

ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

HASTA DİŞLERİNDE BULUNAN *STREPTOCOCCUS MUTANS* SUŞLARININ
GENOTİPLENDİRİLMESİ VE DİŞ ÇÜRÜĞÜ İLE İLİŞKİLİ IL-10 GEN
SNP'SİNİN BELİRLENMESİ

Suha Hamid Obaid AL-MAMOORI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Suha Hamid Obaid AL-MAMOORI tarafından hazırlanan “**Hasta Dişlerinde Bulunan *Streptococcus mutans* Suşlarının Genotiplendirilmesi ve Diş Çürüğü ile İlişkili IL-10 Gen SNP'sinin Belirlenmesi**” adlı tez çalışması 01/09/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç Dr. Melda DÖLARSLAN

Eş Danışman : Prof. Dr. Basima Ahmed ABDULLAH

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç Dr. Melda DÖLARSLAN
Fiziki Coğrafya Anabilim Dalı
Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Mine TÜRKTAŞ
Biyoloji Anabilim Dalı
Gazi Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Serkan GÜLSOY
Orman Mühendisliği Anabilim Dalı
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Ebru ÖZDENİZ
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ebru GÜL
Orman Mühendisliği Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hamit ALYAR

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “**Hasta Dişlerinde Bulunan *Streptococcus mutans* Suşlarının Genotiplendirilmesi ve Diş Çürüğü ile İlişkili IL-10 Gen SNP'sinin Belirlenmesi**” konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (01/09/2023).

Suha Hamid Obaid AL-MAMoori

ÖZET

Doktora Tezi

HASTA DİŞLERİNDE BULUNAN *STREPTOCOCCUS MUTANS* SUŞLARININ GENOTİPLENDİRİLMESİ VE DİŞ ÇÜRÜĞÜ İLE İLİŞKİLİ IL-10 GEN SNP'SİNİN BELİRLENMESİ

Suha Hamid Obaid AL-MAMOORI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Eş Danışman: Prof. Dr. Basima Ahmed ABDULLAH

Bu araştırmanın amacı, *Streptococcus mutans*'ın neden olduğu çürük ile ilişkili hastalıkların mikroskopik olarak değerlendirilmesi, bakteri suşlarının genotiplenmesi, interlökin-10 genindeki polimorfizmlerin tespiti ve bunun diş çürüğü ile ilişkisinin belirlenmesidir. Bunun için Aralık 2021-Haziran 2022 tarihleri arasında farklı hastanelerden 50 şiddetli diş çürüğü olan ve 50 sağlıklı kişiden örnek alınmıştır. Alınan örneklerden izole edilen *Streptococcus mutans* için seçici bir ortam olan mitis salivarius agar kullanılmıştır. *S. mutans*'ın dokuz suşunda dexA gen dizisinin BioEdit tabanlı genotiplenmesi yapılmıştır. Suh. Weh. 1-9 arası rastgele seçilerek dokuz izolatın hepsinde dizi varyasyonu belirlenmiştir. BioEdit'e dayalı çoklu hizalama sonucunda, *S. mutans* içinde 5, Geneious prime yazılımına dayanan çoklu hizalamada ise 9 genotip tespit edilmiştir. Filogenetik ağaçlar, çevirim içi olarak ve daha sonra MEGA 6 programı kullanılarak oluşturulmuştur. Yapılacak moleküler çalışmalarda kullanılacak primerler *S. mutans* için özel olarak oluşturulmuştur. İmmünojenetik çalışmada, IL-10 geninin promotörünün yanındaki primer çiftinin, amplifikasyon altında hedefi başarıyla amplifiye ettiğini ortaya çıkmıştır. Mikropların doğuştan tanımlanması enfeksiyona karşı ilk savunma hattıdır ve IL-10 bu süreçte önemli bir rol oynar. Antimikrobiyal bağışıklığı aktive etmek, bağışıklık ile ilgili birden fazla bozukluğun IL-10 kodlama varyantlarıyla ilişkilendirilmesi, bağışıklıkta IL-10 sinyallemesinin fizyolojik önemini vurgulamaktadır. Bu çalışmada, güçlü bir antimikrobiyal savunma sağladığı bilinen IL-10 alelinde bir mutasyon kullanılmıştır.

2023, 68 sayfa

ANAHTAR KELİMELE: Diş çürüğü, *Streptococcus mutans*, Interlökin-10, Polimorfizm, PCR

ABSTRACT

PhD Thesis

GENOTYPING OF STREPTOCOCCUS *MUTANS* STRAINS FOUND IN PATIENT TEETH AND IDENTIFICATION OF IL-10 GENE SNP ASSOCIATED WITH DENTAL CARIES

Suha Hamid Obaid AL-MAMOORI

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Melda DÖLARSLAN
Co-Advisor: Prof. Dr. Basima Ahmed ABDULLAH

The aim of this study was to microscopically evaluate caries-associated diseases caused by *Streptococcus mutans*, genotyping of bacterial strains, detection of polymorphisms in the interleukin-10 gene and determination of its association with dental caries. For this purpose, samples were taken from 50 people with severe dental caries and 50 healthy people from different hospitals between December 2021 and June 2022. Mitis salivarius agar, a selective medium, was used for *Streptococcus mutans* isolated from the samples. BioEdit-based genotyping of the dexA gene sequence was performed in nine strains of *S. mutans*. Suh. Weh. 1-9 were randomly selected and sequence variation was determined in all nine isolates. Multiple alignment based on BioEdit identified 5 genotypes in *S. mutans* and multiple alignment based on Geneious prime software identified 9 genotypes. Phylogenetic trees were constructed online and then using the MEGA 6 program. The primers to be used in the molecular studies were created specifically for *S. mutans*. The immunogenetic study revealed that the primer pair next to the promoter of the IL-10 gene successfully amplified the target under amplification. Innate identification of microbes is the first line of defense against infection and IL-10 plays an important role in this process. Activating antimicrobial immunity, multiple immune-related disorders have been associated with IL-10 coding variants, highlighting the physiological importance of IL-10 signaling in immunity. In this research, a mutation in the IL-10 allele known to confer a strong antimicrobial defense was used.

2023, 68 pages

Keywords: Dental caries, *Streptococcus mutans*, Interleukin-10, Polymorphism, PCR

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanlarım Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN'a ve Prof. Dr. Basima Ahmed ABDULLAH'a sabırları, rehberlikleri ve anlayışları için teşekkür ederim.

Suha Hamid Obaid AL-MAMOORI

Çankırı, Eylül 2023



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1 <i>Streptococcus mutans</i> 'ın Sistematığı	4
2.2 <i>S. mutans</i> 'ın Genel Karakterizasyonu	4
2.3 Ağız Sağlığı Hastalıkları.....	5
2.4 <i>Streptococcus mutans</i> 'ın Karakterizasyonu	6
2.5 <i>S. mutans</i> için Genotipleme Yöntemleri.....	6
2.6 Diş Çürükleri	8
2.7 Diş Çürümesi ve Gen Polimorfizmleri	9
2.8 İnterlökin 10 (IL-10)	9
3. MATERYAL VE METOT	12
3.1 Materyal	12
3.1.1 Makine ve teçhizat	12
3.1.2 Kimyasal ve biyolojik maddeler	12
3.1.3 Polimeraz zincir reaksiyonu malzemeleri	13
3.1.4 Primerler	13
3.1.5 Tam kandan genomik DNA'nın saflaştırılması	14
3.1.6 Kullanıma hazır reaktifler	14
3.1.7 Kültür ortamı	14
3.2 Sterilizasyon Yöntemleri	16
3.3 Çalışma Kapsamında Kullanılan Reaktifler	16
3.3.1 Katalaz reaktifi	16

3.3.2 Basitrasin çözeltisi	16
3.3.3 Normal salin	17
3.3.4 Potasyum tellür	17
3.3.5 Oksidaz test reaktifi.....	17
3.3.6 Kovac reaktifi.....	17
3.3.7 Barrette reaktifi	17
3.3.8 Karbonhidrat fermantasyon ortamı	18
3.4 Etik	18
3.5 Örneklerin Toplanması	18
3.6 Mutans Streptokoklarının İzolasyonu	19
3.6.1 Hasta ve kontrol grupları.....	19
3.7 <i>S. mutans</i> 'ın Fenotipik Tanımlanması.....	20
3.8 Bakteriyel Tanımlama için VITEK-2 Sistemi	23
3.9 Genotipleme Deneyi (Genomik DNA Ekstraksiyonu)	23
3.9.1 Tam kandan genomik DNA ekstraksiyonu	23
3.9.2 Diş yıkama ile genomik DNA ekstraksiyonu.....	24
3.9.3 DNA konsantrasyonunun ve saflığının tahmini.....	25
3.9.4 Reaksiyon karışımı	25
3.9.5 Termal döngü koşulları.....	26
3.9.6 IL-10 genotipinin güvencesi	27
3.9.7 Amplifikasyon ürünlerinin tespiti için agaroz jel elektroforezi	27
3.10 Moleküler Çalışma.....	27
3.10.1 <i>S. mutans</i> 'ın genomik DNA ekstraksiyonu	27
3.10.2 Primer tasarımı	28
3.10.3 PCR ampliconlarının DNA dizilemesi	29
3.10.4 Dizileme verilerinin yorumlanması	29
3.10.5 SNP'lerin yeniliğinin kontrol edilmesi	29
3.10.6 Filogeni ağacı	29
3.11 İstatistiksel Analiz.....	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1 Geleneksel Tanımlama: <i>S. mutans</i> 'ın Fenotipik ve Biyokimyasal Tanımlaması	31

4.2 Mutans Streptokokların İzolasyonu	32
4.3 <i>S. mutans</i> 'ın Moleküler Tanımlanması	33
4.3.1 Spesifik primer tasarlama konumu	33
4.3.2 Silico PCR ile güçlendirilmiş dexA geninin kısmi dizisi.....	34
4.3.3 dexA geninin hedeflenen dizisinin PCR'ı	35
4.3.4 <i>S. mutans</i> konformasyonunu belirlemek için dizi çalışması	35
4.3.5 Sekans sonuçlarına dayalı olarak <i>S. mutans</i> genotiplemesi.....	36
4.4 HB750_04715 Genine Dayalı <i>S. mutans</i> Suşlarının Genotiplendirilmesi.....	40
4.4.1 Spesifik primer PAR'ın HB750_04715 geni üzerindeki yeri	40
4.4.2 HB750_04715'in silico PCR ile çoğaltılmış kısmi dizisi	41
4.4.3 PCR'a dayalı <i>S. mutans</i> genotiplemesi.....	42
4.4.4 <i>S. mutans</i> 'ın yerel suşlarının genbank'ta depolanan referans suşlarla çift yönlü hizalanması.....	43
4.4.5 BioEdit'e dayalı olarak <i>S. mutans</i> 'ın HB750_04715 geninin dokuz dizisinin genotiplendirilmesi.....	43
4.4.6 <i>S. mutans</i> 'ın dokuz sekans HB750_04715 geninin Geneious prime yazılımına dayalı olarak genotiplendirilmesi	44
4.4.7 <i>S. mutans</i> 'ın çevrimiçi çoklu hizalama dizi analizine ve MEGA 6 yazılımına dayalı filogeni ağacı.....	45
4.5 IL-10'un Polimorfizmi	47
4.5.1 IL-10'un ve primerlerin yan bölgelerinin konumları.....	48
4.5.2 IL-10 geni üzerindeki SNP'lerin konumu	49
4.5.3 IL-10 geninin amplifikasyon kısmını içeren SNP'ler (rs1800871 T>C, rs1800872)	49
4.5.4 Hedeflenen bölgenin kromatogramlarının çoklu hizalamaları	50
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ.....	68

SİMGELER DİZİNİ

bp	Baz çifti
°C	Derece santigrat
g	Gram
L	Litre
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
sa	Saat
U	Ünite
%	Yüzde



KISALTMALAR DİZİNİ

API	Analitik profil indeksi
AP-PCR	İsteğe bağlı olarak hazırlanmış polimeraz zincir reaksiyonu
BA	Kan agar
BBA	Bağlama tamponu
CWS	Kolon yıkama solüsyonu
DMFT	Çürük olan dolgulu dişler
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
GD	Genomik DNA
HWE	Hardy-Weinberg dengesi
IL-10	İnterlökin-10
MSB Agar	Mitis salivarius basitrasın agar
NCBI	Ulusal biyoteknoloji bilgi merkezi
OPA	Oligoprimere
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	Rastgele polimorfizm DNA'sının amplifikasyonu
RFIP	Kısıtlama parça uzunluğu polimorfizmi
RLB	RBC lizis tamponu
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1	Diş çürüğü, tükürük ve hastalardan örnek toplama şeması	20
Şekil 4.1	Mitis salivarius agar plakasındaki <i>Streptococcus mutans</i> 'ın koloni morfolojisi. A-tek koloni, B ve C çizgi oluşturma kültür yöntemleri ve büyüme	33
Şekil 4.2	<i>S. mutans</i> dexA geninin kısmi dizisinin amplikon bölgesi	34
Şekil 4.3	Spesifik primer ile amplifiye edilen dexA geni amplikonunun grafik dizisi ..	34
Şekil 4.4	<i>S. mutans</i> 'ın dexA geninin amplifikasyon kısmi dizisinin PCR ürünleri	35
Şekil 4.5	<i>S. mutans</i> izolat dizisi ile Blast programı kullanılarak NCBI raporunun sonuçları	36
Şekil 4.6	BioEdit yazılımına dayalı olarak dokuz <i>S. mutans</i> 'ın genotiplenmesi	37
Şekil 4.7	Geneious prime yazılımına dayalı olarak <i>S. mutans</i> 'ın genotiplenmesi tarafından gerçekleştirilen hizalama.....	38
Şekil 4.8	<i>S. mutans</i> Suh.Wed suşu 1 ile gen bankası hizasında saklanan 7 referans <i>Streptococcus mutans</i> suşunun çevrimiçi filogeni ağacı.....	39
Şekil 4.9	<i>S. mutans</i> CP044221.1 referans suşu ve <i>S. pneumoniae</i> KB371854.1 ile ağaç kökü ile dexA gen hizalamasının Mega 6 UPGM ile filogeni ağacının oluşturulması	40
Şekil 4.10	<i>S. mutans</i> kromozomu üzerinde 931677-932091 arasındaki bölgede seçilen amplikon bölgesini çoğaltmak için tasarlanan primer çifti bölgesi....	41
Şekil 4.11	<i>S. mutans</i> kromozomu üzerinde 931677-932091 arasında yer alan, spesifik primer çifti ile çoğaltılan amplikonun 11 grafik dizisi.....	42
Şekil 4.12	<i>S. mutans</i> 'ın tiplendirilmesi için seçilen genin amplifikasyon kısmi dizisinin PCR ürünlerinin jel elektroforezi	42
Şekil 4.13	Yerel <i>S. mutans</i> suşunun gen bankasında depolanan referans suşlarla ikili olarak hizalanması.....	43
Şekil 4.14	BioEdit yazılımına dayalı sekiz <i>S. mutans</i> suşu için seçici genin kısmi dizisinin çoklu hizalanması	44
Şekil 4.15	Geneious prime yazılımı tarafından gerçekleştirilen hizalama.....	45
Şekil 4.16	WAHEEDA ile hizalanan 12 referans <i>S. mutans</i> suşunun çevrimiçi filogeni ağacı	46
Şekil 4.17	Seçilen genin sekiz <i>S. mutans</i> dizisinin filogeni ağacının Mega 6 yazılımı ile oluşturulması	47
Şekil 4.18	Primerin amplikon sekansı ve yan bölgesi	48
Şekil 4.19	SNP'leri kapsayan F10 primer çifti tarafından amplifiye edilen IL-10'un promotör bölgesinin hedeflenen bölgesi	48
Şekil 4.20	SNP'leri kapsayan F10 primer çifti tarafından amplifiye edilen IL-10'un kısmi dizisinin hedeflenen bölgesi	49
Şekil 4.21	IL10'un hedef DNA bölgesindeki SNP'ler.....	50

