Ayrıca 16s rRNA’nın V1-V9 bölgeleri arasındaki değişken bölgelerin tamamının dizilenmesi çalışmanın gücünü arttırmıştır.

Çalışmamızda üzerinde durulması gereken birkaç kısıtlılık vardı. İlk olarak çalışmanın yüksek maliyeti sebebiyle az sayıda katılımcı çalışmaya dahil edilebildi. İkincisi, geçirilmiş sinüs cerrahisi sonrası nüks görülen hastalar ile cerrahi tedavi almamış hastalar arasındaki mikrobiyom karşılaştırmasını kesitsel bir çalışma tasarlayarak araştırdık. Endoskopik sinüs cerrahisi öncesinde ve uzun dönemde mikrobiyom araştırması yapan boylamsal bir çalışma cerrahinin etkisini değerlendirmek için daha etkili olacaktır. Ayrıca 16s rRNA yeni nesil dizileme ile yapılan mikrobiyom çalışmaları birtakım kısıtlılıklara sahiplerdir. Kullanılan DNA ekstraksiyonu metoduna göre sonuçların önemli ölçüde değişiklik gösterebileceği belirtilmiştir (226). Ayrıca DNA ekstraksiyonu sırasında canlı olmayan mikroorganizmalardan da DNA elde edilmektedir. Dahası, bakterilerin 16s rRNA gen kopyaları değişkendir ve bu durum yüksek kopya sayısı olan türlerin bolluğunda artış ile sonuçlanır. (227). Dizileme analizi kısmı da sonuçlarda önemli değişikliğe sebep olabilir. Mikrobiyal çeşitliliğin fazla tahmin edilmesinin önüne

geçilebilmesi için mümkün olan en kaliteli sekanslar ile analiz yapılmalıdır (228). Ayrıca taksonomik sınıflamada kullanılan veri tabanları da sonuçları etkiletebilmektedir (227). Metagenomik mRNA'nın ekstraksiyonu ve analizi, mikrobiyal toplulukların fonksiyonel ve metabolik çeşitliliğini değerlendirmek için daha isabetli bir yöntem olabilir (210).



6. ÖZET

Giriş: Nazal polipli kronik rinosinüzit (KRS+NP) gelişiminde birden fazla inflamatuvar mekanizma dinamik olarak etkileşim halinde yer alır. İnflamasyonun gelişiminde mukozal yüzeyde konak ve çevresel faktörler arasındaki ilişkinin bozulması sebep olmaktadır. Çevresel faktörlerin en önemli kısmını mikroorganizmalar oluşturmaktadır. Gelişen yeni nesil dizileme teknikleri ile mikrobiyomda yer alan mikroorganizmaları hızlı ve isabetli bir şekilde tanımlamak mümkün olmuştur.

Materyal Metot: Çalışmaya 28 gönüllü dahil edildi (10 kişi kontrol grubu, 10 kişi opere olmamış KRS+NP, 8 kişi daha önce opere olmuş KRS+NP). Tüm katılımcılardan endoskopik bakı altında swab ile orta meatustan sürüntü örneği alındı. DNA ekstraksiyonu sonrası Swift Amplicon 16S+ITS kiti ile kütüphane oluşturulup Illumina Miseq ile dizileme yapıldı. QIIME2 kullanılarak sekans analizi yapıldı. 16S için Silva v138 ITS için UNITE v8,2 veri tabanı kullanıldı.

Bulgular: Hastaların LM ve SNOT-22 skorları sırasıyla, Primer hastalık grubunda $18,6 \pm 4,7$ ve $42,6 \pm 19,5$, nüks hastalık grubunda ise $16,5 \pm 5,1$ ve $32,0 \pm 11,4$ idi. SNOT-22 skorları LM skorları ile anlamlı korelasyon göstermedi. Çalışma grubunda en baskın bakteriler şube olarak Firmicutes (%44,5), Proteobacteria (%25,2), Actinobacteria (%24,6), cins olarak *Staphylococcus* (%22,2), *Corynebacterium* (%16,2), *Sphingomonas* (%9,2) idi. Kontrol grubundaki Actinobacteria bolluğu, nüks hastalık ve primer hastalık grubuna göre fazla bulundu. *Corynebacterium* ortalama rölatif bolluğu (MRA) kontrol grubunda

hastalara göre anlamlı şekilde yüksek izlendi ($p=0,007$). *Streptococcus*, *Moraxella*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus* ve *Micrococcus* ise hasta gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bollukta izlenmiştir. Tüm gruplarda baskın mantar cinsi cins *Malassezia* idi. Kontrol grubundaki MRA'sı hasta gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti. *Staphylococcus*; *Dolosigranulum* ve *Fusobacterium* ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde negatif korelasyon gösteriyordu ($p<0,05$). *Corynebacterium*; *Lawsonella* ve *Anaerococcus* ile pozitif, *Neisseria*, *Prevotella*, *Fusobacterium* ve *Peptostreptococcus* ile negatif korelasyona sahipti ($p<0,05$)

Sonuç: KRS+NP hastalarının nazal mikrobiyomu kontrol grubunda göre daha fazla bireyler arası çeşitlilik göstermektedir. *Corynebacterium* KRS+NP hastalarında kontrol grubuna göre daha az bolluktadır. *Malassezia* nazal kavite ve paranazal sinüslerde baskın olan mantar cinsidir ve *Corynebacterium* bolluğu ile pozitif korelasyon göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Nazal mikrobiyom, Kronik Rinosinüzit, Nazal polip, Endoskopik sinüs cerrahisi

7. ABSTRACT

Introduction: Multiple inflammatory mechanisms dynamically interact in the development of chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP). The disruption of the relationship between host and environmental factors on the mucosal surface causes the development of inflammation. Microorganisms constitute the most important part of environmental factors. It has been possible to identify microorganisms of the microbiome rapidly and accurately with the new generation sequencing techniques.

Materials and Methods: 28 volunteers were included in the study (10 control group, 10 non-operated CRSwNP, 8 previously operated CRSwNP). Swab samples were taken from the middle meatus under endoscopic examination from all participants. After DNA extraction, a library was created with the Swift Amplicon 16S + ITS kit and sequenced with Illumina Miseq. Sequence analysis was performed using QIIME2. UNITE v8.2 database for ITS and Silva v138 for 16S rRNA.

