T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP ve ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Doç. Dr. Beytullah Karadayı

TÜKÜRÜK MİKROBİYOTASINDAKİ DİŞ TEDAVİSİNE BAĞLI DEĞİŞİMİN ARAŞTIRILMASI: BİR ADLİ AMAÇLI METAGENOMİK ANALİZ ÇALIŞMASI

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FEYZA GÜL

İSTANBUL, 2022

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP ve ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Doç. Dr. Beytullah Karadayı

TÜKÜRÜK MİKROBİYOTASINDAKİ DİŞ TEDAVİSİNE BAĞLI DEĞİŞİMİN ARAŞTIRILMASI: BİR ADLİ AMAÇLI METAGENOMİK ANALİZ ÇALIŞMASI

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FEYZA GÜL

İSTANBUL, 2022

Bu tez projesi İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 35209

Önsöz

İlk ve en büyük teşekkürüm, tez dönemim boyunca esirgemediği vakti, anlayış ve güler yüzü, sonsuz desteği, yaptığım hataları bile başarısızlık olarak hissettirmeyen, henüz tanışmıyorken bana staj imkânı sunan çok değerli danışman hocam, ***Doç. Dr. Beytullah Karadayı***'ya.

Bu çalışmaya finansal destek sağlayan ***İÜ-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi***'ne,

Enstitüye başladığım günden itibaren adaptasyonumda ve çalışmalarımın yönlendirilmesinde, güler yüz ve iyi niyetleriyle desteklerini üzerimde hissettiğim değerli Hocalarım ***Prof. Dr. Emel Hülya Yükseloğlu, Prof. Dr. Gürsel Çetin, Doç. Dr. Gönül Filoğlu, Arş. Gör. Dr. Filiz Ekim Çevik, Araştırmacı Gülten Rayimoğlu*** ve ***Öğr. Gör. Ömer Karataş***'a,

Özellikle laboratuvar çalışmalarım sırasında desteklerini eksik etmeyen değerli hocalarım ***Doç. Dr. Tülin Özbek*** ve ***Dr. Öğr. Üyesi Şükriye Karadayı***'ya,

Bu çalışma için numune bağışında bulunan tüm gönüllü katılımcılara ve numune toplama sürecimde yardımlarıyla birlikte ilgi ve güler yüzlerini esirgemeyen değerli hocalarım ***Dr. Öğr. Üyesi Zeliha Zuhal Yurdabakan, Dr. Öğr. Üyesi Meltem Mert Eren*** ve ***tüm diş hekimi arkadaşları***na,

Çalışmamın metagenomik analiz aşamalarında tavsiyeleriyle bana yol gösteren, desteklerini esirgemeyen ve sorularımı sabırla yanıtlayan ***Ali Arslan, Berkay Ekren*** ve tüm ***GenOva çalışanları***na,

Bu süreçte edindiğim, verdikleri moral ve yardımlar için sevgili arkadaşlarım ***Fatma Beyza Kula*** ve ***İlkgül Akmayan***'a

Sevgili ***AİLEM***'e ve bu süreçte her an desteğini hissettiğim yol arkadaşım ***Abubaker Ahmed Mahjoob***'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım..

İçindekiler

Önsöz i
Şekiller Dizini iv
Tablolar Dizini vi
Kısaltmalar viii
Özet 1
Abstract 3
1. Giriş ve Amaç 5
2. Genel Bilgiler 11
2.1. Mikrobiyoloji ve Adli Bilimler 11
2.2. Adli Mikrobiyoloji ve Kimliklendirme 14
2.3. Genetik Materyal Aktarımı 19
2.4. Mikrobiyom- İnsan Mikrobiyomu 21
2.5. Mikrobiyota Çalışmalarında Kullanılan Moleküler Tanı Yöntemleri 25
2.5.1. Kültür-Temelli Yöntemler 25
2.5.2. Kültür-Bağımsız Yöntemler 26
2.6. İnsan Ağız (Oral) Mikrobiyomu 27
2.6.1. Sağlıklı Ağız Mikrobiyomu 33
2.7. Tükürük ve Tükürük Mikrobiyomu 34
2.8. Çürükler ve Çürük Lezyonları 38
2.8.1. Mine, Dentin ve Sement Çürükleri 40
2.8.2. Çürük Mikrobiyolojisi 41
2.8.3. Çürük Diş Dokularının Muayenesi 45
2.8.4. Çürük Muayenesinde Kullanılan Tanı Yöntemleri 46
2.8.5. Uluslararası Çürük Tespit ve Değerlendirme Sistemi II – ICDAS II 49
2.8.6. ICDAS II Çürük Skorları 50
2.9. DNA Dizileme Yöntemleri 50
2.9.1. Birinci Nesil Dizileme Teknikleri (Klasik Dizileme) 51
2.9.2. Yeni Nesil Dizileme (YND) Teknolojileri 52
2.9.2.1. Oxford Nanopor Teknolojisi (ONT) 53
2.9.2.2. YND Teknolojilerinin Kullanım Alanları 54
2.9.2.2.1 Metagenomik 55

3. Gereç ve Yöntem 60
3.1. Örneklem Grubu Seçimi ve Örnek Alımı 60
3.2. Klinik Muayene ve ICDAS II Skorlarının Belirlenmesi 62
3.3. Örneklerin Saklanması 64
3.4. Çalışmada Kullanılan Malzemelerin Listesi 64
3.5. Tükürük örneklerinden DNA izolasyonu 65
3.6. DNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi 67
3.7. YND Çalışması (16S rRNA Sekanslama) 68
3.7.1. PCR Yöntemi ile 16S rRNA Geni V1-V9 Bölgelerinin Çoğaltılması 69
3.7.2. 16S rRNA Tüm Bölge (V1-V9) Dizileme İçin Kütüphane Oluşturulması 70
3.7.3. YND Sonucu Elde Edilen Verilerin Biyoinformatik Analizi 71
3.7.4. YND Sonucu Elde Edilen Verilerinin İstatistiksel Analizi 71
4. Bulgular 73
4.1. Çalışma Gruplarına Ait Özellikler 73
4.2. ICDAS II Skor Verileri 75
4.3. DNA Miktar Tayini Sonuçları 76
4.4. Çalışma Gruplarına Ait Metagenomik Analiz Bulguları 77
4.4.1. Taksonomik Sınıflandırma Sonuçları 79
4.4.2. Tür Düzeyinde Oluşturulan Sıcaklık Haritası 101
4.4.3. Çeşitlilik Analizleri 102
4.4.4. Karar Ağacı Analizi 110
5. Tartışma 113
6. Sonuç 126
7. Kaynaklar 128
EKLER 150
ÖZGEÇMİŞ 156

Şekiller Dizini

Şekil 1 : İnsan genomu ve insan mikrobiyomu karakterizasyonunu içerecek şekilde genişletilmiş insan araştırma ve adli tıp testi diyagramı…..…… 24

Şekil 2 : Ribozom kompleksi ve 16S rRNA geninin şeması. Gri ve beyaz kutular sırasıyla korunan bölgeleri ve hiperdeğişken bölgeleri göstermektedir… 57

Şekil 3 : Oxford Nanopore Teknolojilerine (ONT) dahil olan MinION Mk1B cihazı……...…… 78

Şekil 4 : Oxford Nanopore Teknolojilerinde (ONT) kullanılmak üzere tasarlanmış akış hücresi (FlowCell)……..…… 78

Şekil 5 : Hasta ve kontrol gruplarının şube düzeyindeki taksonomik içeriklerinin bağıl bolluk değerleri ortalamalarını gösteren grafik…..…… 80

Şekil 6 : Tedavi/kontrol öncesi örneklerin şube düzeyinde taksonomik içeriğinin bağıl bolluk değerlerini gösteren grafik……..……... 81

Şekil 7 : Tedavi/kontrol sonrası örneklerin şube düzeyinde taksonomik içeriğinin bağıl bolluk değerlerini gösteren grafik……..…… 83

Şekil 8 : Tedavi/kontrol öncesi ve sonrası grupların tükürük mikrobiyomlarında sık tespit edilen bakteri cinslerinin ortalama göreceli bolluğu. "Others", tespit edilen diğer cinsleri temsil etmektedir…… 85

Şekil 9 : Tedavi/kontrol öncesi alınan tükürük örneklerinin cins düzeyinde taksonomik içeriğinin bağıl bolluk değerleri……..…….. 88

Şekil 10 : Tedavi/kontrol sonrası alınan tükürük örneklerinin cins düzeyinde taksonomik içeriğinin bağıl bolluk değerleri……..…..... 90

Şekil 11 : Tükürük mikrobiyomunda sık tespit edilen bakteri türlerinin ortalama göreceli bolluk değerlerini gösteren grafik (%). "Others", tespit edilen diğer türleri temsil etmektedir……... 93

Şekil 12 : Tedavi/kontrol öncesi grubun bireyleri için tükürük mikrobiyomunda en sık tespit edilen bakteri türlerinin bolluk değerlerini gösteren grafik... 96

Şekil 13 : Tedavi/kontrol sonrası grubun bireyleri için tükürük mikrobiyomunda en sık tespit edilen bakteri türlerinin bolluk değerlerini gösteren grafik.. 98

Şekil 14 : Tedavi/kontrol öncesi ve sonrası alınan tükürük örneklerindeki tür düzeyinde karşılaştırmalı kümeleme ve sıcaklık haritası…….. 101

Şekil 15 : Hesaplanan Shannon indeksine göre alfa değerleri……... 103

Şekil 16 : Hesaplanan Inverse Simpson indeksine göre alfa değerleri…….. 104

Şekil 17 : Tedavi öncesi ve sonrası alınan tükürük örneklerinin cins düzeyinde hesaplanan ve Bray-Curtis farklılık indekslerine göre oluşturulan Temel Koordinat Analizi (PCoA) grafiği……... 105

Şekil 18 : Tedavi öncesi ve sonrası alınan tükürük örneklerinin tür düzeyinde hesaplanan ve Bray-Curtis farklılık indekslerine göre oluşturulan Temel Koordinat Analizi (PCoA) grafiği……..……. 108

Şekil 19 : Tedavi öncesi ve sonrası örneklerin karar ağacı modeli…… 111

Tablolar Dizini

Tablo I : 16S rRNA geninin yüksek değişkenlik gösteren bölgelerinin başlangıç ve bitiş pozisyonları……... 59

Tablo II : Çalışmada kullanılan laboratuvar alet ve gereçlerinin listesi…….... 65

Tablo III : DNA izolasyonu yapılan örneklerin PCR reaksiyon bileşenleri….. 70

Tablo IV : 96-well plate`e hazırlanan karışıma uygulanan amplifikasyon aşamaları……... 70

Tablo V : Çalışma gruplarına ait özellikler……... 74

Tablo VI : Çalışma kapsamındaki bireylerin çürük dişlerine ait ICDAS II skor verileri……..... 75

Tablo VII : Genomik DNA'ların spektrofotometrik ölçüm değerleri…….. 76

Tablo VIII : Hasta ve kontrol gruplarında görülen şubelerin ortalama değerleri (%) …….. 79

Tablo IX : Tedavi/kontrol öncesi örneklerin şube düzeyinde taksonomik içeriğinin bağıl bolluk değerleri (%)…….. 81

Tablo X : Tedavi/kontrol sonrası örneklerin şube düzeyinde taksonomik içeriğinin bağıl bolluk değerleri (%)…….. 82

Tablo XI : Tükürük mikrobiyomunda sık tespit edilen bakteri cinslerinin ortalama göreceli bolluk değerleri (%)……. 84

Tablo XII : Tedavi/kontrol öncesi grubun bireyleri için tükürük mikrobiyomunda en sık tespit edilen 13 bakteri cinsinin bağıl bolluk değerleri (%)……. 87

Tablo XIII : Tedavi/kontrol sonrası bireylerin tükürük mikrobiyomunda görülen cinslerin göreceli bolluk değerleri (%)……... 89

Tablo XIV : Tükürük mikrobiyomunda sık tespit edilen bakteri türlerinin ortalama göreceli bolluk değerleri (%)……. 92

Tablo XV : Tedavi/kontrol öncesi grubun bireyleri için tükürük mikrobiyomunda en sık tespit edilen bakteri türlerinin bolluk değerleri (%)……. 95

Tablo XVI : Tedavi/kontrol sonrası grubun bireyleri için tükürük mikrobiyomunda en sık tespit edilen bakteri türlerinin bolluk değerleri (%)……. 97

Tablo XVII : İstatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren bakterilerin göreceli bolluklarının medyan değerleri ve buna bağlı olarak değişim miktarları……... 100

Tablo XVIII : Tedavi/kontrol öncesi ve sonrası alınan tükürük örneklerinin cins düzeyinde belirlenen Bray Curtis uzaklık metrikleri……. 107

Tablo XIX : Tedavi/kontrol öncesi ve sonrası alınan tükürük örneklerinin tür düzeyinde belirlenen Bray Curtis uzaklık metrikleri……. 109

Tablo XX : Oluşturulmuş karar ağacı modelinde, hasta ve tedavi olmuş bireylerin sınıflandırması sonucunda ulaşılan toplam doğruluk, özgüllük ve hassaslık seviyeleri…… 112

Kısaltmalar

µl	Mikrolitre
AC	After Control (Kontrol Sonrası)
ADA CCS	Amerikan Diş Hekimleri Birliği Çürük Sınıflandırma Sistemi
ark.	Arkadaşları
AT	After Treatment (Tedavi Sonrası)
BC	Before Control (Kontrol Öncesi)
bç	Baz Çifti
BT	Before Treatment (Tedavi Öncesi)
CA	Çürük Aktif (Caries Active)
CAST	Çürük Değerlendirme Spektrumu ve Tedavisi İndeksi
CF	Çürüksüz (Caries Free)
DMF	Çürük-Eksik-Dolgulu Diş İndeksi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FDI	Federation Dentaire Internationale Numbering System
FOTI	Fiber Optik Transillüminasyon
HGP	İnsan Genom Projesi (Human Genome Project)
HMP	İnsan Mikrobiyom Projesi (Human Microbiome Project)
HOM	İnsan Oral Mikrobiyomu (Human Oral Microbiome)
HOMD	İnsan Oral Mikrobiyom Veritabanı (Human Oral Microbiome Database)
ICCMS	Uluslararası Çürük Sınıflandırması ve Yönetim Sistemi

ICDAS	Uluslararası Çürük Tespit ve Değerlendirme Sistemi (Internatıonal Carıes Detectıon And Assessment System)
LCN	Düşük Kopya Sayılı (Low Copy Number)
ml	Mililitre
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
ng	Nanogram
NIDCR	Diş ve Kraniyofasyal Araştırma Ulusal Enstitüsü (The National Institute of Dental and Craniofacial Research)
NIH	Amerika Ulusal Sağlık Enstitüleri (National Institute of Health)
NYVAD	Evrensel Görsel Skorlama sistemi (Universal Visual Scoring Sistem)
ONT	Oxford Nanopor Teknolojisi
ort.	Ortalama
OTU	Operasyonel Taksonomik Ünite
PCoA	Temel Koordinat Analizi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QLF	Kantitatif Işık Etkili Floresan Yöntemi
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
spp.	Türleri (Species)
STR	Kısa Tekrar Dizileri (Short Tandem Repeat)
YND	Yeni Nesil Dizileme

Özet

Geleneksel yöntemlerin yanında yeni nesil dizileme tekniklerinin kullanıma girmesiyle mikrobiyomların adli amaçlı olarak kişilerin kimliklendirilmesinde kullanılabilirliği üzerine çalışmalar da hız kazanmıştır. Bu nedenle, kişilere ait biyolojik örneklerin mikrobiyota yapısının ve hangi faktörlere göre değişim gösterdiğinin iyi bilinmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında, bakteriyel 16S rRNA geninin değişken tüm bölgelerinin (V1 – V9) dizilişine dayanan bir yaklaşım aracılığıyla, diş çürüğü bulunan bireylerin tedavi öncesi ve tedavi sonrası tükürüklerindeki mikrobiyota yapısının adli ve klinik bakış açısı ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Amaç doğrultusunda, yaşları 18-50 arasında en az üç derin dentin çürüğü bulunan (ICDAS II > 4) 8 hasta ve herhangi bir diş ve diş eti rahatsızlığı bulunmayan (ICDAS II = 0) 2 kişi kontrol amaçlı çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta bireylerden tedavi öncesi (BT) ve tedavi sonrası (AT) olmak üzere tükürük örnekleri toplanmıştır. Kontrol grubundan ise birer ay ara ile ikişer (BC-AC) tükürük örneği alınmıştır. Toplamda alınan 20 tükürük örneğinin mikrobiyomlarındaki bakteriyel dağılım belirleme çalışmaları, Oxford Nanopor Teknolojilerine dahil olan MinION cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Veriler üzerinden biyoinformatik analizler yapılmış; sonuçlar amaç kapsamında istatistiksel karşılaştırma yöntemleri ve alfa/beta çeşitlilik analizleri ile değerlendirilmiştir.

Sonuçlarımızı, kullandığımız uzaklık metriklerine göre değerlendirdiğimizde aktif çürük dişlere sahip bireylerin tükürüklerindeki mikrobiyal komposizyonların

tedavi sonrasında da nispeten kararlı kaldığı görülmüştür. Bununla birlikte analiz sonuçlarına göre *Schaalia odontolytica* ve *Tannerella spp.* türlerinin de dahil olduğu toplam 28 cins ve tür düzeyinde bakterinin göreceli miktar seviyelerinin, bireylerin tedavi öncesi ve sonrasındaki bakteriyel dağılımlarında, anlamlı farklılık gösterdikleri tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Sonuç olarak, çürük diş tedavisi sonrasında tükürük mikrobiyom komposizyonu nispeten stabil kalmasına rağmen özellikle tür düzeyinde her iki örnek grubu arasında pek çok bakteri türü açısından önemli değişim olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlarımız, insan mikrobiyom çeşitliliğinin adli ve klinik amaçlı daha ileri çalışmaları ve bir bireyin tükürük mikrobiyomunu etkileyen faktörlerin araştırılması için bir çerçeve sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Oral mikrobiyota, Diş tedavisi, Adli kimliklendirme, Mikrobiyom, Metagenomik analiz.

Abstract

Starting to use new-generation sequencing techniques beside the traditional methods, the studies on microbiomes that are used on identification of individuals for forensic aims have been accelerated. Therefore, it is crucial to know the microbiota structure of the biological samples of individuals and according to what factors it may differ.

In this thesis, it is aimed to compare the microbiota structure of salivas before and after treatment of individuals who have caries with a forensic and clinical viewpoint via an approach of sequencing the whole hypervariable regions (V1 – V9) of bacterial 16S rRNA genes. To realize this aim, 8 individuals who are between 18-50 having at least three deep tooth decay (ICDAS II > 4) and 2 individuals who have no tooth problems or periodontitis (ICDAS II = 0) are included in the study. The saliva samples were collected before (BT) and after treatment (AT) from the individuals who have dental caries. Saliva samples were collected twice (BC-AC) from each individual in the control group in a month. The studies of determining bacterial distribution of total 20 saliva samples have been done by MinION device which belongs to Oxford Nanopore Technologies. Bioinformatic analysis were carried out according to the outcomes; the results were evaluated by statistical comparing methods and alfa/beta variety analysis within the scope of the purpose.

When we evaluate the results according to distance metrics that we used, the microbial composition of saliva in individuals who have active caries has been

observed to be relatively stable. According to the results of the analysis, it has been observed that the relative abundance values of total 28 genera and species levels of bacteria which also include *Schaalia odontolytica* and *Tannerella spp.*, were found to differ significantly in bacterial distribution of individuals before and after treatment ($p<0.05$).

In conclusion, although the saliva microbiome composition remained relatively stable after decayed tooth treatment, it was found that there was a significant change in many bacterial species, especially at the species level, between both sample groups. Our results provide a framework for further forensic and clinical studies of human microbiome diversity and the study of factors affecting an individual's salivary microbiome.

Keywords: Oral microbiota, Dental treatment, Forensic identification, Microbiome, Metagenomic analysis.

1. Giriş ve Amaç

Adli moleküler genetik alanında özellikle bakterilerin tespitine yönelik son teknolojik gelişmeler ışığında, kimliklendirme vakalarının çözümünde mevcut DNA analiz yöntemleri ile sonuç alınamadığında; delil olarak şüphelinin ya da olay yerindeki adli biyolojik örneğin içerdiği mikrobiyomların (vücudumuzdaki patojen, simbiyotik ya da kommensal tüm mikroorganizmalar) (1,2) kullanılabileceği birçok araştırıcı tarafından ortaya konulmakta (3) ve bu alan adli mikrobiyolojinin geleceği olarak düşünülmektedir (4,5). Yeni doğan bebekteki mikrobiyota yapısının moleküler yöntemler kullanılarak incelendiği çalışmalarda, tamamen steril bir şekilde dünyaya gelen fetüsün doğum kanalından ilk geçtiği andan itibaren normal bir bakteri florasının anneden çocuğa direkt olarak iletilmesi ile bebekte kolonize olduğunu ve yine ağız yoluyla da vücudun diğer bölümlerine iletildiği gösterilmektedir (6).

Her insan spesifik bir mikrobiyal parmak izi taşır ve bu izleri, deri-yüzey ilişkisi, solunum aktivitesi, konuşma, öpme vb. gibi sebeplerle birçok farklı şekilde çevreye yayar (7-11).

Son yıllarda gerçekleştirilen insan mikrobiyom çalışmalarında; hem kişinin değişik vücut bölgelerinde hem de kişiler arasında, bakteriyel kompozisyon bakımından önemli farklılıklar olduğu gösterilmiştir (7). Hatta ikizlerde bile mikrobiyom topluluğu çok benzer olmasına rağmen aynı değildir (4,5,7).

Ağız boşluğu, insan vücudunda ekolojik koşullarının sürekli değişiklik gösterdiği, her birinin kendi karakteristik özelliği olan dişler, yanak, tükürük gibi farklı yapılar bulunduran eşsiz bir ekosistemdir. Ağızdaki bu farklı yapılar, mikroorganizmaların gelişimini teşvik eden ayrı ekolojik ortamlar oluşturur ve her ortam kendine özgü bir mikrobiyoma sahiptir (6).

Tüm ağız boşluğu, sayısız miktarda farklı biyolojik olarak aktif bileşen içeren zengin bir salgı olan ayrıca farklı dokular arasında tampon görevini üstlenen tükürük ile sürekli nemlendirilir (6). Tükürük, aynı zamanda bir dağıtım sistemi olarak kullanılmasıyla birlikte; vücut durumunun bir yansıması olarak genel sağlığı, hastalığın başlangıcını ve ilerlemeyi izlemek için de kullanılabilir (6,12). Literatürde tükürük mikrobiyomunun metagenomik analizinin adli amaçlı kullanılabileceğine yönelik çalışmaların sayısı her geçen gün artış göstermektedir (7,13-15).

Tükürükte bulunan bakteri türlerinin bazılarının, özellikle diş çürüğü ve diş eti rahatsızlıklarının gelişimiyle yakından ilişkili olabileceği klinik amaçlı gerçekleştirilen sınırlı sayıda çalışmada gösterilmiştir (16,17).

Mikrobiyal, genetik, immünolojik, davranışsal ve çevresel faktörler de dahil olmak üzere çeşitli faktörler diş çürüğünün oluşumuna ve gelişimindeki biyolojik sürece katkıda bulunur (6). Ayrıca bu faktörler mikrobiyal metabolik aktiviteyi de etkileyebilir ve bu da oral mikrobiyotayı değiştirebilir ve daha patojenik bir mikrobiyom olışumunu destekler. Bu nedenle, oral mikrobiyomun bileşimi ve

biyokimyasal aktivitelerinde meydana gelen değişiklikler diş çürüğünün belirleyicisi olabilir (18).

Sağlıkla ve çürüklerle ilişkili tespit edilen oral mikrobiyomun bileşimi hakkında edinilen bilgiler, bu mikrobiyal topluluğun mevcut çürüğe nasıl ve ne kadar katkıda bulunduğunu yorumlamak için temel bir bilgi sağlar. Moleküler dizilerin karşılaştırılmalı analizi, filogenetik ilişkileri belirlemede güçlü bir yaklaşım haline gelmiştir. Karmaşık bir mikrobiyal topluluktaki mikroorganizmaların sayısını ve filogenetik ilişkilerini belirlemeye yönelik ilk çalışmalar, organizma karışımlarında nispeten iyi korunmuş 16S rRNA genlerinin analizini içermektedir (19). Karmaşık mikrobiyal topluluklar hakkında daha ayrıntılı bilgi sunma potansiyeline sahip olan bu moleküler yöntemler, insan ağız boşluğu, yemek borusu, kolon ve dışkı gibi bölgelerin mikroflorasını karakterize etmek için kullanılmıştır ve birçok yeni, kültüre edilememiş bakteri türünü ortaya çıkarmıştır (1,19-24).

Çürüklerle ilişkili mikrobiyota hakkında geleneksel teknikler kullanılarak yapılan çalışmalardan; *Lactobacillus* ve *Actinomyces* türlerine ek olarak *Streptococcus mutans*'ın çürüklerle ilişkili ana patojen olduğu bilgisi edinilmiştir (25,26). Kültürden bağımsız araştırmalar (örneğin, 16S gen analizi), kültür çalışmalarından elde edilen bulguları destekleyerek, çürüklerle ilişkili daha fazla bakteri çeşitliliğini ortaya koymuştur. Bunlar arasında *S. mutans*, mutans olmayan streptokoklar ve *Actinomyces, Bifidobacterium, Lactobacillus, Propionibacterium, Veillonella* ve *Atopobium* cinslerinin çeşitli türleri vardır. Bu tür zenginliği oral, mikrobiyomda yeni nesil dizileme (YND)

çalışmalarıyla geleneksel tekniklerden daha fazla bakteriyel topluluk bilgisi ortaya çıkardığını göstermektedir (26,27).

Cinsel saldırıların aydınlatılmasında, biyolojik örneğin identifikasyonu adli bilimlerin en önemli çalışma alanlarından birini oluşturur. Çeşitli kısa ardışık tekrar (STR) lokusları, Y-STR, mini-STR ve mitokondriyal DNA (mtDNA) da adli olayların çözümü için kullanılan teknikler arasında olmasına rağmen olay yerinde her zaman yeterli miktar ve kalitede uygun örneğin bulunması mümkün olmadığından, onun yerine latent örnek olarak adlandırılan kişinin vücudundaki mikroorganizmaların oluşturduğu örnekler, hemen hemen tüm olgularda bulunabilmektedir. Nitekim, bakteri DNA'sının, insan DNA'sından daha iyi korunmuş olması ve degredasyona daha dirençli olması sebebiyle bir yüzeydeki kalıcılığının çok daha fazla olması onun adli çalışmalardaki en önemli avantajını oluşturmaktadır. Tükürük örneği, kriminal olaylarda kullanılan sperm ve kan gibi biyolojik sıvıların aksine, steril değildir. Tükürüğün her ml'sinde yaklaşık 500 milyon kadar bakteri hücresi ve en az 700 farklı bakteri türü bulunmaktadır (20,28,29). Bilim insanları, bu bakteri çeşitliliği üzerine yapılan genetik düzeydeki araştırmaların tıp ve adli bilimler alanında geniş bir kullanım potansiyeli olduğunu belirtmektedir (14,29).

Lazarevic ve ark. yaptığı çalışmaya göre; tükürük mikrobiyal topluluğu, en az 5 gün boyunca stabil kalmış, hatta mevcut tüm örnekler daha uzun zaman aralıklarına dahil edildiğinde bile (29 güne kadar) bu gözlem doğrulanmıştır ve bu sonuçların, kişiye özel taksonların kalıcılığına işaret ettiği düşünülmektedir. Bakterilerin nispi

oranları değişebilmekle birlikte, bileşiminin göreceli olarak kararlı olduğu, hatta bakteriyel mikrobiyota kullanılarak iki kişiyi ayırmanın mümkün olabileceği ileri sürülmektedir (30). Fakat bireyin diş tedavisi görmesi, antibiyotik kullanımı veya günlük hayatta yaşam tarzındaki ani değişikliklerin olmasının vücuttaki mikrobiyota yapısını bir miktar değiştirebileceği bilinmektedir (6,30-34). Mikrobiyom çeşitliliğinin adli araştırmalardaki önemi kişinin nadir rastlanan bir bakteriyel türü bulundurması durumunda daha da artmakta ve önemli sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır (4). Özellikle olay yerinde bırakılma ihtimali çok yüksek olan biyolojik örneklerden tükürükte bulunan ve doğru şekilde belirlenen bakteri çeşitleri herkeste farklılık göstereceğinden, adli vakaların aydınlatılmasında da değerli bilgiler sağlaması beklenmektedir.

Mikrobiyotanın adli uygulamalarda kullanılabilmesi için tükürük mikrobiyal florasının oluşumunda etkili faktörlerin bilinmesi ve etkilerinin iyi ortaya konulması gerekmektedir. Tükürük mikrobiyomunun diş tedavisi ile zamana bağlı değişiminin tespiti ile ilgili verilere ulaşılması, adli bilimler ve klinik bilimler için önemli bir veri grubunu oluşturacaktır. Oral mikrobiyota bileşimini etkileyen faktörler arasında yaş, cinsiyet, beslenme alışkanlıkları, sigara içme, ağız hijyeni, bir hastalığa sahip olma, antibiyotik kullanımı ve muhtemel genetik faktörler yer alır. Tükürük mikrobiyotası metagenomik analizi, zaman içinde konuya özgü gruplamaları ortaya çıkardığından, farklı faktörlerin etkisine ve mikrobiyota değişikliklerinin dinamiklerine ilişkin biyobelirteçleri saptamak için çok sayıda denek üzerinde uzun vadeli bir araştırma

yapmak, alana büyük ölçüde fayda sağlayacaktır. Gerçekleştirdiğimiz literatür taramalarında, tükürük örneklerinin mikrobiyom komposizyonunun diş tedavisine bağlı değişimi ve stabilizasyonunun metagenomik analiz ile ortaya konulduğu adli amaçlı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında, bakteriyel 16S rRNA geninin değişken tüm bölgelerinin (V1 – V9) dizilişine dayanan bir yaklaşım aracılığıyla, diş çürüğü bulunan bireylerin tedavi öncesi ve tedavi sonrası tükürüklerindeki mikrobiyota yapısının adli ve klinik bakış açısı ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Böylelikle, başta cinsel saldırılar olmak üzere bir adli olayın failinin herhangi bir yerde veya herhangi bir obje üzerinde bıraktığı tükürük izinden yararlanılarak, o kişiye ait ağız hijyeni ile ilgili bilgi elde edilebilmesi mümkün olabilecektir. Bunun yanında bu çalışmada, bir kimliklendirme biyobelirtecinde olmazsa olmaz kriter olan "zaman içinde kararlı kalma" koşulunun karşılanıp karşılanmadığı, çürük diş tedavileri açısından değerlendirilme imkânı bulunacaktır. Ayrıca elde edilen veriler klinik bakış açısı ile de kısaca yorumlanacaktır.

2. Genel Bilgiler

2.1.Mikrobiyoloji ve Adli Bilimler

Bilim adamlarının kommensal ve patojenik mikrobiyal toplulukların insan sağlığı ve hastalığında oynadıkları rolleri keşfetme uğraşları M.Ö. 400'lere dayanmaktadır (35).

1600`lü yıllarda, üniversite mezunu bile olmayan lakin evrensel olarak mikrobiyolojinin babası olarak kabul edilen Antonie van Leeuwenhoek, oldukça basit, tek lensli el tipi mikroskoplar yaptı. Uygun aydınlatmaya sahip bu mikroskoplar, nesnelerin 275 kattan fazla büyütülmesine izin verdi ve bunları kullanarak, "hayvancıklar" olarak adlandırdığı bakterileri ilk gören kişi oldu (35). Farklı koşullarda denemeler yaparak kendi dişlerindeki bakterileri de keşfetmeye çalışan Leeuwenhoek, ağzımızda yaşayan "hayvancıklar"ın ne kadar kalabalık olduklarını da belirtti. Bu diş çalışmaları, canlı bakterilerin ilk gözlemleriydi. Ayrıca kan hücrelerini keşfeden ve hayvanlarda canlı sperm hücrelerini gören ilk kişi oldu (35,36).

Başlangıçta toplumu etkileyen bulaşıcı hastalıkların nedenlerini açıklamaya odaklanan mikrobiyoloji, zamanla bilimin birçok ihtiyacını karşılayan ve pratik uygulamalarını içeren zengin bir tarihe sahip olmuştur.

1800'lerin sonlarına doğru Louis Pasteur, yaptığı deneylerde şarap ve süt ürünlerinin neden ekşi olduğunu keşfetmek için çok sayıda çalışma yaptı ve bundan bakterilerin sorumlu olduğunu buldu. Pasteur, bu konuyla ilgili "eğer bakteriler şarabı

'hastalaştırabiliyorsa', o zaman belki de insan hastalıklarına da neden olabilecekler" düşüncesini öne sürerek, mikroorganizmaların günlük yaşamdaki önemine dikkat çekti. Yine 1900`lü yıllarda Alman bilim adamı Robert Koch`un yaptığı çalışmalarla bu teori kanıtlanmış oldu (37). Ayrıca Pasteur`un bu sorunu çözmesinden yaklaşık 200 yıl önce kontaminasyon etkeninin farkında olan Leeuwenhoek "küçük hayvanlar" diye tabir ettiği bakterileri başka kaynaklardan getirmemeye özen göstererek, bir çok değişik kaynaktan topladığı su numunelerini, farklı koşulları da göz önünde bulundurarak (zaman, hava durumu, kaynak, vb) incelemiş ve her durumda, farklı hayvancık (bakteri) popülasyonlarını tanımlamıştır (35). Sonrasında Leeuwenhoek`un çalışmalarını mikroskop altında gözlemleyen çok yönlü bilim insanı Robert Hooke "Görünmez miktarda maddede bu kadar sonsuz sayıda hayvan olması çok harika görünüyor" diye belirtmiştir (35). Mikrobiyoloji tarihinde sıklıkla gözden kaçan bir figür olan Hooke`un 1665 yılında yayınladığı kitabı Micrographia, Leeuwenhoek'un kendi mikroskobik çalışmalarına başlaması için önemli bir ilham kaynağı olmuştu (35).

Tek lensli mikroskopların artık çok yetersiz kalmasıyla, daha dayanıklı ve daha iyi gözlemler yapabilen, çift lensli mikroskoplar üretilmiş, devamında da elektron mikroskobu geliştirilmiş ve mikrobiyolojinin temelleri genişlemeye başlamıştı (35,38).

Mikrobiyolojinin başlıca çalışma grupları bakteriler, algler, mantarlar, virüsler ve protozoalardır. Mikroorganizmaların bu devasa çeşitliliğinin arasında en çok

çalışılmış olanlar hem çevreye hem de insan bedenine büyük etkileri olan bakterilerdir (38).

2001'de Amerika Birleşik Devletleri'nde meydana gelen şarbon mektubu saldırılarının dünyayı yeni bir gerçekliğe taşımasıyla olay, o dönemki bilim camiasının salgınla ve bu tarz saldırılarla ilişkili biyolojik kanıtları karakterize etmeye ne yazık ki hazırlıksız olduğunu gösterdi. Bu olay sonrasında, mikrobiyoloji alanı bu gibi biyoterörist olaylarının araştırılmasına yardımcı olmak için adli anlamda geliştirilmeye başlandı (39).

Son yıllarda daha çok gelişen ve kullanımı yaygınlaşan mikrobiyal adli tıp, özellikle biyolojik kökenli suçlar, biyoterörizm, besin zehirlenmesi veya direkt mikrobiyoloji ile ilgili olmasa da bir cinayet veya cinsel saldırı gibi adli vakaları aydınlatmaya çalışmaktadır. Bu kapsamda adli mikrobiyoloji, mikrobiyolojiden daha çok yardım alabileceğimiz durumlarda, kolluk kuvvetlerinin müdahalesini güçlendirmek için eldeki delilleri mikrobiyolojik açıdan analiz eden yeni bilimsel tekniklerle gelişmeye devam etmektedir. Araştırma ve geliştirmedeki ilerlemeler; adli mikrobiyoloji alanını destekleyen yeni teknolojiler, araçlar ve analitik keşiflere yol açmıştır. Bu araçlar aynı zamanda cinsel istismar ve diğer fiziksel suçların aydınlatılmasında patojenik mikroorganizmaların bulaşma yollarını araştırmak için de kullanılabilmektedir (40-43). Adli mikrobiyoloji alanı; adli bilimlerin başta mikrobiyoloji olmak üzere, genetik, biyoinformatik, immünoloji, popülasyon genetiği,

biyokimya, moleküler biyoloji, epidemiyoloji gibi birden fazla uzmanlık ağı ile iş birliği üzerine kurulmuştur (39).

2.2.Adli Mikrobiyoloji ve Kimliklendirme

Ceza ve hukuk davalarında iz miktardaki kanıtları incelemenin iyileştirilmesi, genel olarak adli inceleme uzmanlarının odak noktasıdır. Son zamanlarda, suç olaylarını aydınlatmak, bir suçun failini bulmak veya masumları korumak amacıyla mikrobiyotanın kullanımını kapsayan yöntemler hızla gelişmiş ve tamamlayıcı seçenekler sunmuştur. Mikrobiyolojik kanıtları karakterize ederek adli davaların aydınlatılmaya çalışıldığı disiplin ise adli mikrobiyoloji olarak tanımlanır (40,44,45).

İnsan genomundaki kimliklendirme, akrabalık, soy ve fenotip gibi durumlar ile ilgili genomdaki stabil kalıtsal belirteçlerin analizi için insan deoksiribonükleik asit (DNA) moleküllerine dayalı kimlik testleri yapılırken; adli mikrobiyom testleri bireylerin diyet, sağlık, yakın zamandaki coğrafi konumunu belirleme veya ölüm sonrası zaman aralıklarıyla ilgili olarak vücuttaki mikrobiyal topluluklardaki hem kararlı hem de stabil olmayan değişikliklerin analiz edilmesine imkân sağlar. Dolayısıyla kararlı mikrobiyom kimlik bilgisi sağlayabilirken; değişken mikrobiyom yapısı son diyeti, sağlık durumunu veya coğrafi konum gibi durumları gösterebilir (40).

İnsan vücudunun üyeleri olan mikrobiyal toplulukların, tüm vücut hücrelerinden en az on katı kadar daha fazla olduğu bilinmektedir (39,46,47). Her bir

habitatın imzası olan mikroorganizmaların çeşitliliğinin ve bolluğunun hem vücudun farklı bölgelerinde hem de bireyler arasında hatta sağlıklı bireyler arasında bile geniş ölçüde değişiklik gösterdiği bulunmuştur (44-48). Dolayısıyla mikrobiyotanın, adli biyolojik delilin kaynağının belirlenmesinde kullanılabilecek değerinin oldukça yüksek olduğu anlaşılmaktadır (39).

Grice ve ark. kişilerin ayakkabılarından aldıkları örneklerden bakteriyel DNA'yı analiz etmeye çalıştıkları çalışmada; bireylerin ayakkabılarında ve ayak derilerinde yeterli bakteri olduğunu ve test edilen bireyler arasında mikrobiyom topluluklarının benzersiz olduğu tespit edildi. Araştırıcılar, ayakkabı ve kullanıcı profilleri arasında belli bir düzeyde eşleşmenin mümkün olduğunu fakat önemli ölçüde farklılıklar olduğunu ve birkaç karşılaştırmada bireyin kimliğini çözümleyebildiklerini belirtmişlerdir (39). Tims ve ark. el yıkamadan önce ve sonra mikrobiyomu analiz ettiği benzer bir çalışmada benzer varyasyonları gözlemlemiştir (49).

Bununla birlikte mikrobiyom, bireylerde zamana bağlı olarak da değişiklik gösterebilmesiyle, toplumun geneline bakıldığında nispeten stabil görünmektedir (30,44,50-52). Kişilerin yaşam tarzı, yaşadığı coğrafya, sağlık problemleri, gördüğü tedaviler, kullandığı ilaçlar, yedikleri, meslekleri gibi etmenler o kişilerin mikrobiyomunun yapısını ve bileşimini etkileyebilir. O halde "mikroorganizmalar bir kişiyi tanımlamak için nasıl kullanılabilir?" sorusunun cevabı çok iyi ortaya konulmalıdır. Vücut içinde veya üzerinde yaşayan mikrobiyal toplulukların profilinin

çıkarılmasıyla, kişilerin yaşam tarzlarıyla ilgili detaylar hakkında bilgi sahibi olunabileceği düşünülmektedir (44,53,54). Mikroorganizmaların kullanımının yaygınlaşmasıyla, mikrobiyomun yapısındaki ve bileşimindeki zamana bağlı gelişen bu dalgalanmaların, adli amaçlar için de faydalı bilgiler sağlayabileceği keşfedilmiştir (44,53,54).

