



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**DİŞ ÇEVRESİNDE OLUŞAN SİYAH LEKELERİN
KOMPOZİSYONU VE MİKROFLORASININ YENİ NESİL
DİZİLEME (NGS) YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI**

ZEYNEP CEREN ÇELİK

UZMANLIK TEZİ

RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

PROF. DR. FUNDA YANIKOĞLU

İSTANBUL- 2018

I. BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarında etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilemeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakların da kaynaklar listesinde yer aldığını, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Arş. Gör. Dt. Zeynep Ceren Çelik

İmza

II. TEŞEKKÜR

“Diş çevresinde oluşan siyah lekelerin kompozisyonu ve mikroflorasının Yeni Nesil Dizileme (NGS) yöntemi ile saptanması” konulu tezimde sayın danışman hocam Prof. Dr. Funda YANIKOĞLU’na çalışmam boyunca göstermiş olduğu sonsuz desteği, inancı ve anlayışı için, Prof. Dr. Dilek TAĞTEKİN’e hep daha iyi bir akademisyen olabilmem için olumlu yönlendirmeleri, tez çalışmam sürecindeki destekleri için derin şükranlarımı sunarım.

Çalışmamın laboratuvar aşamalarının tamamındaki desteklerinden dolayı İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü Genom Laboratuvarı öğretim üyeleri Sayın Doç. Dr. Neslihan ABACI’ya ve Sayın Doç. Dr. Sema SIRMA EKMEKÇİ’ye, Sayın Dr. Aris ÇAKİRİS’e ve çalışmamızın bulgularının istatistiksel değerlendirmesindeki yardımları ve emekleri için Sayın Dr. Can ILGIN’a,

Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalında görevli tüm değerli hocalarıma, asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca beni eğitim hayatım boyunca aldığım her kararda destekleyen, bilimsel düşünmemi sağlayan, sevgi dolu annem Canan PEHLİVAN ve bana her baktığında içimi yaşama sevinciyle dolduran, hayatta güçlü olmamı sağlayan canım babam Mehmet Ali PEHLİVAN’a, bana şevkatle kollarını açan, benim iyi bir bilim insanı olacağıma inançları sonsuz annem Şükriye ÇELİK ve babam Selahattin ÇELİK’e,

Bana bir kardeşten daha fazlası canım ağabeyim Mustafa Cem PEHLİVAN’a ve Servet PEHLİVAN’a; ileride ortak çalışmalar yapacağımıza yürekten inandığım biricik kardeşim Fethiye ÇELİK’e; ailemizin enerji kaynağı, ilk göz ağrımız, içimi yaşama sevinciyle dolduran dünyalar tatlısı yeğenim Cemre Su’ya,

Son olarak, tezimin her aşamasında benim yanımda olan, bıkmadan, yorulmadan, gerektiğinde uykusuz kalarak büyük özveriyle çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen, bana her daim güç veren, varlığıyla hayatımı anlamlı kılan Sevgili eşim Diş Hekimi Halil ÇELİK’e en kalbi teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DUP-120917-0514 numaralı proje ile desteklenmiştir

III. İÇİNDEKİLER

I.	BEYAN.....	i
II.	TEŞEKKÜR.....	ii
III.	İÇİNDEKİLER.....	iii
IV.	SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
V.	TABLolar LİSTESİ.....	vii
VI.	RESİMLER LİSTESİ.....	viii
VII.	ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
1.	ÖZET.....	1
2.	SUMMARY.....	2
3.	GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4.	GENEL BİLGİLER.....	6
4.1.	Oral Biyofilm.....	6
4.1.1.	Oral Biyofilm Tanımı ve İlgili Terimler.....	6
4.1.2.	Dental Plağın Oluşumu ve İçeriği.....	8
4.1.3.	Çürük Mikrobiyomu.....	13
4.2.	Dişlerin Siyah Lekelenmeleri.....	13
4.2.1.	Siyah Lekelerin Tanımı.....	13
4.2.2.	Siyah Lekelerin Prevalansı.....	14
4.2.3.	Siyah Lekelerin Çürük ile İlişkisi.....	14

4.2.4. Siyah Lekelerin Kimyasal İçeriği	15
4.2.5. Siyah Lekelerin Beslenme ile İlişkisi	16
4.2.6. Siyah Lekelerin Mikrobiyolojisi.....	17
4.3. Biyofilm İnceleme yöntemleri.....	18
4.3.1. Kültür Yöntemleri.....	18
4.3.2. PCR Yöntemleri	19
4.3.3. Metagenomik Yöntemler ve Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing).....	21
5. GEREÇ VE YÖNTEM	22
5.1. Çalışmanın Yer ve Zamanı.....	22
5.2. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Seçilmesi.....	22
5.3. DNA/RNA Shield Solüsyonunun Eppendorf Tüplere Konulması.....	24
5.4. Plak Numunelerinin Alınması ve Genom Laboratuvarına İletilmesi.....	30
5.5. DNA İzolasyonu.....	33
5.6. Kütüphane Oluşturulması.....	42
5.7. NGS Analizi	43
5.8. Ham Datanın biyoinformatik analizi.....	43
5.9. İstatistiksel Analiz	48
6. BULGULAR.....	49
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	68
8. KAYNAKLAR	77
9. EKLER.....	89
Ek 1. Etik Kurul Onayı.....	89
Ek 2. Aydınlatılmış Onam Formu	91

Ek 3. Hasta değerlendirme Formu.....	95
10. ÖZGEÇMİŞ	96



IV. SİMGELER ve KISALTMALAR

α	: Alfa
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EPS	: Ekstrasellüler polisakkarit
Fe	: Demir iyonu
g	: Gram
HOMD	: Human Oral Microbiome Database
iqr	: Çeyrekler arası aralık
Maks.	: Maksimum değer
Min.	: Minimum değer
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
μ l	: Mikrolitre
NGS	: Next Generation Sequencing (Yeni Nesil Dizileme)
OTU	: Operasyonel Taksonomik Ünite
p50	: Ortanca değer
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik Asit
SL	: Siyah leke
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

V. TABLOLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 4.1. Biyofilm ve özelliklerine ait mikrobiyolojik terimler.....	7
Tablo 4.2. Bakteriyel sınıflandırma ve örneği.....	8
Tablo 4.3. Diş plağına erken ve geç kolonize olan mikroorganizma türleri.....	11
Tablo 5.1. DNA izolasyonu safhaları için kullanılan malzemeler ve miktarları.....	34
Tablo 6.1. Gruplara ait yaşların median değerleri.....	49
Tablo 6.2. Gruplara göre diş fırçalama sıklığı ve yüzdeleri.....	50
Tablo 6.3. Diş taşı temizliği takiben siyah leke oluşma süresi	51
Tablo 6.4. Siyah lekeli ve lekesiz ağızlarda ICDAS 0, 1, 2 kodlu dişlerin sayısı.....	52
Tablo 6.5. SL'li ve lekesiz posterior dişlerin ICDAS 0, 1, 2 ve ICDAS 3, 4, 5, 6 kodları	52
Tablo 6.6. 1. Grup hastalardan alınan numunelerin DNA konantrasyonları.....	53
Tablo 6.7. 2. Grup hastalardan alınan numunelerin DNA konantrasyonları.....	54
Tablo 6.8. 3. Grup hastalardan alınan numunelerin DNA konantrasyonları.....	54
Tablo 6.9. 4. Grup hastalardan alınan numunelerin DNA konantrasyonları	55
Tablo 6.10. 1. Grup ve 2. Grup arasında anlamlı düzeyde farklılık gösteren bakteriler.....	60
Tablo 6.11. 1. Grup ve 3. Grup arasında anlamlı düzeyde farklılık gösteren bakteriler.....	61
Tablo 6.12. 2. Grup ve 4. Grup arasında anlamlı düzeyde farklılık gösteren bakteriler.....	62
Tablo 6.13. 1. Grup ve 4. Grup arasında anlamlı düzeyde farklılık gösteren bakteriler.....	63
Tablo 6.14. 2. Grup ve 3. Grup arasında anlamlı düzeyde farklılık gösteren bakteriler.....	64
Tablo 6.15. 3. Grup ve 4. Grup arasında anlamlı düzeyde farklılık gösteren bakteriler.....	65
Tablo 6.16. Siyah lekeli ve lekesiz hastalara ait plakların tamamında anlamlı düzeyde farklılık gösteren bakteri cinsleri.....	66

VI. RESİMLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 5.1. Laboratuvarın genel görünümü.....	25
Resim 5.2. Eldivenlerin (A) ve çeker ocağın (B) %70 etil alkol çözeltisi ile dezenfekte edilmesi.....	25
Resim 5.3. DNA/RNA Shield solüsyonu (Zyobiomics© ZymoResearch, USA).....	26
Resim 5.4A. 1.5 ml'lik RNAase/DNAase Free eppendorf tüpler.....	27
Resim 5.4B. RNAase/DNAase Free eppendorf tüplerin tüp tutucusuna yerleştirilmesi.....	27
Resim 5.5. Steril DNAaz/RNAaz bulundurmayan mikropipet uçları.....	28
Resim 5.6. Mikropipet görüntüsü.....	28
Resim 5.7. DNA/RNA Shield solüsyonunun çeker ocak içerisinde eppendorflara enjekte edilmesi.....	29
Resim 5.8A. Solüsyonuyla birlikte numune alımına hazır eppendorf tüp.....	29
Resim 5.8B. Eppendorf tüplerin parafilm ile kaplanması.....	30
Resim 5.9. Dişlerinin vestibül yüzeylerini de kapsayan yoğun siyah lekeli çürüksüz 1. Grup'taki 4 numaralı hastanın ağız içi görüntüsü.....	30
Resim 5.10. SL'li ve çürüklü 2. Grup'deki 17 numaralı hastanın ağız içi görüntüsü.....	31
Resim 5.11. Lekesiz ve çürüksüz 3. Grup'teki 28 numaralı hastanın ağız içi görüntüsü....	31
Resim 5.12. Lekesiz ve çürüklü 4. Grup'teki 42 numaralı hastanın ağız görüntüsü.....	31
Resim 5.13. 1. Grup'taki hastalara ait ağız içi ve numune alımı görüntüleri.....	32
Resim 5.14. 1. Grup'deki 9 numaralı hastanın ağız içi görüntüsü (A) ve plak örneği alınması (B).....	32
Resim 5.15. 3. Grup'a ait 32 numaralı hastanın anterior (A) ve posterior (B) dişlerinden plak örnekleri alınması.....	33

Resim 5.16.	5 numaralı hastanın (1. Grup) ve 27 numaralı hastanın (3. Grup) plak örneklerinin DNA/RNA Shield solüsyonu içindeki görüntüsü.....	33
Resim 5.17.	DNA izolasyonu aşamalarında kullanılan solüsyonlar, numuneler ve sentrifüj cihazının (Microfuge 16®, Beckman Coulter) görüntüsü.....	34
Resim 5.18A.	Numunelerin eppendorff tüp içerisinden alınması.....	35
Resim 5.18B.	ZR Bashingbead Lysis tüpleri.....	35
Resim 5.19.	Homojenizatör cihazının çalışır durumdaki görüntüsü.....	36
Resim 5.20A.	Homojenizatöre konulan tüplerin köpükleşmiş görüntüsü.....	36
Resim 5.20B.	Sentrifüj cihazının çalışır haldeki görüntüsü.....	37
Resim 5.21.	Zymo-Spin™ IV Spin Filter başlıklarının steril bir toplama tüpüne konulması.....	37
Resim 5.22.	Sentrifüj cihazından çıkan numune ve Bashingbead karışımı bulunduran tüpün görüntüsü. Bu resimde çökelti ve çökelti üzerindeki kalan kısım net biçimde izlenebilmektedir.....	38
Resim 5.23.	Sentrifüj sonucu toplama kabının altında kalan filtrat görüntüsü.....	38
Resim 5.24.	Oluşturulan solüsyonun yeni ve steril bir toplama tüpüne aktarılması.....	39
Resim 5.25.	1.5 µl.'lik steril DNase/RNase Free eppendorff tüp.....	40
Resim 5.26.	Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter (yeşil başlıklı) görüntüsü.....	40
Resim 5.27A.	DNA konsantrasyonunu ölçen cihazın ve programın görüntüsü.....	41
Resim 5.27B.	2 µl solüsyonun cihazın hassas metal detektörüne konulmuş görüntüsü.....	41
Resim 5.28.	DNA konsantrasyon ölçümü sonrasında ekrandaki sonuç görüntüsü.....	42

VII. ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 4.1.	Biyofilmin gelişim aşamaları.....9
Şekil 4.2.	Polimeraz zincir reaksiyonu Şematik anlatımı.....20
Şekil 5.1.	İleri ve Geri okumaların eşleştirme safhası.....44
Şekil 5.2.	Özet (<i>summary seq</i>) ekranı görüntüsü.....45
Şekil 5.3.	OTU kümelenmesi basamağı sonrası elde edilen Şematik görüntü.....46
Şekil 5.4.	Çalışmamızda izlenen adımların Şematik olarak gösterilmesi..... .47
Şekil 6.1.	1. Grup bireylere ait biyofilmde biyoinformatik analiz sonucu ortak bulunan bakterilerin <i>Krona-Pe-Chart</i> görseli.....56
Şekil 6.2.	2. Grup bireylere ait biyofilmde biyoinformatik analiz sonucu ortak bulunan bakterilerin <i>Krona-Pie-Chart</i> görseli.....57
Şekil 6.3.	3. Grup bireylere ait biyofilmde biyoinformatik analiz sonucu ortak bulunan bakterilerin <i>Krona-Pie-Chart</i> görseli.....58
Şekil 6.4.	4. Grup bireylere ait biyofilmde biyoinformatik analiz sonucu ortak bulunan bakterilerin <i>Krona-Pie-Chart</i> görseli.....59

Diş çevresinde oluşan siyah lekelerin kompozisyonu ve mikroflorasının Yeni Nesil Dizileme (NGS) yöntemi ile saptanması

Uzmanlık Öğrencisinin Adı: Zeynep Ceren Çelik

Danışman: Prof. Dr. Funda Yanıkoğlu

Anabilim Dalı: Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: Dişlerin siyah lekelenmeleri (SL), klinik olarak çoğunlukla diş eti marjinine paralel yerleşmiş, dairesel ve koyu renkli siyah oluşumlardır. Çalışmamızın amacı, daimi dişlenmede SL oluşumundan sorumlu bakterileri NGS yöntemi ile saptamak ve leke oluşumunun çürük ile ilişkisini belirlemektir.

Gereç ve Yöntem: Sistemik olarak sağlıklı 52 erişkin birey SL’li-çürüksüz, SL’li-çürüklü, lekesiz-çürüksüz ve lekesiz-çürüklü olmak üzere 4 grup (n=13) halinde çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların beslenme alışkanlıkları ve demir eksikliği durumları anket formu şeklinde kaydedilmiştir. Çürük sınıflandırmaları Uluslararası Çürük Tanıma ve Değerlendirme Sistemi ICDAS II kodlamasına uygun yapılmıştır. 08:00-10:00 saatleri arasında en az 8-12 saatlik supragingival plak örneklerinden DNA izolasyonları elde edilmiştir. Bakteriyel 16S ribozomal RNA geni hedeflenmiş dizileme, Quick-16S™ NGS Kütüphane Hazırlık Kiti kullanılarak yapılmıştır (Zymo Research, Irvine, ABD). Kullanılan bakteri 16S primerleri, 16S rRNA geninin V3-V4 bölgesini genişletmiştir. Biyoinformatik analiz *usegalaxy.org* üzerinden NGS Mothur yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde STATA 15.1 yazılımı kullanılmış olup Pearson Ki-kare, Fisher testleri uygulanmıştır.

Bulgular: SL’li dişlerde çürüksüzlük (ICDAS 0, 1, 2) miktarı lekesizlere oranla daha yüksektir (p=0,003). Çürük faktörü göz önünde bulundurulmaksızın SL’li plakta en yüksek sırasıyla *Capnocytophaga* (%4,8), *Corynebacterium* (%3,9), *Neisseria* (%5,4) cinsi bakteriler bulunmaktadır (p<0,05). Çürüksüz hastalar değerlendirildiğinde SL’li plakta en yüksek *Capnocytophaga* (%10,8), *Cardiobacterium* (%3,6), *Rothia* (%1,72) cinsi bakteriler tespit edilmiştir (p<0,05).

Sonuç: Bu çalışma erişkin hastalarda SL’li ve lekesiz çürüklü ve çürüksüz bireylerin plak mikrobiyomunu NGS yöntemiyle inceleyen öncüller arasındadır. SL’nin çürüklü ve çürüksüz ağızlarda farklı kompleks mikrobiyom yapısı vardır. Siyah lekeli bireylerde daha az çürük bulunduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Siyah leke, oral mikrobiyom, Yeni Nesil Dizileme, ICDAS II

Detection the composition and microflora of black stains around the teeth with Next Generation Sequencing Method (NGS)

Name of student: Zeynep Ceren Çelik

Consultant: Prof. Dr. Funda Yanıkoğlu

Department: Restorative Dentistry

2. SUMMARY

Aim: The black stains (BS) are circular and dark black formations that are clinically located parallel to the gingival margin. The aim of our study was to determine the etiologic bacteria of BS in permanent dentition using Next Generation Sequencing (NGS) method and to determine the relation caries and BS.

Materials and Methods: A total of 52 systemically healthy patients with BS&caries-free (n=13), BS&cariou (n=13), stainless&caries-free (n=13), stainless&cariou (n=13) were included in the study. After informed consent was signed by all patients, nutritional habits and iron deficiency were recorded as a questionnaire. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS II) was used for caries classification. Between 08:00-10:00, at least 8-12 hours of supragingival plaque samples were collected, DNA isolations were completed. The samples were processed by ZymoBIOMICS™ Service - Targeted Metagenomic Sequencing (Zymo Research, Irvine, CA). Bacterial 16S ribosomal RNA gene targeted sequencing was performed using the Quick-16S™ NGS Library Preparation Kit. The bacterial 16S primers used amplified the V3-V4 region of the 16S rRNA gene. Bioinformatics analysis was performed using NGS Mothur in open source *usegalaxy.org*. Data were analyzed statistically using STATA 15.1 software and Pearson Chi-Square and Fisher tests.

Results: Number of caries-free teeth (ICDAS 0, 1, 2) was statistically higher in patients with BS ($p = 0,003$). *Capnocytophaga* (4.8%), *Corynebacterium* (3.9%) and *Neisseria* (5.4%) were found to be highest in BS plaques neglecting presence of caries ($p < 0.05$). *Capnocytophaga* (10,8%), *Cardiobacterium* (3,6%) and *Rothia* (1,72%) species were detected in BS plaques of caries-free patients ($p < 0,05$).

Conclusion: This study is one of the pioneer studies by examining plaques with BS in carious and caries-free adult patients using NGS method. BS plaque has ultimate complex microbial structure. Patients with BS are seem to have less caries.

Key words: Black stain, Oral microbiome, Next Generation Sequencing, ICDAS II

2. GİRİŞ ve AMAÇ

Diş renklenmeleri estetik ve klinik sorunlara neden olan ve sıklıkla rastlanan bulgulardan biridir. Etiyolojisi, görünümü, lokalizasyonu, içeriği, şiddeti, diş bağlanma derecesi bakımından birbirlerinden ayrılır (Akyüz ve ark, 2015). Diş renklenmelerinin doğru tanımlanması, uygun tedavinin seçilmesi ve toplum bilinci yaratılması bakımından oldukça önemlidir.

Renklenmeler etiyolojik olarak üçe ayrılmaktadır ve bunlar: ekstrinsik, intrinsik ve her ikisinin kombinasyonu olan internalize olarak sıralanabilir (Hattab ve ark, 1999). Ekstrinsik renklenmeler, dış kaynaklı ajanlar tarafından dişin yüzeyine lokalize olmuş oluşumlardır. Bunlara örnek olarak çay, kahve, tütün, kırmızı şarap, balzamik sirke, soya sosu, böğürtlen gibi yiyecek ve içecekler örnek verilebilir. Bunların pelikül içerisine nüfuz etmesiyle pelikül boyanır ve dişin dış yapısında bir renklenme meydana gelir (Cynthia ve ark, 2015). İntersik renklenmeler, pigment materyallerin dentin dokularının içerisine kümelenmesiyle oluşur. İnternalize renklenmeler ise dış kaynaklı ajanların diş yapısındaki defektlerden içeri sızması ve burada hapsolmesiyle oluşur (Suliman, 2005).

Dişlerin siyah lekelenmeleri (SL) bir ekstrinsik renklenme çeşidi olmakla beraber klinik olarak çoğunlukla diş eti marjinine paralel yerleşmiş, dairesel şekilde, koyu renkli siyah oluşumlardır (Heinrich-Weltzien ve ark, 2014). SL'nin yüksek oranda çözünmeyen demir tuzları, bakır, kalsiyum ve fosfat içeren özel yapıda bir dental plak çeşidi olduğu öne sürülmüştür (Reid ve Beeley, 1976). Bu lekeler siyah rengini veren ajanın çözünmeyen demir tuzlarından ferrik sülfid olduğunu ve bu bileşiğin bakteriler tarafından oluşturulmuş hidrojen sülfid ile tükürük veya dişeti oluğu sıvısından kaynaklı demirin reaksiyonu sonucu meydana geldiğini savunan çalışmalar yapılmıştır (Reid ve ark, 1977; Zyla ve ark, 2015). Tükürükteki demir miktarını artıran demir takviye ilaçları veya demirden zengin beslenmenin de bu renklenmeleri artırabileceği ve buna sebep olan bakteri popülasyonunu artırabileceği ortaya konmuştur (Adcock ve Hogan, 2008).

SL, süt ve daimi olmak üzere her iki dentisyonda da görülebilir ve etkilenme prevalansı çalışmanın yürütüldüğü ülkeye ve popülasyona göre değişkenlik göstermekle birlikte %1-20 olarak kaydedilmiştir (Li ve ark, 2015). Bunun yanında farklı ülkelerde yapılan çalışmalar, SL oluşumunun cinsiyetler arasında anlamlı bir

fark göstermediğini vurgulamaktadır (Martin ve ark, 2013; Chen ve ark, 2014; Akyüz ve ark, 2015). SL'nin dişle bağlantısının oldukça güçlü olması nedeniyle hastanın günlük temizliği esnasında bu lekelerin ortadan kaldırılması zorlaşır. Estetik kaygılar nedeniyle profesyonel detertraj işlemleri için doktora başvurulduğunda ya da klinik muayene sırasında fark edilerek teşhis edilir. Bu lekeler küret yardımıyla bir süreliğine temizlenmiş olsa da tekrar oluşabilmektedir (Chen ve ark, 2014).

SL'lerin diğer birçok ekstrinsik renklenmelerden ayrılan ve toplum sağlığı açısından önem arz eden bir konumu vardır. İlk kez 1923 yılında SL'li hastalar için *çürüğe dirençli birey* kavramı ortaya konulmuş ve bu durumun birincil nedeni olarak özel yapıda mikroflora olarak gösterilmiştir (Slots, 1974). Bu alanda yapılmış birçok epidemiyolojik çalışma SL'li hastalarda lekesiz hastalarla karşılaştırıldığında daha az sayıda çürük bulunduğunu göstermiştir (Koch ve ark, 2001; Gasparetto ve ark, 2003; Heinrich-Weltzien ve ark, 2009; Heinrich-Weltzien ve ark, 2014; Zyla ve ark, 2015; Li ve ark, 2015). SL oluşumundan siyah pigment üreten kromojen bakterilerin sorumlu olduğu; bu bakterilerin çeşitliliği üzerine ve SL oluşmayan ağızlardan farklı mikrobiotanın detaylı olarak araştırılması gerektiği savunulmaktadır (Slots, 1974; Costa ve ark, 2012; Heinrich-Weltzien ve ark, 2014).

SL'li dental plakta günümüze kadar yapılan incelemelerde çoğunluk olarak *Prevotella Melaninogenicus* ve *Actinomyces* türlerinin baskın olduğu gram pozitif çomaklardan oluşan bir bakteri popülasyonu gözlemlenmiştir (Heinrich-Weltzien ve ark, 2009; Bandon ve ark, 2011). Ancak, SL oluşturan bakterilerin ağız içinde bulunan diğer bakterilerle etkileşimleri de yeterli biçimde aydınlatılamamıştır (Heinrich-Weltzien ve ark, 2014).

Oral mikroorganizmaların teşhisinin kültür yöntemi ile saptanması geleneksel olarak kabul edilen bir yöntem olmasına rağmen ağız içi bakterilerin yaklaşık %50'sinin yaşam koşulları bakımından kültür edilemez oluşu bu yöntemi yetersiz kılmaktadır (Aas ve ark, 2005; Hart ve ark, 2011). Buna ilaveten konvansiyonel kültür yöntemi oldukça zaman alıcı bir yöntemdir. Diğer taraftan, bakteri teşhisinde moleküler metodlar, kültür edilemez ve/veya kültür edilmesi zor bakterilerin teşhisinde oldukça avantaj sağlamaktadır (Abusleme ve ark, 2014; Li ve ark, 2015).

Günümüzde moleküler metodların başında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gelmektedir. Bir diğer ismi Sanger Kapiller Dizileme olan PCR yöntemi son 30 yılda

altın standart yöntem olarak kullanılmıştır (Abacı ve ark, 2015). Ancak, yalnızca bulunması tahmin edilen bakterilerin teşhis ediliyor olması ve teşhis edilebilen bakterilerin sınırlı sayıda olması mikrobiyal çeşitliliğin en fazla olduğu habitatlardan biri olan ağız içi florası için yetersiz kalabilmektedir (Berlutti ve ark, 2006). “Birinci nesil” teknoloji olarak kabul edilen Sanger dizileme ile karşılaştırıldığında NGS yöntemi, oldukça çok sayıdaki dizileri kısa bir sürede ve daha ekonomik şekilde analiz edebilmektedir (Abacı ve ark, 2015). Buna ek olarak, genomun herhangi bir konak hücre ya da *E. Coli*'de klonlamadan dizileme yapılabilmesine olanak sağlamaktadır (Üstek ve ark, 2011). NGS yöntemiyle incelenen numunede var olan tüm mikrobiyolojik genomların (mikrobiyom) rastgele dizilenmesi sonucunda ortamın mikrobiyolojik çeşitliliğini saptamak mümkündür (Mardis, 2008). Böylelikle incelenen numune içerisindeki mikroorganizmaların türü ve miktarına dair bilgiler elde edilebilir ve buna ek olarak şimdiye kadar var olduğu bilinmeyen, kültür edilememesinden kaynaklı olarak teşhis edilmemiş olan mikroorganizmalar da bu yöntemle saptanabilir (Üstek ve ark, 2011). Ayrıca, sistem ölü ya da canlı tüm mikroorganizmaları tanımlamaya imkan sağladığı için, klinikte toplanan örneklerin laboratuvara ulaştırılma süresi ve koşulları bakımından kültür yöntemlerine göre daha esnek bir protokolü vardır. Bu özelliğiyle örneklerin standardizasyonu bakımından oldukça üstün bir avantaj sağlamaktadır.

Çalışmanın hipotezi dişlerinde SL gözlenen bireylerin plak örnekleri leke gözlenmeyen bireylerden farklılık göstereceği ve SL bulunduğu dişi ve yüzeyini çürüğe karşı koruduğudur. Bu doğrultuda çalışmamızın amacı, daimi dentisyonda çürüklü ve çürüksüz plakta SL oluşumundan sorumlu bakterileri kuvvetli doğruluklu sonuçlar veren NGS yöntemiyle cins düzeyinde tanımlamak, lekelerin bulunduğu dişlerde ve genel ağız ortamında çürük bulunma miktarı ve derecesini belirlemektir. Böylelikle buradaki özgün mikrobiyal ortamın *çürük önleyici* mekanizması da tartışılacaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Oral Biyofilm

4.1.1. Oral Biyofilm Tanımı ve İlgili Terimler

Biyofilm, canlı ya da cansız bir yüzeye bağlanmış/tutunmuş mikroorganizmalar topluluğu olarak tanımlanır (Jamal ve ark, 2015). Daha kapsamlı şekilde ifade edilirse, bir yüzeye sıkıca tutunmuş ve biyolojik kökenli bir organik matrikse gömülmüş prokaryotik ve ökaryotik hücrelerden oluşan bir tabakadır (Wanner ve ark, 2014). Mikropların keşfi 17'nci yüzyıla dayanmaktadır (Slavkin, 1997). Tarihsel olarak, ilk kez Antonie Van Leeuwenhoek kendisinden ve başkalarından alınmış diş plağı numunelerini incelemiş ve diş plağında “küçük hayvancıklar” olarak nitelediği mikroorganizmaları gözlemlemiştir (Slavkin, 1997; Donlan ve Costerton, 2002; Aparna ve Yadav, 2008). O zamandan beri araştırmacılar mikroorganizmaların sınırlarını keşfetmeye ve bu alanda daha kapsamlı terminolojiler üzerine odaklanmaya devam etmektedir. Biyofilm üzerine anahtar terimler Tablo 1’de listelenmiştir (Kilian ve ark, 2016).

İnsan ağız boşluğunda yalnızca dişler değil, dişeti sulkusu, dil, sert ve yumuşak damaklar ve bademcikler dahil olmak üzere mikroorganizmaların yaşayabileceği bir dizi farklı habitatlar bulunur (Gao ve ark, 2018). İnsan ağız boşluğunda bulunan mikroorganizmalar, oral mikroflora, oral mikrobiyota veya oral mikrobiyom olarak adlandırılmıştır (Dewhirst ve ark, 2010).

Oral mikrobiyom, insan sağlığında önemli bir rol oynar. (Zarco ve ark, 2012). Yetişkin bir bireyin yaklaşık olarak 50-100 milyar bakteri barındıran ağız boşluğu son derece karmaşık bir yapıdır (Krishnan ve ark, 2017). İnsan ağız boşluğunda yaklaşık 700 prokaryot türü bulunmaktadır ve bu bakteriler belirli bağlantılar ve ilişkiler çerçevesinde denge halinde yaşamaktadır (Aas ve ark, 2005; Kuramitsu ve ark, 2007). Mikrobiyal floranın dengesizliği başta diş çürüğü olmak üzere periodontal hastalıklar (Abusleme ve ark, 2013; Jorth ve ark, 2014; Costalonga ve Herzberg, 2014, Philip ve ark, 2018), oral mukoza hastalıkları (Saikaly, 2018), gastroentestinal ve sinir sistemi ile ilgili rahatsızlıklar (Blod ve ark, 2017) gibi durumlara yol açabilir.