Results: Patients' LM and SNOT-22 scores were 18.6 ± 4.7 and 42.6 ± 19.5 in the primary disease group, 16.5 ± 5.1 and 32.0 ± 11.4 in the recurrent disease group, respectively. SNOT-22 scores did not correlate significantly with LM scores. The most dominant bacteria in the study group were *Firmicutes* (44.5%), *Proteobacteria* (25.2%), *Actinobacteria* (24.6%) as phylum and *Staphylococcus* (22.2%), *Corynebacterium* (16.2%), *Sphingomonas*. (9.2%) as genus. The abundance of *Actinobacteria* in the control group was higher than the recurrent

disease and primary disease groups. Mean relative abundance of *Corynebacterium* (MRA) was significantly higher in the control group compared to the patients ($p = 0.007$). *Streptococcus*, *Moraxella*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus* and *Micrococcus* were significantly higher in the patient groups compared to the control group. The dominant fungal genus in all groups was the genus *Malassezia*. MRA in the control group was significantly higher than the patient groups. *Staphylococcus*; showed a statistically significant negative correlation with *Dolosigranulum* and *Fusobacterium* ($p < 0.05$). *Corynebacterium* had a positive correlation with *Lawsonella* and *Anaerococcus*, and a negative correlation with *Neisseria*, *Prevotella*, *Fusobacterium* and *Peptostreptococcus* ($p < 0.05$).

Conclusion: Nasal microbiome of CRSwNP patients shows greater inter-individual variation than the control group. *Corynebacterium* is less abundant in patients with CRSwNP compared to the control group. *Malassezia* is the dominant fungus genus in the nasal cavity and paranasal sinuses and correlates positively with the abundance of *Corynebacterium*.

Keywords: Nasal microbiome, Chronic Rhinosinusitis, Nasal polyps, Endoscopic sinus surgery

8. KAYNAKÇA

1. Lanza DC, Kennedy DW. Adult rhinosinusitis defined. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;117(3 Pt 2):S1-7.
2. Fokkens WJ, Lund VJ, Hopkins C, Hellings PW, Kern R, Reitsma S, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology.* 2020;58(Suppl S29):1-464.
3. Kato A. Immunopathology of chronic rhinosinusitis. *Allergol Int.* 2015;64(2):121-30.
4. Min YG, Jung HW, Kim HS, Park SK, Yoo KY. Prevalence and risk factors of chronic sinusitis in Korea: results of a nationwide survey. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1996;253(7):435-9.
5. Hedman J, Kaprio J, Poussa T, Nieminen MM. Prevalence of asthma, aspirin intolerance, nasal polyposis and chronic obstructive pulmonary disease in a population-based study. *Int J Epidemiol.* 1999;28(4):717-22.
6. Larsen K, Tos M. The estimated incidence of symptomatic nasal polyps. *Acta Otolaryngol.* 2002;122(2):179-82.
7. Settipane GA. Epidemiology of nasal polyps. *Allergy Asthma Proc.* 1996;17(5):231-6.
8. Settipane GA, Chafee FH. Nasal polyps in asthma and rhinitis. A review of 6,037 patients. *J Allergy Clin Immunol.* 1977;59(1):17-21.
9. Tengroth L, Arebro J, Kumlien Georén S, Winqvist O, Cardell LO. Deprived TLR9 expression in apparently healthy nasal mucosa might trigger polyp-growth in chronic rhinosinusitis patients. *PLoS One.* 2014;9(8):e105618.
10. Feazel LM, Robertson CE, Ramakrishnan VR, Frank DN. Microbiome complexity and *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 2012;122(2):467-72.
11. Teufelberger AR, Bröker BM, Krysko DV, Bachert C, Krysko O. *Staphylococcus aureus* Orchestrates Type 2 Airway Diseases. *Trends Mol Med.* 2019;25(8):696-707.
12. Tomassen P, Vandeplas G, Van Zele T, Cardell LO, Arebro J, Olze H, et al. Inflammatory endotypes of chronic rhinosinusitis based on cluster analysis of biomarkers. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(5):1449-56.e4.
13. Zhao YC, Bassiouni A, Tanjararak K, Vreugde S, Wormald PJ, Psaltis AJ. Role of fungi in chronic rhinosinusitis through ITS sequencing. *Laryngoscope.* 2018;128(1):16-22.
14. Rai G, Ansari MA, Dar SA, Datt S, Gupta N, Sharma S, et al. Serum Cytokine Profile in Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyposis Infected by *Aspergillus flavus*. *Ann Lab Med.* 2018;38(2):125-31.
15. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome.* 2015;3:31.
16. Council NR. The new science of metagenomics: revealing the secrets of our microbial planet: National Academies Press; 2007.

17. Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, Blumberg RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science*. 2016;352(6285):539-44.
18. Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*. 2016;535(7610):75-84.
19. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med*. 2016;8(1):51.
20. Hedayat KM, Lapraz J-C. Chapter 6 - Disorders of dysbiosis. In: Hedayat KM, Lapraz J-C, editors. *The Theory of Endobiogeny*: Academic Press; 2019. p. 77-100.
21. Hoggard M, Biswas K, Zoing M, Wagner Mackenzie B, Taylor MW, Douglas RG. Evidence of microbiota dysbiosis in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2017;7(3):230-9.
22. Copeland E, Leonard K, Carney R, Kong J, Forer M, Naidoo Y, et al. Chronic Rhinosinusitis: Potential Role of Microbial Dysbiosis and Recommendations for Sampling Sites. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:57.
23. Bosch A, Levin E, Houten M, Hasrat R, Kalkman G, Biesbroek G, et al. Development of Upper Respiratory Tract Microbiota in Infancy is Affected by Mode of Delivery. *EBioMedicine*. 2016;9.
24. Dimitri-Pinheiro S, Soares R, Barata P. The Microbiome of the Nose-Friend or Foe? *Allergy Rhinol (Providence)*. 2020;11:2152656720911605-.
25. Man WH, de Steenhuijsen P, Pitsers WA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(5):259-70.
26. Esposito S, Principi N. Impact of nasopharyngeal microbiota on the development of respiratory tract diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(1):1-7.
27. Huang YJ. Nasopharyngeal Microbiota: Gatekeepers or Fortune Tellers of Susceptibility to Respiratory Tract Infections? *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;196(12):1504-5.
28. Benninger MS, Ferguson BJ, Hadley JA, Hamilos DL, Jacobs M, Kennedy DW, et al. Adult chronic rhinosinusitis: definitions, diagnosis, epidemiology, and pathophysiology. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;129(3 Suppl):S1-32.
29. Settipane RA, Peters AT, Chandra R. Chapter 4: Chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2013;27 Suppl 1:S11-5.
30. Stjärne P, Odebäck P, Stållberg B, Lundberg J, Olsson P. High costs and burden of illness in acute rhinosinusitis: real-life treatment patterns and outcomes in Swedish primary care. *Prim Care Respir J*. 2012;21(2):174-9; quiz 10p following 9.
31. Turner RB. Epidemiology, pathogenesis, and treatment of the common cold. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1997;78(6):531-9; quiz 9-40.
32. Fokkens W, Lund V, Mullol J. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. *Rhinol Suppl*. 2007;20:1-136.
33. Aring AM, Chan MM. Current Concepts in Adult Acute Rhinosinusitis. *Am Fam Physician*. 2016;94(2):97-105.