Costello ve ark. farklı zaman dilimlerinde ve farklı vücut bölgelerinden aldıkları numunelerle gerçekleştirdikleri çalışmada, bir topluluğun bakteri kompozisyonunun öncelikle vücut habitatı tarafından belirlendiğini bulmuş ve habitatlar içinde, kişiler arası değişkenlik yüksekken, bireylerin minimum zamansal değişkenlik gösterdiğini bulmuşlardır. Bu sonuçlarla, kişi mikrobiyotasının kişiselleşmiş olmasına rağmen, vücut habitatları ve zamana göre sistematik olarak değiştiğini belirtmişlerdir (47). Yine bundan birkaç yıl sonra Caporaso da arkadaşlarıyla yaptığı çalışmada aynı sonuçlara ulaşmıştır (51).

David ve ark.nın iki kişinin tükürük mikrobiyotasındaki değişimi bir yıl boyunca takip ettikleri çalışmanın bulguları, insanla ilişkili mikrobiyal toplulukların genellikle istikrarlı olduğunu; bununla birlikte, her insanın hayatındaki eylemlerin, deneyimlerin veya nadir olayların tükürüklerindeki mikrobiyota dinamiklerini hızla ve geniş çapta etkileyebildiğini göstermektedir (52).

Vücudumuzda taşıdığımız mikroorganizmalar ve bunlara eşlik eden genetik yapı; hırsızlık, cinayet, cinsel saldırılar gibi adli olaylara karışmış kişileri kimliklendirmek için kullanılan insan DNA'sına benzer şekilde olay yerlerinde tespit

edilebilir. Birbirlerinden farklı ve çok sayıda mikrobiyal türü barındıran bu mikrobiyal genomlar toplu olarak karmaşık ve değişkendir. Bu mikrobiyom, mevcut insan kısa ardışık tekrar dizileri (Short Tandem Repeats, STR) kadar ayırt edici ve bireyselleştirici olabilecek adli imzalar sağlayabilir ve kimliklendirmede kullanılabilir (39). Bu nedenle insan mikrobiyomu araştırmaları, suçlara karışan insanları tanımlamak veya orada hiç bulunmamış, olayla ilgisi olmayan insanları hariç tutmak için kullanılabilecek başka bir önemli teknik olabilir (39).

İnsanlar her saat başı, dokunma, öpüşme, öksürme gibi eylemlerle 30 milyon civarı bakteri hücresini çevrelerine yayarlar. Örneğin, bir kitabın sayfasını çevirirken parmak yalamak veya kısa bir süre için ağıza bir kalem yerleştirmek gibi rutin insan davranışları ile içerisinde oldukça zengin bakteri ve genetik materyal içeren tükürük sıvısı kolaylıkla etrafa bırakılabilir. Bu alanda çalışan araştırıcılar, insanların fiziksel yüzeylerde bıraktıkları bu mikroorganizmaların adli potansiyelini birçok çalışmayla göstermişlerdir (55,56). Örneğin, Lax ve ark. cep telefonlarıyla yaptıkları çalışmada sahiplerinin kişisel mikrobiyal imzalarını taşıdığını, mikrobiyotaya dayalı olarak bireysel kimlik çıkarmanın mümkün olduğunu savunmuş hatta kişilerin yakın geçmişte nerelerde bulunduklarını belirlemek için de kullanılabileceğini söylemişlerdir (5). Başka bir çalışmada ise Fierer ve ark. parmak uçlarında bulunan bakteri topluluğunun bir bilgisayar klavyesi ile izlenebilir olduğunu ve kişinin hangi klavyeyi hatta hangi tuşları kullandığının bulunabileceği bulgusuna ulaşmıştır (7).

Adli bilimlerdeki kimliklendirme çalışmalarında, analiz edilen özellikler bakımından kişiler arasındaki benzerlikler ve farklılıklar istatiksel olarak değerlendirilmekte ve sonuca gidilmektedir (7). Cinsel saldırılar gibi biyolojik örneklere sıklıkla rastlayabileceğimiz vakaların aydınlatılmasında, biyolojik örneğin identifikasyonu adli bilimlerin en önemli konularından biridir (31). Tükürük veya toplanan diğer biyolojik örneklerde eğer failin DNA'sının kalitesi uygunsa otozomal kromozomların polimorfik STR bölgeleri analiz edilerek kişiye özgü DNA profili çıkarılmakta ve kişi kimliklendirilebilmektedir (57,58). Ancak, cinsel saldırı iddialarında veya diğer olgularda delil amaçlı biyolojik örnek alınmasında, olayın üzerinden belirli bir sürenin geçmiş olması veya toplanan örneklerin degrede olması gibi sebeplerle her zaman miktarı ve kalitesi uygun bir DNA elde edilememektedir. Ayrıca, biyolojik örnekler ne kadar iyi koşullarda ve usulüne uygun toplansa da faile ait DNA'yı içeren materyal sıklıkla mağdurun fazla miktardaki DNA'sı ile karışmış olarak bulunmaktadır. Bu durumda ya erkeğe ait aleller, kadına ait aleller tarafından maskelenmekte ve profil değerlendirilememekte ya da elde edilen profil karışık olmakta ve yorumu güçleşmektedir. Böyle durumlarda, sadece Y kromozomuna özgü primerlerin kullanıldığı Y-STR analizleri, olayın çözümünde son derece etkindirler. Ancak, delilin şüpheliye ait olma olasılığı, aynı baba ata soyundan gelen ağabey, baba, oğul, amca, hatta kuzen için de aynı olduğundan, Y-STR'lerin bu özellikleri en önemli sınırlayıcı faktör olarak da karşımıza çıkmaktadır (59).

Adli moleküler genetik alanında özellikle bakterilerin tespitine yönelik son teknolojik gelişmeler ışığında, kimliklendirme ve cinsel saldırı vakalarının çözümünde uygulanan DNA analiz yöntemleri ile sonuç alınamadığında; delil olarak şüphelinin ya da olay yerindeki adli biyolojik örneğin içerdiği mikrobiyomların (vücudumuzdaki patojen, simbiyotik ya da kommensal tüm mikroorganizmalar) (1,2,47,60) kullanılabileceği birçok bilim adamı tarafından ileri sürülmektedir (3). Latent örnek olarak adlandırılan kişinin vücudundaki mikroorganizmaların oluşturduğu örnekler, hemen hemen tüm olgularda bulunabilmektedir. Bundan dolayı son yıllarda araştırmacılar adli vakaların çözümünde insan mikrobiyomunun da kullanılabileceğini düşünmektedirler (4,5,7,31,61).

2.3. Genetik Materyal Aktarımı

Çevreyle her türlü etkileşimimiz sonucu her an sayısız miktarda DNA'mızı diğer nesnelere aktarırız (birincil, ikincil veya üçüncül aktarım yoluyla). Bu vasıta ile kimliğimizi belirlemek üzere kullanılabilecek olan kişiselleştirici bir imzayı geride bırakmış oluruz (39).

İnsan vücudunda bulunan bakteri hücrelerinin sayısının insan hücrelerine kıyasla çok daha fazla olduğu göz önüne alındığında, temas edilen nesnelerde insana ait biyobelirteçlerden çok bakteri hücresi gözlenmektedir (39). Aynı zamanda bakteri DNA'sı, insan DNA'sından daha iyi korunmuştur ve degradasyona daha dirençlidir, böylelikle bir yüzeydeki kalıcılığı çok daha fazladır. Bu da bulaştığı yüzeyde insan DNA`sından daha uzun süre ve korunaklı kalabileceğini göstermektedir (31).

Bireylerin derisinden dökülen epitel hücreleri veya olay yerinde bırakılan herhangi bir vücut sıvısı adli bilimlerde bir ceza soruşturmasına kilit kanıtlar sağlayabilmek ve doğru sonuçlar oluşturabilmek adına önemlidir. Çünkü bu deliller bırakılan sıvının veya dokunun kimliklendirilmesiyle DNA profili arasında doğru bağlantılar kurulmasını sağlayacaktır (62).

Bir DNA profilini belirli bir kişiye atfetmek ve profilleri az miktardaki DNA'dan elde etmek için profilleme sistemlerinin duyarlılığının artması, suç faaliyetlerinin araştırılmasında büyük bir önem ve güven teşkil etmektedir. Elde edilen sonuçların çoğunun karışık profiller içereceğini düşünürsek, yani bir profilde birlikte temsil edilen birden fazla bireyden DNA olduğunu düşünürsek, artan duyarlılık bu tip vakaları aydınlatmada kolaylaştırıcı etken olacaktır (48).

Ne yazık ki, elde edilen DNA miktarının çok az olduğu vakalarda profillemeyi teknolojik ilerlemelere rağmen güvenilir bir şekilde yapmak mümkün olmayabilir. Bu tür sınırlı miktardaki numunelerden sonuç elde etmek ve insan DNA'sının tespit hassasiyetini artırmak için mevcut yöntemlerde modifikasyonlar yapılır. Profilleme için hassasiyetin yüksek olduğu ve az miktardaki DNA'nın çalışılabildiği bir yöntem olan düşük kopya sayılı (Low copy number, LCN) tiplemesinde bile artan hassasiyetle birlikte daha yüksek bir oranda kontaminasyon tespit etme potansiyeli vardır, bu da tekrarlanabilirliği azaltmaktadır (39).

Bu gibi durumlarda, adli bilimler uzmanlarının insan mikrobiyomunu kullanarak çeşitli vaka senaryolarını analiz etmesine yardımcı olabilecek ve

mikrobiyal dünyadan adli amaçlarla yararlanma potansiyeli konusunda kullanabilecek yeni bilgilere ihtiyaç duyduğu açıktır (39).

2.4. Mikrobiyom- İnsan Mikrobiyomu

İnsan vücudunda, sağlık ve hastalık durumlarında temel roller oynayan çeşitli mikrobiyal topluluklar ve onların genleri (mikrobiyom) bulunur (48). Mikrobiyom teriminin ilk defa ABD'li Nobel ödüllü moleküler biyolog Joshua Lederberg (1925-2008) tarafından 2001 yılında tanımlanmış ve bir alanı tam anlamıyla kaplayan ve paylaşan kommensal, simbiyotik ve patojen mikroorganizmaların tüm genetik materyalini ifade eden bir terim olduğu ifade edilmiştir (2,63,64). Oral mikroflora veya oral mikrobiyota diye adlandırılan insan ağız boşluğundaki mikroorganizmalar da Lederberg`in bu tanımından sonra oral mikrobiyom olarak adlandırılmaya başlanmıştır (2,63,64).

Doğduklarında yaklaşık 20.500 gen barındıran insanlar, kendileriyle birlikte ~100 trilyon mikrobiyal simbiyotuyla birlikte (insan mikrobiyotası) yaşamlarını tamamlarlar (47). Bu mikrobiyal topluluk bize, bağışıklık sağlamak, beslenmeye yardımcı olmak, patojenlere direnmek gibi önemli özellikler kazandırmaktadır. İnsan genetiğini anlamak için bu mikrobiyal çeşitliliği ve dağılımını etkileyen faktörleri de iyi anlamak gerekir (47).

Mikrobiyom, deri, ağız, solunum sistemi, vajina, dişler gibi insan vücudunun farklı kısımlarında yaşayan; mantar, bakteri, maya, virüs, arkea, akar gibi tüm genom

içeren mikrobiyal üyeleri kapsar. İnsan vücudundaki mikroorganizmalar çoğunlukla göz ardı edilsede, vücudumuzdaki tüm hücrelerin yaklaşık %90'ını oluşturur, geri kalan %10'unu ise insan hücreleri oluşturmaktadır. Dolayısıyla insan genomundan çok daha fazla sayıda gene sahiptir. Bu nedenle mikrobiyoma, bizim "ikinci genomumuz" da denebilir (38,65,66).

Hastalık ve sağlık üzerine büyük etkilerinin olduğunu bildiğimiz, vücudumuzun içinde ve üzerinde yaşayan mikroplar büyük ölçüde kommensaldir ve bize, kendi başımıza geliştirdiğimizin üzerinde bir genetik çeşitlilik ve gen işlevi sağlamaktadır (38). Vücudun normal florasında bulunan mikroorganizmaların, beslenmeye yardımcı olmak, patojenlere direnç göstermek ve bağışıklık sistemini güçlendirmek gibi faydaları vardır (47).

Son yıllarda gerçekleştirilen insan mikrobiyom çalışmalarında; hem kişinin değişik vücut bölgelerinde hem de kişiler arasında, bakteriyel kompozisyon bakımından önemli farklılıklar olduğu gösterilmiştir (7).

Grice ve ark. kalabalık bir sağlıklı yetişkin insan grubuyla yaptığı çalışmada birden fazla vücut bölgesini incelemişler ve her bir vücut habitatının baskın imza taksonları barındırdığını doğrulamışlardır. Örneğin, kulağın arkasındaki kıvrımlı bölge *Propionibacterium* tarafından, vajina *Lactobacillus*, oral bölge *Streptococcus* ve bağırsak *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* tarafından domine edilmiştir. Aynı zamanda, bu geniş çalışma grubuyla kişilerarası çeşitliliğin, bireyin kendi içindeki çeşitlilikten

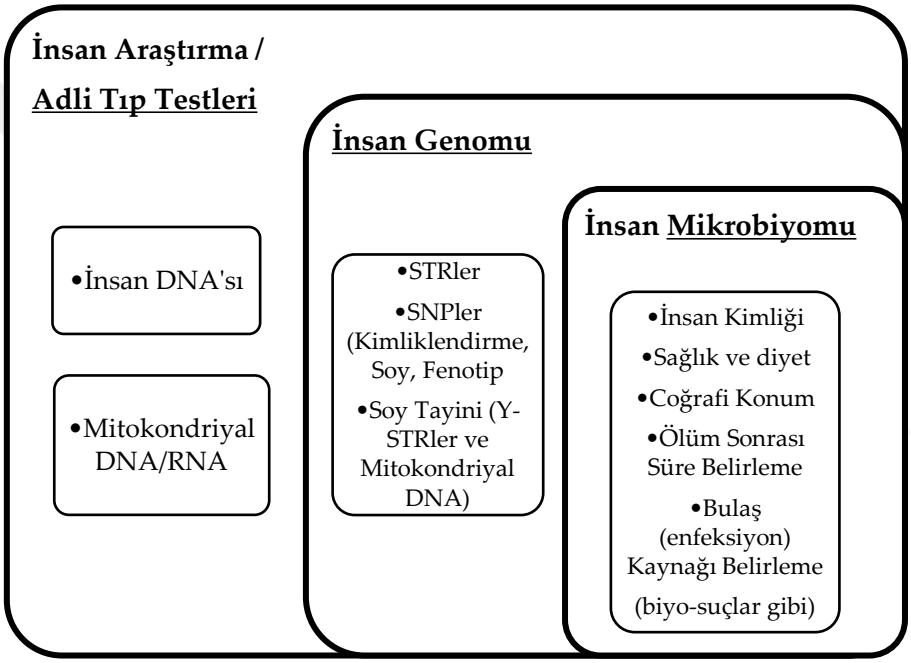
önemli ölçüde daha fazla oranda olduğunu da belirterek önceden yapılmış birçok çalışmanın bulgularını vurgulamışlardır (38).

2007 yılında, insan vücudunda bulunan tüm mikroorganizmaları tanımlamak, insan konaklarıyla mikrobiyal toplulukların hastalık ve sağlık durumlarındaki ilişkisini karakterize etmek, aynı zamanda bireyler arası mikrobiyom çeşitliliğini belirlemek gibi hedeflerle; ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri (*National Institute of Health*, NIH) tarafından finanse edilen İnsan Mikrobiyom Projesi (*Human Microbiome Project*, HMP) başlatılmıştır. HMP, İnsan Genom Projesi (*Human Genome Project*, HGP)'nin deneysel bir devamı niteliğindedir ve metagenomik yaklaşımla çalışılmaktadır (2,46,48). Hedeflerinden biri, sağlıklı insan yetişkin mikrobiyomunu geniş bir grupta ve birden fazla vücut bölgesinde tanımlamak olan bu proje, her bir vücut habitatının baskın taksonlar barındırdığını doğrulamıştır (1).

İkiz bireylerin barındırdıkları mikrobiyom çok benzer olmasına rağmen aynı değildir (4,5,7,67,68). İkizler, her zaman tüm popülasyonlar içinde daha çok birbirlerine benzerler, ancak yaşları ilerledikçe veya artık birlikte yaşamadıklarında birbirlerine daha az benzer hale gelirler (69). Genetik bilginin aynı olduğu tek yumurta ikizlerinde bile benzersiz olan mikrobiyota, adli vakalarda, kanıtların bakteri genomu kullanılarak çözüme kavuşma şansını artırabilecek potansiyele sahiptir (44,70).

İnsan mikrobiyomu analizleri, geleneksel DNA profilleme tekniklerinin yanında potansiyel olarak daha güçlü ilişkiler kurabilmek için ek veriler sağlar. Bir adli soruşturmada, insan genomunu analiz etmeye dayalı yöntemler (STR veya tek

nükleotid polimorfizm (Single nucleotide polymorphism, SNP) analizleri gibi) yetersiz kaldığında daha güçlü veriler elde edebilmek için insan mikrobiyomu analizleri ile bir arada yürütülebilir (Şekil 1) (39). Bu mikrobiyal genetik belirteçler, mevcut adli genetik test yeteneklerini genişletmek için kullanılmaktadır (40,44). Fakat tüm genom diziliminin, en kapsamlı, güvenilir ve tekrarlanabilir bilgiyi sağlayacağı bilinmelidir (40).



Şekil 1: İnsan genomu ve insan mikrobiyomu karakterizasyonunu içerecek şekilde genişletilmiş insan araştırma ve adli tıp testi diyagramı (39).

Mikrobiyom profilleme tekniklerinin standardizasyonuna ve uygulanmasına, ayrıca profillemeyi otomatikleştirebilecek geniş bir kalite kontrollü kaynak ve veri yelpazesiyle farklı vücut habitatlarının analizine imkân sağlayan teknolojilerinin geliştirilmesine hala önemli yatırımlar gerekmektedir (44,46,48).

2.5.Mikrobiyota Çalışmalarında Kullanılan Moleküler Tanı Yöntemleri

İnsan vücudunda barınan mikrobiyotanın sağlık ve hastalık üzerindeki etkileri 1900`lü yıllardan itibaren kullanılmaya başlanan kültürden bağımsız yöntemler ile daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Edinilen bilgiler yoğunlaştıkça klasik (kültür temelli) yöntemlerin yeterli olmadığı düşünülmeye başlanmış ve sürekli yeni teknikler geliştirilmeye çalışılmıştır (71).

Mikrobiyota çalışmalarında, moleküler tanı konulması amacıyla kullanılan mikrobiyolojik yöntemler, zaman içindeki gelişimlere bakıldığında; kültür-temelli ve kültür-bağımsız yöntemler olarak iki grupta incelenebilir (65).

2.5.1. Kültür-Temelli Yöntemler

Yirminci yüzyılın başlarına kadar, bir biyonumune incelenirken, mikroorganizmaları tanımlamada ve özelliklerini belirlemede, bir hastalığın ilerlemesinin veya tedavi sonuçlarının izlenmesinde, altın standart olarak kabul edilen bir takım özel kültür ortamlarına veya mikroskobik testlere ihtiyaç duyuluyordu. Mikroorganizmaların fizyolojik özelliklerini belirlemek için boyama yöntemleri, direnç testleri, antibiyotik testleri gibi yöntemler kullanılıyordu ve bu şekilde çoğu bakteri ve mantar enfeksiyonunun tespiti için geleneksel olarak yapılabiliyor ve mikroorganizmalar taksonomik olarak sınıflandırılabiliyordu (46,72,73).

Fakat bu yaklaşımlar, ancak laboratuvar koşullarında kültürü kolaylıkla yapılabilen yalnızca sınırlı sayıda mikroorganizmanın kimliklendirilebilmesine imkan sağlıyordu (72).

Zamanla geliştirilen kültür teknikleriyle mikroorganizmaların kimliklendirilmesi uygun maaliyetli olsa da; verilen emek ve harcanılan zaman fazla olduğu, ayrıca tespit edilebilen bakteri çeşidinin aslında var olanın sadece küçük bir bölümünü oluşturduğundan dolayı mikrobiyal çeşitlilik açısından yalnızca sınırlı bilgi sağlanabilmiştir (8,74).

2.5.2. Kültür-Bağımsız Yöntemler

2000'li yıllara doğru ilerledikçe mikrobiyolojik araştırmalarda kültür temelli yöntemlerden ziyade, özellikle 16S ribozomal ribonükleik asit (rRNA) geninin sekanslanması gibi yeni gelişmelerin ardından, sağlam bakteri hücrelerine ihtiyaç duymayan kültürden bağımsız yöntemler popüler hale gelmiştir (65,75). Kültürden bağımsız yöntemlerde numuneler kültüre ekilmez. Öncelerde, bakterilerin kültür ortamında analiz edilmesiyle önemli bilgiler elde edilmiştir. Fakat kültürden bağımsız moleküler yöntemlerin kullanılmaya başlanmasıyla, mevcut bilgilerimizin ne kadar eksik ve bazen de yanlış olduğu görülmüştür (76).

Oldukça yüksek duyarlılığa sahip olan kültürden bağımsız yöntemler, özellikle laboratuvar ortamında üretilemeyen mikroorganizmaların kısa sürede tespit edilebilmesini sağlamaktadır (65). Kültürden bağımsız yöntemlerle tek tek kültür ortamında yetiştirilen mikroorganizmalardan çok asıl numuneden DNA izole edilir

ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), klonlama, sekanslama gibi yöntemlerle çoğaltılır ve çok yönlü araştırmaların yapılmasına imkân sağlanır (77,78). İnsan mikrobiyom inceleme çalışmalarında en sık kullanılan teknikler ise 16S rRNA kısmi sekanslama ve metagenomik analizdir (38,77,79,80).

2.6. İnsan Ağız (Oral) Mikrobiyomu

Ağız boşluğu (kavitesi); yiyeceğin ağızdan alınması, sindirimin devamlılığını sağlamak için çiğnenerek tükürük ile karıştırılması ve yemek borusuna iletilmesi; aynı zamanda içimize çektiğimiz havanın akciğerlere giderken burun ve ağızdan geçmesi gibi sebeplerden dolayı, vücudun içine açılan önemli bir kapıdır (64).

Bakteriler, virüsler, mantarlar, arkealar ve protozoonların yaşam alanı olan ağız boşluğu, insan vücudunun en çeşitli mikrobiyomunu barındıran bölgelerinden birisidir (2,81,82).

Ağızdaki bakteri toplulukları, enfeksiyonlara neden olması veya enfeksiyonları önlemesiyle genel sağlık üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (30). Ağız boşluğu, sağlığı korumak için gerekli olan, ancak aynı zamanda hastalığa da yol açabilen, çeşitli nişlere dağılmış benzersiz mikroorganizma çeşitliliği ile insan mikrobiyomunun vazgeçilmez bir parçasıdır. Bu zengin flora, ağızdaki farklı yapılar veya diş yüzeylerinde gıda artıklarının birikmesi, ısı ve pH azalması gibi etkenler ile güçlenir ve bazen insan vücudunun hastalıkla mücadele etmesini zorlaştırır (73,83,84).

Chen ve ark. tarafından yapılan tükürükteki bakterilerle ilgili oral mikrobiyom projesi kapsamında 700 civarı bakteri tespit edilmiş ve sonuçlar ağız mikrobiyomunun oldukça yüksek çeşitlilik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (85). Ayrıca, ağız mikrobiyomu ile yapılan çalışmalar tamamlandığında yaklaşık 1200 türün tespit edileceği yönünde tahminler de bulunmaktadır (86).

Mikroorganizmaların ağız ortamında yaşamlarını sürdürmesi, onların yüzeye yapışabilme durumlarına bağlıdır. Ağızda herhangi bir yüzeye tutunamayan mikroorganizmalar, tükürüğün akışıyla birlikte ve sık yutma refleksiyle kolaylıkla uzaklaştırılabilir. Birkaç türde özelleşmiş organizma (özellikle streptokoklar) mukoza ve diş yüzeyi gibi yumuşak, henüz mineralize olmamış ağız içi dokularına birbirlerine bağlanmalarını sağlayan yapışkan bir matriks üreterek yapışabilir. Böylece bakteriler diş yüzeyi gibi bölgelerde rahatlıkla kolonize olabilirler (82,83).

Ağız içinde bulunan birçok bakterinin büyümesini devam ettirebilmesi için gereken bir diğer etken de pH'dır. Sağlıklı bir ortam oluşturmak için ortamın optimal pH değeri nötr değerler civarında olması gerekmektedir (66). Buna karşı, laktik asit üretimi yapabilen (sakrokrolitik metabolizmaya sahip) bakteriler, ortamın pH'ını düşürürler. Düşük bir pH ise diş yapısının demineralizasyonunun artmasını sağlar ve aside toleranslı bakterilerin büyümesini destekler. Bu durum ağıza yerleşik bulunan yararlı türlerin çoğunu inhibe eder ve oral mikrobiyota dengesinde bozulmaya neden olur. Ağız içerisindeki yüzeylerde yaygın çevresel koşulları büyük ölçüde tükürük belirler ve bütün bu oluşumlar arasında tampon görevi görür ve yararlı bakteriler için

uygun pH'da bir ortam oluşturur. Bu durum çürük oluşturabilecek (karyojenik) bakterilerin sayısını arttırabilecek asidik koşulları nötralize etmeye yarar, dolayısıyla oral mikrobiyal dengenin korunmasını sağlar (66).

Ağız kavitesi, limitlerinin belirli olması ve barındırdığı biyolojik topluluğun genel kompozisyonunun bilinmesi sebeplerinden dolayı nispeten iyi tanımlanmış bir bölgedir. Ağız ekosistemi içerisinde; yanaklar, dil, ağız mukozası, dişeti, dişler üzerinde lokalize girintili veya bazı düz yüzeyler gibi farklı ekolojik ortamları bulundurur. Her bir ekolojik ortam eşsiz çevre koşullarına sahip olmasıyla birlikte oldukça farklı mikroorganizma topluluklarının da barınma alanlarıdır (82).

Örnek alımının kolaylığı, dünyadaki en yaygın enfeksiyon hastalıklarından olan diş çürüğü ve dişeti hastalıkları ile ilişkisi ve bunun gibi nedenlerden dolayı insan ağız mikrobiyomu, vücutta en çok çalışılan alanlardandır (2,85,86).

Çalışmalar, insan ağız boşluğundaki farklı yapılar ve dokuların farklı mikrobiyal topluluklar tarafından kolonize edildiğini dolayısıyla bir dizi farklı habitat içerdiğini göstermiştir (20,64). Örneğin; dilin üst yüzeyi papillalarla kaplı olmasıyla farklı bir yaşam alanıdır. Bu pürüzlü yapı, ağız boşluğundaki mukozal yüzeylerde mevcut olmayan ek bir sığınma alanı sağlar ve "*S.salivarius* ve *Micrococcus mucilaginous*" çoğunlukla bu bölgede bulunan fakat dişte neredeyse hiç bulunmayan mikroorganizmalardandır. *Actinomycetaceae* alt türleri, normal floradan ve çürükten (derin dentin çürükleri, kök çürükleri gibi) izole edilir. Dişlerde *S.sanguis* ve *S.mitis* baskın topluluktur. Ağız streptokokları (*S. mutans*) için en uygun yaşam ortamı ise diş

girintileri (pit ve fissürler) dir. Çürük en sık bu alanlarda oluşur. Dişlerde, *S. mutans*`ın popülasyon büyüklüğü değişkenlik gösterir (82).

Ağız boşluğunda, kültür ortamında izole edilmiş yaklaşık 280 bakteri türü bulunmuş ve resmi olarak adlandırılmıştır (87). Ağız boşluğundaki organizmaların çoğu faydalı, bağışıklık sistemi olgunlaşması için, ağız sağlığını korumak için veya patojen savunması için gerekli, yani kommensal olsa da bunların bir alt kümesinin sistemik hastalığa neden olabilecek fırsatçı patojenler olması muhtemeldir (20,87,88). İnsanlarda görülen en yaygın ağız hastalıkları, konağın davranış alışkanlıklarının ve barındırdığı mikrobiyal toplulukların yapısındaki değişikliklerin sonucunda meydana gelmektedir. Bu nedenle, ağızda bulunan mikrobiyal toplulukların yapısında değişikliklere neden olan ekolojik olayların anlaşılması, ağız sağlığını geliştirmek için önleyici stratejilerin geliştirilmesinde önemli bir adımdır (89,90).

Birbiriyle hiçbir şekilde ilişkisi olmayan sağlıklı bireylerin ağızlarındaki bakteri mikrobiyomları her yapıda farklılık gösterse de yüksek oranda aynı olduğu, yani ağız boşluğunda hem "çekirdek" hem de "değişebilir" mikrobiyom varlığı gösterilmiştir (2,81,91,92). Tüm bireylerce paylaşılan ve vücudun değişik bölgelerinde sağlıklı koşullar altında bulunan ve baskın olan sağlıklı türlere çekirdek mikrobiyom; her bireye özel olan ve farklı yaşama biçimlerine, fenotipik ve genotipik belirleyicilere cevap olarak geliştirilmiş mikrobiyoma ise değişebilir mikrobiyom denmektedir (2,84,88,91,93). Vücudun benzer bölgelerinde benzer mikrobiyota paylaşılsa da, her

noktadaki mikrobiyom tür ve suş düzeyinde, aynı parmak izi gibi kişilerce ayırt edilen, taklit edilemeyen çeşitli farklılıklar bulunmaktadır (9,84).

Bik ve ark. 10 sağlıklı kişinin ağız mikrobiyomu üzerine yaptıkları çalışmada; topladıkları örnekleri 16S rRNA gen sekanslama yöntemi ile dizilediler. Elde ettikleri sonuçları iç içe yerleştirilmiş 4 halka şeklinde gösterdiklerinde; en içteki halka %100 paylaşılan ağızdaki çekirdek mikrobiyomu, ikinci halka %51-99, üçüncü halka %21-50, en dış halka %1-20 kişinin paylaştığı, kişiler arası değişebilir ağız mikrobiyomunu belirtiyordu (92).

Ağız mikrobiyal toplulukları, diğer vücut habitatlarındakilere kıyasla nispeten kararlı sayılmasıyla birlikte, sık sık yutkunmak, ağız hijyen prosedürleri nedeniyle çevresel mikroplara maruz kalmak, zaman içinde değişiklik gösteren; yaş, diyet veya altta yatan sistemik sağlık durumları gibi faktörler nedeniyle zaman zaman bir takım değişikliklere tabi olmaktadır (73).

Oral mikrobiyotanın sekanslanmasında ve taksonomik düzeyde belirlenmesinde en yaygın kullanılan gen, ortak oral bakteri veri tabanı üzerinde şekillendirilen İnsan Oral Mikrobiyom Veritabanı (*Human Oral Microbiome Database,* HOMD)'nda yer alan 16S rRNA'dır (85). Yeni teknolojilerle bakterilerin DNA'sının tanımlanması, ağızda mevcut olan mikrobiyotanın beklenenden çok daha farklı ve karmaşık olduğunu göstermiştir (94,95).

Oral mikrobiyom bileşiminin kalıtsal olup olmadığı ile ilgili; Stahringer ve ark., alellerinin %100'ünü paylaşan monozigot ikiz çiftlerinin, alellerinin yaklaşık %50'sini paylaşan dizigot ikizlerinden daha benzer oral mikrobiyomlara sahip olması gerektiği hipotezini kurmuştur. 27 monozigot ve 18 dizigotik ikizden 10 yıl boyunca belirli yaş aralıklarında alınan 264 tükürük örneğini 16S rRNA sekanslama yöntemiyle incelemişler ve birlikte yaşayan monozigot çiftleri arasında dizigot çiftlerinden daha fazla benzerliğe doğru istatistiksel olarak anlamlı olmayan hafif bir eğilim gözlemlemişlerdir. Fakat farklı ortamlarda yaşayan, birbirlerinden ilgisiz bireylerle karşılaştırıldığında aradaki farkın oldukça önemli hale geldiğini belirtmişlerdir. Bu araştırmaya göre oral mikrobiyom kompozisyonu; kişinin ne yediğine, kiminle öpüştüğüne ve dişlerini ne sıklıkta fırçaladığına bağlıdır. Mikrobiyom genetik faktörlerden çok konağın mikroorganizma toplulukları için sağladığı çevreye göre şekillenmektedir (2,69).

NIH'ın bir dalı olan Diş ve Kraniyofasyal Araştırma Ulusal Enstitüsü (*The National Institute of Dental and Craniofacial Research,* NIDCR), insan ağız mikrobiyom veritabanı (www.homd.org) oluşturmak üzere İnsan Oral Mikrobiyom Projesine (*Human Oral Microbiome*, HOM) destek vermiş ve proje başlatılmıştır (64). Elde edilen verilerle de insan ağzının barındırdığı mikrobiyal kompozisyonu belirlemek üzerine geliştirilmiş en kapsamlı veri tabanı oluşturulması hedeflenmektedir. Bu proje sayesinde tükürük veya diğer ağız içi dokularının mikrobiyom profilleri sağlık ve hastalıkla ilgili türlerle karşılaştırılabilecek, yapılan tedavilerin ağızda bulunan bakteri

ekolojisi üzerine etkisi izlenebilecek ve mikrobiyal kaymalar tespit edilebilecek, dolayısıyla ağız mikrobiyotasının sistemik sağlıkla ilişkisi çok daha iyi anlaşılabilecektir (2).

2.6.1. Sağlıklı Ağız Mikrobiyomu

Ağız, ancak kommensal organizmalara sahip olması ve karşılıklı yarar ilişkisi içinde, ekolojik olarak denge sağlayabileceği bir mikrobiyoma sahip olmasıyla sağlıklı olarak adlandırılır (84). Oral kavitede bulunan mikroorganizmalar arasındaki kommensal ilişki, biyoçeşitliliği sürdürecek şekilde gelişmelerine olanak verirmektedir. Bu çeşitlilik sağlık için gereklidir ve ağız boşluğundaki her türün dengeyi sağlayabilmesi ve devam ettirebilmesi için gereken özel bir fonksiyonu olduğunu göstermektedir. Bu sayede konakçı ve mikrobiyal organizmalar arasındaki karşılıklı yarar ilişkisi sağlıklı bir şekilde devam eder (2,84).

Zaura ve ark. sağlıklı bireylerden çeşitli intraoral örnekler (diş yüzeyleri, yanak, sert damak, dil ve tükürük) alarak mikrobiyom belirleme çalışması yapmış ve 3600'den fazla benzersiz sekans, >500 farklı OTU (veya filotip (%97 genetik benzerlikle kümelenen diziler)), 88-104 üstün takson bulmuşlardır. Baskın taksonlar: *Firmicutes* (*Streptococcus* cinsi, *Granulicatella* cinsi, *Veillonellaceae* ailesi), *Bacteroidetes* (*Porphyromonas, Capnocytophaga* ve *Prevotella* cinsleri), *Proteobacteria* (*Haemophilus* ve *Neisseria* cinsleri), *Fusobacteria* (*Fusobacterium* cinsi), *Actinobacteria* (*Actinomyces, Corynebacterium* ve *Rothia* cinsleri)dir ve total oral bakterilerin %96'sını oluştururlar (91).

Ayrıca; *Chloroflexi, Tenericutes, Spirochaetes, Synergistetes* ve adlandırılmamış iki şube *SR1* ve *TM7*`nin de sağlıklı ağız boşluğunda baskın şubelerden oldukları belirtilmektedir (2,64).

Belstrøm ve ark. sağlıklı bireylerden alınan tükürük örnekleriyle ağızlarında çürük dişleri bulunan bireylerin tükürük örnekleri üzerinde YND tekniklerini kullanarak bir çalışma yapmıştır. Bu iki grubu birbirleriyle karşılaştırdığında, sağlıklı gruptan alınan tükürük örneklerinde önemli ölçüde daha yüksek alfa çeşitliliğine rastlamışlardır. Ayrıca sağlıklı bireylerin tükürüğünde nispeten iki kat daha yüksek *Neisseria*, *Haemophilus* ve *Fusobacterium* bolluğu olduğunu kaydetmişlerdir (96).

2.7. Tükürük ve Tükürük Mikrobiyomu

Tükürük, tükürük bezlerinden ağız boşluğuna salgılanan ve her biri farklı organizmalar tarafından kolonize edilen (97); diş yüzeyleri, dişeti yarıkları, dil dorsumu ve yanak mukozası gibi çeşitli ağız içi yüzeylerde bulunan mikrobiyal topluluklardan dökülen bakterileri içeren biyolojik bir sıvıdır (98). Aynı zamanda ağız florasında bulunan kommensal bakteriler üzerine yapılan araştırmalar için kolayca erişilebilir bir vücut sıvısıdır ve rutin olarak genetik ve adli amaçlarla insan DNA'sı elde etmek için kullanılmaktadır (69,99,100).

Tükürük örneği, kriminal olaylarda kullanılan sperm ve kan gibi biyolojik sıvıların aksine, steril değildir. Tükürüğün her ml'sinde yaklaşık 500 milyon kadar bakteri hücresi bulunmaktadır (20). Bilim insanları, bu bakteri çeşitliliği üzerine

yapılan genetik düzeydeki araştırmaların tıp ve adli bilimler alanında geniş bir kullanım potansiyeli olduğunu ileri sürmektedir. Son yıllardaki çalışmalar, tükürüklerindeki bakteriyel mikrobiyotayı kullanarak iki farklı kişiyi ayırmanın mümkün olabileceğini göstermektedir (31).

Tükürük, oral mikrobiyotanın sistemik hastalıklarla ilişkisi nedeniyle tanısal bir sıvı olarak dikkatleri üzerine çekmiştir ve tanı aracı olarak kullanımı son 10 yılda katlanarak artmıştır. Bununla birlikte, tükürük toplama için standartlaştırılmış yöntemlerin olmaması, mikrobiyom araştırmalarında tükürüğün daha az tercih edilmesine yol açmıştır (97,101). Farklı tükürük toplama yöntemleri (sürüntü, gargara, tükürük sıvısı..), tükürük mikrobiyota bileşimini az da olsa etkilemektedir fakat genel oral mikrobiyom profiline önemli ölçüde katkıda bulunmadığı gösterilmektedir (97).

Dişlerin yapısının bozulması, çürük oluşumu veya mevcut çürüklerin tedavisi, diş eti iltihabı oluşumu, dişeti yarıklarının derinleşmesi gibi ekolojik değişiklikler tükürükteki bakteri topluluğunu etkileyebilir. Ağız boşluğunun dış ortama sürekli maruz kalması sebebiyle, ağızdaki mikrobiyal topluluk sigara veya kişisel ağız hijyeni gibi dış etkenlerden de etkilenebilir. Ayrıca kişilerin sistemik bir rahatsızlığının olup olmaması da tükürük mikrobiyota yapısı ile ilişkilendirilebilir (98). Kişilerin sağlık durumlarıyla olan bu bağlantılara bakarak, tükürük mikrobiyomunun kişilerin sağlık veya hastalık teşhisleri için yol gösterici olabileceği söylenebilir (97,98).

Tükürük, en kolay erişilebilir vücut sıvısı olmasına rağmen biyomoleküllerin farklı koşullarda (hem biyolojik hem çevresel) değişkenliği sebebiyle, klinik

çalışmalarda doku, kan, idrar veya fekal maddeye kıyasla daha az kullanılır (97). Fakat etkili bir teşhis sıvısı olarak tükürüğün kullanımı mevcut teknolojik gelişmelerden büyük ölçüde etkilenmiştir. Teknolojideki ilerlemeler, tükürüğün içerisinde barınan mikropları daha kapsamlı incelemeyi mümkün kılmış, ve bunların ağız sağlığı özelliklerini belirleyebilmenin yanı sıra, genel sağlığın temel özelliklerini belirleyebilmeye de yardımcı olacağı saptanmıştır (101). Tükürük bazlı klinik tanı testleri; otoimmün bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar, endokrinoloji, bulaşıcı hastalıklar, bakteriyel enfeksiyonlar, uyuşturucu gibi ilaçları izleme, psikiyatri gibi daha birçok araştırma alanlarında mevcut tanı metodolojilerinin yanında yardımcı bir tanı testi olarak faydalı olabilir, hatta bu testlerin yerini alabilir (101). Kan bazlı analizler gibi tükürük analizinin de iki amacı vardır: birincisi, hastalığı olan bireyleri belirlemek ve ikincisi, tedavi altındaki bir bireyin süreçten nasıl etkilendiğini izlemektir (101).

Suç soruşturmalarında, zamanla gelişen uygulamalarla birlikte olayı aydınlatmak için olay yerinden elde edilen her türlü biyolojik örnek dikkatle incelenmektedir.

Cinsel saldırı olgularında delil amaçlı olarak öncelikle fiziksel muayene ve genital bölge muayenesi yapılmakta, sonrasında mağdur ve failden kan, semen, tükürük, idrar ve bunların lekeleri ile saç ve deri altı doku materyali gibi DNA içeren biyolojik materyaller toplanmaktadır. Özellikle fiziksel muayene sırasında karşılaşılan boyun bölgesinde ve göğüslerdeki emme ve ısırma eylemleri sonucunda oluşan

ekimozlar, faile ait tükürük materyali içermesi nedeniyle son derece önemlidir (102). Nitekim son yıllarda cinsel saldırı olgularının çözümünde tükürük örneklerinin kullanımı giderek yaygınlaşmıştır (103,104).