Tablo 4.1. Biyofilm ve özelliklerine ait mikrobiyolojik terimler (Kilian ve ark, 2016)

Terimler	
	Tanım
Biyofilm	Bir yüzeye ya da birbirine bağlı biçimde hücre dışı polimerik matrikse gömülmüş hücreler topluluğu. (Donlan ve Costerton, 2002)
Biyoinformatik	Genetik kodlar gibi karmaşık biyolojik verileri analiz etmek için hesaplama tekniklerinin uygulanması.
Koevrin	Birbiriyle etkileşen türlerin paralel evrimi
Topluluk profili	16S rRNA gen dizileri ile kompleks mikrobiyal toplulukların karakterizasyonu.
Disbiyozis	Normal mikrobiyom nüfus yapısının genellikle hastalık durumları veya ilaçlar gibi dış faktörlerle bozulduğu bir durumdur (Cho ve Blaser, 2012)
Holobiyont	Konak organizma ve tüm simbiyotik mikroorganizmaların toplamına verilen ad.
Metagenomik	Karmaşık bir popülasyonun genetik bilgisinin, tipik olarak bir çevresel veya konakçı örneklemindeki mikroplardan analizi. Metagenom birçok mikrobun genomlarından oluşur (Cho ve Blaser, 2012).
Metatranskriptomik	Aktif genlerin ve mikrobiyom türlerinin analizi (Bikel ve ark, 2015).
Mikrobiyom	Mikropların, genetik bilgileri ve etkileşimde buldukları ortamların toplamı (Cho ve Blaser, 2012).
Mikrobiyota	Mikrobiyomu oluşturan tüm canlı mikrobiyal organizmalar (Cho ve Blaser, 2012).
Fenotip	Bir organizmanın gözlemlenebilir fiziksel özellikleri, örneğin görünüş, davranış vb.
Filogenetik	Organizmaların arasındaki evrimsel ilişkilerin incelenmesi
Filotip	16S rRNA gen dizisine dayanarak filogenetik bir ağaç içerisinde yerleştirilmesiyle tanımlanan bir bakteri türü
Tür	İzole edilmiş, kültürü yapılmış ve isimlendirilmiş farklı bakteri grupları.
Simbiyozis	Uzun süreli birbirleriyle yakın ilişkide yaşayan iki veya daha fazla tür (Bordenstein ve Theis, 2015)

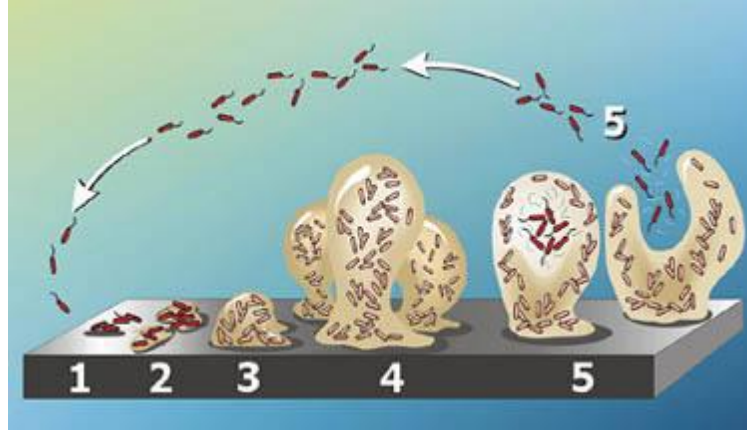
Oral mikrobiyomda doğal olarak bulunan, asla bulunmayan, sayısı arttığında dengesizlik yaratan bakteriler çeşitli yazılımlarla kayıt altına alınmıştır. Bunlardan en geniş bilgi yelpazesine sahip olan “İnsan Oral Mikrobiyom Veri tabanı (HOMD)”, insan ile ilişkili bir mikrobiyotanın tanımlamasıdır (Gao ve ark, 2018). HOMD'nin amacı, bilimsel topluluğa insan ağız boşluğunda bulunan yaklaşık 700 prokaryot türü hakkında kapsamlı bilgi sağlamaktır. HOMD, 16S rRNA gen tabanlı geçici isimlendirme şemasına dayanmaktadır (Dewhirst ve ark, 2010). Mikroorganizmaları sınıflandırmada sıra kurallarına uyulur. Bu sınıflandırma ilk olarak 1984 yılında Bergey's Manual Systematic Bacteriology kaynak kitabında belirtildiği üzere kabul edilmektedir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 Bakteriyel sınıflandırma ve örneği (HOMD veritabanından alınmıştır)

Alem (Kingdom):	Prokaryot
Bölüm (Division):	<i>Gracilicutes</i>
Sınıf (Class):	<i>Scotobacteria</i>
Takım (Order):	<i>Spirochaetales</i>
Familya (Family):	<i>Leptospiraceae</i>
Cins (Genus):	<i>Leptospira</i>
Tür (Species):	<i>Leptospira interrogans</i>

4.1.2. Dental Plakın Oluşumu ve İçeriği

Mikroorganizmalar, diş yüzeyinde organize çok türlü topluluklar şeklinde yaşarlar (Palmer ve ark, 2011). Dişlerdeki oral mikrobiyal topluluklar: dental plak, diş plağı, mikrobiyal dental plak, dental biyofilm terimleriyle bilinmektedir (Barber, 2009). Diş plakının, bir diğer ismiyle dental biyofilmin oluşum aşamaları beş ayrı fazı içerir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Biyofilmin gelişim aşamaları. (Stoodley ve ark. 2002)

1. Aşama: Planktonik hücreler yüzeye yapışır
2. Aşama: Planktonik hücreler ekzopolisakkarit üretirler.
3. Aşama: Biyofilmin erken safhası
4. Aşama: Biyofilmin olgun safhası
5. Aşama: Olgun biyofilmden kopan planktonik hücreler yeni yüzeylere yapışarak döngüyü yeniden başlatırlar.

4.1.2.1. Pelikül Oluşumu

Oral biyofilm oluşumunun ilk basamağı, tükürük glikoproteinlerinden oluşan içeriğiyle pelikülün dış yüzeyine bağlanmasıdır. Pelikül oluşum mekanizması, Gibbs yasasının serbest entalpi yasasına dayanır, çünkü glikoproteinler dış yüzeyine tutunursa daha fazla enerji açığa çıkar ve yüksek yüzey enerjisi yeni bağlantılara zemin hazırlar (Hannig ve Hannig, 2009). Pelikül, dış yüzeyinde oluşan bakterisiz ince bir tabakadır. Esas olarak tükürük proteinlerinden oluşur ancak bu yapıda tükürük kaynaklı olmayan az miktarda protein, glikoprotein, lipid ve karbonhidratlar da mevcuttur (Lendenmann ve ark, 2000).

Pelikül tabakası, dişi demineralizasyona karşı koruma ve remineralizasyonu teşvik etme ve lubrikasyon özelliklerinin yanısıra plak oluşumunun ilk birkaç saatinde kolonileşen erken mikrobiyal plağın oluşmasına da öncülük eder (Lendenmann ve ark, 2000; Siqueira ve ark, 2012; Masson ve ark, 2013). Tükürük bileşenleri, örneğin: albumin, glikoproteinler, müsinler, hücre artıkları ve prolin açısından zengin proteinler, bakteriler tarafından tanınabilen ve dış yüzeyine bağlanan ve böylece ince

bir pelikül tabakası oluşturan çeşitli reseptörler sağlar. Pelikül amorf, aselüler, organik ve görünmez bir tabakadır (Beighton ve ark, 2013).

4.1.2.2. Erken Kolonizasyon

Biyofilm oluşumunun ikinci aşamasında, öncü koloniler ilk dört saat içinde pelikül yüzeyindeki reseptörleri tanıyarak ve birincil bakteri tabakasını oluşturarak pelikül yapıyı oluşturur (Lie, 1977; Lie, 1979). Tükürük kaynaklı bağlanan proteinlere örnek olarak *a*-amilaz ve prolinden zengin glikoproteinler/proteinler sıralanabilir. Tükürük proteinleri mikroorganizmalar için temel besin kaynağıdır (Bradshaw ve ark, 1994; Marsh ve ark, 2010). Çünkü beslenme yoluyla alınan besinler ağızdan hızla temizlenir ve dış yüzeyine zayıf tutunan bakteriler için elverişsizdir (Keene ve ark, 1966; Beighton ve ark, 2013). Pelikül yüzeyine bu aşamadaki zayıf bağlanma geri dönüşümlüdür ve erken dönemde bağlanan bakteriler kolaylıkla pelikülden ayrılabilir (Kolenbrander ve ark, 2002). Öncü bakterilerin yapışmasında mevcut olan kuvvetler: hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, kalsiyum köprüleri, Van der Waals kuvvetleri, asit-baz etkileşimleri ve elektrostatik etkileşimlerdir (Characklis ve Marshall, 1990; Hannig ve Hannig, 2009). Bu fiziksel kuvvetler, güçlü kimyasal bağlara dönüştüğünde bakteriler yüzeye daha sıkı tutunmuş olur. Öncü bakteriler pelikülde tutunduklarında birbirlerine bağlanıp, sıkıca tutunmayı sağlayan ekstraselüler polisakkaritler (EPS) salgırlar. Bakterilerin yüzeye bağlandıkları esas yapılar, fimbria ve fibrillerdir (Handley, 1990). *Streptokoklar*, ilk 4-8 saatlik dental plağın %60-80'ini oluşturur (Dige ve ark, 2009; Jakubovics ve Kolenbrander, 2010). *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* diş yüzeyindeki başlıca kolonize olan türlerden olup bakteri bileşimi ağzın farklı bölgelerine göre değişkenlik gösterir (Li ve ark, 2004; Sachdeo ve ark, 2008; Papaioannou ve ark, 2009). Sonuç olarak, *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Capnocytophaga*, *Veillonella* ve *Neisseria* cinsi bakteriler diş yüzeyine erken evrede bağlanan başlıca öncü bakterilerdir (Foster ve Kolenbrander, 2004; Aydın ve Mısırlıgil, 2012). Erken kolonize olan bakteriler, tutundukları yüzeyin yalnızca yüzey özelliklerini değiştirmekle kalmaz, aynı zamanda diğer bakterilerin de kolonize olmasını sağlayan ortam koşullarını oluşturmuş olur (Davey ve Costerton, 2006).

Tablo 4.3. Diş plağına erken ve geç kolonize olan mikroorganizma türleri (Aydın ve Mısırlıgil, 2012)

Erken Kolonizasyon	Geç Kolonizasyon
<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Campylobacter gracilis</i>
<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Campylobacter showae</i>
<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Eubacterium nodatum</i>
<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Parvimonas micra</i>
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Actinomyces oris</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	
<i>Veillonella parvula</i>	
<i>Haemophilus türleri</i>	
<i>Prevotella türleri</i>	

Böylelikle bu evrede hızlı bir bakteriyel büyüme gözlenir. Birkaç saat içinde kapsamlı mikrobiyal büyüme gözlenebilir (Palmer ve ark, 2006; Periasamy ve Kolenbrander, 2010).

4.1.2.3. İkincil Kolonizasyon

Bazı bakteriler tükürük proteinleri ve polisakkaritleri metabolize ettikten sonra yapışkan ekstrasellüler maddeler üretirler. Bu bakterilerin sentezlediği protein yeni bakterilerin tutunmasını kolaylaştırır ve bakterilerin sayısında artışa neden olur (Nobbs ve ark, 2011). Gram-negatif bakteriler, diş plağı yüzeyine ikincil kolonize olan bakterilerdir (Periasamy ve Kolenbrander, 2010).

4.1.2.4. Olgun Dental Plağın Oluşumu

Öncü bakteriler yüzeye tutunduktan sonra geç kolonize olan bakterilere ya doğrudan ya da tükürük glikoproteinleri aracılığıyla spesifik bağlama bölgeleri sağlar ve biyofilm gelişimini destekler (Hannig ve Hannig, 2009). Geç kolonize olan bakteriler, öncü bakterilerin yüzeyindeki spesifik polisakkarit ve/veya protein reseptörlerini tanır ve bunlara yapışırlar (Huang ve ark, 2011). Yüzeye sonradan yapışan bakterilere örnek olarak *Fusobacterium Nucleatum*, *Treponema türleri*, *Tannerella Forsythensis*, *Porphyromonas Gingivalis*, *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* bakterileri sayılabilir (Kolenbrander ve ark, 2002; Foster ve Kolanbrander, 2004). Olgun biyofilmin mikrobiyal bileşenleri erken dönemde oluşan biyofilmden oldukça farklıdır. Plak olgunlaşırken, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Fusobacterium* ve *Veillonella* türlerinin miktarı artarken, göreceli olarak *Streptococcus* ve *Neisseria* miktarı azalır (Ritz, 1967). Olgun biyofilm yapısı tipik olarak birçok gözenekli tabaka ve kanallardan oluşmaktadır ve bu yapı, bakterilerin çoğalması için temel besinleri sağlamaktadır. Bu gözenekli yapıyı oluşturan temel mekanizma bakterilerin agregasyonudur (Kolenbrander ve London, 1993). Genel olarak, bir bakteri türü, diğer bakterileri spesifik protein ve reseptörler vasıtasıyla tanıyarak birden fazla bakterinin alanda birlikte bulunmasını sağlayabilir ve birbirleriyle koagregere olabilir (Huang ve ark, 2011). Bununla birlikte, agregasyon da oldukça spesifiktir. Çünkü, bir bakteriyel tür herhangi bir bakteri türüyle rastgele şekilde biraraya gelmez. Örneğin, *S. mutanslar*, *F. nucleatum* ile koagregere olurken *P. gingivalis* ile birleşme eğilimi göstermezler (Huang ve ark, 2011). Temel agregasyon mekanizması, bakteriler arasında polisakkarit reseptörlerin tanınmasına dayanmaktadır. Pek çok agregasyon mekanizması ortamda laktoz şekeri bulunduğunda inaktive olurken sukrozdan etkilenmemektedir. Bu alanda yapılan bir çalışmada *Streptococcus* ve *Actinomyces* türleri arasındaki agregasyonun laktoz ve D-galaktoz varlığında %90 oranında, maltoz, sukroz ve diğer monosakkaritlerin varlığından ancak %10 oranında inhibe olduğunu göstermişlerdir (McIntire ve ark, 1978). Böylelikle olgun plağın ortamdaki besin kaynaklarından etkilendiği, bir bakteri türünün farklı agregasyon mekanizmalarıyla farklı bakterilere bağlanabileceği ve ortamın koşullarını şekillendirebileceği ortaya sürülmüştür (Kolenbrander ve London, 1993). Bunun yanı sıra, eğer iki ya da daha fazla bakteri hücresi aynı reseptörü tanırsa, tüm bakteriler bu

spesifik bağlanma bölgesi için yarışır. Yarışmalı bağlanma sonunda ortaya çıkan kompleks yapı olgun plağın bileşenlerini oluşturur (Huang ve ark, 2011).

4.1.3. Çürük Mikrobiyomu

Çürük lezyonu, süt, karma ve daimi dişlenme dönemlerinin tümünde ağız boşluğunda görülen en yaygın hastalıklardan biridir (Tanner ve ark, 2011). Çürük oluşumu plak mik florası, konak bağışıklık sisteminin duyarlılığı, diyet alışkanlıkları ve bireyin ağız hijyeni gibi çok faktörlü olayların sonucudur (Torlakovic ve ark, 2012). Öyle ki, ağız hijyen bakımı ihmal edildiğinde plak içindeki bakteriyel flora olgunlaşmaya başlar, karbonhidrat açısından zengin substratların mevcudiyetinde ise asit üretebilen (asidojenik) ve asitli ortamda yaşayabilen/asite dayanıklı (asidürik) türler baskın hale gelir.

Streptococcus mutans prevalansı sık sık çürük oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Buna ek olarak tükürükte, olgun supragingival ve subgingival plakta, süt veya daimi dişlerden elde ettikleri mine ve dentin çürüğü örneklerinde çürük oluşumuna eşlik eden başka asidojenik bakteri türlerinin de olduğu bildirilmiştir; bunlara örnek olarak: *Lactobacillus*, *Granulicatella*, *Gemella*, *Haemophilus*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Rothia*, *Selenomonas*, *Atopobium*, *Neisseria*, *Eikenella*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, ve *Enterococcus* türleri sıralanabilir (Munson ve ark, 2004; Chhour ve ark, 2005, Aas ve ark, 2008; Palmer ve ark, 2010; Tanner ve ark, 2011; Torlakovic ve ark, 2012)

4.2. Dişlerin Siyah Lekelenmeleri

4.2.1. Siyah Lekelerin Tanımı

SL bir ekstrinsik renklenme çeşidi olmakla beraber klinik olarak çoğunlukla diş eti marjinine paralel, dairesel, siyah koyu renkli oluşumlardır (Heinrich-Weltzien ve ark, 2014). İlk olarak, 20. yüzyılın başlarında, Pickerill bu özelleşmiş plağı dişlerin gingival sınırlarında, ince, koyu kahverengi lekeli bir çizgi olarak tarif etmiş ve bu oluşumu bir çeşit diş taşı olarak kaydetmiştir (Pickerill, 1923). SL dişe oldukça sıkı tutunur ve hastanın günlük temizliği esnasında ortadan kaldırılmasının zorlaşmasına neden olur (Albelda-Bernardo ve ark, 2018). Estetik kaygılar nedeniyle profesyonel detertraj işlemleri için doktora başvurusuyla ya da klinik olarak rastgele fark

edilmesiyle teşhis edilir (Bu lekeler küret yardımıyla bir süreliğine temizlenmiş olsa da, tekrar oluşabilmektedir (Chen ve ark, 2014; Sfeatcu ve ark, 2015).

4.2.2. Siyah Lekelerin Prevalansı

SL, süt ve daimi olmak üzere her iki dentisyonda da görülebilir ve etkilenme prevalansı çalışmanın yürütüldüğü ülkeye ve popülasyona göre değişkenlik göstermekle birlikte %1-20 olarak kaydedilmiştir (Takashima ve ark, 2014; Li ve ark, 2015). Bunun yanında farklı ülkelerde yapılan çalışmalar, SL oluşumunun cinsiyetler arasında anlamlı bir fark göstermediğini vurgulamaktadır (Chen ve ark, 2014; Martin ve ark, 2013; Akyüz ve ark, 2015). İngiltere’de yapılan epidemiyolojik bir çalışmada, 11 ila 13 yaş arasındaki yaklaşık bin çocuğu kapsayan bir popülasyonda, siyah lekelerin prevalansı %21 oranında bildirilmiştir (Sutcliffe, 1967). 7-15 yaşları arasındaki İsviçreli çocuklarda yapılmış bir başka çalışmada, siyah leke prevalansının %19,9 olduğu, benzer yaş grubundaki Alman çocuklarda ise bu rakamın %4,6, İtalyan çocuklarda ise %6,3 olduğu belirtilmiştir (Koch ve ark, 2001). Brezilya’nın farklı bölgelerinde yapılmış çalışmalara göre, siyah leke prevalansının 6-13 yaş arası çocuklarda %9,3; 3-5 yaş arası çocuklarda ise %3,5 olduğu bildirilmiştir (Gasparetto, 2003; França-Pinto ve ark, 2012). Filipinli çocukları kapsayan bir diğer çalışmada ise siyah leke bulunma prevalansı %16 bulunmuştur (Heinrich-Weltzien, 2009). Çin’de yaşları 4-6 arasında değişen 1397 çocuğu kapsayan bir başka çalışmada ise prevalansın %9.9 olduğu saptanmıştır (Chen ve ark, 2014). Hırvatistan’da genç erişkin hasta grubunda saptanan siyah leke prevalansı ise %6 olarak belirlenmiştir. (Prskalo ve ark, 2017). Ülkemizde, Akyüz ve ark. tarafından 2015 yılında yapılan epidemiyolojik bir çalışmada yaşları 5 ila 13 arasında değişen çocuklarda siyah leke prevalansı %18.5 olarak bulunmuştur (Akyüz ve ark, 2015).

4.2.3. Siyah Lekelerin Çürük ile İlişkisi

Diş çürükleri dünyanın en sık rastlanan hastalıklarından biridir. Diş çürüklerinin bu denli yaygın olması ve ülkelerin sağlık hizmeti potansiyellerinin insanların tüm gereksinimlerini karşılayamayacak kadar az olması ülkemizin de üyesi olduğu Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) bu konuda sayısız bülten yayınlamasının bir nedenidir.

Hastaların kişisel çabalarının dışında sahip oldukları farklı ağız içi mikrobiyota ile ilişkili düşük çürük insidansı varlığı, bu özel durumun spesifik olarak hangi bakteriler tarafından oluşturulduğunu araştırma ilgisi doğurmuştur.

SL'lerin diğer birçok ekstrinsik renklenmelerden ayrılan ve toplum sağlığı açısından önem arz eden bir konumu vardır. Bu alanda yapılmış birçok epidemiyolojik çalışma SL bulduran hastaların düşük çürük deneyimi olduğunu göstermiştir (Koch ve ark, 2001; Gasparetto ve ark, 2003; Heinrich-Weltzien ve ark, 2009; Heinrich-Weltzien ve ark, 2014; Zyla ve ark, 2015; Li ve ark, 2015). Bunun yanında Brezilya nüfusu üzerinde yapılan bir çalışma, SL'nin çürük oluşumu üzerine engelleyici bir faktör olduğunu belirtmiştir (Gasparetto ve ark, 2003). İtalya'nın Potenza bölgesinde yaşları 6-12 arasında değişen okul çağı çocuklarında yapılan bir diğer çalışmada SL bulduran ağızların dmft kayıtlarının anlamlı ölçüde düşük izlendiği tespit edilmiş ve bu korelasyonun daimi dentisyonda da devam edeceği öngörüsünde bulunulmuştur (Koch ve ark, 2001).

SL'nin nasıl oluştuğu ve çürüklere karşı koruyucu özellikleri uzun bir süredir tartışılmaktadır. 20'nci yüzyılın başlarında, Pickerill siyah leke oluşumunu özelleşmiş bir çeşit diş taşı olarak kaydetmiş, SL'nin ortaya çıkmasının çürüklere karşı bir bağışıklık belirtisi olduğunu varsaymış ve bu alanda daha fazla araştırmaya duyulan ihtiyacın altını çizmiştir. (Pickerill, 1923).

4.2.4. Siyah Lekelerin Kimyasal İçeriği

SL'nin yüksek oranda çözünmeyen demir tuzları, bakır, kalsiyum ve fosfat içeren özel yapıda bir dental plak çeşidi olduğu öne sürülmüştür (Reid ve Beeley, 1976). Bu lekeler siyah rengini veren çözünmeyen demir tuzlarının ferrik sülfid olduğunu ve bu bileşimin bakteriler tarafından oluşturulmuş hidrojen sülfid ile tükürük ve dişeti oluşu sıvısından kaynaklı demirin reaksiyonu sonucu meydana geldiğini savunan çalışmalar yapılmıştır (Reid ve ark, 1977; Tantbironj ve ark, 1998).

SL içeriği ile ilgili çalışmalar, lekesiz plaklar ile karşılaştırıldığında, SL'li plağın daha yüksek oranda kalsiyum ve fosfat içeriğine sahip olduğu görülmüştür (Li ve ark, 2015). Dalga boyu değişken spektrometre kullanılarak gerçekleştirilen kimyasal yoğunluk analizlerinde siyah lekeli plak bölgesinde yüksek konsantrasyonda

sülfür, bakır ve demir alanları tespit edilmiştir (Zyla ve ark, 2015). Bu alanda genellikle plak analizleri yapılmış olup SL’li ağızlardan alınan tükürük örneklerinin analizlerinde anlamlı ölçüde yüksek tamponlama kapasitesi, kalsiyum ve fosfat saptanmıştır (Surdacka, 1989; Garan ve ark, 2012).

4.2.5. Siyah Lekelerin Beslenme ile İlişkisi

Ekstrinsik diş renklenmeleri, yiyecek veya içecek lekelerinin diş yüzeyinde birikmesi, yetersiz diş fırçalama teknikleri, sigara, aşırı klorheksidin kullanımı, farklı içerikli diş macunlarının ve/veya metal tuzlarının tüketimi ile ilişkili bulunmuştur (Watts ve Addy, 2001; Lorenz ve ark, 2015). Siyah lekeler de dişlerin vestibüler ve oral yüzeylerinde oluşan bir ekstrinsik renklenme çeşidi olup içeriğinde çözünmeyen demir tuzları ve yüksek konsantrasyonlarda kalsiyum ve fosfat iyonları bulunduğu öne sürülmüştür (Bandon ve ark, 2011). Ağızda SL bulunan okul öncesi çocuklardan oluşan bir çalışmada, siyah lekeleri olmayan çocuklara göre demir takviyesi ilaçları önemli ölçüde daha yüksek bir oranda tükettikleri saptanmıştır (Martin ve ark, 2013). Tükürükteki demir miktarını artıran demir takviye ilaçları veya demirden zengin beslenmenin de bu renklenmeleri artırabileceği ortaya konmuştur (Kim ve Shirley, 2008). Çeşitli vaka raporlarının derlemesi olarak yapılan bu çalışma, ilaçlar yoluyla ek demir takviyesi alan bebeklerin diş yüzeylerinde oluşan SL’nin, doz azaltıldığı takdirde azaldığını göstermiştir (Kim ve Shirley, 2008).

Yeşil yapraklı sebze ve meyveler, süt ürünleri, yumurta gibi yüksek oranda demir içeren besinler ve soya sosu tüketimi SL oluşumunu desteklemektedir (Martin ve ark, 2013; Chen ve ark, 2014). Brezilya’da yapılmış bir diğer çalışmada ise şişelenmiş mineral su veya doğal kaynak suyu yerine musluk suyu içmenin daha yüksek SL prevalansı ile ilişkili görünmektedir (França-Pinto ve ark, 2012).

Bir diğer çalışmada, pazı, ıspanak, lahana gibi yeşillikler, brokoli ve pancar gibi pigmentli sebzeler ele alınmıştır. Pancar ve yeşil lahana tüketimi için istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Siyah renklenme görülen hastalarda istatistiksel olarak daha fazla pancar ve daha az yeşil lahana tüketimi tespit edilmiş ve bu sonuç sebzeler içerisinde bulunan lif ve pigment maddelerin yoğunluğu ile ilişkilendirilmiştir (Prskalo ve ark, 2017).

4.2.6. Siyah Lekelerin Mikrobiyolojisi

SL oluşumundan siyah pigment üreten kromojen bakterilerin sorumlu olduğu; bu bakterilerin çeşitliliği üzerine ve SL oluşmayan ağızlardan farklı mikrobiotanın detaylı olarak araştırılması gerektiği savunulmaktadır (Koch ve ark, 2001; Li ve ark, 2015; Zyla ve ark, 2015)

SL içeren dental plaklar günümüzden önce incelendiğinde çoğunluk olarak *Prevotella Melaninogenicus* ve *Actinomyces* türlerinin baskın olduğu gram pozitif çomaklardan oluşan bir bakteri popülasyonu gözlemlenmiştir. Fakat bu özel yapının mikrobiyal çeşitliliği günümüzde hala tam olarak ortaya konulamamıştır (Ronay ve Attin, 2011). Bu nedenle SL oluşturan bakterilerin ağız içinde bulunan diğer bakterilerle etkileşimleri de yeterli biçimde aydınlatılamamaktadır (Heinrich-Weltzien ve ark, 2014).

Çalışmalar, SL'nin kalsifikasyona eğilimi olan, özelleşmiş mikrobiyal içerikli bir plak birikimi olduğunu göstermiştir (Theilade ve ark, 1973). Mikroorganizmaların çoğu gram pozitif çubuk şekilli bakteriler olduğu bulunmuştur. Bunların da büyük bir kısmının *Actinomyces israelii* ve *Actinomyces naeslundii* gibi fakültatif anaerobik ve zorunlu anaerobik bakterilerin oluşturduğu öne sürülmüştür (Slots, 1974; Saba ve ark, 2006). Buna ek olarak, ağız florasında bulunan siyah pigmentli bakterilerin de bu tür lekelerle ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Yoshida ve ark, 2005). *Prevotella intermedia* ve *Prevotella nigrescens* gibi siyah pigmentli bakterilerin çoğalmaları için ihtiyaç duydukları demiri hemoglobin içerisindeki hem maddesinden sağladıkları ve metabolik faaliyetler sonucu siyah pigmentasyonlara neden olabilecekleri de düşünülmüştür (Soukos ve ark, 2005). Li ve ark. (2015) tarafından yapılan PCR çalışmasında, siyah lekeli ve siyah lekesiz çocukların ağız mikrobiyolojisi araştırılmış ve siyah lekeli ağızlarda *Actinomyces*, *Cardiobacterium*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Tannerella* ve *Treponema* türlerinin daha fazla bulunduğunu ortaya koymuşlardır (Li ve ark, 2015). SL'de periodontal bakterilerin varlığını belirlemek için tasarlanmış bir başka PCR çalışmasında, siyah lekeli ağızlarda *Actinomyces* türleri ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*'ın kontrollere göre daha yaygın bulunduğu saptanmıştır (Saba ve ark, 2006). Yakın tarihli bir çalışmada, CRT BacteriaTest (İvoclar®, Vivadent, Zürih, İsviçre) kullanılmış ve SL'li hastalarda *Streptococcus Mutans* ve *Lactobacillus* miktarları araştırılmıştır. Kontrol ve siyah lekeli grubun her

ikisinde de bu bakterilerin bulunduğu ancak siyah lekeli hastalarda miktar olarak daha az *S. mutans* bulunduğu tespit edilmiştir (Prskalo ve ark, 2017). Aynı amaçla dizayn edilmiş bir diğer çalışmada ise kontrol ve siyah lekeli ağızlarda bulunan *S. Mutans* ve *S. Sobrinus* miktarlarının anlamlı derece farklılık göstermediği ancak *Lactobacillus* türlerinin siyah lekeli ağızlarda anlamlı ölçüde daha az miktarda görüldüğü saptanmıştır. (Heinrich-Weltzien ve ark, 2014). Aynı çalışmada siyah lekeli plakta lekeli plak ile karşılaştırıldığında anlamlı ölçüde daha fazla *Actinomyces naeslundii* ve daha az *Fusobacterium nucleatum* tespit edilmiştir. Buna karşın, siyah lekeli biyofilmlerin benzer miktarlarda *S. Mutans* içerdiğini öne süren başka çalışmalar da bulunmaktadır (Costa ve ark, 2012; Li ve ark, 2015).

Sonuç olarak, siyah lekeli hastalardan alınan plak ve tükürük örnekleri ile farklı metodolojilerle yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Araştırılmak istenen bakteri türleri, bakterilerin biyolojik özellikleri, araştırılan hasta grubundaki beslenme, yaş, ırk ve diğer farklılıklar birçok farklı sonuç bulunmasına neden olmuştur.

4.3. Biyofilm İnceleme yöntemleri

4.3.1 Kültür Yöntemleri

Mikrobiyal kültür modelleri birer *in vitro* araştırma aracı olup çürük çalışmalarında ağız ortamını simüle etmesi amacıyla laboratuvar ortamında üretilir (Sissons, 1997; Tang ve ark, 2003). Kültür modellerinin tasarımları, laboratuvar çalışmalarının amaçlarına göre değişir. Bunlar, kapalı sistemler ve açık sistemler olarak sınıflandırılabilirler.