34. Monto AS. The seasonality of rhinovirus infections and its implications for clinical recognition. *Clin Ther.* 2002;24(12):1987-97.
35. Loftus PA, Lin J, Tabaee A. Anatomic variants of the paranasal sinuses in patients with recurrent acute rhinosinusitis. *International Forum of Allergy & Rhinology.* 2016;6(3):328-33.
36. Zuskin E, Mustajbegovic J, Schachter EN, Kern J, Vadjic V, Strok N, et al. Respiratory findings in mail carriers. *Int Arch Occup Environ Health.* 2000;73(2):136-43.
37. Tan KS, Yan Y, Ong HH, Chow VTK, Shi L, Wang DY. Impact of Respiratory Virus Infections in Exacerbation of Acute and Chronic Rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2017;17(4):24.
38. Tachibana T, Kariya S, Orita Y, Nakada M, Makino T, Haruna T, et al. Factors that prolong the duration of recovery in acute rhinosinusitis with orbital complications. *Acta Otolaryngol.* 2019;139(1):52-6.
39. Hansen FS, Hoffmans R, Georgalas C, Fokkens WJ. Complications of acute rhinosinusitis in The Netherlands. *Fam Pract.* 2012;29(2):147-53.
40. Hastan D, Fokkens WJ, Bachert C, Newson RB, Bislimovska J, Bockelbrink A, et al. Chronic rhinosinusitis in Europe--an underestimated disease. A GA²LEN study. *Allergy.* 2011;66(9):1216-23.
41. Kim JH, Cho C, Lee EJ, Suh YS, Choi BI, Kim KS. Prevalence and risk factors of chronic rhinosinusitis in South Korea according to diagnostic criteria. *Rhinology.* 2016;54(4):329-35.
42. Tomassen P, Newson RB, Hoffmans R, Lötvall J, Cardell LO, Gunnbjörnsdóttir M, et al. Reliability of EP3OS symptom criteria and nasal endoscopy in the assessment of chronic rhinosinusitis--a GA² LEN study. *Allergy.* 2011;66(4):556-61.
43. Seybt MW, McMains KC, Kountakis SE. The prevalence and effect of asthma on adults with chronic rhinosinusitis. *Ear Nose Throat J.* 2007;86(7):409-11.
44. Won HK, Kim YC, Kang MG, Park HK, Lee SE, Kim MH, et al. Age-related prevalence of chronic rhinosinusitis and nasal polyps and their relationships with asthma onset. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2018;120(4):389-94.
45. Philpott CM, Erskine S, Hopkins C, Kumar N, Anari S, Kara N, et al. Prevalence of asthma, aspirin sensitivity and allergy in chronic rhinosinusitis: data from the UK National Chronic Rhinosinusitis Epidemiology Study. *Respir Res.* 2018;19(1):129.
46. Ocampo CJ, Peters AT. Antibody deficiency in chronic rhinosinusitis: epidemiology and burden of illness. *Am J Rhinol Allergy.* 2013;27(1):34-8.
47. Sella GCP, Tamashiro E, Anselmo-Lima WT, Valera FCP. Relation between chronic rhinosinusitis and gastroesophageal reflux in adults: systematic review. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2017;83(3):356-63.
48. Guan WJ, Peng Y, Zi XX, Tan KS, He TT, Zhong NS, et al. Motile Ciliary Disorders in Chronic Airway Inflammatory Diseases: Critical Target for Interventions. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2018;18(9):48.

49. Miłkowska-Dymanowska J, Białas AJ, Zalewska-Janowska A, Górski P, Piotrowski WJ. Underrecognized comorbidities of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015;10:1331-41.
50. Önerci M. Nasal polyposis. *Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery*: Springer; 2010. p. 20-2.
51. Pahor AL, Farid A. Ni-Ankh-Sekhmet: first rhinologist in history. *J Laryngol Otol*. 2003;117(11):846-9.
52. Vancil ME. A historical survey of treatments for nasal polyposis. *Laryngoscope*. 1969;79(3):435-45.
53. Lascaratos JG, Segas JV, Assimakopoulos DA. Treatment of nasal polyposis in Byzantine times. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000;109(9):871-6.
54. Koç A, Erginoğlu U, Karaaslan O. Otorhinolaryngological procedures in the fifteenth century in Anatolia. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2004;113(5):414-7.
55. Stevenson RS, Guthrie D. *A history of oto-laryngology*: E. & S. Livingstone; 1949.
56. Jankowski R, Pigret D, Decroocq F. Comparison of Functional Results after Ethmoidectomy and Nasalization for Diffuse and Severe Nasal Polyposis. *Acta Oto-Laryngologica*. 1997;117(4):601-8.
57. Kennedy DW, Zinreich SJ, Rosenbaum AE, Johns ME. Functional endoscopic sinus surgery. Theory and diagnostic evaluation. *Arch Otolaryngol*. 1985;111(9):576-82.
58. van Camp C, Clement PA. Results of oral steroid treatment in nasal polyposis. *Rhinology*. 1994;32(1):5-9.
59. Greisner WA, 3rd, Settipane GA. Hereditary factor for nasal polyps. *Allergy Asthma Proc*. 1996;17(5):283-6.
60. Cohen NA, Widelitz JS, Chiu AG, Palmer JN, Kennedy DW. Familial aggregation of sinonasal polyps correlates with severity of disease. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;134(4):601-4.
61. Van Zele T, Claeys S, Gevaert P, Van Maele G, Holtappels G, Van Cauwenberge P, et al. Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. *Allergy*. 2006;61(11):1280-9.
62. Jareoncharsri P, Bunnag C, Muangsomboon S, Tunsuriyawong P, Assanasen P. Clinical and histopathological classification of nasal polyps in Thais. 2002.
63. Lacroix JS, Zheng CG, Goytom SH, Landis B, Szalay-Quinodoz I, Malis DD. Histological comparison of nasal polyposis in black African, Chinese and Caucasian patients. *Rhinology*. 2002;40(3):118-21.
64. Oakley GM, Curtin K, Orb Q, Schaefer C, Orlandi RR, Alt JA. Familial risk of chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis: genetics or environment. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2015;5(4):276-82.
65. Zariwala MA, Knowles MR, Leigh MW. Primary Ciliary Dyskinesia. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. *GeneReviews*(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle 1993.
66. Weinhold B. Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect*. 2006;114(3):A160-7.