İnsan tükürük mikrobiyomu ağız boşluğunda meydana gelebilecek hastalıklarda rol alabildiği gibi; vücudun diğer bölgelerindeki mikrobiyomlarla da etkileşime girebilir ve hastalıkların tanısal bir göstergesi olabilir (99).

Epidemiyolojik veya genetik çalışmalarda bir DNA kaynağı olarak tükürüğün kullanımının yaygınlaşmasıyla, tükürük mikrobiyomunun önemi ve kullanımı artmaya başlamıştır (99,105).

Hansen ve ark.nın bir hemşire grubu üzerinde yaptığı çalışmada; kan, tükürük ve bukkal hücre örneklerinden genomik DNA analizi yapmış ve yanıt oranlarını (miktar ve kalite) karşılaştırmıştır. Kan ve tükürük numunelerinden en iyi kalitede DNA sağlandığını belirterek, tükürük örneklerinin kullanımının yüksek kalitede genomik DNA elde etmek için kan örneklerine iyi bir alternatif olduğu ve epidemiyolojik çalışmalarda yanıt oranını önemli ölçüde artıracağı sonucuna varmışlardır (105).

Tükürük mikrobiyomu coğrafi konumlar arasında da önemli ölçüde farklılık göstermektedir ve insan popülasyonlarının yapısı ve göçleri hakkında bilgi sağlayabilir. Özellikle *Serratia* ve *Enterobacter* bakteri türlerinin coğrafya değişimlerinde önemli değişiklikler gösterdiği bulunmuştur (30,99).

Literatürde farklı vücut bölgelerinin metagenomik analizi ile ilgili çalışmalara rastlanmıştır, ancak tükürük örneklerinin mikrobiyom yapısının diş tedavisi sonrası zamana karşı değişiminin metagenomik analiz ile ortaya konulduğu bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tükürük mikrobiyomunun diş tedavisi ile zamana bağlı değişiminin tespiti ile ilgili verilere ulaşılması, adli bilimler ve klinik bilimler için önemli bir veri grubu oluşturacaktır.

2.8. Çürükler ve Çürük Lezyonları

Diş çürüğü, periodontitis (diş eti hastalığı), endodontik (kök kanalı) enfeksiyonlar, alveolar osteit (kuru yuva) ve bademcik iltihabı gibi bir dizi oral enfeksiyon hastalığına ağızda bulunan mikroorganizmaların neden olduğu tespit edilmiştir (64). Bunlardan diş çürüğü ve dişeti hastalıkları, en yaygın kronik hastalıklardandır (82).

Diş çürüğü, dünya çapında insan popülasyonunu yaşamları boyunca etkileyen en yaygın kronik ve çok faktörlü hastalıklardan biri olmakla birlikte kısa bir süre için bile ihmal edilirse insan hayatının her döneminde oluşma potansiyeli bulunan bir hastalıktır (6).

Diş çürüğü genellikle diş yüzeyinde meydana gelen mineral kaybı ve yeniden oluşumunun fiziksel ve kimyasal süreçleri olarak tanımlanır (6). Mikroorganizmaların, mine bozulmasının ilk anından itibaren alttaki dentin tabakasından diş pulpasına kadar tüm tübüler dentin ağına erişim sağlayıp

ilerlemesiyle oluşan ilerleyici bir hastalıktır. Lezyonun ilerlemesiyle pulpa dokuda toksik etkiye sebep olup nekroz oluşturabilmektedir (106,107).

Bakteriler, diş yüzeylerini kolonize etmeden önce tükürükte bulunur. Diş hastalıklarının yönetimi için tükürük patojenlerinin öğrenilmesinde yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (108).

Bu alanda yapılan araştırmalar, ağızdaki bakterilerin bileşimi ile dişlerde çürük oluşumu arasındaki ilişki hakkında önemli bilgiler sağlamış, tükürük ve plakta bulunan gıda bakterilerinin enerji kazanmak için karbonhidratları metabolize etmesi ve yan ürün olarak açığa çıkan organik asitlerin dişin kristal yapısını bozduğunu ve diş çürüğü oluşumunda birincil faktör olarak göstermişlerdir (12). Diş minerali ve plak arasındaki fizyolojik dengenin değişmesi ile çürük oluşumu başlamaktadır. Dişlerde kavite veya defekt oluşumuna sebep olan bu yıkım ise bakteri enfeksiyonunun işaretidir, bakteri aktivitesinin artmasıyla, çürük aktivitesi de artış göstermektedir (82).

Genellikle periodontal hastalıklarla ilişkili ilerleyen diş çürükleri ağız boşluğunda en sık görülen kronik patolojilerdendir (12). Son on yılda diş çürüğü oranındaki dramatik düşüşe rağmen, hala okul çağındaki çocukların ve yetişkinlerin %60-90'ında meydana gelen ciddi bir sağlık sorununu temsil etmektedir. Bu nedenle genel sağlık ve yaşam kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (12,109). Diş çürüğünün çeşitli belirtileri, yaşın tüm evrelerinde kalıcı olarak ortaya çıkar (12).

2.8.1. Mine, Dentin ve Sement Çürükleri

Diş minesinde çürükler başladığında ilk önce beyaz nokta lezyonları görülmeye başlar. Dişin yüzeyi kurutularak incelendiği zaman daha net görülen bu beyaz lekeler, tebeşirimsi mat beyaz alanlardır ve başlangıç çürüğü olarak isimlendirilir. Çürüğün ilerleme hızı yerleştiği yüzeye göre değişiklik gösterir. Bu aşamada dişin yüzey tabakası henüz gözle görülür düzeyde bozulmamıştır. Derinlerdeki mine kısmı etkilendikçe çürük bir yarık halinde mine-dentin sınırına doğru ilerler (110,111).

Çürük, minede hasar oluşturduktan sonra, mikroorganizmalar mine tabakasında yarıklar oluşturarak dentin tabakaya doğru ilerler ve burada demineralizasyona neden olurlar. Burada, çürüğün hızlı bir yıkımdan çok aktif ama durağan şekilde ilerlediği gözlenmiştir. Çürük hızlı ilerlediğinde, sarı veya açık kahverengi lezyonlar gözlenir ve dokunun yumuşak olması beklenir; durağan bir şekilde ilerlemeye devam eden çürük ise, daha sert yapıdadır ve rengi koyu kahverengi olarak görülmektedir (110).

Diş etinin çekilmesiye ilerleyen dişeti rahatsizliklarinda dişeti cebinde kolonize olan mikroorganizmalardan; çocuklarda ağızda uzun süre yiyecek bekletme alışkanlıklarından veya radyoterapi uygulamaları sonucu oluşabilen, kök yüzeyini kaplayan sement dokusunda meydana gelen çürükler de sement çürükleri olarak adlandırılmaktadır (110).

2.8.2. Çürük Mikrobiyolojisi

Oral ekosistemde değişik faktörlerle karakterize olmuş farklı yaşam alanlarının bulunması, her alanda farklı mikrobiyal toplulukların barınmasına neden olur. Mikroorganizmaların dağılımı, ağız boşluğundaki yaşama alanlarına göre değişiklikler göstermektedir (112).

İnsanlarda karşılaşılan en yaygın diş hastalığı olan çürüklerde nispeten küçük bir bakteri grubu öncelikli olarak sorumludur (karyojenik bakteriler). Bu bakterilerin bir grubunu *Streptococcus* oluşturur. Özellikle "*Streptococcus mutans*" alt grupları (*S.cricetus, S.rattus, S.ferus, S.sobrinus*) ve "*Streptococcus sanguinis*" çürüğün önemli potansiyel sebebi olarak gösterilir. Diğer grubunu ise *Lactobacillus* oluşturur. Büyük miktarlarda asit üretebilen, asidik çevreyi tolere edebilen *Streptococcus mutans* ve *Lactobacillus* insanlarda çürüklerle ilişkili başlıca mikroorganizmalar gibi görünürler (82). *Actinomyces viscosus* da kök çürüğü gibi ilerlemiş çürük lezyonlarında görülen bakterilerdendir (73).

Oral mikrobiyotada bulunan karyojenik mikroorganizmaların özellikleri şu şekilde sıralanabilir (112):

¬ Anaerob veya fakültatif anaerob olmaları.

¬ Asidojenik özellik gösterirler (çoğunlukla laktik asit üretirler).

¬ Asidüriktirler (pH değerinin düşük olduğu ortamlarda yaşayabilirler).

Dişlerde çürük yapıcı iyonların aktifleşmesi için ortamın pH'ının düşük, yani asidik olması beklenmektedir (eşik değer, pH: 5,5). Fakat çürük oluşumu için sadece bu yeterli değildir, dişlerin belirli bir süre boyunca oluşan asidin etkisi altında kalması gerekmektedir. Bu etki süresi en az 30 dakika olarak ifade edilir (113). Bu etkileşim sonrası demineralizasyon başlar, başta sub-mikroskobik olan, zamanla da gözle görülür şekilde ilerleyen çürük dediğimiz doku kayıpları meydana gelir. Ayrıca, ortamda oluşan asit türü ve miktarı da çürük oluşumu için önemlidir. Mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sonucu asetik asit, propionik asit, laktik asit gibi asitler oluşur; ancak bu asit türleri arasında diş çürükleri üzerinde en etkilisi laktik asittir. Bu da çürük oluşumunun başlıca ajanlarından olan *Streptococcus* ve *Lactobacillus*lar tarafından salgılanmaktadır (112).

Streptokokların alt grubu olan *Streptococcus mutans*, tüm insanlarda etnik köken, ırk veya coğrafi konum durumları göz önüne alınmaksızın ortak bir enfeksiyon etkeni olarak mevcuttur. Yani, *S. mutans* suşlarının hem çürük aktif (caries active, CA) popülasyonlarda, hem de herhangi çürük deneyimi olmayan (caries free, CF) popülasyonlarda yaygın olduğu tespit edilmiştir. Fakat diş yüzeyine kolonize olabilen, düşük pH'a sahip ortamda yaşayabilen, çok miktarda asit üretebilen en önemli patojen mikroorganizmalardan olan *S. mutans* genellikle diş çürüğünün birincil etiyolojik belirleyicisi olarak kabul edilir (25,26). Sağlıklı insanlarda *S. mutans* floranın küçük bir bileşeni olarak ağızda bulunur. Fakat aktif çürük lezyonu artan hastalarda, *S.mutans*`ın, florada baskın hale geldiği görülmektedir. En belirgin şekilde

S.mutans, çürüğün başlamasıyla; *Lactobacillus* ise kavitasyon oluşmuş bir lezyonun aktif ilerlemesiyle yani ilerlemiş çürüklerle ilişkilendirilmektedir (12,82,112,114).

Klinik araştırmalar dişteki bazı bölgelerin fiziksel formları nedeniyle çürüğü arttırdığını göstermiştir. Buna göre çoğunlukla dişin çiğneyici yüzeyinde bulunmasıyla birlikte diş yüzeyindeki girintili çıkıntılı yüzeylerin (pit ve fissürler) *Streptococcus mutans* için en uygun yaşam ortamı ve çürüğe en yatkın bölgeler olduğu tespit edilmiştir. Bu derin girintiler, bakteriler için bir sığınma alanı oluşturmalarıyla birlikte tükürük faktörlerinin o bölgeye ulaşmasını ve demineralizasyonun tamirini de engellerler (82). Benzer şekilde dişlerin çarpıklığı da çürük problemlerine yatkınlığı artırır.

Gross ve ark. çalışmalarında; çürüklerin derecesi ilerledikçe ağızdaki bakteri topluluğu çeşitliliğinde bir azalmanın meydana geleceği ve koşulların değiştiği ortamda bazı bakteriler (*Streptococcus mitis, S. pneumoniae, S. infantis* gibi) için hayatta kalmanın zorlaşacağı sonucuna varmıştır. Aynı zamanda sağlıklı deneklerde laktobasil tespit edememiş, çürük derecesi ilerledikçe tüm *Lactobacillus* türlerinin seviyelerinin arttığını da belirtmişlerdir (115). Yang ve ark., 16S rRNA genini sekanslayarak sağlıklı ve çürük aktif yetişkinlerin oral mikrobiyomu üzerinde yaptığı çalışmada; sağlıklı ve çürükler arasında bakteri bolluğunda, özellikle *Prevotella* türlerinde anlamlı farklılıklar olduğunu göstermiştir (116). Aas ve ark., sadece diş çürüğü olan çocuk ve genç yetişkinler üzerinde yaptıkları çalışmada; bakteriyel profillerin hastalık ve sağlık durumlarında değişiklik gösterdiğini belirtmiş ve diş

çürüğü etiyolojisinde birincil patojen olarak *Streptococcus mutans*'ın rolünün olduğuna ve *Lactobacillus* türlerinin genel olarak çürük lezyonlarında bulunduğuna işaret etmişlerdir (26).

İlerlemiş çürük lezyonları YND teknolojileri ile çalışıldığında, toplam bakteri bileşiminin aslında ekilebilir bakteri sayısından oldukça fazla olduğu görülmüştür. Bu, ilerlemiş çürüklerle ilişkili bakterilerde henüz çözülmemiş bir karmaşıklığın var olduğunu göstermektedir (107).

Chhour ve ark., ileri düzeyde çürük lezyonları bulunan bireylerde 16S rRNA gen dizilime yöntemini kullanarak; *Prevotella spp*'nin nispi bolluğunu keşfetmeyi amaçladığı çalışmada, 75 türün varlığını gözlemlemiş, ve bu türlerin %50'sini *Laktobacil*lerin oluşturduğu, %15'inde ise *Prevotella*ların bol olduğunu bulmuştur (107). Becker ve ark. da diş yüzeylerinden aldıkları plaklarla yaptıkları araştırmada; diş çürükleri ile *Streptococcus mutans* bakteri türü arasında önemli epidemiyolojik kanıtların olduğunu belirtse de çürük patobiyolojisinin daha karmaşık bakteri türleri içerebileceğini belirtmişlerdir ve derin dentin çürüklerine sahip olan bireyler için *Bifidobacterium ve Lactobacillus* türlerini derin çürük lezyonlarda bulunan önemli patojenler olarak göstermişlerdir. Aynı zamanda *Veillonella* türünün ilerlemiş yaşlarda ve derin dentin çürükleri olan bireylerde daha yüksek oranlarda tespit edildiğini belirtmişlerdir (117).

Çürük mikrobiyolojisinin anlaşılmasında; geleneksel mikrobiyoloji çalışmalarının (bakteri tanımlama-boyama teknikleri, besiyeri, ekim, kültür,

antibiyotik duyarlılık testleri, florometrik teknikler gibi) yanında metagenomik analizler gibi, kültürden bağımsız, yüksek çözünürlüklü, yeni teknolojik imkanların gelişmesi, karyojenik (çürük oluşturabilen) mikroorganizmaların yeni ve önemli türlerinin düzeylerini belirlemede yeni bir çağ başlatmıştır (64,82).

Son yıllarda, mikroorganizmaların tanımlanması ve özelliklerinin daha iyi anlaşılması, aynı zamanda yeni türleri keşfetmek için genetik biliminden yararlanılmaya başlanmıştır. Bu alanda yapılacak her yeni çalışma çürük mikrobiyolojisini daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır (82).

2.8.3. Çürük Diş Dokularının Muayenesi

Ağız sağlığına ilişkin muayenelerin yapılması, değerlendirilmesi, ölçütlerinin hesaplanması ve verilerin toplanması, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün önerdiği üzere; ağız muayenelerinin, standardizasyon ve kalibrasyonu eğitimi almış diş hekimliği fakültesi mezunu bir diş hekimi tarafından yapılması gerekmektedir (118-120).

Diş muayenesi yapılırken diş yüzeyinin temizlenmesi önemlidir. Diş dokusu yüzeyindeki tartar ve farklı renklenmeler, yapılan çürük değerlendirmelerinde yanlış sonuçlar doğurabilir. Bu durumda diş yüzeyinin hava ile kurutulması gerekir, kurutmanın iyi yapılması dekalsifikasyonları daha belirgin hale getirir (121).

2.8.4. Çürük Muayenesinde Kullanılan Tanı Yöntemleri

Toplumların ağız-diş sağlığı düzeyini gösteren ve çeşitli değerlendirmeler için kullanılan temel ölçütler, farklı gruplara göre karşılaştırılabilir bilgilerdir. Bu ölçütler, rutin sağlık kontrolleriyle kolayca elde edilebilir ve ölçütlerle yapılan araştırmalar başlıca bireyleri veya genel toplumu etkileyen ortak ağız-diş sağlığı hastalıkları ve durumları hakkında bilgiler verir (110,118,122).

Diş çürüğünün teşhis ve tanısı, bir hastalığın neden olduğu çürük lezyonları ve oluşturdukları kaviteler gibi doku hasarlarının klinik bulgularının tespitini içermektedir. Çürük tanısında kullanılacak yöntemin ideal olabilmesi için; basit, güvenilir, geçerli, non-invaziv, yüksek sensitivite, spesifite (hastalık olan veya olmayan dişleri ayırt edebilme) ve doğruluk oranı değerlerine sahip olması gereklidir. Yöntemin tekrarlanabilir ve güvenilir olması önemlidir (110,122,123).

Kullanılan yöntemin "altın standart" olarak değerlendirilebilmesi için 3 kriteri sağlaması gerektiği belirtilmiştir (110,122,124).

a) Tekrarlanabilir bir yöntem olmalıdır.

b) Anatomik ve sağlıksız dokular ayırt edilebilmelidir.

c) Yöntem bağımsız olmalıdır.

Diş hekimliğinde bireylerin çürük değerlendirmesine ilişkin çalışmalar 1800'lü yıllardan günümüze kadar süregelmektedir ve bu amaçla, birçok değerlendirme ve öngörme modeli geliştirilmiştir (125).

Fakat maalesef ki günümüzde kabul gören çürük tanı yöntemleri klinik uygulamalarda kullanıldıklarında "altın standart" özelliklerinin tamamına birden sahip değildir (123,124). Bu nedenle aşağıda sıralanan tanı yöntemlerinin genellikle ya tek başlarına ya da birbirleriyle kombinasyon olarak kullanıldığı görülmektedir (121).

- Geleneksel Metotlar

  Görsel Muayene (Vizüel Yöntem)
  Büyüterek Görsel Muayene
  Geleneksel Radyografik Muayene

- Günümüzdeki Dijital Teknolojileri İçeren Yöntemler

  Dijital Radyografik Muayene
  Elektronik Çürük Monitörü Yardımı ile Muayene
  Fiber Optik Transillüminasyon (FOTİ) Yardımı ile Muayene
  Kantitatif Işık Etkili Floresan Yöntemi (QLF) Yardımı ile Muayene
  Lazer Floresan Sistemler Yardımı ile Muayene

- Henüz Geliştirilmekte Olan Teknolojileri Kullanan Yöntemler

  Ultrasonik Görüntüleme Sistemi (Sonografi) Yardımı ile Muayene

Bunlar gibi halihazırda kullanılan ve yeni gelişen ve gelişmeye devam eden birçok çürük tanı yöntemi bulunmaktadır. Geleneksel metotlardan olan gözle muayene klinik uygulamalarda sıklıkla kullanılan bir tanı yöntemidir (111,123). Klinik muayene sırasında yapılan görsel inceleme ışık, ayna ve sond kullanılarak ve diş yüzeyinin iyice temizlenip kuru hava ile kurutulmasıyla yapılan incelemedir (126).

Bu metotların klinik sensitivitesi (seçicilik) nispeten düşük olsa da, spesifitesi (duyarlılık) yüksek olduğu belirlenmiştir Bu metot ile (112);

- Dişlerin dile ve yanağa bakan yüzeylerin,
- Ön dişlerin arayüzeylerin,
- Diş girintilerindeki kavitasyonsuz mine çürüklerin,
- Minede sınırlı olan, klinik olarak saptanabilen kavitelerin,
- Arka dişlerin dile ve yanağa bakan yüzeyleri,
- Ön dişlerin ara yüzeylerinde oluşan ve dentinde kavitasyona neden olmuş lezyonların,
- Kavitasyon oluşturmuş çürüklerin,
- Köklerde oluşan kavitasyonlu ve kavitasyonsuz çürüklerin tanısı konulabilir.

Ayrıca bu gibi yöntemler görsel muayene ile başarılı sonuçlar elde edebilmek amacıyla klinik muayeneler sırasında kullanılabilecek bazı kriterleri ve beraberinde skorlama sistemlerini de getirmiştir (127). Diş çürüğünün değerlendirilmesinde, Çürük-Eksik-Dolgulu Diş (DMF) İndeksi, Uluslararası Çürük Tespit ve Değerlendirme Sistemi (ICDAS), Uluslararası Çürük Sınıflandırması ve Yönetim Sistemi (ICCMS), Çürük Değerlendirme Spektrumu ve Tedavisi (CAST) İndeksi, Amerikan Dişhekimleri Birliği Çürük Sınıflandırma Sistemi (ADA CCS), PUFA İndeksi, NYVAD Sistemi gibi skorlama sistemleri kullanılmaktadır.

2003 yılında skorlama sistemlerine alternatif olabilecek ve tüm dünyada kullanılabilecek olan ICDAS geliştirilmiştir. 2005 yılında bu sistem daha da

iyileştirilerek ve bazı değişikliklere gidilerek kullanımı kolaylaştırılmış ve ICDAS II olarak adlandırılmıştır (127-130).

2.8.5. Uluslararası Çürük Tespit ve Değerlendirme Sistemi II – ICDAS II

Diş çürüğü kompleks bir hastalıktır ve son yıllarda diş çürüğünün hangi gelişim aşamasında bulunduğunun tespitini yapabilmek için pek çok sayıda değerlendirilme kriteri geliştirilmiştir (111).

2001 yılında ABD'de düzenlenen NIH'ın "yaşam boyu diş çürüklerinin teşhisi ve yönetimi" konulu bir konferansta, çürük tespit/teşhis sistemlerinin güvenilirlik ve tekrarlanabilirliğin önemli kriterler olduğu sonucuna varılmıştır. Fakat görsel ve görsel-dokunsal kriter dahil olmak üzere mevcut olan çürük tespit/teşhis sistemlerinin çoğu yeterince güçlü değildi. Buna dayanarak, uluslararası bir grup araştırmacı, hem çürük aktivitesinin değerlendirilmesine izin verecek hem de uluslararası kabul görmüş bir çürük tespit sistemi tasarlama amacıyla 2003 yılında farklı kuruluşlar tarafından da desteklenen ICDAS'ı kurdu. 2005 yılında bu sistem dünyanın dört bir yanından katılımcıların geri bildirimlerine dayanarak, modifiye edilmiş ve ICDAS II olarak değiştirilmiştir. Bu sistem, ağızdaki demineralizasyon olayı sonucu oluşmaya başlayan diş çürüğünü, gözle görünen başlangıç safhasından, kavitasyon gösteren ilerlemiş safhalarına kadar altı basamakta tespit etmek üzere dizayn edilmiştir (111,112,128,130).

2.8.6. ICDAS II Çürük Skorları

Dişler, tavsiye edilen süre kadar (en az 5 saniye) kurutulduktan sonra ICDAS II skorları diş çürüğünün tipine ve derecesine göre 0' dan 6' ya kadar sıralanır. Bireysel diş yüzeyleri için ICDAS II skorları şu şekilde tanımlanmıştır (18,131):

0 → hava ile kurutmadan sonra minede hiç değişiklik olmaması durumu, sağlıklı diş dokuları
1 → hava ile kurutmadan sonra minede ilk görsel değişiklik için
2 → minede belirgin görsel değişiklikler, diş nemli iken bile görülür
3 → lokalize mine parçalanması, henüz çürüğün dentin tabakaya ilerlemesiyle ilgili klinik bir gözlem yoktur
4 → dentinde koyu gölgeler halinde görülen çürükler
5 → dentinde gözle görünür belirgin kaviteli çürükler
6 → gözle görülen, yüzeyin yarısından fazlasını etkileyen geniş kaviteli dentin çürüğü

2.9.DNA Dizileme Yöntemleri

1953'te Franklin, Watson ve Crick tarafından DNA'nın yapısının keşfinden sonra gen dizilerinin sekanslanması bilim camiası tarafından üzerinde çalışmalar yapılan bir alan olmuştur. İnsan genomunu sekanslamanın mümkün kılınması, özellikle genetik bozuklukların tedavisine giden sürecin ilk adımı olmasıyla ayrı bir değer kazanmıştır (132).

Tek başına fenotipik özelliklere dayalı rutin mikrobiyolojik testler kültürlenmiş bir izolatın tanımlanması konusunda yeterli bilgi vermediğinde veya bir belirsizlik

durumu olduğunda DNA dizilemeye dayalı moleküler testlerden yardım alınabilmektedir (73).

DNA profillemenin adli tıpta temel unsur hale gelmesinde elbette dizileme teknolojilerindeki ilerlemelerin katkısı vardır (44). Fakat günümüzde hala, DNA profillemedeki ilerlemelere rağmen henüz bir çözüme kavuşamamış birçok ceza davası vardır. Olay yerindeki kanıtların kirlenmesi veya yok olmasına neden olacak herhangi bir etken, soruşturmanın verimliliğini engelleyecektir. Bu nedenle, failleri suç mahaline bağlamak için elde edilebilecek her türlü delilin iyileştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (44).

2.9.1. Birinci Nesil Dizileme Teknikleri (Klasik Dizileme)

Birinci nesil dizileme yöntemleri, 1977'de Frederick Sanger'in geliştirdiği Sanger dizileme yöntemi ve Maxam-Gilbert tarafından tanımlanan kimyasal degredasyon yöntemleridir. Bu dizileme teknikleri ile DNA dizileme otomatik hale getirilmiştir. Genom sekansını belirlemede en yaygın kullanılan yöntem Sanger metodudur (133). Bu metot literatürde zincir sonlandırma metodu olarak da bilinmektedir.

Sanger dizileme yöntemi ile uzun DNA bölgelerinin dizilenmesi için gereken klonlama işlemleriyle birlikte uzun zamana ve maaliyete ihtiyaç duyulsa da sekanslama konusunda devrim niteliğinde bir gelişme olmuştur. Bu yöntem kullanılarak elde edilen en büyük başarı, 13 yıl süren ve gerçekleştirilmesi yaklaşık 3

milyar ABD dolarına mal olan HGP'nin tamamlanmasıdır (134). Fakat bunların yanında, son derece yüksek maliyet, uzun deney kurulum süreleri, yüksek DNA konsantrasyonları gereksinimi gibi zahmetli adımların olması, bilim adamlarını Sanger yöntemine alternatif olabilecek yeni yöntemler arayışına sokmuştur (90,135).

2.9.2. Yeni Nesil Dizileme (YND) Teknolojileri

Sanger dizileme tekniklerinin birçok avantajının beraberinde getirdiği sınırlamalar yeni teknoloji platformlarının geliştirilmesine yol açmıştır. YND teknikleri, kitleler halinde dizileme verileri üretir ve tüm genomlardaki veya DNA veya RNA'nın hedeflenen bölgelerindeki nükleotidlerin dizisini yüksek verimle, uygun maliyetle ve çok kısa sürelerde dizilemeyi mümkün kılmaktadır (136).

Paralel dizileme ile milyonlarca küçük DNA parçasının eş zamanlı olarak dizilenmesi gerçekleştirilebilmekte; bu sayede genomda bulunan her bir bazın birden çok kez okunması mümkün kılınmakta ve mevcut çeşitlilik daha doğru bir şekilde tespit edilebilmektedir (134,137,138).

Keşfedildiği ilk zamanlarda oldukça pahalı olan YND sistemlerindeki DNA okuma maliyetleri, son zamanlarda geliştirilen teknolojiler sayesinde güvenilirliği yüksek çok sayıda tekniğin ortaya çıkarılmasıyla oldukça azalmıştır (139).

2.9.2.1.Oxford Nanopor Teknolojisi (ONT)

YND teknolojilerindeki ilerlemeler, dizileme maliyetlerinin azaltılması, verimin artırılması ve sürecin hızlandırılması gibi ihtiyaçlarla hızla devam etmektedir, bu da yeni teknolojilerin gelişmesi ve uygulama alanlarına girmesiyle devam etmektedir. Bu ihtiyaçları gidermek ve tek moleküllü bir algılama sistemi geliştirmek için 2005 yılında ONT adını duyurmaya başlamıştır (140). Teknoloji, hatalı okuma oranlarının düşürülmesi, okunan dizi uzunluğunun artırılması, aynı anda çok sayıda bölgenin analizi, maliyet düşüklüğü gibi faydaların yanı sıra kısa sürede tamamlanması, her zaman laboratuvar ortamı gerektirmemesi ve olgu başında kullanıma imkân sağlaması gibi yenilikleri içermektedir (141,142).

Nanopor tabanlı teknolojilerde, dizilemesi yapılacak DNA ekstraktının biyolojik bir gözenekli yapıdan geçerken DNA'nın sahip olduğu nükleotidlerin sebep olduğu elektriksel iletkenlikteki değişikliklerin ölçülmesiyle DNA bazları tanımlanmaktadır (143,144). Tek moleküllü algılama teknolojisi olan nanopor teknolojisiyle moleküllerin tespiti, çeştli analitlerin tanımlanması ve nicelenmesi PCR amplifikasyonuna, kimyasal etiketlemelere (floresan boya ile vs) veya modifikasyonlara (nükleotidler, polimerazlar veya ligazlar) gereksinim duymadan yapılabilmektedir. Aynı zamanda PCR işleminin olmamasıyla analiz süresi günlerden saatlere düşmektedir. Teknoloji, uzun okumalara (10.000-50.000 baz) izin vermesi dahil olmak üzere önemli avantajlar sağlamaktadır (141).

Teknolojinin ilk ürünü MinION, 2015 yılında ticari olarak satışa sunulmuştur. MinION, genel DNA dizileme uygulamaları için tasarlanmış, USB bellek boyutlarında bir DNA dizileme cihazıdır. Bu cihaz herhangi bir bilgisayarın USB 3.0 girişine takılarak kullanılabilmektedir. MinION kullanılarak yapılabilecek ortalama uzunluk 5,4 kb ila 10 kb arasında olduğu açıklanmıştır ve bu değer, yüzlerce baz çifti olan diğer DNA dizileme teknolojilerinin ortalama okuma uzunluklarından çok daha uzundur. Cihazın küçük, pratik ve düşük maliyetli olması laboratuvar ortamının yanı sıra dış ortamda, hatta direkt olgu başında oldukça hızlı analiz olanağı sağlamaktadır (144). Şirket, 2017'de daha yüksek verimli projelerle ilgilenen müşteriler için beş MinION akış hücresini entegre eden masa üstü kullanımına uygun GridION X5 cihazını piyasaya sürmüştür. 2018'de ise PromethION çok verimli DNA dizileme cihazı piyasaya tanıtılmıştır (140).

ONT'nde özel kitler sayesinde kütüphane hazırlığı 10 dakika gibi kısa bir sürede gerçekleştirilebilmektedir. MinION ile dizileme sırasında cihaz bilgisayara bağlandıktan sonra uygun yazılım programları ile bağlantılar kurularak eş zamanlı dizileme analizi gerçekleştirilebilmektedir (145).

2.9.2.2.YND Teknolojilerinin Kullanım Alanları

YND teknolojileri kullanılmaya başlandıkları tarihlerden itibaren; transkriptom dizileme ve epigenetik çalışmalar dahil olmak üzere, metagenomik, tarımsal biyoteknoloji, metilasyon analizi, atasal DNA analizleri gibi birçok alanda uygulanmaya başlanmış ve oldukça etkili sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca, hastalıklara

yol açan mikroorganizmaların genomlarının dizilenebilmesine imkan sağlamasıyla, adli tıp, adli mikrobiyoloji ve birçok temel bilim alanında bu teknolojilerin farklı kullanımları uygulamaya girmektedir (146).

2.9.2.2.1 Metagenomik

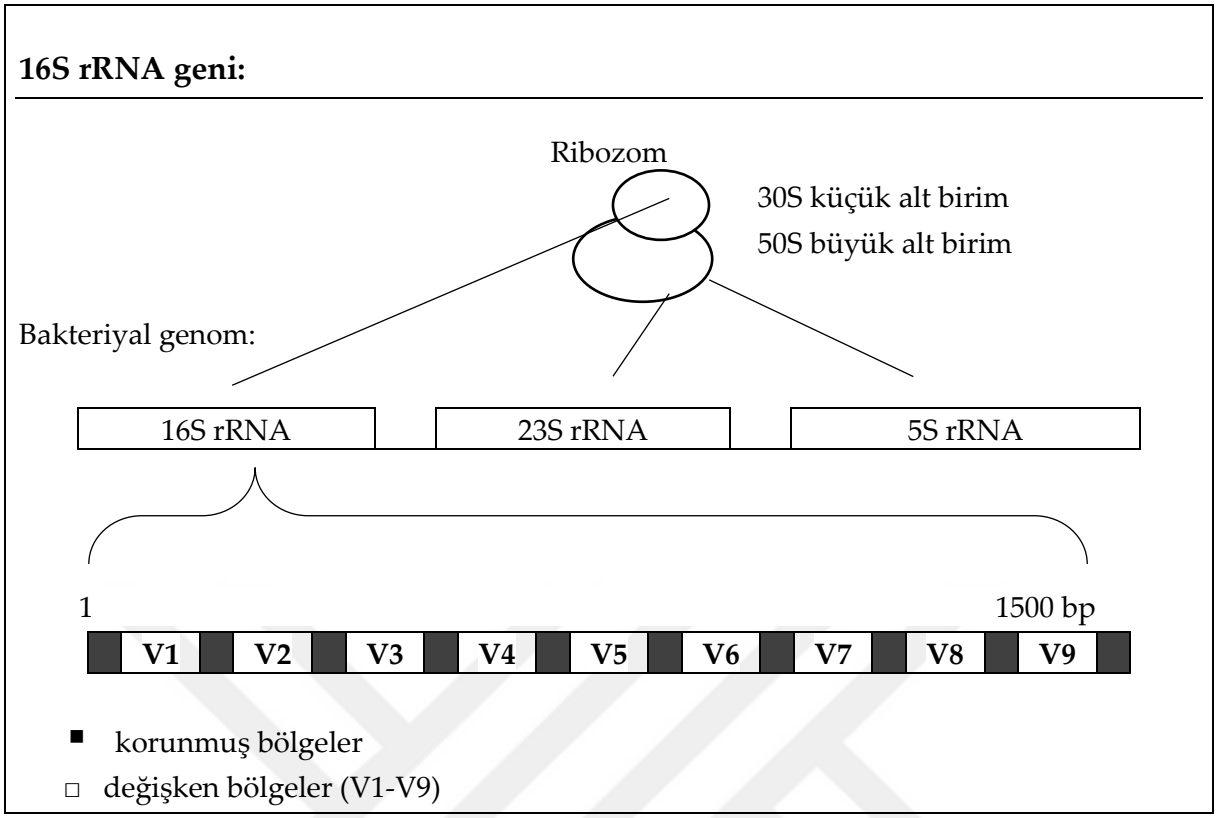
Günümüzde YND teknikleri ile karmaşık örneklerin, çok başarılı bir şekilde dizilenmesi mümkündür. Yeni nesil DNA dizileme sistemlerindeki ilerlemeler, tüm mikrobiyom analizini olanaklı kılan metagenom biliminin ortaya çıkmasını ve hız kazanmasını sağlamıştır (147).

Metagenomik, bir arada bulunan karmaşık mikrobiyal topluluklarını karakterize etmek için kültürden bağımsız yöntemlerin kullanıldığı genomik tabanlı araştırmaların kullanımını tanımlamaktadır. Metagenomik analiz teknikleri, bakteri kültürü ihtiyacını ortadan kaldırarak çekici bir alternatif sunmaktadır (30). Belirli bir örnekte bulunan birçok mikrobiyal organizmanın karakteristik ve işlevsel bilgilerini belirleyebilmek için tüm genomlarını sıralayarak temel filotiplenmesi yapılabilmektedir (80).

Bir mikrobiyomun biyolojik çeşitliliğini belirlemek için geliştirilen teknik ve yöntemlerden en çok tercih edileni, önceden oluşturulan veri tabanlarına kayıt edilmiş taksonomik bilgilerin kaynak olarak kullanılarak, edinilen yeni verilerin taksonomik ünitelere ayrıştırılmasıdır. Tüm genom dizilemesi kullanılamayan durumlarda yalnızca metagenomik analiz ile tüm prokaryotlarda küçük alt birim (16S) ribozomal

RNA genleri dizilenerek bu yeni verilerin bilinen dizilerle eslenmesiyle taksonomik profilleme sağlanmaktadır (148). 16S rRNA gen klon çalışmalarıyla mikrobiyal dünyanın gizli çeşitliliği ortaya çıkarılmıştır (64).

Prokaryotik ribozomlar, 30S ve 50S'lik alt birimlere sahip olup, 16S rRNA geni 30S'lik ribozom alt biriminde yer almaktadır (Şekil 2). Bu genler, mRNA'dan protein translasyonunda görev aldığı için organizmalar arasında son derece korunmuştur. 16S rRNA geni 3' ucunda, mRNA'nın AUG kodonuna bağlanma kapasitesine sahip olan anti-Shine Dalgarno dizileri olarak bilinen bazı özel dizileri barındırır. Dolayısıyla 16S rRNA geni protein sentezinin başlamasında çok önemli etkinliğe sahiptir. 16S rRNA geni tüm bakteriler ve arkeler için korunmuş, değişken bölgeler içerir ve bu değişken bölgeler farklı mikroorganizmalar arasında ayırım yapmak için kullanılır (80,148). Oldukça kısa (~1500 bç) nükleotid uzunluğuna sahip olan 16S rRNA geni, üzerinde bulunan korunan bölgeler arasında dağılmış dokuz hiperdeğişken bölgeye (V1'den V9'a kadar adlandırılır) sahiptir (Şekil 2). Haritalama, bilinen 16S rRNA dizilerinin bir veri tabanına okunurken organizmaların taksonomik tanımlanmasına izin veren bu segmentlerdir (81,149-151).



Şekil 2: Ribozom kompleksi ve 16S rRNA geninin şeması. Gri ve beyaz kutular sırasıyla korunan bölgeleri ve hiperdeğişken bölgeleri göstermektedir (152).

16S barkodlama olarak da bilinen bu dizileme yöntemi hem deneysel hem de hesaplama açısından daha ucuz olduğu ve daha büyük ölçekli çalışma tasarımlarına izin verdiği için metagenomik çalışmalarda daha sık kullanılmaktadır. 16S rRNA gen metotları, bu korunmuş bölgeleri hedef alan evrensel primerler kullanarak olabildiği kadar farklı ve çok sayıda mikroorganizmanın PCR ile amplifiye edilmesini sağlar. Sonraki aşama, amplifiye edilen örneğin YND cihazları ile sekanslanmasıdır (148). Bakteri sekansları, GenBank gibi uluslararası gen veri bankalarındaki gen dizilimleri ile karşılaştırılarak bakteri identifikasyonu yapılmaktadır. Böylelikle, bakterilerin çok büyük bir kısmı, tür ve cins düzeyinde tanımlanabilmektedir (148). Üstelik YND

teknikleri ile az zaman aralığında ve düşük maliyetler ile 16S rRNA gen bölgesinin çalışılması mümkün olmaktadır (80).

Bakteriyel 16S rRNA geninin yüksek verimli DNA dizilimi, biyolojik numuneler üzerinde kültüre dayalı yöntemlerle belirlenebilenden çok daha büyük bir bakteri çeşitliliğini ortaya çıkarmıştır. Bakteri kültürü yöntemleri 16S rRNA gen dizilimine kıyasla uygun maliyetli olsa da, genomik yöntemler oldukça tamamlayıcıdır, ve kültür ortamında kolayca yetiştirilemeyen bakterileri tanımlayabilir (153). Dizileme teknolojilerindeki hızlı ilerlemeler son yıllarda mikrobiyom anlayışını ve kullanımını oldukça artırmıştır (154). Nitekim 16S rRNA genlerinin dizi analizini kullanan kültürden bağımsız moleküler yöntemlere dayanarak, ağız boşluğundaki baskın bakteri türlerinin çoğu da tanımlanabilmiştir (20,26,95,107).

Bakteriyel 16S rRNA genlerinin yüksek oranda değişkenlik gösteren bölgeleri farklı derecelerde dizileme çeşitliliği gösterir, fakat organizmadaki bütün bakterileri ayırt edebilmek için bu gen dizisinde bulunan sadece bir bölgenin analizi yeterli değildir. Cins düzeyinde bir ayrım yapabilmek için genellikle V2, V3 ve V6 bölgelerinin yeterli olmasıyla, bu diziler bazı durumlarda tür düzeyinde ayrım yapmak için de kullanılabilmektedir (155,156). Bu bölgeler yüksek oranda değişkenlik sergileyen bölgeler olduklarından biyolojik çeşitliliğin sınıflandırılmasında önemli bir potansiyeli barındırmaktadır. Bu gen dizisinde bulunan diğer bölgeler yüksek derecede dizi korunumuna sahip olduklarından dolayı pek tercih edilmezler. Jeodezik

uzaklık verilerine göre farklı alt-bölgeler arasındaki yakınlık ilişkisi incelendiğinde, bakterilerin filogenetik analizi için V4-V6 bölgelerinin en güvenilir ve 16S rRNA gen dizisini en iyi temsil eden bölgeler olduğu bildirilirken; V2 ve V8 bölgelerinin güvenilirliğinin az olduğu bildirilmiştir (151,156).