Şekil 4.22 IL10'un hedef DNA bölgesi olarak hedeflenen bölge chr1:206772998-206773585'in kromatogramlarının çoklu hizalaması: rs1800871 T>C, rs1800872 A>C, hasta hastalığı vakaları.....	51
Şekil 4.23 IL10'un hedef DNA bölgesi olarak hedeflenen bölge chr1:206772998-206773585'in kromatogramlarının çoklu hizalaması: rs1800871 T>C, rs1800872 A>C, Kontrol vakaları.....	51



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Çalışmada kullanılan makine ve teçhizat.....	12
Çizelge 3.2	Kimyasal ve biyolojik malzemeler	13
Çizelge 3.3	Standart PCR kiti bileşenleri.....	13
Çizelge 3.4	Genomik DNA için saflaştırma kiti ve tamponu	13
Çizelge 3.5	Çalışmada kullanılan primerler.....	14
Çizelge 3.6	Genomik DNA için ekstraksiyon kiti	14
Çizelge 3.7	Çalışmada kullanılan kültür ortamları	15
Çizelge 3.8	IL-10 genindeki gen polimorfizmi ve <i>S. mutans</i> için PCR reaksiyon karışımının içeriği	26
Çizelge 3.9	<i>S. mutans</i> genine yönelik spesifik primerler için termal döngü koşulları..	26
Çizelge 3.10	IL-10'a yönelik spesifik primerler için termal döngü koşulları	26
Çizelge 4.1	<i>S. mutans</i> 'ın biyokimyasal test sonuçları	31
Çizelge 4.2	SNP'nin yabani tip alel ve mutant allelinin genotip dağılımı ve alel sıklığı: kontrol grubu	52
Çizelge 4.3	SNP'nin yabani tip alel ve mutant allelinin genotip dağılımı ve alel sıklığı: hasta grubu.....	52

1. GİRİŞ

Diş çürükleri, sağlık hizmeti gerektiren popüler insan sağlığı sorunlarından biri olarak görülmektedir. Tüm yaş gruplarında diş çürüğü görülmektedir. Çoğu vaka, dişlerin ve diş çevresindeki dokunun tahribatına neden olan mikrobik veya parazitik enfeksiyonlar olarak tanımlanmaktadır. Bazı patojenler insanlar arasında bulaşabilir (Bostancı and Belibasakis 2012).

Diş çürüğü muhtemelen ağız boşluğunun en yaygın bilinen hastalığıdır, özellikle 5 ile 12 yaş aralığındaki çocukları etkiler ve dünya çapında en aralıklı karşı konulamaz hastalık olarak düşünülür (Linossier *et al.* 2011). Bu durum nevrotik etkileşimdir, çok faktörlü, sınırlı, post-eruptif ve bulaşıcıdır, sonunda sert diş dokularını yok eder (Acuña *et al.* 2004). Bu sorunun başlaması ve gelişmesi, yaralanmanın evresine bağlı olarak değişen bol miktarda mikroorganizmanın varlığına bağlıdır (Figuroa-Gordon *et al.* 2009). Ağız bakterilerinin koordineli toplulukları olan biyofilmler, organizmanın bağışıklık sistemi ile hassas bir denge içinde dişleri kolonize eder (Reyes *et al.* 2012). Fermentatif sindirimle ilişkili bakteri popülasyonunun varlığına rağmen sükroz tüketimindeki bir artış (Figuroa-Gordon *et al.* 2009), hem tükürüğün aşındırıcı bitmiş sonuçları ortadan kaldırma sınırını hem de tükürük/plak destek çerçevesinin öldürme gücünü aşarak biyofilmin ekstra fermentasyonunu sağlayabilecek daha fazla aşındırıcı oluşumla sonuçlanır (Forssten *et al.* 2010).

Günümüzde periodontal enfeksiyonlarla tek bir mikroorganizmanın değil, bir grup mikrobik organizmanın ilişkili olduğu genel olarak kabul edilmektedir. Gerçekte, periodontal bakterilerin subgingival bölgede kolonize olması, çevre periodontal dokuda enflamasyonu ilk tetikleyen olgudur. Örneğin, streptokoklar ve aktinomiçesler diş yüzeylerindeki en yaygın erken veya önemli kolonizatörlerdir. Zamanla, diş etleri ve dişlerin birleştiği yer Gram-pozitif fakültatif anaerobik mikroplar daha az yaygın hale gelir ve yerlerini Gram-negatif anaeroblara bırakır (Jenkinson and Lamont 2006).

Diş çürüklerinin başlıca patojen olan *Streptococcus mutans*, kalp kapakçığı dokularında ve ateromatöz plak testlerinde diğer türlere kıyasla alışılmadık derecede yüksek bir tekrar oranında bulunmuştur (Nakano *et al.* 2006). Bir fare modelinde yapılan araştırmalarda, *P. gingivalis* gibi *S. mutans*'ın da aterojenik plak oluşumunu hızlandırdığını ve trombosit sayısını artırdığını, her ikisinin de kan pıhtısı oluşumunu teşvik ettiğini göstermiştir (Kuramitsu *et al.* 2001).

Aktif bireylerde görülen çürük vakalarının RAPD-PCR sonuçları, popülasyonda çok çeşitli *S. mutans* genotiplerinin bulunduğunu göstermiştir (Napimoga *et al.* 2004). Önceki genotipleme yöntemlerinin çoğu A-PCR'ye dayanmaktaydı ve bu modlar spesifik olmayan primerler kullandığı için gözenek üretim yöntemleri olarak kabul edilmekteydi.

Periodontitisin kalıcı ve agresif olarak iki ana kategorisi vardır. Geri dönüşü olmayan ve dinamik periodontal hastalık periodontitis, diş kaybına ve diş fonksiyonlarında bozulmaya neden olabilir (Duarte *et al.* 2015).

Çok çeşitli hücreler, geniş biyolojik etkilere sahip olan ve makrofajlar ve T lenfositler de dahil olmak üzere hücre ve humoral konak yanıtlarında önemli bir rol oynayan sitokin interlökin-10 (IL-10) salgılar. Genel kanının aksine, IL-10 hem normal hem de anormal yanıtları azaltma işlevi gören bir sitokindir. Normal periodontal dokular ve nevrotik durumlar tarafından salgılanan sitokinlerdeki değişiklikleri göstermek için çalışmalar yapılmış olsa da, IL-10'un periodontal koşullardaki eklemlenme profili gizemini korumaktadır (Mannino *et al.* 2015).

Periodontitisin temel patofizyolojisini tanımlamak için protein fonksiyonunu ve artikülasyon kalitesini düzenleyebilen IL-10'daki polimorfizm düzenli olarak ele alınmıştır. IL-10 aktivitesinin yönlendirilmesinde kilit rol oynayan çok sayıda SNP sayılmıştır, Çeviri başlatma noktası rs1800872-592'de bulunan bir varyantla ilişkilidir. Birçok çalışma IL-10 rs1800872 (-592, -590, -597 C>A) ve periodontal hastalıklar arasındaki bağlantıyı incelemiştir, ancak çelişkili sonuçlar bulmuşlardır Nüfus temelli bir çalışmadan (Toker *et al.* 2018) elde edilen kanıtlar, IL-10'da (rs1800872) bir polimorfizm olduğunu ortaya koymuştur.

Yapılan alımlarada, *Streptococcus mutans*, diş çürüklerinin başlangıcından sorumlu önemli bir mikroorganizma olarak görölmektedir. *S. mutans* bireyler arasında, özellikle de aileler içinde iletişim kurabilir. Bu alışmada, *S. mutans* düzenini değiştirebilmek için başka bir genotipleme yolu oluşturulmuştur. Bu metodoloji, birbiriyle sıkı sıkıya ilişkili bireyler arasında yeterli ayrımı yapabilmekte ve zayıf RAPD-PCR genotipleme yöntemleri gibi alışıla gelmiş diğer genotipleme yöntemlerine kıyasla daha iyi güvenilirlik sunmaktadır. Böylece, bu bakterinin etrafında dönen ve diş çürüklerinin önlenmesi ve tedavisine yönelik zorlayıcı genel sağlık metodolojilerine muhtemelen daha yardımcı olabilir.

Bu alışma, yetişkin gönüllülerin tükürüklerinden izole edilen *Streptococcus mutans*'ın genotipik tanımlanması için belirli primerlerin kullanılmasının etkinliğini ve tükürük örneklerini kültüre etmeden doğrudan PCR yöntemini değerlendirmeyi amaçlamıştır. Ayrıca, bu çalışmada diş çürüğü geçiren hastalarda IL-10'daki polimorfizm değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu doğrultuda, doktor kontrolünde herhangi bir diş çürüğü komplikasyonu geçiren hastalardan diş yıkama örneklerinin alınması, alınan örneklerin yıkama dişlerinde doğrudan DNA'ya tabi tutulması ve *S. mutans* izolasyonu için besleyici MSA besiyerinde kültüre edilmesi, *S. mutans*'ın tanımlanması için fenotipik, biyokimyasal, kültürel testlerin uygulanmas ve spesifik primerler kullanılarak genotipleme yönteminin yapılması, Diş ürüğü geçiren hastalardan alınan kan ve tükürük örneklerinden DNA ekstraksiyonunun yapılması, DNA örneklerinin mantarlar için spesifik primer çiftleri ile amplifikasyonu, PCR ürünlerinin dizi analizi ile IL-10 SNP'sinin değerlendirilmesi ve Genius Primer yazılımı ve BioEdit yazılımına dayalı biyoinformatik analiz moleküler verilerinin düzenlenmesi amaçlanmaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Streptococcus mutans*'ın Sistematığı

Streptococcus mutans bakterisi, anaerobik ortamlarda gelişen ve insanlarda diş çürümesinin önemli bir nedeni olan gram pozitif bir streptokoktur (yuvarlak bakteri). "Streptokok" terimi *Streptococcus* cinsinin herhangi bir üyesini belirtmek için kullanılır. 1924 yılında James Kilian Clarke mikroorganizmayı karakterize eden ilk kişi olmuştur (Clarke 1924).

Yakın akraba bir tür olan *Streptococcus sobrinus* da bu bakteri ile ağız boşluğunu paylaşabilir: Ağız hastalığına her ikisi de neden olabilir ve laboratuvarında ikisini ayırt etmek maliyetlidir ve çoğu zaman klinik olarak gerekli değildir (Sánchez-Pérez and Gío 2007, Shahabuddin *et al.* 2016). Bu nedenle, mutans streptokoklar klinik amaçlar için tipik olarak birlikte değerlendirilir. Viridans streptokoklar, aynı tropizme sahip bu bakteri kümelenmesini sergileyen başka *Streptococcus* türüdür.

- Alem: Bakteriler
- Şube: *Fimicutes*
- Sınıf: Basil
- Takım: Laktobasilaz
- Familya: *Streptococcaceae*
- Cins: *Streptococcus*
- Tür: *S. mutans* (Clarke 1924)

2.2 *S. mutans*'ın Genel Karakterizasyonu

S. mutans dahil en az 25 farklı oral streptokok türünün insan ağız mikrobiyomunda rutin olarak bulunduğu düşünülmektedir. Bu mikroorganizmaların sınıflandırılması henüz başlangıç aşamasındadır (Nicolas and Lavoie 2011). Her türün, belirli bir ağız bölgesinde kolonileşmeye çok uygun olmasını sağlayan benzersiz özellikleri vardır ve bu alanlar,

ağız boşluğu boyunca farklı ekolojik alanları temsil eder. Ağız boşluğunda *S. mutans* toplam streptokokların %39'unu oluşturur. En sık çukur ve çatlaklarda görülür. Bukkal yüzeyde %2-9 oranında *S. mutans* bakterisi tespit edilmiştir (Nicolas and Lavoie 2011).

S. mutans'ın bakteriyel karyojenik potansiyeli, *S. mutans* ve *Candida albicans* arasındaki simbiyotik ilişki, glukan üretiminin ve biyofilm oluşumunun artmasına yol açmaktadır. Dolayısıyla bu durum *S. mutans*'ın karyojenik etkisini güçlendirmektedir (Metwalli *et al.* 2013).

Ağızdaki streptokoklar sağlığımız için yararlı ya da zararlı olabilir. Normalde konakçının yüzeyinde ikamet eden streptokoklar fırsatçı patojenlere dönüşebilir ve doğru koşullar oluştuğunda hastalık ve hasara neden olabilir. Ağızdaki rahatsızlıklar, mikrobiyal topluluğun dengesinin bozulmasıyla başlayabilir.

2.3 Ağız Sağlığı Hastalıkları

Streptococcus mutans veya *S. sanguinis* gibi başka bir karyojenik streptokok içeren tükürük, bakteri içeren yiyecek veya içeceklerle temas ederse oral enfeksiyon kaynağı olabilir (Dewhirst *et al.* 2010). Tükürüğünde yüksek *S. mutans* sayısı (>105 koloni oluşturan birim) olan enfekte bir kişiden, *S. mutans* bulaşması en çok çocuklarda görülür (Cephas *et al.* 2011). *S. mutans* insan diş plağında yaygın olarak bulunur ve diş çürükleriyle ilişkilendirilmiştir *S. mutans* insan diş plağında yaygın olarak bulunur ve diş çürükleriyle ilişkilendirilmiştir (Nibali 2015). Diş minesini, dentin ve diğer bağlı sert dokulardaki minerallerin parçalanması ve kaybıdır. Diş çürükleri, diş yüzeyinin bakteriyel fermentasyonun asidik yan ürünleriyle uzun süre temas etmesinden kaynaklanır. Dişler üzerindeki kireçli beyaz lekeler, mikrokaviteler olarak da bilinen minenin demineralizasyonunun ilk kanıtıdır (Matsui and Cvitkovitch 2010). Kahverengi bir lezyonla gösterilen aktif çürükler diş çürümeye, diş eti iltihabına ve diş yapısının kaybına neden olabilir. Çiğneme ağrısı, çene ağrısı, diş hassasiyeti, dişlerde renk değişikliği, yüzde iltihaplanma, hafif ateş ve baş ağrısı bu durumun yaygın klinik belirtileridir (Rickard *et al.* 2003). Ağız kokusu ve ağızda ekşi bir tat diş çürüğünün belirtileri olabilir. *Pyogenes*'in neden olduğu ağız enfeksiyonları geçici ya da kalıcı

olabilir. Diş çürükleri akut bir çürük durumu sırasında yanal olarak yayılır ve erken bir aşamada hızlı pulpa dokusu dejenerasyonuna neden olur.