Kapalı sistemdeki mikrobiyal kültür modellerinin besin kaynağı sınırlıdır. Bol miktarda besin olduğundan biyofilmin büyüme oranı başlangıçta hızlıdır. Ancak, böyle bir durum doğal ortamdaki biyofilmin büyümesinde görülmeyen bir olgudur (Coenye ve Nelis, 2010). Büyüme koşulları, besinlerin tüketimi ve metabolik ürünlerin birikmesiyle önemli ölçüde değişecektir. Bu nedenle biyofilmin fizyolojik ve biyolojik özellikleri doğal olanlarla karşılaştırılmaz (Yu ve ark, 2017).

Araştırmacılar, basitliği, üretkenliğinin bolluğu, tekrarlanabilirliği, deney koşullarının kontrol edilebilirliği, daha az kontaminasyon oluşu ve maliyetinin uygunluğu gibi özellikleri nedeniyle kapalı sistem modellerini kullanmışlardır. Agar

yöntemi ve mikrotitre biyofilm modelleri, kapalı sistem içerisinde en yaygın kullanılan iki farklı mikrobiyal kültür modeli örnekleridir (Yu ve ark, 2017).

Açık sistem ise devamlılığı olan bir kültür ortamını tarif eder. Burada, ortama verilen besinler ve ortaya çıkan metabolit ve artıklar eş zamanlı olarak sistemde işlenir ve bu durum bir döngü halinde devam eder. Böylelikle, bakteri ve metabolik ürünlerin konsantrasyonu sabit kalır (Marsh, 1989). Açık sistem, *in vivo* ortamda kapalı sistemden daha iyi simüle eder. Ayrıca biyofilm büyüme hızının ve diğer değişkenlerin daha iyi düzenlenmesini sağlar (Sim ve ark, 2016). Ancak, açık sistemdeki biyofilmin heterojenliğinden dolayı deney sonuçlarının tekrarlanabilirliği düşüktür. Bunun yanında yapının karmaşıklığı dekontaminasyon olasılığını artırmaktadır (Yu ve ark, 2017).

Açık sistemde yaygın kullanılan mikrobiyal kültür modelleri: kemostat modeli, akış hücresi biyofilm modeli, sabit derinlikli film fermenter modeli, damla akışlı biyofilm reaktörü, çoklu Sorbarod modeli ve çoklu yapay ağız modellerini içermektedir (Yu ve ark, 2017).

4.3.2 PCR Yöntemleri

İnsan genetiği üzerine çalışmalar DNA'nın ilk kez 1869'da Johann Friedrich Miescher tarafından izole edilmesiyle başlamıştır (Dahm, 2005). Daha sonra, 1953'te Watson ve Crick, DNA'nın çift sarmal yapısını tanımlamıştır (Dahm, 2005). 1975 yılında, genetik analiz için Southern blot teknolojisi kullanılmıştır. Onun bir çeşit modifikasyonu olan RFLP ise 1980 yılında Ray White tarafından geliştirilmiştir (Tilstone ve ark, 2006).

Moleküler biyolojide devrim niteliğinde, önemli tekniklerden biri olan PCR, Mullis tarafından 1983'te ortaya konmuş ve 1993 yılında Kimya alanında Nobel ödülüne layık görülmüştür (Maheaswari, 2016). Diş hekimliğinde ise, 1992'nin başlarında, adli diş hekimliğinde kullanılmak üzere insan dişinin pulpa dokusundan DNA'yı tanımlamak için kullanılmıştır (Pötsch ve ark, 1992).

2005 yılında, PCR dental plak numunesindeki tüm bakteri spektrumunun genomik haritasının çıkartılması amacıyla kullanılmıştır (Kumar ve ark, 2005). Daha sonra, ağız ortamında bulunan tüm bakteriyel türlerin dizilenmesi için HOMD veritabanı

geliştirilmiştir (Do ve ark, 2013). Oral kavitenin ekoloji bilgisi, PCR çalışmaları kullanılarak daha iyi anlaşılmıştır (Bizzarro ve ark, 2013).

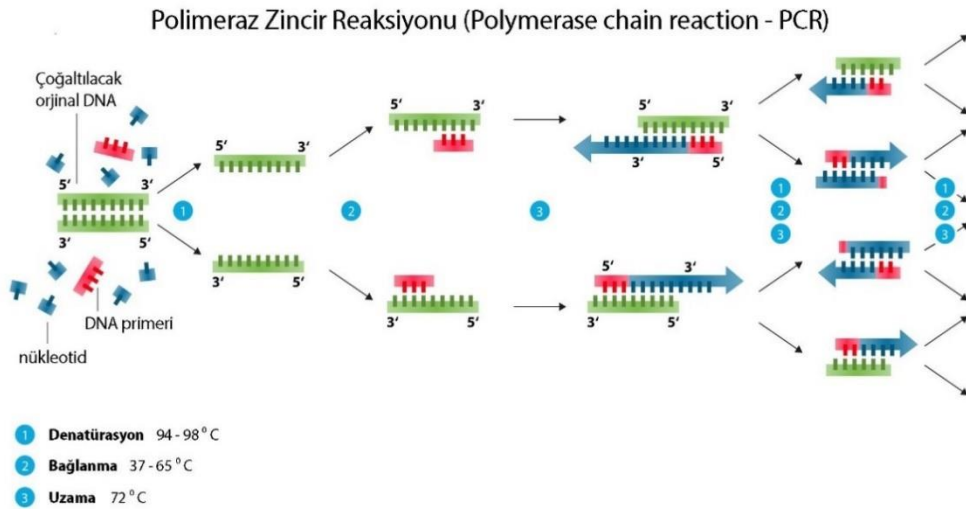
PCR basitçe, nükleotitlerin uygun koşullarda tüpte çoğaltılması işlemidir. Belli bir DNA parçasının kopyalarının primer adı verilen yapılar tarafından yönlendirilerek enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* (canlı dışında, tüpte) bir yöntemdir. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki nükleotid dizilerini tamamlayıcı bir çift sentetik DNA parçası (primer) kullanılarak, bu iki primerle sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır (Maheaswari ve ark, 2016).

Polimeraz zincir reaksiyonunda üç temel basamak vardır ve çoğaltılmış ürünün miktarı, bu üç adımın tekrarlanma sayısına bağlıdır:

1. Denatürasyon: DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden 94 – 98 santigrad derecede ayrılmasıdır.

2. Primer bağlanması (*annealing*, hibridizasyon): Sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya 37 – 65 derecede bağlanmasıdır.

3. Uzama (*extension*, polimerizasyon): Zincirin uzaması veya DNA polimerazın primerleri 72 derecede uzamasıdır. (Maheaswari ve ark, 2016)



Şekil 4.2. Polimeraz zincir reaksiyonu şematik anlatımı (<https://www.drozdogan.com/polimeraz-zincir-reaksiyonu-nedir-pcr-tarihcesi-nasil-yapilir/> Erişim tarihi: 25 Ekim 2018, Son güncelleme tarihi: 28 Nisan 2018)

4.3.3. Metagonomik Yöntemler ve Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing)

Oral mikroorganizmaların teşhisinin kültür yöntemi ile saptanması geleneksel olarak kabul edilen bir yöntem olmasına rağmen ağız içi bakterilerin yaklaşık %50'sinin yaşam koşulları bakımından kültür edilemez oluşu kültür yöntemi yetersiz kılmaktadır. Bunun aksine, bakteri teşhisinde moleküler metodlar kültür edilemez ve kültür edilmesi zor bakterilerin teşhisinde oldukça avantaj sağlar (Li ve ark, 2015).

Günümüzde moleküler metodların başında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gelmektedir. Bir diğer ismi Sanger Dizileme olan PCR yönteminin yalnızca bulunması tahmin edilen bakterilerin teşhis ediliyor olması ve bu bakterilerin sayılarının sınırlı olması ağız florası gibi yüksek çeşitlilik içeren mikrobiyal florayı tamamıyla teşhis edebilmede yeterli olamamaktadır. Sanger dizileme ile karşılaştırıldığında Yeni Nesil Dizileme (NGS) yöntemi, genomun herhangi bir konak hücrede çoğaltılmadan dizileme yapılabilmesine imkan tanımaktadır (Üstek ve ark, 2011).

Yeni nesil DNA dizileme sistemleriyle yüksek doğrulukla, ultra hızlı olarak, dizileme yapılabilir. Bu yöntemle elde edilen bir mikrobiyal genom dizileri araştırmacılara zengin ve özgün bilgi sağlamaktadır. NGS yöntemiyle incelenen numunede var olan tüm mikrobiyolojik genomların (mikrobiyom) rastgele dizilenmesi sonucunda ortamın mikrobiyolojik çeşitliliğini saptamak mümkündür (Mardis, 2008). Böylelikle incelenen numune içerisindeki mikroorganizmaların türü ve miktarına dair bilgiler elde edilebilir ve buna ek olarak şimdiye kadar var olduğu bilinmeyen, kültür edilememesinden kaynaklı olarak teşhis edilmemiş olan mikroorganizmalar da bu yöntemle saptanabilir (Üstek ve ark, 2011). Ayrıca, sistem ölü ya da canlı tüm mikroorganizmaları tanımlamaya imkan sağladığı için, klinikte toplanan örneklerin laboratuvara ulaştırılma süresi ve koşulları bakımından kültür yöntemlerine göre daha esnek bir protokolü vardır. Bu özelliğiyle örneklerin standardizasyonu bakımından oldukça üstün bir avantaj sağlamaktadır.

Bu bilgilerin ışığında biz de NGS yöntemini çalışmamızın hipotezini gerçekleştirmek için SL'li çürüksüz, SL'li çürüklü, lekesiz çürüksüz ve lekesiz çürüklü bireylere ait supragingival plak örneklerinin bakteriyel çeşitliliğini değerlendirmek üzere kullandık.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Çalışmanın Yer ve Zamanı

Çalışmamız için Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Etik Kurulundan onay alınmıştır (Tarih: 06.06.2017, Karar no: 2017-100). (Ek 1)

Çalışmamız ilaç dışı klinik araştırma kategorisinde olup Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Ana Bilim Dalında ve İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsünde Haziran 2017 – Haziran 2018 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

5.2. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Seçilmesi

Çalışmamızda T.C Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalına 2016 ve 2017 yıllarında başvuran, herhangi bir sistemik hastalığı bulunmayan, herediter, morfolojik ve ilaca bağlı yapısal değişiklikler (Amelogenesis imperfecta, Dentinogenesis imperfecta, Florosis, Molar-Insizal Hipomineralizasyon vb.) içermeyen dişleri olan, son 6 hafta içinde herhangi bir antibiyotik tedavisi görmemiş, oral hijyen alışkanlıkları birbirleriyle benzer (günde en az 1 kez dişlerini diş macunu ile fırçalayan) 18-50 yaşları arasında 52 erişkin birey dahil edilmiştir.

Çürük sınıflandırılması ICDAS II kriterleri esas alınarak yapılmıştır. ICDAS ICDAS kavramı çürüğün ve şiddetinin erken ve ileri evrelerinde tespitini kanıtlara dayalı olarak sunan standart bir çürük tespit ve değerlendirme yöntemidir (Pitts, 2004). Sınıflandırma aşağıdaki gibidir:

ICDAS 0 : Sağlam yüzey (diş yüzeyi 5 sn. boyunca kurutulduktan sonra mine şeffaflığında herhangi bir değişiklik gözlenmez)

ICDAS 1: Diş yüzeyinde nemliken herhangi bir değişiklik gözlenmez. Hava spreyi ile 5 saniye boyunca kurutulduktan sonra minede opaklaşma gözlenir

ICDAS 2: Pit ve fissürlerdeki renk değişimi ve opasite diş yüzeyi nemliken de belirgindir.

ICDAS 3: Minede bölgesel yıkım ve kavitasyon başlamıştır. Dentin görülmez.

ICDAS 4: Lokalize mine yıkımı olabilir veya olmayabilir. Ancak alttan yansıma yapan dentin görüntüsü belirgindir. Mavi, gri veya kahverengi olabilir.

ICDAS 5: Mine kavitasyonu altında expoze dentin izlenebilir. Kuru iken diş dokusunda madde kaybı ve demineralizasyon görülebilir.

ICDAS 6: Dişin yarısından fazlası etkilenmiş, içindeki dentin dokusu görülebilir şekilde geniş kavite bulunmaktadır.

Çalışma için sözlü ve yazılı olarak bilgilendirilen hastaların çürük durumları klinik ve radyolojik olarak ICDAS II kriterlerine göre belirlenerek, hastalar 13'er kişilik 4 gruba ayrılmıştır. Gruplar aşağıda listelendiği gibidir:

- 1) 1. Grup (SL'li çürüksüz): ICDAS 0-2 kodlu en az 6 dişinde SL olan hastalar
- 2) 2. Grup (SL'li çürüklü): ICDAS 3-6 kodlu en az 6 dişte SL bulunan hastalar
- 3) 3. Grup (Lekesiz çürüksüz): Tüm dişleri ICDAS 0-2 kodlu lekesiz hasta grubu
- 4) 4. Grup (Lekesiz çürüklü): ICDAS 3-6 kodlu en az 6 dişli olan lekesiz hasta grubu

Hastalar çalışma hakkında aydınlatılmış onam formu ile bilgilendirilip ve kendi el yazılarıyla anladıklarına dair formu imzaladılar. (Ek 2)

Buna ek olarak plak örnekleri alınmadan önce ön cephe alt ve üst çene oklüzyundayken ağız içi fotoğraf, üst çene oklüzal yüzey, alt çene oklüzal yüzey ve leke bulunan bukkal yüzeylerin fotoğrafları ağız-içi ayna ve dudak-yanak ekartörleri ile reflektör ışığı altında ve gün ışığında alındı. (SONY Exmar R 18.2 Megapixels DSC-HX20V)

Hasta değerlendirme kartında var olan sorular hastaya tek bir hekim (Arş. Gör. Dt. Zeynep Ceren Çelik) tarafından soruldu (Ek 3). Bu sorular ve gözlemler sırasıyla şöyledir:

- 1) Demir eksikliği durumu (Varsa medikal/bitkisel ilaç kullanımı)
- 2) Periodontal Sağlığı, Genel Ağız Hijyeni (Bu madde hekimin klinik muayenesi ve radyolojik kaydı ile beraber Kronik periodontitis, Agresif Periodontitis, Gingivitis tanıları ile tamamlanmıştır)
- 3) Sigara kullanımı

- 4) Daha önce diş taşı temizliği yapıldı mı? Yapıldıysa tekrar lekeler ne kadar sürede oluştu?
- 5) Ne zamandan beri lekelerin farkındasınız? Bunun için herhangi bir şey yapıyor musunuz?
- 6) Diş fırçalama sıklığı / şekli :

Bu basamak tamamlandıktan sonra, hastanın eklemek istediği durumlar not alındı ve beslenme alışkanlıklarını sorgulayan, 1 porsiyonunda bulunan demir miktarına göre en fazla demir içeren gıdaları tüketim anketi yapılmıştır.

Sakatat (karaciğer, dalak vs.), Maydanoz, Ispanak, Pekmez Baklagiller, Kabak çekirdeği Midye Bitter Çikolata Çay Kahve Kuruyemiş (Kaju, badem, fıstık)

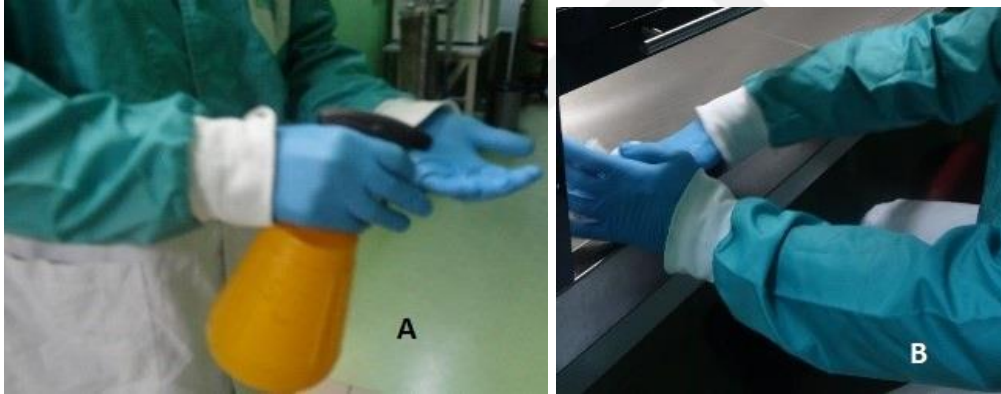
Bu yiyeceklerin belirlenen porsiyon miktarlarına göre tüketim sıklığı Hiç/Nadir, Ayda 2 kez, Haftada 1 kez, Haftada 2 ve üzeri, Hergün şeklinde kaydedilmiştir.

5.3. DNA/RNA Shield Solüsyonunun Steril Eppendorf Tüplerine Konulması

Çalışmamızda kullanılan DNA/RNA Shield solüsyonu, ortam sıcaklıklarında plak numunelerinin (hücreler, dokular, kan, plazma, serum, tükürük, idrar, dışkı vb. numuneler de dahil olmak üzere) genetik bütünlüğünün ve ifade profillerinin muhafaza edilebilmesini sağlamaktadır. Solüsyon ile numune içerisindeki DNA ve RNA doğrudan çökeltme veya reaktif kaldırma olmaksızın izole edilebilmektedir. Numunelerin alındığı T.C. Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı ile İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü Genom Laboratuvarı (Resim 5.1) arasındaki mesafe dolayısıyla numunelerin laboratuvara sağlıklı biçimde ulaştırılmasını sağlayan bu kit aynı zamanda kullanılan ZymoBionics DNA izolasyon kiti ile de uyumludur. Bu solüsyonda muhafaza edilen RNA oda sıcaklığında 1 ay, DNA oda sıcaklığında 2 ay stabil kalabilmektedir.



Resim 5.1. Laboratuvarın genel görünümü (İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü Genom Laboratuvarı)



Resim 5.2. Eldivenlerin (A) ve çeker ocağın (B) %70 etil alkol çözeltisi ile dezenfekte edilmesi

Öncelikle tüm laboratuvar şartları sağlanarak, pudrasız nitril eldivenler ve çeker ocağın içi %70 etil alkol çözeltisi ile dezenfekte edilmiştir (Resimler 5.2A,B).



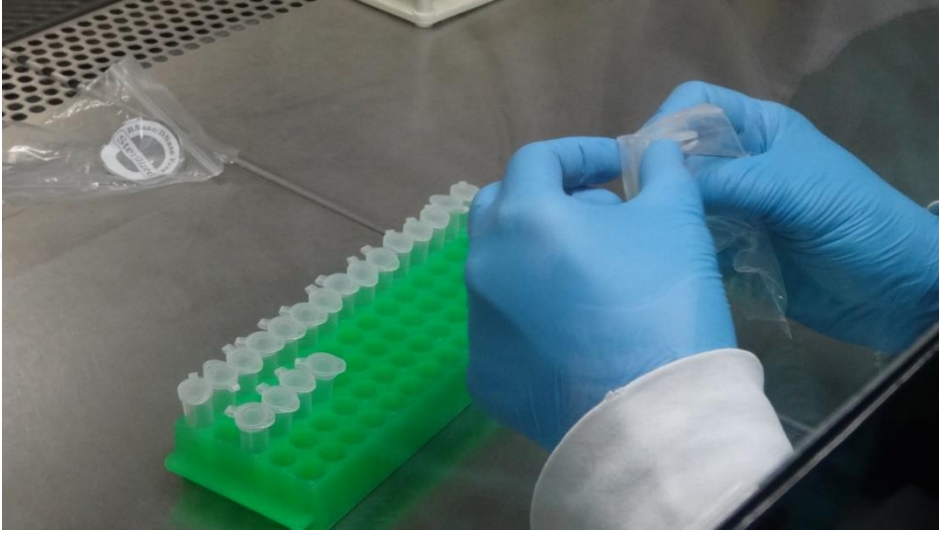
Resim 5.3. DNA/RNA Shield solüsyonu (Zymobiomics© ZymoResearch, USA)

DNA/RNA Shield solüsyonu (Resim 5.3) numunelerin içerisindeki bakteriyel DNA'ın stabil kalmasını sağlamaktadır. Solüsyon ile ortam sıcaklıklarında numunelerin (hücreler, dokular, kan, plazma, serum, diş plağı, tükürük, idrar, dışkı vb.) genetik bütünlüğünü ve ifade profilleri muhafaza edilmektedir. Aynı zamanda DNA ve RNA doğrudan çökeltme veya reaktif kaldırma olmaksızın izole edilebilmektedir. Çalışmamızda kullanılan ZymoBIOMICS™ DNA izolasyon kiti ile uyumludur ve bu solüsyon içerisinde muhafaza edilen RNA oda sıcaklığında 1 ay, DNA oda sıcaklığında 2 ay stabil kalabilmektedir.

Solüsyon numunenin özelliğini değiştirmemesi için çeker ocak içerisinde sterilize edilmiş DNAaz ve RNAaz bulundurmayan 1.5 ml'lik RNAase/DNAase Free eppendorf tüpler (Resim 5.4A) tüp tutucuya yerleştirilmiştir (Resim 5.4B).



Resim 5.4A. 1.5 ml'lik RNAase/DNAase Free eppendorf tüpler



Resim 5.4B. RNAase/DNAase Free eppendorf tüplerin tüp tutucusuna yerleştirilmesi

DNA/RNA Shield solüsyonu bir mikropipet yardımıyla eppendorf tüplere yerleştirilmiştir. Mikropipetin mikro uçları da aynı şekilde RNAase-DNAase free steril uçlardan oluşmaktadır (Resim 5.5.).

Steril RNAase- DNAase free uçlar ve eppendorflar bakterilerden arındırılmış temiz sahada otomatik makineler ile el değmeden üretilir ve gama ışını ile sterilize edilir. Numuneler içerisindeki DNA'nın yapısını bozacak DNAase enzimi içermemesi

özelliğiyle mikrobiyolojik çalışmalarda hassas ve doğru ölçümler yapılabilmesine olanak sağlar.

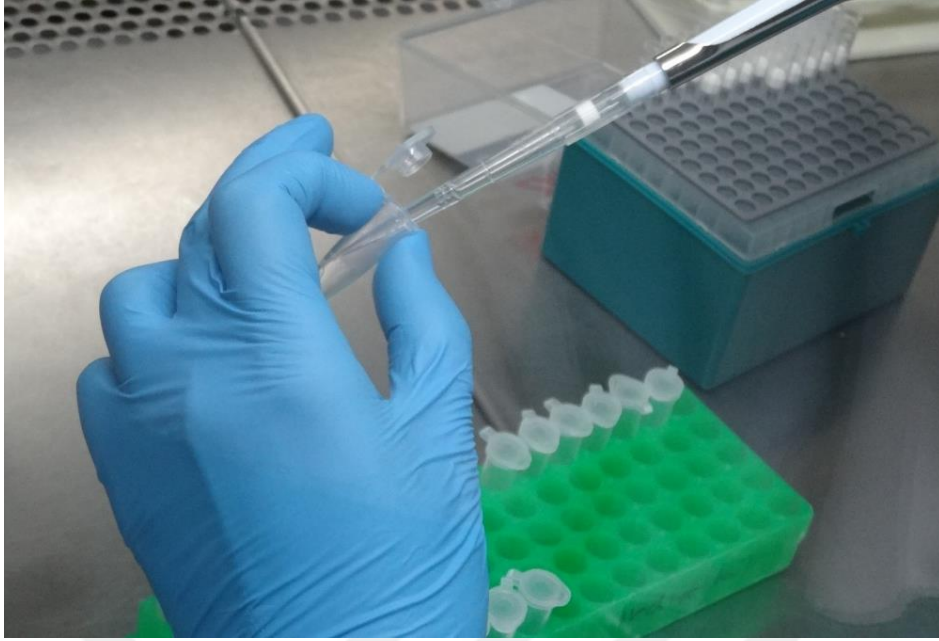


Resim 5.5. Steril DNAaz/RNAaz bulundurmeyan mikropipet uçları

Her bir eppendorfa 250 µl alınmak suretiyle mikropipet ayarlanmıştır (Resim 5.6). Çekilen solüsyon eppendorf tüpe enjekte edilmiştir (Resim 5.7).



Resim 5.6. Mikropipetin görüntüsü



Resim 5.7. DNA/RNA Shield solüsyonunun çeker ocak içerisinde eppendorflara enjekte edilmesi

Hazırlanan solüsyonlar eppendorfun iç kapağına dokunulmadan kapatılıp (Resim 5.8A) parafilm ile kaplanarak (Resim 5.8B), numunelerin alındığı Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı'na ulaştırılmıştır.



Resim 5.8A. Solüsyonuyla birlikte numune alımına hazır eppendorf tüp



Resim 5.8B. Eppendorf tüplerin parafilm ile kaplanması

Ağızları kapalı eppendorfların kapakları parafilm ile kaplanarak tam bir izolasyon sağlanmıştır. Parafilm, çoğunlukla laboratuvarlarda kullanılan, arkası kağıt kaplı plastik parafin bir banttır.

5.4. Plak Numunelerinin Alınması ve Genom Laboratuvarına İletilmesi

Çalışmaya dahil olma kriterlerine tam uyumlu siyah lekeli ve çürüksüz hastalardan oluşan 1. Grup (Resim 5.9); siyah lekeli ve çürüklü hastalardan oluşan 2. Grup (Resim 5.10); lekesiz ve çürüksüz hastalardan oluşan 3. Grup (Resim 5.11); lekesiz ve çürüklü hastalardan oluşan 4. Grup bireyleri (Resim 5.12) öncelikle sözlü olarak çalışma hakkında tekrar bilgilendirilmiştir.



Resim 5.9. Dişlerinin vestibül yüzeylerini de kapsayan yoğun siyah lekeli çürüksüz 1. Grup'taki 4 numaralı hastanın ağız içi görüntüsü.



Resim 5.10. Siyah lekeli ve çürüklü 2. Grup'deki 17 numaralı hastanın ağız içi görüntüsü



Resim 5.11. Lekesiz ve çürüksüz 3. Grup'teki 28 numaralı hastanın ağız içi görüntüsü



Resim 5.12. Lekesiz ve çürüklü 4. Grup'teki 42 numaralı hastanın ağız görüntüsü

Plak örneklerinin standardize edilmesi için hastalara akşam yemeğinden sonra diş fırçalama işlemi yapabilecekleri ancak daha sonra herhangi bir beslenme ve oral hijyen uygulamasından kaçınmaları gerektiği bilgisi verilmiştir. En az 10 saatte ağızda oluşmuş plak örnekleri, hastalara aydınlatılmış onam formu imzalatıldıktan sonra, sabah 08:00-09:00 saatleri arasında keskin bir periodontal küret yardımıyla toplanarak DNA/RNA Shield solüsyonu bulunduran eppendorf tüplere aktarılarak (2 tüp), kapakları parafilm ile kaplanmıştır (Resim 5.13A-D, 5.14).



Resim 5.13. 1. Grup'taki hastalara ait ağız içi ve numune alımı görüntüleri



Resim 5.14. 1. Grup'taki 9 numaralı hastanın ağız içi görünütüsü(A) ve plak örneği alınması (B)



Resim 5.15.3. Grup'e ait 32 numaralı hastanın anterior (A) ve posterior (B) dişlerinden plak örnekleri alınması



Resim 5.16. 5 numaralı hastanın (1. Grup) ve 27 numaralı hastanın (3. Grup) plak örneklerinin DNA/RNA Shield solüsyonu içindeki görüntüsü

5.5. DNA İzolasyonu

Alınan örneklerin içindeki tüm DNA'nın elde edilmesi çoklu basamaklarda kullanılan birçok solüsyon ile mümkün olmuştur. DNA izolasyonu amacıyla kullanılan malzemeler aşağıda listelenmiştir (Tablo 5.1, Resim 5.17)

Tablo 5.1. DNA İzolasyonu safhaları için kullanılan malzemeler ve miktarları

Malzeme ismi	Miktarı
ZR Bashingbead™ Lysis Tube (0.1x 0.5mm)	50
ZymoBIOMICS™ Lysis Solution	40 ml
ZymoBIOMICS™ Binding Buffer	100 ml
ZymoBIOMICS™ Wash Buffer 1	50 ml
ZymoBIOMICS™ Wash Buffer 2	60 ml
ZymoBIOMICS™ DNAase/RNAase Free water	10 ml x 3
Zymo-Spin™ IV Spin Filters (Orange tops)	50
Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filters (Green tops)	50
Zymo-Spin™ IIIC- Z Columns	50
Collection Tubes	200



Resim 5.17. DNA izolasyonu aşamalarında kullanılan solüsyonlar, numuneler ve sentrifüj cihazının (Microfuge 16®, Beckman Coulter) görüntüsü

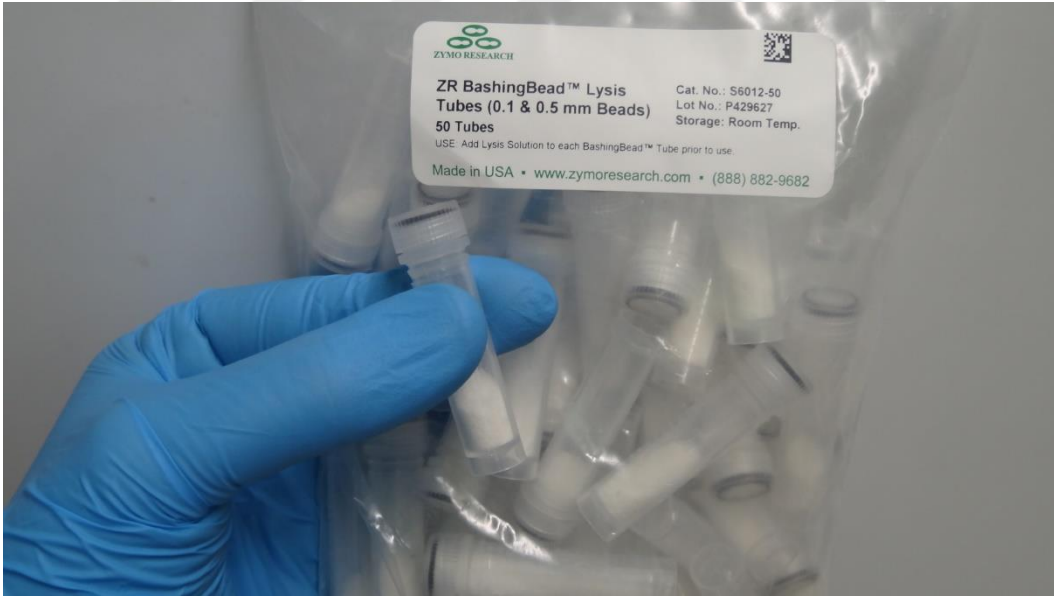
Başlamadan önce, ZymoBIOMICS™ DNA Binding Buffer çözeltisine laboratuvarında önceden hazırlanmış beta-mercaptoetanol çözeltisi 500 µl eklenmiştir. Böylece toplam 100 ml'lik çözeltide %0.5 oranında bulunacak şekilde hazırlanmış ve üzerine not

alınmıştır. DNA izolasyon kiti üzerindeki üretici talimatları doğrultusunda 13 basamakta gerçekleşmiştir.