16S rRNA genlerinin yüksek düzeyde değişkenlik gösteren bölgelere ek olarak, korunmuş bölgeleri de içeriyor olması o bölgelere de primerlerin yazılmasına olanak sağlamaktadır. Bu özellik, 16S rRNA genlerini mikrobiyota çalışmalarında oldukça popüler hale getirmiştir. Bu nedenle, veri tabanlarında kaydedilen 16S rRNA gen dizileri sürekli olarak artmakta; bu da bakterilerin kimliklendirilmesi ve sınıflandırılmasında gen dizilerine ulaşılabilirliği artırmaktadır (156). Bahsi edilen yüksek derecede değişkenlik gösteren 'V' bölgeleri için başlangıç ve bitiş pozisyonları Tablo I'de gösterilmiştir (156).

Tablo I: 16S rRNA geninin yüksek değişkenlik gösteren bölgelerinin başlangıç ve bitiş pozisyonları (156).

Değişken bölge numarası	**Başlangıç ve bitiş numaraları**
V1 bölgesi	69-99
V2 bölgesi	137-242
V3 bölgesi	433-497
V4 bölgesi	576-682
V5 bölgesi	822-879
V6 bölgesi	986-1043
V7 bölgesi	1117-1173
V8 Bölgesi	1243-1294
V9 Bölgesi	1435-1465

3. Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda Ocak 2021 tarihinden itibaren İstanbul'daki özel bir diş tedavi kliniğine diş rahatsızlığı nedeniyle gelen ve klinikte yapılan tetkikler sonucunda numune vermeye uygun hastalardan alınan tükürük örnekleri kullanıldı. Gönüllü olarak çalışmaya katılmak isteyenlerin bütün dişlerinin durumu alanında uzman bir diş hekimi tarafından klinik değerlendirmesi yapılması sureti ile belirlendi. Her diş ve diş yüzeyi için çürük değerlendirmesi gerçekleştirildi ve her birey için çürük dişlerin ICDAS II skorları tespit edildi.

Çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 132763 sayılı ve 08.10.2020 tarihli etik kurulu raporu alınarak onaylanmıştır (EK-1).

Bu tez projesi İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje Kodu: TYL-2020-35209) (EK-2).

3.1.Örneklem Grubu Seçimi ve Örnek Alımı

Kliniğe diş tedavisi nedeni ile başvuran bireylerin ağız sağlığı durumu, dişlerin, oral mukozanın ve periodontal (diş eti) dokuların muayenesini içeren klinik muayenesi uzman bir diş hekimi tarafından gerçekleştirilmiştir. Klinikte yapılan tetkikler sonucunda numune vermeye uygun, en az 3 derin dentin çürüğü bulunan ve bu çürüklerin ICDAS II skoru 4-6 arasında olan, 18 yaş üstü, son 3 ay içerisinde antibiyotik kullanımı olmayan, yakın zamanda kronik bir rahatsızlık geçirmemiş olan

8 hasta olgu grubu olarak araştırmaya dahil edildi. Bu gruptaki bireylerden henüz tedavilerine başlamadan, 50 mililitre (ml)'lik steril falcon tüplere en az 2 ml olacak şekilde tükürük örnekleri alındı ve ardından tedavi süreçleri başlatıldı. Tükürükteki çürük dişlerin tedavisine ve zamana bağlı mikrobiyom değişimini gözlemlemek için her bireyden, tedavileri bitiminden itibaren 30 gün süre geçmesi beklenerek tekrar aynı şekilde örnek alımı yapıldı. Temin edilen örnekler soğuk zincir korunarak en hızlı şekilde -20 °C buzdolabına kaldırıldı.

Aynı zamanda; cinsiyet fark etmeksizin, 18 yaş üstü, son 3 ay içerisinde antibiyotik kullanımı olmayan, yakın zamanda geçirmiş olduğu bir kronik rahatsızlığı ve ağzında çürük dişi bulunmayan (ICDAS II skoru 0) 2 birey de kontrol grubu olarak araştırmaya dahil edildi. Bu gruptaki bireylerden de aynı şekilde 30 gün ara ile toplamda 2 kez olmak üzere 50 ml'lik steril falcon tüplere en az 2 ml olacak şekilde örnek alımı yapıldı. Örnekler, vakit kaybedilmeden -20 °C buzdolabına kaldırıldı. Böylece toplamda 10 gönüllü bireye (8 hasta–2 kontrol) ait 20 tükürük örneği toplandı.

Hasta grubunun örnekleri BT (Before Treatment) ve AT (After Treatment) olmak üzere tedavi öncesi ve tedavi sonrası örnek şeklinde kodlandı; kontrol grubunun kodlamaları ise BC (Before Control) ve AC (After Control) şeklinde yapıldı (Tablo VII). Proje bulgularımızın uluslararası makaleye dönüştürülmesi hedeflendiğinden (grafik çıktıları için) kodlamalarda ingilizce kısaltmalar tercih edilmiştir.

Gönüllülerin çalışma öncesinde ve çalışma sırasında çalışmayı etkileyebilecek kriterleri tespit edildiğinde veya çekilme kararı alan denekler çalışmadan çıkartılmıştır.

Belirtilen tarihlerde tetkikleri yapılan, ayrıca "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" ve "Gönüllü Anket Formu"nu (EK-3) doldurarak çalışmaya dahil edilen 8 hasta ve 2 kontrol grubunun bilgileri anketler yardımı ile kaydedildi.

Çalışmaya katılan kişilerin cinsiyet dağılımı, meslek bilgisi, bilinen hastalığı, kullandığı ilaç bilgisi, gün içerisinde diş fırçalama sıklığı ve ağız florasını etkileyebilecek önemli koşullar formlar yardımıyla belirlenmiştir (Tablo V).

3.2.Klinik Muayene ve ICDAS II Skorlarının Belirlenmesi

Hastaların ağız içi muayeneleri yeterli gün ışığı alan, dental ünitenin bulunduğu özel bir diş tedavi kliniğinde, ayna, sond, hava tabancası ve görüşü kuvvetlendirmek amacıyla reflektör ışığı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada ağız sağlığına ilişkin ölçütlerinin hesaplanması ve verilerin toplanması DSÖ'nün önerdiği şekilde gerçekleştirilmiş; ağız muayenelerinin standardizasyonu ve kalibrasyonu eğitimi almış diş hekimliği fakültesi mezunu bir diş hekiminden destek alınmıştır.

Bu kapsamda tüm bireylerin diş çürüğü muayenesi uzman diş hekimi tarafından yapılmış olup; çürük lezyon skorları, görsel/görsel-dokunsal kriterlerle mevcut çürük tespit/teşhis sistemi olan ICDAS II ile belirlenmiştir.

Bu sistemle dişler, muayeneye başlamadan önce basınçlı hava ile 5 saniye kurutulmak suretiyle incelenmiştir (18,131).

Bireysel diş yüzeyleri için ICDAS II skorları şu şekilde tanımlanmıştır (18,131,157):

0 → hava ile kurutmadan sonra minede hiç değişiklik olmaması veya çok az değişiklik olması durumunda,
1 → minede gözlenen ilk görsel değişiklik için,
2 → belirgin görsel değişiklikler,
3 → lokalize mine parçalanması,
4 → dentin altında koyu gölge
5 → görünür dentin ile belirgin kavite (çürük)
6 → görünür dentin ile yüzeyin yarısından fazlasını etkileyen geniş ve belirgin kavite

Burada, bireylerin çürük durumlarına göre (18);

-Çürüksüz diş yüzeylerinin ICDAS II skorları 0,

-Aktif mine çürük lezyonlarının ICDAS II skorları 1-3,

-Aktif dentin çürük lezyonlarının ICDAS II skorları ≥4 şeklinde belirlenmiştir

Bu araştırmada, hasta grubunun çalışmaya dahil edilme kriteri, en az 3 diş için ICDAS II skorunun 4,5 veya 6 olmasıydı; bununla birlikte hasta eğer daha fazla çürük dişe sahipse diğer dişleri daha düşük ICDAS II skorlarına sahip çürük lezyonlarına da sahip olabilirdi.

Çalışma kapsamında gönüllülere ait ICDAS II skor bilgileri bulgular kısmında Tablo VI`da verilmiştir.

3.3.Örneklerin Saklanması

Araştırmanın amacı ve kapsamı hakkında bilgi verilerek araştırmaya katılmayı kabul ettiklerine dair sözlü ve yazılı onamları alındıktan sonra; sağlıklı ve diş tedavisi görecek olan kişilerden toplanan tükürük örneklerine; örneklerin alındığı tarih, örnekleme sayısı (1. veya 2. örnekleme) ve kod numaraları yazılıp etiketleme işlemi yapıldı. Alınan örnekler meydana gelebilecek herhangi bir kontaminasyonu önlemek amacıyla önce -20 °C'de saklanma koşullarında muhafaza edildi, numunelerin hepsi tamamlandıktan sonra soğuk zincir korunarak analiz işlemlerinin gerçekleştirileceği laboratuvar ortamına taşındı. Sonrasında, çalışmaya dahil edilen tüm örneklere mikrobiyal DNA izolasyonu ve metagenomik analiz prosedürleri uygulandı.

3.4.Çalışmada Kullanılan Malzemelerin Listesi

Çalışmamızda kullandığımız, laboratuvar alet ve gereçlerine ait bilgiler Tablo II'de verilmiştir.

Tablo II: Çalışmada kullanılan laboratuvar alet ve gereçlerinin listesi.

Cihaz	Marka / Model
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 32R
Spektrofotometre	Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spektrofotometre
Sıcak su banyosu	Inovia Dry Bath
Vorteks	Velp Scientifica
Spin	Inovia
Buzdolabı	Arçelik Altus / No frost
Tükürük Patojen DNA İzolasyon Kiti (50)	QIAamp® UCP Pathogen Mini Kit
PCR Saflaştırma Kiti (250)	Agencourt AMPure® XP (Beckman Coulter) – Life Sciences
YND Teknolojisi	ONT'den MinION Mk1B cihazı
YND Kiti (Kütüphane Hazırlığı)	ONT 16S Barkodlama Kiti 1-24 (SQK-16S024)
PCR Kiti	LongAmp HotStart Taq 2X Master Mix
50 ml lik steril falcon tüpler	
1.5 ve 2 ml lik mikrosantrifüj tüpleri	
Otomatik pipet ve uçları	

3.5.Tükürük örneklerinden DNA izolasyonu

Laboratuvara getirilen ve -20 °C de donmuş halde bulunan örnekler, ilk önce oda sıcaklığında inkübe edilip çözülmeye bırakıldı. Sonuçlarda herhangi bir değişiklik olmasını önlemek amacı ile örnekler bekletilmeden DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Toplanan tükürük örnekleri üzerinde DNA izolasyonu, QIAamp® UCP Pathogen Mini Kit ile gerçekleştirildi. İzolasyon işlemi, protokole uygun olarak 1.5 ml tükürük numunesi üzerinden yapıldı.

QIAamp® UCP Pathogen Mini Kit ile İzolasyon İşlemi Aşamaları

1. 2'şer ml'lik ependorf tüplerine belirgin bir şekilde kodlanmış her bir örnekten 1.5'er ml eklendi ve maksimum hızda (1400 x g'den fazla) 5 dakika santrifüj edildi.
2. Süpernatant uzaklaştırıldı (gerekli durumlarda 1. ve 2. adımlar tekrar edildi).
3. Pellet üzerine 400 mikrolitre (µl) buffer ATL eklendi ve tekrar süspansiyon hale getirildi.
4. Örneklere 40 µl proteinaz K eklendi ve 10 saniye vorteks yapıldı.
5. Örnekler 56 °C de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. Örneklere 200 µl buffer APL2 eklendi. Ependorf tüplerin kapağı kapatıldı ve 30 saniye darbeli vorteks (pulse-vortex) yapıldı.
7. 70 °C de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
8. Kısa bir spin attırıldı (10 saniye kadar).
9. Lizata 300 µl etanol ilave edildi. Ependorfun kapağı kapatıldı ve 15-30 saniye darbeli vorteks yapıldı.
10. Dikkatli bir şekilde 9. basamaktaki karışımdan (miks) 600 µl alınarak QIAamp UCP Mini spin kolona (2 ml toplama tüp içerisinde) aktarıldı. 6000 x g (8000rpm) de 1 dakika santrifüj edildi. Filtrat içeren toplama tüpleri atıldı, yeni temiz 2 ml toplama tüplerine QIAamp UCP Mini spin kolonlar yerleştirildi.
11. QIAamp UCP Mini spin kolonlara 9. basamaktaki karışımdan (miks) arta kalan alındı ve 10. basamak tekrar edildi.
12. Dikkatli bir şekilde QIAamp UCP Mini spin kolonlar açıldı ve 600 µl buffer APW1 eklendi. Kapak kapatıldı ve 6000 x g (8000rpm) de 1 dakika santrifuj edildi. Filtrat içeren toplama tüpleri atıldı ve yeniden temiz toplama tüplerine QIAamp UCP Mini spin kolonlar yerleştirildi.
13. Dikkatli bir şekilde QIAamp UCP Mini spin kolonlar açıldı ve 750 µl Buffer APW2 eklendi. Kapaklar kapatıldı ve 20,000 x g'de 3 dakika santrifüj edildi.

14. Burada, kolonda kalan APW2 yi olabildiğince elimine etmek amacı ile toplama tüplerindeki filtratlar uzaklaştırıldıktan sonra kolonlar tekrar yerleştirildi ve 1 dakika maksimum hızda santrifüj edildi.
15. Yeni 2 ml toplama tüpleri içerisine QIAamp UCP Mini spin kolonlar yerleştirildi. Kapaklar açıldı ve membran tamamen kuruyana kadar 56 °C de 3 dakika inkübasyona bırakıldı.
16. Bu adımda toplama tüpleri atıldı ve QIAamp UCP Mini spin kolonlar yeni temiz birer 1.5 ml elüsyon tüpler içerisine yerleştirildi. Dikkatli bir şekilde 50 µl buffer AVE den QIAamp UCP Mini membran merkezine ilave edildi. Kapakları kapatıldı ve 70 °C de 6 dakika inkübasyona bırakıldı.
17. DNA'yı kolondan ayrıştırmak için 1 dakika boyunca maksimum hızda (25.000 x g) santrifüj edildi.
18. Elde edilen elüsyonlar, etiket bilgisi kontrol edilerek parafilmle kaplandıktan sonra -20 °C buzdolabında saklandı.

3.6. DNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi

İzolasyon sonunda elde edilen DNA izolatlarından, Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spektrofotometre cihazı kullanılarak miktar ve saflık ölçümleri gerçekleştirildi. DNA, RNA ve protein örneklerinden yalnızca 1-2 µL alınarak saniyede tüm spektral verileri hızlıca ölçebilen bu cihazla DNA miktarları, son hacmi 50 µl olan izolatlardan cihaza 1'er µl yüklenmesi ile belirlendi. Aynı zamanda bu cihaz A260/A280 ve A260/A230 saflık oranlarını da doğrudan ölçebilmektedir. A260/A280 oranının ~1.8, A260/A230 oranının ise 1.8-2.2 olması elde edilen DNA'nın saf olduğunu göstermektedir (158). Elde edilen DNA izolatlarının A260/A280 oranının ~1.8 civarında olması sonraki basamaklarda uygulanacak olan

ileri moleküler tekniklerden verimli ve doğruluğu yüksek sonuçlar elde etmek açısından önemlidir (158). Özellikle YND analizlerinde DNA'nın saflığı çok önemlidir, ayrıca birbirlerine benzer başlangıç konsantrasyonlarına sahip DNA örnekleri ile çalışmak sonuçların güvenilirliğini arttıracaktır (159).

Elde edilen 20 farklı genomik DNA için yapılan spektrofotometrik miktar ölçüm sonuçları bulgular kısmında Tablo VII`de gösterilmiştir. Bu ölçümler sırasında aynı zamanda kontaminasyon riskini belirlemek için DNA kalite ve saflık değerleri (A260/A280 ve A260/A230) de ölçüldü (Tablo VII).

16S amplikonları, PCR yöntemi ile elde edildiğinden, saflık derecesi yeterli olmayan örnekler (NanoDrop A260/A280 ve A260/A230 değerlerinin çok düşük olduğu örnekler), manyetik tanecik yöntemiyle saflaştırıldıktan sonra, örneklerin tekrar kalite kontrolleri yapılıp, esas konsantrasyonları ölçülerek işleme devam edildi.

3.7. YND Çalışması (16S rRNA Sekanslama)

QIAamp® UCP Pathogen Mini Kit ile DNA izolasyonları gerçekleştirilen örneklerin mikrobiyom kompozisyonunu belirlemek için farklı türlerdeki korunmuş bölgelerin arasına dağılmış dokuz hiperdeğişken bölge (V1-V9)'den yararlanarak, prokaryotlara özel 16S rRNA gen bölgesi üzerinden metagenomik analiz gerçekleştirildi.

Örneklerin yeni nesil DNA sekanslama işlemi için alınan izin dahilinde Gen Ova Medikal Ürünler ve Sağlık Hizmetleri LTD.ŞTİ.'nin anlaşmalı laboratuvarlarının

teknik alt yapısı kullanılmıştır. Tükürük mikrobiyomlarındaki bakteriyel dağılım belirleme çalışmaları, ONT'ne dahil olan MinION Mk1B cihazı (Şekil 3) ile 16S rDNA geninin değişkenlik gösteren tüm bölgeleri (V1-V9) üzerinden gerçekleştirilmiştir (160).

3.7.1. PCR Yöntemi ile 16S rRNA Geni V1-V9 Bölgelerinin Çoğaltılması

Çalışmanın PCR aşaması, 16S dizileme, bakteri tanımlaması gibi amaçlarla kullanılan "ONT 16S Barkodlama Kiti 1-24 (SQK-16S024)" el kitabında belirtilen koşullar ve 16S geninin V1-V9 bölgesini kapsayan, bu kitin içerisinde bulunan primerler kullanılarak yürütülmüştür (161).

İzole edilen DNA'dan ~1500 bç uzunluğunda olan 16S rRNA geninin tamamını çoğaltmak ve ardından kütüphane hazırlığı yapmak için bir yöntem sunan 16S Barkodlama Kiti ile genom belirli bir ilgi alanına daraltılarak, genomun gereksiz bölgelerini sıralamadan numunedeki tüm organizmalar tanımlanabilir olmuş ve bu sayede analiz daha hızlı ve daha ekonomik hale getirilmiştir. Sekanslama öncesi örneklerden elde edilen DNA'ları PCR ile çoğaltma işlemi kit içeriğine uygun olarak, LongAmp™ Hot Start Taq 2X Master Mix (162) ile hızlı dizileme adaptörlerinin bağlanmasını kolaylaştıran 5' uçlar içeren spesifik 16S primerleri (27F ve 1492R) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve takibinde gerçekleştirilen amplifikasyon aşamaları sırasıyla Tablo III ve Tablo IV'te gösterilmiştir.

Tablo III: DNA izolasyonu yapılan örneklerin PCR reaksiyon bileşenleri.

Bileşen	Hacim
LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix	25 µl
Forward Primer	5 µl
Reverse Primer	5 µl
Kalıp DNA	10 ng (10 µl)
Nükleaz içermeyen su (Nuclease-free water)	50 µl ye kadar

Tablo IV: 96-well plate`e hazırlanan karışıma uygulanan amplifikasyon aşamaları.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk denatürasyon	95 ° C	1 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95 ° C	20 saniye	30 döngü
Primer Eşleşmesi	55 ° C	30 saniye	30 döngü
Primer Uzaması	65 ° C	2 dakika	30 döngü
Son Uzatma	65 ° C	5 dakika	1 döngü
	4 °C	∞	

Amplifiye edilmiş DNA, Agencourt AMPure® XP (Beckman Coulter) (163) kullanılarak saflaştırılıp, kütüphane hazırlamasına geçilmiştir. Bu aşamada PCR ürünlerinin manyetik boncuklar ile temizlenmesi sağlanmıştır.

3.7.2. 16S rRNA Tüm Bölge (V1-V9) Dizileme İçin Kütüphane Oluşturulması

Tez projesi kapsamında üretilen yüksek çıktılı DNA dizi analizleri aşağıda detaylandırılan, hassas moleküler analizler gerçekleştirmek için yüksek teknoloji elektroniklere gömülü nano gözenekler kullanan ve yeni nesil bir algılama teknolojisi olan ONT program parçaları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Dizileme işlemine başlamadan önce kütüphane hazırlığı ve flow cell hazırlığı aşamaları yapılmıştır. Saflaştırma işlemi tamamlanmış her bir örnek DNA'sı, tamamı kitin içerisinden çıkan ONT dizileme tamponu, yükleme tanecikleri ve nükleaz free su

ile karıştırıldıktan sonra ONT FLO-Min106D (versiyon R9.4.1) akış hücresine (flowcell) yüklenerek kütüphane hazırlığı gerçekleştirilmiştir (Şekil 4). ONT FLO-Min106D (R9.4.1) akış hücresi MinION cihazıyla ve bu cihazın masaüstü modeli olan GridION cihazıyla kullanılan bir sarf malzemedir. Bu cihazda, her bir DNA fragmanı için sadece o okumaya özgü benzersiz bir FAST5 uzantılı dosya üretilir. Bu ham okuma verileri ise ONT MinKNOW (versiyon 21.02.1) programı ile alınmıştır.

3.7.3. YND Sonucu Elde Edilen Verilerin Biyoinformatik Analizi

Fast5 olarak elde edilen veriler, ONTguppy (versiyon 5.0.16) komut satırı programı ile adapter ve barkodlardan kurtarılmıştır. Dizilerin FastQC (v 0.11.9) ile kalite kontrolü sonrasında, bbtools (v. 38.91), magicblast (v. 1.6.0) ve samtools (v. 1.13) programları ile konsensüs dizileri oluşturulmuştur.

Tekrar kalite kontrol işlemlerine giren diziler, 29.07.2021 tarihli Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) 16S bakteriyel veri bankasına (164) eşleştirilip anotasyonu yapılarak, her örnek için "operasyonel taksonomik ünite (OTU)" tabloları elde edilmiştir. Son olarak, elde edilen OTU ve taksonomik değerlere göre alfa çeşitlilik, beta çeşitlilik ve filum (şube), cins ve tür bazında analizler gerçekleştirilmiştir.

3.7.4. YND Sonucu Elde Edilen Verilerinin İstatistiksel Analizi

Elde edilmiş olan OTU dosyaları, R (v. 4.0.4) ve R studio IDE (v. 1.4) ile tek bir tabloda birleştirilerek tüm bakteriler için göreceli miktarlar elde edilmiş, yine R

istatistiksel bilgisayar dili (tidyverse, readr, xlsx, RColorBrewer, gplots ve ggplot2 paketleri) kullanılarak verilerin istatistiksel analizleri gerçekleştirilmiştir.

Normallik testi için Shapiro-Wilk's testi, önemli farklılık gösteren özellikleri belirlemek amacıyla Wilcoxon Signed Rank Testi ve düzeltme yöntemi olarak da Bonferroni yöntemi uygulanmıştır.

4. Bulgular

4.1. Çalışma Gruplarına Ait Özellikler

Bu çalışmada hasta grubunun dağılımı %50'si (n=4) kadın, %50'si (n=4) erkektir. Kadın hasta grubunun ortalama yaşı 25.75 (22-31), erkek hasta grubunun ortalama yaşı ise 21 (18-24) olarak hesaplanmıştır. Hasta grubunun toplam yaş ortalaması ise 23.37 yıldır. Bu grupta yer alan hastaların hiç biri son üç ay içinde ilaç veya antibiyotik kullanmamıştır. Kadın hastaların tamamının günde iki kez, erkek hastaların ise günde bir veya iki kez diş fırçalama sıklığı olduğu belirlenmiştir. Gargara suyu veya diş ipi kullanımına bakıldığında ise iki kadın hastanın düzenli, bir erkek hastanın nadiren diş ipi kullandığı, diğer hastaların ise hiç kullanmadıkları belirtilmiştir. Ayrıca bu grupta yer alanların tamamı herhangi bir hastalığının olmadığını belirtmişlerdir. Sigara kullanım sıklığına bakıldığında ise yalnızca bir kadın hastanın günde 4-5 adet sigara kullandığı görülmüştür.

Kontrol grubunun dağılımı ise %100`ü (n=2) kadın olmak üzere yaş ortalaması 25.5 (22-29) olarak tespit edilmiştir. Her iki kişinin de son üç ay içinde herhangi bir antibiyotik kullanımı olmadığı görülmüştür. Ayrıca her ikisinin de günde iki kez dişlerini fırçaladıkları, gargara suyu veya diş ipi kullanmadıkları ve herhangi bilinen bir hastalıklarının olmadığı belirtilmiştir. Bu kişilerin sigara kullanım alışkanlığının olmadığı görülmüştür.

Çalışmaya katılan kişilerin cinsiyet dağılımı, meslek bilgisi, bilinen bir hastalığı, kullandığı ilaç bilgisi, gün içerisinde diş fırçalama sıklığı gibi ağız florasını etkileyebilecek önemli koşullar Tablo V'te verilmiştir.

Tablo V: Çalışma gruplarına ait özellikler.

	Cinsiyet	**Yaş**	**Meslek**	**İlaç/anti-biyotik kullanımı**	**Diş fırçalama sıklığı (günde)**	**Gargara suyu veya diş ipi kullanımı**	**Hastalık bilgisi**	**Sigara kullanımı**
Hasta 1	Kadın	23	Güzellik uzmanı	+3ay	2 kez	Her gün diş ipi	yok	yok
Hasta 2	Erkek	18	Öğrenci	+3ay	1 kez	yok	yok	yok
Hasta 3	Kadın	31	Güvenlik görevlisi	yok	2 kez	yok	yok	yok
Hasta 4	Erkek	24	Öğrenci	+3ay	1-2 kez	yok	yok	yok
Hasta 5	Erkek	18	Tekstil	+3ay	1 kez	yok	yok	yok
Hasta 6	Kadın	27	Tekstil	+3ay	2 kez	yok	yok	yok
Hasta 7	Kadın	22	Stajyer Avukat	+3ay	2 kez	Bazen diş ipi	yok	Günde 4-5 adet
Hasta 8	Erkek	24	Öğrenci	+3ay	1-2 kez	Nadiren diş ipi	yok	yok
Kontrol 1	Kadın	29	Öğretim üyesi	+3ay	2 kez	yok	yok	yok
Kontrol 2	Kadın	22	Öğrenci	+3ay	2 kez	yok	yok	yok

4.2. ICDAS II Skor Verileri

Uzman bir diş hekimi tarafından, ICDAS II'ye göre, görsel/görsel-dokunsal kriterlerle belirlenen, bireylerin mevcut çürük durumlarının verileri Tablo VI'daki gibidir.

Tablo VI: Çalışma kapsamındaki bireylerin çürük dişlerine ait ICDAS II skor verileri.

Çalışma Grubu	**ICDAS II Skorları***				
Hasta 1	26-4	15-4	17-4	47-4	
Hasta 2	16-5 15-6	25-6 26-6	47-4 46-4	36-5 37-5	
Hasta 3	14-5 16-5	21-4 24-5	35-5 36-6	37-5 45-5	46-5
Hasta 4	45-6 46-5	47-5 35-4	36-4 24-5	25-4 14-4	15-4 17-5
Hasta 5	12-5	37-4	47-4		
Hasta 6	48-4	38-4	36-6	37-4	
Hasta 7	46-3 47-4	17-4 27-4	26-4 22-2		
Hasta 8	15-4 25-4	26-4 47-4	27-4 46-4		
Kontrol 1	0				
Kontrol 2	0				

*Soldaki değerler FDI Numaralandırma Sistemine (Federation Dentaire Internationale Numbering System) (165) göre dişçilikte kullanılan diş numaralarını; sağdakiler ise o dişlerin sahip oldukları ICDAS II skorlarını göstermektedir

4.3. DNA Miktar Tayini Sonuçları

Çalışma kapsamında gönüllülerden toplanan tükürük örneklerinden QIAamp® UCP Pathogen Mini Kit içeriğine uyularak DNA izolasyon işlemi gerçekleştirildi. İzolasyon sonunda elde edilen DNA izolatlarının miktar ve saflık değerleri, Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spektrofotometre cihazı ile ölçüldü. Ölçüm sonuçları Tablo VII'de verildiği gibidir.

Tablo VII: Genomik DNA'ların spektrofotometrik ölçüm değerleri.

	HASTA GRUBU			
	KOD	**DNA Miktarı (ng/µl)**	**A260/A280**	**A260/A230**
Hasta 1	BT1	470.5	2.00	1.28
	AT1	669.6	1.94	1.04
Hasta 2	BT2	745.2	2.14	1.69
	AT2	614.4	2.11	0.64
Hasta 3	BT3	447.1	2.04	1.34
	AT3	934.0	1.91	2.01
Hasta 4	BT4	299.2	1.90	1.25
	AT4	98.6	2.04	0.90
Hasta 5	BT5	997.8	2.10	0.75
	AT5	489.7	1.96	0.91
Hasta 6	BT6	394.6	2.04	1.68
	AT6	528.1	2.11	1.03
Hasta 7	BT7	478.7	2.04	1.31
	AT7	264.0	1.96	0.84
Hasta 8	BT8	396.5	1.95	1.93
	AT8	1040.1	1.93	1.91
	KONTROL GRUBU			
Kontrol 1	BC1	701.2	1.96	1.83
	AC1	480.6	1.97	0.95
Kontrol 2	BC2	91.2	1.95	0.90
	AC2	493.5	1.99	1.65

4.4.Çalışma Gruplarına Ait Metagenomik Analiz Bulguları

Çürük diş tedavisi öncesinde ve sonrasında alınan tükürük örnekleri ONT platformu ile dizilenmiştir. Düşük kalitede okuma ve konak kontaminasyonunun filtrelenmesinden sonra, ortalama olarak her örnek için 87.500 gen okunarak, toplamda 1.750.000 16S rRNA gen okuması elde edilmiştir.

Dizileme sonucunda toplam 18 bakteri şubesi, 695 bakteri cinsi ve 986 bakteri türü tespit edilmiştir. Kullanılan veri tabanı ile yapılan karşılaştırmada %95'lik bir benzerlik eşiği ile toplam 28 cins ve tür her iki grup (BT ve AT) arasında anlamlı olarak farklı göreceli bolluklarda temsil edilmiştir ($p<0.05$) (Tablo XVII).

Dizilemesi yapılan örneklerin metagenomik analizi yapıldıktan sonra okuma sonuçlarının biyolojik örneklere taksonomik atanması ile elde edilen veriler her bir örneğe ait kod numaralarıyla birlikte tablolar ve şekiller halinde gösterilmiş ve mikroorganizma çeşitliliği belirlenmiştir. Taksonomik analiz sonuçları, örneklerde tespit edilen mikroorganizmaların taksonomik bilgileri ve o örnekteki görülme yüzdeleriyle birlikte gösterilmiştir.



Şekil 3: Oxford Nanopore Teknolojilerine (ONT) dahil olan MinION Mk1B cihazı.



Şekil 4: Oxford Nanopore Teknolojilerinde (ONT) kullanılmak üzere tasarlanmış akış hücresi (FlowCell).

4.4.1. Taksonomik Sınıflandırma Sonuçları

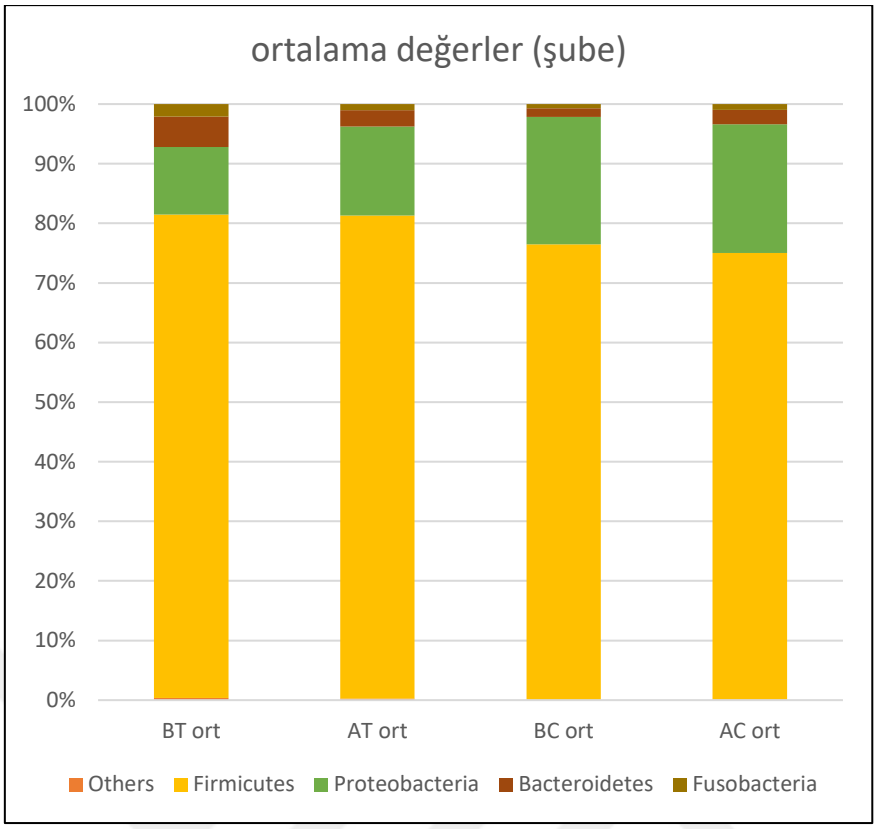
Örneklerdeki taksonomik içeriklerin şube (filum), cins ve tür düzeyinde taksonomik sınıflandırması gerçekleştirilmiştir.

Şube (Filum) Düzeyinde:

Örneklerin şube düzeyinde yapılan incelemeleri sonucunda; *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* ve *Fusobacteria* şubeleri tespit edilmiştir. Bireyler kendi aralarında kategorize edilerek karşılaştırmaları yapılmış, bu şubelerin ortalama bolluk değerleri % cinsinden Tablo VIII'de verilmiştir. Tükürükte oldukça yüksek oranda bulunan *Firmicutes* şubesi %80 in üzerinde bir oranla tüm gruplarda baskın şube olarak görülmektedir. *Proteobacteria* tedavi sonrası (AT) örneklerde, *Bacteroidetes* ve iyi temizlenmemiş ağız ve diş etlerinde sıklıkla rastlanan ve türleri genellikle fırsatçı patojen olarak tanımlanan *Fusobacteria* şubesi ise tedavi öncesi (BT) örneklerinde daha yüksek değerlerde bulunmuştur (Şekil 5).

Tablo VIII: Hasta ve kontrol gruplarında görülen şubelerin ortalama değerleri (%).

Mikroorganizma (Şube)	**Hasta Grubu**		**Kontrol Grubu**	
	BT Grubu Ort. (%)	**AT Grubu Ort. (%)**	**BC Grubu Ort. (%)**	**AC Grubu Ort. (%)**
Firmicutes	81.09	81.04	76.41	74.94
Proteobacteria	11.31	14.95	21.36	21.57
Bacteroidetes	5.11	2.71	1.43	2.38
Fusobacteria	2.11	1.02	0.70	0.99
Diğerleri	0.37	0.26	0.07	0.09

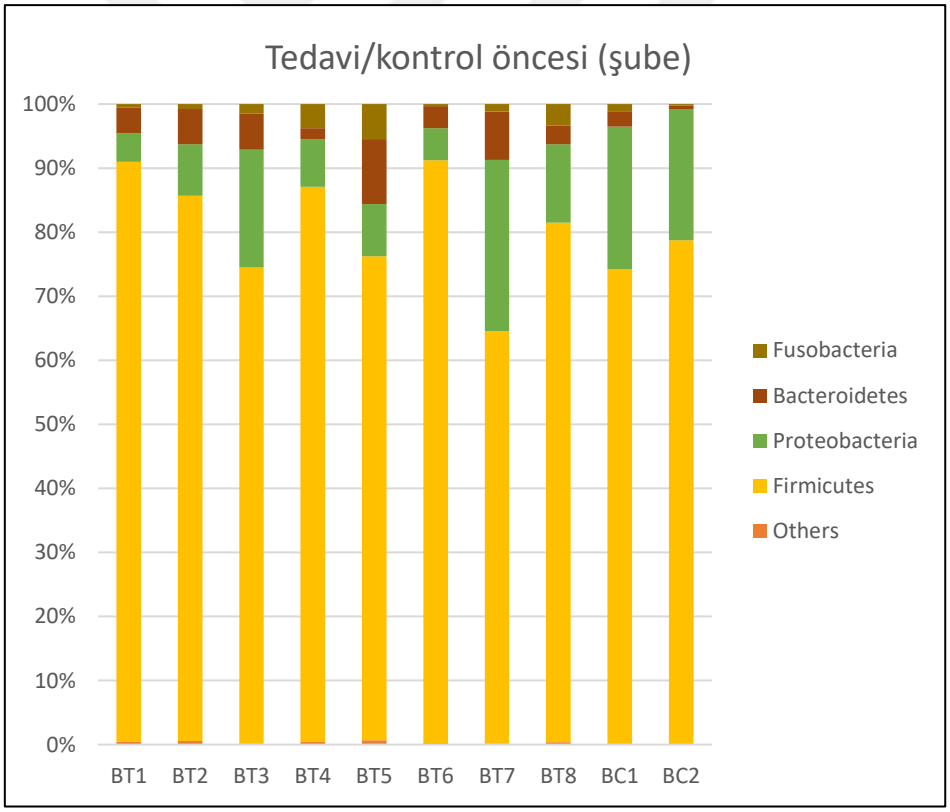


Şekil 5: Hasta ve kontrol gruplarının şube düzeyindeki taksonomik içeriklerinin bağıl bolluk değerleri ortalamalarını gösteren grafik.

Tedavi/kontrol öncesi örneklerinin şube düzeyindeki taksonomik içerikleri Şekil 6'da verilmiştir. Şekildeki değerlere bakıldığında, tüm bireyler içinde en yüksek oranlar *Firmicutes* şubesini göstermektedir. Ağzındaki derin çürük sayısı en fazla olan hastalardan olan BT7 de yıkım yetenekleri bakımından zengin olan ve *Neisseria* gibi türleri barındıran *Protobacteria* şubesi %26.73 ile en yüksek değerde tespit edilmiştir (Tablo IX). Kötü ağız hijyen koşullarında fırsatçı patojen olarak bulunduğu bilinen *Fusobacteria* şubesi BT4 ve BT8 hastalarında diğerlerine göre daha yüksek bollukta gözlenmiştir (Tablo IX).

Tablo IX: Tedavi/kontrol öncesi örneklerin şube düzeyinde taksonomik içeriğinin bağıl bolluk değerleri (%).