Tedavi edilmemiş diş çürükleri devam eder ve bakteriyemiye neden olursa fırsatçı kalp kapağı endokarditi mümkündür. Yüksek derecede virülan *S. mutans* suşları da ülseratif kolitin kötüleşmesiyle ilişkilendirilmiştir. Uygun bir patolojik açıklama olmadan, bu tür olasılıkların varlığını göz ardı edilmemelidir (Mang-De La Rosa *et al.* 2014, Belibasakis *et al.* 2019).

2.4 *Streptococcus mutans*'ın Karakterizasyonu

S. sobrinus'u da içeren mutans streptokoklar arasında *S. mutans*, cinsin tek gram-pozitif, fakültatif anaerobik üyesidir. *S. sobrinus*, mutans streptokoklar için seçici bir besiyeri olan Mitis-salivarius agar içeren plaklarda üretildiğinde düzgün bir koloni şekline sahipken, *S. mutans* hastalığın başlamasındaki rolü nedeniyle diş çürüklerinin önemli bir patojeni olarak kabul edilmektedir (Kreulen *et al.* 1997, Nakano *et al.* 2006, Nakano and Ooshima 2009).

Pioneer morfolojisi, Mitis-salivarius veya Mitis-salivarius-basitrasın agar gibi belirli besiyerlerinde *S. mutans* ve *S. sobrinus*'un varlığını belirlemek için kullanılmıştır (Saravia *et al.* 2013). Franco *et al.* (2007) yaptıkları çalışmada, *S. mutans*'ı *S. sobrinus*'tan ayırmanın zor ve zaman alıcı olduğunu belirtmiştir. Taranan bakteri durumlarına ilişkin immünolojik ve biyokimyasal testlerin sonuçları sunulmuştur. Her durumda, MS türlerinin kolay, hızlı ve güvenilir bir şekilde ayırt edilmesi için bir polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi de geliştirilmiştir (Oho *et al.* 2000, Nakano *et al.* 2004).

2.5 *S. mutans* için Genotipleme Yöntemleri

Tükürük çok çeşitli *S. mutans* genotipleri içerir ve geleneksel olarak bunları ayırt etmek için dental biyofilm ve RAPD-PCR tekniği kullanılmıştır (Arthur *et al.* 2007, Lembo *et al.* 2007, Redmo Emanuelsson *et al.* 2003). Bu yöntemin doğruluğu, *S. mutans* genotipik

kimliğine yönelik alternatif yaklaşımlarla karşılaştırıldığında tartışmalıdır (Li *et al.* 2001). *S. mutans* genotiplenmesinde isteğe bağlı primerler kullanmıştır. AP-PCR genotiplenmesine, çeşitli öznel ön testler kullanılarak ek ağırlık verilmesi önerilmiştir (Truong *et al.* 2000). Ön oligoprimler OPA 05 ve OPA 13, Saarela *et al.* (1996) tarafından tanımlandığı gibi *S. mutans* genotiplerini ayırt etmede etkili olmuştur (Truong *et al.* 2000, Redmo Emanuelsson *et al.* 2003). OPA 03 ve OPA 18'in *S. mutans*'ı diğer oral bakterilerden ayırt etme yeteneği, mutans streptokoklar arasında genotipik çeşitlilik üzerine yapılan bir çalışmada doğrulanmıştır. Li and Caufield (1998), *S. mutans* referans suşlarının genotiplendirilmesi için birçok isteğe bağlı hazırlık tekniğini değerlendirdikten sonra, OPA 02'nin genotip ayırımında en iyi gücü gösterdiğini ve farklı primerlerle karşılaştırıldığında en fazla sayıda ampikon verdiğini öne sürmüştür.

S. mutans'ın genotipik çeşitliliği, geleneksel karşı ilaçların ötesinde hastalığı önlemek ve sağlığı iyileştirmek için çürüklere yönelik yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir (Napimoga *et al.* 2005).

Kreulen *et al.* (1997) çürük ilerlemesi ve genotip çeşitliliği arasında negatif bir korelasyon bulmuş olsa da Lembo *et al.* (2007) çürük olmayan ve çürük olan çocuklarda tespit edilen genotip sayısında önemli bir fark bulamamıştır (Mitchell *et al.* 2009), Mevcut araştırmanın bulguları *S. mutans*'ın kalıtsal çeşitliliği ile çürük ilerlemesi arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Önceki araştırmalarla tutarlı olarak, diş çürüğü olan okul öncesi çocuklarda genotip sayısı çürük olmayanlara göre daha yüksektir (Napimoga *et al.* 2004).

Altı ve yedi yaşlarındaki çocukların tükürük testleri, diş çürüğü olan ve olmayan çocuklar arasında *Streptococcus mutans* prevalansı ve genotipleri açısından farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur (Arévalo-Ruano *et al.* 2014). Bu çalışmada; Kolombiya'nın Medellin kentindeki bir devlet okulundan 6-7 yaş arası çocuklardan rastgele 47 tükürük örneği toplanmıştır. DMF-T İndeksini (Çürük, Eksik ve Dolgulu Dişler) belirlemek için ağız muayeneleri yapılmıştır. PCR, API 20STREP ve *Streptococcus sobrinus* ve *Streptococcus mutans*'ın 16S rRNA ardışık analizi sekellerin ayırt edilmesini sağlamıştır. PCR, c, e, f ve k genotipleri arasında ayırım yapmak için kullanılmıştır: *S. mutans*

prevalansı %14,9 olarak bulunmuştur. Tükürük testlerinin %57,4'ünde (27) diş çürüğü olan çocukların %8,5'inde (4/30) *S. mutans* genotip c; %2,1'inde (1/30) genotip f; %1,6'sında (1/31) ise genotip c ve k bulunmuştur.

Ayrıca, Napimoga *et al.* (2004) AP-PCR kullanarak çürük-dinamik bireylerde sekiz genotipin tavan yaptığını keşfetmiştir. Ancak, araştırmalar çocukların genellikle bir ile beş arasında ayırt edilebilir *S. mutans* genotipine sahip olduğunu göstermiştir (Mattos-Graner *et al.* 2001, Grönroos and Alaluusua 2000).

Bu bulgular, çocuklarla ilgili önceki çalışmalarda görülenlerle tutarlıdır. Ayrıca çürüğü olmayan on okul öncesi çocuğun aynı genotipe sahip olduğu bulunmuştur. Diş çürüğü olan grupta ise 13 çocukta birden fazla genotip tespit edilmiştir. Bu durum, fermente edilebilir karbonhidrat tüketiminin, aynı ağız boşluğunda farklı genotiplerin yoğun kolonizasyonu ve büyümesi gibi uzun vadeli etkilerinin bir sonucu olarak açıklanabilir (Li and Caufield 1998, Guo *et al.* 2006, Lembo *et al.* 2007).

2.6 Diş Çürükleri

Diş çürüğünün mikrobiyolojik oluşumu, yüzyıllar olmasa da on yıllar boyunca çeşitli çalışmaların odak noktası olmuştur. Mutans streptokoklar (MS) özellikle çürük gelişiminin erken evrelerinde önemli bir role sahiptir. Bununla birlikte, çürüğe giden yolların MS'den bağımsız olduğu konusunda yaygın bir mutabakat vardır ve diğer plak türlerinin MS'nin bağlılığını ne ölçüde etkilediği konusunda süregelen tartışmalar mevcuttur (Takahashi and Nyvad 2008). Tür spesifikliğine karşı en az bir örnekte suş belirginliği lehine tartışılmıştır. MS olmayan oral *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* ve *Streptococcus anginosus* türlerinin suşları "düşük pH streptokokları" olarak kategorize edilir, ancak diğer türler de aday olarak önerilmiştir (Matsui and Cvitkovitch 2010, Okahashi *et al.* 2013, Van Dyke and Sima 2020).

2.7 Diş Çürümesi ve Gen Polimorfizmleri

Hughes *et al.* (2006) çok sayıda sitokin ve büyüme faktörünü çok çeşitli insan hastalıklarının patogeneğinde önemli olarak tanımlamış olsa da geleneksel klinik kurallar genellikle bir bireyin gelecekte periodontal enfeksiyonun yayılmasına karşı duyarlılığını yeterince tahmin etmekte veya uygun bir tedavi yöntemi seçmekte yetersiz kalmaktadır (Giannobile *et al.* 2009).

Morse *et al.* (1999) araştırmasına göre TNF-alfa, interlökin-1 beta, interlökin-6 ve interlökin-10'daki genetik varyasyonlar transkripsiyonel düzenleme ile bağlantılıdır (Poli *et al.* 2002). Periodontal tedavinin sonucunu tahmin etme ve tedavi stratejisindeki bir değişikliği gerekçelendirme yeteneği, periodontal hastalıkların ilerlemesi ve başlangıcı ile ilişkili olası genetik varyantların tanımlanmasıyla desteklenebilir (Kinane and Hart 2003).

Dikkatsiz periodontal tedaviyi takiben klinik sonuçlarla ilişkili olarak değişen kalitede birkaç polimorfizm araştırılmıştır; yine de sistemik olarak sağlam testlerin eksikliği daha fazla araştırma ihtiyacını ortaya çıkarmıştır (Chatzopoulos *et al.* 2016). Dikkatli olmayan periodontal tedavi alırken periodontal hastalıklarında ilerleme yaşamaya devam eden hastalar, ek temel anti-toksinlerden veya diğer ek tedavilerden fayda görebilir. Periodontal olarak bozulmuş dişlerin ve diş kaybının sıklığını azaltmak için, genetik testler periodontal hastalığın gelecekte ortadan kalkma riskini tahmin etmek için kullanılabilir ve kişiselleştirilmiş tedaviye (Kişiselleştirilmiş/Hassas Tıp) izin verebilir (Maney and Owens 2015). Test sonuçları, periodontal hastalık tespitinin doğruluğunu artırırken, etkisiz tedavilere de ışık tutabilir.

2.8 İnterlökin 10 (IL-10)

IL-10 geninin kromozom 1q31-q32 üzerindeki konumu, IL-10 geninin promotör bölgesindeki varyasyonlar IL-10 sitokin ekspresyonunu değiştirerek yeni inflamatuvar yanıtlara yol açabilir (Gibson *et al.* 2001). IL-10 polimorfizmleri ve CP ile ilgili olarak,

zıt sonuçlar vardır (Moore *et al.* 2001). Bağlantı dengesizliği içinde olan IL10-1082, -819 ve -592 polimorfizmleri tarafından oluşturulan iki ana haplotip vardır. Pakistan'da yapılan araştırmalar IL10-1082, -819 ve -592 polimorfizmlerini hepatit C riskiyle ilişkilendirmiştir (Afzal *et al.* 2011). Ayrıca, çeşitli çalışmalar bu polimorfizmlerin hepatit B enfeksiyonu dahil diğer kronik hastalıklarla bağlantılı olduğunu göstermiştir (Lachmann *et al.* 2007) Çerçeve metaloproteinazları inhibe etme kabiliyeti nedeniyle IL-10, periodontal doku bozulmasını da azaltır (Moore *et al.* 2001) Bu akış sitometrisi analizinin amacı, IL-10 polimorfizmleri ile hastalık duyarlılığı (-1082, -819 ve -592) ve kalıcı periodontitis arasındaki potansiyel bağlantıları belirlemektir (Wong *et al.* 2018).

İnflamasyonun ilerlemesini önemli ölçüde etkileyen IL-10, monosit ve makrofaj pro-inflamatuar tepkisini azaltarak inflamatuvar tepkileri bastırmaya yardımcı olan bir sitokin olarak da düşünülmektedir. Ayırma faktörü IL-10, B hücresi IgG, IgA ve IgM üretimini uyarak normalde CD4+ T hücresi yaşlanmasını hızlandıran nevrotik güvenli reaktiviteyi azaltır (Groux *et al.* 1997). IL-6 572 G/C ve IL-10 592 C/A kalite polimorfizmleri, özellikle Kafkas Avrupalılar arasında artmış kalıcı periodontitis riski ile ilişkilendirilmiştir (Albuquerque *et al.* 2012, Song *et al.* 2013).

İnterlökin-10 (IL-10) periodontal enfeksiyonların önlenmesinde önemli rol oynayan bir sitokindir. Farklı IL-10 eklemlenmeleri, IL-10 kalitesinin bağlanma bölgesindeki IL10-1082, -819 ve -592 polimorfizmleriyle ilişkilendirilmiştir. Bu derlemenin amacı, İranlılardan oluşan temsili bir örneklemde bu SNP'lerin uzun süreli periodontitis ile ilişkilerini araştırmaktır (Heidari *et al.* 2013).

1087(G/A) ve -597(C/A) lokasyonlarındaki interlökin-10 tek nükleotid polimorfizmleri sırasıyla genel kalıcı periodontitis ve sınırlı agresif periodontitis ile bağlantılıdır ve bu polimorfizmlerin periodontitis etiyolojisinde bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Kinane and Hart 2003).

Yapılan bir çalışmada, *S. mutans*'a verilen yanıtın bir Th1 reaksiyonu olduğu belirtilmiştir (Hahn *et al.* 2004). IL-10, organizmaların ihtiyaçlarına göre monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından üretilir. Bağışıklayıcıların üretimi gibi B hücrelerinin

büyümesi de uyarılır. İnsan monositlerinin Gram-negatif mikroorganizmalara yanıt olarak IL-10 üretme ve salma yeteneği muhtemelen bakterinin lipopolisakkarit konsantrasyonuna bağlıdır. İnsan monositlerinin Gram-negatif mikroorganizmalara yanıt olarak IL-10 üretme ve salma kabiliyeti muhtemelen bakterinin lipopolisakkarit konsantrasyonuna bağlıdır (Cogulu *et al.* 2015). IL-1 üretimi, makrofajlar ve lenfositler tarafından salınan IL-10 tarafından baskılanabilir. Mevcut incelemede, tükürük veya serumdaki IL-10 konsantrasyonları ile diş çürüğü veya *S. mutans* prevalansı arasında bir ilişki bulunmamıştır.

rs1800872-592 bölgesi, IL-10 için yaygın bir SNP'dir ve 592A varyantının daha düşük serum IL-10 ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. rs1800871 ve rs1800896 SNP'leri dışında, IL-10 kalitesinin kaydedilmesi ve serbest bırakılması A/G (1082) ve C/T (819) SNP'leri ile de ilişkilendirilmiştir (Khabour and Barnawi 2010). Buna ek olarak, -592C>An, Japonya, İtalya, Ürdün ve Bulgaristan'daki popülasyonların uzun ömürlülüğü ile bağlantılı olan 1082 SNP ($R^2=3,7$, $D'=1,0$) ile LD içindedir (Okayama *et al.* 2005).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Makine ve teçhizat

Çalışmada kullanılan makine ve teçhizat Çizelge 3.1’de listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan makine ve teçhizat

Makine	Üretici firma	Menşei
Otoklav	Labtech	Kore
Bileşik ışık mikroskobu	Olympus	Japonya
Dijital kamera	Sony	Japonya
Elektroforez ünitesi	Labnet	Tayvan
İnkübatör	Memmert	Almanya
Aşılama döngüsü	Japan	Japonya
Makro santrifüj	Hitachi	Almanya
Mikro santrifüj	Hitachi	Almanya
Mikro pipet	Eppendorf	Almanya
Mikrodalga	Germany	Almanya
Nanodrop 2000	Thermo	Amerika Birleşik Devletleri
Soğutucu	Concord	Lübnan
Hassas denge	Precisa	İsviçre
Termo döngü (PCR)	Agilent	Almanya
Aletler	Sterile	İngiltere
Tüp çalkalayıcı	Labinco	Hollanda
UV Işık	Korea	Kore
Girdap	Hiedolphy	Almanya
Vorteks santrifüjü	Memmert	Almanya
Su banyosu	Memmert	Almanya

3.1.2 Kimyasal ve biyolojik maddeler

Bu araştırmada kullanılan kimyasal ve biyolojik maddeler Çizelge 3.2’de yer almaktadır.