67. Kim JY, Kim DK, Yu MS, Cha MJ, Yu SL, Kang J. Role of epigenetics in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Mol Med Rep*. 2018;17(1):1219-27.
68. Esselens C, Malapeira J, Colomé N, Casal C, Rodríguez-Manzaneque JC, Canals F, et al. The cleavage of semaphorin 3C induced by ADAMTS1 promotes cell migration. *J Biol Chem*. 2010;285(4):2463-73.
69. Cormier C, Mfuno Endam L, Filali-Mouhim A, Boisvert P, Boulet LP, Boulay ME, et al. A pooling-based genomewide association study identifies genetic variants associated with *Staphylococcus aureus* colonization in chronic rhinosinusitis patients. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2014;4(3):207-15.
70. Wang JH, Kwon HJ, Jang YJ. Rhinovirus enhances various bacterial adhesions to nasal epithelial cells simultaneously. *Laryngoscope*. 2009;119(7):1406-11.
71. Yeo NK, Jang YJ. Rhinovirus infection-induced alteration of tight junction and adherens junction components in human nasal epithelial cells. *Laryngoscope*. 2010;120(2):346-52.
72. He SH, Zheng J, Duan MK. Induction of mucin secretion from human bronchial tissue and epithelial cells by rhinovirus and lipopolysaccharide. *Acta Pharmacol Sin*. 2004;25(9):1176-81.
73. Jackson DJ, Johnston SL. The role of viruses in acute exacerbations of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(6):1178-87; quiz 88-9.
74. Hoggard M, Wagner Mackenzie B, Jain R, Taylor MW, Biswas K, Douglas RG. Chronic Rhinosinusitis and the Evolving Understanding of Microbial Ecology in Chronic Inflammatory Mucosal Disease. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(1):321-48.
75. Ioannidis D, Lachanas VA, Florou Z, Bizakis JG, Petinaki E, Skoulakis CE. Herpes viruses and human papilloma virus in nasal polyposis and controls. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2015;81(6):658-62.
76. Wang X, Zhang N, Glorieux S, Holtappels G, Vaneechoutte M, Krysko O, et al. Herpes simplex virus type 1 infection facilitates invasion of *Staphylococcus aureus* into the nasal mucosa and nasal polyp tissue. *PLoS One*. 2012;7(6):e39875.
77. Liu Q, Lu X, Bo M, Qing H, Wang X, Zhang L. The microbiology of chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Acta Otolaryngol*. 2014;134(12):1251-8.
78. Wei HZ, Li YC, Wang XD, Lu XX, Hu CH, He S, et al. The microbiology of chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2018;275(6):1439-47.
79. Długaszewska J, Leszczynska M, Lenkowski M, Tatarska A, Pastusiak T, Szyfter W. The pathophysiological role of bacterial biofilms in chronic sinusitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016;273(8):1989-94.
80. Sun Y, Zhou B, Wang CS, Huang Q, Zhang Q, Han YH, et al. Clinical and histopathologic features of biofilm-associated chronic rhinosinusitis with nasal polyps in Chinese patients. *Chin Med J (Engl)*. 2012;125(6):1104-9.

81. Hoggard M, Zoing M, Biswas K, Taylor MW, Douglas RG. The sinonasal mycobiota in chronic rhinosinusitis and control patients. *Rhinology*. 2019;57(3):190-9.
82. Cleland EJ, Bassiouni A, Boase S, Dowd S, Vreugde S, Wormald PJ. The fungal microbiome in chronic rhinosinusitis: richness, diversity, postoperative changes and patient outcomes. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2014;4(4):259-65.
83. Hirotzu M, Shiozawa A, Ono N, Miwa M, Kikuchi K, Ikeda K. Fungal extracts detected in eosinophilic chronic rhinosinusitis induced cytokines from the nasal polyp cells. *Laryngoscope*. 2014;124(9):E347-53.
84. Sproson EL, Thomas KM, Lau LC, Harries PG, Howarth PH, Salib RJ. Common airborne fungi induce species-specific effects on upper airway inflammatory and remodelling responses. *Rhinology*. 2016;54(1):51-5.
85. Fokkens WJ, van Drunen C, Georgalas C, Ebbens F. Role of fungi in pathogenesis of chronic rhinosinusitis: the hypothesis rejected. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012;20(1):19-23.
86. Xie L, Liu AG, Peng LY, Wang SJ, Zhang YP, Wang XS. Expression of E-prostanoid receptors in nasal polyp tissues of smoking and nonsmoking patients with chronic rhinosinusitis. *PLoS One*. 2018;13(7):e0200989.
87. Mulligan JK, O'Connell BP, Pasquini W, Mulligan RM, Smith S, Soler ZM, et al. Impact of tobacco smoke on upper airway dendritic cell accumulation and regulation by sinonasal epithelial cells. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2017;7(8):777-85.
88. Yamin M, Holbrook EH, Gray ST, Busaba NY, Lovett B, Hamilos DL. Profibrotic transforming growth factor beta 1 and activin A are increased in nasal polyp tissue and induced in nasal polyp epithelium by cigarette smoke and Toll-like receptor 3 ligation. *International forum of allergy & rhinology*. 2015;5(7):573-82.
89. Perić A, Mirković C, Vojvodić D. Clara cell protein 16 release from the nasal mucosa in allergic rhinitis, chronic rhinosinusitis, and exposure to air pollutants. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2018;69(3):215-9.
90. Khelifi R, Olmedo P, Gil F, Chakroun A, Hammami B, Hamza-Chaffai A. Heavy metals in normal mucosa and nasal polyp tissues from Tunisian patients. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2015;22(1):463-71.
91. Kohanski MA, Workman AD, Patel NN, Hung LY, Shtraks JP, Chen B, et al. Solitary chemosensory cells are a primary epithelial source of IL-25 in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(2):460-9.e7.
92. Yu XM, Li CW, Li YY, Liu J, Lin ZB, Li TY, et al. Down-regulation of EMP1 is associated with epithelial hyperplasia and metaplasia in nasal polyps. *Histopathology*. 2013;63(5):686-95.
93. Soyka MB, Wawrzyniak P, Eiwegger T, Holzmann D, Treis A, Wanke K, et al. Defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: the regulation of tight junctions by IFN- γ and IL-4. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(5):1087-96.e10.
94. Jiao J, Duan S, Meng N, Li Y, Fan E, Zhang L. Role of IFN- γ , IL-13, and IL-17 on mucociliary differentiation of nasal epithelial cells in chronic

rhinosinusitis with nasal polyps. *Clinical & Experimental Allergy*. 2016;46(3):449-60.