Mikroorganizma (Şube)	**Hasta Grubu**							**Kontrol Grubu**		
	BT1	**BT2**	**BT3**	**BT4**	**BT5**	**BT6**	**BT7**	**BT8**	**BC1**	**BC2**
Firmicutes	90.58	85.11	74.31	86.62	75.56	91.02	64.39	81.10	74.15	78.68
Proteobacteria	4.42	8.07	18.40	7.45	8.15	4.97	26.73	12.25	22.26	20.46
Bacteroidetes	4.01	5.50	5.63	1.68	10.17	3.45	7.51	2.90	2.29	0.57
Fusobacteria	0.56	0.75	1.49	3.78	5.44	0.33	1.19	3.35	1.21	0.20
Diğerleri	0.41	0.55	0.15	0.44	0.66	0.21	0.16	0.36	0.07	0.07

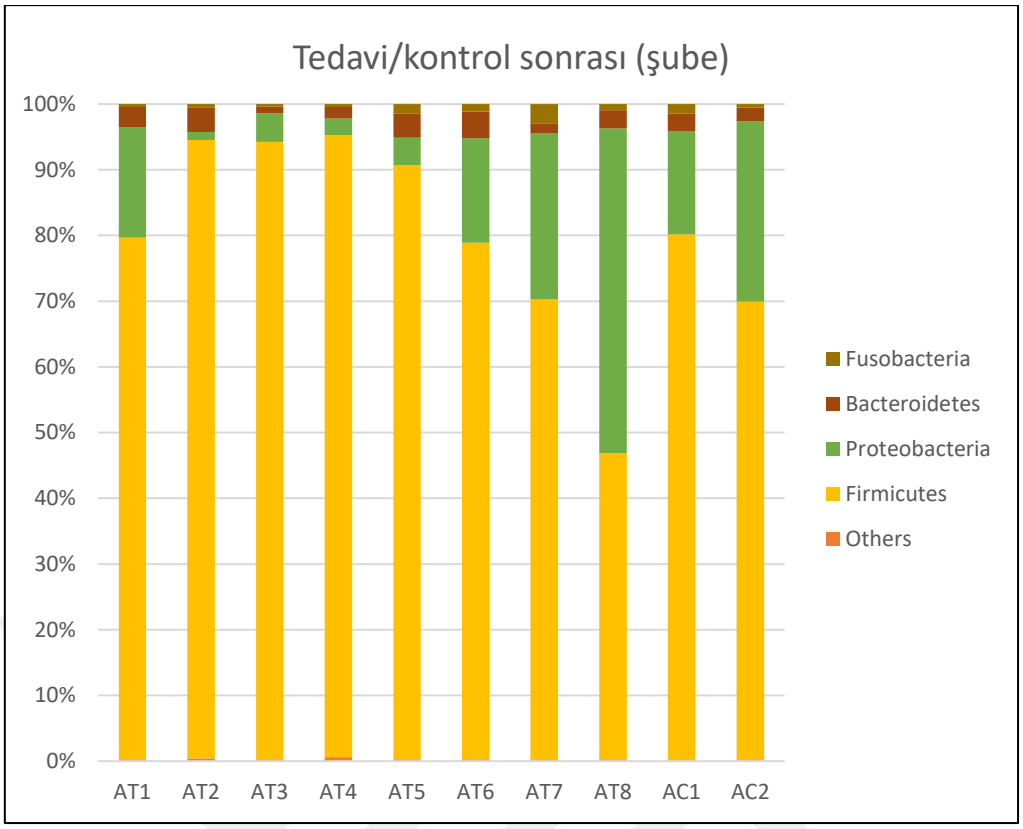


Şekil 6: Tedavi/kontrol öncesi örneklerin şube düzeyinde taksonomik içeriğinin bağıl bolluk değerlerini gösteren grafik.

Tedavi/kontrol sonrası örneklerin şube düzeyindeki taksonomik içerikleri Tablo X'da verilmiştir. Tedavi öncesi tespit edilen şube düzeyindeki bolluk değerlerine göre 5 hastanın (AT2, AT3, AT4, AT5, AT7) *Proteobacteria* bolluk değerlerinde azalma gözlenmiştir. Kötü ağız hijyeninin olduğu ve çürüklü ağızda daha yüksek oranlarda gözlemlediğimiz *Fusobacteria* şubesinin bolluk değeri AT1, AT2, AT3, AT4, AT5 ve AT8 bireylerinde diş tedavileri sonrasında azalış göstermiştir (Şekil 7).

Tablo X: Tedavi/kontrol sonrası örneklerin şube düzeyinde taksonomik içeriğinin bağıl bolluk değerleri (%).

Mikroorganizma (Şube)	**Hasta Grubu**								**Kontrol Grubu**	
	AT1	**AT2**	**AT3**	**AT4**	**AT5**	**AT6**	**AT7**	**AT8**	**AC1**	**AC2**
Firmicutes	79.52	94.11	94.07	94.66	90.39	78.73	70.12	46.73	80.07	69.80
Proteobacteria	16.78	1.20	4.35	2.56	4.19	15.86	25.22	49.41	15.72	27.43
Bacteroidetes	3.09	3.77	1.02	1.72	3.71	4.11	1.54	2.74	2.67	2.10
Fusobacteria	0.44	0.47	0.37	0.46	1.40	1.12	2.93	0.93	1.44	0.55
Diğerleri	0.15	0.43	0.15	0.58	0.29	0.16	0.16	0.16	0.09	0.10



Şekil 7: Tedavi/kontrol sonrası örneklerin şube düzeyinde taksonomik içeriğinin bağıl bolluk değerlerini gösteren grafik.

Karşılaştırma kolaylığı sağlamak amacıyla, her iki grubun tüm bireylerinin (BT,BC/AT,AC) tükürük mikrobiyomlarında en sık tespit edilen bakteri şubelerinin bolluk değerlerini gösteren grafik EK-4'te verilmiştir.

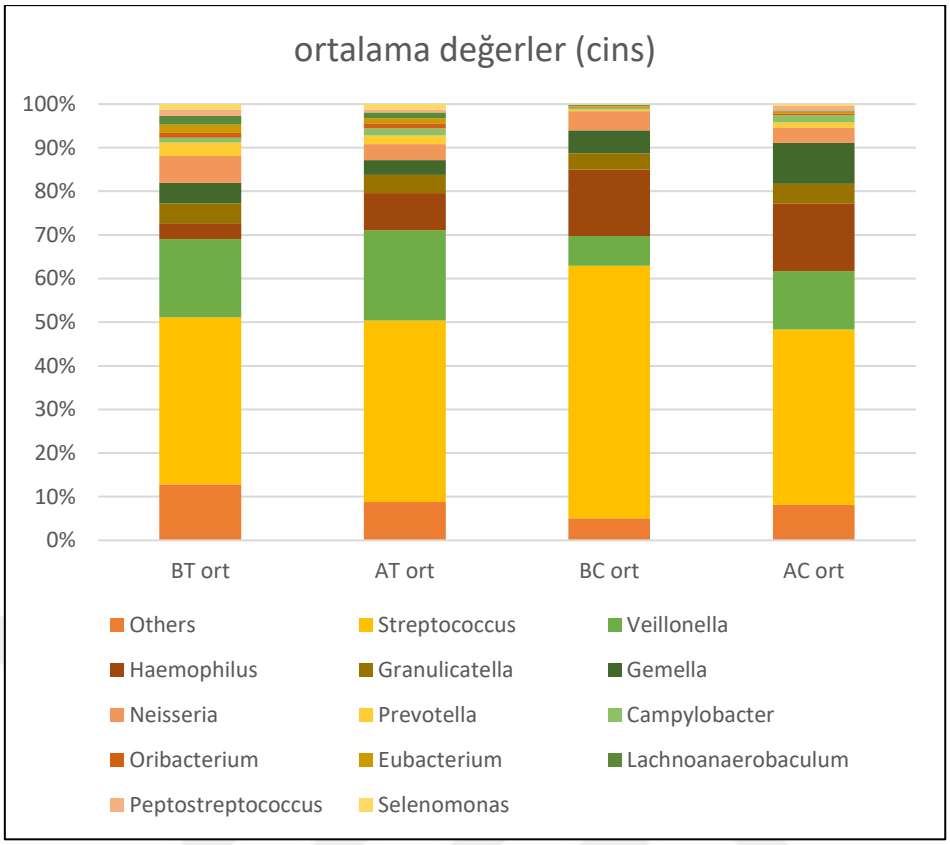
Cins Düzeyinde;

Cins düzeyinde yapılan incelemelerde; *Streptococcus, Veillonella, Haemophilus, Granulicatella, Gemella, Neisseria, Prevotella, Campylobacter, Oribacterium, Eubacterium, Lachnoanaerobaculum, Peptostreptococcus* ve *Selenomonas* cinsleri her iki grupta da en yüksek oranda görülen cinsler olarak bulunmuştur. Bireyler diş tedavilerine başlamadan önce alınan tükürük örneklerinin mikrobiyal kompozisyonları

incelendiğinde, *Streptococcus, Granulicatella, Gemella, Neisseria, Prevotella, Eubacterium, Lachnoanaerobaculum, Peptostreptococcus* cinsleri; tedavileri tamamlanıp 1 ay süre beklenerek alınan tükürük örneklerinde ise, *Veillonella, Haemophilus, Campylobacter, Oribacterium* cinsleri daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Ancak gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Örneklerin mikrobiyal profillerinde sık tespit edilen bakteri cinslerinin göreceli bolluklarının ortalama değerleri Tablo XI ve Şekil 8'de verilmiştir.

Tablo XI: Tükürük mikrobiyomunda sık tespit edilen bakteri cinslerinin ortalama göreceli bolluk değerleri (%).

Mikroorganizma (Cins)	**BT Grubu Ort. (%)**	**AT Grubu Ort. (%)**	**p-değeri**
Streptococcus	38.33	41.65	0.72
Veillonella	17.91	20.64	0.64
Haemophilus	3.62	8.51	0.87
Granulicatella	4.57	4.18	0.87
Gemella	4.70	3.34	0.08
Neisseria	6.14	3.70	0.19
Prevotella	3.09	1.99	0.27
Campylobacter	1.11	1.55	0.64
Oribacterium	1.10	1.19	0.46
Eubacterium	1.88	1.21	0.50
Lachnoanaerobaculum	1.97	1.28	0.38
Peptostreptococcus	1.45	0.67	0.16
Selenomonas	1.27	1.24	0.95
Diğerleri	12.79	8.76	



Şekil 8: Tedavi/kontrol öncesi ve sonrası grupların tükürük mikrobiyomlarında sık tespit edilen bakteri cinslerinin ortalama göreceli bolluğu. "Others", tespit edilen diğer cinsleri temsil etmektedir.

Tablo XII ve Şekil 9'da tedavi öncesi alınan tükürük örneklerinin cins düzeyindeki taksonomik içeriklerin bağıl bolluk değerleri incelendiğinde;

- BT1 örneğinde ağırlıklı olarak *Veillonella* (%30.79), *Prevotella* (%3.67), *Campylobacter* (%1.29), *Oribacterium* (%0.70), *Eubacterium* (%0.88), *Lachnoanaerobaculum* (%1.53), *Peptostreptococcus* (%0.22), *Selenomonas* (%2.74) cinsleri,
- BT2 örneğinde, *Veillonella* (%38.99), *Gemella* (%6.41), *Neisseria* (%5.97), *Prevotella* (%3.74), *Campylobacter* (%1.18), *Oribacterium* (%1.16), *Eubacterium* (%1.40),

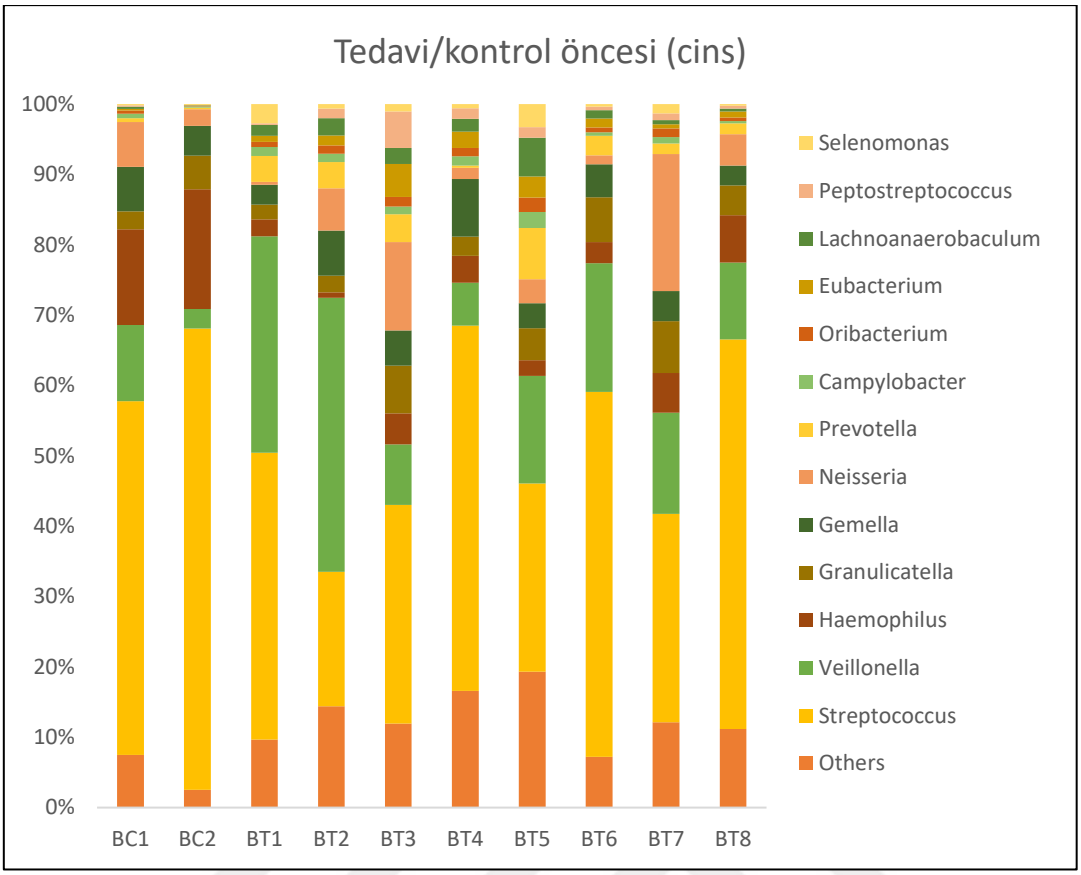
Lachnoanaerobaculum (%2.49), *Peptostreptococcus* (%1.32), *Selenomonas* (%0.65) cinsleri

- BT3 örneğinde, *Veillonella* (%8.59), *Granulicatella* (%6.79), *Gemella* (%5.00), *Neisseria* (%12.52), *Prevotella* (%3.98), *Campylobacter* (%1.07), *Oribacterium* (%1.37), *Eubacterium* (%4.69), *Lachnoanaerobaculum* (%2.269), *Peptostreptococcus* (%5.20), *Selenomonas* (%1.04) cinsleri,
- BT4 örneğinde, *Veillonella* (%6.11), *Gemella* (%8.15), *Campylobacter* (%1.31), *Oribacterium* (%1.18), *Eubacterium* (%2.34), *Lachnoanaerobaculum* (%1.80), *Peptostreptococcus* (%1.50), *Selenomonas* (%0.58) cinsleri
- BT5 örneğinde, *Veillonella* (%15.30), *Granulicatella* (%4.54), *Prevotella* (%7.24), *Campylobacter* (%2.31), *Oribacterium* (%2.03), *Eubacterium* (%3.01), *Lachnoanaerobaculum* (%5.49), *Peptostreptococcus* (%1.48), *Selenomonas* (%3.29) cinsleri
- BT6 örneğinde, *Veillonella* (%18.27), *Granulicatella* (%6.41), *Prevotella* (%2.76), *Campylobacter* (%0.51), *Oribacterium* (%0.67), *Eubacterium* (%1.29), *Lachnoanaerobaculum* (%1.17), *Peptostreptococcus* (%0.51), *Selenomonas* (%0.35) cinsleri
- BT7 örneğinde, *Veillonella* (%14.34), *Granulicatella* (%7.35), *Neisseria* (%19.45), *Prevotella* (%1.52), *Campylobacter* (%0.92), *Oribacterium* (%1.21), *Eubacterium* (%0.57), *Lachnoanaerobaculum* (%0.63), *Peptostreptococcus* (%0.92), *Selenomonas* (%1.33) cinsleri

- BT8 örneğinde ise, *Veillonella* (%10.90), *Neisseria* (%4.45), *Prevotella* (%1.54), *Oribacterium* (%0.53), *Eubacterium* (%0.84), *Lachnoanaerobaculum* (%0.40), *Peptostreptococcus* (%0.44), *Selenomonas* (%0.22) cinslerinin göreceli bollukları kontrol grubu örneklerine göre daha yüksek değerlerde tespit edilmiştir.

Tablo XII: Tedavi/kontrol öncesi grubun bireyleri için tükürük mikrobiyomunda en sık tespit edilen 13 bakteri cinsinin bağıl bolluk değerleri (%).

Mikroorganizma (Cins)	**Hasta Grubu**								**Kontrol Grubu**	
	BT1	**BT2**	**BT3**	**BT4**	**BT5**	**BT6**	**BT7**	**BT8**	**BC1**	**BC2**
Streptococcus	40.75	19.11	31.11	51.94	26.73	51.90	29.65	55.43	50.30	65.53
Veillonella	30.79	38.99	8.59	6.11	15.30	18.27	14.34	10.90	10.80	2.80
Haemophilus	2.39	0.76	4.41	3.79	2.21	3.00	5.66	6.74	13.62	17.00
Granulicatella	2.10	2.36	6.79	2.75	4.54	6.41	7.35	4.23	2.52	4.77
Gemella	2.81	6.41	5.00	8.15	3.55	4.65	4.27	2.79	6.32	4.24
Neisseria	0.42	5.97	12.52	1.60	3.42	1.28	19.45	4.45	6.38	2.35
Prevotella	3.67	3.74	3.98	0.32	7.24	2.76	1.52	1.54	0.54	0.24
Campylobacter	1.29	1.18	1.07	1.31	2.31	0.51	0.92	0.31	0.65	0.15
Oribacterium	0.70	1.16	1.37	1.18	2.03	0.67	1.21	0.53	0.44	0.09
Eubacterium	0.88	1.40	4.69	2.34	3.01	1.29	0.57	0.84	0.21	0.03
Lachnoanaerobaculum	1.53	2.49	2.26	1.80	5.49	1.17	0.63	0.40	0.34	0.04
Peptostreptococcus	0.22	1.32	5.20	1.50	1.48	0.51	0.92	0.44	0.15	0.02
Selenomonas	2.74	0.65	1.04	0.58	3.29	0.35	1.33	0.22	0.19	0.12
Diğerleri	9.68	14.40	11.92	16.57	19.33	7.19	12.10	11.15	7.49	2.54

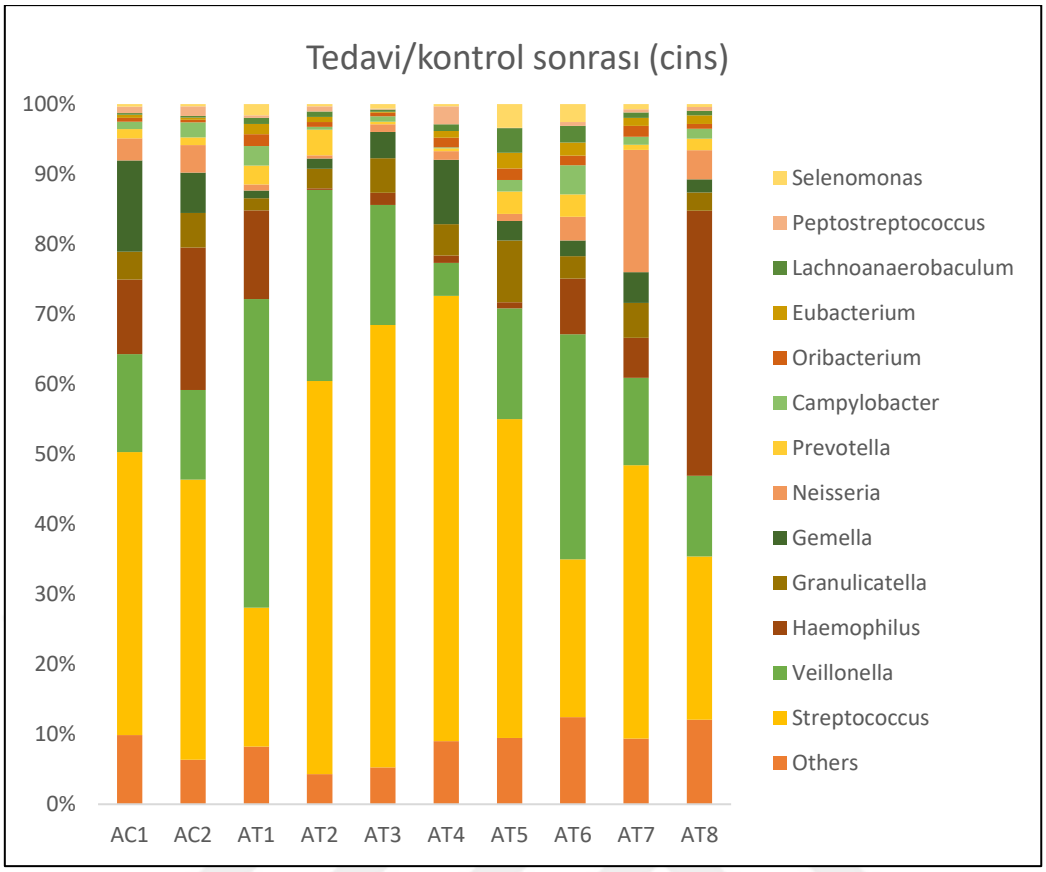


Şekil 9: Tedavi/kontrol öncesi alınan tükürük örneklerinin cins düzeyinde taksonomik içeriğinin bağıl bolluk değerleri.

Tedavi/kontrol sonrası bireylerin tükürük mikrobiyomunda görülen cinslerin göreceli bolluk değerlerinin verildiği Tablo XIII ve Şekil 10'a bakıldığında, *Streptococcus* cinsine ait bolluk değerinin çoğu hastada (AT2, AT3, AT4, AT5, AT7) belirgin bir şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir. *Gemella* ve *Neisseria* cinsleri genel olarak azalış göstermekle birlikte sadece 2'şer bireyde (sırasıyla AT4, AT7 ve AT1, AT6) önemli oranda bir değişim göstermemiştir.

Tablo XIII: Tedavi/kontrol sonrası bireylerin tükürük mikrobiyomunda görülen cinslerin göreceli bolluk değerleri (%).

Mikroorganizma (Cins)	**Hasta Grubu**								**Kontrol Grubu**	
	AT1	**AT2**	**AT3**	**AT4**	**AT5**	**AT6**	**AT7**	**AT8**	**AC1**	**AC2**
Streptococcus	19.86	56.16	63.19	63.61	45.53	22.53	39.05	23.28	40.41	40.01
Veillonella	44.07	27.28	17.14	4.71	15.81	32.14	12.50	11.51	13.99	12.79
Haemophilus	12.69	0.25	1.73	1.05	0.88	7.94	5.72	37.87	10.69	20.36
Granulicatella	1.73	2.76	4.96	4.45	8.80	3.22	4.97	2.59	3.97	4.93
Gemella	1.07	1.45	3.70	9.21	2.79	2.26	4.40	1.86	13.02	5.76
Neisseria	0.86	0.44	1.13	1.22	1.00	3.35	17.44	4.17	3.14	3.93
Prevotella	2.72	3.65	0.36	0.42	3.21	3.19	0.71	1.65	1.32	1.07
Campylobacter	2.78	0.42	0.76	0.12	1.64	4.15	1.14	1.40	1.08	2.16
Oribacterium	1.68	0.69	0.51	1.38	1.64	1.38	1.59	0.70	0.52	0.36
Eubacterium	1.48	0.72	0.12	0.96	2.24	1.88	1.11	1.19	0.44	0.31
Lachnoanaerobaculum	0.87	0.78	0.33	0.92	3.50	2.35	0.81	0.66	0.25	0.24
Peptostreptococcus	0.34	0.75	0.14	2.56	0.07	0.56	0.42	0.55	0.90	1.35
Selenomonas	1.60	0.30	0.62	0.33	3.36	2.56	0.74	0.40	0.37	0.33
Diğerleri	8.22	4.31	5.25	8.99	9.44	12.45	9.35	12.08	9.86	6.36



Şekil 10: Tedavi/kontrol sonrası alınan tükürük örneklerinin cins düzeyinde taksonomik içeriğinin bağıl bolluk değerler.

Karşılaştırma kolaylığı sağlamak amacıyla, her iki grubun tüm bireylerinin (BT,BC/AT,AC) tükürük mikrobiyomlarında en sık tespit edilen bakteri cinslerinin bolluk değerlerini gösteren grafik EK-5'te verilmiştir.

Tür Düzeyinde;

Tür düzeyinde yapılan incelemelerde; her iki grupta da en sık görülen türler olarak *Streptococcus spp., Veillonella spp., Granulicatella spp., Gemella spp., Haemophilus spp., Neisseria spp., Prevotella spp., Lachnoanaerobaculum spp., Streptococcus mitis, Eubacterium spp., Fusobacterium spp., Oribacterium spp., Campylobacter spp., Parvimonas spp., Porphyromonas spp., Peptostreptococcus spp., Selenomonas spp., Streptococcus pseudopneumoniae, Streptococcus infantis ATCC 700779* tespit edilmiştir (Tablo XIV).

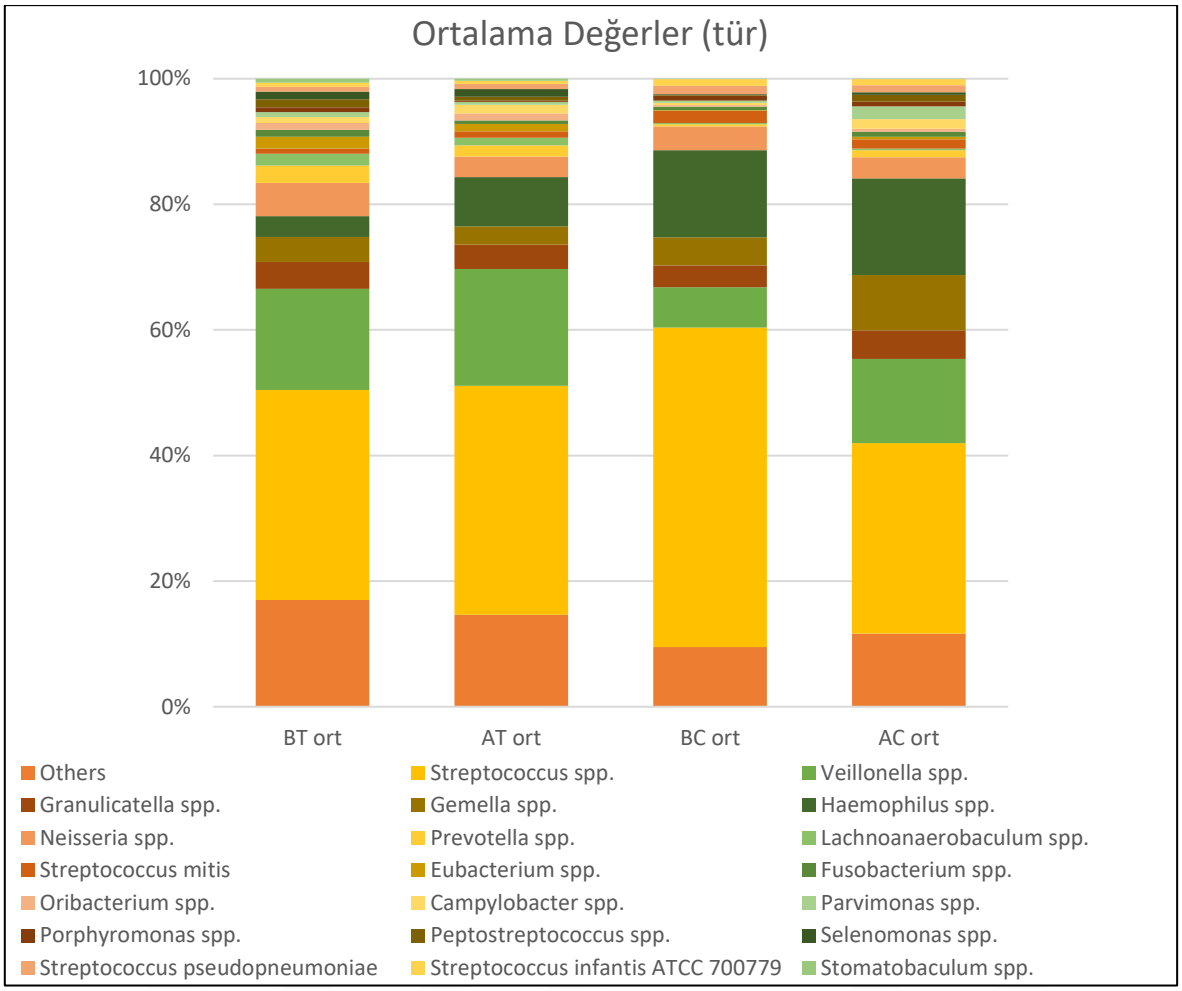
Tedavi öncesi alınan tükürük örneklerinin mikrobiyomunda; *Granulicatella spp., Gemella spp., Neisseria spp., Prevotella spp., Lachnoanaerobaculum spp., Eubacterium spp., Fusobacterium spp., Parvimonas spp., Porphyromonas spp., Peptostreptococcus spp., Selenomonas spp., Streptococcus infantis ATCC 700779* daha sık tespit edilmiştir.

Hastalar diş tedavilerini bitirdikten sonra alınan örneklerde ise; *Streptococcus spp., Veillonella spp., Haemophilus spp., Streptococcus mitis, Oribacterium spp., Campylobacter spp., Streptococcus pseudopneumoniae* türlerinin baskın hale geçtiği görülmektedir.

Tükürük mikrobiyomlarında sık tespit edilen bakteri türlerinin ortalama göreceli bolluğu Şekil 11'de verilmiştir.

Tablo XIV: Tükürük mikrobiyomunda sık tespit edilen bakteri türlerinin ortalama göreceli bolluk değerleri (%).

Mikroorganizma (Tür)	**BT Grubu Ort. (%)**	**AT Grubu Ort. (%)**	**p – değeri**
Streptococcus spp.	33.48	36.46	0.79
Veillonella spp.	16.11	18.58	0.64
Granulicatella spp.	4.24	3.92	0.95
Gemella spp.	3.98	2.87	0.10
Haemophilus spp.	3.30	7.83	0.87
Neisseria spp.	5.33	3.28	0.23
Prevotella spp.	2.74	1.79	0.32
Lachnoanaerobaculum spp.	1.84	1.20	0.38
Streptococcus mitis	0.85	1.01	0.95
Eubacterium spp.	1.86	1.20	0.50
Fusobacterium spp.	1.14	0.55	0.32
Oribacterium spp.	1.04	1.13	0.40
Campylobacter spp.	0.96	1.33	0.64
Parvimonas spp.	0.78	0.45	0.12
Porphyromonas spp.	0.74	0.25	0.38
Peptostreptococcus spp.	1.28	0.60	0.16
Selenomonas spp.	1.25	1.21	0.95
Streptococcus pseudopneumoniae	0.76	0.79	0.87
Streptococcus infantis ATCC 700779	0.62	0.50	0.13
Stomatobaculum spp.	0.64	0.32	0.13
Diğerleri	16.98	14.63	



Şekil 11: Tükürük mikrobiyomunda sık tespit edilen bakteri türlerinin ortalama göreceli bolluk değerlerini gösteren grafik (%). "Others", tespit edilen diğer türleri temsil etmektedir.

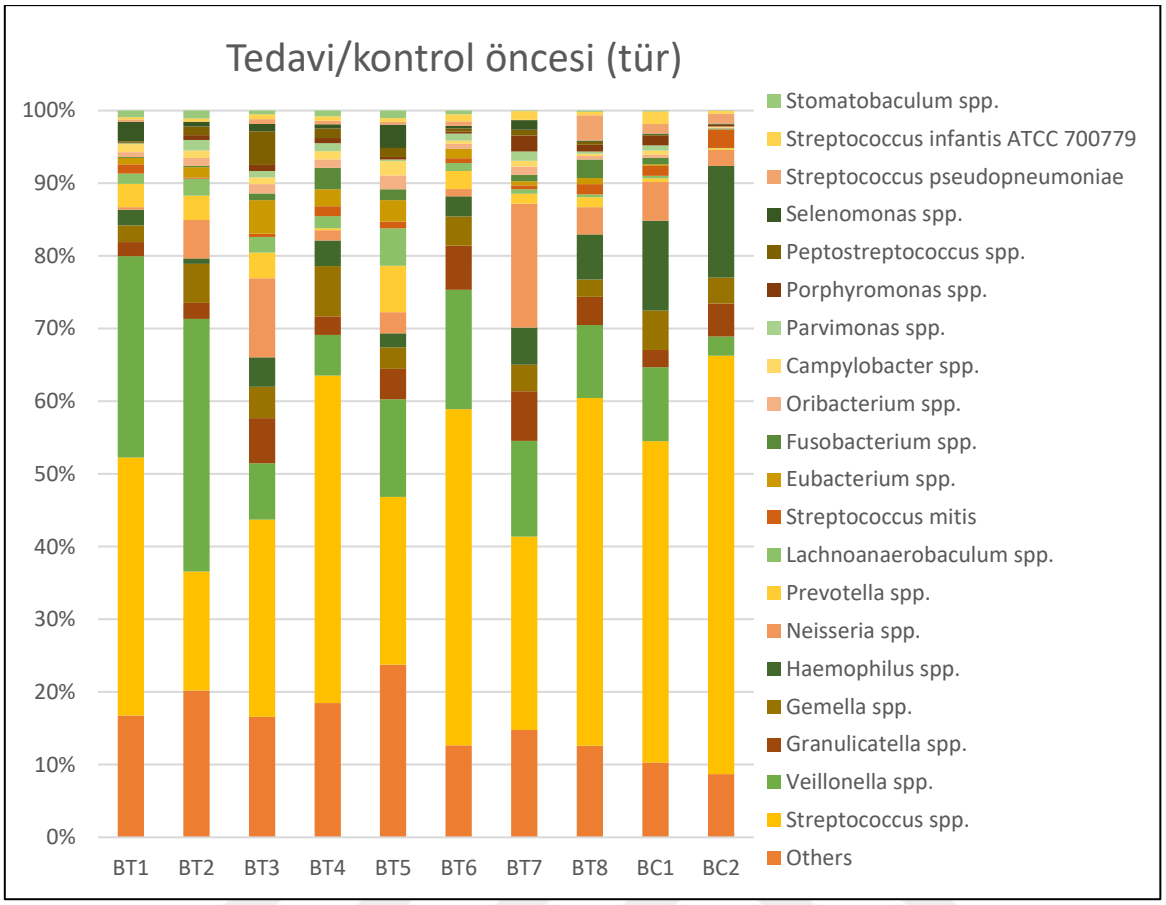
Tedavi/kontrol öncesi alınan tükürük örneklerinin tür bakımından bakteri bollukları incelendiğinde, özellikle bazı türlerin tedavi öncesi örneklerde kontrol örneklerine göre belirgin düzeyde daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 12). *Veillonella spp*. türünün %34.74 oranıyla en yüksek BT2 örneğinde ve diğer bireylerde de kontrol grubuna kıyasla yüksek değerlerde bulunduğu tespit edilmiştir. *Granulicatella spp*. türü BT3, BT6 ve BT7 örneğinde; *Gemella spp*. BT4 örneğinde; *Neisseria spp*. BT2, BT3 ve BT7 örneklerinde; *Prevotella spp*., *Lachnoanaerobaculum spp*., *Oribacterium spp*.,

Campylobacter spp. ve *Peptostreptococcus spp*. tüm BT grubu örneklerde; *Porphyromonas spp.* BT7 örneğinde; *Selenomonas spp.* BT1, BT3 ve BT7 örneklerinde; *Streptococcus pseudopneumoniae* BT8 örneğinde; *Stomatobaculum spp*. türleri ise B2 ve BT5 örneklerinde kontrol örneklerine güre daha yüksek oranlarda gözlenmiştir (Tablo XV).

Ayrıca *Streptococcus spp., Haemophilus spp.* türleri kontrol grubu örneklerine kıyasla çürüklü grupta daha düşük değerlerde tespit edilmiştir.

Tablo XV: Tedavi/kontrol öncesi grubun bireyleri için tükürük mikrobiyomunda en sık tespit edilen bakteri türlerinin bolluk değerleri (%).

Mikroorganizma (Tür)	**Hasta Grubu**								**Kontrol Grubu**	
	BT1	**BT2**	**BT3**	**BT4**	**BT5**	**BT6**	**BT7**	**BT8**	**BC1**	**BC2**
Streptococcus spp.	35.47	16.41	27.14	45.06	23.08	46.26	26.59	47.83	44.22	57.55
Veillonella spp.	27.73	34.74	7.74	5.62	13.42	16.42	13.16	10.03	10.15	2.64
Granulicatella spp.	1.93	2.21	6.22	2.56	4.18	6.10	6.83	3.88	2.37	4.56
Gemella spp.	2.31	5.37	4.34	6.91	2.94	3.98	3.63	2.36	5.42	3.56
Haemophilus spp.	2.12	0.73	4.05	3.50	1.97	2.76	5.1	6.21	12.39	15.36
Neisseria spp.	0.36	5.28	10.84	1.4	2.88	1.03	17.06	3.76	5.32	2.18
Prevotella spp.	3.21	3.37	3.53	0.28	6.37	2.49	1.34	1.36	0.49	0.20
Lachnoanaerobaculum spp.	1.41	2.33	2.14	1.68	5.16	1.07	0.61	0.37	0.33	0.04
Streptococcus mitis	1.30	0.18	0.45	1.35	0.91	0.64	0.55	1.41	1.38	2.53
Eubacterium spp.	0.87	1.40	4.65	2.33	2.95	1.28	0.57	0.83	0.21	0.03
Fusobacterium spp.	0.11	0.19	0.90	2.95	1.50	0.06	0.85	2.57	0.90	0.14
Oribacterium spp.	0.66	1.07	1.29	1.12	1.90	0.63	1.14	0.50	0.42	0.09
Campylobacter spp.	1.11	1.03	0.92	1.15	1.97	0.42	0.80	0.29	0.58	0.13
Parvimonas spp.	0.09	1.45	0.88	1.10	0.21	0.97	1.28	0.32	0.68	0
Porphyromonas spp.	0.06	0.65	0.80	0.70	0.34	0.26	2.17	0.90	1.31	0.26
Peptostreptococcus spp.	0.20	1.17	4.62	1.33	1.25	0.46	0.80	0.39	0.14	0.02
Selenomonas spp.	2.70	0.65	1.01	0.57	3.19	0.35	1.32	0.21	0.18	0.12
Streptococcus pseudopneumoniae	0.32	0.03	0.68	0.48	0.42	0.62	0.04	3.46	1.32	1.35
Streptococcus infantis ATCC 700779	0.31	0.44	0.64	0.58	0.44	0.96	1.16	0.47	1.69	0.41
Stomatobaculum spp.	0.89	1.07	0.53	0.79	1.06	0.51	0.09	0.16	0.13	0.02
Diğerleri	16.78	20.20	16.57	18.47	23.74	12.66	14.78	12.63	10.30	8.70

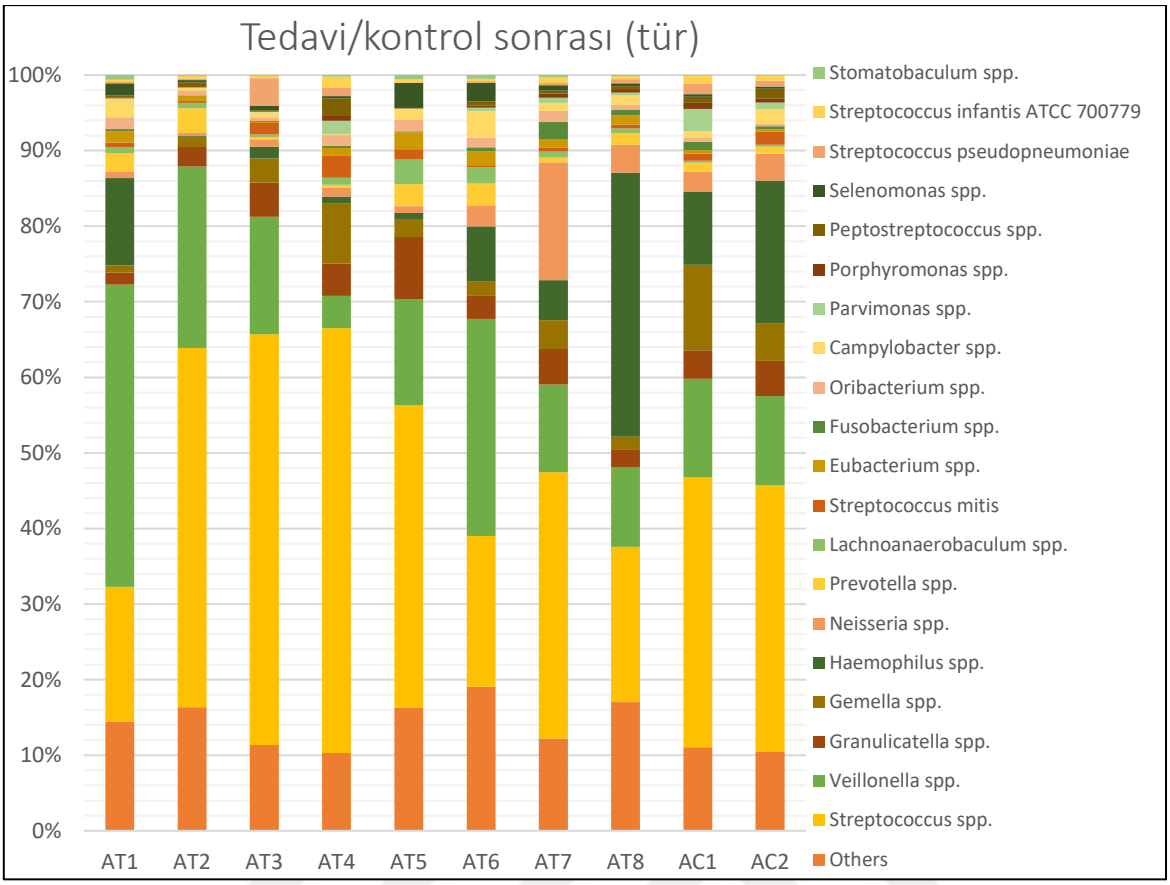


Şekil 12: Tedavi/kontrol öncesi grubun bireyleri için tükürük mikrobiyomunda en sık tespit edilen bakteri türlerinin bolluk değerlerini gösteren grafik.