Öncelikle eppendorf tüplerin içerisinde mikropipetle alınan örnek ZR BashingBead™ Lysis tüplerine aktarılmıştır (Resim 5.18A,B).

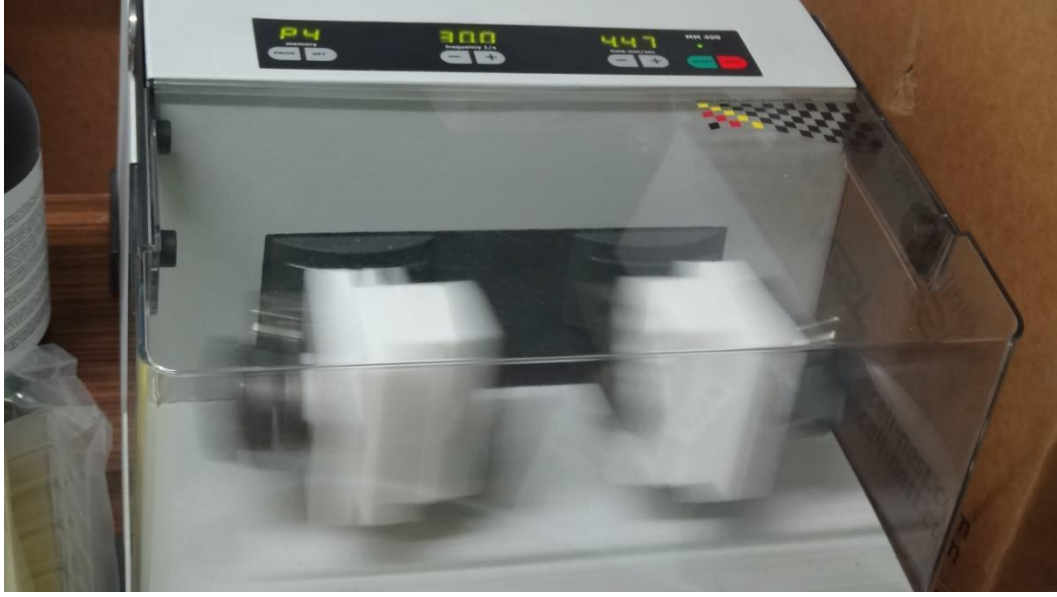


Resim 5.18A. Numunelerin eppendorf tüp içerisinde alınması



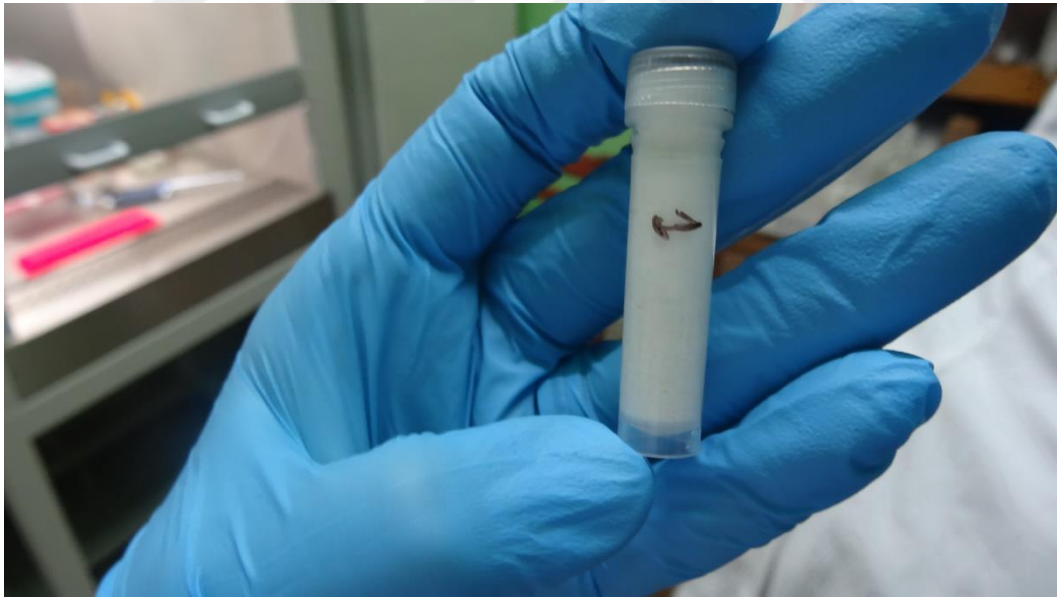
Resim 5.18B. ZR Bashingbead Lysis tüpleri

Bir sonraki basamakta örneğin tüp içeriği ile homojen biçimde karışması için örnekler 30 1/s frekansta 5 dk. süre ile homojenizatöre (Retsch®) yerleştirilmiştir (Resim 5.19).

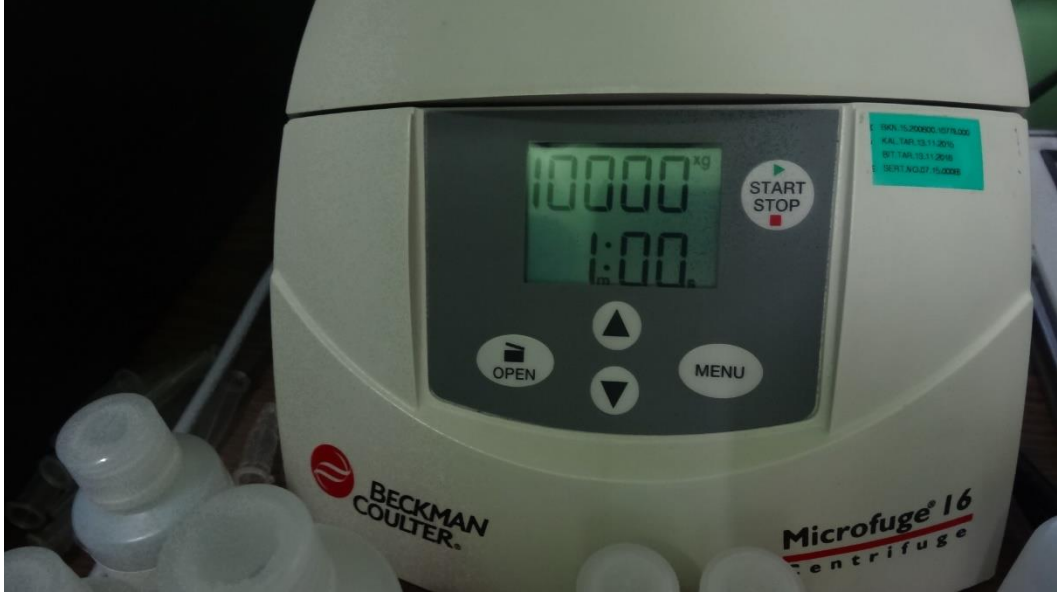


Resim 5.19. Homojenizatör cihazının çalışır durumdaki görüntüsü

Numunelerin köpükleşme durumunu (Resim 5.20A) elimine etmek amacıyla 10000xg frekansta (Microfuge 16 Centrifuge®, Beckman Coulter) 3 dk. süresince santrifüj edilmiştir (Resim 5.20B).



Resim 5.20A. Homojenizatöre konulan tüplerin köpükleşmiş görüntüsü



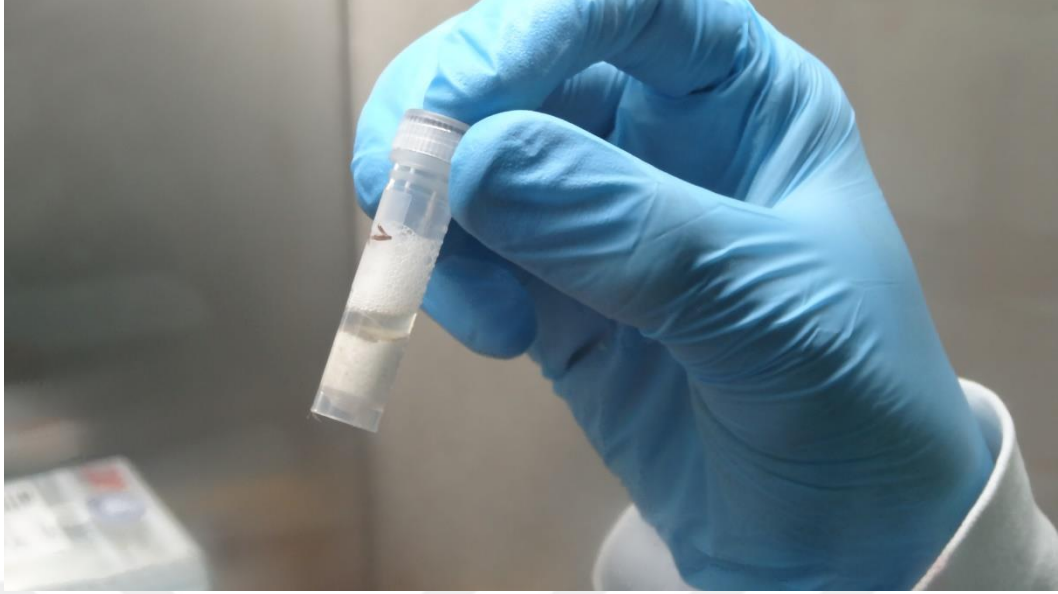
Resim 5.20B. Sentrifüj cihazının çalışır haldeki görüntüsü

Bir sonraki basamakta kullanılacak olan Zymo-Spin™ IV Spin Filter (Turuncu kapaklı tüpler) taban kısmı çıkartıldı ve bir toplama tübüne konulmuştur (Resim 5.21).



Resim 5.21. Zymo-Spin™ IV Spin Filter başlıklarının steril bir toplama tübüne konulması

Sentrifüj cihazından çıkarılan numune tüplerinin (Resim 5.22) *supernatant* kısmı (çökelti üzerinde kalan sıvı kısım) 200 μ l. olacak şekilde bir önceki basamakta hazırlanan Zymo-Spin™ IV Spin Filter'e transfer edilip 8000 x g'de 1 dk. süreyle santrifüj edilmiştir.



Resim 5.22. Sentrifüj cihazından çıkan numune ve Bashingbead karışımı bulunduran tüpün görüntüsü. Bu resimde çökelti ve çökelti üzerindeki kalan kısım net biçimde izlenebilmektedir.

Dördüncü basamakta santrifüj sonucu toplama kabının altında kalan filtrata (Resim 5.23) 1200 µl ZymoBIOMICSTTM DNA Binding Buffer Solüsyonu eklenmiştir.



Resim 5.23. Sentrifüj sonucu toplama kabının altında kalan filtrat görüntüsü

Oluşan 1400 µl.lik karışımın 700 µl.'si mikropipet yardımıyla alınarak DNA yı tutan yeni bir toplama tübü içerisine konulmuştur (Resim 5.24).



Resim 5.24. Oluşturulan solüsyonun yeni ve steril bir toplama tüpüne aktarılması

Filtrenin altında kalan sıvı çöpe atılmış olup ve kalan 700 µl çözelti tekrar filtreye konulup 10.000 x g frekansta 1 dk. süreyle santrifüj edilmiştir.

Yeni ve steril bir toplama tübünün üzerine DNA ihtiva eden Zymo-Spin™ IIIC-Z filtre yerleştirilmiştir. Üzerine 400 µl. ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 1 Yıkama tampon solüsyonu eklenip, 10000 x g'da 1 dk. süreyle santrifüj edilmiştir.

Daha sonra üzerine 700 µl eklenip, tekrar 10000 x g'da 1 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Altta kalan sıvı çöpe atılmıştır. İkincil yıkama işlemi için 200 µl ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 2 filtre üzerine eklenip tekrar 10000 x g'da 1 dk süre ile santrifüj edilmiştir.

Son olarak Zymo-Spin™ IIIC-Z Column filtre 1.5 µl.'lik steril DNase/RNase Free eppendorf tüpe yerleştirilmiştir ve üzerine 50 µl. ZymoBIOMICS™ DNase/RNase Free Water konuldu. (Resim 5.25) 1 dk. inkübasyon için beklendikten sonra (Filtre bu solüsyonla iyice ıslansın diye) 10000 x g'da 1 dk. süreyle santrifüj edilmiştir.



Resim 5.25. 1.5 μ l.'lik steril DNase/RNase Free eppendorf tüp

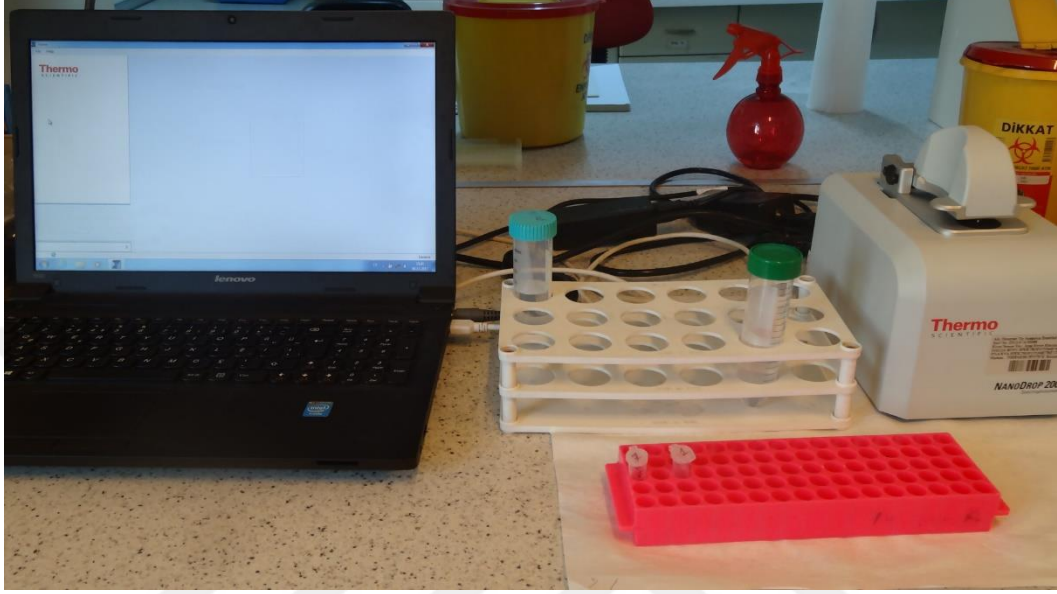
Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter (Yeşil başlıklı) temiz bir toplama tübüne konulmuştur. Bu şekilde 8000 x g'da 3 dk. süreyle santrifüj edilerek altta kalan sıvı çöpe atılmıştır.

Son basamakta hazırlanan DNA içeren sıvı, temiz 1.5 ml'lik toplama tübünün içerisine konulan Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter üzerine aktarılmıştır. Hafifçe kapağı kapatılarak son olarak 8,000 x g frekansta 1 dk. süre ile santrifüj edilmiştir.

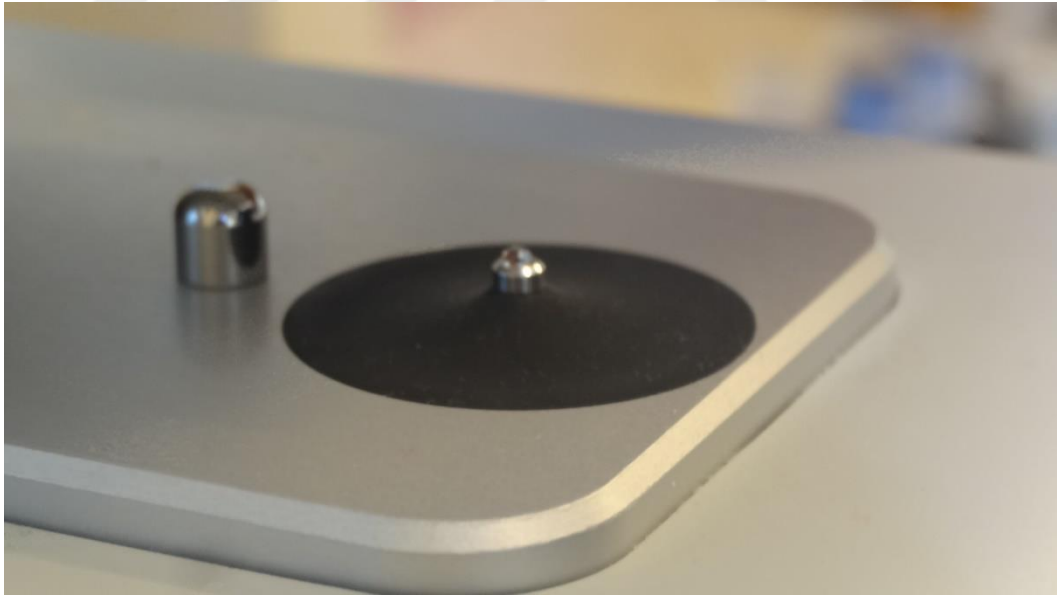


Resim 5.26. Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter (Yeşil başlıklı) görüntüsü

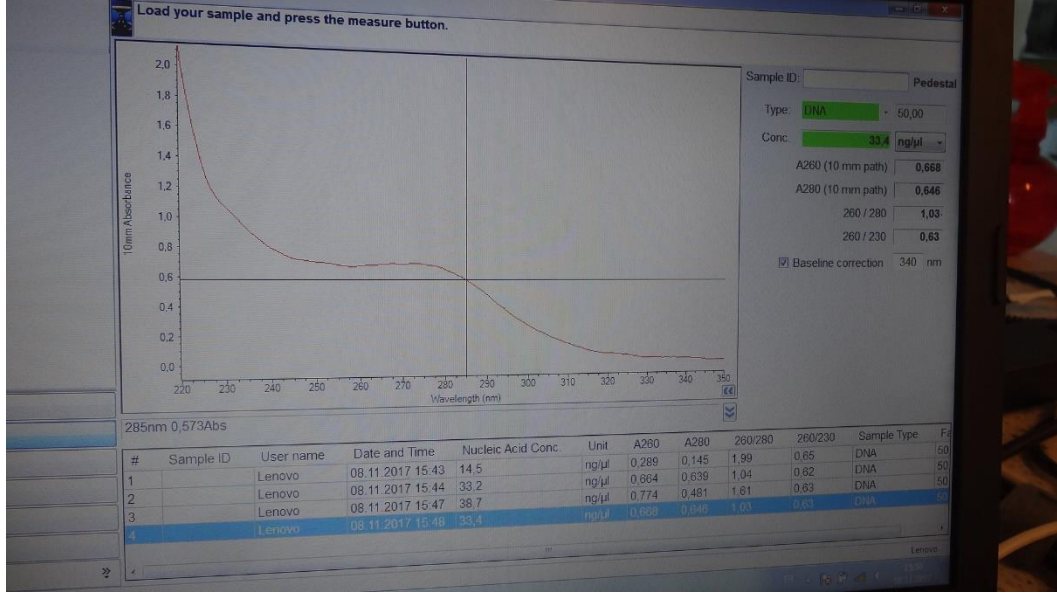
DNA Konsantrasyonunun analizlerinin yapılması için Nanodrop 2000 (Thermo, USA) kullanılmıştır. (5.27A,B) Cihaz öncelikle saf su ile kalibre edilmiştir. Daha sonra 2 μ l'lik DNA solüsyonlarının konsantrasyon ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Resim 5.28).



Resim 5.27A. DNA konsantrasyonunu ölçen cihazın ve programın görüntüsü



Resim 5.27B. 2 μ l solüsyonun cihazın hassas metal detektörüne konulmuş görüntüsü



Resim 5.28. DNA konsantrasyon ölçümü sonrasında ekrandaki sonuç görüntüsü

5.6. Kütüphane Oluşturulması

Numuneler ZymoBIOMICS™ Servis - Hedefli Metagenomik Dizileme ile işlenmiş ve analiz edilmiştir. (ZymoResearch, Irvine, CA).

16S kütüphane hazırlanması: Bakteriyel 16S ribozomal RNA geni hedeflenmiş sekanslama, Quick-16S™ NGS Kütüphane Hazırlık Kiti kullanılarak yapılmıştır (Zymo Research, Irvine, CA). Kullanılan bakteri 16S primerleri, 16S rRNA geninin V3-V4 bölgesini genişletmiştir. Bu primerler, yüksek duyarlılıkla 16S geninin en iyi kapsama alanını sağlamak için Zymo Research tarafından özel olarak tasarlanmıştır. 16S rRNA geninin V3-V4 bölgesini güçlendirirler. Sekanslama kütüphanesi, döngüleri kontrol etmek ve böylece PCR kimera formasyonunu önlemek için real t-PCR makinelerinde PCR reaksiyonlarının gerçekleştirildiği yenilikçi bir kütüphane hazırlama prosesi kullanılarak hazırlandı. Nihai PCR ürünleri, qPCR floresan okumaları ile ölçülerek eşit molariteye dayalı olarak birarada toplanmıştır. Son olarak ortak kütüphane Select-a-Size DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research, Irvine, CA) ile filtrelendi, daha sonra TapeStation® ve Qubit® ile ölçülmüştür.

5.7. NGS Analizi

Dizileme: Son kütüphane Illumina® MiSeq™ üzerinde bir V3 reaktif kiti (600 döngü) ile dizildi. Dizileme >% 10 PhiX ile gerçekleştirilmiştir.

5.8. Ham Datanın biyoinformatik analizi

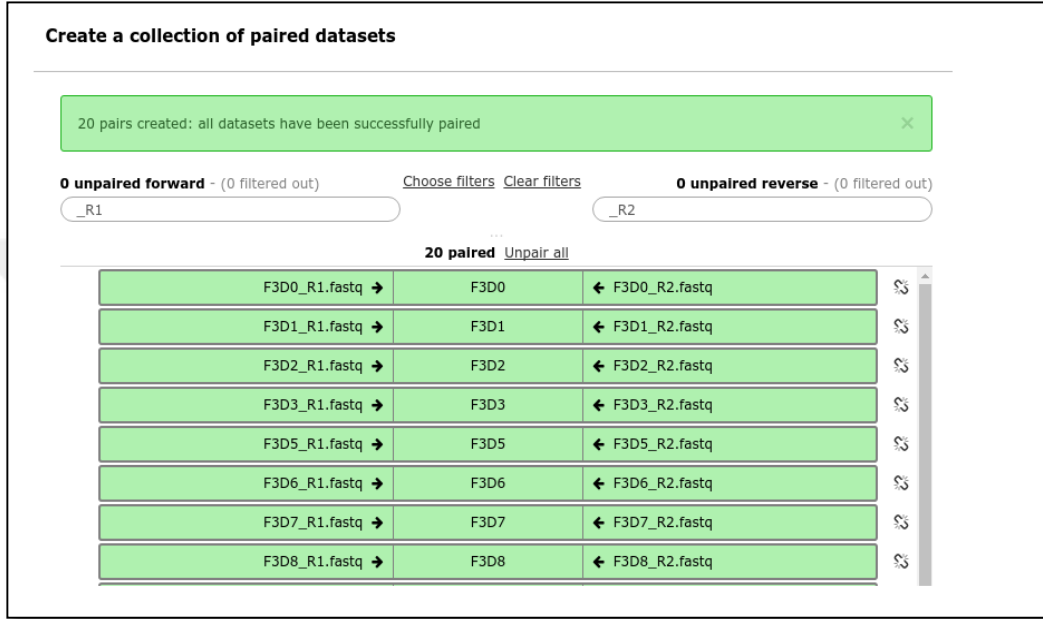
Biyoinformatik analiz usegalaxy.org açık kaynak adresi üzerinden NGS Mothur yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Galaxy yazılımı, Mothur programının araştırmacılar tarafından hatasız biçimde kullanılabilmesi için bir kitapçık yayımlamıştır. 16S rRNA'nın Mothur'da mikrobiyal analizi adlı örnek kitapçığı esas alınarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Mothur yazılım paketinin yaratıcısı olan Galaxy bünyesinde bulunan Schloss laboratuvarı tarafından sunulan Standart Çalışma Prosedürü'nü izleyerek ZymoResearch'ün sağladığı çalışmamızın ham datası Dr. Aris Çakiris ve Arş. Gör. Dt. Zeynep Ceren Çelik tarafından değerlendirildi (Schloss, 2018). Bu analizler aşağıdaki başlık ve altbaşlıklarda gerçekleşmiştir:

1. Verilerin elde edilmesi ve hazırlanması
 1. Girdi verilerinin anlaşılması
 2. Verilerin Galaxy programına aktarılması
2. Kalite kontrolü
 1. Sıralama ve PCR hatalarının sıralanması ve azaltılması
 2. Örnek topluluğa göre hata oranlarının değerlendirilmesi
 3. OTU analizi
 4. Türlerin çeşitliliğini hesaplama
3. Görselleştirme
 1. *Phinch*
 2. *Krona*
4. İlave işlemler
 1. Kümellemelerin istatistiksel anlamlılığını belirleme
 2. Toplum düzeyinde değerlendirme

Galaxy açık-kaynak programında grupların ayrı ayrı değerlendirilmesine olanak veren dört ayrı sayfa oluşturulmuştur. Her bir sayfa'da 13'er verinin değerlendirilmesi amaçlandı. Sisteme tüm içeriği yüklenen ham data, ileri ve geri okuma şeklinde R1 ve R2 uzantılarıyla gelmiş olup, sisteme yüklendikten sonra bu çiftler eşleştirilerek tek bir fasta dosyası haline getirilmiştir.



Şekil 5.1. İleri ve Geri okumaların eşleştirme safhası

Analizin ilerleyen safhalarında kullanılmak üzere, Zenodo programından yüklenebilecek referans URL'ler hesaba yüklenmiştir. Aşamala ilerledikçe kullanım sırası geldiğinde veri kütüphanesinden kolaylıkla elde edilebilecek bu referans dizilerin uzantıları aşağıdaki gibidir:

- ✓ silva.v4.fasta
- ✓ HMP MOCK.v35.fasta
- ✓ mouse.dpw.metadata
- ✓ mouse.time.design
- ✓ trainset9_032012.pds.fasta
- ✓ trainset9_032012.pds.tax

Verilerin sisteme aktarılmasını takiben, kalite kontrolü basamağı olan hatalı okumaların elenmesi/azaltılması gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada verilerin kalitesini

artırmak amacıyla summary.seq sekmesi kullanılarak öncelikle verinin bir özeti çıkartılmıştır.

	Start	End	NBases	Ambigs	Polymer	NumSeqs
Minimum:	1	304	304	0	3	1
2.5%-tile:	1	440	440	0	4	28027
25%-tile:	1	443	443	0	4	280266
Median:	1	460	460	0	5	560531
75%-tile:	1	465	465	1	6	840796
97.5%-tile:	1	465	465	15	7	1093034
Maximum:	1	602	602	150	281	1121060
Mean: 1	456.903	456.903	1.78196	5.23803		
# of Seqs:		1121060				
Output File Names:						
fasta.summary						
It took 41 secs to summarize 1121060 sequences.						

Şekil 5.2. Özet (*summary seq*) ekranı görüntüsü

Bu ekran görüntüsü 13 numunenin toplamdaki okuma sayısını ve bu okumalar sırasındaki istatistiki bilgilerini sunmaktadır. 1.121.060 sekansın 41 saniye gibi kısa bir sürede okunduğu ve değerlendirildiği bu programda minimum baz ve maksimum baz sayıları sırasıyla 304 ve 602'dir. Maksimum olarak okunan değer ortalama değerlerin oldukça üzerindedir, program bu veriyi şüphe uyandırıcı olarak kabul etmekte ve bir sonraki okumalarda bu hatalı verinin elenmesini önermektedir. Bir sonraki adım olan run screen.seqs, filter.seq sekmeleri veri içerisinde abartılı ve hatalı baz okumalarının en aza indirgenmiş biçimde değerlendirme yapmaya olanak vermektedir.

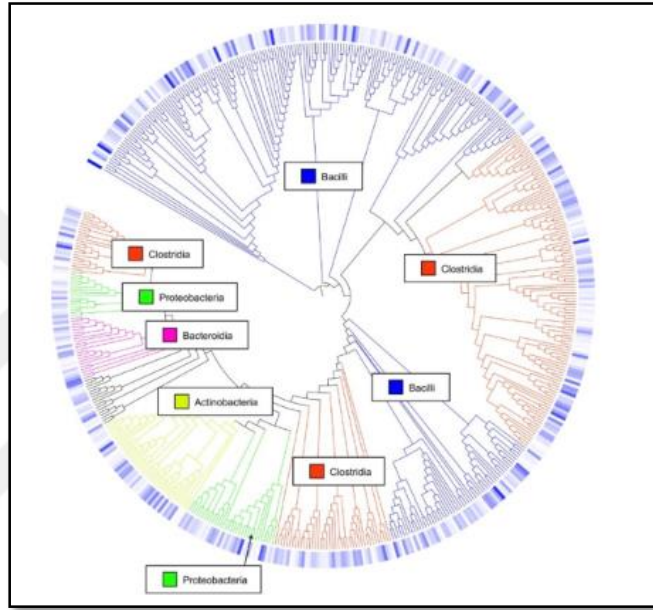
“maxlength” parameter to 275

Bir sonraki basamakta, birbirinin kopyası olan sekansların elenmesi amaçlanmıştır. bir numune içerisinde oldukça fazla miktarda aynı bakteriden buluabildiği için yazılımsal olarak zaman kayıplarına neden olabileceği için unique.se sekmesi birbirinin duplikesi olan sekansları ortadan kaldırmıştır. Takip eden diğer basamaklardan sonra “bakteri olmayan sekansların çıkarılması” Kalite kontrolü aşamasının en son adımıdır.

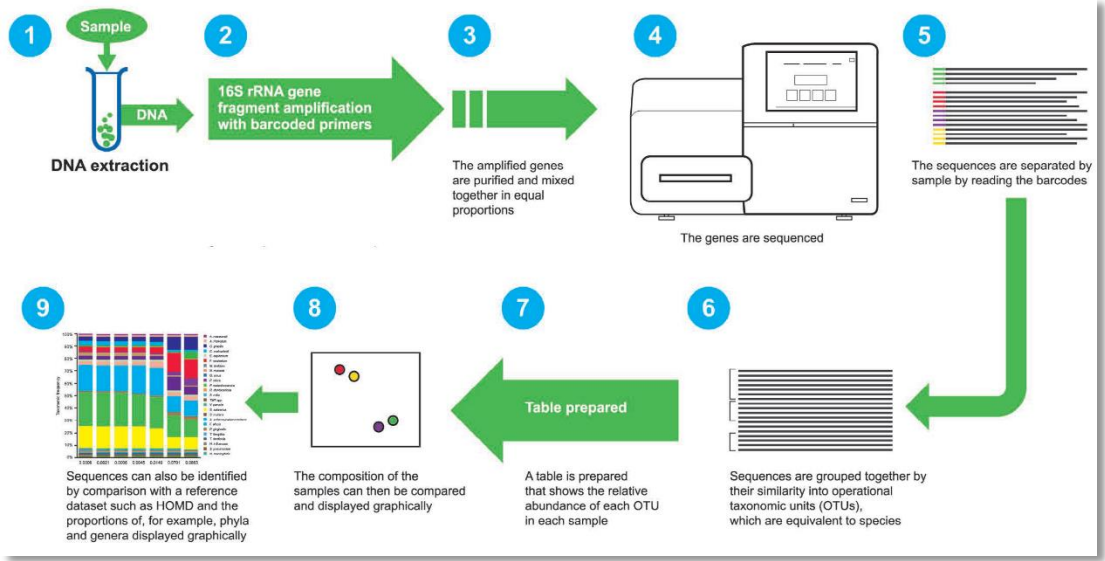
Bu aşamada veri kümemizde “istenilmeyen sekans” örneğin: 18S rRNA gen fragmanları ya da arkea, kloroplast yada mitokondriyel 16S rRNA'lar olup olmadığını

tespit etmek ve onların ayıklanması amacıyla kullanılmıştır. Kalan verinin örnek toplum (mock community) ile uyumluluğuna bakarak bir sonraki adımda hata payları hesaplanmıştır.