95. Sun Y, Zhou B, Wang C, Huang Q, Zhang Q, Han Y, et al. Biofilm formation and Toll-like receptor 2, Toll-like receptor 4, and NF-kappaB expression in sinus tissues of patients with chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2012;26(2):104-9.
96. Shin SH, Kim YH, Jin HS, Kang SH. *Alternaria* Induces Production of Thymic Stromal Lymphopoietin in Nasal Fibroblasts Through Toll-like Receptor 2. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2016;8(1):63-8.
97. Cho JS, Kang JH, Um JY, Han IH, Park IH, Lee HM. Lipopolysaccharide induces pro-inflammatory cytokines and MMP production via TLR4 in nasal polyp-derived fibroblast and organ culture. *PLoS One*. 2014;9(11):e90683.
98. Puposki JA, Klingler AI, Tan BK, Soroosh P, Banie H, Lewis G, et al. Group 2 innate lymphoid cells are elevated and activated in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Immun Inflamm Dis*. 2017;5(3):233-43.
99. Derycke L, Zhang N, Holtappels G, Dutré T, Bachert C. IL-17A as a regulator of neutrophil survival in nasal polyp disease of patients with and without cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2012;11(3):193-200.
100. van Drunen CM, Reinartz S, Wigman J, Fokkens WJ. Inflammation in chronic rhinosinusitis and nasal polyposis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2009;29(4):621-9.
101. Abbas AK LA, Pillai S. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System* 2019.
102. Puposki JA, Uzzaman A, Nagarkar DR, Chustz RT, Peters AT, Suh LA, et al. Increased expression of the chemokine CCL23 in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(1):73-81.e4.
103. Krysko O, Holtappels G, Zhang N, Kubica M, Deswarte K, Derycke L, et al. Alternatively activated macrophages and impaired phagocytosis of *S. aureus* in chronic rhinosinusitis. *Allergy*. 2011;66(3):396-403.
104. Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Hulse KE, Suh LA, Carter R, et al. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(1):49-57.
105. Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Hulse KE, Suh LA, Carter R, et al. Increased expression of factor XIII-A in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):584-92.e4.
106. Voehringer D. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(5):362-75.
107. Pawankar R, Lee KH, Nonaka M, Takizawa R. Role of mast cells and basophils in chronic rhinosinusitis. *Clin Allergy Immunol*. 2007;20:93-101.
108. Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Suh LA, Carter R, Norton J, et al. Glandular mast cells with distinct phenotype are highly elevated in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(2):410-20.e5.
109. Gevaert P, Calus L, Van Zele T, Blomme K, De Ruyck N, Bauters W, et al. Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(1):110-6.e1.

110. Saitoh T, Kusunoli T, Yao T, Kawano K, Kojima Y, Miyahara K, et al. Relationship between epithelial damage or basement membrane thickness and eosinophilic infiltration in nasal polyps with chronic rhinosinusitis. *Rhinology*. 2009;47(3):275-9.
111. Soler ZM, Sauer D, Mace J, Smith TL. Impact of mucosal eosinophilia and nasal polyposis on quality-of-life outcomes after sinus surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010;142(1):64-71.
112. Vlamincx S, Vauterin T, Hellings PW, Jorissen M, Acke F, Van Cauwenberge P, et al. The importance of local eosinophilia in the surgical outcome of chronic rhinosinusitis: a 3-year prospective observational study. *Am J Rhinol Allergy*. 2014;28(3):260-4.
113. Pleass RJ, Lang ML, Kerr MA, Woof JM. IgA is a more potent inducer of NADPH oxidase activation and degranulation in blood eosinophils than IgE. *Mol Immunol*. 2007;44(6):1401-8.
114. Feldman S, Kasjanski R, Poposki J, Hernandez D, Chen JN, Norton JE, et al. Chronic airway inflammation provides a unique environment for B cell activation and antibody production. *Clin Exp Allergy*. 2017;47(4):457-66.
115. Bachert C, Sousa AR, Lund VJ, Scadding GK, Gevaert P, Nasser S, et al. Reduced need for surgery in severe nasal polyposis with mepolizumab: Randomized trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(4):1024-31.e14.
116. Laidlaw TM, Prussin C, Panettieri RA, Lee S, Ferguson BJ, Adappa ND, et al. Dexamipexole depletes blood and tissue eosinophils in nasal polyps with no change in polyp size. *Laryngoscope*. 2019;129(2):E61-e6.
117. Kim JH, Kim GE, Cho GS, Kwon HJ, Joo CH, Kim HS, et al. Natural killer cells from patients with chronic rhinosinusitis have impaired effector functions. *PLoS One*. 2013;8(10):e77177.
118. Kim JH, Choi GE, Lee BJ, Kwon SW, Lee SH, Kim HS, et al. Natural killer cells regulate eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis. *Sci Rep*. 2016;6:27615.
119. Laidlaw TM, Kidder MS, Bhattacharyya N, Xing W, Shen S, Milne GL, et al. Cysteinyl leukotriene overproduction in aspirin-exacerbated respiratory disease is driven by platelet-adherent leukocytes. *Blood*. 2012;119(16):3790-8.
120. Zheng R, Wang D, Wang K, Gao WX, Yang QT, Jiang LJ, et al. Elevated expression of IL-17RB and ST2 on myeloid dendritic cells is associated with a Th2-skewed eosinophilic inflammation in nasal polyps. *Clin Transl Allergy*. 2018;8:50.
121. Shi LL, Song J, Xiong P, Cao PP, Liao B, Ma J, et al. Disease-specific T-helper cell polarizing function of lesional dendritic cells in different types of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(6):628-38.
122. Wang X, Zhang N, Bo M, Holtappels G, Zheng M, Lou H, et al. Diversity of T(H) cytokine profiles in patients with chronic rhinosinusitis: A multicenter study in Europe, Asia, and Oceania. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(5):1344-53.