Çizelge 3.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler

Kimyasal ve Biyolojik Malzemeler	Şirket	Ülke
Agaroz	Bio basic	Kanada
DNA Markörü (DNA işaretleyici) 100bp	Fisher	ABD
Etanol %99 ve %70 alkol	Flukachemika	İsviçre
Etidyum Bromür	Bio basic	Kanada
Gliserol	B.D.H	İngiltere
İzopropanol ve Etanol %70	Indico	Hindistan
Yağa daldırma	Indico	Hindistan
Tris Borat-EDTA-Tampon çözeltisi (TBE)10x	Bio basic	Kanada
Tris-EDTA Tampon çözümü (TE)	Promega	ABD

3.1.3 Polimeraz zincir reaksiyonu malzemeleri

Polimeraz zincir reaksiyonu malzemeleri Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Standart PCR kiti bileşenleri

Malzeme	Menşei
Etidyum bromür	Promega (ABD)
Gliserol	Hi media (Hindistan)
Gram boyama	Hi media (Hindistan)
TE-tampon	Promega (ABD)
Green master karışım	Promega (ABD)
Moleküler marker	Bioneer

Çizelge 3.4 Genomik DNA için saflaştırma kiti ve tamponu

No	Genomik DNA saflaştırma kiti ve tamponlar
1	Proteinaz K
2	Hücre lizizi tamponu
3	Çekirdek parçalama tamponu
4	Bağlama tamponu
5	İlk yıkama tamponu ve 2. yıkama tamponu
6	Nükleaz içermeyen su

3.1.4 Primerler

Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 Çalışmada kullanılan primerler

Primer	Sıra (5'→3')	Boyut	Referans
Spesifik astar	FDX:5 -`CGCAGGTTGAAACAGAATGC-3'	615 bp	Bu çalışma için tasarlandı.
Spesifik	FRL: AGCCATGCGCAATCAACAGGTT	415 bp	Bu çalışma için tasarlandı.
IL-10	IL10F: ATCCAAGACAACACTACTAA	588 bp	(Yoo <i>et al.</i> 2005)

3.1.5 Tam kandan genomik DNA'nın saflaştırılması

Çizelge 3.6'da tam kan Genomik DNA kitinin saflaştırma içeriği gösterilmiştir.

Çizelge 3.6 Genomik DNA için ekstraksiyon kiti

Malzemeler	Miktar (µL)
Kırmızı kan hücresi lizis solüsyonu	200-300
Çekirdek Lizis çözümü	200-400
Protein çöktürme çözümü	250
Nükleaz içermeyen su	50-200
DNA rehidrasyon çözümü	50
RNase A çözümü	3-6

3.1.6 Kullanıma hazır reaktifler

Çalışmada kullanılan tüm reaktifleri Hi-media Company -India'dan sağlamıştır. Bunlar arasında Gram boyası katalaz, oksidaz, metil kırmızısı ve voges-proskaur bulunmaktadır.

3.1.7 Kültür ortamı

Üretici tarafından tedarik edilen tüm kültür ortamları (kullanıma hazır), üretim protokolüne bağlı olarak hazırlanmış ve Çizelge 3.7'de gösterildiği gibi otoklavda 121°C ve 15 pound/inc²'de 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

Çizelge 3.7 Çalışmada kullanılan kültür ortamları

Kültür medyası	Kullanım nedeni
Kan Agar	Hemolitik kan testi
Beyin Kalp infüzyon suyu	Bakteriyel aktivasyon
MacConkey agar	Laktoz fermentasyonu
Mitis-salivarius agar besiyeri	<i>S. mutans</i> için seçici ortam
Besin agar	Bakteri ekimi
Besin suyu	Bakteriyel aktivasyon
Sükroz pepton agar	Bakteri izolasyonları

Sükroz Pepton Agar: Bu, bakteri izolasyonları için genel amaçlı, seçici olmayan bir besiyeridir, ancak *Agrobacterium* yetiştirmek için kullanılmamalıdır. *Pseudomonads* ve *Xanthomonas campestris*'in mukoid yapısı bu besiyerini üreten bakterileri tespit etmek için ideal hale getirir. Bu besiyerinin şeffaflığı plaka sayımları için ideal bir ortam yaratmaktadır. Bu besiyeri: Distile su, sukroz 20 g, pepton 5 g, K₂HPO₄ 0,5 g, MgSO₄-7H₂O 0,25 g ve litre başına 15 g agardan oluşur.

Beyin Kalp İnfüzyon Broth (BHI-B): Besiyeri Hi-Media Şirketi tarafından belirtilen talimatlara göre üretilmiş ve sterilize edilmiştir. Besiyeri, 37 gram 1000 mL distile su içinde süspanse edilmiştir. Sterilizasyondan sonra, maksimum etkinlik için vidalı kapaklı şişelere dökülmüştür. Besiyeri üreticinin talimatlarına uygun olarak yapıldığı gün kullanılmalıdır.

Kan Agar: Bu besiyerini yapmak için 37 g kanlı agar bazı 1 litre distile suda çözülmüştür. Besiyerini iyice çözmek için kaynatılması gerekir. Otoklavlandıktan ve 45-50°C'ye soğutulduktan sonra aseptik olarak %5 v/v steril defibrine kan eklenir ve karışım steril petri kaplarına konulur.

Mitis-Salivarius Basitrasin Agar (MSB Agar): *S. mutans* yetiştirmek için bu besiyeri seçici bir besiyeri olarak kullanılır. Besiyeri, 200 U/mL basitrasin ve %20 (w/v) sükroz içerir. Üretici firma talimatlarına uygun olarak, 90 g toz 1000 mL distile içerisinde tamamen çözülene kadar manyetik bir karıştırıcı kullanarak karıştırılır. MS izolasyonu için spesifikliğini artırmak amacıyla MSA'ya 150 g/L konsantrasyonda (sterilizasyondan

önce) sükröz eklenir. Besiyeri otoklavlandıktan sonra yaklaşık 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra, agarın her litresi için 1 mL basitrasın çözeltisi eklenir. Karışım daha sonra petri kaplarına konarak soğumaya bırakılır. Ardından kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edilir.

3.2 Sterilizasyon Yöntemleri

Sterilizasyon yöntemleri aşağıda sıralanmıştır. Bunlar:

- Kültür ortamının 121°C'de ve 15 Psi basınçta 15 dakika süreyle sterilizasyonu,
- Camların 180°C'de 2 saat boyunca elektrikli fırında kuru ısı ile sterilizasyonu,
- Bacitracin'in Millipore filtrasyonu ile sterilizasyonu.

3.3 Çalışma Kapsamında Kullanılan Reaktifler

Aşağıdaki reaktifler manuel standrazasyona dayalı olarak hazırlanmıştır:

3.3.1 Katalaz reaktifi

İzolatların katalaz enzimi üretme kapasitesi, karanlık bir kapta stok çözeltiden yapılan hidrojen peroksit (%3) ile test edilerek belirlenmiştir.

3.3.2 Basitrasın çözeltisi

Mitis-Salivarius Basitrasın Agar (MSB Agar) yapımında kullanılmak üzere 200 IU bacitracin yapmak için, önce 0,364 g bacitracin antibiyotiğini 100 mL sterilize distile suda manyetik bir karıştırıcı kullanarak çözdük ve antibiyotiğin tamamen çözünmesini sağladık, ardından çözeltiyi 0,20 m Millipore membrandan süzdük ve soğuttuk. Her iki ile üç haftada bir yeni bir çözelti hazırlandı.

3.3.3 Normal salin

Normal tuzlu su, (9 g) NaCl'ın 1 L distile suda çözülmesiyle hazırlanmıştır; nihai pH 7,3'e ayarlanmış ve ardından her birinde 9,9 mL olacak şekilde vidalı kapaklı şişelere dağıtılmış, ardından şişeler otoklavla sterilize edilmiş ve kullanılabilecek kadar buzdolabında saklanmıştır.

3.3.4 Potasyum tellür

Tamponu yapmak için önce 1 g potasyum tellür 90 mL steril damıtılmış suda çözülür ve ardından %1'lik bir konsantrasyon elde etmek için toplam hacim 100 mL çıkarılır. Çözelti daha sonra bir Millipore filtreden süzülür ve 4 santigrat derecede saklanır.

3.3.5 Oksidaz test reaktifi

1 g tetra Metil-P-fenilen diamin dihidro klorürün 90 mL steril distile suda çözülmesi ve miktarın 100 mL'ye çıkarılmasıyla elde edilen reaktif, bakteriyel oksidaz enzim üretimini ölçmek için kullanılmıştır.

3.3.6 Kovac reaktifi

İndol test reaktifi, 5 g para-dimetil amino benzaldehitin 75 mL izopropil alkol içinde bir su banyosu üzerinde çözülmesiyle hazırlanır. Elde edilen çözelti daha sonra açık sarı bir renk alana ve çözünür hale gelene kadar güçlü HCl ile seyreltilir.

3.3.7 Barrette reaktifi

Kullanımdan önce karıştırılarak iki çözelti hazırlanmasını içerir. Bunlar:

Çözelti (A): 5 g alfa-naftol 100 mL mutlak alkol içinde çözülür

Çözelti (B): De iyonize suda %40 KOH çözülür.

Kullanılmadan önce 1 hacim Çözelti (A), 3 hacim Çözelti (B) ile karıştırılır.

3.3.8 Karbonhidrat fermentasyon ortamı

Bakterilerin farklı şekerlerin tüketimine duyarlılığını indüklemek için, şekerlerden (Rafinoz, D-Glikoz ve Laktoz, Sükroz, Dekstroz, Ksiloz ve Mannitol) oluşan şeker çözeltisi %1'lik nihai konsantrasyonda kullanılmıştır. Bu besiyeri, 10 g pepton, 1 g sığır eti ekstraktı ve 5 g NaCl ve 0,018 g fenol kırmızısının 100 mL distile suda çözülmesiyle hazırlanmış ve pH 7,4'e ayarlanmış, besiyeri her tüp için 4,5 mL hacminde test tüplerine dağıtılmış ve besiyeri otoklavda 121°C sıcaklıkta 15Psi dakika sterilize edilmiş ve üzerine test tüpü başına 0,5 mL oranında süzülerek steril şeker çözeltisi eklenmiştir.

3.4 Etik

Çalışmanın yapılması ve örneklerin alınması için gerekli olan etik belgesi alınarak tüm katılımcılara yazılı bilgilendirme yapılmıştır. Çalışmaya katılan katılımcılar takip prosedürlerinden, yürürlükteki tüm yasa ve standartlara uygun olarak tüm testlerin yapıldığını onaylamıştır. Yazarlar, tüm prosedürlerin 1964 Helsinki Deklarasyonu'nda belirlenen ve ilgili etik kurul tarafından incelenip onaylanan yönergelere uygun olduğunu teyit etmektedir.

3.5 Örneklerin Toplanması

Özel Klinikten 50 diş plağı ve diş yıkama örneği ve 50 kontrol örneği alınarak 10 mL'lik steril kaplara yerleştirilmiştir. Örnekler laboratuvara gönderilinceye kadar buzdolabında tutulmuştur.

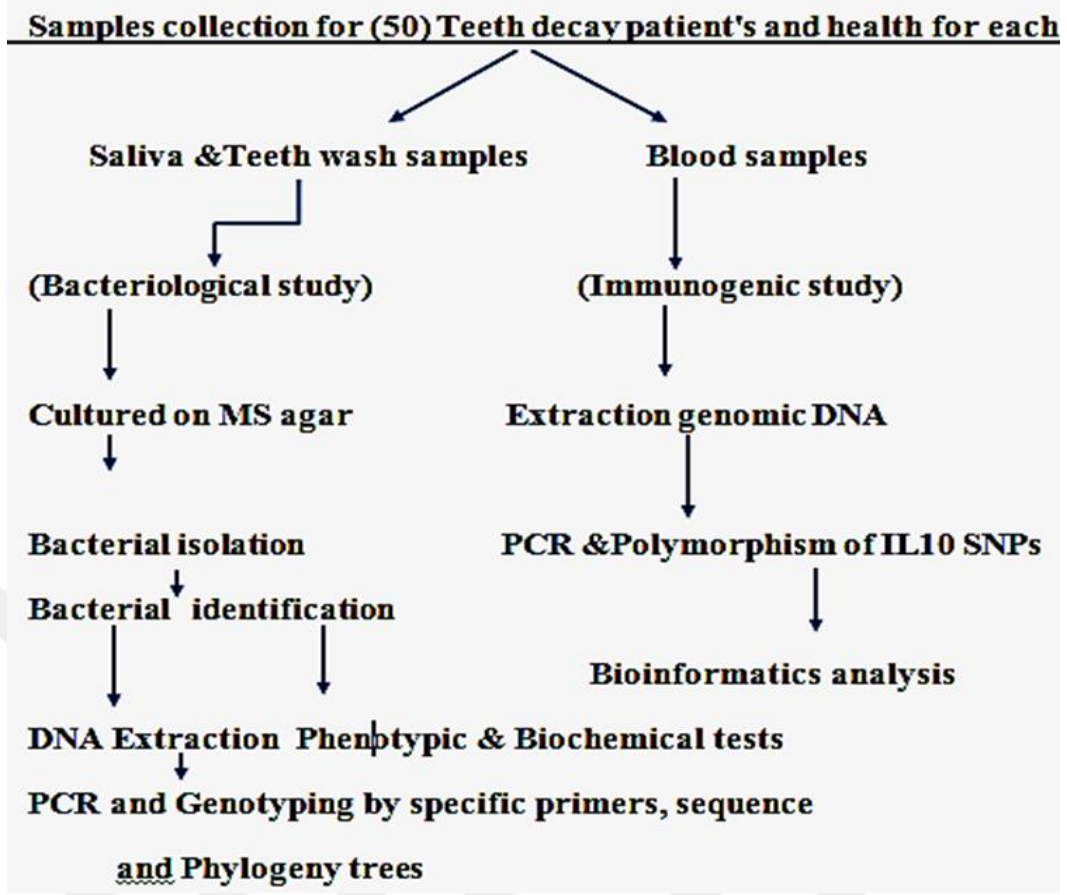
3.6 Mutans Streptokoklarının İzolasyonu

Steril çubuklar kullanılarak, 100 L seyreltilmemiş numune MS agar plakalarına ekilmiştir. Kùltürler 37°C'de 48 saat boyunca anaerobik olarak ve 37°C'de bir gece boyunca aerobik olarak inkübe edilmiştir. Koloni oluşturan birim konsantrasyonu (CFU) 250'den fazla olan numuneler canlı olarak kabul edilmiştir (Salman *et al.* 2017). İzolatlar ilk olarak 37°C'de iki gün boyunca anaerobik bir ortamda büyütüldükten sonra kanlı agar (BA) plakalarında tanımlanmıştır. İzolatları ilk olarak karakterize etmek için MS-agar ve BA üzerinde koloni görünümü, Gram boyama ve mikroskopik analiz, Katalaz ve Dekstran Üretimi Testi yapılmıştır (Al-Mudallal *et al.* 2008).