Tedavi/kontrol sonrası grubun bireyleri için tükürük mikrobiyomunda en sık tespit edilen bakteri türlerinin bolluk değerleri Tablo XVI'da verilmiştir. Tabloya göre, bireyler tedavi olduktan sonra alınan örneklerle kontrol örneklerinin *Streptococcus spp.* bolluğunun yakın oranlarda olduğu görülmektedir. *Gemella spp., Streptococcus mitis* ve *Peptostreptococcus spp.* türleri AT4 örneği hariç tüm bireylerde kontrol grubunun değerlerinden gözle görülür derecede düşük değerlerde tespit edilmiştir. *Eubacterium spp*. türleri ise tüm AT grubu örneklerinde kontrol örneklerine kıyasla yüksek değerde görülmüştür.

Tablo XVI: Tedavi/kontrol sonrası grubun bireyleri için tükürük mikrobiyomunda en sık tespit edilen bakteri türlerinin bolluk değerleri (%).

Mikroorganizma (Tür)	**Hasta Grubu**								**Kontrol Grubu**	
	AT1	**AT2**	**AT3**	**AT4**	**AT5**	**AT6**	**AT7**	**AT8**	**AC1**	**AC2**
Streptococcus spp.	17.83	47.53	54.36	56.23	40.05	19.94	35.23	20.53	35.71	35.26
Veillonella spp.	39.96	23.99	15.54	4.28	14.03	28.74	11.59	10.50	13.05	11.75
Granulicatella spp.	1.63	2.59	4.51	4.28	8.22	3.02	4.68	2.41	3.78	4.66
Gemella spp.	0.94	1.24	3.17	7.88	2.35	1.94	3.82	1.65	11.31	5.02
Haemophilus spp.	11.56	0.22	1.58	0.96	0.82	7.24	5.29	34.95	9.69	18.81
Neisseria spp.	0.78	0.40	0.95	1.17	0.88	2.81	15.55	3.67	2.61	3.56
Prevotella spp.	2.46	3.28	0.31	0.37	2.89	2.87	0.65	1.49	1.18	0.96
Lachnoanaerobaculum spp.	0.80	0.7	0.31	0.92	3.27	2.16	0.78	0.63	0.24	0.22
Streptococcus mitis	0.63	0.23	1.54	2.97	1.36	0.25	0.57	0.54	0.94	1.73
Eubacterium spp.	1.471	0.72	0.12	0.96	2.21	1.87	1.10	1.19	0.44	0.31
Fusobacterium spp.	0.29	0.02	0.13	0.29	0.15	0.48	2.24	0.75	1.13	0.44
Oribacterium spp.	1.59	0.66	0.48	1.38	1.51	1.29	1.48	0.66	0.49	0.34
Campylobacter spp.	2.43	0.35	0.66	0.12	1.40	3.49	1.02	1.21	0.94	1.88
Parvimonas spp.	0.07	0.04	0.06	1.80	0.06	0.46	0.70	0.38	2.89	0.90
Porphyromonas spp.	0.06	0.01	0.07	0.62	0.05	0.28	0.53	0.34	0.81	0.55
Peptostreptococcus spp.	0.31	0.65	0.13	2.30	0.05	0.49	0.38	0.50	0.80	1.23
Selenomonas spp.	1.59	0.29	0.60	0.33	3.27	2.52	0.73	0.39	0.36	0.31
Streptococcus pseudopneumoniae	0.27	0.22	3.64	1.13	0.08	0.22	0.28	0.51	1.32	0.75
Streptococcus infantis ATCC 700779	0.19	0.30	0.33	1.42	0.38	0.30	0.71	0.37	1.12	0.67
Stomatobaculum spp.	0.63	0.13	0.07	0.21	0.59	0.48	0.32	0.18	0.06	0.08
Diğerleri	14.47	16.37	11.34	10.28	16.27	19.08	12.21	17.00	11.03	10.50



Şekil 13: Tedavi/kontrol sonrası grubun bireyleri için tükürük mikrobiyomunda en sık tespit edilen bakteri türlerinin bolluk değerlerini gösteren grafik.

Karşılaştırma kolaylığı sağlamak amacıyla, her iki grubun tüm bireylerinin (BT,BC/AT,AC) tükürük mikrobiyomlarında en sık tespit edilen bakteri türlerinin bolluk değerlerini gösteren grafik EK-6'da verilmiştir.

Shapiro-Wilks Normallik Test sonucuna göre normal dağılıma uymayan verilere, parametrik olmayan Wilcoxon Signed Rank Testi uygulanarak bakterilerin, göreceli miktarlarının sağlıklı ve hasta bireyler arasındaki farklılıkları değerlendirilmiştir. Elde edilen p değerlerine, anlamlı bakteri sayısının yüksekliği nedeniyle Bonferroni doğrulama yöntemi uygulanmıştır. Buna göre, istatistiksel olarak, Tablo XVII'de listelenmiş 28 cins ve tür düzeyinde bakterinin göreceli miktar seviyelerinde, bireylerin tedavi öncesi ve sonrasında bakteriyel dağılımlarında, anlamlı farklılık gösterdikleri ($p<0.05$) tespit edilmiştir. Bu bakteri tür ve cinsleri, *Leptolyngbya spp., Bacteroides spp., Schaalia odontolytica, Avibacterium spp., Brevibacillus spp., Moryella spp., Lachnobacterium spp., Tannerella spp., Prevotella nanceiensis, Alkalibacterium spp., Syntrophomonas spp., Capnocytophaga leadbetteri, Asaccharospora spp., Geobacter sulfurreducens subsp. ethanolicus, Succinispira spp., Natranaerovirga pectinivora, Desulfonispora spp., Eubacterium yurii subsp. margaretiae ATCC 43715, Mogibacterium diversum, Brachymonas spp., Fervidicella spp., Granulicatella adiacens, Weissella spp, Porphyromonas pasteri, Listeria spp., Gemella sanguinis, Porphyromonas spp.* ve *Pseudoclostridium spp.* olarak belirlenmişlerdir (Tablo XVII).

Tablo XVII: İstatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren bakterilerin göreceli bolluklarının medyan değerleri ve buna bağlı olarak değişim miktarları.

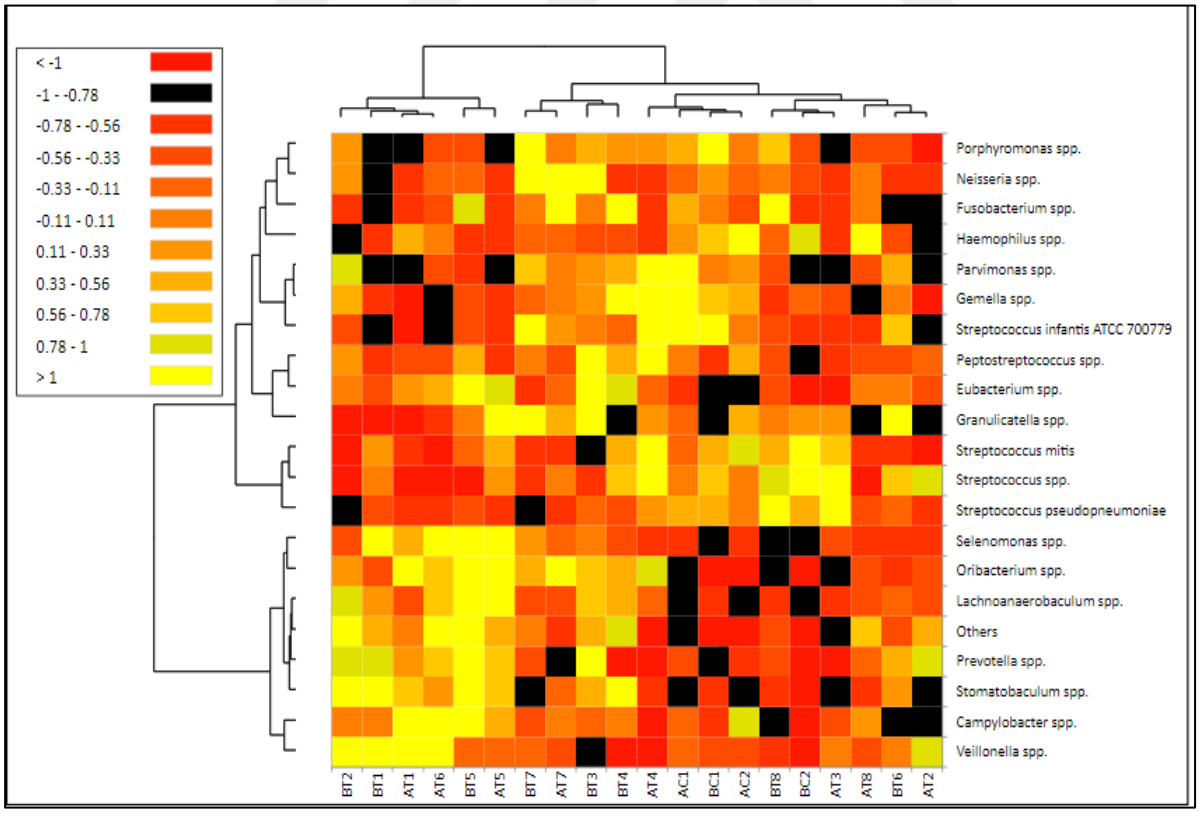
	Mikroorganizma	BT Medyan	AT Medyan	Değişim miktarı (kat)	Değişim	p değeri*
OTU495	*Leptolyngbya spp.*	2	0	*2 kat	azalma	0.004
OTU119	*Bacteroides spp.*	8	2	4 kat	azalma	0.008
OTU799	*Schaalia odontolytica*	15,5	1,5	10 kat	azalma	0.009
OTU115	*Avibacterium spp.*	0	1,5	*1.5 kat	artma	0.012
OTU140	*Brevibacillus spp.*	0	1	*1 kat	artma	0.012
OTU571	*Moryella spp.*	5,5	0,5	11 kat	azalma	0.014
OTU470	*Lachnobacterium spp.*	3	0	*3 kat	azalma	0.014
OTU905	*Tannerella spp.*	15	0	*15 kat	azalma	0.017
OTU706	*Prevotella nanceiensis*	14	2	7 kat	azalma	0.019
OTU43	*Alkalibacterium spp.*	5	2	2.5 kat	azalma	0.021
OTU900	*Syntrophomonas spp.*	7,5	1,5	0.2 kat	azalma	0.023
OTU170	*Capnocytophaga leadbetteri*	2	0	*2 kat	azalma	0.029
OTU107	*Asaccharospora spp.*	1	0	*1 kat	azalma	0.031
OTU388	*Geobacter sulfurreducens subsp. ethanolicus*	0	0,5	*0.5 kat	artma	0.031
OTU894	*Succinispira spp.*	1,5	0	*1.5 kat	azalma	0.032
OTU584	*Natranaerovirga pectinivora*	1	0	*1 kat	azalma	0.032
OTU273	*Desulfonispora spp.*	1	0	*1 kat	azalma	0.032
OTU326	*Eubacterium yurii subsp. margaretiae ATCC 43715*	5	1	5 kat	azalma	0.032
OTU562	*Mogibacterium diversum*	2	0	*2 kat	azalma	0.034
OTU137	*Brachymonas spp.*	0	2	*2 kat	artma	0.039
OTU337	*Fervidicella spp.*	12,5	2,5	5 kat	azalma	0.039
OTU401	*Granulicatella adiacens*	230,5	131	2 kat	azalma	0.040
OTU973	*Weissella spp.*	6,5	2,5	2.7 kat	azalma	0.043
OTU693	*Porphyromonas pasteri*	65,5	11,5	5.5 kat	azalma	0.045
OTU508	*Listeria spp.*	4,5	2	2.3 kat	azalma	0.049
OTU380	*Gemella sanguinis*	358	104,5	3 kat	azalma	0.049
OTU688	*Porphyromonas spp.*	683	182	3.5 kat	azalma	0.049
OTU730	*Pseudoclostridium spp.*	100,5	34,5	3 kat	azalma	0.049

* ***Wilcoxon Signed Rank testi*** **$p<0.05$**

4.4.2. Tür Düzeyinde Oluşturulan Sıcaklık Haritası

Örneklerdeki bakteri tür içerikleri ve bunların örnekler içerisindeki genel çokluklarının gösterimi için sıcaklık haritası kullanıldı. Bu harita, renk değişimlerine göre, göreceli tür bolluk değerleri açısından örnekler arasında karşılaştırmaya imkân sağlamaktadır (Şekil 14).

Hasta ve kontrol grupları arasında sık tespit edilen 21 bakteri türünün bağıl bolluğunu görselleştirmek için bir sıcaklık haritası oluşturuldu (Şekil 14). Bu sıcaklık haritası ile tedavi/kontrol öncesi ve sonrası tükürük örnekleri arasındaki farklılıklar ve benzerlikler bakteri cinsi ve türü düzeyinde ortaya konulmuştur.



Şekil 14: Tedavi/kontrol öncesi ve sonrası alınan tükürük örneklerindeki tür düzeyinde karşılaştırmalı kümeleme ve sıcaklık haritası.

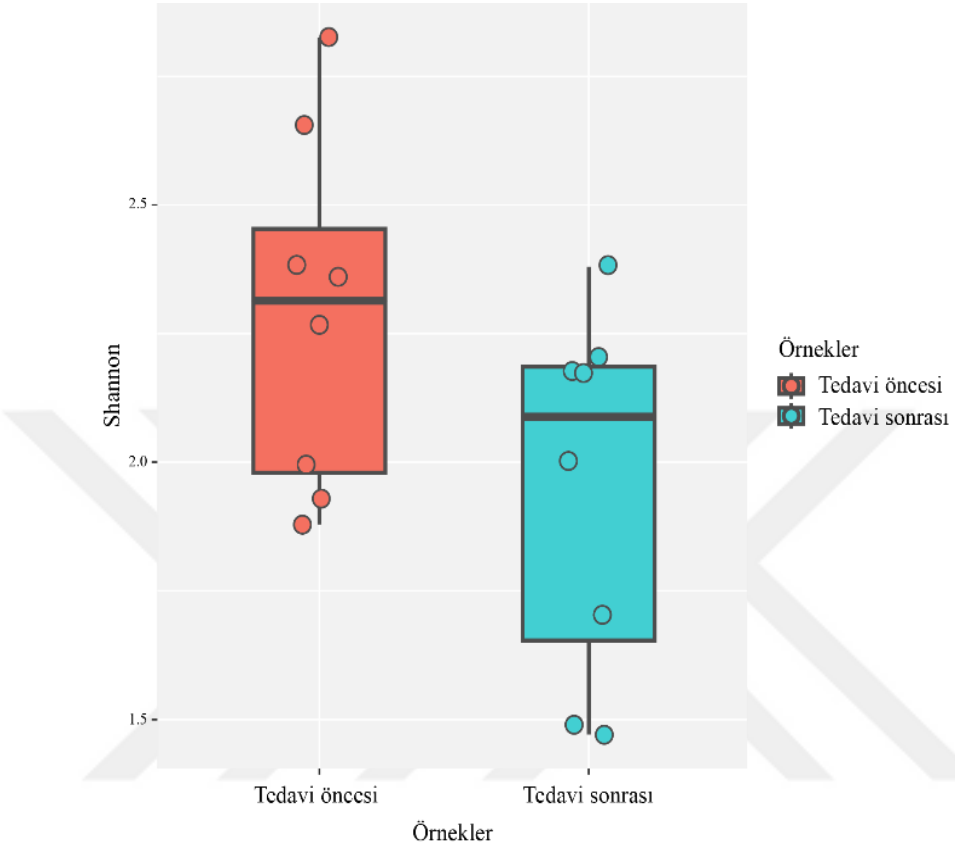
Şeklin sol tarafında bulunan değerler, sıcaklık haritası oluşturulurken kullanılan gruplama indekslerini göstermektedir. Sarı-turuncu renk tonları miktarları çok yüksek olup da birbirleri arasında yüksek ilişkiyi, yani pozitif korelasyonları temsil ederken; koyu renkler (turuncudan siyaha doğru) negatif korelasyonları temsil etmektedir. Renk yoğunluğu korelasyonların mutlak değeri ile orantılıdır.

4.4.3. Çeşitlilik Analizleri

Alfa Çeşitlilik (Alpha Diversity)

Her bir tükürük örneğinin (8 hastanın tedavi öncesi ve sonrası örnekleri) mikrobiyomundaki organizma çeşitliliğinin araştırılması için alfa çeşitlilik analizlerinden yararlanılmıştır. Her bireyin alfa çeşitliliği; Shannon indeksi ve Inverse Simpson indeksi ile ölçülmüştür. Bu metriklerin hesaplanması için önce R'da Rstudio üzerinden, phyloseq paketi içindeki seyreltme (rarefaction), uygun derinlik değeri ile gerçekleştirilmiştir.

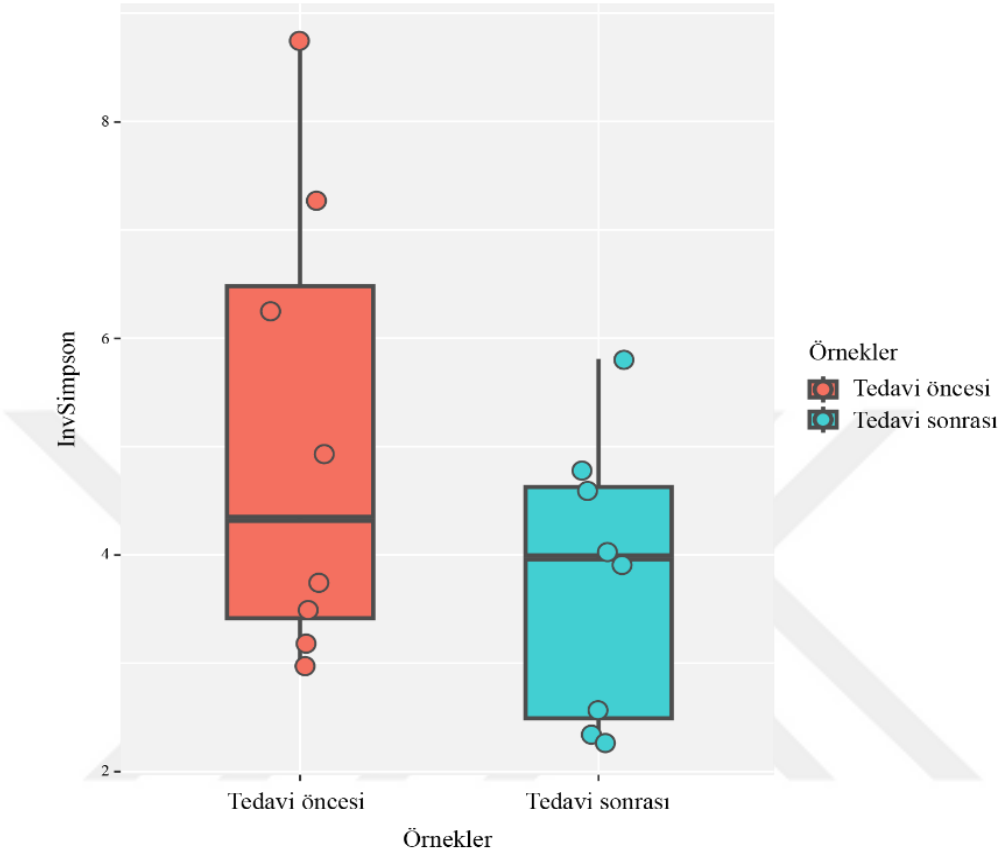
Kullanılan metriklerden ilki, Shannon çeşitlilik indeksidir. Bu indeks ile hem zenginlik hem de çeşitlilik aynı ağırlıkta incelenir.



Şekil 15: Hesaplanan Shannon indeksine göre alfa değerleri. (p=0.04)

Shannon indeksi ile topluluk veya habitat içerisindeki tür çeşitliliğinin incelenmesi yapılabilmektedir. Bu indeks, topluluktaki bir bakteri türünün birey sayısının toplam birey sayısına oranlanması ile hesaplanmaktadır (166). Şekil 15'te, Shannon indeksi ile tedavi öncesi ve sonrası bireylerde alfa çeşitliliği farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir ($p<0.05$). Shannon indeksine göre, ağız mikrobiyotası alfa çeşitliliğinin tedavi sonrasında bir miktar azaldığı gözlemlenmektedir.

Inverse Simpson indeksinde de zenginlik ve çeşitlilik ölçümleri yapılmıştır. Fakat bu indeksle Shannon'dan farklı olarak çeşitliğe daha çok ağırlık verilir (Şekil 16).

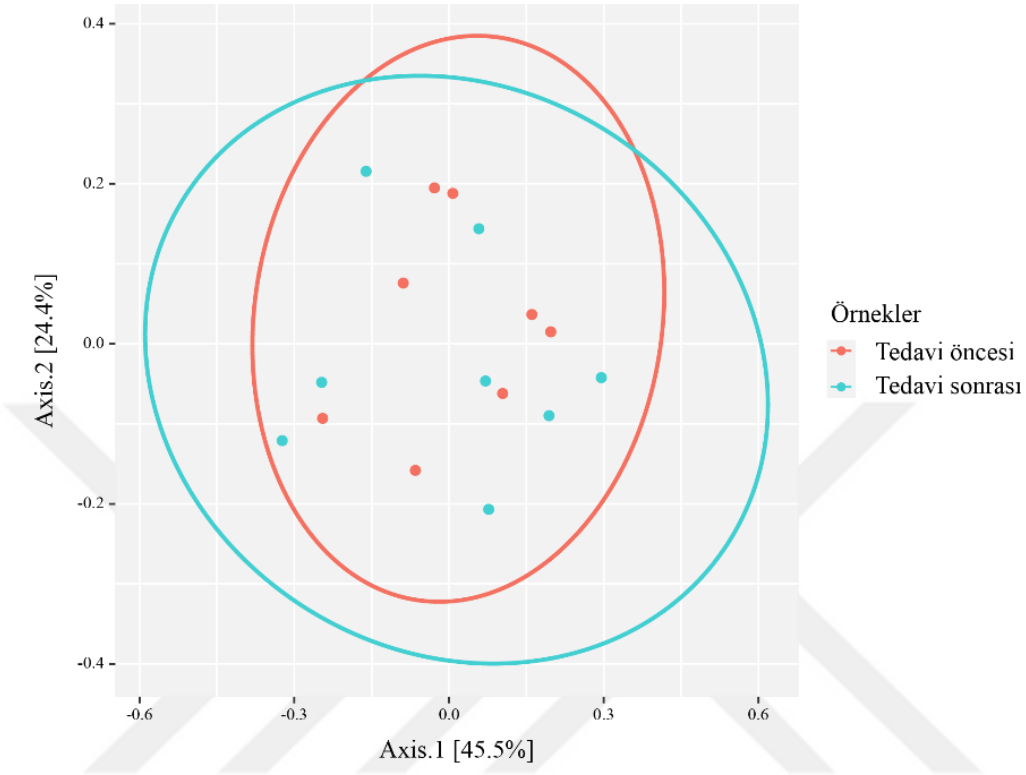


Şekil 16: Hesaplanan Inverse Simpson indeksine göre alfa değerleri. (p=0.14)

Simpson indeksine göre tedavi öncesi örneklerin, tedavi sonrası örneklere göre tükürük mikrobiyomunda tür çeşitliliği açısından anlamlı fark görülmemiştir (p>0.05). Bu indeks ile birim alanda bulunan her türe ait biyokütle miktarı kullanılarak hesaplama yapılabilmektedir (167).

Beta Çeşitlilik (Beta Diversity)

Cins düzeyinde



Şekil 17: Tedavi öncesi ve sonrası alınan tükürük örneklerinin cins düzeyinde hesaplanan ve Bray-Curtis farklılık indekslerine göre oluşturulan Temel Koordinat Analizi (PCoA) grafiği.

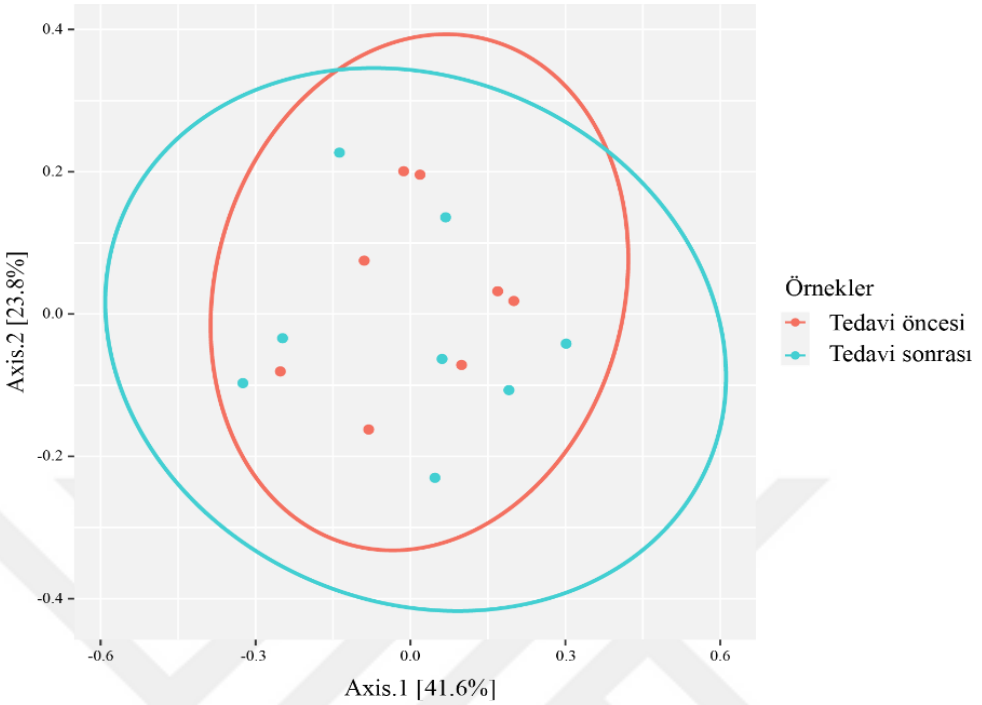
Diş tedavisi gören hastalardan, tedavilerine başlamadan önce ve tedavi bittikten sonra alınan tükürük örneklerinden dizileme sonucu elde edilen veriler ve tespit edilen bakteri cinslerinin bolluğunu gösteren tablolara dayanarak örnekler arasındaki beta çeşitlilik analizleri gerçekleştirilmiştir. Cins düzeyinde beta çeşitliliğin değerlendirildiği PCoA analiz grafiği Şekil 17'de verilmiştir. Grafik, Bray Curtis uzaklık metriği kullanılarak oluşturulmuştur. Grafikte kırmızı noktalar ile belirtilenler tedavi öncesini gösterirken, mavi noktalar tedavi sonrası bireyleri temsil etmektedir.

Şekilde, yakın kümelenen örneklerin içerdikleri cins kompozisyonu açısından birbirine benzer olduğu, uzak kümelenen örneklerin ise cins düzeyinde kompozisyon farklılığı barındırdığı görülmektedir. Birkaç örneğin dışında çoğu örnek birbirine yakın kümelenmiştir. Cins kompozisyonu açısından bakıldığında gruplar arasında düşük düzeyde bir farklılık olduğu görülmüştür. Cins düzeyinde belirlenen Bray Curtis uzaklık metrikleri ayrıca Tablo XVIII'de verilmiştir.

Tablo XVIII: Tedavi/kontrol öncesi ve sonrası alınan tükürük örneklerinin cins düzeyinde belirlenen Bray Curtis uzaklık metrikleri.

	BT1	BT2	BT3	BT4	BT5	BT6	BT7	BT8	BC1	BC2	AT1	AT2	AT3	AT4	AT5	AT6	AT7	AT8	AC1	AC2
BT1	0	0.27	0.38	0.35	0.33	0.21	0.39	0.33	0.35	0.46	0.29	0.17	0.29	0.41	0.21	0.22	0.32	0.49	0.30	0.32
BT2	0.27	0	0.38	0.48	0.35	0.40	0.41	0.50	0.48	0.66	0.22	0.38	0.50	0.54	0.42	0.21	0.44	0.49	0.43	0.45
BT3	0.38	0.38	0	0.32	0.28	0.32	0.20	0.33	0.34	0.48	0.50	0.45	0.41	0.39	0.33	0.38	0.21	0.43	0.32	0.32
BT4	0.35	0.48	0.32	0	0.39	0.20	0.40	0.19	0.21	0.30	0.56	0.30	0.26	0.18	0.28	0.48	0.28	0.49	0.26	0.30
BT5	0.33	0.35	0.28	0.39	0	0.33	0.31	0.39	0.43	0.55	0.43	0.41	0.41	0.48	0.26	0.30	0.34	0.43	0.36	0.36
BT6	0.21	0.40	0.32	0.20	0.33	0	0.32	0.17	0.21	0.29	0.44	0.16	0.14	0.24	0.16	0.36	0.26	0.47	0.24	0.26
BT7	0.39	0.41	0.20	0.40	0.31	0.32	0	0.32	0.32	0.48	0.47	0.44	0.38	0.45	0.34	0.37	0.14	0.41	0.28	0.29
BT8	0.33	0.50	0.33	0.19	0.39	0.17	0.32	0	0.15	0.23	0.51	0.22	0.18	0.23	0.26	0.41	0.22	0.40	0.22	0.24
BC1	0.35	0.48	0.34	0.21	0.43	0.21	0.32	0.15	0	0.21	0.47	0.29	0.24	0.28	0.30	0.44	0.23	0.36	0.18	0.16
BC2	0.46	0.66	0.48	0.30	0.55	0.29	0.48	0.23	0.21	0	0.59	0.34	0.20	0.20	0.39	0.56	0.38	0.47	0.33	0.26
AT1	0.29	0.22	0.50	0.56	0.43	0.44	0.47	0.51	0.47	0.59	0	0.41	0.52	0.63	0.45	0.18	0.48	0.42	0.44	0.42
AT2	0.17	0.38	0.45	0.30	0.41	0.16	0.44	0.22	0.29	0.34	0.41	0	0.17	0.28	0.24	0.35	0.37	0.53	0.34	0.36
AT3	0.29	0.50	0.41	0.26	0.41	0.14	0.38	0.18	0.24	0.20	0.52	0.17	0	0.17	0.23	0.46	0.31	0.52	0.29	0.30
AT4	0.41	0.54	0.39	0.18	0.48	0.24	0.45	0.23	0.28	0.20	0.63	0.28	0.17	0	0.33	0.56	0.36	0.58	0.31	0.35
AT5	0.21	0.42	0.33	0.28	0.26	0.16	0.34	0.26	0.30	0.39	0.45	0.24	0.23	0.33	0	0.36	0.28	0.49	0.29	0.30
AT6	0.22	0.21	0.38	0.48	0.30	0.36	0.37	0.41	0.44	0.56	0.18	0.35	0.46	0.56	0.36	0	0.39	0.38	0.37	0.38
AT7	0.32	0.44	0.21	0.28	0.34	0.26	0.14	0.22	0.23	0.38	0.48	0.37	0.31	0.36	0.28	0.39	0	0.40	0.21	0.21
AT8	0.49	0.49	0.43	0.49	0.43	0.47	0.41	0.40	0.36	0.47	0.42	0.53	0.52	0.58	0.49	0.38	0.40	0	0.37	0.27
AC1	0.30	0.43	0.32	0.26	0.36	0.24	0.28	0.22	0.18	0.33	0.44	0.34	0.29	0.31	0.29	0.37	0.21	0.37	0	0.14
AC2	0.32	0.45	0.32	0.30	0.36	0.26	0.29	0.24	0.16	0.26	0.42	0.36	0.30	0.35	0.30	0.38	0.21	0.27	0.14	0

Tür Düzeyinde



Şekil 18: Tedavi öncesi ve sonrası alınan tükürük örneklerinin tür düzeyinde hesaplanan ve Bray-Curtis farklılık indekslerine göre oluşturulan Temel Koordinat Analizi (PCoA) grafiği.

Tür düzeyinde beta çeşitliliğin değerlendirildiği PCoA analizi Şekil 18'te verilmiştir. Grafikte kırmızı nokta ile belirtilenler tedavi öncesini gösterirken, mavi noktalar tedavi sonrası bireyleri temsil etmektedir. Şekilde, yakın kümelenen örneklerin içerdikleri cins düzeyinde bakteri kompozisyonlarının birbirlerine benzer olduğu, uzak olanların ise farklı olduğu görülmektedir. Birkaç örneğin dışında çoğu örneğin yakın kümelendiği görülmektedir. Genel olarak içerdikleri bakteri türü kompozisyonu açısından gruplar arasında düşük düzeyde bir farklılık olduğu tespit edilmiştir. Tür düzeyinde belirlenen Bray Curtis uzaklık metrikleri ayrıca Tablo XIX'da verilmiştir.

Tablo XIX: Tedavi/kontrol öncesi ve sonrası alınan tükürük örneklerinin tür düzeyinde belirlenen Bray Curtis uzaklık metrikleri.

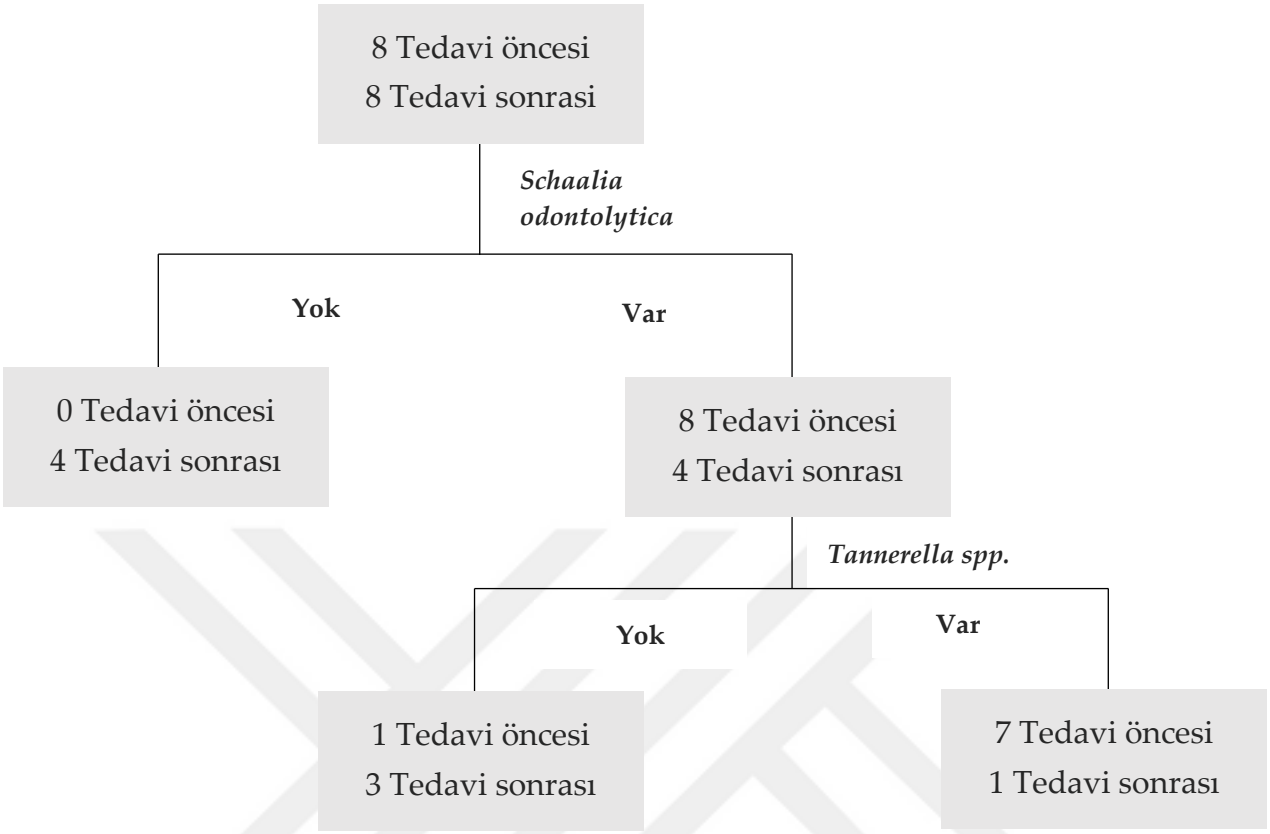
	BT1	BT2	BT3	BT4	BT5	BT6	BT7	BT8	BC1	BC2	AT1	AT2	AT3	AT4	AT5	AT6	AT7	AT8	AC1	AC2
BT1	0	0.28	0.40	0.38	0.34	0.24	0.41	0.35	0.38	0.49	0.29	0.21	0.31	0.44	0.23	0.23	0.33	0.50	0.33	0.35
BT2	0.28	0	0.40	0.49	0.37	0.41	0.43	0.53	0.50	0.68	0.25	0.38	0.51	0.56	0.43	0.23	0.45	0.51	0.45	0.47
BT3	0.40	0.40	0	0.33	0.30	0.33	0.22	0.35	0.35	0.50	0.51	0.48	0.43	0.41	0.35	0.39	0.23	0.44	0.34	0.33
BT4	0.38	0.49	0.33	0	0.41	0.25	0.41	0.23	0.25	0.34	0.57	0.36	0.30	0.22	0.31	0.49	0.29	0.50	0.29	0.32
BT5	0.34	0.37	0.30	0.41	0	0.35	0.34	0.41	0.45	0.57	0.43	0.44	0.43	0.49	0.27	0.31	0.36	0.44	0.38	0.38
BT6	0.24	0.41	0.33	0.25	0.35	0	0.33	0.20	0.24	0.32	0.44	0.20	0.16	0.27	0.19	0.36	0.27	0.48	0.26	0.27
BT7	0.41	0.43	0.22	0.41	0.34	0.33	0	0.34	0.33	0.50	0.48	0.47	0.41	0.46	0.36	0.39	0.16	0.42	0.29	0.31
BT8	0.35	0.53	0.35	0.23	0.41	0.20	0.34	0	0.17	0.26	0.52	0.29	0.19	0.27	0.29	0.43	0.24	0.41	0.24	0.25
BC1	0.38	0.50	0.35	0.25	0.45	0.24	0.33	0.17	0	0.24	0.48	0.34	0.27	0.29	0.33	0.45	0.24	0.37	0.18	0.18
BC2	0.49	0.68	0.50	0.34	0.57	0.32	0.50	0.26	0.24	0	0.59	0.42	0.24	0.23	0.43	0.57	0.40	0.48	0.34	0.27
AT1	0.29	0.25	0.51	0.57	0.43	0.44	0.48	0.52	0.48	0.59	0	0.41	0.52	0.64	0.46	0.19	0.49	0.43	0.45	0.43
AT2	0.21	0.38	0.48	0.36	0.44	0.20	0.47	0.29	0.34	0.42	0.41	0	0.24	0.36	0.27	0.37	0.39	0.55	0.38	0.40
AT3	0.31	0.51	0.43	0.30	0.43	0.16	0.41	0.19	0.27	0.24	0.52	0.24	0	0.22	0.26	0.46	0.33	0.52	0.31	0.32
AT4	0.44	0.56	0.41	0.22	0.49	0.27	0.46	0.27	0.29	0.23	0.64	0.36	0.22	0	0.36	0.58	0.38	0.59	0.32	0.36
AT5	0.23	0.43	0.35	0.31	0.27	0.19	0.36	0.29	0.33	0.43	0.46	0.27	0.26	0.36	0	0.36	0.30	0.50	0.32	0.32
AT6	0.23	0.23	0.39	0.49	0.31	0.36	0.39	0.43	0.45	0.57	0.19	0.37	0.46	0.58	0.36	0	0.40	0.40	0.39	0.39
AT7	0.33	0.45	0.23	0.29	0.36	0.27	0.16	0.24	0.24	0.40	0.49	0.39	0.33	0.38	0.30	0.40	0	0.41	0.23	0.22
AT8	0.50	0.51	0.44	0.50	0.44	0.48	0.42	0.41	0.37	0.48	0.43	0.55	0.52	0.59	0.50	0.40	0.41	0	0.38	0.28
AC1	0.33	0.45	0.34	0.29	0.38	0.26	0.29	0.24	0.18	0.34	0.45	0.38	0.31	0.32	0.32	0.39	0.23	0.38	0	0.16
AC2	0.35	0.47	0.33	0.32	0.38	0.27	0.31	0.25	0.18	0.27	0.43	0.40	0.32	0.36	0.32	0.39	0.22	0.28	0.16	0

4.4.4. Karar Ağacı Analizi

Araştırma uygulamalarında ve tıbbi çalışmalarda bir sonuca ulaşmak için ve olası sonuçları göstermek amacıyla ağaç benzeri bir model ya da grafik kullanılmaktadır, bu modele karar ağacı denilmektedir. Karar ağacı ile en az iki seçenekten en doğru olanı seçme sürecine uygulanabilecek mantığı, değerleri, mevcut bilgileri ve ortaya koyma aşamaları belirlenebilmektedir. Bu değerlendirmeleri gerçekleştirirken karşılaşılabilecek her seçenek için olasılık ve yarar değerleri atanarak grafik veya modeller oluşturulmaktadır. Böylelikle karşılaşılan her bir durum sayılarla ifade edilerek, seçenekleri karşılaştırmada kolaylık sağlanmaktadır (168).