123. Tsybikov NN, Egorova EV, Kuznik BI, Fefelova EV, Magen E. Anticytokine autoantibodies in chronic rhinosinusitis. *Allergy Asthma Proc.* 2015;36(6):473-80.
124. Wang M, Zhang N, Zheng M, Li Y, Meng L, Ruan Y, et al. Cross-talk between T(H)2 and T(H)17 pathways in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;144(5):1254-64.
125. Ickrath P, Kleinsasser N, Ding X, Ginzkey C, Beyersdorf N, Hagen R, et al. Accumulation of CD69+ tissue-resident memory T cells in the nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. *Int J Mol Med.* 2018;42(2):1116-24.
126. Kato A, Peters A, Suh L, Carter R, Harris KE, Chandra R, et al. Evidence of a role for B cell-activating factor of the TNF family in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(6):1385-92, 92.e1-2.
127. Tan BK, Klingler AI, Poposki JA, Stevens WW, Peters AT, Suh LA, et al. Heterogeneous inflammatory patterns in chronic rhinosinusitis without nasal polyps in Chicago, Illinois. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(2):699-703.e7.
128. Chen JB, James LK, Davies AM, Wu YB, Rimmer J, Lund VJ, et al. Antibodies and superantibodies in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(4):1195-204.e11.
129. Tan BK, Peters AT, Schleimer RP, Hulse KE. Pathogenic and protective roles of B cells and antibodies in patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(5):1553-60.
130. Stevens WW, Lee RJ, Schleimer RP, Cohen NA. Chronic rhinosinusitis pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(6):1442-53.
131. Barham HP, Osborn JL, Snidvongs K, Mrad N, Sacks R, Harvey RJ. Remodeling changes of the upper airway with chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2015;5(7):565-72.
132. Ebenezer JA, Christensen JM, Oliver BG, Oliver RA, Tjin G, Ho J, et al. Periostin as a marker of mucosal remodelling in chronic rhinosinusitis. *Rhinology.* 2017;55(3):234-41.
133. Kountakis SE, Arango P, Bradley D, Wade ZK, Borish L. Molecular and cellular staging for the severity of chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 2004;114(11):1895-905.
134. Van Bruaene N, Bachert C. Tissue remodeling in chronic rhinosinusitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2011;11(1):8-11.
135. Shi LL, Xiong P, Zhang L, Cao PP, Liao B, Lu X, et al. Features of airway remodeling in different types of Chinese chronic rhinosinusitis are associated with inflammation patterns. *Allergy.* 2013;68(1):101-9.
136. Zhang N, Van Crombruggen K, Gevaert E, Bachert C. Barrier function of the nasal mucosa in health and type-2 biased airway diseases. *Allergy.* 2016;71(3):295-307.
137. Ramezanpour M, Moraitis S, Smith JLP, Wormald PJ, Vreugde S. Th17 Cytokines Disrupt the Airway Mucosal Barrier in Chronic Rhinosinusitis. *Mediators of Inflammation.* 2016;2016:9798206.
138. Schleimer RP. Immunopathogenesis of Chronic Rhinosinusitis and Nasal Polyposis. *Annu Rev Pathol.* 2017;12:331-57.

139. Shiono O, Sakuma Y, Komatsu M, Hirama M, Yamashita Y, Ishitoya J, et al. Differential expression of periostin in the nasal polyp may represent distinct histological features of chronic rhinosinusitis. *Auris Nasus Larynx*. 2015;42(2):123-7.
140. Kong DH, Kim YK, Kim MR, Jang JH, Lee S. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4).
141. Batzakakis D, Stathas T, Mastronikolis N, Kourousis C, Aletras A, Naxakis S. Adhesion molecules as predictors of nasal polyposis recurrence. *Am J Rhinol Allergy*. 2014;28(1):20-2.
142. Cerutti A, Chen K, Chorny A. Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:273-93.
143. Pothoven KL, Norton JE, Hulse KE, Suh LA, Carter RG, Rocci E, et al. Oncostatin M promotes mucosal epithelial barrier dysfunction, and its expression is increased in patients with eosinophilic mucosal disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(3):737-46.e4.
144. Shimizu S, Gabazza EC, Ogawa T, Tojima I, Hoshi E, Kouzaki H, et al. Role of thrombin in chronic rhinosinusitis-associated tissue remodeling. *Am J Rhinol Allergy*. 2011;25(1):7-11.
145. Shimizu S, Tojima I, Takezawa K, Matsumoto K, Kouzaki H, Shimizu T. Thrombin and Activated Coagulation Factor X Stimulate the Release of Cytokines and Fibronectin from Nasal Polyp Fibroblasts via Protease-Activated Receptors. *American Journal of Rhinology and Allergy*. 2017;31:13-8.
146. Shimizu S, Ogawa T, Takezawa K, Tojima I, Kouzaki H, Shimizu T. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in nasal mucosa and nasal secretions of chronic rhinosinusitis with nasal polyp. *Am J Rhinol Allergy*. 2015;29(4):235-42.
147. Kim DY, Cho SH, Takabayashi T, Schleimer RP. Chronic Rhinosinusitis and the Coagulation System. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2015;7(5):421-30.
148. Takabayashi T, Schleimer RP. Formation of nasal polyps: The roles of innate type 2 inflammation and deposition of fibrin. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(3):740-50.
149. Karatzanis AD, Samara KD, Antoniou KM, Lymbouridou R, Chatzakis N, Spandidos DA, et al. Investigation of angiogenetic pathways in nasal polyposis. *Mol Med Rep*. 2012;5(5):1158-62.
150. Stevens PR, Tessema B, Brown SM, Parham K, Gronowicz G. Chronic rhinosinusitis osteoblasts differ in cellular properties from normal bone. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2015;5(2):124-31.
151. Wu D, Nocera AL, Mueller SK, Finn K, Libermann TA, Bleier BS. Osteitis is associated with dysregulated pro-osteoblastic activity in patients with nasal polyps. *Laryngoscope*. 2019;129(3):E102-e9.
152. Hoggard M, Nocera A, Biswas K, Taylor MW, Douglas RG, Bleier BS. The sinonasal microbiota, neural signaling, and depression in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2018;8(3):394-405.