3.6.1 Hasta ve kontrol grupları

50 örnek, farklı hastanelerden şiddetli diş çürüğü olan ve özel hekim tarafından teşhis edilen hastalardan toplanmış, kontrol grubu ise diş çürüğü olmayan rastgele 50 sağlıklı kişiden oluşturulmuştur. Hasta ve kontrol grupları üç gün öncesine kadar herhangi bir antibiyotik almamıştır ve örnekler Aralık 2021-Haziran 2022 tarihleri arasında yapılmıştır. Çalışmaya katılan kişilerin yaşları 30-60 arasında değişmektedir. Ayrıca, moleküler çalışma için aynı hastadan EDTA tüplerinde 3 mL kan örnekleri toplanmış, örnekler -20°C altında dondurulmuş halde saklanmıştır.

Bakterilerin tanımlanması ve bakteriyel enfeksiyonu doğrulamak için *S. mutans* için spesifik primer-PCR kullanılmıştır. İnterlökün 10 için PCR dizileri ve *S. mutans* için PCR kullandıktan sonra dizi analizi polimorfizmleri kullanılarak genlerdeki SNP'lerin genotip dağılımları incelenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Diş çürüğü, tükürük ve hastalardan örnek toplama şeması

3.7 *S. mutans*'ın Fenotipik Tanımlanması

Tanımlama, doğrudan diseksiyon mikroskobu altında (büyütme X 20) incelenerek MSB agar üzerindeki kolonilerin morfolojisine göre yapılmıştır.

Seçici MSB agar plaklarında, *S. mutans* kolonileri soluk mavi renkte, yaklaşık 2-3 mm çapında, besiyeri yüzeyine iyi yapışmış, kabarık veya dışbükey yüzeyli, ön veya küresel morfolojide görünmüştür. Bazı koloniler düzensiz koloniler, pürüzlü koloniler, Paris dizilimi veya kısa-orta uzunlukta zincirler şeklinde görülmüştür. Tüm bakteri izolatları için saf ve genç kültürden yayma hazırlanmış ve ışık mikroskobu altında bakteri hücrelerinin boyutunu, şeklini ve düzenini gösteren gram boyası ile boyanmıştır.

Biyokimyasal Testler: Steril koşullar altında MSB agardan inokülasyon halkası kullanılarak küçük koloniler alınmış ve daha sonra kanlı agar plaklarına (hemoliz türü için) yayılmış ve iki gün boyunca anaerobik olarak inkübe edilmiştir, saf kültür elde etmek için alt kültürler birkaç kez tekrarlanmıştır ve aşağıdaki testler yapılmıştır. Tüm biyokimyasal testler (Cowan 1977, Könemann and Visser 1988)'ya göre gerçekleştirilmiştir.

Katalaz Üretim Testi: Bu test %3 Hidrojen peroksitten (H_2O_2) etkilenen katalaz enziminin üretim aktivitesini tespit etmek için kullanılır. Az miktarda saf *S. mutans* kültürü, steril bir halka kullanılarak temiz ve kuru bir cam lam yüzeyine ayrı ayrı aktarılmıştır. Lam üzerindeki bakteri kültürünün bir kısmının üzerine hemen %3'lük hidrojen peroksit damlatılmış, gaz kabarcıklarının oluşmaması katalaz enziminin yokluğunu göstermiştir. Bu test doğrudan MSB agar plaklarındaki koloniler üzerinde de gerçekleştirilmiştir. B-Farklı karbonhidrat kaynaklarının fermantasyonu aşağıdaki yöntemle belirlenmiştir: Her biri %10 (mannitol, sorbitol, sukroz, rafinoz ve inülin) ile desteklenmiş tiyoglikolat besiyeri negatif kontrol olarak kullanılırken, sukroz pozitif kontrol olarak kullanılmış, süspanse besiyeri test edilen izolatlarla inoküle edilmiş ve anaerobik olarak 37°C'de 72 saat inkübe edilmiştir, besiyerinin rengi kontrollerle karşılaştırıldığında kırmızıdan sarıya değişmiştir, bu bakterilerin bu karbonhidrat kaynaklarını fermente etme yeteneğini göstermiştir (Cowan 1977).

Oksidaz testi: Oksidaz reaktifi ile doyurulmuş bir filtre kağıdına sterilize edilmiş bir tahta çubuk kullanarak 24 saatlik bir koloninin bir kısmının aktarılması ve 10 saniye içinde mavi rengin ortaya çıkması testin pozitif olduğunun göstergesidir.

Üreaz testi: Üre içeren tüplerin bakteri kültürü ile eğimli bir şekilde aşılması ve tüplerin 37°C'de 1-7 gün boyunca inkübe edilmesi ve besiyerinin renginin sarıdan pembeye kayması durumunda test pozitifdir.

Hemoliz testi: Kanlı agar plakaları, planlama yöntemi kullanılarak test edilecek bakteri ile aşılanır, ardından inkübasyon için 18-24 saat boyunca bu sıcaklıkta tutulur. Genişleyen

bir koloniyi çevreleyen hemoliz yararlı bir etki yaratır, bu da β -hemolitik tipte olduğunu gösterir. α -hemolitikdir, ancak ayrışma olmadığında γ -hemolitikdir.

Hareketliliğin İncelenmesi: Hareketin merkezini içeren tüpler saplama yöntemi ile aşıl原因arak 48 saat inkübe edilmiştir. Pozitif sonuç üremenin saplama sınırlarının dışına yayılması ile kaydedilirken, negatif sonuç bakterilerin sadece saplama bölgesinde üremesi ve çevrenin saf kalması ile gözlenmiştir.

İndol Üretim Testi: Peptonlu su (triptofan içeren) kullanılarak değerlendirilen saf bakteri kolonisinin oda sıcaklığında kültüre edilmiştir. Ortam 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra birkaç damla Kovacs reaktifi eklenir ardından kırmızı halka oluşumu sonucun pozitif olduğunu gösterir.

Metil Kırmızısı testi: Metil Kırmızı Vogues Proskauer besiyeri 37°C'de 24 saat boyunca yeni bir bakteri suşu ile enjekte edildikten sonra test tüpüne birkaç damla reaktif (metil kırmızısı) eklenir. Glikoz, kırmızı bir renk tonuyla gösterildiği gibi karışık asitlere fermente edildiğinde, sonucun pozitif olduğu anlaşılır.

Vogues-Proskauer testi: Peptonlu su, glukoz ve fosfat ile test edilecek saf bakteri kolonisinin bir kısmı 37°C'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra, dahil edilen Barritte reaktifi %40 konsantrasyonda 1 hacim potasyum hidroksit çözeltisi KOH ve %5 konsantrasyonda 3 hacim Naphthol- α çözelti ortama eklenir ve ardından 10-15 dakika bekletilir. Pozitif sonuç, nötr bileşik Asetil metil karbinolün oluşumunu gösteren kırmızı rengin ortaya çıkmasıyla meydana gelir.

Simmons Sitrat Testi: Yeni izole edilen bakteriler Simmons sitrat eğimli agar üzerine konmuş ve 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Mavi renk tonunun varlığı, bakterilerin glikozu sitrata dönüştürmede başarılı olduğunu gösterir.

3.8 Bakteriyel Tanımlama için VITEK-2 Sistemi

VITEK-2 taşınabilir bir tanımlama sistemidir. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin izolasyonu, VITEK kart tabanlı biyokimyasal testlerin belirli bir düzenine dayanmaktadır. Bakteri izolatlarının BHI ve MacConkey agar üzerinde alt kültüre alınması çok fazla iş gerektirir. Tüm test kartları mekanik olarak bir süspansiyonla doldurulduktan sonra, bir test tüpüne bir bakteri çözeltisi olacak şekilde yerleştirilir ve kaset kapatılır. Cihaz vakumla doldurulup, sıcaklık 35,5 santigrat dereceye ayarlandıktan sonra yeni bir optik okuma başlığı kullanılarak her 15 dakikada bir otomatik olarak bir kolorimetrik ölçüm alınır. Verilerin analizi için 6-8 saatlik inkübasyondan sonra (maksimum inkübasyon süresi 10 saattir) kinetik modda organizma tanımlamasına izin veren VITEK® 2 veritabanı versiyon 4,01 kullanılmıştır (Aslanzadeh 2006).

3.9 Genotipleme Deneyi (Genomik DNA Ekstraksiyonu)

3.9.1 Tam kandan genomik DNA ekstraksiyonu

Teknik, üretici tarafından belirtildiği şekilde Promega/USA ReliPrep TM Blood Gdna Miniprep ekipmanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir:

- Kan örneklerini toplamak için EDTA'lı tüpler kullanılmıştır.
- Kan donmuşsa, 1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpünde Proteinaz K (PK) çözeltisi (20 µL) ile karıştırılmadan önce 15 dakika çözülmesine izin verildi
- Her bir numuneye RBC Lizis Tamponu (RLB) (200 µL) eklenmiş ve en az 15sn olmak üzere birkaç saniye vorteks ile karıştırılmıştır.
- Aşırı yüklemeyi, tüpler için 56°C su banyosunda 12 dakikalık bir inkübasyon süresi izlemiştir.
- ReliPrep TM Bağlama Kolonu tüpü, numuneler inkübe edilirken bir toplama tüpüne yerleştirilmelidir.
- 15 saniye sonra tüpleri vorteks karıştırıcıdan alın ve kapaklarını kapatın, ardından 250 µL bağlama tamponu (BBA) eklenir.

- Tüplerin içeriğinde koyu yeşil bir renk meydana gelebilir.
- Daha sonra Eppendorf tüpüne boş bir ReliPrep TM Bağlama Kolonu yerleştirilir.
- ReliPrep TM Bağlama Kolonunu içeren toplama tüpünün içeriğini mikrosantrifüjlenir.
- Ardından 3 dakika boyunca 13,000-16,000 rpm'de santrifüjlenir ve lizatin membranın üstünde görünmediğinden ve membranın içinden tamamen geçtiğinden emin olunur. Gerekli olduğu durumlarda Adım 10 tekrarlanmalıdır.
- Toplama tüpünde tehlikeli maddeler bulunmaktadır ve bunların atılması gerekir.
- Yeni bir toplama tüpü alınarak bağlayıcı kolon içine konur. Ek olarak, 300 L kolon yıkama solüsyonu (CWD) eklenir ve elde edilen atık atılmadan önce kolon 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Kolon yıkama solüsyonunda heme varlığını görülürse, PCR cihazında Etiket Polimerazın devre dışı bırakılmadığından emin olmak için 12. adım tekrarlanır.
- Kolon temiz bir 1,5 mikro santrifüj tüpüne aktardıktan sonra 80 µL nükleaz içermeyen su eklenir ve 12,000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenir.
- PCR ile ilgili olası sorunları en aza indirmek için tüm örnekler üç hafta boyunca -10 ve -20 santigrat derece arasında dondurulmuştur.

3.9.2 Diş yıkama ile genomik DNA ekstraksiyonu

- Her bir numune için 1000 µL diş yıkaması 5 dakika boyunca 8000 rpm santrifüj işlemine tabi tutulmuş, süpernatant boşaltılmış, kalıntı 20 µL Proteinaz K (PK) solüsyonu içeren 1,5 mL'lik bir mikro santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- Aşırı yükleme için 15 dakika boyunca 56°C su banyosunda bırakılmıştır.
- Numuneler inkübe edildikten sonra ReliPrep TM Bağlama Kolonu tüpünün içeriği temiz bir toplama tüpüne aktarılır.
- Numuneler su banyosundan çıkarılır, 250 µL Bağlama Tamponu (BBA) eklenir ve tüpler kapatılmadan önce 15 saniye vortekslenir.
- Tüplerin içeriğinin koyu yeşil olduğu gözlemlenir.
- ReliPrep TM Bağlama Kolonu boşaldığında, Eppendorf tüpünün içeriği buna eklenir.

- Toplama tüpüne yerleştirilmiş bir ReliPrep TM Bağlama Kolonunu döndürmek için bir mikrosantrifüj kullanılır
- Ardından, dakikada 13,000-16,000 devirde üç dakika boyunca santrifüjde döndürülür. Ardından, lizatın membran boyunca yayıldığından ve artık üstte durmadığından emin olunması gerekir. Nesne hala görülebiliyorsa, 10. adım geçilmelidir.
- Toplama tüpünde atılması gereken tehlikeli maddeler uzaklaştırılmalıdır.
- Yeni bir toplama tüpü alın ve bağlayıcı kolonu içine konur. Ek olarak, 300 µL kolon yıkama çözeltisi (CWD) eklenir ve elde edilen atık atılmadan önce kolon 12,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Kolon yıkama solüsyonu mevcutsa, diş hekiminin diş yıkamasından kalan heme kalıntısının PCR'ın Tag Polimerazını devre dışı bırakma olasılığını ortadan kaldırmak için 12. adım tekrarlanır.
- Kolona 80 µL nükleaz içermeyen su eklenir, temiz bir 1,5 mL mikro santrifüj tüpüne yerleştirilir ve 12,000 rpm'de 2 dakika döndürülür.
- PCR sorunlarının giderilmesindeki olası zorlukları aşmak için tüm örnekler -10 ile -20°C'de üç hafta süreyle dondurulur.

3.9.3 DNA konsantrasyonunun ve saflığının tahmini

Nano drop yardımıyla, ekstrakte edilen DNA'nın 2,5 µL'si makineye yerleştirilerek numunelerin DNA konsantrasyonunu ng/L cinsinden ve protein kontaminasyonunun varlığını ortaya koyan 260/280 nm optik yoğunluk (OD) oranını gözlemleyerek numunelerin saflığı tespit edilir. DNA saflaştırması için 260/280 nm oranının 1,7-1,9 olması optimal olarak kabul edilmiştir.