Karar ağacı modelinde ilk dal, gruplar arasında en fazla ayırmayı yapabilecek olan özelliklerden biri olarak seçilir. Sonraki dallar ise bir önceki dal için seçilmiş olan özelliğin ayıramadığı bireyleri ayırabilen başka bir özellik seçilerek oluşturulur.

Bu çalışmada da istatistiksel olarak farklılık gösteren ve ağızda bulunma oranlarının değişimlerine göre, bakteriler üzerine bir karar ağacı modeli oluşturulmuştur. Kişilerin tedavi öncesi ve sonrası durumları dikkate alınarak ağızda hastalık durumunda bulunan *Schaalia odontolytica* ve *Tannerella spp.* bakterileri kullanılarak sınıflandırma oluşturulabilmiştir (Şekil 19). Oluşturulan bu karar ağacı modelinde, kısıtlayıcı faktör olarak seçilen ve bireyleri farklı sınıflara ayırmak için kullanılan özellikler, modelin kısıtlayıcılığından (over-train) kaçınmak için ek dal oluşturulmamıştır.



Şekil 19: Tedavi öncesi ve sonrası örneklerin karar ağacı modeli.

Çürük diş tedavisi görmüş 8 bireyin dahil edildiği bu çalışmada, bireylerin tedavi öncesi ve sonrası değerleri 16 örnek üzerinden, ağız ve diş sağlığı için önemli iki bakteri türü (*Tannerella spp.* ve *Schaalia odontolytica)* açısından bir karar ağacı modeli ile karşılaştırılmıştır (Şekil 19).

Bu bakterilerden *Schaalia odontolytica* türü, hasta bireylerin tümünün ağız mikrobiyotalarında tedavi öncesinde bulunuyorken, tedavi sonrasında hastaların yarısının ağız florasında artık saptanmadığı görülmüştür. Karar ağacı modelinin devamında yine ağız hijyeni için önemli olan *Tannerella spp*.nin varlığı üzerinden değerlendirme gerçekleştirilmiştir. Böylece hastaların tükürük mikrobiyomlarındaki

bu iki bakteri türünün, iki grubu (tedavi öncesi ve sonrası) ayırma kapasitesi ortaya konulmuştur (Tablo XX).

Tablo XX: Oluşturulmuş karar ağacı modelinde, hasta ve tedavi olmuş bireylerin sınıflandırması sonucunda ulaşılan toplam doğruluk, özgüllük ve hassaslık seviyeleri.

Toplam 8 Birey 8 Tedavi Öncesi 8 Tedavi Sonrası		**Gerçek Durum**		
		Tedavi Öncesi	**Tedavi Sonrası**	
Karar Ağacı Modeli	**Tedavi Öncesi**	**7**	**1**	
	Tedavi Sonrası	**1**	**7**	
		Hassaslık: 7/8 (%87.5)	**Özgüllük:** 7/8 (%87.5)	**Toplam Doğruluk:** 14/16 (%87.5)

Oluşturulmuş karar ağacı modelinde, hasta ve tedavi olmuş bireylerin sınıflandırılması sonucunda, özgüllük %87.5 ve hassaslık %87.5 olmak üzere toplam doğruluk %87.5 ile tahmin edilebilmektedir (Tablo XX).

5. Tartışma

Adli vakalarda, olay yerinde olay ile ilişkilendirilebilecek birçok biyolojik materyal bulunabilmekte, materyaller nitel ve nicel özelliklerine göre delil niteliği taşıyabilmektedir. Soruşturmanın en önemli bölümünü çoğu zaman olay yeri incelemesi ile elde edilen bulgular oluşturmaktadır. Deliller, adli olayları aydınlatmayı sağlayacak en önemli unsurlardır. Olay yerinden toplanan gözle görülebilir delillerin yanı sıra; materyaller üzerindeki görünmeyen mikroorganizmalar da delil olarak değerlendirilebilmektedir (169,170). Delil niteliği taşıyan bulguların toplanması ve değerlendirilmesi çoğunlukla multidisipliner çalışmalarla daha verimli sonuçlar doğurmaktadır. Adli bilimlerin çalışma alanlarından biri olan adli mikrobiyoloji ise bu bağlamda suçluları tanımlamak ve masumların suçsuzluğunu kanıtlamak amacıyla mikroorganizmaları belirlemek açısından önem kazanmıştır (1).

Son yıllarda YND teknolojilerinin gelişimi sonrası deliller üzerinden elde edilen mikrobiyota bilgisinin kullanımı, kimliklendirme çalışmalarında giderek yaygınlaşan ve yüksek ayrım gücü sunan bir yöntemdir. Şüpheliden alınan bir numunedeki oral mikrobiyal imzaların, olay yerindeki bir numunedeki ile eşleşip eşleşmediği veya suçla ilgisinin olup olmadığının tespiti, karşılaştırma yoluyla dahil etme veya dışlama yapabilmek açısından oldukça önemlidir. Adli bilimlerde kullanılan mevcut kimliklendirme yöntemleri büyük ölçüde insan DNA'sının analizine dayanmaktadır. Fakat insan DNA'sının kullanımıyla ilgili; miktar azlığı, kontaminasyon, DNA'nın yapısının bozulması, veya cinsel saldırı vakalarında failden alınan DNA'nın kurbanın

DNA'sı tarafından maskelenmesi gibi sınırlılıkların olabileceği ve bu durumun kimliklendirmeyi zorlaştıracağı da göz ardı edilmemelidir (14). Oysa ki, bakteri DNA'sı insan DNA'sından daha iyi korunur ve bozulmalara karşı daha dirençlidir. Bu nedenle, bakteri DNA'sının yüzeylerde daha sağlıklı ve uzun süre kalabilmesi delil olarak kullanılabilirliği için bir avantaj oluşturmaktadır. Delillerin mevcut geleneksel yöntemler ile analizinde sonuç alınamadığında bu örneklerin kapsamlı mikrobiyal içeriğini tanımlamak bilimsel olarak klinik ve adli amaçlarla ilgili sonuçlara ulaşmayı da beraberinde getirmektedir (14,65,71). Bu kapsamda fiziksel ve biyolojik delillerden mikrobiyota kullanımı ile kimliklendirme, adli davaların çözümü için giderek önem kazanmaktadır (171,172).

Tükürük, olay yerinde herhangi bir obje üzerinde bulunabileceği gibi, mağdur veya suçlu kişilerin vücutlarında da bulunabilmektedir. Bu gibi durumlarda eğer bilinçli uygulamalar yapılırsa bir vücut sekresyonu olan tükürük, çok değerli bir delil haline gelebilmektedir. Olay yerinden toplanan tükürük örneklerine genelde DNA uygulamaları ile yaklaşılmaktadır. Bireylerin genetik koduna yerleştirilmiş kişiye özel birçok tanımlama bölgesi (STR gibi) bulunmaktadır. Bu yapılar, insanları doğru bir şekilde tanımlamak ve aralarında ayrım yapmak için biyolojik örneklerdeki polimorfizmden yararlanmayı sağlamaktadır. Fakat DNA profillemedeki ilerlemelere rağmen hala çözülemeyen oldukça fazla sayıda ceza davası mevcuttur. Bu nedenle failleri suç mahalli ile ilişkilendirebilmek için elde edilebilecek delillerin artırılmasına her zaman ihtiyaç bulunmaktadır.

Moleküler yöntemler; mikrobiyoloji alanında yapılan çalışmalara, konakçı ve sahip olduğu bakteri popülasyonunun araştırılması için yeni ve heyecan verici boyutlar kazandırmıştır. YND yöntemleri kullanılarak oral mikrobiyomun incelenmesi adli mikrobiyolojiye dolayısıyla adli bilimlere yeni bir bakış açısı getirmiştir (173).

Tükürük örneklerinin taksonomik içeriği daha önce birçok çalışmada, 16S rRNA genlerinin sekanslanmasıyla karakterize edilmiştir. Fakat yapılan literatür araştırmasına göre, bilindiği kadarıyla bu çalışma, tükürük örneklerinin diş tedavisine bağlı değişiminin YND yöntemi ile doğrudan analizi ve bunların adli amaçlı kullanılabilirliğini yorumlayan ilk çalışmadır.

Bu çalışmada, tükürük bakteri kompozisyonunun incelenmesi için 16S rRNA geninin V1-V9 hiperdeğişken bölgelerini inceleyen ONT'den MinION YND cihazı kullanılmıştır. 16S rRNA gen analizindeki teknik gelişmeler, mikrobiyal toplulukların bileşimini kapsamlı bir şekilde incelemeyi ve sağlıklı bir ağıza ait tükürük mikrobiyal flora ile hastalıklı bir ağıza ait tükürük mikrobiyal flora arasındaki farklılıkları incelemeyi mümkün kılmıştır. Bu çalışmada, üretilen kısmi 16S rRNA dizilerinin 29.07.2021 tarihli NCBI 16S bakteriyel veri bankasıyla karşılaştırma yoluyla bakteri belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırma sonucunda toplam 18 bakteri şubesi, 695 bakteri cinsi ve 986 bakteri türünde eşleşmeler tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında tespit edilen toplam 28 cins ve tür her iki grup (BT ve AT) arasında anlamlı olarak farklı göreceli bolluklarda temsil edilmiştir ($p<0.05$). Bu sonuçlara göre

sağlıklı bir ağıza ait tükürük mikrobiyal florası ile hastalıklı bir ağıza ait tükürük mikrobiyal florası arasında önemli ve ayırt edilebilir filotiplerin ortaya çıktığı görülmektedir.

Diş çürükleri, dünya genelinde yaygın olarak görülen, asit üreten bakterilerin diş yüzeyini kolonize etmesi sonucu oluşan kronik bir hastalıktır (82). Diş minesinde çürükler başladığında ilk önce beyaz nokta lezyonları görülmeye başlar. Çürük, minede hasar oluşturduktan sonra, bakteriler mine tabakasında yarıklar oluşturarak dentin tabakaya ilerler ve burada demineralizasyona neden olurlar (111). Çürüğün sonraki aşamalarında ise, sarı veya açık kahverengi lezyonlar gözlenir ve dokunun yumuşak olması beklenir; durağan ilerleyen çürük ise, daha sert yapıdadır ve koyu kahverengi olarak görülmektedir (110). Oral ekosistem, çeşitli faktörlerle karakterize olmuş farklı yaşam alanları barındırmaktadır ve her alanda farklı mikrobiyal topluluklar büyür ve gelişir. Mikroorganizmaların dağılımı ise ağız boşluğundaki yaşam alanlarına göre değişiklik gösterebilmektedir (112). Ağız mikrobiyotasında meydana gelen değişikliklerin, çürüğün başlaması veya ilerlemesinde etkili olduğu bilinmektedir (174). Bu sebeple, ağızdaki mikrobiyal kompozisyonunun kapsamlı bir şekilde incelenmesi hem klinik bilgi sağlaması hem de adli alanda kişilerin kimliklendirilebilmesine yardımcı olarak kullanılabilmesi amacıyla oldukça önemli bir yere sahiptir. Kanto ve ark. adli diş hekimliğinin tükürük DNA tiplendirmesine katkısını tartışmak amacıyla deri üzerine bırakılmış tükürük örneklerini incelemiş ve o bölgede kişilere ait mikroorganizmalar tespit etmişlerdir. Bu mikroorganizmaların

tiplendirilmesinin adli bilimler açısından şüpheli bulunan kişilerin kimliklendirilmesinde araştırmacılara yardımcı olacağını savunmuşlardır (13). Özellikle olay yerinde bulunan bir tükürük örneğine ait mikrobiyota bilgisi, olayın herhangi bir şüphelisi bulunmaması durumunda da şüphelinin başta ağız ve diş sağlığı olmakla birlikte klinik durumu hakkında da bilgi sunabilir. Bu çalışmada da tükürük örneklerinden elde edilen kapsamlı mikrobiyota bilgisi ile kişinin ağzındaki diş çürüğü durumunun tespiti ve bu değerlendirmelerin adli amaçlı kullanım potansiyeli araştırılmıştır. Böylece mevcut oral mikrobiyom inceleme çalışmalarına hem klinik hem de adli kimliklendirme açısından yeni ve tamamlayıcı bilgiler sunulması hedeflenmiştir.

Çalışmamıza dahil edilen bireylerin çürük durumlarının değerlendirilmesinde, görsel-dokunsal kriter uygulanan ICDAS II indeksi kullanılmıştır (175). ICDAS II, uluslararası kabul görmüş bir çürük tespit sistemidir ve sistem, demineralizasyon sonucu oluşan diş çürüğünü gözle görünür başlangıç safhasından, kavitasyon gösteren ilerlemiş safhalarına kadar altı basamakta derecelendirmek üzere kullanılmaktadır (111,112,128,130,176). Örneklerin alındığı kişilerle ilgili veriler, Tablo V'te gösterilmiştir. Çalışmada hasta grubu örneklerinin %50'si (n=4) kadınlardan, %50'si (n=4) erkeklerden oluşmaktadır. Cinsiyet oranlarının ve kişilerin diş fırçalama sıklıklarının birbirine yakın olmasından dolayı bu faktörlerin çalışma sonuçlarına etkisinin çok sınırlı olduğunu düşünmekteyiz.

Vücudumuzda çok sayıda bakteri hücresi bulunduğu için, özellikle alt türler düzeyinde karşılaştırma yapıldığında bunların kişiye özgü olduğu düşünülmektedir (45). Üstelik bazı araştırmacılar, kişiye ait bakteri florasının nispeten uzun bir süre stabil olarak kalabildiğini göstermiştir (30,61). Costello ve ark., vücut habitatları tarafından belirlenen mikrobiyom kompozisyonlarının bireyde kendi içinde minimal geçici değişiklikler sergilerken, bireyler arasındaki değişkenliğin oldukça yüksek olduğunu göstermiştir (47). Leake ve ark., bireylerin tükürük bakteriyel bileşimindeki değişimi dört farklı zaman noktasında inceledikleri çalışmada, kişilerin tükürüklerinde bulunan bakteri mikrobiyotasını kullanarak iki kişiyi ayırt etmenin mümkün olabileceğini öne sürmüşlerdir (14). Ayrıca çalışmalarındaki örneklere beş ana şubenin, *Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes* ve *Fusobacteria,* hakim olduğunu belirtmişlerdir (14). Bu şubeler daha önce gerçekleştirilmiş 16S rRNA gen tabanlı bakteriyel topluluk belirleme çalışmalarında tutarlı olarak baskın oral mikrobiyotayı oluşturmuştur (91,177). Bizim çalışmamızda da *Firmicutes'*in örneklerimizde baskın şube olduğunu görmekteyiz (Tablo VIII). Biz bu çalışmada her ne kadar kişiler arasındaki oral mikrobiyal yapıdaki farklılıklara odaklanmamış olsak da bireyler arasındaki mikrobiyom komposizyonları açısından tespit edilen farklılığın, bireylerin tedavi öncesi ve sonrası ağız mikrobiyomunda gözlenen farklılığa göre oldukça büyük olduğu görüldü. Bu bulgu, kişilerin diş sağlığı durumunda meydana gelen değişimlere rağmen tükürük mikrobiyomunun hala kişiler arasındaki spesifik ayrım yapabilme potansiyelini koruduğunu göstermektedir.

Shannon indeksi topluluk veya habitat içindeki tür çeşitliliğinin incelenmesinde kullanılmaktadır (166). Bu çalışmada Shannon indeksi ile tedavi öncesi ve sonrası bireylerde alfa çeşitliliği farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Çalışma bulgularımıza göre, ağız mikrobiyotası alfa çeşitliliğinin tedavi sonrasında çoğu tür ve cinslerin bolluk seviyelerinde önemli düzeyde azalmalar olduğu belirlenmiştir. *Bacteroides spp.* ve *Tannerella spp.* dahil olmak üzere 24 cins ve türde görülen bu azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo XVII). Bu sonuç çürük tedavisi sonrası beklediğimiz bir durumdu. Olay yerinde bulunan tükürük delillerinden elde edilebilecek bu tür bilgilerin iyi yorumlanması halinde olayın fail ya da faillerinin ağız hijyeni hakkında adli makamlara önemli bilgiler sağlayacağı muhakkaktır.

Yang ve ark., 16S rRNA genini sekanslayarak sağlıklı ve aktif çürüğü bulunan yetişkinlerin oral mikrobiyomu üzerinde bir çalışma gerçekleştirmiştir (116). Araştırıcılar, çürük aktif tükürük mikrobiyotalarının cinsiyetten bağımsız olarak *Prevotella*'da istatistiksel olarak anlamlı bir zenginleşme (~%10) barındırdığını tespit ettiler (116). *Prevotella*, gram negatif çubuk şekilli anaeroblardır ve bazıları endodontik (178) ve periodontal (179) enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir. Başka bir çalışmaya göre de *Prevotella intermedius* türü diş eti iltihabı ile ilişkilendirilmiştir (180). Bununla birlikte, bu çalışmada tükürük numunesi alma stratejimizin tasarımı ve uygulanması, ortaya çıkan periodontal hastalıkları veya diğer sistematik hastalıkları olan bireyleri hariç tutarak aktif diş çürüğüne odaklanmıştır. Bu nedenle, *Prevotella*'nın bağıl bolluk

değişiminin altında yatan neden bireyin periodontal durumu değil, çürük durumu olmalıdır. Çalışma bulgularımıza göre de tedavi sonrasında *Prevotella* türlerinin önemli bir oranda azaldığı gözlenmiştir. Ancak bu fark "*Prevotella nanceiensis"* dışındaki alt türler için istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

Tükürük sıvısı, mikrobiyal içerik bakımından zengin olduğu için çürük, periodontitis, diyabet, pankreas kanseri gibi çeşitli ağız içi veya sistemik hastalık durumlarının teşhis edilmesinde önemli bir materyal olarak kullanılabilir (181). Aas ve ark., sadece diş çürüğü olan çocuk ve genç yetişkinler üzerinde yaptıkları çalışmada; bakteriyel profillerin hastalık ve sağlık durumlarında değişiklik gösterdiğini belirtmiş; diş çürüğü etiyolojisinde birincil patojen olarak *Streptococcus mutans*'ın rolünün olduğuna; *Lactobacillus* türlerinin ise genel olarak ileri çürük lezyonlarında ortaya çıktığına işaret etmişlerdir (26). Önemli çürük patojenlerinden olan *Lactobacillus*'u da barındıran *Firmicutes* şubesinin taksonomik topluluk içindeki bağıl bolluk oranı her ne kadar tedavi öncesi ve sonrasında birbirine eşitmiş gibi görünse de özellikle 1. 6. ve 8. hastalarda tedavi sonrası büyük oranda azaldığı saptanmıştır.

Streptococcus mutans genellikle diş çürüklerinin başlıca etiyolojik ajanı olarak gösterilse de, (25) Aas ve ark,nın çalışması, kalıcı dişlerinde yaygın çürük bulunan deneklerin %10'unun saptanabilir *S. mutans* seviyelerine sahip olmadığını göstermiştir (26). Mevcut çalışmamızın bulguları da bu sonucu destekler nitelikte olup, kalıcı

dişlerinde derin dentin çürüğü olan (ICDASII ≥ 4) hastaların tedavi sonrasında *S. mutans* seviyelerinde önemli bir azalma olmadığını göstermiştir.

Çalışmamızda, tükürük mikrobiyomlarında 16S rRNA sekansına dayanarak tespit edilen bir diğer organizma ise *Veillonella* türleridir. Literatürde oral *Veillonella*'nın tanımlanması ve dağılımı ile ilgili henüz sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (182). *Veillonella* suşlarının cins düzeyinde tanımlanmasının nispeten kolay olduğu bilinmektedir, ancak bunları ayırt etmek için yararlı fenotipik veya biyokimyasal incelemeler olmadığından tür düzeyinde tanımlanması zordur (182). Bu sorunu çözmek üzere farklı bir yöntem kullanan Mashima ve ark., tükürük bakteri profilindeki farklılıkların ağız hijyeni durumuna bağlı olabileceği sonucuna vardığı metagenomik analiz çalışmasnda; özellikle *V. parvula* türü olmak üzere *Veillonella* türlerinin zayıf ağız sağlığı durumunda potansiyel olarak önemli rol oynadığını göstermişlerdir. Aynı zamanda *Veillonella*'nın zayıf ağız sağlığı durumu için biyolojik bir gösterge olarak hizmet edebileceği sonucuna varmışlardır (183). Mevcut çalışmamızda, 2., 4., ve 7. hastalarda *Veillonella* türleri her ne kadar tedavi öncesi örneklerimizde yüksek seviyelerde gözlenmiş olsa da, diğer hastalarda tedavi sonrası sağlıklı ağız ortamı ile ilişkilendirilmiştir. Bu farklı bulgular, örnekleme yöntemindeki farklılıklar, tespit metodolojisindeki farklılıklar veya 16S rRNA metodolojileri kullanılarak tespit edilmeyen genomik farklılıklar nedeniyle meydana gelmiş olabileceği olarak açıklanabilir. Gelecekte *Veillonella*'yı tür düzeyinde

tanımlayabilecek teknikleri kullanan çalışmalara bu bilgileri doğrulamak amacıyla halen ihtiyaç duyulmaktadır.

Mevcut çalışmada çok sayıda tür sağlıklı ağız ve diş yapısıyla ilişkilendirilmiştir. *Avibacterium spp., Brevibacillus spp., Geobacter sulfurreducens subsp. ethanolicus,* ve *Brachymonas spp*. cins ve türleri, bireyler çürük tedavisi olmadan önce tükürük mikrobiyotasında önemli ölçüde görülmezken, kişilerin diş tedavisi tamamlandıktan sonra alınan tükürük örneklerinde anlamlı seviyede artış göstermiştir ($p<0.05$) (Tablo XVII). Sarkar ve ark., tükürük örneklerindeki bakteri cinslerini tanımlamak için, %90'lık bir benzerlik eşiği kullanarak yaptıkları araştırmada, *Brevibacillus* ve yine bizim çalışmamızda iki grup arasında anlamlı değişiklik gösteren *Weissella*'nın daha önce HOMD'a bildirilmeyen yeni bakteri cinsleri olduğunu belirtmişlerdir (184). Çalışmalar arasında coğrafya farklılıkları bulunmaktadır ve bu bakteri cinslerinin ağız sağlığındaki etkilerini tam olarak anlayabilmek için daha büyük örneklem grubu olan çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

İnsan ağzındaki farklı dokuları kolonize eden oral mikropların ekolojisini ve patojenitesini etkileyen önemli çevresel faktörlerden biri pH'dır. Oral patojenik bakteriler ağızdan alınan karbonhidratları degrede edilmesi yoluyla asit üretimini sağlamaktadır (185). Diş çürüğünün başlamasına ve ilerlemesine neden olan pH değişimleri, öncelikle asit üretimine bağlanmıştır, ancak sağlıkla ilişkili türler, pH'ı düşürmek için temel maddeler üreterek aktif bir rol oynamaktadır (115,185). Bu

durumla ilgili olarak *Streptococcus mitis'*in çürük ilerlemesine katkısı daha farklı olabilmektedir. *S. mitis* amonyak üretebilir ve pH seviyesini yükseltebilir, bununla birlikte düşük pH'da bile hızla asit üretebildiği bilinmektedir ve bu çürük oluşumunda önemli olabilir (115). Çalışmamızda, birkaç tedavi öncesi alınan tükürük numunesinde *S. mitis* seviyesi yüksek seviyelerde gözlense de genel olarak artan *S. mitis* seviyeleri sağlıkla ilişkilendirilmiştir. Nitekim, Gross ve ark. çalışmalarında; çürüklerin derecesi ilerledikçe ağızdaki bakteri topluluğu çeşitliliğinde bir azalmanın meydana geleceği ve koşulların değiştiği ortamda *S. mitis, S. pneumoniae, S. infantis* gibi bazı bakteriler için hayatta kalmanın zorlaşacağı sonucuna varmıştır (115).

Asit kullanan bazı bakteri türleri düşük pH'da hayatta kalabilir ve sonuçta karyojenik toplulukların hayatta kalmasına katkıda bulunabilir. Ancak sağlıkla ilişkili asit kullanan türler, yüksek düzeyde asit koşullarında hayatta kalamayabilir (115,186). Ölçülebilir düzeyde *Lactobacillus* veya *S. mutans* bulunmayan tedavi öncesi örneklerinde *Campylobacter spp.* ve baskın asit üreticisi olan *Selenomonas spp.* baskın türler olarak bulunmaktaydı. *Campylobacter* ve *Veillonella* gibi benzer türler enerji kaynağı olarak organik asitleri kullanır ve asit havuzu görevi görerek çürüğe katkıda bulunabilir. Fakat epidemiyolojik kanıtların yetersizliği nedeniyle *Campylobacter spp.* sağlıkla da ilişklendirilmiştir (26,115). Sağlıkla ilişkilendirilen *Campylobacter* türlerinin organik asit kullanmasıyla, sağlıklı bir oral biyofilmde pH homeostazının devamlılığını sağlaması ve sağlıklı oral mikrobiyotada yüksek oranda görülmesi beklenen bir durum olacaktır. Nitekim mevcut çalışmamızda da tedavi

sonrası sağlıklı ağız florasına ait örneklerin mikrobiyotalarında bu türün artışı görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada bazı potansiyel asit üretici bakteri cinsleri literatürle uyumlu olarak tedavi öncesi hastaların tükürük mikrobiyomunda yüksek seviyelerde gözlemlenmiştir. Bunlardan *Selenomonas* ve *Neisseria* tedavi sonrası sağlıklı örneklere kıyasla tedavi öncesi alınan örneklerde daha yüksek seviyelerde tespit edilmiştir.

Önemli klinik patojenlerden olduğu ve çoğu anaerobik enfeksiyonda bulunduğu bilinen *Bacteroides spp.*'nin (187) bizim çalışmamızda da kötü ağız sağlığıyla ilişkili olduğu saptanmış; tedavi sonrası sağlıklı ağız florasına göre, tedavi öncesi alınan örneklerde anlamlı düzeyde yüksek seviyede tespit edilmiştir.

Genellikle yerleşik ağız florasının bir parçasını oluşturduğu bilinen *Capnocytophaga* cinsi bakteriler, çeşitli periodontal enfeksiyonların fırsatçı patojenleri olarak da tanımlanırlar (188,189). Bu bakteri cinsinin farklı etkileri göz önüne alındığında, tür düzeyinde tanımlanmasının önemli olduğu düşünülmektedir. Mevcut çalışmamızda *Capnocytophaga leadbetteri* türünün hastalık durumunda anlamlı bolluğu gözlenmektedir. Bu mikroorganizmaların varlığının bazı adli olgu çözümlerinde o kişiyi kimliklendirmede fayda sağlayacağı muhakkaktır. Nitekim Şekil 19'da görüldüğü üzere özellikle iki bakteri türünün çürük tedavisi öncesi ve sonrası tükürükte bulunma durumlarının değişimlerine göre bir karar ağacı modeli oluşturulmuştur. 16S rDNA V1-V9 gen bölgesi üzerinden yaptığımız dizileme çalışmamızda saptadığımız, eski taksonomik ismi *Actinomyces odontolyticus* olarak da

bilinen *Schaalia odontolytica* türünün, 2015 yılında yapılmış olan bir çalışmada, kronik periodontitise sahip olan hasta bireylerin ağız boşluklarında yüksek oranda görüldüğü raporlanmıştır (190). Mevcut çalışmamızda da *Schaalia odontolytica* türünün, özellikle hasta bireylerin ağız mikrobiyotalarında tedavi öncesinde bulunuyorken, tedavi sonrası ağız floralarında anlamlı düzeyde azaldığı (10 kat), 4 bireyde ise hiç görülmediği saptanmıştır. Çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilen diğer bir bakteri cinsi olan *Tannerella spp*., tedavi öncesinde hastaların tükürük mikrobiyotalarında yüksek düzeyde bulunurken, tedavileri sonrasında bu bakteri türünde de önemli ölçüde azalma olduğu (15 kat) görülmüştür. *Tannerella spp*. daha önceki ağız enfeksiyonları ile ilgili çalışmalarda da iltihap oluşumu için risk faktörlerinin oluşumunu artırdığı belirtilmiştir (191,192). Bu çalışmada oluşturulan karar ağacı modeline göre sadece en fazla değişim gözlenen bu iki bakteri türünün değerlendirilmesi sonucunda dahi %87.5 spesifiklik ve hassasiyetinde sağlıklı ve hasta grup arasında ayrım sağlanabildiği görülmüştür. Şüphesiz bu karar ağacı modeline başka bakteri türlerinin de dahil edilmesi ile bu oranlar daha da artacaktır. Bu tür değerlendirmeler hem adli hem de klinik amaçlar açısından oldukça değerli sonuçlar sunacaktır.

6. Sonuç

Tükürük örneği başta cinsel saldırılar olmak üzere adli olguların çözümünde delil olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle şüphelisi olmayan olgularda saldırgana ait profil oluşturulmasında bu tür deliller önemli bilgiler sağlayabilmektedir. Bu çalışma sonucunda diş çürüğü tedavisi öncesi ve sonrası tükürük örneklerinin metagenomik analiz verilerine göre, 28 bakteride cins ve tür düzeyinde (çoğunda azalma yönünde) anlamlı değişim gözlenmiştir. Özellikle *Schaalia odontolytica, Moryella spp., Tannerella spp., Prevotella nanceiensis, Eubacterium yurii subsp. margaretiae ATCC 43715, Fervidicella spp.,* ve *Porphyromonas pasteri* bakterileri tedavi öncesi tükürük mikrobiyomlarında ağırlıklı olarak daha yüksek oranda bulunurken; tedavi sonrası alınan sağlıklı tükürük mikrobiyomlarında bu bakterilerin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Bu veriler, hangi bakteri türlerinin doğrudan aktif diş çürüğü ve ağız hijyeni, hangilerinin sağlıklı diş yapısı ile alakalı olduğu klinik ve adli kullanım açısından bize önemli bilgiler sunmaktadır.

Sonuç olarak kullandığımız uzaklık metriklerine göre değerlendirdiğimizde aktif çürük dişlere sahip bireylerin tükürüklerindeki mikrobiyal komposizyonların tedavi sonrasında tür çeşitliliğindeki azalmaya rağmen nispeten kararlı kaldığı görülmüştür. Fakat özellikle hem cins hem de tür düzeyinde her iki grup arasında bazı bakteriler açısından önemli değişim olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada sınırlı örnek sayımıza rağmen oluşturulan karar ağacı modeli yardımıyla en fazla değişim gözlenen iki bakteriye ait sonuçların değerlendirilmesi ile %87.5 doğruluk oranı ile

sağlıklı ve çürük dişe sahip bireyler arasında ayrım sağlanabildiği görülmüştür. Sonuçlarımız, insan mikrobiyom çeşitliliğinin daha ileri çalışmaları ve bir bireyin tükürük mikrobiyomunu etkileyen faktörlerin araştırılması için bir çerçeve sağlamaktadır. Burada sunulan bilgiler daha geniş kapsamlı çalışmalar ile desteklenmek koşuluyla hem adli vakaların çözümünde hem de klinik amaçlar için kullanılabilir.

7. Kaynaklar

1. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA ve ark. The NIH Human Microbiome Project. Genome Research 2009; 19, 2317–2323.

2. Külekçi G. Ağız SağlığınınYeni̇ Tanımı: Ağız Mi̇krobi̇yomu. ANKEM Dergisi 2013; 27(3):167-172.

3. Korkmaz M, Uysal C, Sivri S, Bozkurt İ, Bulut K, Şimşek Ş ve ark. Cinsel saldırı sonrası adli tıp bölümüne başvuran olguların beden ve ruh sağlıklarının değerlendirilmesi. Dicle Tıp Dergisi 2014; 41 (4): 656-661.

4. Tridico SR, Murray DC, Addison J, Kirkbride KP, Bunce M. Metagenomic Analyses of Bacteria on Human Hairs: A Qualitative Assessment for Applications in Forensic Science. Investigative Genetics 2014; 5:16.

5. Lax S, Hampton-Marcell JT, Gibbons SM, Colares GB, Smith D, Eisen JA ve ark. Forensic Analysis of The Microbiome of Phones And Shoes. Microbiome 2015; 3:21.

6. Struzycka I. The Oral Microbiome in Dental Caries. Polish Journal of Microbiology 2014; 63:2, 127-135.

7. Fierer N, Lauber CL, Zhou N, McDonald D, Costello EK, Knight R. Forensic Identification Using Skin Bacterial Communities. PNAS Microbiology 2010 Nisan; 107:14, 6477–6481.

8. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M ve ark. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. NIH Public Access 2005; 308(5728): 1635–1638.

9. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An Ecological and Evolutionary Perspective on Human-Microbe Mutualism and Disease. Nature 2007 Ekim; vol

449:18, 811-818

10. Grice EA, Kong HH, Renaud G, Young AC, Bouffard GG, Blakesley RW ve ark. A Diversity Profile of the Human Skin Microbiota. Genome Research 2008; 18:1043–1050.

11. Oakley BB, Fiedler TL, Marrazzo JM, Fredricks DN. Diversity of Human Vaginal Bacterial Communities and Associations with Clinically Defined Bacterial Vaginosis. Applied and Environmental Microbiology 2008 Ağustos; Vol. 74, No. 15. p; 4898–4909

12. Laputková G, Schwartzová V, Bánovčin J, Alexovič M, Sabo J. Salivary Protein Roles in Oral Health and As Predictors of Caries Risk. De Gruyter-Open Life Science 2018; 13: 174–200.

13. Anzai-Kanto E, Hirata MH, Hirata RDC, Nunes FD, Melani RFH, Oliveira RN. DNA Extraction From Human Saliva Deposited on Skin and its Use in Forensic Identification Procedures. Forensic Dentistry-Brazilian Oral Research 2005; 19(3):216-22.

14. Leake SL, Pagni M, Falquet L, Taroni F, Greub G. The Salivary Microbiome for Differentiating Individuals: Proof of Principle. Microbes and infection/Institut Pasteur 2016 Ocak; 18/6. p 399-405

15. Rostamkhil Z. Adli Bilimlerde Tükürük Mikrobiyotasının Kimliklendirme Açısından Önemi [MSc tezi]. İstanbul (TR): İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, 2021.

16. Francavilla R, Ercolini D, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, Filippis FD ve ark . Salivary Microbiota and Metabolome Associated with Celiac Disease. Applied and Environmental Microbiology 2014; 80(11): p. 3416–3425.

17. Belstrøm D, Fiehn NE, Nielsen CH, Holmstrup P, Kirkby N, Klepac-Ceraj V ve

ark. Altered Bacterial Profiles in Saliva from Adults with Caries Lesions: A Case-Cohort Study. Caries Research 2014; 48:368–375.

18. Richards VP, Alvarez AJ, Luce AR, Bedenbaugh M, Mitchell ML, Burne RA ve ark. Microbiomes of Site-Specific Dental Plaques from Children with Different Caries Status. American Society For Microbiology-Infection and Immunity 2017; 85:8.

19. Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of Vaginal Microbial Communities in Adult Healthy Women Using Cultivation-Independent Methods. Microbiology 2004; 150, 2565–2573.

20. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. Journal of Clinical Microbiology 2005 Kasım; 43(11): p. 5721–5732.

21. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Delanghe J, Simaey LV ve ark. Cloning of 16S rRNA Genes Amplified from Normal and Disturbed Vaginal Microflora Suggests a Strong Association Between Atopobium Vaginae, Gardnerella Vaginalis and Bacterial Vaginosis. BMC Microbiolgy 2004; 4:16.

22. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F ve ark. Molecular Analysis of the Bacterial Microbiota in the Human Stomach. PNAS-Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2006 Ocak; 103(3): p.732-737.

23. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1977; 74(11): pp. 5088-5090.

24. Dymock D, Weightman AJ, Scully C, Wade WG. Molecular Analysis of Microflora Associated with Dentoalveolar Abscesses. Journal of Clinical

Microbiology 1996. 34(3): p. 537–542

25. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA ve ark. The Biology of *Streptococcus Mutans*. Microbiology Spectrum 2019 Ocak; 7(1).

26. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE ve ark. Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults. Journal of Clinical Microbiology 2008; 46(4): p. 1407–1417

27. Adler CJ, Browne GV, Sukumar S, Hughes T. Evolution of the Oral Microbiome and Dental Caries. Cellular and Molecular Life Sciences 2017; 4(3):264-269.

28. Akpınar O. Orofasiyal Enfeksiyonlar Bölüm 2 - Orofasiyal Mikrobiyota. Research Gate 2020.

29. Belstrøm D. The Salivary Microbiota in Health and Disease. Journal of Oral Microbiology 2020; vol 12.

30. Lazarevic V, Whiteson K, Hernandez D, François P, Schrenzel J. Study of Inter- and Intra-Individual Variations in the Salivary Microbiota. BMC Genomics 2010; 11:523.

31. Leake SL. Is Human DNA Enough? -Potential for Bacterial DNA. StatisticalGeneticsandMethodology-Frontiers in Genetics 2013; 4.

32. Avila M, Ojcius DM, Yılmaz Ö. The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. DNA and Cell Biology 2009; 28(8): Pp. 405–411.

33. Cabral DJ, Wurster JI, Flokas ME, Alevizakos M, Zabat M, Korry BJ ve ark. The Salivary Microbiome is Consistent Between Subjects and Resistant to Impacts of Short-Term Hospitalization. Nature-Scientific Reports 2017; 7: 11040.

34. Enomoto A, Nambu T, Mashimo C, Taniguchi M, Nakatani K, Komuro A ve ark. A Preliminary Study of the Effect of Room Temperature Incubation on

Phylogenetic Composition of Salivary Microbiota. Journal of Oral Science & Rehabilitation 2018; 4(3).

35. Lane N. The Unseen World: Reflections on Leeuwenhoek (1677) 'Concerning Little Animals'. Philosophical Transactions-The Royal Society 2015; 370:20140344.

36. Leewenhoeck A. Microscopical Observations, About Animals in the Scurf of the Teeth, the Substance Call'd Worms in the Nose, the Cuticula Consisting of Scales. the Royal Society 1683; s. 568–574.

37. Chamany K, Allen D, Tanner K. Making Biology Learning Relevant to Students: Integrating People, History, and Context into College Biology Teaching. CBE Life Sciences Education 2008; 7: 267–278.

38. Grice EA, Segre JA. The Human Microbiome: Our Second Genome. NIH-Annual Review of Genomics and Human Genetics 2012; 13: 151–170.

39. Schmedes SE, Sajantila A, Budowle B. Expansion of Microbial Forensics. Journal of Clinical Microbiology 2016; 54(8):1964 –1974.

40. Tomaso H, Neubauer H. Forensic Microbiology. Forensic Medicine - From Old Problems to New Challenges 2011; doi:10.5772/19136.

41. Banaschak S, Werwein M, Brinkmann B, Hauber I. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection After Sexual Abuse: Value of Nucleic Acid Sequence Analysis in Identifying the Offender. Clinical Infection Diseases 2000; 31: 1098–1100.

42. Tuğ A. Adli Bilimler ve Mikrobiyoloji. Adli Tıp Dergisi 2009; 23(1): 47–55.

43. Schmedes SE, Budowle B. Microbial Forensics. Encyclopedia of Microbiology 2019; p.134-145.

44. Hampton-Marcell J T, Lopez JV, Gilbert JA. The Human Microbiome: An Emerging Tool In Forensics. Microbial Biotechnology 2017; 10: 228–230.

45. Zhu A, Sunagawa S, Mende DR, Bork P. Inter-Individual Differences In The Gene Content Of Human Gut Bacterial Species. Genome Biology 2015; 16:82

46. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome. Nature 2013; 486(7402): 207-214. doi:10.1038/nature11234.

47. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. Science-NIH Public Access 2009; 326(5960): 1694-1697.

48. Methé BA, Nelson KE, Pop M, Creasy HH, Giglio MG, Huttenhower C ve ark. A Framework For Human Microbiome Research. Nature PMC 2012; 486(7402).

49. Tims S, Wamel W, Endtz HP, Belkum A, Kayser M. Microbial DNA Fingerprinting of Human Fingerprints: Dynamic Colonization of Fingertip Microflora Challenges Human Host Inferences For Forensic Purposes. International Journal of Legal Medicine 2010; 124: 477-481.

50. Oh J, Byrd AL, Park M, NISC Comparative Sequencing Program, Kong HH, Segre JA. Temporal Stability of the Human Skin Microbiome. Cell-HHS Public Access 2016; 165(4):854–866.

51. Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK, Berg-Lyons D, Gonzalez A, Stombaugh J ve ark. Moving Pictures of the Human Microbiome. Genome Biology 2011; 12:R50.

52. David LA, Materna AC, Friedman J, Campos-Baptista M, Blackburn MC, Perrotta A ve ark. Host Lifestyle Affects Human Microbiota on Daily Timescales. Genome Biology 2014; 15:R89.