153. Wu D, Mueller SK, Nocera AL, Finn K, Libermann TA, Bleier BS. Axonal Guidance Signaling Pathway Is Suppressed in Human Nasal Polyps. *Am J Rhinol Allergy*. 2018;32(4):208-16.
154. Younis RT, Anand VK, Davidson B. The role of computed tomography and magnetic resonance imaging in patients with sinusitis with complications. *Laryngoscope*. 2002;112(2):224-9.
155. Lund V, Mackay I. Staging in Rhinosinusitis. *Rhinology*. 1994;31:183-4.
156. Leopold DA, Stafford CT, Sod EW, Szeverenyi NM, Allison JD, Phipps RJ, et al. Clinical Course of Acute Maxillary Sinusitis Documented by Sequential MRI Scanning. *American Journal of Rhinology*. 1994;8(1):19-28.
157. Lloyd GA, Lund VJ, Scadding GK. CT of the paranasal sinuses and functional endoscopic surgery: a critical analysis of 100 symptomatic patients. *J Laryngol Otol*. 1991;105(3):181-5.
158. Ashraf N, Bhattacharyya N. Determination of the “incidental” Lund score for the staging of chronic rhinosinusitis. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 2001;125(5):483-6.
159. Hill M, Bhattacharyya N, Hall TR, Lufkin R, Shapiro NL. Incidental paranasal sinus imaging abnormalities and the normal Lund score in children. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;130(2):171-5.
160. Zheng Y, Zhao Y, Lv D, Liu Y, Qiao X, An P, et al. Correlation between computed tomography staging and quality of life instruments in patients with chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2010;24(1):e41-5.
161. Brooks SG, Trope M, Blasetti M, Doghramji L, Parasher A, Glicksman JT, et al. Preoperative Lund-Mackay computed tomography score is associated with preoperative symptom severity and predicts quality-of-life outcome trajectories after sinus surgery. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2018;8(6):668-75.
162. Hopkins C, Browne JP, Slack R, Lund V, Brown P. The Lund-Mackay staging system for chronic rhinosinusitis: how is it used and what does it predict? *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007;137(4):555-61.
163. Rudmik L, Mace J, Smith T. Low-stage computed tomography chronic rhinosinusitis: what is the role of endoscopic sinus surgery? *Laryngoscope*. 2011;121(2):417-21.
164. Rudmik L, Hopkins C, Peters A, Smith TL, Schlosser RJ, Soler ZM. Patient-reported outcome measures for adult chronic rhinosinusitis: A systematic review and quality assessment. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(6):1532-40.e2.
165. Hancı D, Altun H, Şahin E, Altıntoprak N, Cingi C. Turkish translation, cross-cultural adaptation and validation of the SinoNasal Outcome Test (SNOT)-22. *ENT Updates*. 2015;5:51-7.
166. Toma S, Hopkins C. Stratification of SNOT-22 scores into mild, moderate or severe and relationship with other subjective instruments. *Rhinology*. 2016;54(2):129-33.
167. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*. 2016;164(3):337-40.
168. Gilbert JA, Blaser MJ, Caporaso JG, Jansson JK, Lynch SV, Knight R. Current understanding of the human microbiome. *Nat Med*. 2018;24(4):392-400.

169. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007;449(7164):804-10.
170. Preston FW. The Commonness, And Rarity, of Species. *Ecology*. 1948;29(3):254-83.
171. Hill MO. Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences. *Ecology*. 1973;54(2):427-32.
172. Whittaker RH. EVOLUTION AND MEASUREMENT OF SPECIES DIVERSITY. *TAXON*. 1972;21(2-3):213-51.
173. Spellerberg IF, Fedor PJ. A tribute to Claude Shannon (1916–2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the ‘Shannon–Wiener’ Index. *Global Ecology and Biogeography*. 2003;12(3):177-9.
174. Simpson EH. Measurement of Diversity. *Nature*. 1949;163:688.
175. Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(5):1576-85.
176. Bray JR, Curtis JT. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*. 1957;27(4):325-49.
177. Edgar RC. Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics*. 2018;34(14):2371-5.
178. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-14.
179. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*. 2005;43(11):5721-32.
180. Lloyd-Price J, Mahurkar A, Rahnavard G, Crabtree J, Orvis J, Hall AB, et al. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature*. 2017;550(7674):61-6.
181. Hoffmann C, Dollive S, Grunberg S, Chen J, Li H, Wu GD, et al. Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS One*. 2013;8(6):e66019.
182. Pride DT, Salzman J, Haynes M, Rohwer F, Davis-Long C, White RA, 3rd, et al. Evidence of a robust resident bacteriophage population revealed through analysis of the human salivary virome. *Isme j*. 2012;6(5):915-26.
183. The Integrative Human Microbiome Project. *Nature*. 2019;569(7758):641-8.
184. Hardy BL, Dickey SW, Plaut RD, Riggins DP, Stibitz S, Otto M, et al. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* Exploits *Staphylococcus aureus* Virulence Components in a Novel Polymicrobial Defense Strategy. *mBio*. 2019;10(1).
185. Yan M, Pamp Sünje J, Fukuyama J, Hwang Peter H, Cho D-Y, Holmes S, et al. Nasal Microenvironments and Interspecific Interactions Influence Nasal Microbiota Complexity and *S. aureus* Carriage. *Cell Host & Microbe*. 2013;14(6):631-40.
186. Bassis CM, Tang AL, Young VB, Pynnonen MA. The nasal cavity microbiota of healthy adults. *Microbiome*. 2014;2(1):27.

187. Zhou Y, Mihindukulasuriya KA, Gao H, La Rosa PS, Wylie KM, Martin JC, et al. Exploration of bacterial community classes in major human habitats. *Genome Biology*. 2014;15(5):R66.
188. Ramakrishnan VR, Feazel LM, Gitomer SA, Ir D, Robertson CE, Frank DN. The Microbiome of the Middle Meatus in Healthy Adults. *PLOS ONE*. 2014;8(12):e85507.
189. Choi CH, Poroyko V, Watanabe S, Jiang D, Lane J, deTineo M, et al. Seasonal Allergic Rhinitis Affects Sinonasal Microbiota. *American Journal of Rhinology & Allergy*. 2014;28(4):281-6.
190. Ruokolainen L, Paalanen L, Karkman A, Laatikainen T, von Hertzen L, Vlasoff T, et al. Significant disparities in allergy prevalence and microbiota between the young people in Finnish and Russian Karelia. *Clinical & Experimental Allergy*. 2017;47(5):665-74.
191. Choi E-B, Hong S-W, Kim D-K, Jeon SG, Kim K-R, Cho S-H, et al. Decreased diversity of nasal microbiota and their secreted extracellular vesicles in patients with chronic rhinosinusitis based on a metagenomic analysis. *Allergy*. 2014;69(4):517-26.
192. Rom D, Bassiouni A, Eykman E, Liu Z, Paramasivan S, Alvarado R, et al. The Association Between Disease Severity and Microbiome in Chronic Rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2019;129(6):1265-73.
193. Ramakrishnan VR, Feazel LM, Abrass LJ, Frank DN. Prevalence and abundance of *Staphylococcus aureus* in the middle meatus of patients with chronic rhinosinusitis, nasal polyps, and asthma. *International Forum of Allergy & Rhinology*. 2013;3(4):267-71.
194. Koeller K, Herlemann DPR, Schuldt T, Ovari A, Guder E, Podbielski A, et al. Microbiome and Culture Based Analysis of Chronic Rhinosinusitis Compared to Healthy Sinus Mucosa. *Front Microbiol*. 2018;9:643.
195. Ramakrishnan VR, Hauser LJ, Feazel LM, Ir D, Robertson CE, Frank DN. Sinus microbiota varies among chronic rhinosinusitis phenotypes and predicts surgical outcome. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(2):334-42.e1.
196. Doty RL. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? *Ann Neurol*. 2008;63(1):7-15.
197. Rey NL, Wesson DW, Brundin P. The olfactory bulb as the entry site for prion-like propagation in neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Disease*. 2018;109:226-48.
198. Gay F. Staphylococcal immune complexes and myelinolytic toxin in early acute multiple sclerosis lesions-An immunohistological study supported by multifactorial cluster analysis and antigen-imprint isoelectric focusing. *Mult Scler Relat Disord*. 2013;2(3):213-32.
199. Maheshwari P, Eslick GD. Bacterial infection and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *J Alzheimers Dis*. 2015;43(3):957-66.
200. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*. 2019;37(8):852-7.

201. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*. 2012;41(D1):D590-D6.
202. Abarenkov K, Zirk A, Piirmann T, Pöhönen R, Ivanov F, Nilsson RH, et al. UNITE QIIME release for Fungi 2. . UNITE Community. 2020(10.15156/BIO/786387).
203. Drake-Lee AB, Lowe D, Swanston A, Grace A. Clinical Profile and recurrence of nasal polyps. *The Journal of Laryngology & Otology*. 1984;98(8):783-93.
204. Bachert C, Zhang N, Holtappels G, De Lobel L, van Cauwenberge P, Liu S, et al. Presence of IL-5 protein and IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins in nasal polyps is associated with comorbid asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(5):962-8, 8.e1-6.
205. Gan W, Yang F, Tang Y, Zhou D, Qing D, Hu J, et al. The difference in nasal bacterial microbiome diversity between chronic rhinosinusitis patients with polyps and a control population. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2019;9(6):582-92.
206. Jain R, Hoggard M, Biswas K, Zoing M, Jiang Y, Douglas R. Changes in the bacterial microbiome of patients with chronic rhinosinusitis after endoscopic sinus surgery. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2017;7(1):7-15.
207. Ramakrishnan VR, Gitomer S, Kofonow JM, Robertson CE, Frank DN. Investigation of sinonasal microbiome spatial organization in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2017;7(1):16-23.
208. Bassiouni A, Cleland EJ, Psaltis AJ, Vreugde S, Wormald PJ. Sinonasal microbiome sampling: a comparison of techniques. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123216.
209. Choi EB, Hong SW, Kim DK, Jeon SG, Kim KR, Cho SH, et al. Decreased diversity of nasal microbiota and their secreted extracellular vesicles in patients with chronic rhinosinusitis based on a metagenomic analysis. *Allergy*. 2014;69(4):517-26.
210. Chalermwatanachai T, Vilchez-Vargas R, Holtappels G, Lacoere T, Jáuregui R, Kerckhof FM, et al. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps is characterized by dysbacteriosis of the nasal microbiota. *Sci Rep*. 2018;8(1):7926.
211. Cleland EJ, Bassiouni A, Vreugde S, Wormald PJ. The bacterial microbiome in chronic rhinosinusitis: Richness, diversity, postoperative changes, and patient outcomes. *Am J Rhinol Allergy*. 2016;30(1):37-43.
212. Bassis CM, Tang AL, Young VB, Pynnonen MA. The nasal cavity microbiota of healthy adults. *Microbiome*. 2014;2:27.
213. Wang JC, Moore CA, Epperson MV, Sedaghat AR. Association of the sinonasal bacterial microbiome with clinical outcomes in chronic rhinosinusitis: a systematic review. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2020;10(4):433-43.
214. Wagner Mackenzie B, Waite DW, Hoggard M, Douglas RG, Taylor MW, Biswas K. Bacterial community collapse: a meta-analysis of the sinonasal microbiota in chronic rhinosinusitis. *Environ Microbiol*. 2017;19(1):381-92.
215. Brook I. Microbiology of Sinusitis. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2011;8(1):90-100.

216. Lee JT, Frank DN, Ramakrishnan V. Microbiome of the paranasal sinuses: Update and literature review. *Am J Rhinol Allergy*. 2016;30(1):3-16.
217. Ashbee HR, Evans EG. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(1):21-57.
218. Gelber JT, Cope EK, Goldberg AN, Pletcher SD. Evaluation of *Malassezia* and Common Fungal Pathogens in Subtypes of Chronic Rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2016;6(9):950-5.
219. Hoggard M, Vesty A, Wong G, Montgomery JM, Fourie C, Douglas RG, et al. Characterizing the Human Mycobiota: A Comparison of Small Subunit rRNA, ITS1, ITS2, and Large Subunit rRNA Genomic Targets. *Front Microbiol*. 2018;9:2208.
220. Mahdavinia M, Engen PA, LoSavio PS, Naqib A, Khan RJ, Tobin MC, et al. The nasal microbiome in patients with chronic rhinosinusitis: Analyzing the effects of atopy and bacterial functional pathways in 111 patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(1):287-90.e4.
221. Abbas EE, Li C, Xie A, Lu S, Tang L, Liu Y, et al. Distinct Clinical Pathology and Microbiota in Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps Endotypes. *Laryngoscope*. 2021;131(1):E34-e44.
222. Coyte KZ, Rakoff-Nahoum S. Understanding Competition and Cooperation within the Mammalian Gut Microbiome. *Curr Biol*. 2019;29(11):R538-r44.
223. Kiryukhina NV, Melnikov VG, Suvorov AV, Morozova YA, Ilyin VK. Use of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* for elimination of *Staphylococcus aureus* from the nasal cavity in volunteers exposed to abnormal microclimate and altered gaseous environment. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2013;5(4):233-8.
224. Uehara Y, Nakama H, Agematsu K, Uchida M, Kawakami Y, Abdul Fattah AS, et al. Bacterial interference among nasal inhabitants: eradication of *Staphylococcus aureus* from nasal cavities by artificial implantation of *Corynebacterium* sp. *J Hosp Infect*. 2000;44(2):127-33.
225. Brugger SD, Eslami SM, Pettigrew MM, Escapa IF, Henke MM, Kong Y, et al. *Dolosigranulum pigrum* cooperation and competition in human nasal microbiota. *bioRxiv*. 2019:678698.
226. Kennedy NA, Walker AW, Berry SH, Duncan SH, Farquarson FM, Louis P, et al. The impact of different DNA extraction kits and laboratories upon the assessment of human gut microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing. *PLoS One*. 2014;9(2):e88982.
227. Jervis Bardy J, Psaltis AJ. Next Generation Sequencing and the Microbiome of Chronic Rhinosinusitis: A Primer for Clinicians and Review of Current Research, Its Limitations, and Future Directions. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2016;125(8):613-21.
228. Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods*. 2013;10(1):57-9.