Tüm mikroorganizmalar, bilinen 16S rRNA genler veri tabanlarında bulunmayabilir. Birbirine oldukça benzer sekanslar, operasyonel takson üniteleri (OTU) olarak gruplanarak genellikle %97 benzerlik cins düzeyinde, %98-99 benzerlik suş düzeyinde ayırma gidilmesi için bir eşik değerdir. Çalışmamızda, ham data OTU kümelenmesi basamağına tabi tutulmuştur.



Şekil 5.3. OTU kümelenmesi basamağı sonrası elde edilen şematik görüntü (Danzeisen ve ark, 2013, 10.7717/peerj.237)



Şekil 5.4. Çalışmamızda izlenen adımların şematik olarak gösterilmesi (Kilian ve ark, 2016)

1. DNA izolasyonu;
2. Belirli primerlerle 16S rRNA gen fragmanı amplifikasyonu;
3. Amplifiye edilmiş genler saflaştırıldı ve eşit ölçülerde karıştırılmıştır.
4. Gen dizileme işlemi gerçekleştirilmiştir;
5. Diziler birbirinden ayrıştırılmıştır;
6. Aynı türler olduğunu gösteren benzerliklerine göre operasyonel taxonomik ünite (OTU) şeklinde gruplanmıştır;
7. Her bir örnek içerisinde ne kadar miktarda OTU olduğunu gösteren tablolar elde edilmiştir;
8. Örneklerin kompozisyonu grafik şeklinde gösterilebilir hale getirilmiştir;
9. Diziler HOMD verileri ile karşılaştırılmalı olarak filus ve genera bakımından ayrıntılı olarak görselleştirilmiştir.

5.9. İstatistiksel Analiz

. İstatistik analizler Dr. Can Ilgın tarafından yapılmıştır. İstatistik analizlerde STATA 15.1 yazılımı kullanılmış olup; $p < 0,05$ (Bonferroni düzeltmeleri hariç olmak üzere) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Kategorik değişkenler arası ilişkilerin değerlendirilmesinde Pearson Ki-Kare, Fisher testleri uygulanmıştır.

Dağılımı normallik yönünden değerlendirmek için Histogram, Kolmogorov-Smirnov, Q-Q Plot testleri, Shapiro-Wilk, Skewness-Kurtosis testleri uygulanmıştır.

Veri dağılımları normal (parametrik) bulunmadığı için ikiden fazla grubun değerlendirilmesinde Kruskal Wallis, gruplararası post-hoc analizler için Mann-Whitney U testleri uygulanmıştır.

Kruskal Wallis testi için p anlamlılık düzeyi grup sayısına göre $0,05/4=0,0125$ olarak yeniden belirlenerek istatistiksel açıdan anlamlılık incelenmiştir. İki grup arasındaki karşılaştırmalarda Mann Whitney U testleri uygulanmış olup $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen 52 bireyin 33'ü kadın 19'u erkek bireylerden oluşmaktadır. Tüm hastaların yaşları 18-50 arasında değişmekte olup, yaş ortalaması $26,4 \pm 8,4$ 'tür. Yaş değerlerinin dağılımını incelemek amacıyla testleri sırasıyla uygulanarak, verilerin non-parametrik dağıldığı tespit edildi. Bu tespit doğrultusunda, median değerler Tablo 6.1'de gösterilmiştir.

Tablo 6.1. Gruplara ait yaşların median değerleri

Grup	N	Yaş (ortanca değer)
1	13	27
2	13	26
3	13	22
4	13	23
Toplam	52	23.5

Bireylerin demir eksikliği durumları değerlendirildiğinde, siyah lekeli hastalardan oluşan 1. Grup (%61,5) ve 2. Grup (%76,9)'de 3. Grup (%15,3) ve 4. Grup (%0) bireylerinden istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha fazla demir eksikliği bulunduğu saptanmıştır ($p<0.001$). Buna ek olarak demir eksikliği görülen bireylerin %90'ında demir takviyesi ilaçları kullanımı tespit edilmiş; demir eksikliği olmayan gruplar ile anlamlı farklılık bulunmuştur. ($p=0.003$; $p<0.001$)

Diş fırçalama alışkanlıklarına göre değerlendirildiğinde, hastalar, hiç/seyrekle, günde 1 defa, günde 2 defa veya günde 3 defa cevaplarını vermişlerdir. (Tablo 6.2)

Tablo 6.2. Gruplara göre diş fırçalama sıklığı ve yüzdeleri

	Hiç /Seyrek	Bir defa	İki defa	Üç defa
1. Grup	4 (%30,8)	7 (%53,8)	2 (%15,4)	0
2. Grup	8 (%61,5)	3 (%23,1)	2 (%15,4)	0
3. Grup	0 (%0)	2 (%15,4)	10 (%76,9)	1 (%7,7)
4. Grup	7 (%53,8)	6 (%46,2)	0 (%0)	0 (%0)

Bu sonuçlara göre lekeli çürüksüz hastaların çoğunluğu (%53,8) dişlerini bir kez fırçalarken, siyah lekesiz ve çürüksüz hastalar günde 2 defa fırçalamaktadır. Bu sonuçlar verilen diğer cevaplara göre anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Buna ek olarak lekeli ve çürükleri olan hastaların büyük bir çoğunluğu dişlerini seyrek fırçalarken, lekesiz ve çürük hastalarda günde 1 defa ve seyrek fırçalayan hastalar birbirine benzer oranlarda bulunmaktadır.

Hastaların sigara içme alışkanlıkları değerlendirildiğinde, tüm hastaların %78,8'inin sigara kullanmadığı, ve bu sigara kullanan 11 hastanın 7'sinin, büyük çoğunluğunun, lekesiz ve çürüksüz hasta grubundan olduğu tespit edilmiştir. Lekesiz ve çürüklü 4. Grup hastalarda sigara içme alışkanlığı diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0,021$; $p<0,05$). Gruplar lekeli ve lekesiz olarak toplu olarak değerlendirildiğinde sigara içme alışkanlığının anlamlı fark göstermediği ($p=0,09$), ancak çürüksüz ve çürüklü olarak değerlendirildiğinde çürüklü hastalarda sigara içme alışkanlığının anlamlı düzeyde yüksek bulunduğu tespit edilmiştir ($p=0,017$).

Hastaların beslenme alışkanlıkları değerlendirildiğinde, çürük varlığından bağımsız olarak lekeli ($n=26$) ve lekesiz ($n=26$) hastalarda sırasıyla, sakatat (1 porsiyon), maydanoz (1 demet), ıspanak (1 porsiyon), pekmez (4 yemek kaşığı), baklagiller (6 yemek kaşığı), kabak çekirdeği (1 avuç), midye (4 ve daha fazla), bitter çikolata (100 mg.), çay (2 bardak), kahve (2 fincan), kuruyemiş (1 avuç) şeklinde

demirden zengin gıdaların tüketimi sorgulanmıştır Sakatat tüketimi lekeli hastalarda anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur ($p=0.027$).

Buna ek olarak midye'nin ayda bir kez tüketimi de lekesiz hastalarda (%87,5), lekeli hastalara (%12,5) oranla daha yüksek bulunmuştur ($p=0,005$). Ancak, lekeli hastalarda çay ve kahve tüketiminin de lekesiz hastalarla kıyaslandığında anlamlı ölçüde yüksek olduğu saptanmıştır ($p_{\text{çay}}=0,05$; $p_{\text{kahve}}=0,002$).

Siyah lekelerin ne kadar süre içerisinde oluştuğuna yönelik analizde bireylerin daha önceden diştaşı temizliği yaptıırıp yaptırmadığı ve bu siyah lekelerin tekrar ne kadar sürede oluştuğu sorgulandı. Verilen cevaplar parametrik dağılmadığı için ortanca değerler karşılaştırılmıştır. Buna göre, daha önce diştaşı temizliği yaptırmış olan SL'li ve çürüksüz hastalar 6 ay, SL'li ve çürüklü hastalar 12 ay süre ile bu lekelerin tekrar oluştuğunu bildirmişlerdir (Tablo 6.3). Çürük varlığının siyah leke oluşumunu geciktirdiği gözlenmektedir.

Tablo 6.3. Diş taşı temizliği takiben siyah leke oluşma süresi

	N	p50 (ay)	iqr (ay)	P25 (ay)	P75 (ay)	Min. (ay)	Maks. (ay)
SL- çürüksüz	13	<u>6</u>	42	6	48	1	72
SL- çürüklü	13	<u>12</u>	6	6	12	1	60

Hastaların çürük durumları ICDAS II kriterlerine göre teşhis edilmiş ve kaydedilmiştir. Çürük sayılarının normal bir dağılım göstermemesi nedeniyle, ortanca değerler esas alınarak istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir (Tablo 6.4). Bu sonuçlara göre siyah lekeli hastalarda görülen ortalama 13 dişte çürüksüzlük (ICDAS 0,1,2) lekesiz bireylerin 7 dişte çürüksüzlük durumu, siyah lekeli hastalarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek sayıda ICDAS 0,1,2 görüldüğünü ortaya koymuştur ($P= 0,007$; $p<0,05$)

Tablo 6.4. Siyah lekeli ve lekesiz ağızlarda ICDAS 0, 1, 2 kodlu dişlerin sayısı

	SL'li (1. Grup ve 2. Grup)	Lekesiz (3. Grup ve 4. Grup)
	<i>Diş sayısı</i>	<i>Diş sayısı</i>
N	26	26
p50*	13	7
iqr	7	9
p25	9	2
p75	16	11
min	3	0
maks	28	21

*p50 ortanca değeri göstermektedir.

Buna ek olarak siyah lekeli olan 1. Grup ve 2. Grup bireylerinin toplam 365 adet posterior (küçük azı ve büyük azı toplamı) dişleri ICDAS II kriterlerine uygun şekilde incelenmiştir. ICDAS 0,1 ve 2 kodlu dişler çürüksüz, ICDAS 3,4,5 ve 6 kodlu dişler ise çürüklü olarak kabul edilmiştir. Aynı ağızlarda siyah lekeli ve lekesiz dişler bu değerlendirmeye tabi tutularak sayıları kaydedilmiştir. SL'li toplam 164 dişin %18,2'si ICDAS 3, 4, 5 ve 6 koduna sahipken, lekesiz hastaların %43,2'si ICDAS 3,4,5 ve 6 kodlu olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda SL'li bireylerin arka dişlerinde aktif ve ileri derecede çürük bulunma olasılığı lekesiz ağızlara oranla anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (p=0,0011).

Tablo 6.5. SL'li ve lekesiz posterior dişlerin ICDAS 0, 1, 2 ve ICDAS 3, 4, 5, 6 kodları

	SL	SL	Lekesiz	Lekesiz
	ICDAS 0,1,2	ICDAS 3,4,5,6	ICDAS 0,1,2	ICDAS 3,4,5,6
p50	5	1	4	3
Ort ± SS*	5,36 ± 4,33	1,21 ± 1,47	4,56 ± 4,42	3,48 ± 2,68
Toplam diş sayısı	134	30	114	87

* Ort ± SS: Ortalama ± Standart Sapma

Nükleik asitler ve proteinler sırasıyla 260 ve 280 nm dalga boyunda maksimum absorbans özelliğine sahiptir. Tarihsel olarak, bu dalga boylarındaki absorbans oranı, hem nükleik asit hem de protein ekstraksiyonlarında bir saflık ölçüsü olarak kullanılmıştır. ~ 1.8'lik bir oran genellikle DNA için “saf” olarak kabul edilir; ~ 2.0 oranı genellikle RNA için “saf” olarak kabul edilir. Bu değerlere yakın değerler de kullanılan metodun kesinlik ve doğruluk oranlarına paralel olarak doğru sonuçlar vermektedir. Buna ek olarak DNA'nın inceleme yapılabilmesi için yeterli konsantrasyonu 30 ng/µl olmalıdır (William ve ark, 1997)

Bu çalışmada elde edilen tüm plak numunelerinin DNA izolasyonları tek bir araştırmacı Dr. Sayın Aris Çakiris tarafından İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü Genom Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Hastalara uygulanan anketler ve klinik ve radyolojik muayene sonucu teşhis edilen çürük durumları yukarıda belirtildiği gibi sonuçlar vermiştir. 1. Grup (1-13 kodlu hastalar), 2. Grup (14-26 kodlu hastalar), 3. Grup (27-39 kodlu hastalar), 4. Grup (40-52 kodlu hastalar) toplanan supragingival plak örneklerine dair DNA konsantrasyonları sırasıyla Tablo 6.6-6.9'da gösterilmiştir.

Tablo 6.6. 1. Grup bireylerinden alınan numunelerin DNA konsantrasyonları

Numune No	İzolasyon tarihi	ng/µl	260/280 nm	260/230 nm
1	2.02.2018	36,6	1,78	1,69
2	21.11.2017	58,8	1,7	1,15
3	21.11.2017	118,8	1,81	1,8
4	10.11.2017	109,5	1,86	2,07
5	10.11.2017	97,3	1,78	1,67
6	10.11.2017	67,8	1,71	1,3
7	10.11.2017	41,3	1,77	1,48
8	10.11.2017	68,4	1,79	1,8
9	2.02.2018	50,8	1,79	1,23
10	18.12.2017	64,4	1,67	1,54
11	9.01.2018	132,7	1,82	1,39
12	9.01.2018	48,1	1,76	1,24
13	9.01.2018	45	1,74	1,33

Tablo 6.7. 2. Grup bireylerinden alınan numunelerin DNA konsantrasyonları

Numune No	İzolasyon tarihi	ng/µl	260/280 nm	260/230 nm
14	18.12.2017	117,3	1,79	2,15
15	18.12.2017	58,8	1,69	1,79
16	9.01.2018	26,2	1,63	1,09
17	9.01.2018	59,4	1,8	1,33
18	9.01.2018	61,6	1,82	1,47
19	2.02.2018	48,4	1,81	1,69
20	2.02.2018	73,9	1,8	1,94
21	2.02.2018	66,9	1,75	1,15
22	6.03.2018	58,5	1,78	1,39
23	6.03.2018	49,4	1,72	1,38
24	7.03.2018	95,9	1,75	1,44
25	7.03.2018	53,6	1,71	1,24
26	17.03.2018	90,8	1,74	1,54

Tablo 6.8. 3. Grup bireylerinden alınan numunelerin DNA konsantrasyonları

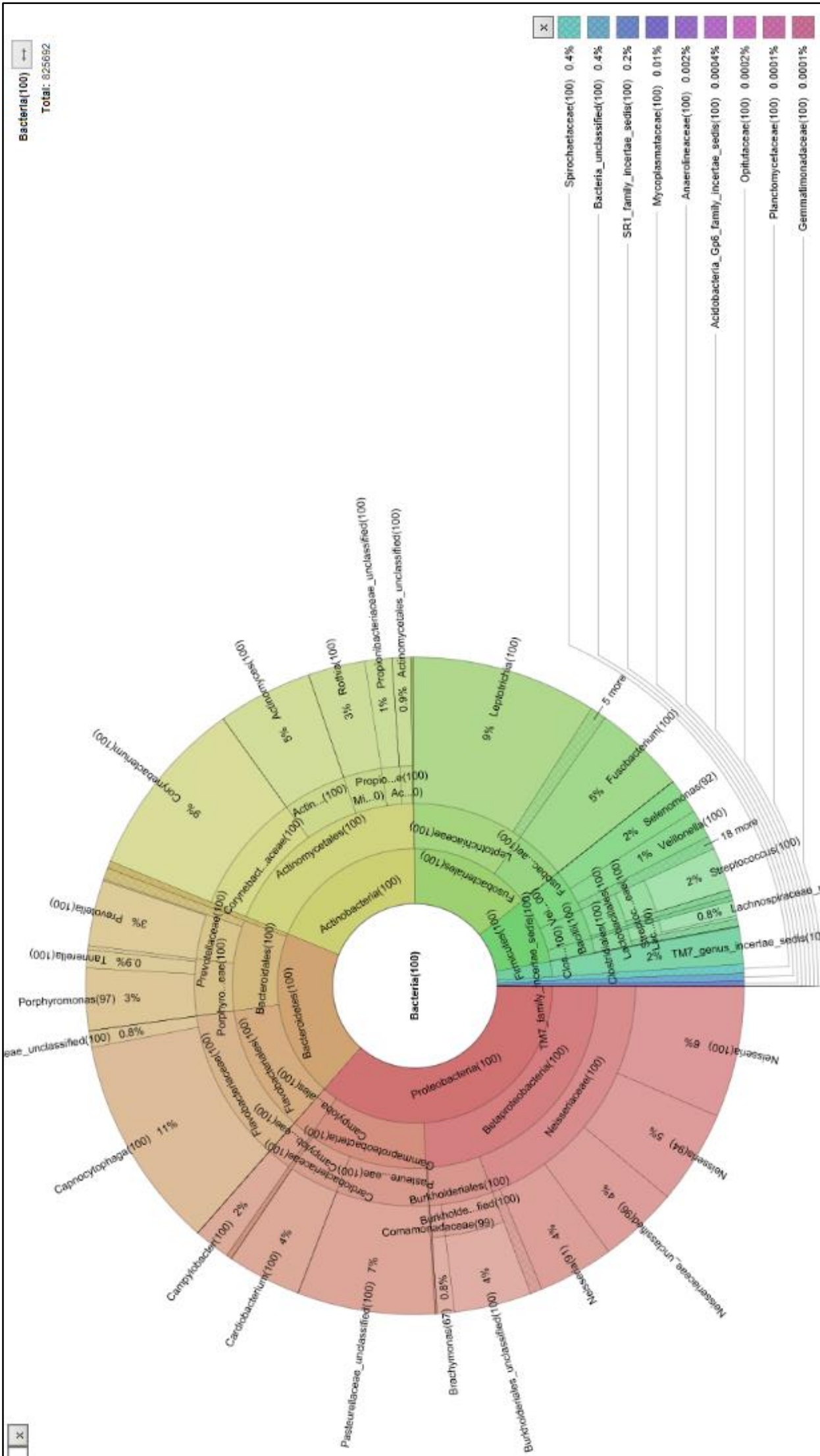
Numune No	İzolasyon tarihi	ng/µl	260/280 nm	260/230 nm
27	21.11.2017	132	1,81	1,88
28	18.12.2017	32,2	1,59	1,81
29	18.12.2017	63,4	1,77	1,74
30	2.02.2018	99,6	1,75	1,46
31	6.03.2018	38,1	1,61	1,12
32	6.03.2018	46,3	1,85	1,74
33	7.03.2018	135,8	1,78	1,75
34	7.03.2018	84,7	1,77	1,43
35	7.03.2018	107,1	1,79	1,66
36	7.03.2018	91,3	1,57	0,52
37	7.03.2018	56,2	1,63	0,4
38	17.03.2018	60,1	1,79	1,76
39	17.03.2018	48,2	1,78	0,43

Tablo 6.9. 4. Grup bireylerinden alınan numunelerin DNA konsantrasyonları

Numune No	İzolasyon tarihi	ng/ μ l	260/280 nm	260/230 nm
40	9.04.2018	132,5	1,86	1,23
41	17.03.2018	140	1,82	2,06
42	17.03.2018	162,1	1,79	1,86
43	17.03.2018	126,5	1,79	1,91
44	17.03.2018	98,6	1,79	1,13
45	9.04.2018	199,6	1,82	1,18
46	9.04.2018	87,6	1,86	1,85
47	9.04.2018	205,4	1,81	1,83
48	9.04.2018	99,1	1,81	1,74
49	9.04.2018	141,1	1,79	1,5
50	9.04.2018	277,7	1,81	2,07
51	9.04.2018	256,2	1,85	0,66
52	9.04.2018	201,6	1,8	1,98

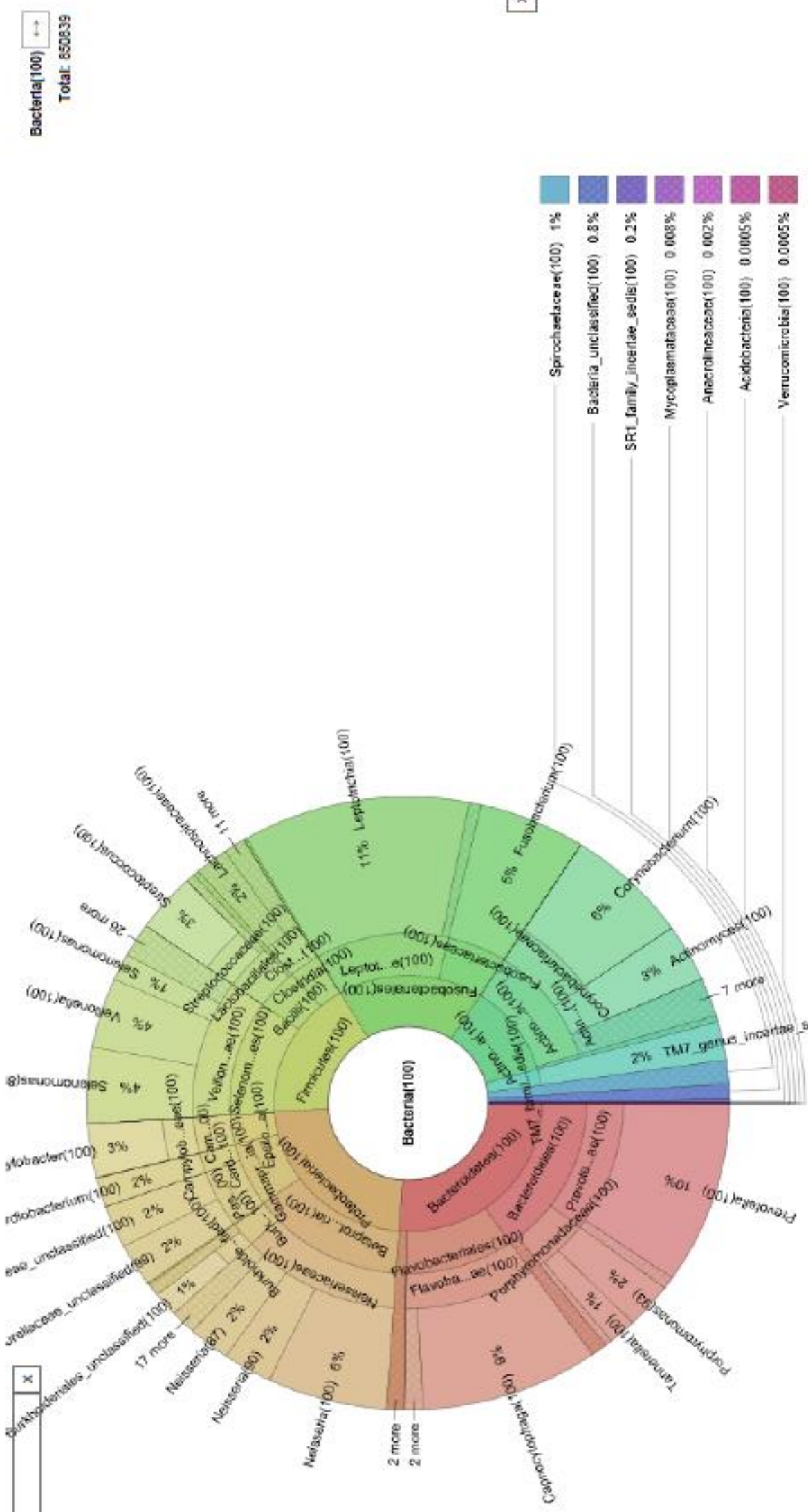
Galaxy.use açık kaynak programında gerçekleştirilen biyoinformatik analiz sonucunda elde edilen Krona-Pie-Chart görselleri 1. Grup, 2. Grup, 3. Grup ve 4. Grup bireylerinde ortak bulunan bakterileri göstermektedir. Sırasıyla Şekil 6.1-6.4'te gösterilen program ekran görüntüleri, bakteriyel çeşitliliği 6. basamak olan *cins* düzeyinde göstermektedir. Program, bu analizi Alem, Bölüm, Sınıf, Takım, Familya ve Cins düzeyinde yapabilme imkanı tanımaktadır.

Şemanın en dış bölgesinde grupların ortalama bakteri yüzdeleri cins düzeyinde izlenebilmektedir. Bunun dışında %0,001 ve daha düşük yüzdelerde bulunan bakteri cinsleri ise ayrıca bir uzantıyla ekranın sağ alt bölgesine listelenmiştir. Nadir görülen bu bakteriler sayıca 1-10 arasında değişmekte olup flora bakterisi olmaktan ziyade çevresel etkilerle plak içerisine dahil olmuş bakteriler olabilmektedir.



Şekil 6.1. 1. Grup bireylerine ait biyofilimde biyoinformatik analiz sonucu ortak bulunan bakterilerin Krona-Pie-Chart görseli.

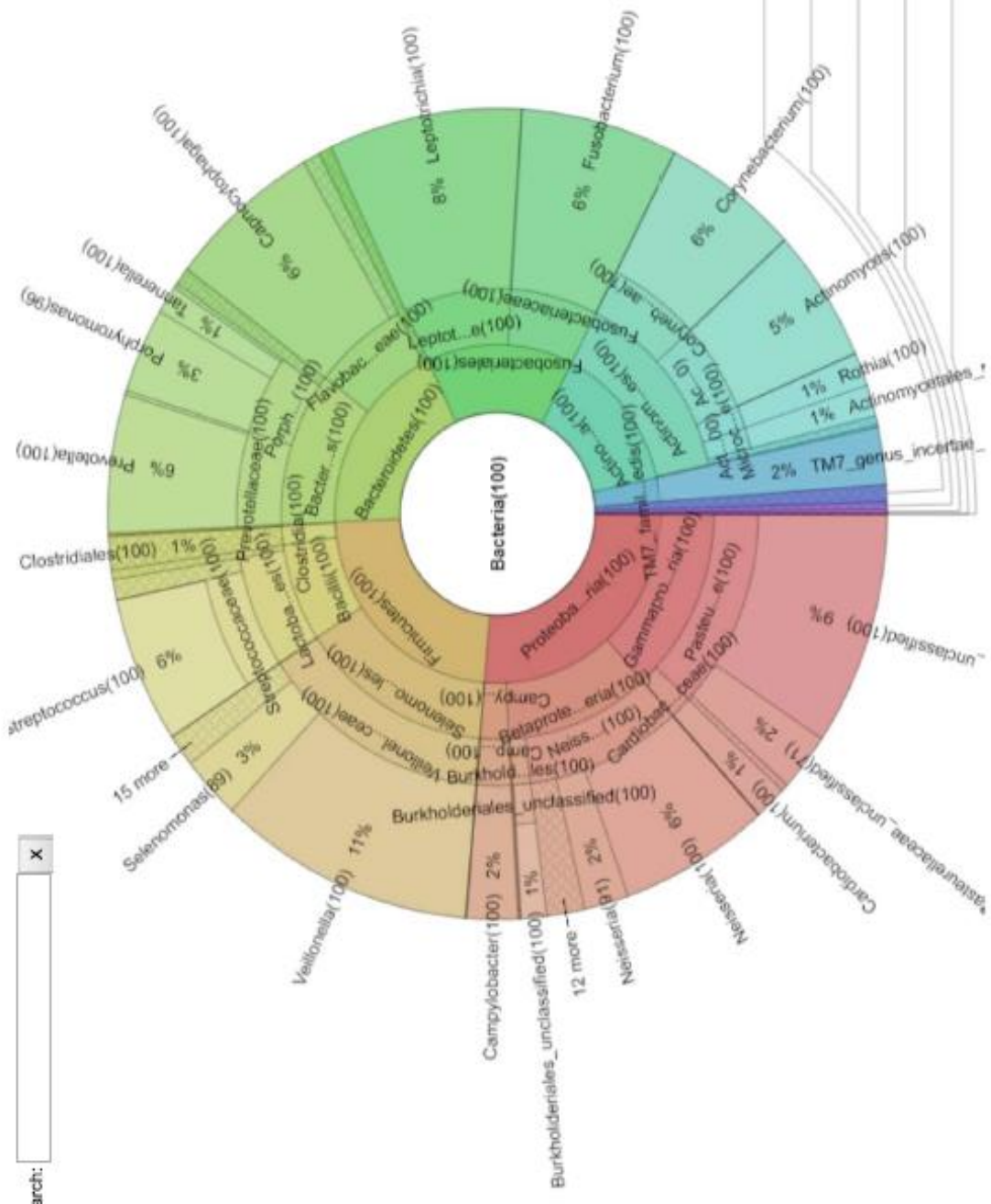
Şekil 6.1’de görüldüğü üzere 1. Gruba dahil 13 hastanın örneklerinde toplamda **825.823 bakteri** ve **165 çeşit farklı bakteri cinsi** tespit edilmiştir. Ortak bakterilerin örneklerdeki yüzdelik değerleri küçükten büyüğe sıralanmış ve ortanca değerler şekildedeki gibi görselleştirilmiştir.



Şekil 6.2. 2. 2. Grup bireylerine ait biyofilimde biyoinformatik analiz sonucu ortak bulunan bakterilerin *Krona-Pie-Chart* görseli.