3.9.4 Reaksiyon karışımı

Çizelge 3.8'de IL-10 polimorfizmini DNA amplifikasyonu ile tanımlamak yapılan aşamalar gösterilmiştir; bu adımlar her bir seyreltilmiş primerden 1,5 µL eklendikten sonra 25 µL reaksiyon karışımının son hacminde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.8 IL-10 genindeki gen polimorfizmi ve *S. mutans* için PCR reaksiyon karışımının içeriği

No	Reaksiyon karışımı bileşenleri	Hacim μ L
1	PCR Ön Karışımı	12
2	Dış İleri primer	1,5
3	Dış ters primer	1,5
4	Hasta DNA şablonu	2
5	Nükleaz içermeyen Su (Promega)	8
Toplam hacim		25

3.9.5 Termal döngü koşulları

PCR reaksiyonu Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10'da gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.9 *S. mutans* genine yönelik spesifik primerler için termal döngü koşulları

<i>S. mutans</i> genine yönelik spesifik primerler			
Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
İlk Denatürasyon	95	3 dk	1
Denatürasyon	95	40 sn	
Tavlama	56	40 sn	30
Eklenti	72	40 sn	
Son Uzatma	72	3 dk	1
Tutma	4	α	4

Çizelge 3.10 IL-10'a yönelik spesifik primerler için termal döngü koşulları

IL-10			
Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman (sn).	Döngü
İlk Denatürasyon	95	3 dk	1
Denatürasyon	95	40 sn	30
Tavlama	47	40 sn	
Eklenti	72	40 sn	
Son uzatma	72	3 dk	1
Tutma	4	α	4

3.9.6 IL-10 genotipinin güvencesi

IL-10 SNP genotiplerini (NCBI SNP CLUSTER ID: rs1800871, rs1800872) araştırmak için Govatati *et al.* (2012) tarafından daha önce belirlenen standartlara göre polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve sekanslama araştırması kullanılmıştır. PCR'ler, 50 ng genomik DNA, her primerden 2 ile 6 pmol, 12 µL Master karışımı (Promega Co.) içeren 25 µL'lik tam bir hacimde gerçekteştirilmiştir. PCR geliştirme, programlanabilir bir sıcak döngüleyici açılı PCR çerçevesinde (Labnet USA) gerçekteştirilmiştir. Toplamda 35 döngü PCR amplifikasyonu gerçekteştirilmiştir (94°C'de 1 dakika denatürasyon, 47°C'de 1 dakika güçlendirme, 72°C'de 40 saniye genişleme ve 72°C'de 3 dakika son amplifikasyon). 588 bp PCR ürünü, etidyum bromürle boyanmış %1,5 agaroz jel üzerinde elektroforeze tabi tutulmuş ve ardından dizilenmiştir (Macrogen, Kore).

3.9.7 Amplifikasyon ürünlerinin tespiti için agaroz jel elektroforezi

PCR amplifikasyon ürünleri, etidyum bromür ile boyanmış %1,5 agaroz jel üzerinde elektroforez ayrıştırmasından geçirilmiştir. 1,5 g agaroz tozunu 100 mL 1X TBE tamponu (pH:8) içinde bir şişede çözdükten sonra karışım mikrodalgada 2 dakika ısıtarak, 50 santigrat dereceye kadar soğumaya bırakılır ve ardından jele yaklaşık 1,2 µL etidyum bromür boya konsantrasyonu (0,5 mg/mL) eklenir.

3.10 Moleküler Çalışma

3.10.1 *S. mutans*'ın genomik DNA ekstraksiyonu

- Genomik DNA ekstraksiyonu bir (Genomik DNA Promega kiti) kullanılarak gerçekteştirilmiş olup DNA izolasyonu süreci aşağıdaki şekilde özetlenmiştir:
- Bir kültürden saf bakteri kolonisi izole edilmiştir (37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir).
- Canlı bakteriler 200 µL Hücre lizis tamponu ile 1,5 mL Eppendorf tüpüne yerleştirildi ve 60°C'de en az 10 dakika inkübe edilmeden önce tüp 6 saniye boyunca şiddetli bir şekilde çalkalanarak karıştırıldı.

- Mikro santrifüj tüpü örnekleri 20 µL Proteinaz K ve vorteks karıştırıcı ile muamele edildikten sonra 56 °C'deki su banyosunda 15 dakika inkübe edilmiştir.
- Hücre lizatı daha sonra test tüpleri üç ila altı kez ters çevrilerek RNaz Solüsyonu (0,6 µL) ile karıştırıldı,
- Örnek 37°C'de 10-15 dakika inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına soğutuldu.
- Tüpler 14,000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantın tamamı atılmıştır.
- DNA içeren süpernatana 400 µL %100 etanol veya 200 L izopropanol ekledikten sonra her tüpü 15 saniye boyunca kuvvetlice çalkalandı.
- Karışımı GD kolon tüpüne aktardık, 2 dakika santrifüj ettik ve ardından tehlikeli atığı toplama tüpüne boşaltıldı.
- GD kolon için yedek toplama tüpü Alkol 2 mL, oda sıcaklığında, uçucu, dehidre olana ve tüpün tabanında zar zor algılanabilir beyaz bir madde görülene kadar.
- Yıkama prosedürüne başlamak için, önce her GD kolon tüpünü (300 µL) W1 tamponuyla doldurduk, 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj ettik ve akan suyu attık
- Her GD kolon tüpüne (500 µL) W2 tamponu eklendikten ve 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra akış suyu atılmıştır.
- Saf DNA, kurutulmuş GD kolon tüpleri 1,5 mL'lik bir Eppendorf tüpüne yerleştirilerek ve nükleaz içermeyen su (80-100 µL) veya elüsyon tamponu (100 µL) eklenerek elüe edilmiştir. Elüsyon tamponunun emilmesini sağlamak için 5 dakika bekledikten sonra tüpler 1400 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.
- DNA, daha sonra kullanılmak üzere veya PCR analizi yapılana kadar -20°C'de dondurulmuştur.

3.10.2 Primer tasarımı

Bu araştırmada, *S. mutans*'ın moleküler tanımlanması için polimeraz zincir reaksiyonu yürütmek üzere üç özel tasarlanmış primer kullanılmıştır. İlk amplifikasyon, D49430.1 referans suşundan dexA geninin kısmi bir dizisini üreterek, NCBI gen bankasındaki hedef genin grafiksel konumunu doğrulanmıştır. Daha sonra, Cp050273.1 referans suşu için HB750 04715 geninin kısmi dizisini çoğaltmak için ikinci bir primer çifti oluşturulmuştur.

3.10.3 PCR ampliconlarının DNA dizilemesi

PCR ampliconlarının çözünürlüğü için sekanslama yapılmıştır (Macrogen Inc. Seul, Güney Kore). Ek açıklama ve varyansların PCR veya dizileme artefaktlarının sonucu olma olasılığını ortadan kaldırmak için, ABI dizi dosyalarından yalnızca temiz kromatogramlar değerlendirilmiştir. Geri kazanılan PCR parçalarının sanal konumlarını ve diğer özelliklerini belirlemek için, yerel bakteri örneklerinin gözlenen DNA dizileri, NCBI Blast motorunun alınan bitişik DNA dizileri ile karşılaştırılmıştır.

3.10.4 Dizileme verilerinin yorumlanması

Çoklu hizalama için BioEdit Dizi Tabanlı Editör Yazılımı Sürüm 7.1 yardımıyla, çeşitli örneklerden elde edilen PCR ürünlerinin dizileme sonuçları düzenlenip hizalandıktan sonra ve referans veri tabanında (DNASTAR, Madison, WI, ABD) karşılık gelen dizilerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Ek olarak, PCR ampliconları ve bunlara karşılık gelen genomik konumlar, Genius primer yazılımı kullanılarak dizilenen her örnekte gözlenen değişikliklere göre numaralandırılmıştır.

3.10.5 SNP'lerin yeniliğinin kontrol edilmesi

Tespit edilen SNP'lerin benzersizliği dbSNP veri tabanına girilerek doğrulanmıştır. Her SNP daha sonra referans genomdaki uygun konumuna yerleştirilmiştir. Uygun dbSNP bölgesinin görüntülenmesi, daha önce tespit edilmemiş bir SNP'nin mevcut olup olmadığını tespit etmemizi sağlayarak bundan sonra, bulabildiğimiz her bir SNP için her bir dbSNP konumunun kaydedilmesini sağlamıştır.

3.10.6 Filogeni ağacı

S. mutans sekans verileri Mega6 programına aktarılmıştır. Evrimsel bir ağaç veya filogeni oluşturulmuştur.

3.11 İstatistiksel Analiz

SNP'lerin gerçek ve tahmin edilen frekansları karşılaştırılarak, Hardy-Weinberg Dengesi'nden (HWE) sapıp saptadıklarını belirlemek için bir Ki-kare testi kullanılmıştır. Çeşitli genotipler ile CI arasındaki bağlantıyı belirlemek için odds oranları (OR) ve %95 güven aralıkları hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık için SPSS sınır değeri $<0,05$ olarak belirlenmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Geleneksel Tanımlama: *S. mutans*'ın Fenotipik ve Biyokimyasal Tanımlaması

S. mutans'ın izolasyonu ve tanımlaması için 60 adet diş çürüğü örneği kullanıldı; bu örnekler, *Streptococcus* ve diğer oral mikroskobik organizmaların büyümesini destekleyen seçici besiyeri Mitis Salivarius Agar'da ve yüksek konsantrasyonda antibiyotik bacitracin içeren seçici besiyeri Mitis Salivarius Basitrasin Agar'da aşılanmıştır.

S. mutans ve *S. sobrius* hariç çoğu bakterinin büyümesi inhibe edilerek; *S. mutans* bakterisinden 20 ayrışma elde edilmiştir. MSA ortamındaki ayrışmalar, 37°C'de 48 saatlik anaerobik kuluçkalamanın ardından gelişir.

Küçük ölçekte yapılan mikroskobik inceleme, gram pozitif, yuvarlak şekilli mikroorganizmaların zincirlerini veya gruplarını belirler. Şekil 4.1'de çökeltme tonunun maviden kırmızıya kayması, MSBA'nın odak noktasında oluşturma sınırlarının birbirinden 1 mm boyunca ayrıldığını ve %10 TTC ve %4 mannitol ile hızlı sonuç için olumlu sonuçlar verdiğini gösterir. Biyokimyasal testlerle gösterilen gelişimdeki bağlantı kesintileri Çizelge 4.1'de listelenmiştir.

Çizelge 4.1 *S. mutans*'ın biyokimyasal test sonuçları

Temel Özellikler	Özellikler (<i>Streptococcus mutans</i>)
Kapsül	(-ve)
Katalaz	(-ve)
Gazlar	(-ve)
H ₂ O ₂	(-ve)
Hemoliz	Alfa –Beta Hemoliz
Metil kırmızısı	(-ve)
Hareketlilik	Hareketsiz
OF (Oksidatif-Fermentatif)	Fakültatif anaeroblar
Oksidaz	(-ve)
Şekil	Kok
Spor	Spor yapmayan
Voges Proskauer	(+ve)

Çizelge 4.1 *S. mutans*'ın biyokimyasal test sonuçları (Devam)

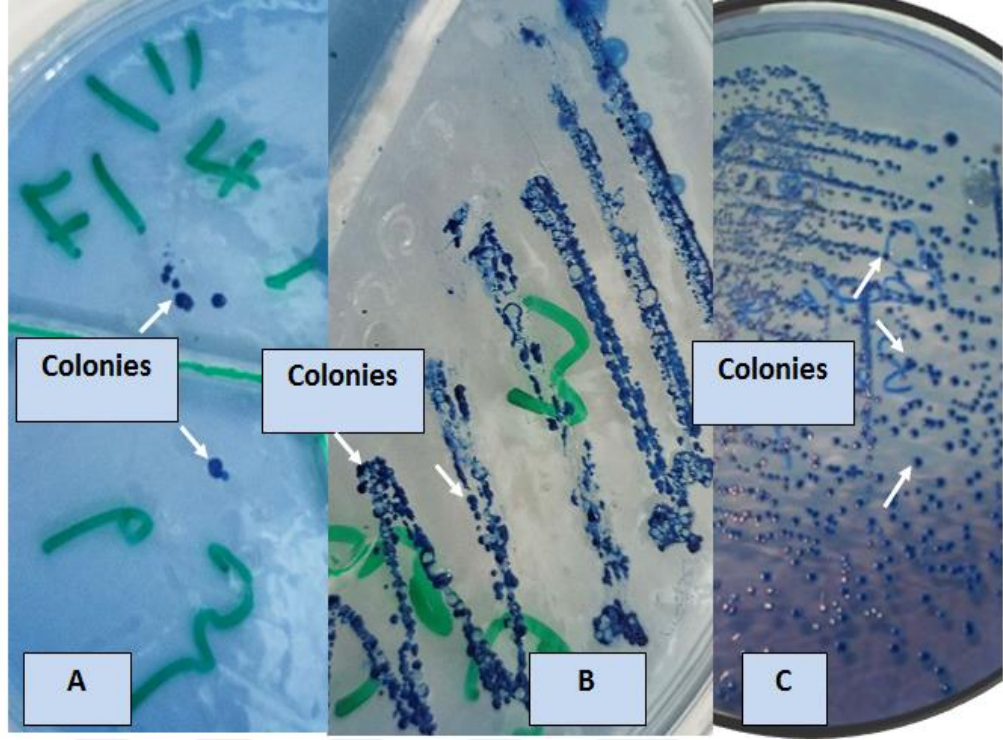
Temel Özellikler	Özellikler (<i>Streptococcus mutans</i>)
Fermantasyonu	
Adonitol	(-ve)
Arabinoz	(-ve)
Arbutin	(+ve)
Basitrasin	Dayanıklılı
Safra eskalin	(+ve)
Selobiyoz	(+ve)
DNAz	(-ve)
Galaktoz	(+ve)
Jelatin hidrolizi	(-ve)
Glikoz	(+ve)
Gliserol	(-ve)
Pigment ürünü	Değişken

Pozitif (+ve) ve Negatif (-ve)

4.2 Mutans Streptokokların İzolasyonu

Mutans streptokoklar için seçici besiyeri olarak mitis salivarius agarda kültür yöntemi, birçok *Streptococcus mutans* kolonisi olduğunu ortaya çıkarmıştır, bu koloniler özel koloni morfolojisi, pürüzlü, koyu mavi renk ile karakterize edilmiştir. Bakterinin sadece çürük aktif bölgelerden izole edildiği bildirilirken, *S. mutans* hem aktif hem de çürük olmayan bölgelerden izole edilmiştir.

MSB üzerinde 55 hastadan (10 ile 55 yaş arası) 38 bakteri kolonisi geri kazanılmıştır. Mutans streptokokları sınırlandırmak için il morfolojisine bağlı olarak 10 koloni seçilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Mitis salivarius agar plakasındaki *Streptococcus mutans*'ın koloni morfolojisi. A-tek koloni, B ve C çizgi oluşturma kültür yöntemleri ve büyüme

4.3 *S. mutans*'ın Moleküler Tanımlanması

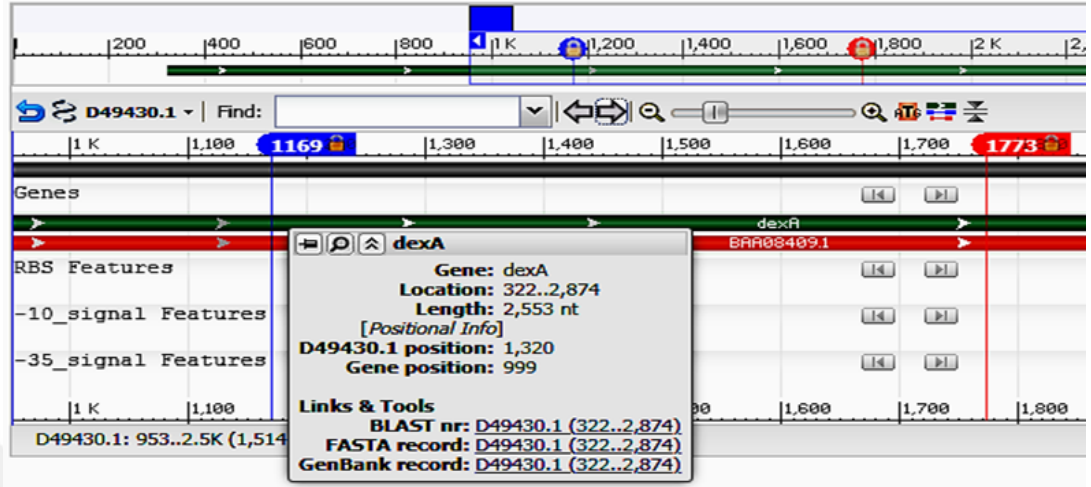
4.3.1 Spesifik primer tasarlama konumu

D49430.1 referans suşu, başka hiçbir bakteride bulunmayan *S. mutans*'ı çoğaltmak üzere spesifik primer çifti tasarlamak için seçilmiştir. Tasarlanan primer çiftinin yeri, 16rDNA'da 1169 ve 1773 arasındaki bölgede meydana gelen dexA geninin kısmi dizisinin ampikon bölgesidir (Şekil 4.2).