53. Kuntz TM, Gilbert JA. Introducing the Microbiome into Precision Medicine.

54. Gonzalez A, Hyde E, Sangwan N, Gilbert JA, Viirre E, Knight Rob ve ark. Migraines Are Correlated with Higher Levels of Nitrate-, Nitrite-, and Nitric Oxide-Reducing Oral Microbes in the American Gut Project Cohort. American Society For Microbiology 2016; 1(5).

55. Qian J, Hospodsky D, Yamamoto N, Nazaroff WW, Peccia J. Size-resolved emission rates of airborne bacteria and fungi in an occupied classroom. Indoor Air 2012; 22: 339–351

56. Meadow JF, Altrichter AE, Green JL. Mobile Phones Carry the Personal Microbiome of Their Owners. PeerJ 2014; doi 10.7717/peerj.447

57. Aaspõllu A, Lillsaar T, Tummeleht L, Simm J, Metsis M. Can Microbes on Skin Help Linking Persons and Crimes? Forensic Science International: Genetics Supplement Series 3 2011; e269–e270.

58. Nishi E, Tashiro Y, Sakai K. Discrimination Among Individuals Using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profiling of Bacteria Derived from Forensic Evidence. International Journal of Legal Medicine 2015; 129:425–433.

59. Butler JM, Decker AE, Kline MC, Vallone PM. Chromosomal Duplications Along the Y-Chromosome and Their Potential Impact on Y-STR Interpretation. Journal of Forensic Sciences 2005; 50(4): 853-859.

60. Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC ve ark. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. Science 2009; 324(5931): 1190-1192.

61. Fierer N, Hamady M, Lauber CL, Knight R. The Influence of Sex, Handedness, and Washing on the Diversity of Hand Surface Bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2008; 105(46):

17994–17999.

62. Sijen T, Harbison S. On the Identification of Body Fluids and Tissues: A Crucial Link in the Investigation and Solution of Crime. Genes 2021; 12, 1728.

63. Lederberg J, McCray AT. 'Ome Sweet' Omics-- A Genealogical Treasury of Words. The Scientist 2001; 15(7): 8.

64. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu WH ve ark. The Human Oral Microbiome. Journal of Bacteriology 2010; 192(19): p. 5002–5017.

65. Gürsoy NC, Otlu B. Mikrobiyota Çalışmalarında Moleküler Tanı Yöntemleri. Journal of Biotechnology and Strategic Health Research 2017; 1 (Special issue): 56-67.

66. Pamukçu U, Yıldız FN, Dal T, Peker İ. Oral Mikrobiyota Araştırmaları Işığında Ağız Sağlığına Yeni Bakış Açısı: Derleme. Journal of Biotechnology and Strategic Health Research 2018; 2(3):128-137.

67. Fleming RI, Harbison S. The Use of Bacteria for the Identification of Vaginal Secretions. Forensic Science International: Genetics 4 2010; 311–315

68. Turnbaugh P J, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE ve ark. A Core Gut Microbiome in Obese and Lean Twins. Nature 2009; 457(7228): 480–484.

69. Stahringer SS, Clemente JC, Corley RP, Hewitt J, Knights D, Walters WA ve ark. Nurture Trumps Nature in a Longitudinal Survey of Salivary Bacterial Communities in Twins from Early Adolescence to Early Adulthood. Genome Research 2012; 22: 2146–2152.

70. Goodrich J, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R ve ark. Human Genetics Shape the Gut Microbiome. Cell 2014; 159(4): 789–799.

71. Zoetendal EG, Vaughan EE, De Vos WM. A Microbial World Within Us. Molecular Microbiology 2006; 59(6): 1639–1650.

72. Findley K, Grice EA. The Skin Microbiome: A Focus on Pathogens and Their Association with Skin Disease. PLOS Pathogens 2014; 10(11).

73. Parahitiyawa NB, Scully C, Leung WK, Yam WC, Jin LJ, Samaranayake LP. Exploring the Oral Bacterial Flora: Current Status and Future Directions. Oral Diseases 2010; 16: 136–145.

74. Stewart EJ. Growing Unculturable Bacteria. Journal of Bacteriology 2012; 194(16): p. 4151–4160.

75. Zuckerkandl E, Pauling L. Molecules as Documents of Evolutionary History. Journal of Theoretical Biology 1965; 8: 357–366.

76. Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. Journal of Bacteriology 1998; 180(18): p. 4765–4774.

77. Morgan XC, Huttenhower C. Chapter 12: Human Microbiome Analysis. PLoS Computational Biology 2012; 8(12).

78. Akoğlu G. Mikrobiyom ve Deri Mikrobiyomuna Genel Bakış. Dermatoz 2017; 1: doi: 10.15624.dermatoz17081d2.

79. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid Determination of 16S Ribosomal RNA Sequences for Phylogenetic Analyses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1985; 82: p. 6955–6959.

80. Kong HH. Skin Microbiome: Genomics-Based Insights into the Diversity and Role of Skin Microbes. Trends in Molecular Medicine 2011; 17(6): 320–328.

81. Willis JR, Gabaldón T. The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. Microorganisms 2020; 8.

82. Çakir FY, Gürgan S, Attar N. Çürük Mikrobiyolojisi. Hacettepe Diş Hekimlği Fakültesi Dergisi 2010; 34(3-4): s. 78–91.

83. Bağış N. Farklı Diş Macunlarının Antibakteriyel Etkilerinin İn Vitro Olarak İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi 2014; 41(2): s. 77–88.

84. Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS. The Oral Microbiome in Health and Disease and the Potential Impact on Personalized Dental Medicine. Oral Diseses 2012; 18: 109–120.

85. Chen T, Yu WH, Izard J, Baranova OV, Lakshmanan A, Dewhirst FE. The Human Oral Microbiome Database: A Web Accessible Resource for Investigating Oral Microbe Taxonomic and Genomic Information. Database-The Journal of Biological Databases and Curation 2010.

86. Jenkinson HF. Beyond the Oral Microbiome. Environmental Microbiology 2011; 13(12): 3077–3087

87. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA ve ark. Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque. Journal of Bacteriology 2001; 183(12): p. 3770–3783.

88. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The Human Microbiome Project. Nature 2007; 449(18): 804–810.

89. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? Microbiology 2003; 149: 279–294.

90. Diaz PI, Dupuy AK, Abusleme L, Reese B, Obergfell C, Choquette L ve ark.

Using High Throughput Sequencing to Explore the Biodiversity in Oral Bacterial Communities. Molecular Oral Microbiology 2012; 27(3): 182–201.

91. Zaura E, Keijser BJF, Huse SM, Crielaard W. Defining the Healthy 'Core Mcrobiome' of Oral Microbial Communities. BMC Microbiology 2009; 9:259.

92. Bik EM, Long CD, Armitage GC, Loomer P, Emerson J, Mongodin EF ve ark. Bacterial Diversity in the Oral Cavity of Ten Healthy Individuals. International Society for Microbial Ecology Journal 2010; 4(8): 962–974.

93. Sonnenburg JL, Fischbach MA. Community Health Care: Therapeutic Opportunities in the Human Microbiome. Science Translational Medicine 2011 3(78): 78ps12.

94. Teles R, Teles F, Frias-Lopez J, Paster B, Haffajee A. Lessons Learned and Unlearned in Periodontal Microbiology. Periodontology 2000; 62: 95–162.

95. Paster BJ, Dewhirst FE. Molecular Microbial Diagnosis. Periodontol 2000. 2009; 51: 38–44

96. Belstrøm D, Holmstrup P, Fiehn N, Kirkby N, Kokaras A, Paster BJ ve ark. Salivary Microbiota in Individuals with Different Levels of Caries Experience. Journal Of Oral Microbiology, 2017; 9(1).

97. Lim Y, Totsika M, Morrison M, Punyadeera C. The Saliva Microbiome Profiles Are Minimally Affected by Collection Method or DNA Extraction Protocols. Scientific Reports 2017; 7: 8523.

98. Takeshita T, Kageyama S, Furuta M, Tsuboi H, Takeuchi K, Shibata Y ve ark. Bacterial Diversity in Saliva and Oral Health-Related Conditions: The Hisayama Study. Scientific Reports 2016; 6:22164.

99. Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. Global Diversity in the Human

Salivary Microbiome. Genome Research 2009; 19: 636–643.

100. Young SE, Stallings MC, Corley RP, Krauter KS, Hewitt JK. Genetic and Environmental Influences on Behavioral Disinhibition. American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics) 2000; 96: 684–695.

101. Martí-Álamo S, Mancheño-Franch A, Marzal-Gamarra C, Carlos-Fabuel L. Saliva as a Diagnostic Fluid. Literature Review. Journal of Clinical and Experimental Dentistry 2012; 4(4): e237-43.

102. Sözen Ş, Aksoy E. Cinsel Saldırılarda Hekim Sorumluluğu, Tıbbi ve Hukuki Yaklaşım. Klinik Gelişim, www.adlitabib.saglik.gov.tr

103. Kılıççıoğlu DB, Beyaztaş FY, Aydın H, Aker A. Sürüntü Yöntemiyle Deri Üzerindeki Tükürük Kalıntılarında Amilaz Enzim Aktivitesinin Tespiti. Adli Tıp Dergisi 2005; 19(3): 23-28.

104. Karadayı S, Arasoglu T, Akmayan İ, Karadayı B. Assessment of the Exclusion Potential of Suspects by Using Microbial Signature in Sexual Assault Cases: A Scenario-Based Experimental Study. Forensic Science International 2021; 325.

105. Hansen TO, Simonsen MK, Nielsen FC, Hundrup YA. Collection of Blood, Saliva, and Buccal Cell Samples in a Pilot Study on the Danish Nurse Cohort: Comparison of the Response Rate and Quality of Genomic DNA. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 2007;16(10).

106. Love RM, McMillan MD, Park Y, Jenkinson HF. Coinvasion of Dentinal Tubules by *Porphyromonas Gingivalis* and *Streptococcus gordonii* Depends Upon Binding Specificity of Streptococcal Antigen I/II Adhesin. Infection and Immunity 2000; 68(3): p. 1359-1365

107. Chhour KL, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Molecular Analysis of Microbial Diversity in Advanced Caries. Journal of

Clinical Microbiology 2005; 43(2): p. 843-849

108. Slots J, Slots H. Bacterial and Viral Pathogens in Saliva: Disease Relationship and Infectious Risk. Periodontology 2000; 55: p. 48–69.

109. Petersen PE, Bourgeis D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The Global Burden of Oral Diseases and Risks to Oral Health. Bulletin of the World Health Organization 2005; 83(9), p. 661–669.

110. Özdemir CE. Süt Azı Dişlerinin Kontak Noktası Çürüklerinin Tanısında Kavo Diagnodent Pen'in Etkinliği, Sono-Abrazyon ve Geleneksel Yöntemlerle Mikroinvaziv Kavite Hazırlıkları ve Restorasyonların Klinik Değerlendirmesi [PhD tezi]. ERZURUM (TR): Pedodonti Anabilim Dalı, Atatürk Üniversitesi, 2014.

111. Er F. Farklı Çürük Teşhis Yöntemlerinin Aproksimal Çürüklerde in Vitro Olarak Değerlendirilmesi [PhD Tezi]. LEFKOŞA (CY): Yakın Doğu Üniversitesi, 2013.

112. Şenol N. Gizli Çürük Tanı Yöntemleri ve İncelenmesi [Bitirme Tezi]. İstanbul (TR): İstanbul Üniversitesi, 2020.

113. Meyer-Lueckel H, Paris S, Ekstrand KR. Caries Management-Science and Clinical Practice, Part 1. Thieme Medical Publishers 2013; ISBN 978-3-13-154711-8.

114. Jiang S, Huang X, Zhang C, Cai Z, Zou T. Morphological and Proteomic Analyses of the Biofilms Generated by Streptococcus Mutans Isolated from Caries-Active and Caries-Free Adults. Journal of Dental Sciences 2015; 10: 206-215.

115. Gross EL, Leys EJ, Gasparovich SR, Firestone ND, Schwartzbaum JA, Janies DA ve ark. Bacterial 16S Sequence Analysis of Severe Caries in Young Permanent Teeth. Journal of Clinical Microbiology 2010; 48(11): p. 4121–4128.

116. Yang F, Zeng X, Ning K, Liu KL, Lo CC, Wang W ve ark. Saliva Microbiomes Distinguish Caries-Active from Healthy Human Populations. International Society for Microbial Ecology 2012; 6: 1–10.

117. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL ve ark. Molecular Analysis of Bacterial Species Associated with Childhood Caries. Journal of Clinical Microbiology 2002;. 40(3): p. 1001-1009.

118. Doğan BG. Temel Ağız-Diş Sağlığı Göstergeleri. Toplum Hekimliği Bülteni 2007; 26(2): p. 40-46

119. Kwan SYL, Petersen PE, Pine CM, Borutta A. Health-Promoting Schools: an opportunity for Oral Health Promotion. Bulletin of the World Health Organization 2005; 83:677-685.

120. Karabekiroğlu S, Ünlü N. Yüksek Çürük Riskli Genç Yetişkinlerde Diş Çürüğüne Ait Temel Parametrelerin Değerlendirilmesi. Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi 2014; 35(2): p. 26–31.

121. Korkut B, Tağtekin DA, Yanıkoğlu FÇ. Diş Çürüklerinin Erken Teşhisi ve Teşhiste Yeni Yöntemler: QLF, Diagnodent, Elektriksel İletkenlik ve Ultrasonik Sistem. Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi 2011; 32: 55–67.

122. Pitts NB. Diagnostic Tools and Measurements - Impact on Appropriate Care. Community Dentistry And Oral Epidemiology 1997; 25: 24–35.

123. Efes BG. Konservatif Diş Tedavisinde Diagnostik Yöntemler. İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi 2012.

124. Zangooei BM, Fasihinia H, Khalesi M, Gholami L. Dental Caries Diagnostic Methods. DJH 2010; 2(1).

125. Cantekin K. En Az Müdahale İle Uygulanan Dental Tedavilerin Etkinliğinin

Değerlendirilmesi [PhD Tezi]. Erzrum (T.C.): Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Pedodonti Anabilim Dalı 2011.

126. McComb D, Tam LE. Diagnosis of Occlusal Caries: Part I. Journal de l'Association dentaire canadienne 2001; 67(8): 454–457.

127. Diniz MB, Rodrigues JA, Hug I, Cordeiro RCL, Lussi A. Reproducibility and Accuracy of the ICDAS-II for Occlusal Caries Detection. Community Dentistry and Oral Epidemiology 2009; 37: 399–404.

128. Jablonski-Momeni A, Stachniss V, Ricketts DN, Heinzel-Gutenbrunner M, Pieper K. Reproducibility and Accuracy of the ICDAS-II for Detection of Occlusal Caries in Vitro. Caries Research 2008; 42: 79-87.

129. Sebastian ST, Johnson T. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an Integrated Approach. International Journal of Oral Health and Medical Research 2015; 2(3): 81-84.

130. Ekstrand KR, Martignon S, Ricketts DJN, Qvist V. Detection and Activity Assessment of Primary Coronal Caries Lesions: A Methodologic Study. Operative Dentistry 2007; 32(3): 225-235.

131. Banting D, Deery C, Eggertsson H, Ekstrand KR, Zandona F, Longbottom C ve ark. Rationale and Evidence for the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS II) 2012 Haziran.

132. Travers A, Muskhelishvili G. DNA Structure and Function. Federation of European Biochemical Societies Journal 2015; 282: 2279–2295 (2015).

133. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1977; 74(12): pp. 5463-5467

134. Mohamad O, Ho WS. The Next Generation Sequencing Technologies. Bulletin of the Genetics Society of Malaysia, Conference Paper 2011; 18(1/2): p. 33-35.

135. Yang Y, Xie B, Yan J. Application of Next-Generation Sequencing Technology in Forensic Science. Genomics Proteomics Bioinformatics 2014; 12: 190–197.

136. www.illumina.com. (10.11.2021)

137. Heather JM, Chain B. The Sequence of Sequencers: The History of Sequencing DNA. Genomics 2016; 107: 1–8.

138. Buermans HPJ, Dunnen JT. Next Generation Sequencing Technology: Advances and Applications. Biochimica et Biophysica Acta 2014; 1842: 1932–1941.

139. McPherson JD. Next-Generation Gap. Nature Methods Supplement 2009; 6(11).

140. https://nanoporetech.com/about-us/history. (20.12.2021)

141. Feng Y, Zhang Y, Ying C, Wang D, Du C. Nanopore-Based Fourth-Generation DNA Sequencing Technology. Genomics Proteomics Bioinformatics 2015; 13: 4–16.

142. Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. Genomics Proteomics Bioinformatics 2016; 14: p. 265–279.

143. Fyta M. Threading DNA Through Nanopores for Biosensing Applications. Journal of Physics: Condensed Matter 2015; 27.

144. Hayden EC. Data from Pocket-Sized Genome Sequencer Unveiled. Nature News 2014; doi: 10.1038/nature.2014.14724.

145. Loman NJ, Quinlan AR. Poretools: A Toolkit for Analyzing Nanopore Sequence Data. Oxford University Press 2014; 30(23): p. 3399–3401.

146. Doğan M, Eröz R, Yüce H, Özmerdivenli R. Yeni Nesil Dizileme (YND)

Hakkında Bilinenler (Literatür Taraması). Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2017; 19(1): 27-30.

147. Üstek D, Abacı N, Sırma S, Çakiris A. Yeni Nesil DNA Dizileme. Deneysel Tip Araştirma Enstitüsü Dergisi 2011; 1(1): 11–18.

148. Cox MJ, Cookson WOCM, Moffatt MF. Sequencing the Human Microbiome in Health and Disease. Human Molecular Genetics 2013; 22(1): 88–94.

149. Anderson S. Shotgun DNA Sequencing using Cloned DNase I-Generated Fragments. Nucleic Acids Research 1981; 9(13): 3015–3027.

150. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. Journal of Bacteriology 1991; 173(2): 697–703.

151. Yang B, Wang Y, Qian PY. Sensitivity and Correlation of Hypervariable Regions in 16S rRNA Genes in Phylogenetic Analysis. BMC Bioinformatics 2016; 17:135.

152. Fukuda K, Ogawa M, Taniguchi H, Saito M. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. Journal of UOEH 2016; 38(3): 223–232.

153. Kong HH, Oh J, Deming C, Conlan S, Grice EA, Beatson MA ve ark. Temporal Shifts in the Skin Microbiome Associated with Disease Flares and Treatment in Children with Atopic Dermatitis. Genome Research 2012; 22: 850–859.

154. Jo JH, Kennedy EA, Kong HH. Topographical and Physiological Differences of the Skin Mycobiome in Health and Disease. Virulence 2017; 8(3): 324-333.

155. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A Detailed Analysis of 16S Ribosomal RNA Gene Segments for the Diagnosis of Pathogenic Bacteria. Journal of Microbiological Methods 2007; 69(2): 330–339.

156. Turan MK, Günay ÖC, Kayış SA, Çörtük M. Mikrobiyotada 16S rRNA ve Basit Biyoinformatik Analizler. Journal of Biotechnology and Strategic Health Research 2018; 2(1): 23-34.

157. Gugnani N, Pandit IK, Sr'vastava N, Gupta M, Sharma M. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): A New Concept. International Journal of Clinical Pediatric Dentistry 2011; 4(2): 93-100.

158. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. Biotechniques 1997; 22(3): 474-481.

159. Montgomery J, Wittwer CT, Palais R, Zhou L. Simultaneous Mutation Scanning and Genotyping by High-Resolution DNA Melting Analysis. Nature Protocols 2007; 2(1): p. 59-66

160. https://nanoporetech.com/products/minion. (28.12.2021)

161. https://store.nanoporetech.com/16s-barcoding-kit-1-24.html. (29.12.2021)

162. https://international.neb.com/protocols/2012/10/17/protocol-for-longamp-hot-start-taq-2x-master-mix-m0533. (20.12.2021)

163. https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=B37419. doi:10.1016/j.mimet.2009.09.012.Metagenomic. (20.12.2021)

164. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. doi:10.1016/j.plantsci.2010.07.019. (28.12.2021)

165. Chen H, Zhang K, Lyu P, Li H, Zhang L, Wu J ve ark. A Deep Learning Approach to Automatic Teeth Detection and Numbering Based on Object Detection in Dental Periapical Films. Scientific Report 2019; 9:3840.

166. Allen B, Kon M, Bar-Yam Y. A New Phylogenetic Diversity Measure

Generalizing the Shannon Index and its Application to Phyllostomid Bats. The American Naturalist 2009 Ağustos; 174(2).

167. Sagar R, Sharma GP. Measurement of Alpha Diversity using Simpson Index (1/λ): the Jeopardy. Environmental Skeptics and Critics 2012; 1(1): 23-24.

168. Uysal M, Güyer T. İstatistiksel Veri Analizine İlişkin Genişleyebilir Bir Karar Ağacı Tasarımı. Bilişim Teknolojileri Dergisi 2014; 7(3): 33-43

169. Wickenheiser RA. Trace DNA: A Review, Discussion of Theory, and Application of the Transfer of Trace Quantities of DNA Through Skin Contact. Journal of Forensic Sciences 2001; p. 442–450.

170. Ogdur M, Cakan H, Cevik FE. Investigation of the microorganisms decaying bloody evidences. Medicine Science International Medical Journal 2018; doi:10.5455/medscience.2017.06.8734.

171. Karadayı Ş, Karadayı B. Tükürük Mikrobiyomunun Adli Amaçlı Kullanımı: Metagenomik Analiz Yöntemleri: Geleneksel Derleme. Türkiye Klinikleri Adli Tıp ve Adli Bilimler Dergisi 2021; 8(3): 260-73

172. Karadayı S. Assessment of the link between evidence and crime scene through soil bacterial and fungal microbiome: A mock case in forensic study. Forensic Science International 2021.

173. Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental Caries from a Molecular Microbiological Perspective. Caries Research 2013; 47: 89–102.

174. Wang Y, Zhang J, Chen X, Jiang W, Wang S, Xu L ve ark. Profiling of Oral Microbiota in Early Childhood Caries Using Single-Molecule Real-Time Sequencing. Frontiers in Microbiology 2017; 8: 2244.

175. Pitts NB, Ekstrand KR. International Caries Detection and Assessment System

(ICDAS) and its International Caries Classification and Management System (ICCMS) - Methods for Staging of the Caries Process and Enabling Dentists to Manage Caries. Community Dentistry and Oral Epidemiology 2013; 41: 41–52.

176. Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H ve ark. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an Integrated System for Measuring Dental Caries. Community Dentistry and Oral Epidemiology 2007; 35: 170–178.

177. Keijser BJF, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JMBM, Schuren FHJ, Montijn RC ve ark. Pyrosequencing Analysis of the Oral Microflora of Healthy Adults. Journal of Dental Research 2008; 87(11):1016-1020.

178. Rôças IN, Siqueira JF. Prevalence of New Candidate Pathogens *Prevotella baroniae*, *Prevotella multisaccharivorax* and As-yet-Uncultivated *Bacteroidetes* Clone X083 in Primary Endodontic Infections. Journal of Endodontics 2009; 35(10), 1359–1362.

179. Serrano C, Torres N, Valdivieso C, Castaño C, Barrera M, Cabrales A. Antibiotic Resistance of Periodontal Pathogens Obtained from Frequent Antibiotic Users. Acta Odontológica Latinoamericana 2009; 22(2): 99–104.

180. Gürsoy M, Haraldsson G, Hyvönen M, Sorsa T, Pajukanta R, Könönen E. Does the Frequency of *Prevotella interme*dia Increase During Pregnancy? Oral Microbiology Immunology 2009; 24: 299–303.

181. Yılmaz D, Altındiş M. Sağlık ve Hastalıkta Oral Kavite Mikrobiyotası. Journal of Biotechnology and Strategic Health Research 2018; 2(1): 9-21.

182. Djais AA, Theodorea CF, Mashima I, Otomo M, Saitoh M, Nakazawa F. Identification and Phylogenetic Analysis of Oral *Veillonella* Species Isolated from the Saliva of Japanese Children. F1000Research 2019; 8: 616.

183. Mashima I, Theodorea CF, Thaweboon B, Thaweboon S, Scannapieco FA, Nakazawa F. Exploring the Salivary Microbiome of Children Stratified by the Oral Hygiene Index. PLOS One 2017; 12(9): e0185274.

184. Sarkar A, Stoneking M, Nandineni MR. Unraveling the Human Salivary Microbiome Diversity in Indian Populations. PLOS One 2017; 12(9): e0184515.

185. Burne RA, Marquis RE. Alkali Production by Oral Bacteria and Protection Against Dental Caries. FEMS Microbiology Letters 2000; 193: 1-6.

186. Mohammed KAS, Miles RJ, Halablab MA. The Pattern and Kinetics of Substrate Metabolism of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. The Society for Applied Microbiology 2004; 39: 261–266.

187. Wexler HM. Bacteroides: The Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. Clinical Microbiology Reviews 2007; 20(4): p. 593–621.

188. Frandsen EVG, Poulsen K, Könönen E, Kilian M. Diversity of *Capnocytophaga* Species in Children and Description of *Capnocytophaga leadbetteri* sp. nov. and *Capnocytophaga* Genospecies AHN8471. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2008; 58: 324–336.

189. Idate U, Bhat K, Kotrashetti V, Kugaji M, Kumbar V. Molecular Identification of *Capnocytophaga* Species from the Oral Cavity of Patients with Chronic Periodontitis and Healthy Individuals. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology 2020; 24(2).

190. Vielkind P, Jentsch H, Eschrich K, Rodloff AC, Stingu CS. Prevalence of *Actinomyces spp.* in patients with chronic periodontitis. International Journal of Medical Microbiology 2015; 305: 682–688.

191. Beall CJ, Campbell AG, Griffen AL, Podar M, Leys EJ. Genomics of the Uncultivated, Periodontitis-Associated Bacterium *Tannerella sp*. BU045 (Oral

Taxon 808). American Society for Microbiology 2018; 3(3): e00018-18.

192. Chukkapalli SS, Rivera-Kweh MF, Velsko IM, Chen H, Zheng D, Bhattacharyya I ve ark. Chronic Oral Infection with Major Periodontal Bacteria *Tannerella forsythia* Modulates Systemic Atherosclerosis Risk Factors and Inflammatory Markers. Federation of European Microbiological Societies 2015; 73: 1–12, doi: 10.1093/femspd/ftv009.

EKLER

EK-1 Etik Kurul Onay Formu

EK-2

BAP Birimi Desteği

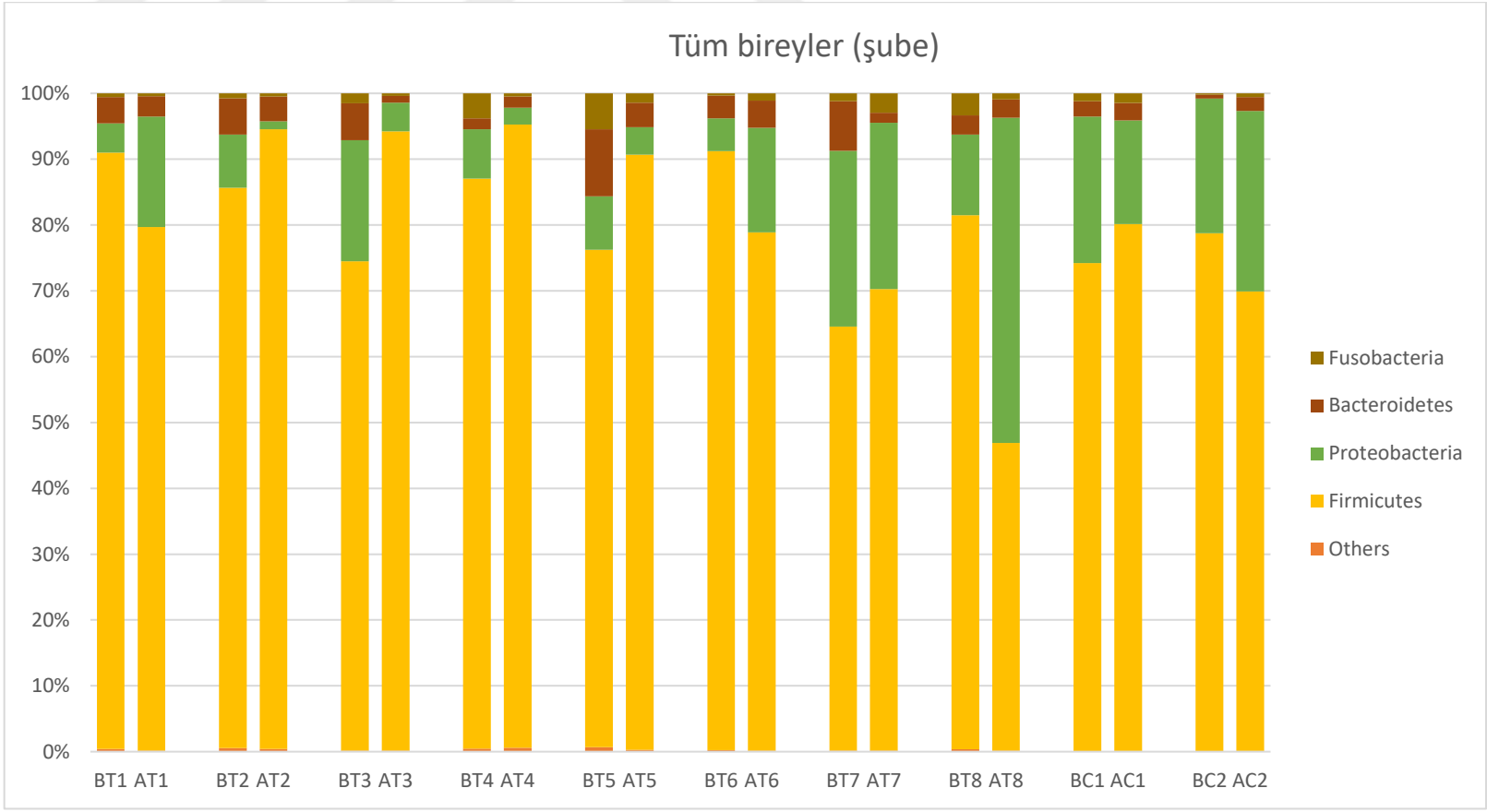
EK-3

Gönüllü Anket Formu

1. Yaş:
2. Cinsiyet:
3. Eğitim:
4. Meslek:
5. Medeni Durum:
6. Ağız ve diş sağlığınız için yaptırdığınız tedaviler hangileridir?
   - Dolgu
   - Diş çekimi / Gömük diş operasyonu
   - Kanal tedavisi
   - Diş taşı temizliği / Küretaj
   - Porselen kuron (kaplama) / Köprü
   - Ortodontik tedavi
   - Fissür örtücü (çürük önleyici)
   - Flor uygulaması
   - Tam protez / Bölümlü iskelet protez
   - İmplant/ İmplant destekli protezler
   - Daha önce herhangi bir diş tedavisi almadım
7. Ne kadar sıklıkta dişlerinizi fırçalarsınız?
8. Günde kaç öğün yemek yersiniz ve öğün aralarınız kaçar saattir?
9. Ağız gargara suyu veya diş ipi kullanıyor musunuz, kullanıyorsanız ne sıklıkta?
10. En son ne zaman bir diş doktoruna başvurdunuz?
11. Sigara kullanım alışkanlığınız nedir?
12. En son antibiyotik kullanımınız ne zamandır?
13. Herhangi bir kronik hastalık durumunuz var mıdır?
14. İlk diş muayenenizde belirlenen ICDAS (Uluslararası Çürük Tespit ve Değerlendirme Sistemi) skorunuz nedir?
15. Ağız içi yaralarınızın oluşum durumu ne sıklıktadır?
16. Boğaz enfeksiyonları geçirme sıklığınız nedir?
17. Diş tedavinizin bitiminden 1 ay sonra tekrardan örnek alımı yapılacaktır, bu süre sonunda tekrar örnek alımına engel olabilecek bir durumunuz var mıdır?

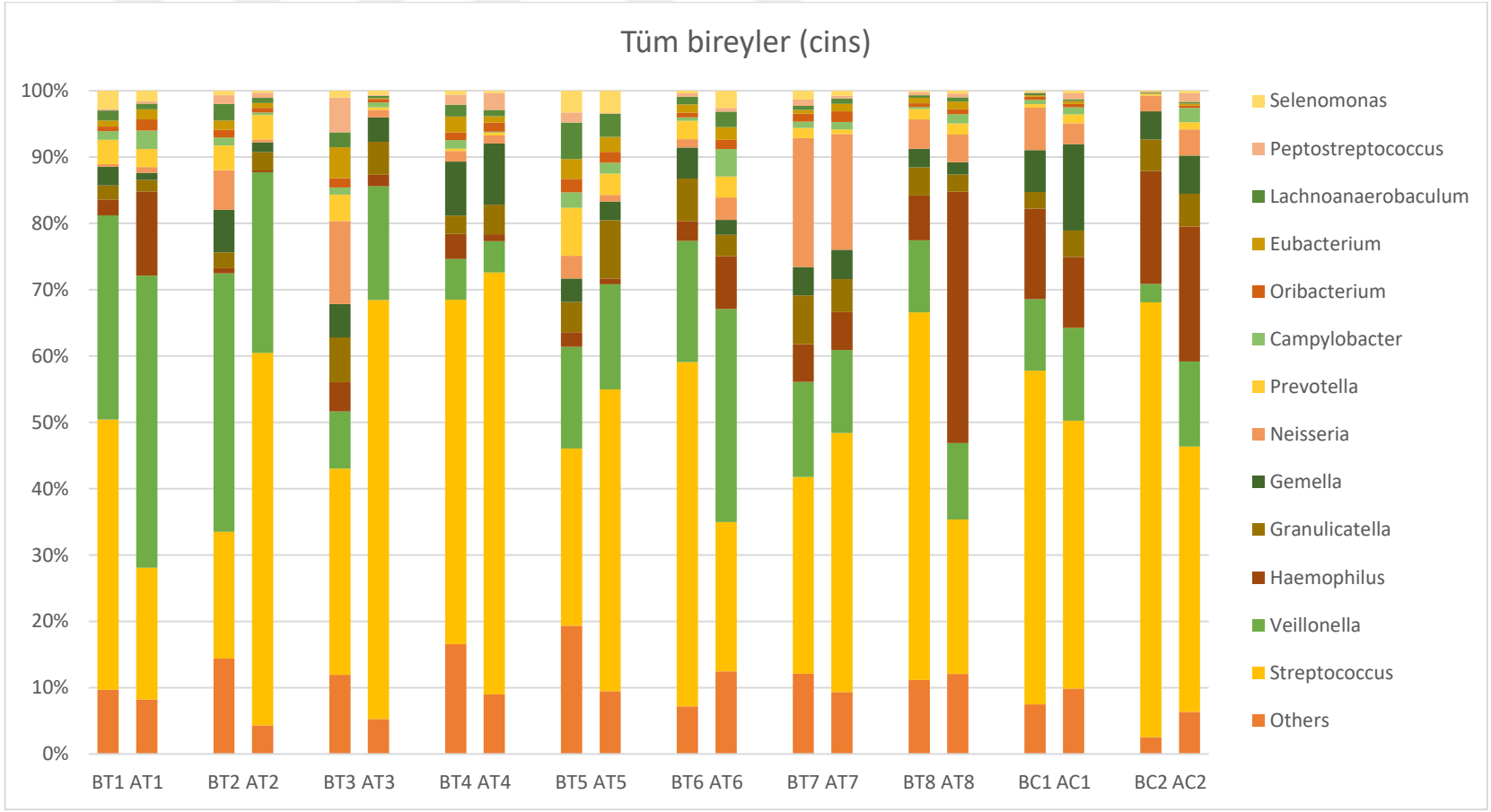
EK-4

Her iki grubun tüm bireylerinin (BT,BC/AT,AC) tükürük mikrobiyomlarında en sık tespit edilen bakteri şubelerinin bolluk değerlerini gösteren grafik (%).



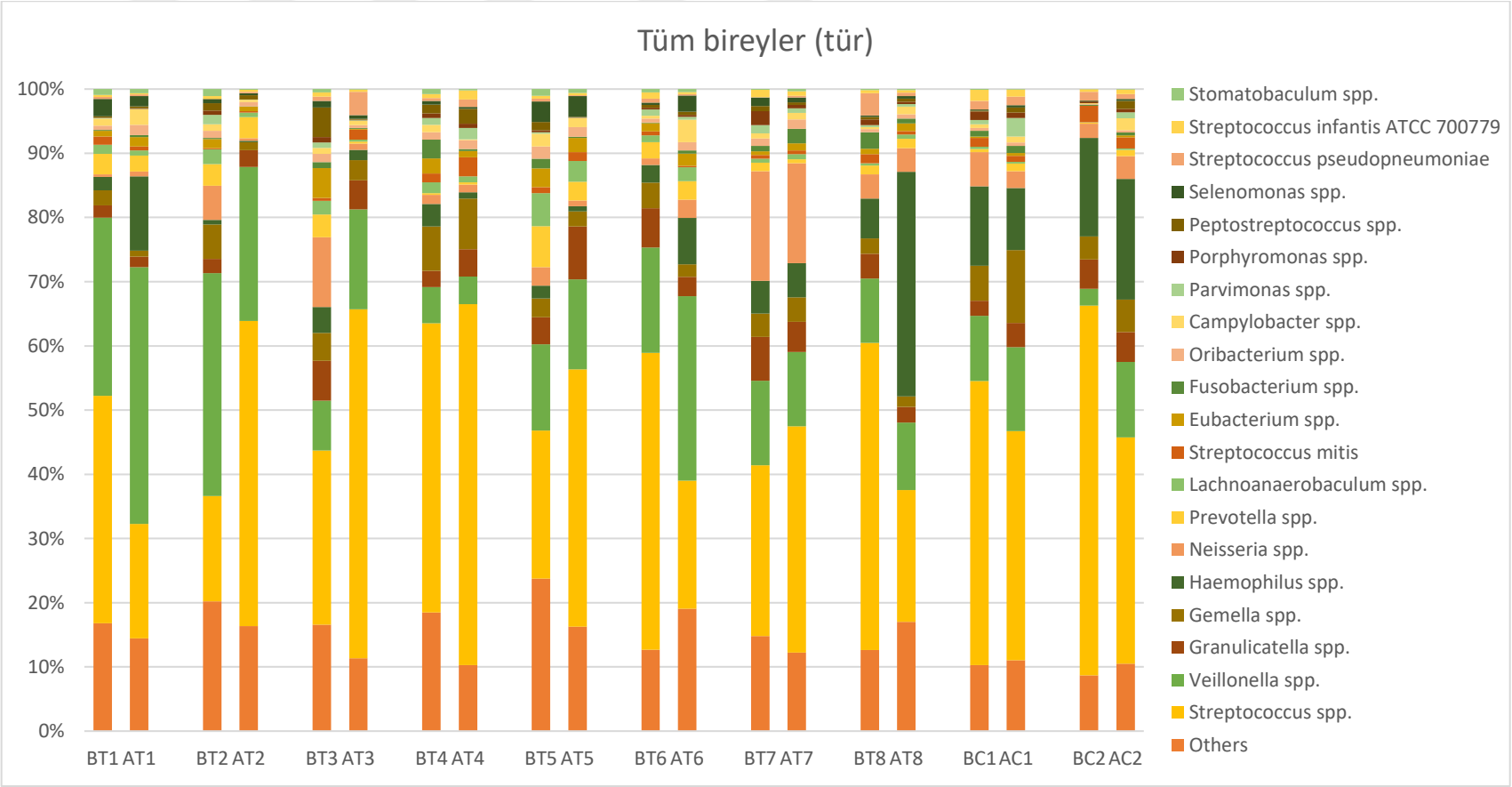
EK-5

Her iki grubun tüm bireylerinin (BT,BC/AT,AC) tükürük mikrobiyomlarında en sık tespit edilen bakteri cinslerinin bolluk değerlerini gösteren grafik (%).



EK-6

Her iki grubun tüm bireylerinin (BT,BC/AT,AC) tükürük mikrobiyomlarında en sık tespit edilen bakteri türlerinin bolluk değerlerini gösteren grafik (%).



ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı	: Feyza GÜL
Doğum Yeri ve Tarihi	:
E-posta	

Eğitim Bilgileri

2019-2022	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Fen Bilimleri Anabilim Dalı, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü (Tezli Yüksek Lisans Programı)
2014-2019	İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (Lisans Programı) (%İngilizce)

Deneyim ve Stajlar

Trainee (Erasmus + Program)	Charles University, Faculty of Medicine, Prague
Laboratuvar stajı (Gönüllü)	Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bülümü, İstanbul
Laboratuvar Çalışanı (Gönüllü)	Turgut Özal Tıp Merkezi ve Araştırma Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, Malatya

Projeler

TÜBİTAK 2209a Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri, 2018	Portakal Ufağından Hesperidin Eldesi ve Antioksidan Polipropilen Film Üretiminde Kullanılması.

Yabancı Dil	İngilizce