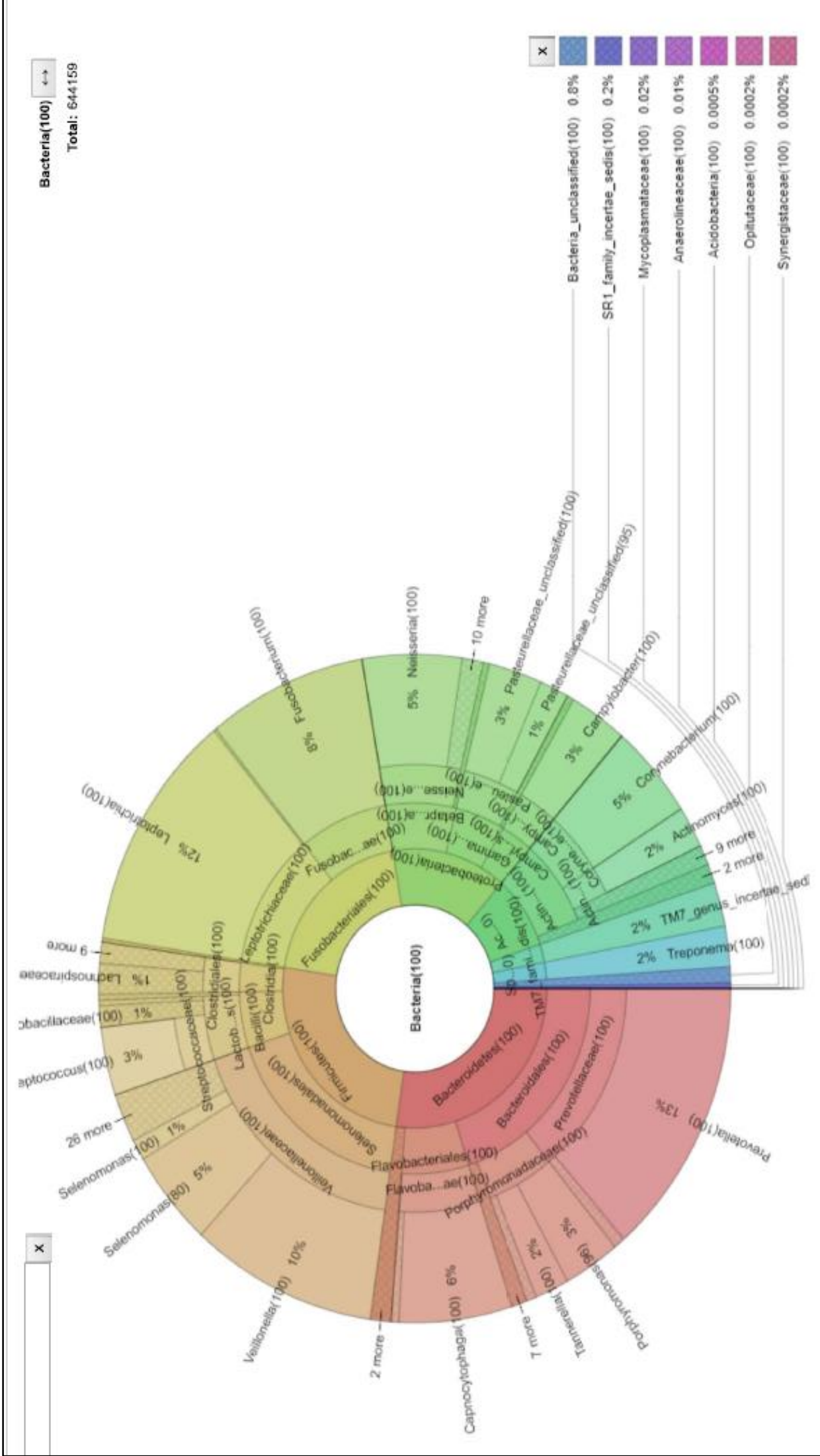
.Siyah lekeleri olan ve çürüklü bireylerden oluşan **2. Grup bireylerde** toplamda **851.137 bakteri** ve **168 çeşit farklı bakteri cinsi** tespit edilmiştir. Her bir hastada bulunan bakteri sayılarının 1. Grup'de olduğu gibi yüzdelik oranları sıralanarak ortanca değerler elde edilmiş ve görselde *Krona-Pie-Chart* görüntüsü elde edilmiştir.

Bacteria(100)
Total: 718448



Şekil 6.3. 3. Grup bireylerine ait biyofilmden biyoinformatik analiz sonucu ortak bulunan bakterilerin *Krona-Pie-Chart* görseli.

Şekil 6.3'te izlenen ekran görüntüsü **3. Grup bireylerine ait biyofilmden** bulunan ortak bakterileri göstermektedir. Buna göre 27-39 kodlu 13 hastanın örneklerinde toplamda **718.834 bakteri** ve **142 çeşit farklı bakteri cinsi** tespit edilmiştir. Ortak bakterilerin örneklerdeki yüzdelik değerleri küçükten büyüğe sıralanmış ve ortanca değerler şekildeki gibi görselleştirilmiştir.



Şekil 6.4. 4. Grup bireylerine ait biyofilimde biyoinformatik analiz sonucu ortak bulunan bakterilerin *Krona-Pie-Chart* görseli.

Lekelesiz ve çürüklü bireylerden oluşan **4. Grup bireylerde** toplamda **644.683 bakteri** ve **161 çeşit farklı bakteri cinsi** tespit edilmiştir. Her bir hastada bulunan bakteri sayılarının diğer gruplarda olduğu gibi yüzdelik oranları sıralanarak ortanca değerler elde edilmiş ve görselde *Krona-Pie-Chart* görüntüsü elde edilmiştir.

Tablo 6.10. 1. Grup ve 2. Grup arasında anlamlı düzeyde farklılık gösteren bakteriler

Bakteri ismi	1. Grup (p50 - %)*	2. Grup (p50 - %)	p
<i>Actinomycetaceae_unclassified</i>	0	0,036	0.0011
<i>Atopobium</i>	0	0,012	0.0031
<i>Bacteroidales_incertae_sedis</i>	0	0,004	0.0028
<i>Bactinomycetaceae_unclassified</i>	0,0035	0	0.0000
<i>Burkholderiales_unclassified</i>	2,038	1,19	0.0257
<i>Cardiobacterium</i>	3,6	1,8	0.0052
<i>Centipeda</i>	0	0,01	0.0003
<i>Clostridiales_unclassified</i>	0,12	0,42	0.0038
<i>Coriobacteriaceae_unclassified</i>	0	0,00142	0.0338
<i>Dialister</i>	0,046	0,156	0.0096
<i>Howardella</i>	0	0,00166	0.0140
<i>Megasphaera</i>	0	0,39	0.0015
<i>Mogibacterium</i>	0	0,008	0.0004
<i>Neisseriaceae_unclassified</i>	3,01	0,92	0.0149
<i>Olsenella</i>	0,02	0,17	0.0272
<i>Peptostreptococcus</i>	0,0049	0,058	0.0252
<i>Prevotella</i>	2,2	8,69	0.0006
<i>Propionibacteriaceae_unclassified</i>	1,14	0,48	0.0027
<i>Rothia</i>	1,72	1,106	0.0149
<i>Scardovia</i>	0	0,00166	0.0499
<i>Schwartzia</i>	0	0,0066	0.0040
<i>Selenomonas</i>	1,42	4,88	0.0011
<i>Shuttleworthia</i>	0	0,0043	0.0067
<i>Solobacterium</i>	0,0027	0,0162	0.0048

*p50 - %: Bireylerin biyofilmlerindeki bakteri yüzdelerinin ortanca değerleri

1. Grup'taki siyah lekeli ve çürüksüz hastalar ile 2. Grup'deki siyah lekeli ve çürüklü hastaların biyofilmlerinde bulunan farklı bakterileri Tablo 6.10'da gösterilmiştir. Çıkan sonuçlara göre, siyah lekeli hastalarda çürüklerden başlıca sorumlu olabilecek bakteriler *Actinomycetaceae_unclassified*, *Atopobium*, *Bacteroidales_incertae_sedis*, *Centipeda*, *Clostridiales_unclassified*, *Coriobacteriaceae_unclassified*, *Dialister*, *Howardella*, *Megasphaera*, *Mogibacterium*, *Olsenella*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Scardovia*, *Schwartzia*, *Selenomonas*, *Shuttleworthia*, *Solobacterium* olarak sıralanabilir. Diğer taraftan çürük oluşumunu engeleyen ve siyah lekeye neden olabilecek bakteriler şöyle sıralanabilir: *Bactinomycetaceae_unclassified*, *Burkholderiales_unclassified*, *Cardiobacterium*, *Neisseriaceae_unclassified*, *Propionibacteriaceae_unclassified*, *Rothia*. Bu bakterilerin arasında *Bactinomycetaceae_unclassified* yalnızca çürüksüz ve lekesiz grupta bulunmaktadır.

Tablo 6.11. 1. Grup ve 3. Grup arasında anlamlı düzeyde farklılık gösteren bakteriler

Bakteri ismi	1. Grup (p50 - %)	3. Grup (p50 - %)	p
<i>Actinomycetaceae_unclassified</i>	0,0025	0	0.0004
<i>Bacteroidales_unclassified</i>	0,052	0,39	0.0023
<i>Bactinomycetaceae_unclassified</i>	0,0035	0	0.0000
<i>Bergeriella</i>	0,0015	0	0.0351
<i>Brachymonas</i>	0,32	0,004	0.0360
<i>Burkholderiales_unclassified</i>	2,038	0,68	0.0071
<i>Capnocytophaga</i>	10,58	6,38	0.0014
<i>Cardiobacterium</i>	3,6	1,2	0.0006
<i>Comamonadaceae_unclassified</i>	0,076	0,0138	0.0192
<i>Corynebacteriaceae_unclassified</i>	0,02	0,0138	0.0483
<i>Granulicatella</i>	0,02	0,13	0.0032
<i>Haemophilus</i>	0,0094	0,23	0.0001
<i>Kingella</i>	0,4	0,74	0.0061
<i>Leptotrichiaceae_unclassified</i>	0,067	0,0072	0.0001
<i>Mannheimia</i>	0,00124	0	0.0093
<i>Mogibacterium</i>	0	0,002	0.0126
<i>Neisseriaceae_unclassified</i>	3,01	0,37	0.0001
<i>Pasteurellaceae_unclassified</i>	5,83	10,4	0.0428
<i>Propionibacteriaceae_unclassified</i>	1,14	0,14	0.0001
<i>Propionibacterium</i>	0,0094	0,0037	0.0111
<i>Rothia</i>	1,72	0,64	0.0293
<i>Streptococcus</i>	2,05	5,6	0.0061
<i>Veillonella</i>	0,94	8,4	0.0000

1. Grup'deki siyah lekeli ve çürüksüz ve 3. Grup'teki lekesiz ve çürüksüz hastaların biyofilmlerinde bulunan farklılık gösteren bakteriler Tablo 6.11'de gösterilmiştir. Bu çıkan sonuçlara göre çürük faktörü olmaksızın siyah lekelerden sorumlu olabilecek bakteriler şu şekilde sıralanabilir: *Actinomycetaceae_unclassified*, *Bactinomycetaceae_unclassified*, *Burkholderiales_unclassified*, *Bergeriella*, *Brachymonas*, *Capnocytophaga*, *Cardiobacterium*, *Rothia*, *Mannheimia*, *Neisseriaceae*, *Propionibacteriaceae_unclassified*, *Propionibacterium*. Buna ek olarak, lekesiz ve çürüksüz hastalarda *Streptococcus* cinsi bakteriler lekeli ve çürüksüz hastalardan anlamlı düzeyde yüksek tespit edilmiş olup ($p=0,0061$) *Pasteurellaceae_unclassified* miktarca yaklaşık 2 kat, *Veillonella* türü bakteriler ise yaklaşık 8 kat yüksek saptanmıştır ($p<0,05$).

Tablo 6.12. 2. Grup ve 4. Grup arasında anlamlı düzeyde farklılık gösteren bakteriler

Bakteri ismi	2. Grup (p50 - %)	4. Grup (p50 - %)	p
<i>Actinomyces</i>	3,24	1,56	0.0378
<i>Bifidobacteriaceae_unclassified</i>	0	0,016	0.0167
<i>Bifidobacterium</i>	0	0,023	0.0374
<i>Brachymonas</i>	0,022	0	0.0095
<i>Burkholderiales_unclassified</i>	1,19	0,2	0.0000
<i>Capnocytophaga</i>	9,38	5,12	0.0032
<i>Cardiobacterium</i>	1,8	0,24	0.0004
<i>Comamonadaceae_unclassified</i>	0,154	0	0.0016
<i>Corynebacterium</i>	7,08	3,12	0.0378
<i>Dialister</i>	0,156	0,166	0.0378
<i>Fusobacterium</i>	4,8	7,7	0.0096
<i>Lactobacillaceae_unclassified</i>	0	0,0035	0.0281
<i>Lactobacillus</i>	0,00188	0,036	0.0077
<i>Neisseria</i>	9,5	2,07	0.0111
<i>Neisseriaceae_unclassified</i>	0,92	0,213	0.0001
<i>Phocaeicola</i>	0	0,004	0.0004
<i>Propionibacteriaceae_unclassified</i>	0,48	0,046	0.0001
<i>Rothia</i>	1,106	0,258	0.0149

Lekli ve çürüklü hasta grubu olan 2. Grup ile lekesiz ve çürüklü 4. Grup bireyelerine ait biyofilmlerde farklılık gösteren bakteriler de 1. Grup ve 3. Grup arasındaki analize benzer şekilde lekelerden sorumlu bakteriler konusunda fikir verebilmektedir. Bu doğrultuda Tablo 6.12’de de izlenebildiği üzere 2. Grup hastalarda anlamlı düzeyde daha yüksek sayıda bulunan bakteriler *Actinomyces*, *Brachymonas*, *Burkholderiales_unclassified*, *Capnocytophaga*, *Cardiobacterium*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Neisseriaceae_unclassified*, *Propionibacteriaceae_unclassified* ve *Rothia* türleri olarak sıralanabilir ($p < 0,05$).

Tablo 6.13. 1. Grup ve 4. Grup arasında anlamlı düzeyde farklılık gösteren bakteriler

Bakteri ismi	1. Grup (p50 - %)	4. Grup (p50 - %)	p
<i>Actinomyces</i>	4,88	1,56	0,0023
<i>Actinomycetaceae_unclassified</i>	0	0,0049	0,0004
<i>Anaeroglobus</i>	0,004	0,032	0,0451
<i>Atopobium</i>	0	0,028	0,0001
<i>Bacteroidales_unclassified</i>	0,052	0,172	0,0129
<i>Bergeriella</i>	0,0015	0	0,0060
<i>Bifidobacterium</i>	0	0,023	0,0000
<i>Brachymonas</i>	0,32	0	0,0083
<i>Burkholderiales_unclassified</i>	2,038	0,2	0,0000
<i>Capnocytophaga</i>	10,58	5,12	0,0003
<i>Cardiobacterium</i>	3,6	0,24	0,0000
<i>Centipeda</i>	0	0,0098	0,0026
<i>Clostridiales_unclassified</i>	0,12	0,32	0,0428
<i>Comamonadaceae_unclassified</i>	0,076	0	0,0056
<i>Coriobacteriaceae_unclassified</i>	0	0,0062	0,0154
<i>Corynebacteriaceae_unclassified</i>	0,02	0,007	0,0083
<i>Corynebacterium</i>	7,96	3,12	0,0011
<i>Cryptobacterium</i>	0	0,002	0,0012
<i>Dialister</i>	0,046	0,166	0,0293
<i>Eubacterium</i>	0,0062	0,025	0,0027
<i>Flavobacteriaceae_unclassified</i>	0,74	0,182	0,0032
<i>Fusobacterium</i>	4,1	7,7	0,0061
<i>Howardella</i>	0	0,0024	0,0118
<i>Lactobacillaceae_unclassified</i>	0	0,0035	0,0011
<i>Lactobacillus</i>	0	0,036	0,0001
<i>Mannheimia</i>	0,00124	0	0,0093
<i>Megasphaera</i>	0	0,042	0,0001
<i>Mogibacterium</i>	0	0,0098	0,0002
<i>Neisseria</i>	14,8	2,07	0,0023
<i>Neisseriaceae_unclassified</i>	3,01	0,213	0,0000
<i>Olsenella</i>	0,02	0,23	0,0052
<i>Pasteurellaceae_unclassified</i>	5,83	2,32	0,0333
<i>Peptostreptococcus</i>	0,0049	0,096	0,0195
<i>Prevotella</i>	2,2	12,4	0,0003
<i>Propionibacteriaceae_unclassified</i>	1,14	0,046	0,0000
<i>Propionibacterium</i>	0,0094	0,032	0,0378
<i>Proteobacteria_unclassified</i>	0,00124	0	0,0028
<i>Rothia</i>	1,72	0,258	0,0001
<i>Scardovia</i>	0	0,008	0,0007
<i>Schwartzia</i>	0	0,0035	0,0204
<i>Selenomonas</i>	1,32	4,8	0,0096
<i>Shuttleworthia</i>	0	0,0093	0,0007
<i>Solobacterium</i>	0,0027	0,0124	0,0036
<i>Treponema</i>	0,38	1,68	0,0083
<i>Veillonella</i>	0,94	7,12	0,0044
<i>Veillonellaceae_unclassified</i>	0,212	1,28	0,0023

Tablo 6.13'te listelenen bakteriler 1. Grup ve 4. Grup arasından anlamlılık gösteren bakterileri göstermektedir. Burada SL'li ve çürüksüz ağızlarda bulunup, çürüklü ve lekesiz ağızlarda "0" derecesinde hiç bulunmayan bakteri cinsleri çürüksüzlük ve siyah leke ile ilişkili olabilmektedir. Buna göre: *Proteobacteria_unclassified*, *Mannheimia*, *Comamonadaceae_unclassified* *Bergeriella*, *Brachymonas* cinsi bakteriler anlamlı düzeyde SL'li ve çürüksüz bireylerde yüksek bulunmuştur.

Tablo 6.14. 2. Grup ve 3. Grup arasında anlamlı düzeyde farklılık gösteren bakteriler

Bakteri ismi	2. Grup (p50 - %)	3. Grup (p50 - %)	p
<i>Anaeroglobus</i>	0,074	0	0.0448
<i>Atopobium</i>	0,012	0,0036	0.0115
<i>Bacteroidales_incertae_sedis</i>	0,004	0	0.0028
<i>Bacteroidales_unclassified</i>	0,072	0,39	0.0171
<i>Brachymonas</i>	0,022	0,004	0.0050
<i>Capnocytophaga</i>	9,38	6,38	0.0149
<i>Centipeda</i>	0,01	0,0012	0.0041
<i>Clostridiales_unclassified</i>	0,42	0,16	0.0071
<i>Comamonadaceae_unclassified</i>	0,154	0,0138	0.0060
<i>Desulfobulbus</i>	0,0018	0	0.0260
<i>Dialister</i>	0,156	0,04	0.0257
<i>Filifactor</i>	0,03	0	0.0176
<i>Haemophilus</i>	0,032	0,23	0.0005
<i>Howardella</i>	0,00166	0	0.0466
<i>Kingella</i>	0,23	0,74	0.0032
<i>Lactobacillus</i>	0,00188	0	0.0158
<i>Leptotrichiaceae_unclassified</i>	0,034	0,0072	0.0009
<i>Megasphaera</i>	0,39	0	0.0125
<i>Neisseriaceae_unclassified</i>	0,92	0,37	0.0032
<i>Pasteurellaceae_unclassified</i>	4,32	10,4	0.0016
<i>Peptostreptococcus</i>	0,058	0,0108	0.0424
<i>Propionibacteriaceae_unclassified</i>	0,48	0,14	0.0111
<i>Propionibacterium</i>	0,013	0,0037	0.0083
<i>Pseudoramibacter</i>	0,0036	0	0.0083
<i>Schwartzia</i>	0,0066	0	0.0097
<i>Selenomonas</i>	4,88	3,028	0.0171
<i>Shuttleworthia</i>	0,0043	0	0.0429
<i>Streptococcus</i>	2,56	5,6	0.0293
<i>Treponema</i>	1,12	0,26	0.0428
<i>Veillonella</i>	2,4	8,4	0.0009
<i>Veillonellaceae_unclassified</i>	1,14	0,38	0.0483

SL'li ve çürüklü 2. Grup hastalar ile lekesiz ve çürüksüz 3. Grup hastalar karşılaştırıldığında, 2. Grup hastalarda *Anaeroglobus*, *Bacteroidales_incertae_sedis*, *Desulfobulbus*, *Filifactor*, *Howardella*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Pseudoramibacter*, *Schwartzia*, *Shuttleworthia* cinsi bakteriler istatistiksel olarak anlamlılıkla gözlenmiştir.

Tablo 6.15. 3. Grup ve 4. Grup arasında anlamlı düzeyde farklılık gösteren bakteriler

Bakteri ismi	3. Grup (p50 - %)	4. Grup (p50 - %)	p
<i>Actinomyces</i>	3,45	1,56	0,0019
<i>Anaeroglobus</i>	0	0,032	0,0108
<i>Anaerolineaceae_unclassified</i>	0	0,0022	0,0011
<i>Atopobium</i>	0,0036	0,028	0,0002
<i>Bifidobacteriaceae_unclassified</i>	0	0,016	0,0000
<i>Bifidobacterium</i>	0	0,023	0,0000
<i>Cardiobacterium</i>	1,2	0,24	0,0001
<i>Centipeda</i>	0,0012	0,0098	0,0236
<i>Cryptobacterium</i>	0	0,002	0,0004
<i>Desulfobulbus</i>	0	0,002	0,0132
<i>Filifactor</i>	0	0,26	0,0077
<i>Flavobacteriaceae_unclassified</i>	0,58	0,182	0,0083
<i>Granulicatella</i>	0,13	0,02	0,0071
<i>Haemophilus</i>	0,23	0,026	0,0061
<i>Howardella</i>	0	0,0024	0,0303
<i>Kingella</i>	0,74	0,216	0,0032
<i>Lactobacillaceae_unclassified</i>	0	0,0035	0,0011
<i>Lactobacillus</i>	0	0,036	0,0000
<i>Leptotrichiaceae_unclassified</i>	0,0072	0,0301	0,0061
<i>Megasphaera</i>	0	0,042	0,0041
<i>Mycoplasma</i>	0	0,0114	0,0037
<i>Olsenella</i>	0,055	0,23	0,0071
<i>Pasteurellaceae_unclassified</i>	10,4	2,32	0,0023
<i>Phocaeicola</i>	0	0,004	0,0004
<i>Prevotella</i>	3,2	12,4	0,0071
<i>Propionibacteriaceae_unclassified</i>	0,14	0,046	0,0005
<i>Propionibacterium</i>	0,0037	0,032	0,0060
<i>Pseudoramibacter</i>	0	0,0116	0,0068
<i>Rothia</i>	0,64	0,258	0,0483
<i>Scardovia</i>	0	0,008	0,0090
<i>Schwartzia</i>	0	0,0035	0,0269
<i>Shuttleworthia</i>	0	0,0093	0,0105
<i>Streptococcus</i>	5,6	2,54	0,0225
<i>Treponema</i>	0,26	1,68	0,0483
<i>Veillonellaceae_unclassified</i>	0,38	1,28	0,0378

Lekesiz çürüksüz hastalardan oluşan 3. Grup ve yine lekesiz ama çürüklü hasta grubu olan 4. Grup bireylerine ait biyofilmlerde farklılık gösteren bakteriler Tablo 6.15'e gösterilmiştir. Bu liste 1. Grup ve 2. Grup arasındaki analize benzer şekilde çürüklerden sorumlu bakteriler konusunda fikir verebilmektedir. Bu doğrultuda, 4. Grup hastalarda anlamlı düzeyde daha yüksek sayıda bulunan bakteriler *Anaeroglobus*, *Atopobium*, *Bifidobacteriaceae_unclassified*, *Bifidobacterium*, *Centipeda*, *Cryptobacterium*, *Filifactor*, *Lactobacillaceae_unclassified*, *Lactobacillus*, *Leptotrichiaceae_unclassified*, *Megasphaera*, *Mycoplasma*, *Olsenella*, *Phocaeicola*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Pseudoramibacter*, *Scardovia*, *Schwartzia*, *Shuttleworthia*, *Treponema*, *Veillonellaceae* cinsi bakteriler olarak sıralanabilir ($p < 0,05$). İlgi çekici bir bulgu olarak Streptococcus, çürüksüz grupta çürüklü gruba kıyasla sayısal olarak daha yüksek (5,6/2,54) bulunmuştur.

Tablo 6.16. Siyah lekeli ve lekesiz hastalara ait plakların tamamında anlamlı düzeyde farklılık gösteren bakteri cinsleri

Bakteri İsmi	Siyah Lekeli p50 - %	Lekesiz p50 - %	p
<i>Aggregatibacter</i>	0,0011	0	0.0163
<i>Bergeriella</i>	0,0006	0	0.0035
<i>Brachymonas</i>	0,0219	0,0009	0.0003
<i>Burkholderiales_unclassified</i>	0,7605	0,1336	0.0000
<i>Capnocytophaga</i>	4,8406	2,5946	0.0000
<i>Comamonadaceae_unclassified</i>	0,7199	0,0039	0.0001
<i>Corynebacterium</i>	3,8696	1,9915	0.0064
<i>Leptotrichiaceae_unclassified</i>	0,0186	0,0053	0.0003
<i>Neisseria</i>	5,4184	1,2459	0.0015
<i>Neisseriaceae_unclassified</i>	0,7909	0,1615	0.0000
<i>Rothia</i>	0,6314	0,1953	0.0019
<i>Streptococcus</i>	1,1235	1,7400	p>0,05
<i>Propionibacteriaceae_unclassified</i>	0,3822	0,0394	0.0000

Tablo 6.16’da çürüklü ve çürüksüz olmasına bakılmaksızın 1. Grup ve 2. Grup’deki hastaların plak mikrofloraları (Siyah Lekeli) 3. Grup ve 4. Grup numuneleri (Lekesiz) ile karşılaştırılmıştır. Siyah lekeli hastalarda *Aggregatibacter*, *Bactinomycetaceae*, *Bergeriella*, *Brachymonas*, *Burkholderiales*, *Capnocytophaga*, *Cardiobacterium*, *Comamonadaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Corynebacterium*, *Eubacterium*, *Gp6*, *Leptotrichiaceae*, *Mannheimia*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Neisseriaceae*, *Proteobacteria*, *Rothia*, *Propionibacteriaceae* cinsi bakteriler anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).



7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dişlerin siyah lekelenmeleri (SL) bir ekstrinsik renklenme çeşidi olmakla beraber klinik olarak çoğunlukla diş eti marjinine paralel yerleşmiş, dairesel şekilde, koyu renkli siyah oluşumlardır (Heinrich-Weltzien ve ark, 2014).

SL'nin içeriğinde yüksek oranda çözünmeyen demir tuzları, bakır, kalsiyum ve fosfat içermesiyle özel yapıda bir dental plak çeşidi olduğu öne sürülmüştür (Reid ve Beeley, 1976). Tükürükteki demir miktarını artıran demir takviye ilaçları veya demirden zengin beslenmenin de bu renklenmeleri artırabileceği ve buna sebep olan bakteri popülasyonunu artırabileceği ortaya konmuştur (Adcock ve Hogan, 2008).

SL oluşumundan siyah pigment üreten kromojen bakterilerin sorumlu olduğu, bu bakterilerin çeşitliliği üzerine ve SL oluşmayan ağızlardan farklı mikrobiotanın detaylı olarak araştırılması gerektiği savunulmaktadır (Slots, 1974; Costa ve ark, 2012; Heinrich-Weltzien ve ark, 2014). Ancak, SL oluşturan bakterilerin ağız içinde bulunan diğer bakterilerle etkileşimleri de yeterli biçimde aydınlatılamamıştır (Heinrich-Weltzien ve ark, 2014).

Süt dişli dönemde, SL bulunduran ağızların mikrobiyal çeşitliliğini NGS yöntemi ile saptamayı amaçlayan yakın tarihli bir çalışma vardır. Çalışma makalesinin sonuç bölümünde NGS yöntemini bu alanda dizayn eden ilk çalışma olduğunu vurgulamıştır (Li ve ark, 2015). Ancak literatürde bilindiği kadarıyla erişkin hastalarda benzer çalışmalar yapılmamıştır (Albelda-Bernardo ve ark, 2018). Böylelikle bu yöntemin diş hekimliği alanında yapılan mikrobiyolojik araştırmalarda kullanımının oldukça yeni olduğu görülebilmektedir.

Çalışmamızda, daimi dentisyonda SL oluşumundan sorumlu kromojen bakterileri yüksek doğruluklu sonuçlar veren NGS yöntemiyle cins düzeyinde saptamak ve çıkan sonuçları lekesiz çürüklü ve çürüksüz bireyler ile karşılaştırmak amaçlanmıştır.

Birçok klinik ve epidemiyolojik çalışmada SL'li çocukların, lekesiz yaşlılarına kıyasla süt dişlerinde (dmft, dt) önemli ölçüde düşük çürük deneyimi gözlenmiştir. (Shourie, 1947; Koch ve ark, 2001; Gasparetto ve ark, 2003; Saba ve ark, 2006; Heinrich-Weltzien ve ark, 2009; Bhat, 2010; França-Pinto ve ark, 2012; Heinrich-Weltzien ve ark, 2014; Zyla ve ark, 2015; Li ve ark, 2015). Buna örnek olarak Saba ve

ark. DMF-T > 3 durumunu siyah lekeli çocuklarda görülme oranını %10.3, lekesiz çocuklarda %31.3 olarak kaydetmişlerdir (Saba ve ark, 2006).

Diş hekimliğinde siyah lekelerin daha düşük çürük prevalansı ile ilişkisi yaygın olarak ortaya konulmuş olmasına rağmen çocuklarda olduğu gibi erişkinlerde de düşük çürük deneyimi ile siyah leke görülme sıklığı nadiren incelenmiştir. Schmully ve ark. klinik ortamda siyah lekeli genç yetişkinlerde, lekeli olmayanlara göre daha düşük DMFT skorları rapor etmiştir (Schmully ve ark, 2014). Pehlivan ve ark. tarafından 2017 yılında yetişkin Türk toplumunda siyah lekelerin ICDAS II sınıflaması ile çürük durumlarını değerlendiren çalışmada siyah lekeli dişlerde ICDAS 0, 1, 2 skorlarının anlamlı ölçüde daha fazla olduğu ve çürüksüzlük ile lekeli olma durumu arasında olumlu bir korelasyon saptamışlardır (Pehlivan ve ark, 2017). Bizim çalışmamız da, bu çalışmaları destekler nitelikte ICDAS 0, ICDAS 1 ve ICDAS 2 skorları ile kodlanan diş sayısı lekeli ağızlarda, lekesizlere oranla anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p=0.0127). Ayrıca yalnızca posterior dişlerin çürüksüz (ICDAS 0, 1 ve 2 kodlu) ve çürüklü (ICDAS 3, 4, 5 ve 6 kodlu) olma durumlarını SL ile ilişkisi incelendiğinde, lekeli dişlerin ICDAS 3, 4, 5 ve 6 koduna sahip olma durumu lekesiz dişlere göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (p=0,0011; p<0,05).