Streptococcus mutans dexA gene for dextranase, comp

GenBank: D49430.1

[GenBank](#) [FASTA](#)



Şekil 4.2 *S. mutans* dexA geninin kısmi dizisinin amplikon bölgesi

4.3.2 Silico PCR ile güçlendirilmiş dexA geninin kısmi dizisi

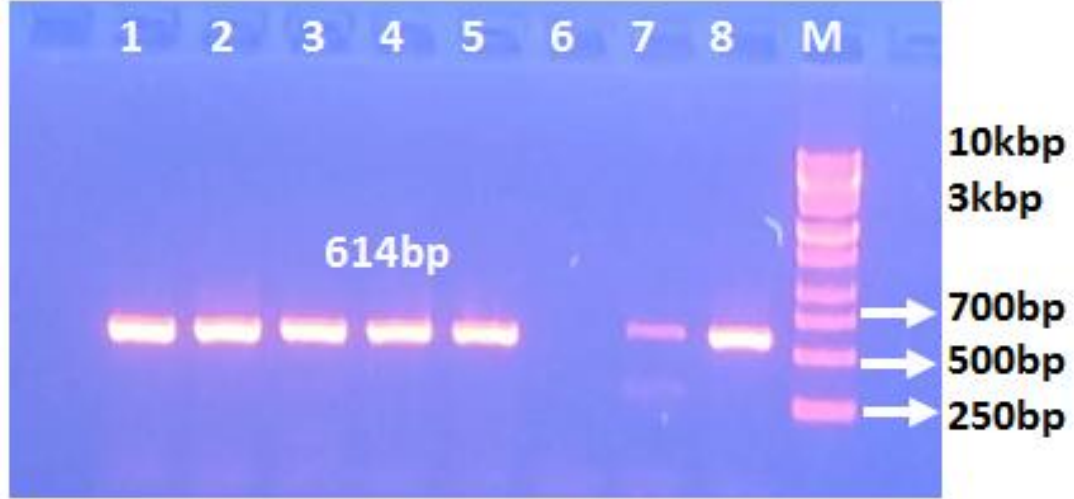
D49430.1 referans suşu, dexA geninin kısmi dizisini hedefleyen spesifik primer çiftinin tasarlanması için kullanılmıştır. İn silico PCR sonucu *S. mutans* için 614bp göstermiştir. İleri ve geri primerlerin konumu ve dizisi ile dexA gen amplikonunun kısmi dizisinin ve primer çiftinin yan bölgesinin grafik dizisi Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

```
>D49430.1:1160-1780 Streptococcus mutans dexA gene for dextranase, complete cds
GGAGCCATTTCGAGGTTGAAACAGATGCTGTTAAAGCCTTGGTCAATCGTGTCATCA
AACTGGCGCTGTTGCCATGCTCTATAATATGATTTTAGCACAGAATGCTAATGAAACGG
CTGTTTTACCAGATACTGAGTACATCTATAATTAAGACTGGTGGTTATGGTCAAAAT
GGTCAGGTCATGACTTACTCTATTGATGATAAGCCACTGCAATATTATTACAATCCTTT
GAGTAAAAGTTGGCAAAATTATTTCTAATGCCATGGCTCAAGCTATGAAAAC TGGC
GGTTTTGATGGCTGGCAGGGAGATACAAATGGAGATAATCGTGTTCTTTCCCATATCA
AAAGGACAGTCGAGATATTGCTCATTCTTTATGTTATCTGATGTCATGCTGAATTTCT
CAATAAAATGAAGGAAAACTGCC TCAGTATTATTTAACAC TCAATGATGTTAATGGTG
AAAATATCAGCAAAC TCGCCAACAGCAAACAAGATGTGATTTACAATGAATTATGGCC
TTTTGGAAC TTCAGCTTTGGGGAACCGTCCCAAGAAAGTTATGGTGAAGCTTGAAGCT
CGTGTGATCAAGTTCGCCAAGCGACAGGGAAAT
```

Şekil 4.3 Spesifik primer ile amplifiye edilen dexA geni amplikonunun grafik dizisi

4.3.3 dexA geninin hedeflenen dizisinin PCR'ı

Spesifik primer çifti, fenotipik ve biyokimyasal testlerle *S. mutans* olarak önceden tanımlanmış 7 koloninin dexA geninin kısmi dizisini başarıyla çoğaltmıştır. Amplifikasyon 614bp büyüklüğünde PCR bandı göstermiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 *S. mutans*'ın dexA geninin amplifikasyon kısmi dizisinin PCR ürünleri

4.3.4 *S. mutans* konformasyonunu belirlemek için dizi çalışması

Amplifiye edilen *S. mutans* izolatlarından olan PCR ürünü (WAHEEDA 1 ve 10) rastgele seçilmiştir. Macrogen Inc. dizileme için toplamda yaklaşık 18 PCR ürünü Seul, Kore'den almıştır. Alınan on diziden dokuzunda başarı sağlanmıştır. Bu araştırmada kullanılan *S. mutans* izolatlarına yazarların tercihlerine göre WAHEEDA adı verilmiştir. İzolatlar için dokuz sekans çizelgesi, bağlantıya dayalı olarak genbank'ta depolanan referans sekanslarla hizalanmıştır, NCBI raporunun sonuçları, CP01323.1, CP033199.1 ve LR13432.1 erişim numaralarına sahip birçok referans *S. mutans* suşu ile %99,35 -%99,15 özdeşlik yüzdesi Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

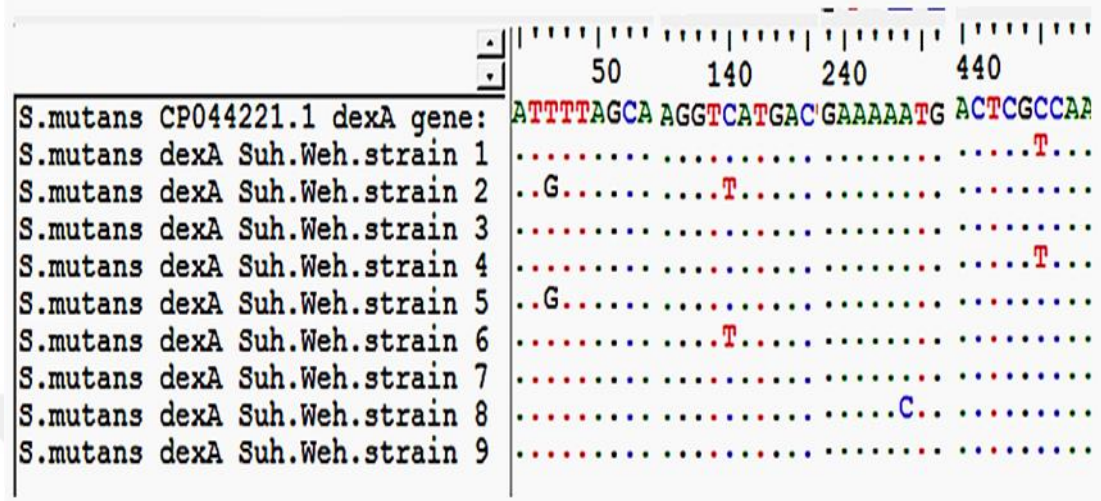
	Description	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Streptococcus mutans strain FDAARGOS_685 chromosome	100%	0.0	99.35%	2054143	CP050962.1
✓	Streptococcus mutans strain P1 chromosome, complete genome	100%	0.0	99.35%	2085371	CP050273.1
✓	Streptococcus mutans strain P6 chromosome, complete genome	100%	0.0	99.35%	2085254	CP050272.1
✓	Streptococcus mutans strain S1 chromosome, complete genome	100%	0.0	99.35%	2080705	CP050271.1
✓	Streptococcus mutans strain S4 chromosome, complete genome	100%	0.0	99.35%	2085365	CP050270.1
✓	Streptococcus mutans strain 35 translation elongation factor ts.1	100%	0.0	99.35%	62987	MK144293.1
✓	Streptococcus mutans NBRC 13955 DNA, complete genome	100%	0.0	99.35%	2018796	AP019720.1
✓	Streptococcus mutans strain NCTC10449 genome assembly, ch	100%	0.0	99.35%	2019343	LS483349.1
✓	Streptococcus mutans strain LAR01 chromosome, complete gen	100%	0.0	99.35%	2088369	CP023477.1
✓	Streptococcus mutans strain FDAARGOS_1458 chromosome, cc	100%	0.0	99.35%	2019345	CP077404.1
✓	Streptococcus mutans strain 27-3 chromosome, complete genom	100%	0.0	99.35%	1978522	CP066294.2
✓	Streptococcus mutans GS-5, complete genome	100%	0.0	99.35%	2027088	CP003686.1
✓	Streptococcus mutans NN2025 DNA, complete genome	100%	0.0	99.35%	2013587	AP010655.1
✓	Streptococcus mutans LJ23 DNA, complete genome	100%	0.0	99.13%	2015626	AP012336.1
✓	Streptococcus mutans strain ATCC 25175 dextranase gene, corr	100%	0.0	99.13%	2553	HQ711852.1
✓	Streptococcus mutans dexA gene for dextranase, complete cds	100%	0.0	99.13%	3747	D49430.1

Şekil 4.5 *S. mutans* izolat dizisi ile Blast programı kullanılarak NCBI raporunun sonuçları

4.3.5 Sekans sonuçlarına dayalı olarak *S. mutans* genotiplenmesi

BioEdit'e dayalı olarak *S. mutans*'ın dokuz dexA gen dizisinin genotiplendirilmesi: Dokuz *S. mutans* suşu Suh.We. 1-9 rastgele seçilmiştir ve dizi varyasyonu göstermelerine rağmen, hepsi BioEdit 2,7'ye dayalı bir çoklu hizalama kullanılarak *S. mutans* referans suşlarıyla (CP01323.1, CP033199.1, LR13432.1, CP033744.1 ve AP014612.1 erişimleri) oldukça özdeşdir. BioEdit'e dayalı olarak *S. mutans*'ın dokuz dexA gen dizisinin CP044221.1 referans suşu ile hizalanmasının sonucu, *S. mutans* içinde beş genotip göstermiştir, bunlar sırasıyla tip 1 suş 1 ve 4, tip 2 suş 3,7 ve 9, tip 3,4,5 suş 2,5 ve 8'i içermektedir, Şekil 4.6. Bu tipler *S. mutans*'ta mevcut birçok tip ile uyumludur. *S. mutans*'ın genetik çeşitliliği, rastgele primerler kullanan PCR (AP-PCR) (Mitchell *et al.* 2009), rastgele çoğalan polimorfik DNA (RAPD) (Redmo Emanuelsson *et al.* 2003) gibi çeşitli genotiplenme yöntemleri kullanılarak çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır. Dizilemenin artık herhangi bir organizmanın genotiplendirilmesi için en iyi teknoloji

olduğuna, maliyet ve doğruluk açısından RAPD-PCR ve RFLP'yi geride bıraktığına inanılmaktadır.



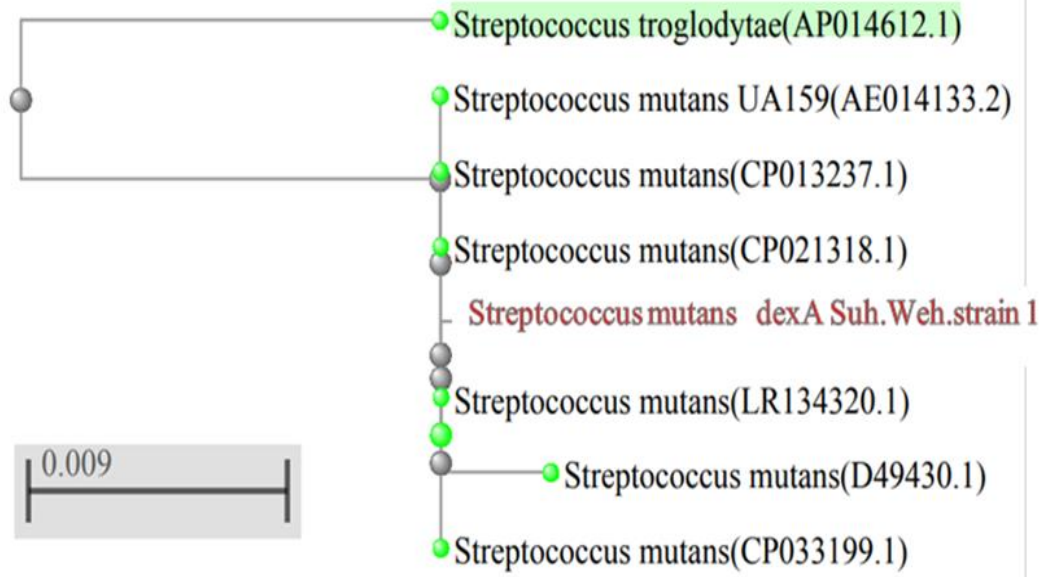
Şekil 4.6 BioEdit yazılımına dayalı olarak dokuz *S. mutans*'ın genotiplenmesi

S. mutans'ın dokuz dizili dexA geninin kromatogramlara dayalı olarak Geneious primer yazılımı ile çoklu hizalanması: Geneious prime yazılımına dayalı çoklu hizalamaların sonuçları, 9 *S. mutans* suşunda mikro-evrimselliğin oldukça keskin bir görünümünü göstermiştir. *S. mutans*, genotip 1'de dokuz suştan 3'ünün timin'den guanin'e heterozigot mutasyon gösterdiğini, genotip 2'de 3 suşun sitozin'den timin'e (C>T) mutasyon geçirdiğini, genotip 3'te ise dokuz suştan 6'sının mutant olduğunu göstermiştir, adeninden sitozine (A>C) homozigot ve heterozigot mutant alel, genotip 4 ise dört sušta mutasyon gösterirken, suş 1'de homozigot, diğerlerinde ise sitozinden timine (C>T) heterozigot mutasyon görölmüştür (Şekil 4.7).