Siyah lekelerin kimyasal yapısının yüksek oranda demir içeren ferrik sülfat olduğu ortaya konulmuştur (Reid ve ark, 1977; Zyla ve ark, 2015). Demir içerikli beslenme veya demir emilimini azaltan yiyecek ve içeceklerin tüketilmesi ve buna bağlı olarak demir takviyesi ilaçlarının kullanımı bu lekelerin oluşumu ile ilişkili bulunmuştur (Kim ve Shirler, 2008; Martin ve ark, 2013; Chen ve ark, 2014). Çalışmamızda sorgulanan besin gupları sakatat (3.1 mg), ıspanak (6.2 mg), pekmez (2.5 mg), kurubaklagiller (4.7 mg), midye (2.1 mg), kabak çekirdeği ve diğer kuruyemişler (1.8 mg) demirden zengin besinlerdir (Bulbul SH, 2004). Yetişkin bir bireyin vücudunda 3-4 gram demir bulunmaktadır. Yaşlanan eritrositler kaybedildikçe yeni eritrositlerin oluşabilmesi için demire ihtiyaç duyulur. Bu miktar günlük olarak 1 mg olarak belirlenmiştir. Buna ek olarak, çay, kahve, kakao'nun ise demir emilimi azaltan etmenlerden *tanen* bulundurmasıyla demir emilimini (%40-%60) azalttığı gözlenmiştir (Bulbul SH, 2004). Demir eksikliği olan bireylere verilen 200 mg'lık preparatlar *Demir Sülfat* halinde basit ve ucuz şekilde elde edilir (Goddard ve ark, 2000). Uzun süreli demir takviye ilaçları tüketimlerinde ortaya çıkan fazladan demir

siyah leke oluşumu ile ilişkili olabilir (Mesonjesi, 2012). Bizim çalışmamızda sakatat tüketimi lekeli hastalarda anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur ($p=0.027$). Buna ek olarak midyenin ayda bir kez tüketimi de lekesiz hastalarda (%87,5), lekeli hastalara (%12,5) oranla daha yüksek bulunmuştur ($p=0,005$). Ayrıca siyah lekeli hastalarda çay ve kahve tüketiminin de lekesiz hastalarla kıyaslandığında anlamlı ölçüde yüksek olduğu saptanmıştır ($p_{\text{çay}}=0,05$; $p_{\text{kahve}}=0,002$). Bu bulguların sonucunda, siyah lekeli hastaların demirden fakir beslenerek %90,1'inin takviye demir ilacı aldıkları tespit edilmiştir.

Çalışmamızın bulguları ile uyumlu olarak olarak ağızda siyah lekeler bulunan okul öncesi çocuklardan oluşan bir çalışmada, siyah lekeleri olmayan çocuklara göre önemli ölçüde daha yüksek bir oranda demir takviyesi ilaçları tükettikleri saptanmıştır. (Martin ve ark, 2013). Bizim çalışmamızda da benzer olarak, bireylerin demir eksikliği durumları değerlendirildiğinde, siyah lekeli hastalardan oluşan 1. Grup (%61,5) ve 2. Grup (%76,9)'de 3. Grup (%15,3) ve 4. Grup (%0) bireylerinden istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha fazla demir eksikliği bulunduğu saptanmıştır ($p<0.001$). Buna ek olarak demir eksikliği görülen bireylerin %90'ında demir takviyesi ilaçları kullanımı tespit edilmiş, demir eksikliği olmayan gruplar ile anlamlı farklılık bulunmuştur. ($p=0.003$; $p<0.001$)

A. naeslundii ve *S. mutans* adezyonunun sırasıyla düşük ve yüksek çürük oluşumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Stenudd ve ark, 2001). SL örneklerinde *A. naeslundii*'nin anlamlı derecede yüksek olması ve *S. mutans* sayısının düşük olma eğilimi bu çocuklarda düşük çürük deneyimi ile ilişkili bulunmuştur. (Heinrich-Weltzien ve ark, 2014). *Actinomyces* kolonizasyonunun *Actinomyces* antikorunu artırdığı ve bu şekilde daha düşük sayıda çürük oluşumu gözlemlendiği bir diğer çalışmada öne sürülmüştür (Levine ve ark, 2005). Böylelikle, bakteriyel mikrobiyotanın kompozisyonunun diş çürüklerine olan duyarlılığı ve direncini modüle edebileceği düşüncesi doğrulanmıştır (Stenudd ve ark, 2001). Bizim çalışmamızda da benzer olarak çürüklü lekesiz (%1.56) ve lekeli (%3.24) hasta grupları arasında *Actinomyces* sayısının anlamlı ölçüde farklı olduğu gözlenmiştir ($p=0.0378$) (Tablo 6.12).

Kolenbrander ve London diş plağının erken ve geç kolonizasyon safhaları arasında köprü görevi gören *Fusobacterium nucleatum*'un lekesiz plakta daha sık saptandığını göstermişlerdir (Kolenbrander ve London, 1993). *Fusobacterium* cinsi

bakteriler *Bacteroidaceae* familyasına mensup olup, sporsuz, gram negatif, anaerob basillerdir ve bizim çalışmamızda da benzer biçimde, *Fusobacterium* cinsi bakteriler 2. Grup (%4,8) ve 4. Grup (%7,7) bireylerine ait biyofilmler karşılaştırıldığında lekesiz çürüklü olan 4. Grup bireylerinde daha fazla oranda bulunmuştur (p=0,0096).

Bir diğer çalışmada, siyah lekelerin oluşumunda rol oynayabileceği düşünülen periodontal patojenlerden gram negatif siyah pigmentli bakterilerden olan *Aggretibacter actinomycetemcomitans* türünün SL örneklerinde %70, lekesiz plak örneklerinde ise %20 oranında olduğu tespit edilmiştir (Saba ve ark, 2006).

.Real-time PCR kullanılan başka bir çalışmada, periodontopatojen bakterilerden olan *A. actinomycetemcomitans* ve *P. intermedia*'nın siyah lekeli ve lekesiz ağızlarda bulunma prevalansı arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. (Heinrich-Weltzien ve ark, 2014). Bizim çalışmamızda *Aggretibacter* ve *Prevotella* cinsi bakteriler ikili karşılaştırmalarda ve lekeli ve lekesiz grupların topluca karşılaştırıldığı analizlerde anlamlı düzeyde farklılık göstermiştir. Tüm siyah lekeli ve tüm lekesiz ağızlar karşılaştırıldığında *Aggretibacter* cinsi bakteriler lekeli ağızlarda anlamlı ölçüde yüksek bulunmuş (p=0.0163); buna ek olarak *Prevotella* cinsi bakterilerin sayıları 3. Grup (%3,2) ve 4. Grup (%12,4) bireylerinde anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur. (p=0,0071) Aynı şekilde 1. Grup (%2,2) ve 2. Grup (%8,69) bireyleri karşılaştırıldığında, çürüklü bireylerde anlamlı ölçüde daha yüksek tespit edilmiştir (p=0,0006). Agresif periodontitis'in başlıca patolojik etyolojisinde yer alan bu bakterilerin siyah lekeli hastalarda anlamlı oranda yüksek bulunması bu hastalarda agresif periodontitise yatkınlık oluşabileceğini düşündürmektedir (Heinrich-Weltzien ve ark, 2014). Bizim çalışmamızda da klinik olarak siyah lekeli genç erişkin hastaların %68'inin 1. Büyükazı dişlerini çürükten, periodontal nedenlerden ve yaygın endodontik enfeksiyon sonucu kaybettikleri saptanmıştır. Mikrobiyolojik olarak bu klinik bulguyu destekler nitelikte ise tüm lekeli ağızlardan alınan örneklerde lekesizlerle karşılaştırıldığında *Aggretibacter* cinsi bakterilerin miktarı anlamlı düzeyde bulunmuştur (p=0.0163). Aynı zamanda Agresif periodontitisli hastaların çürük insidansının düşük olması (Ramachandra, 2014) bizim bulgularımızla uyumludur.

Li ve ark. siyah lekeli ve lekesiz çocuklarda oral mikrobiyotayı değerlendirmek amacıyla 16S rRNA gen dizileme yöntemini kullanan ve bu yönüyle çalışmamıza

yakınlık gösteren bir araştırma yapmışlardır (Li ve ark, 2015). Sadece çürüksüz SL’li ve çürüksüz lekesiz olmak üzere iki grupta yaptıkları çalışmada çürüksüz SL’li çocukların tükürüklerine ve plaklarına ait mikrobiyal çeşitliliğin lekesiz çocuklara oranla anlamlı derecede az olduğunu görmüşlerdir. Mikrobiyolojik bulgular, SL’li çocuklardan alınan plak örneklerinde *Actinomyces*, *Cardiobacterium*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Tannerella* ve *Treponema* türü bakterilerin daha fazla bulunduğunu göstermişlerdir (Li ve ark, 2015). Bizim çalışmamızda çıkan sonuçlara göre çürük faktörü olmaksızın siyah lekelerden sorumlu olabilecek bakteriler şu şekilde sıralanabilir: *Actinomycetaceae*, *Bacteroidetes*, *Burkholderiales*, *Bergeriella*, *Brachymonas*, *Capnocytophaga*, *Cardiobacterium*, *Rothia*, *Mannheimia*, *Neisseriaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Propionibacterium* cinsi bakteriler olarak sıralanabilir. Çalışmamızda lekeli ve lekesiz bireylerin topluca değerlendirildiğinde anlamlı düzeyde en fazla bulunan bakteriler *Capnocytophaga*, *Cardiobacterium*, *Rothia* türleri olmuştur (Tablo 6.11). Li ve ark. da bizim bulgularımızla uyumlu olarak *Cardiobacterium* ve *Corynebacterium* cinsi bakterileri lekeli plakta anlamlı ölçüde yüksek ($p=0.0064$; $p=0,0000$) tespit etmiştir (Li ve ark, 2015). *Capnocytophaga* cinsi bakteriler sağlıklı ağız florasında bulunan Gram negatif çomaklardır. Alemde cins düzeyine doğru sıralandığında taksonomisi *Bacteria*; *Bacteroidetes*; *Flavobacteria*; *Flavobacteriales*; *Flavobacteriaceae*; *Capnocytophaga* şeklindedir. İsmi “Capnos” yani karbondioksit (CO_2) kelimesinden alan bu bakteriler % 5-10 CO_2 ’li ortamda üremeleri özelliğiyle kapnofiliktirler (Pudakalkatti ve ark, 2016) Subgingival plakta bulunmakla birlikte *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Propionibacterium acnes*’in fibroblastlara proliferasyonunu inhibe ederler (Yalçın Çakır ve ark, 2010). Bu özelliğiyle karyojenik bakterilerin çürük yapıcı etkilerini azaltarak SL’li ağızlarda çürük insidansının düşük bulunmasına katkı sağladığını düşünmekteyiz.

SL oluşumu ile ilgili yapılmış bazı çalışmalar, siyah lekeli çocuklarda *Actinomyces* türlerinin anlamlı ölçüde daha fazla bulunduğunu göstermişlerdir. (Heinrich-Weltzien ve ark, 2014, Saba ve ark, 2006, Li ve ark, 2015). Çalışmamız bu bulguları doğrular niteliktedir. 2. Grup lekeli çürüklü ve 4. Grup lekesiz çürüklü hastalar karşılaştırıldığında, lekeli hastalarda *Actinomycetes* miktarı daha yüksek bulunmuştur ($p=0.0378$). Bu nedenle, *Actinomycetes* türleri SL oluşumu ile ilişkili olabilir. Buna ek olarak çalışmamızda *Actinomycetes* cinsi bakterilerin 3. Grup (lekesiz ve çürüksüz)

hastalarda da oran olarak yüksek bulunması (%3.45) *Actinomyces* cinsi bakterilerin çürüksüzlük durumu ile ilişkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Slots, yaptığı mikrobiyolojik çalışmada, bu hastalarda görülen düşük çürük insidansının, *Streptococcus* sayısının düşük olmasına bağlı olduğunu öne sürmüştür. Heinrich-Weltzien'e göre, *S. mutans* ve *S. sobrinus*'un sayımları, çürüklü ve çürüksüz siyah lekeli ve lekesiz çocuklarda anlamlı bir farklılık göstermemiş, ancak *Lactobacillus* türleri lekesiz plak örneklerinde anlamlı ölçüde daha fazla bulunmuştur. (Heinrich-Weltzien ve ark, 2014). Bizim çalışmamız da bu bulguyu destekler nitelikte, lekesiz hastalarda %0,036 değeri, lekeli hastalarda %0,00188 ile lekesiz hastalardan alınan plak örneklerinde istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0.0077$). (Tablo 6.12)

Yakın tarihli bir çalışmada, SL'li çocukların plak örneklerinde *Actinomyces*, *Cardiobacterium*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Tannerella* ve *Treponema* cinsi bakterilerin varlığının daha fazla olduğu saptanmıştır (Li ve ark, 2015). Buna ek olarak *Streptococcus* miktarının SL'li ve lekesiz plaklarda anlamlı düzeyde farklılık göstermediğini belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da benzer biçimde *Streptococcus* lekeli ve lekesiz hastalarda anlamlı olarak farklılık göstermemektedir ($p>0,05$). Li ve ark. çalışmalarının, çocuklarda SL'li plağın mikroflorasının belirlemek amacıyla NGS'in kullanıldığı ilk çalışma olduğu belirtmişlerdir (Li ve ark, 2015). Ancak literatürde bilindiği kadarıyla, erişkin hastalarda benzer çalışmalar yapılmamıştır (Albelda-Bernardo ve ark, 2018).

Bu çalışma, yetişkin hastalarda siyah diş lekeli plağın mikrobiyolojisini değerlendirmek için yeni nesil dizilemenin uygulandığı ilk çalışmadır. Çalışmamız, PCR veya rt-PCR kullanılan çalışmalarla karşılaştırıldığında, bakteriyel kompozisyonun oldukça ayrıntılı bir değerlendirmesini yapmak ve literatürde daha önceden bahsedilmeyen farklı bakterilerin de siyah leke oluşumundan sorumlu olabileceğini göstermek açısından önemlidir. Bizim çalışmamızda çıkan sonuçlara göre çürük faktörü olmaksızın siyah lekelerden sorumlu olabilecek bakteriler şu şekilde sıralanabilir: *Actinomycetaceae*, *Bacteroidales*, *Granulicatella*, *Haemophilus*, *Kingella*, *Pasteurellaceae*, *Veillonella* cinsi bakteriler olarak sıralanabilir. Buna ek olarak, lekesiz ve çürüksüz hastalarda *Streptococcus* cinsi bakteriler siyah lekeli ve çürüksüz hastalardan anlamlı düzeyde yüksek tespit edilmiştir ($p=0,0061$). Ayrıca

çürüklü ve çürüksüz olmasına bakılmaksızın siyah lekeli hastalarda *Aggregatibacter*, *Bactinomycetaceae*, *Bergeriella*, *Brachymonas*, *Burkholderiales*, *Capnocytophaga*, *Cardiobacterium*, *Comamonadaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Corynebacterium*, *Eubacterium*, *Gp6*, *Leptotrichiaceae*, *Mannheimia*, *Moraxella*, *Neisseria* ve *Neisseriaceae*, *Proteobacteria*, *Rothia*, *Propionibacteriaceae* cinsi bakteriler anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Özetle, çürüklü ve çürüksüz tüm SL'li plakta en yüksek sırasıyla *Capnocytophaga* (%4,8), *Corynebacterium* (%3,9), *Neisseria* (%5,4) cinsi bakteriler bulunmaktadır ($p<0,05$). *Corynebacterium* cinsi bakteriler Gram pozitif, filamentöz, fakültatif anaerob çomaklardır (Yalçın Çakır ve ark, 2010). Kanlı Agarda siyah pigmentli koloniler oluşturmasıyla bilinmektedir (Shukla ve ark, 2003). *Rothia* cinsi bakteriler, Gram pozitif, filamentöz, fakültatif anaerob koklardır. *Actinomycetaceae* ailesinin bir üyesidir. Bu bakterileri ağız florasında bulunan türü ise *R. denticariosa*'dır (Yalçın Çakır ve ark, 2010). Çoğu özelliğiyle *Actinomyces* türü bakterilere oldukça benzerlik gösterir. Bunun yanında, *in vitro* ortamda *Corynebacteria* cinsi bakteriler gibi kömür siyahı koloniler oluşturduğu tespit edilmiştir (Daneshvar ve ark, 2004).

Çalışmamızın bulgularında elde edilen grupların ikili karşılaştırması, çürük mikrobiyomuna dair de sonuçlar vermiştir. Özellikle 3. Grup (lekesiz ve çürüksüz) ile 4. Grup (lekesiz ve çürüklü) hastalar arasındaki karşılaştırmada anlamlı düzeyde farklılık gösteren bakteriler *Anaeroglobus*, *Atopobium*, *Bifidobacteriaceae*, *Bifidobacterium*, *Centipeda*, *Cryptobacterium*, *Filifactor*, *Lactobacillus*, *Leptotrichiaceae*, *Megasphaera*, *Mycoplasma*, *Olsenella*, *Phocaeicola*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Pseudoramibacter*, *Scardovia*, *Schwartzia*, *Shuttleworthia*, *Treponema*, *Veillonellaceae* cinsi bakteriler olarak sıralanabilir. Buna karşın Diş Hekimliği tarihinde diş çürüğünün başlıca etyolojisinde *Streptococcus mutans*'ların rol oynadığı öne sürülmüştür (Loesche, 1986; Ge ve ark, 2008; Kanasi ve ark, 2010). Ancak öncü moleküler yöntemler kullanan bazı diğer çalışmalar *S. Mutansları* önemli oranda saptamamış, bu bakterilerin yerine çürüklü plakta *Lactobacillus*, *Actinomyces* veya *Bifidobacterium* gibi diğer bakteriyel türlerin baskın olabileceğini belirtmişlerdir (Becker ve ark, 2002; Aas ve ark, 2008). Son zamanlardaki moleküler çalışmalar bu bulguları destekler nitelikte olup potansiyel karyojenik bakterilerin listesini *Veillonella*, *Propionibacterium* ve *Atopobium* gibi diğer bakteri türlerine genişletmiştir (Belda-Ferre ve ark, 2012). Bizim çalışmamızda da bu bulgular ile uyumlu şekilde

çürüklü plak örneklerinde *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Veillonellaceae* bakteriler istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Bu bakterilere ilaveten çalışmamızda *Anaeroglobus*, *Bifidobacteriaceae*, *Centipeda*, *Cryptobacterium*, *Filifactor*, *Leptotrichiaceae*, *Megasphaera*, *Mycoplasma*, *Olsenella*, *Phocaeicola*, *Prevotella*, *Pseudoramibacter*, *Scardovia*, *Schwartzia*, *Shuttleworthia*, *Treponema* cinsi bakteriler de çürüklü plak ile ilişkili bulunmuştur.

NGS yöntemi önceden tespit edilmemiş türlerin tespit edilmesini mümkün kılar, ancak bu mikroorganizmaların siyah leke oluşumu ile ilgili olup olmadığı daha ayrıntılı analizleri de beraberinde getirir. NGS yöntemi aynı anda binlerce bakterinin analizini yapmaya imkan tanımaktadır. Bu yöntemde bakteri çeşitliliğini saptamak için kullanılan 16S rRNA genini bizim amacımıza uygun kılan çeşitli özellikleri bulunmaktadır. Tüm prokaryotlarda mevcut olması, oldukça korunaklı ve değişken bölgelerinin olması ve bakterilerin tanınırlığında en yaygın kullanılan gen olmasıyla yöntemin güvenilirliğini artırmaktadır. Buna ek olarak, bakteriler teşhis edildikten sonra bu bakterilerin işlevlerini analiz etmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Yukarıda adı geçen ve SL'nin mikrobiyolojisi üzerine yapılmış çalışmalar siyah lekeli diş plağının özel ve spesifik bir mikrobiyolojik bileşime sahip olduğunu göstermektedir. Siyah diş lekelerinin ve lekesiz diş yüzeylerinin diş biyofilmlerinin benzer bakteriyel çeşitliliği ile siyah diş lekelerinin karyojenik olarak bilinen bakterilerden arınmış olmadığı gösterilmiştir (Costa ve ark, 2012). Biz de çalışmamızda siyah lekeli ve aynı zamanda çürüklü bireylerin mikrobiyomu ile lekesiz bireylere ait plak mikrobiyomu arasında benzerlikler saptadık. Bizim çalışmamızda da SL'li ve çürüklü ağızlarda anlamlı düzeyde yüksek bulunan bakteriler *Actinomyces*, *Brachymonas*, *Burkholderiales*, *Capnocytophaga*, *Cardiobacterium*, *Neisseria*, *Neisseriaceae*, *Propionibacteriaceae* ve *Rothia* türleri şeklinde listenebilir ($p<0,05$).

Sonuç olarak:

- Çalışmamız hem siyah leke mikrobiyomuna hem de çürük mikrobiyomunun detaylı incelenmesine olanak vermiştir.
- Tüm ağızdaki dişler değerlendirildiğinde siyah lekeli dişlerin ICDAS 0, 1 ve 2 koduna sahip olma olasılıkları anlamlı düzeyde yüksektir ($p<0,05$). Bu durumda

siyah lekeli dişlerin çürüksüz olma durumu lekesizlere kıyasla anlamlı ölçüde yüksektir.

- Çürük insidansının daha yüksek olduğu posterior dişler değerlendirildiğinde lekесiz dişlerde ICDAS 3, 4, 5 ve 6 kodunun anlamlı ölçüde daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).
- Siyah lekeli bireylerde demir eksikliği ile beraber büyük oranda takviye demir ilacı kullanımı (%90) gözlenmiştir.
- Çürüksüz hastalar değerlendirildiğinde SL'li plakta en yüksek *Capnocytophaga* (%10,8), *Cardiobacterium* (%3,6), *Rothia* (%1,72) cinsi bakteriler tespit edilmiştir ($p<0,05$).
- Çürük faktörü göz önünde bulundurulmaksızın SL'li plakta en yüksek sırasıyla *Capnocytophaga* (%4,8), *Corynebacterium* (%3,9), *Neisseria* (%5,4) cinsi bakteriler bulunmaktadır ($p<0,05$).
- Çürüklü hastalar değerlendirildiğinde SL'li plakta en yüksek *Neisseria* (%9,5), *Capnocytophaga* (%9,4), *Corynebacterium* (%7,1), *Actinomyces* (%3,24), cinsi bakteriler tespit edilmiştir ($p<0,05$).
- Çalışmamızda çürük mikrobiyomu da ayrıntılı olarak incelenmiştir ve lekесiz ağızlarda çürüklerden başlıca sorumlu olabilecek bakteriler *Anaeroglobus*, *Atopobium*, *Bifidobacteriaceae*, *Bifidobacterium*, *Centipeda*, *Cryptobacterium*, *Filifactor*, *Lactobacillus*, *Leptotrichiaceae*, *Megasphaera*, *Mycoplasma*, *Olsenella*, *Phocaeicola*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Pseudoramibacter*, *Scardovia*, *Schwartzia*, *Shuttleworthia*, *Treponema*, *Veillonellaceae* olarak bulunmuştur.
- SL'nin mikrobiyolojisini bulmaya yönelik yapılmış önceki çalışmalarda belirtildiğinin aksine, çalışmamızda **farklı bakterilerin bulunması** *Actinomyces*'in siyah leke oluşumunda yer alan tek mikroorganizma olmadığını göstermektedir.
- Çalışmamızın hipotezini destekler nitelikte SL'nin çürüklü ve çürüksüz ağızlarda farklı kompleks mikrobiyom yapısı vardır ve SL'li bireylerde daha az çürük bulunduğu saptanmıştır.
- NGS yönteminin kullanıldığı çalışmamız tüm ağız mikrofloranın kısa süre içerisinde doğruluğunun kuvvetli olarak teşhis edilebilmesine olanak sağlamıştır. Bu alanda, araştırmamızın hem erişkin hastalarda uygulanması hem de lekeleri olan ve olmayan çürüklü ve çürüksüz hastaları incelemiş olması literatüre öncü olabilecek çalışmalardandır.

8. KAYNAKLAR

Aas JA, Griff en AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, Leys EJ, Paster BJ. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 2008;46:1407-1417.

Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005;43(11):5721-5732.

Abacı N, Arıkan M, Tansel T, Şahin N, Cakiris A, Pacal F, Ekmekci SS, Gök E, Üstek D. Mitochondrial mutations in patients with congenital heart defects by next generation sequencing technology. *Cardiol Young*. 2015;25(4): 705-711

Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson JA, Strausbaugh LD. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J* 2013; 7: 1016-25.

Abusleme L, Hong BY, Dupuy AK, Strausbaugh LD, Diaz PI. Influence of DNA extraction on oral microbial profiles obtained via 16S rRNA gene sequencing. *J Oral Microbiol* 2014, 6: 23990

Adcock KA, Hogan SM. Extrinsic Iron Staining in Infant Teeth from Iron-Fortified Formula and Rice Cereal. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2008;13:162-165

Akyüz S, Garan A, Kaya MS. Prevalence of Black Stain and Dental Caries in Children Attending a University Pediatric Dentistry Clinic in Istanbul. *MUSBED* 2015;5(2):109-114

Albelda-Bernardo MA, Mar Jovani-Sancho M, Veses V, Sheth CC. Remediation of adult black dental stains by phototherapy. 2018; *BDJ Open* 4(1).

Aparna MS, Yadav S. Biofilms: microbes and disease. *Braz J Infect Diseases* 2008; 12: 526-530.

Aydın M, Mısırlıgil A. Ağız mikrobiyolojisi. MN medikal Nobel Kitapevi, İstanbul 2012

Bandon D, Chabane-Lemboub A, Le Gall M. Exogenous tooth discoloration in children: black stains. *Arch Pediatr*. 2011; 18(12): 1348-1352.

Barber, PM. The Analysis of Dental Plaque Sections. *Microb Ecol Health Dis.* 2009; 8(6): 309-311.

Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, Boches SK, Dewhirst FE, Griffen AL. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1001–1009.

Beighton D, Mughal SR, Do T. Bacterial Catabolism of Salivary Substrates. *Oral Microbial Ecology: Curr Res New Perspect.* 2013; 37-46.

Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simon-Soro A, Pignatelli M, Mira A. The oral metagenome in health and disease. *ISME J* 2012; 6: 46-56.

Berlutti F, Vestri A, Ottolenghi L, Polimeni A. Black stains in the mixed dentition: A PCR microbiological study of the etiopathogenic bacteria. *J Clin Pediatr Dent.* 2006; 30(3)

Bikel S, Valdez-Lara A, Cornejo-Granados F, Ricoa K, Canizales-Quinterosa S, Soberónb X, Del Pozo-Yaunerb L, Ochoa-Leyva A. Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. *Comput Struct Biotechnol J* 2015; 13: 390–401.

Bizzarro S, Loos BG, Laine ML, Crielaard W, Zaura E. Subgingival microbiome in smokers and non-smokers in periodontitis: An exploratory study using traditional targeted techniques and a next-generation sequencing. *J Clin Periodontol.* 2013;40:483–92.

Blod C, Schlichting N, Schülin S, Suttikus A, Peukert N, Stingu CS, Hirsch C, Elger W, Lacher M, Bühligen U. The oral microbiome-the relevant reservoir for acute pediatric appendicitis? *Int J Colorectal Dis.* 2017;33(2):209–218.

Bordenstein SR, Theis KR. Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biol* 2015; 13: e1002226.

Bradshaw DJ, Homer KA, Marsh PD Beighton D. Metabolic cooperation in oral microbial communities during growth on mucin. *Microbiol.* 1994; 140: 3407-3412.

Bulbul SH. Çocuk beslenmesinde Demirin Yeri ve Önemi. *STED.* 2004; 13(12): 446-450

Characklis WG, Marshall KC, eds. *Biofilms*, John Wiley & Sons, Inc. New York 1990.

Chen X, Zhan JY, Lu HX, Ye W, Zhang W, Yang WJ, Feng XP. Factors associated with black tooth stain in Chinese preschool children. *Clin Oral Invest.* 2014; 18(9): 2059-2066

Chhour KL, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *J Clin Microbiol* 2005;43:843-9.

Cho I, Blaser M J. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 260–270.

Coenye T, Nelis HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 2010, 83, 89–105

Costa MT, Dorta ML, Ribeiro-Dias F, Pimena FC. Biofilms of black tooth stains: PCR analysis reveals presence of *Streptococcus mutans*. *Braz Dent J.* 2012; 23(5): 555-558.

Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett.* 2014;162(2):22–38.

Cynthia K, Khoury P, Zogheib T, Carina M. Extrinsic tooth discoloration, an updated review. *J Hygiene Tribune.* 2015; 2: 6-8.

Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev Biol.* 2005; 278: 274–88.

Daneshvar MI, Hollis DG, Weyant RS, Jordan JG, MacGregor JP, Morey RE, Whitney AM, Brenner DJ, Steigerwalt AG, Helsel LO, Raney PM, Patel JB, Levett PN, Brown JM. Identification of some charcoal-black-pigmented CDC

fermentative coryneform group 4 isolates as *Rothia dentocariosa* and some as *Corynebacterium aurimucosum*: proposal of *Rothia dentocariosa* emend. Georg and Brown 1967, *Corynebacterium aurimucosum* emend. Yassin et al. 2002, and *Corynebacterium nigricans* Shukla et al. 2003 pro synon. *Corynebacterium aurimucosum*. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(9): 4189-98.

Davey ME, Costerton JW. Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates. *Periodontol* 2000. 2006; 42: 13-26.

Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010; 192: 5002–5017.

Dige I, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B. Application of stereological principles for quantification of bacteria in intact dental biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24:69-75.

Do T, Devine D, Marsh PD. Oral biofilms: Molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clin Cosmet Investig Dent.* 2013;5:11–9.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167–193.

Foster JS, Kolenbrander PE. Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70:4340-4348.

França-Pinto CC, Cenci MS, Correa MB, Romano AR, Peres MA, Peres KG, Matijasevich A, Santos IS, Barros AJ, Demarco FF. Association between black stains and dental caries in primary teeth: findings from a Brazilian population-based birth cohort. *Caries Res* 2012; 46(2): 170-176.

Gao L, Xu T, Huang G, Jiang S, Gu Y, Chen F. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein Cell* 2018; 9(5):488–500.

Garan A, Akyüz S, Oztürk LK, Yarat A. Salivary parameters and caries indices in children with black tooth stains. *J Clin Pediatr Dent.* 2012;36(3):285-288.

Gasparetto A, Conrado CA, Maciel SM, Miyamoto EY, Chicarelli M, Zanata RL. Prevalence of black tooth stains and dental caries in Brazilian schoolchildren. *Braz Dent J.* 2003; 14(3), 157-161

Ge Y, Caufield PW, Fisch GS, Li Y. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* colonization correlated with caries experience in children. *Caries Res.* 2008;42:444–448.

Goddard AF, McIntyre AS, Scott BB. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. *Gut* 2000;46(Suppl IV):iv1–iv5

Handley PS. Structure, composition and functions of surface structures on oral bacteria. *Biofoul.* 1990; 2:239-64.

Hannig C, Hannig M. The oral cavity—a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Invest.* 2009; 13:123-39.

Hart CT, Corby PM, Hauskrecht M, Ryu OH, Pelikan R, Valko M, Oliviera MB, Hoehn G, Bretz W. Identification of Microbial and Proteomic Biomarkers in Early Childhood Caries. *Hindawi Int J Dent.* 2011; 2011: Article ID 196721,

Hattab FN, Qudeimat MA, Al-Rimawi HS. Dental Discoloration: An Overview. *J Esthet Dent.* 1999; 11(6): 291- 310

Heinrich-Weltzien R, Bartsch B, Eick S. Dental Caries and Microbiota in Children with Black Stain and Non-discoloured Dental Plaque. *Caries Res* 2014;48:118–125

Heinrich-Weltzien R, Monse B, van Palenstein, Helderma W. Black stain and dental caries in Filipino schoolchildren. *Community Dent Oral Epidemiol* 2009; 37: 182–187.

Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence.* 2011; 2(5): 435-444,

Jakubovics NS, Kolenbrander PE. The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Diseases.* 2010; 16: 729-739.

Jamal M, Tasneem U, Hussain T, Andleeb S. Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. *J Microbiol Biotech.* 2015; 4: 1-14.

Jorth P, Turner KH, Gumus P, Nizam N, Buduneli N, Whiteley M. Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *MBio.* 2014; 5(2): 1012-1014.

Kanasi E, Dewhirst FE, Chalmers NI, Kent R Jr, Moore A, Hughes CV, Pradhan N, Loo CY, Tannera ACR. Clonal analysis of the microbiota of severe early childhood caries. *Caries Res* 2010;44:485-97.

Keene HJ, Coykendall AL, Lahmeyer HA. Oral glucose clearance time in caries-active and caries-resistant naval recruits. *J Dent Res.* 1966; 45: 409.

Kilian, M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, Tonetti MS, Wade WG, Zaura E. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J.* 2016; 221(10): 657-666.

Kim GA, Shirley MH. Extrinsic Iron Staining in Infant Teeth from Iron-Fortified Formula and Rice Cereal. *J Pediatr Pharmacol Ther* 2008;13:162-165.

Koch MJ, Bove M, Schroff J, Perlea P, García-Godoy F. Black stain and dental caries in schoolchildren in Potenza, Italy. *ASDC J Dent Children* 2001; 68(5-6): 353-355

Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ. Communication among Oral Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002; 66: 486-505.

Kolenbrander PE, London J: Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 1993; 175: 3247–3252.

Krishnan K, Chen T, Paster BJ. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis.* 2017; 23(3): 276-286.

Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3944–55.

Kuramitsu, HK, He X, Lux R, Anderson, MH, Shi W. Interspecies Interactions within Oral Microbial Communities. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007; 71: 653-670.

Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and Dental Pellicle-A Review. *Adv Dent Res.* 2000; 14: 22-28.

Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol.* 2004; 97: 1311-1318.

Li Y, Zhang Q, Zhang F, Liu R, Liu H, Chen F. Analysis of the Microbiota of Black Stain in the Primary Dentition. *J Plos One.* 2015; 10(9): 1-12

Lie T. Early dental plaque morphogenesis. A scanning electron microscope study using the hydroxyapatite splint model and a low-sucrose diet. *J Periodontal Res* 1977; 12: 73-89.

Lie T. Morphologic studies on dental plaque formation. *Acta Odontol Scand* 1979; 37: 73-85.

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986;50:353–380.

Lorenz K, Noack B, Herrmann N, Hoffmann T. Tooth staining potential of experimental amine fluoride/stannous fluoride mouth rinse formulations – a randomized crossover forced staining study. *Clin Oral Investig.* 2015;19(5):1039-45

Maheaswari R, Kshirsagar JT, Lavanya N. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *J Indian Soc Periodontol.* 2016;20(2):128-35.

Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008; 9: 387-402.

Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodont* 2000. 2010; 55: 16-35.

Marsh PD. Host defenses and microbial homeostasis—Role of microbial interactions. *J Dent. Res.* 1989; 68: 1567–1575.

- Martin JMG, Garcia MG, Leston JS, Pendas SL, Martin JJD, Garcia-Pola MJ. Prevalence of black stain and associated risk factors in preschool Spanish children. *Pediatr Int.* 2013; 55(3): 355–359
- Masson N, Domingues RR, Cury JA, Paes Leme AF. Acidulated Phosphate Fluoride Application Changes the Protein Composition of Human Acquired Enamel Pellicle. *Caries Res.* 2013; 47: 251-258.
- McIntire FC, Vatter AE, Baros J, Arnold J. Mechanism of coaggregation between *Actinomyces viscosus* T14V and *Streptococcus sanguis* 34. *Infection and Immunity* 1978; 21:978-88.
- Mesonjesi I. Are extrinsic black stains of teeth iron-saturated bovine lactoferrin and a sign of iron deficient anemia or iron overload. *Med Hypotheses.* 2012; 79(2): 219-221.
- Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol* 2004;42:3023-9.
- Nobbs AH, Jenkinson HF, Jakubovics NS. Stick to your gums: mechanisms of oral microbial adherence. *J Dent Res.* 2011; 90: 1271-1278.
- Palmer CA, Kent R, Loo CY, Hughes CV, Stutius E, Pradhan N. Diet and caries-associated bacteria in severe early childhood caries. *J Dent Res* 2010;89:1224-9.
- Palmer R, Darveau R, Lamont R, Nyvad B, Teles R. Human Oral Bacterial Biofilms: Composition, Dynamics, and Pathogenesis. In *Biofilm Infections*. Springer New York.2011; 35-68.
- Papaoiannou W, Gizani S, Haffajee AD, Quirynen M, Mamai-Homata E, Papagiannoulis L. The microbiota on different oral surfaces in healthy children. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24: 183-189.
- Pehlivan ZC, Yanikoglu F, Tagtekin D, Hayran O. Caries Experience of Black Stained Teeth Using ICDAS II. *Ann Clin Lab Res* 2017;5(4): 211.
- Periasamy S, Kolenbrander PE. Central Role of the Early Colonizer *Veillonella* sp. in Establishing Multispecies Biofilm Communities with Initial Middle, and Late Colonizers of Enamel. *J Bacteriol.* 2010; 192: 2965-2972.

Philip N, Suneja B, Walsh LJ. Ecological approaches to dental caries prevention: paradigm shift or shibboleth? *Caries Res.* 2018;52(1–2):153–165.

Pickerill HP. A sign of immunity. *Br Den J.* 1923; 2; 967–968.

Pitts N. ‘ICDAS’ – An international system for caries detection and assessment being developed to facilitate caries epidemiology, research and appropriate clinical management. *Community Dent Health* 2004; 21: 193–198.

Pötsch L, Meyer U, Rothschild S, Schneider PM, Rittner C. Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA. *Int J Legal Med.* 1992;105:139–43.

Prskalo K, Sever EK, Alerić I, Jelić TA, Žaja I. Risk Factors Associated with Black Tooth Stain. *Acta Clin Croat* 2017; 56 (1): 28-35.

Pudakalkatti PS, Baheti AS, Hattarki SA, Kambali SS, Naik RM. Detection and prevalence of Capnocytophaga in periodontal Health and disease. *J Orofac Sci.* 2016; 8(2): 92-95

Ramachandra SS. Low levels of caries in aggressive periodontitis: A literature review. *Saudi Dent J.* 2014; 26(2): 47–49.

Reid JS, Beeley JA, MacDonald DG. Investigations into black extrinsic tooth stain. *J Dent Res.* 1977; 56(8):895–9

Reid JS, Beeley JA. Biochemical studies on the composition of gingival debris from children with black extrinsic tooth stain, *Caries Res.* 1976; 10(5): 363–369

Ritz HL. Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Archives of Oral Biologh* 1967;12:1561-8.

Ronay V, Attin T. Black stain-a review. *Oral Health Prev Dent.* 2011; 9: 37–45

Saba C, Solidana M, Berlutti F, Vestri A, Ottolenghi L, Polimeni A. Black stains in the mixed dentition: A PCR microbiological study of the etiopathogenic bacteria. *J Clin Pediatr Dent.* 2006;30(3): 219-224.

Sachdeo A, Haffajee AD, Socransky SS. Biofilms in the edentulous oral cavity. *J Prosthodont.* 2008; 17: 348-356.

Saikaly SS. Recurrent aphthous ulceration: a review of potential causes and novel treatments. *J Dermatol Treat.* 2018; 29(6):542-552.

Schloss PD. Identifying and Overcoming Threats to Reproducibility, Replicability, Robustness, and Generalizability in Microbiome Research. *MBio* 2018; 9(3).

Sfeatcu R, Luculescu C, Ciobanu L, Balan A, Gatin E, Patrascu I. Dental Enamel Quality and Black Tooth Stain: A New Approach and Explanation by using Raman and AFM Techniques. *Part Sci Tech.* 2015; 33(4): 429-435.

Shmuly T, Zini A, Yitschaky M, Yitschaky O. Can black extrinsic tooth discoloration predict a lower caries score rate in young adults? *Quintessence Int.* 2014; 45(5): 439-444.

Shukla SK, Harney M, Jhaveri B, Andrews K, Reed KD. Is a Black-Pigmented *Corynebacterium* Species an Opportunistic Pathogen during Pregnancy? Literature Review and Report of 3 New Cases. *Clin Infect Diseases.* 2003; 37(6): 834–837.

Sim CPC, Dashper SG, Reynolds EC. Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents. *J. Dent.* 2016, 50, 1–11

Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE. New Insights into the Composition and Functions of the Acquired Enamel Pellicle. *J Dent Res.* 2012; 91: 1110-1118.

Sissons CH. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res.* 1997; 11: 110–126.

Slavkin HC. Biofilms, Microbial Ecology and Antoni Van Leeuwenhoek. *J Am Dent Assoc.* 1997; 128(4): 492-495.

Slots J. The microflora of black stain on human primary teeth. *Scand J Dent Res.* 1974; 82(7); 484–490.

Soukos NS, Som S, Abernethy AD, Ruggiero K, Dunham J, Lee C, Doukas AG, Goodson JM. Phototargeting oral black-pigmented bacteria. *Antimicrobial Agents Chemother* 2005;49(4):1391-1366.

Stenudd C, Nordlund A, Ryberg M, Johansson I, Källestal C, Strömberg N. The association of bacterial adhesion with dental caries. *J Dent Res.* 2001; 80: 2005–2010.

Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187-209.

Sulieman M. An overview of tooth discoloration: extrinsic, intrinsic and internalized stains. *Dent Update.* 2005; 32: 463-471.

Surdacka A. Chemical composition of the saliva in children and adolescents with black tartar. *Czas Stomatol* 1989;42: 525-33.

Sutcliffe P. Extrinsic tooth stains in children. *Dent Pract Dent Rec* 1967;17:175–179.

Takashima Y, Matsumi Y, Yamasaki Y, Hirano K, Yanagida K, Fujita K, Matsumoto-Nakano M. Black pigmentation in primary dentition: Case report and literature review. *Pediatr Dent J.* 2014; 24(3): 184-188.

Tang G, Yip HK, Cutress TW, Samaranayake LP. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: A review. *J. Dent.* 2003; 31: 161–171.

Tanner AC, Mathney JM, Kent RL, Chalmers NI, Hughes CV, Loo CY, Pradhan N, Kanasi E, Hwang J, Dahlan MA, Papadopolou E, Dewhirst FE. Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1464-74.

Tantbirojn D, Douglas WH, Ko CC, McSwiggen PL. Spatial chemical analysis of dental stain using wavelength dispersive spectrometry. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106(5): 971–976

Theilade J, Slots J, Fejerskov O. The ultrastructure of black stain on human primary teeth. *Scand J Dent Res.* 1973; 81(7): 528–532.

Tilstone WJ, Savage KA, Clark LA. *Forensic Science: An Encyclopedia of History, Methods, and Techniques.* 6th ed. California: ABC-CLIO Publishers; 2006. 48.

Torlakovic L, Klepac-Ceraj V, Ogaard B, Cotton SL, Paster BJ, Olsen I. Microbial community succession on developing lesions on human enamel. *J Oral Microbiol.* 2012; 4:16125.

Üstek D, Abacı N, Sırma S, Çakiris A. Yeni Nesil DNA Dizileme: New Generation DNA Sequencing. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi. 2011; 1(1): 11-18.

Wanner O, Eberl H, Morgenroth E, Noguera D, Picioreanu C, Rittmann B, Loosdrecht M. Mathematical modeling of biofilms. IWA Biofilm Specialists Conference, 2014; 1: 36-45

Watts A, Addy M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. Br Dent J. 2001;190(6):309-16

William W. Wilfinger, Karol Mackey, and Piotr Chomczynski, Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity: BioTechniques. 1997; 22:474-481

Yalçın Çakır F, Gürkan S, Attar N. Çürük Mikrobiyolojisi (Microbiology of Dental Caries). Hacettepe Diş Hek Fak D. 2010; 34(3-4): 78-91.

Yoshida A, Tachibana M, Ansai T, Takehara T. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of black pigmented Prevotella species in oral specimens. Oral Microbiol Immunol 2005;20:43

Yu OY, Zhao IS, Mei ML, Lo EC, Chu CH. Dental Biofilm and Laboratory Microbial Culture Models for Cariology Research. Dentistry journal. Dent J (Basel). 2017; 19;5(2)

Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. Oral Dis. 2012; 18(2):109–120.

Zyla T, Kawala B, Antoszevska-Smith J, Kawala M. Black Stain and Dental Caries: A Review of the Literature. BioMed Res Int. 2015; 2015(469392).

9. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
Dış Hekimliği Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	2017-105			
	PROTOKOL ADI	Dış çevresinde oluşan siyah lekelerin kompozisyonu ve mikroflorasının Yeni Nesil Dizilme yöntemi (NGS) ile saptanması			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI	Dr. ZEYNEP CEREN PEHLİVAN			
	DÖĞER ARAŞTIRICILAR	Dr. FUNDA YANIKOĞLU			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	M.Ü.DİŞ HEKİMLİĞİ FAK			
	DESTEKLEYİCİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
FAZ 2	<input type="checkbox"/>				
FAZ 3	<input type="checkbox"/>				
FAZ 4	<input type="checkbox"/>				
Gözlemsel ilaç çalışması	<input type="checkbox"/>				
Tıbbi cihaz klinik çalışması	<input type="checkbox"/>				
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	<input type="checkbox"/>				
İlaç dışı klinik araştırma	<input checked="" type="checkbox"/>				
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TIK MERKEZ	ÇOK MERKEZLİ	ULUSAL	ULUSLARARASI	
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dil	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>		
DEĞERLENDİRİLEN BAĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama			
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>			
	BİYÜLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>			
	ILAN	<input type="checkbox"/>			
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>			
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>			
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>			
DÖĞER:	<input type="checkbox"/>				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2017-100	Tarih: 06.06.2017			
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırması/çalışması gerekçe, amaç, yaklaşımlar ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırması/çalışması başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel açıdan uygun olduğuna ilişkin etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yürürlükte Kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.				

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr. Nispet Gençoğlu
İmza:

Not: Etik Kurul Başkanı, incanama yer alınmadığı her sayfaya imza atmalıdır.



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
Diş Hekimliği Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
PROTOKOL ADI VE KODU	Diş çevresinde oluşan siyah lekelerin kompozisyonu ve mikroflorasının Yeni Nesil Dizilme yöntemi (NGS) ile saptanması Prot:2017-105
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Prof.Dr.Nimet Gençoğlu

UNVANI/ADISOYADI	UZMANLIK ALANI	KURUMU	İMZA
Prof. Dr. Nimet Gençoğlu	Endodonti	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fak.	
Prof.Dr.Ali Recai Mentiş	Çocuk Diş Hekimliği	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fak.	
Prof.Dr.İlknur Tanboğa	Çocuk Diş Hekimliği	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fak.	
Prof.Dr.Filiz Onat	Tıbbi Farmakoloji	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi	
Prof.Dr.Yaşar Özkan	Ağız Diş ve Çene Cerrahisi	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fak.	
Prof.Dr. Ahu Acar	Ortodonti	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fak.	
Prof.Dr.Zühre Hale Cimilli	Endodonti	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fak.	
Prof.Dr. Şebnem Erçalık Yalçınkaya	Ağız Diş ve Çene Radyoloji	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fak.	
Doç.Dr. Afife Binnaz Hazar Yoruç	Metallerji ve Malzeme Mühendisliği	İstanbul Yıldız Teknik Üniversitesi	
Doç.Dr. Buket Evren	Protetik Diş Tedavisi	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fak.	
Doç.Dr. Tolga Güven	Deontoloji	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi	
Dr. Zerrin Kurşun	Halk Sağlığı	Çekmeköy Toplum Sağlığı Merkezi	
Avukat Burçak Çopuroğlu	Hukuk	Serbest	
Gürol Pekel	Sivil	Serbest	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Nimet Gençoğlu
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzalarını her altımdaki her sayfaya imza atmalıdır.

Ek 2. Aydınlatılmış Onam Formu

ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Diş çevresinde oluşan siyah lekelerin özellikleriyle ilgili araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi “Diş çevresinde oluşan siyah lekelerin kompozisyonu ve mikroflorasının Yeni Nesil Dizileme (NGS) yöntemi ile saptanması” dır.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Bu araştırmayı yapmak istememizin nedeni, bazı bireylerde diş çevresinde siyah lekelerin varlığı tespit edilmektedir ve bu lekelerin varlığında ağızda çürüklerin oluşmadığı veya çok az olduğu gözlemlenmiştir. Amacımız, diş çevresinde oluşan siyah lekelerin çürük engelleyici etkisinin özellikle hangi bakterilerden kaynaklandığını bulmak ve bu mekanizmanın nasıl olduğunu aydınlatmaktır.

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalları'nın ortak katılımı ile gerçekleştirilecek bu çalışmaya katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Arş. Gör. Dt. Zeynep Ceren Pehlivan tarafından muayene edileceksiniz. Muayene öncelikle ağız içini çıplak gözle ayna-sond kullanılarak, ağız içi fotoğraflar ve röntgen kayıtlarının tutulmasıyla gerçekleştirilecektir. Muayene sonucunda doktorunuz uygun görürse bu çalışmaya alınacaksınız. Yine izniniz doğrultusunda bu çalışmayı yapabilmek için lekeli/lekesiz dişlerinizden bir el aleti yardımıyla plak örneği alınacaktır. Plak örneği alma işlemi sabah 08:30-11:30 saatleri arasında siz kahvaltınızı yaptıktan ve dişlerinizi fırçaladıktan sonra yapılacaktır. Örnek alımından hemen önce bir bardak berrak su ie ağızınızı çalkalamanız gerekmektedir. Alınan örnek küçük bir tüpte bulunan tampon çözeltiye konulacaktır. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsünde ileri bir yöntem olan Yeni Nesil Dizileme ile içeriğindeki bakteriler ve diğer mikroorganizmalar saptanacaktır.

Plak alınması sırasında oluşabilecek riskler: Plak alma işlemini “küret” adını verdiğimiz diş taşlarının kaldırılmasına yarayan keskin bir el aleti ile yapmaktayız. Diş ile teması sırasında dişetinde hafif hassasiyet duyabilirsiniz. Bu noktada ani baş hareketlerinden kaçınmalısınız. Plak örneği alma işlemi 3-5 dk. sürecektir. Numuneler alındıktan sonra bölge lastik frezlerle cilalanacaktır.

Bu çalışmaya toplamda sizin gibi 52 birey dahil edilecektir. Araştırma, Marmara Diş Hekimliği Fakültesinde Arş. Gör. Dt. Zeynep Ceren Pehlivan ve Danışman Öğretim Üyesi Prof. Dr. Funda Yanıkoğlu ve İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Tüm Genom Laboratuvarı çalışanları (4 kişilik akademik ekip) tarafından yapılacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Sizinle ilgili tıbbi bilgiler gizli tutulacak, ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Sayın Dt. Zeynep Ceren Pehlivan tarafından Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Ana Bilim Dalı bünyesinde tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağını bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi amacıyla araştırmacı tarafından araştırmadan çıkartılabileceğimi de biliyorum. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğimi biliyorum.

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dt. Zeynep Ceren Pehlivan’a 05432441638 numaralı telefonda ulaşabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve

gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.İmzalamış bulunduğum bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin adı-soyadı, imzası, adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının adı-soyadı, imzası

Arş. Gör. Dt. Zeynep Ceren Pehlivan

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin adı-soyadı, imzası,görevi

Ek 3. Hasta değerlendirme Formu

HASTA DEğERLENDİRME KARTI

Protokol no :

HASTA BİLGİLERİ:

Adı, Soyadı :

Yaş, Cinsiyet :

Tel (Cep) :

Adres :

e-posta :

DEğERLENDİREN HEKİM:

Adı, Soyadı :

Tarih:

	Evet	Hayır
Demir eksikliği durumu (Varsa MEDİKAL/BİTKİSEL ilaç kullanımı)		
Periodontal Sağlık, Genel Ağız Hijyeni		
Sigara kullanımı:		
Daha önce diş taşı temizliği yapıldı mı?		
Yapıldıysa tekrar lekeler ne kadar sürede oluştu?		
Diş fırçalama sıklığı / şekli :		

	MİKTAR	HİÇ/NADİR	AYDA 1 KEZ	HAFTADA 1 KEZ	HAFTADA 2 VE ÜZERİ	HERGÜN
Sakatat (Karaciğer,Dalak vs.)	1 porsiyon					
Maydonoz	1 demet					
İspanak	1 porsiyon					
Pekmez	4 yemek kaşığı					
Baklagiller	6 yemek kaşığı					
Kabak çekirdeği	1 avuç					
Mıdye	4 ve daha fazla					
Bitter Çikolata	100 mg.					
Çay	2 bardak					
Kahve	2 fincan					
Kuruyemiş (Kaju,badem,fıstık)	1 avuç					

AĞIZ İÇİ DEğERLENDİRME (ICDAS)

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Zeynep Ceren	Soyadı	ÇELİK
Doğum Yeri	Melikgazi	Doğum Tarihi	10.10.1992
Uyruğu	T.C.	Tel	05432441638
E-mail	zcerenpehlivan@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Marmara Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi	2019
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi	2015
Lisans	Marmara Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi	2015
Lise	TEV İnanç Türkeş Özel Lisesi	2010

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Araştırma Görevlisi Dt.	Marmara Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi	2016-2019

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce (TOEFL)	İleri (22/30)	İleri (25/30)	İleri (26/30)
Rusça (TORFL)	İleri (88)	İleri (92)	İleri (80)

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
87,5			89					

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	80		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

ZEYNEP CEREN CELIK

RESEARCH ASSISTANT

Marmara Üniversitesi Dis Hekimligi Fakultesi Basıbuyuk Yolu 9/3
34854 Maltepe- İSTANBUL | zcerenpehlivan@gmail.com |
+90 543 244 16 38



PERSONAL INFORMATION AND OBJECTIVE

Works and receives post-graduate education in Department of Restorative Dentistry as a Research Assistant in biggest and most equipped dental faculty in Turkey (Marmara University). Intrests include restorative dentistry, dental public health, preventive dentistry, cariology and oral microbiology. Enjoys to educate patients about personal dental care.

EDUCATION

2006- 2010 : High School Education

TEV Inanc Turkes High School for Gifted Students

(independent private co-educational boarding school for the gifted and talented), *Gebze-KOCAELI/TURKEY*

2010- 2015 : Bachelor of Science Degree&Master of Science Degree

Marmara University Faculty of Dentistry (M. Sc), İSTANBUL /TURKEY

2016- ... : Specialization in Dental Medicine (Research Assistant)

Marmara University Faculty of Dentistry, Department of Restorative Dentisty, İSTANBUL/TURKEY

ACADEMIC

2012 : Member of a project “Fırcalar Cantada Disler Yolunda” Attended to Karaman program of this project by making dental application in Karaman Villages (8 days)

2013 :Applicator of Dental Flour Varnish in Clever Kids Prepschool, Atasehir/Istanbul-TURKEY

2013-2015 : Head of Health Commission in Istanbul Youth Assembly

- 2013-2015 : Organizer of “Application of fluoride varnish and raising awareness in Urban Areas-Kayseri”
- 2013 : Founder of a “Preventive Oral Health Movement for Children with Special HealthCare Needs”, financially supported by Istanbul Municipality
- 2013 : Winner of Turkey (First Place) of ADA/Dentsply Student Clinicians Research Program – Poster Presentation (Presenting Author) in 2013 ADA Annual Dental Meeting, New Orleans /Louisiana-USA
- 2014 : Selected as a “Social Entrepreneurship” by presenting “Healthy Teeth, Healthy Smiles” project, Bilgi University /Istanbul-TURKEY
- 2015 : Took 301st place in Turkey Specialization in Dental Medicine (DUS Exam)
- 2016 : Poster Presentation (Presenting Author) in Congress of Restorative Dentistry 2016, Title: **“Multidisciplinary approach to Blumia Nevrosa Patient in order to obtain esthetics and function”** , Istanbul-TURKEY
- 2017 : Discussion Poster Presentation (Presenting Author) in 22nd BaSS Congress 2017, , Title: **“Multidisciplinary Treatment Procedures For A Patient With Anterior Diastema: A Case Report”** . Thessaloniki-Macedonia May-2017
- 2017 : Discussion Poster Presentation (Presenting Author) in ORCA 2017. Title: **Caries Experience Of Black Stained Teeth Using Icdas System”**. Oslo-Norway July-2017
- 2017 : Poster Presentation (Presenting Author) in 21th International Restorative Dentistry Congress. Title: **Minimally Invasive Approach to Patient with Alzheimer’s Disease with Severe Tooth Wear: A Case Report**. Eskisehir-Turkey December-2017
- 2017 : Poster Presentation in 21th International Restorative Dentistry Congress. Title: **Functional and biocompatible treatment of endodontically treated teeth broken below the gingival level: A Case Report**. Eskisehir-Turkey December-2017

- 2018 : Poster Presentation in I. International Preventive Dentistry Congress. Title: **Effect of demineralization time on hardness and depth of an enamel caries lesion: in vitro study.** Erzurum-Turkey March/2018
- 2018 : Discussion Poster Presentation (Presenting Author) in The 65th Congress of the European Organisation for Caries Research (ORCA). Title: **Short-Term Effects of Preventive Applications on Salivary Parameters in Mentally and Psychosocially Handicapped Children.** Copenhagen-Denmark 4-7 July 2018.
- 2018 : Discussion Poster Presentation in The 65th Congress of the European Organisation for Caries Research (ORCA). Title: **Residual Volumes After Cavity Preparation of Teeth Classified According to ICDAS II.** Copenhagen-Denmark 4-7 July 2018.
- 2018 : Oral Presentation in The 24th International Congress of the Turkish Dental Association Title: **Caries Awareness of X Generation and Y=Why? Generation Individuals.** Ankara 27-30 September, Turkey
- 2018 : Discussion Poster Presentation in The 24th International Congress of the Turkish Dental Association Title: **Evaluation of Iron Deficiency and Periodontal Status of Patients with Black Stains.** Ankara 27-30 September, Turkey
- 2017- ... : English-to-Turkish Translator in Academic Board of Dental Journal of QUINTESSENCE Turkey

PUBLICATIONS

- 2017 : **Pehlivan ZC**, Yanikoglu F, Tagtekin D, Hayran O (2017) Caries Experience of Black Stained Teeth Using ICDAS II. Ann Clin Lab Res 5(4) 211, 1-4 .(ISSN 2386-5180)
- 2017 : **Z.C. Pehlivan**, F. Yanikoglu, D. Tagtekin, O. Hayran (2017) Caries Status of Black Stained Teeth Using ICDAS System. Caries Res.51:48 (DOI: 10.1159/000471777)
- 2018 : Yanikoglu F, Korkut B, **Celik ZC**, Cetinbay C, Erkan K, Kocaman A, Tagtekin D (2018) Volumetric Tissue Loss of Carious Teeth Scored with ICDAS II. Int J Sci Res 7(4): 486-489 (ISSN 2277 – 8179)

- 2018 : **Z.C. Pehlivan-Celik**, B. Tarcin, S. Peker, O. Hayran, B. Alev-Tuzuner, A. Yarat (2018) Short-Term Effects of Preventive Applications on Salivary Parameters in Mentally and Psychosocially Handicapped Children. *Caries Res* 52: 518 (DOI: 10.1159/000488302)
- 2018 : F. Yanikoglu, C. Cetinbay, K. Erkan, B. Korkut, **Z.C. Pehlivan-Celik**, A. Kocaman, D. Tagtekin (2018) Residual Volumes After Cavity Preparation of Teeth Classified According to ICDAS II. *Caries Res* 52: 539 (DOI: 10.1159/000488302)
- 2018 : Avci H, Yanikoglu F, **Celik ZC***, Tagtekin D (2018). Non-invasive and reliable way for diagnosis of flat surface caries with different depths: Ultrasonic Systems (USG) (in press)

LANGUAGE SKILLS

- Turkish : Mother Tongue
- English : Advanced (YDS: 87,5; TOEFL:89)
- Russian :Advanced* (Russian International Language Examination (TORFL) exam B1, Moscow University Pushkin Language Center reading:88; speaking 92)

*Russian Translator of book titled: “Nadejda Konstantinovna by Vera Dridzo” – *Belge Publishhome* Russian translation ISBN: 9789753443913 (2008,January)

PROFESSIONAL MEMBERSHIPS

- Turkish Academy of Esthetic Dentistry (EDAD)
- European Organisation for Caries Research (ORCA-ID:822)
- Association Restorative Dentistry (RDD)
- Turkish Educational Foundation (TEV)
- Journal of Turkish Clinics (Türkiye Klinikleri)

CERTIFICATIONS & AWARDS

- Youngest Russian Translator Award in Turkey after publishing “Nadejda Konstantinovna by Vera Dridzo” – *Belge Publishhome* Russian translation (2008,January)
- Certificate of Achivement “Winner of 3rd Place of Turkey in Scientific Research Project Competition by TUBITAK– Chemistry Brach-”, ISTANBUL(2009, April)

- Certificate of Recognition for the contributions, participation and Poster Presentation named “It’s time for a New Model for a Megacity: Preventive Oral Health Movement for Children with Special HealthCare Needs” 2013 ADA Annual Meeting, New Orleans/LOUSIANA –USA (2013,November)
- Certificate for presenting “How to maintain Oral Health”, Elit Cambridge Schools/ISTANBUL(2015, September)
- Certificate of Participation for Dental Seminar named “2. Esthetics on Climax, Winter Semposium”, KAYSERI(2016, March)
- Certificate of Participation “Diode Laser Applications in Dentistry” by Ass.Prof. Dr. Sirin Guner , Guney Academy/ISTANBUL(2016, June)
- Certificate of Participation “Micro Mega R-Endo Retreatment” by Dr. Meric Karapinar Kazandag , Guney Academy(IDEX Fair)/ISTANBUL (2016, April)
- Certificate of Participation for “20th International Congress of Esthetic Dentistry” EDAD (Turkish Academy of Esthetic Dentistry), ISTANBUL (2016, October)
- Certificate of Participation and Poster Presentation in “20th International Scientific Congress of Association of Restorative Dentistry”, ISTANBUL (2016, October)
- Certificate of Participation and Poster Presentation in “22th International Balkan Stomalological Society (BaSS) Congress”, Thessaloniki-Greece (2017, May)
- Certificate of Participation and Poster Presentation in “64th International Scientific Congress of ORCA”, Oslo-Norway (2017, July)
- Certificate of Participation and Poster Presentation in “21th International Scientific Congress of Association of Restorative Dentistry”, Eskisehir-Turkey (2017, December)

REFERENCES

Prof. Dr. Funda Yanikoglu

fyarikoglu@marmara.edu.tr +90 532 366 65 55

Marmara University, Faculty of Dentistry. Department of Restorative Dentistry
Marmara Üniversitesi Dis Hekimligi Fakultesi, Basıbuyuk Yolu 9/3 34854 Maltepe-
Istanbul/TURKEY