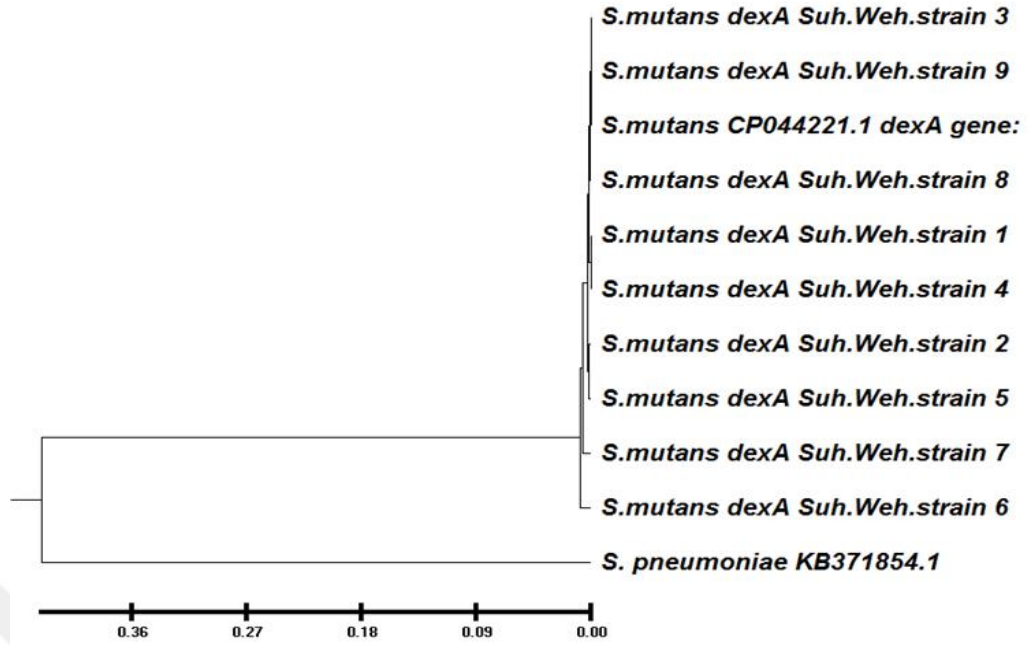
Şekil 4.7 Geneious prime yazılımına dayalı olarak *S. mutans*'ın genotiplenmesi tarafından gerçekleştirilen hizalama

S. mutans'ın çevrimiçi ve MEGA 6 yazılımına dayalı filogeni ağacı: *S. mutans* izolatlarının sekiz ve dokuz dizisi, ilk çevrimiçi olarak (Şekil 4.8) (A) ve ikinci olarak MEGA 6 yazılımı (Şekil 4.8) (B) ile filogeni ağacı oluşturuldu, yakın ilişkili bakteri dizilerini kullanarak, iki amaca hizmet eden bir filogenetik ağaç meydana gelmiştir. Bunlardan birincisi, primer çiftlerimizin *S. mutans* için spesifik olduğunu ve diğer *Streptococcus* spp. mutans için spesifik olduğunu doğrularken; ikincisi *S. mutans* 1 ve 9'un CP01323.1, CP033199.1, LR13432.1, numaralarına sahip referans *S. mutans* suşlarından kaynaklandığını göstermiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 1Suh.Wed suşu 1 ile gen bankası hizasında saklanan 7 referans *Streptococcus mutans* suşunun çevrimiçi filogeni ağacı

Mega 6 yazılımına dayalı 9 *S. mutans* suşunun dexA gen dizisinin filogeni ağacı: *S. mutans* dexA gen dizisinin Mega 6 yazılımına dayalı olarak oluşturulması sonucunda, tüm suşların birbirine kapalı olduğu görülmüştür. Bu sonuç, tüm suşların tek bir biyolojik ünite olarak, *S. pneumoniae*'nın farklı türler olarak ağaç kökü temsilcisiyle karşılaştırıldığında açıklamaktadır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 *S. mutans* CP044221.1 referans suşu ve *S. pneumoniae* KB371854.1 ile ağaç kökü ile dexA gen hizalamasının Mega 6 UPGM ile filogeni ağacının oluşturulması

4.4 HB750_04715 Genine Dayalı *S. mutans* Suşlarının Genotiplendirilmesi

4.4.1 Spesifik primer PAR'ın HB750_04715 geni üzerindeki yeri

S. mutans'ın tüm genomunda arama yaparken, bulunan benzersiz sekans için Cp050273.1 referans suşu seçilmiştir ve ilgilenilen klinik örneklerde *S. mutans* suşunu genotiplemek için başka bir spesifik primer tasarlanmıştır. Daha sonra, tasarlanan grafik dizisinin HB750_04715 geninde yer aldığı belirlenmiştir, bu dizi ileri ve geri primer bölgelerini temsil eden 931677-932091 bölgeleri arasında yer almaktadır (Şekil 4.11).

A whole genomic sequence of Streptococcus mutans strain P1

GenBank: CP050273.1

[GenBank Graphics](#)

>CP050273.1:931665-932100 Chromosomal DNA sequence of Streptococcus mutans, Type Strain P1

```
GGCCGTGCTAGCCGCAACGCGAACATCTTGATCAGCGGCAGCGCCTA
CTGGAACCCAGACACCTAAATAGCCAGAACTTGAGGGTTGGCATAG
CCTTTAATATCAGCCGCTGTGAAGATCAATTCCCCTCTGTCATTGGTG
TAGCGCACCAAACCAGCCGCTTCTTGATCGGAATGATAAGCCTTGAT
ACCGTTATCTGTGGTCAAGAGTAAAGGTCGGTAAGCTTGTTCTTATG
GGCTGCTCCCATATTGACAACCACGCGATCAGAAGCCTTCAAACGTA
AAGAAGGGTTATTGCCTTCAATCACGGCCACTCCTGAAGTCCGTGTG
GTGCGGTCCCCTGTATCCGTTGCTTTCAAAGCACCTTTACCATAGCGG
ACAGACGTAATGATTTGAGAATTGCCAACCTGTTGATTGCGCATGGCT
TGACCGCCT
```

Şekil 4.11 *S. mutans* kromozomu üzerinde 931677-932091 arasında yer alan, spesifik primer çifti ile çoğaltılan amplikonun 11 grafik dizisi

4.4.3 PCR'a dayalı *S. mutans* genotiplemesi

Spesifik primer çifti, 415bp boyutunda benzersiz bant vererek *S. mutans*'ı diğer bakteri türlerinden başarılı bir şekilde genotiplemiştir (Şekil 4.12). 1-9 numara klinik örneklerin (tükürük) doğrudan PCR'ını; 10-18 numaralı örnekler *S. mutans*'ın DNA ekstraksiyonundan sonra saf izolatlarının PCR'ını göstermektedir.



Şekil 4.12 *S. mutans*'ın tiplendirilmesi için seçilen genin amplifikasyon kısmi dizisinin PCR ürünlerinin jel elektroforezi

4.4.4 *S. mutans*'ın yerel suşlarının genbank'ta depolanan referans suşlarla çift yönlü hizalanması

S. mutans'ın yerel suşlarının çift yönlü hizalanmasının sonucu yüksek özdeşlik (%100), E. değeri (0,0) ve yüksek sorgu kapsamı (%100) Şekil 4.13'te gösterilmiştir. Üç hizalama parametresinin yüksek değerleri (Kimlik %100; kapsama 100) % ve yüksek E. değeri 0,0'a yakın olduğundan, bu hizalama kriterleri *S. mutans*'ı başkalarını amplifiye etmek için tasarlanan primerin kesinliğini doğrulamıştır.

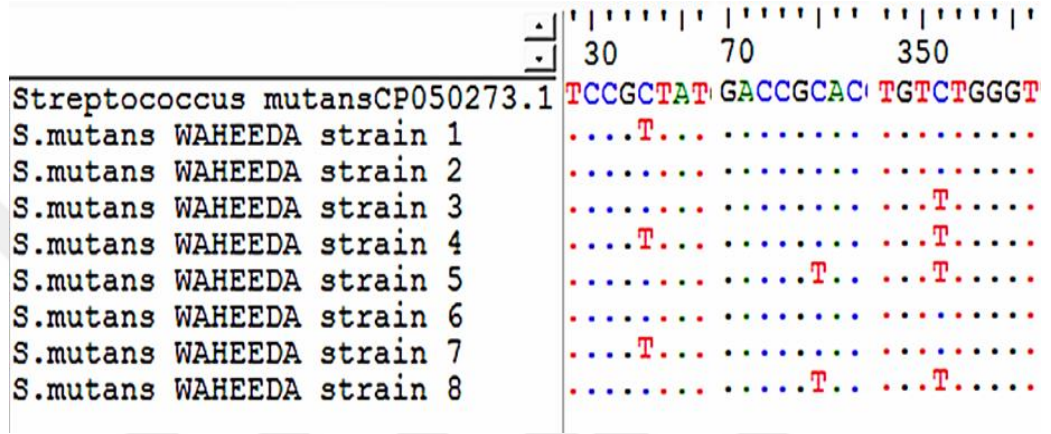
☒ select all	100 sequences selected	hics	Distance tree of results	New MSA View		
	Description	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Streptococcus mutans strain P1 chromosome, complete gen	100%	0.066	100.00%	2085371	CP050273.1
☒	Streptococcus mutans strain P6 chromosome, complete gen	100%	0.066	100.00%	2085254	CP050272.1
☒	Streptococcus mutans strain S1 chromosome, complete gen	100%	0.066	100.00%	2080705	CP050271.1
☒	Streptococcus mutans strain S4 chromosome, complete gen	100%	0.066	100.00%	2085365	CP050270.1
☒	Streptococcus mutans strain NCH105 chromosome, comple	100%	0.066	100.00%	2015393	CP044221.1
☒	Streptococcus mutans NBRC 13955 DNA, complete genom	100%	0.066	100.00%	2018796	AP019720.1
☒	Streptococcus mutans strain LAB761 chromosome, complet	100%	0.066	100.00%	2076490	CP033199.1
☒	Streptococcus mutans strain NCTC10449 genome assembly	100%	0.066	100.00%	2019343	LS483349.1
☒	Streptococcus mutans strain LAR01 chromosome, complete	100%	0.066	100.00%	2088369	CP023477.1
☒	Streptococcus mutans strain NG8, complete genome	100%	0.066	100.00%	1984441	CP013237.1
☒	Streptococcus mutans strain FDAARGOS 1458 chromosom	100%	0.066	100.00%	2019345	CP077404.1
☒	Streptococcus mutans strain 27-3 chromosome, complete gs	100%	0.066	100.00%	1978522	CP066294.2
☒	Streptococcus mutans LJ23 DNA, complete genome	100%	0.066	100.00%	2015626	AP012336.1
☒	Streptococcus mutans B04Sm5 chromosome, complete gen	100%	0.066	100.00%	2011542	CP061071.1
☒	Streptococcus mutans NN2025 DNA, complete genome	100%	0.066	100.00%	2013587	AP010655.1

Şekil 4.13 Yerel *S. mutans* suşunun gen bankasında depolanan referans suşlarla ikili olarak hizalanması

4.4.5 BioEdit'e dayalı olarak *S. mutans*'ın HB750_04715 geninin dokuz dizisinin genotiplendirilmesi

Waheeda 1-8 *S. mutans* suşlarından elde edilen sekiz izolatın tümü sekans farklılığı göstermiş, ancak CP050273.1 erişim numaralı *S. mutans* referans suşlarıyla yüksek

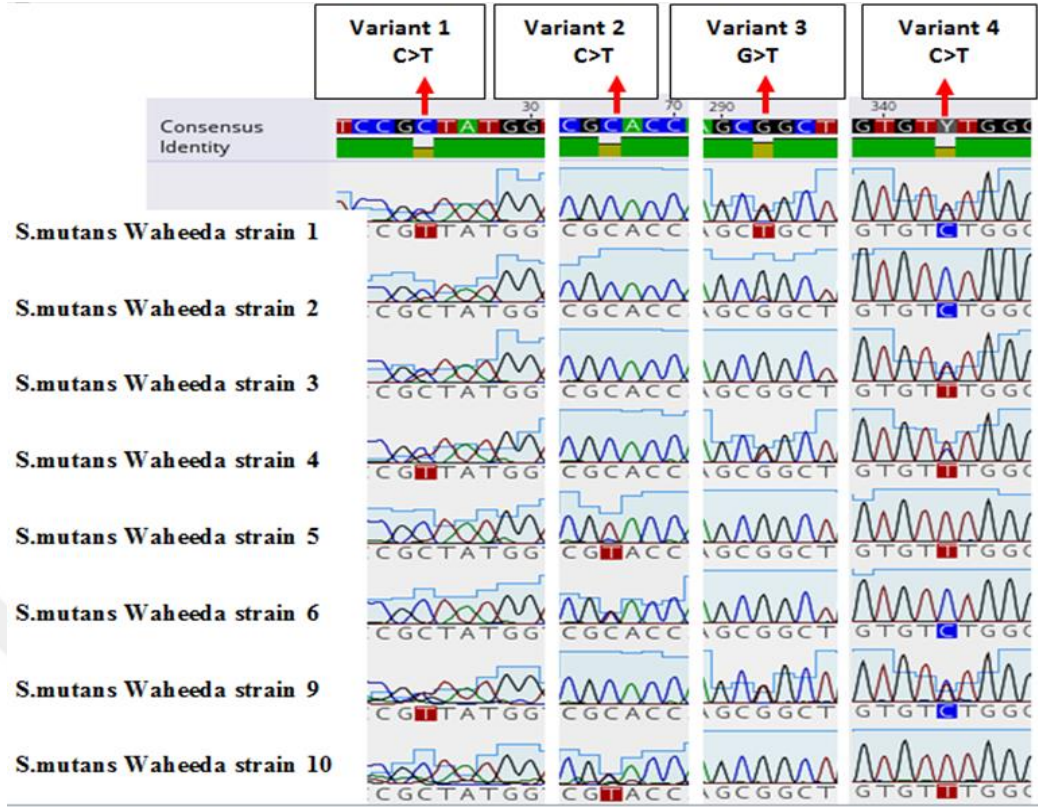
düzeyde benzerlik göstererek daha hassas primer tasarımına olanak sağlamıştır. Çoklu hizalamalar için BioEid 2,7 kullanılmıştır. *S. mutans*'ın sekiz dizi seçici geninin CP050273.1 referans suşu ile BioEdit'e dayalı olarak hizalanmasının sonucu, *S. mutans* içinde beş genotip göstermiştir, bunlar sırasıyla tip 1 suş 1 ve 7, tip 2 suş 2 ve 6, tip 3 suş 5 ve 8, tip 4 ve 5 suş 3 ve 7'dir (Şekil 4.14). Bu tipler *S. mutans*'ta mevcut birçok tip ile uyumludur.



Şekil 4.14 BioEdit yazılımına dayalı sekiz *S. mutans* suşu için seçici genin kısmi dizisinin çoklu hizalanması

4.4.6 *S. mutans*'ın dokuz sekans HB750_04715 geninin Geneious prime yazılımına dayalı olarak genotiplendirilmesi

Streptococcus mutans suşundaki polimorfizmin tespiti için sekiz temsili *S. mutans* suşu seçilmiştir. Waheeda 1-8 rastgele oluşturulmuş ve sekiz izolatin tümünde sekans varyasyonu görülmüştür, ancak CP050273.1 erişim numaralı *S. mutans*'ın referans sekans ipliği ile karşılaştırıldığında beş genotip gösterilmiştir. Şekil 4.15'te *S. mutans*'ın sekiz dizi seçici geninin CP050273.1 referans suşu ile çoklu hizalama sonucunu gösterilmektedir.



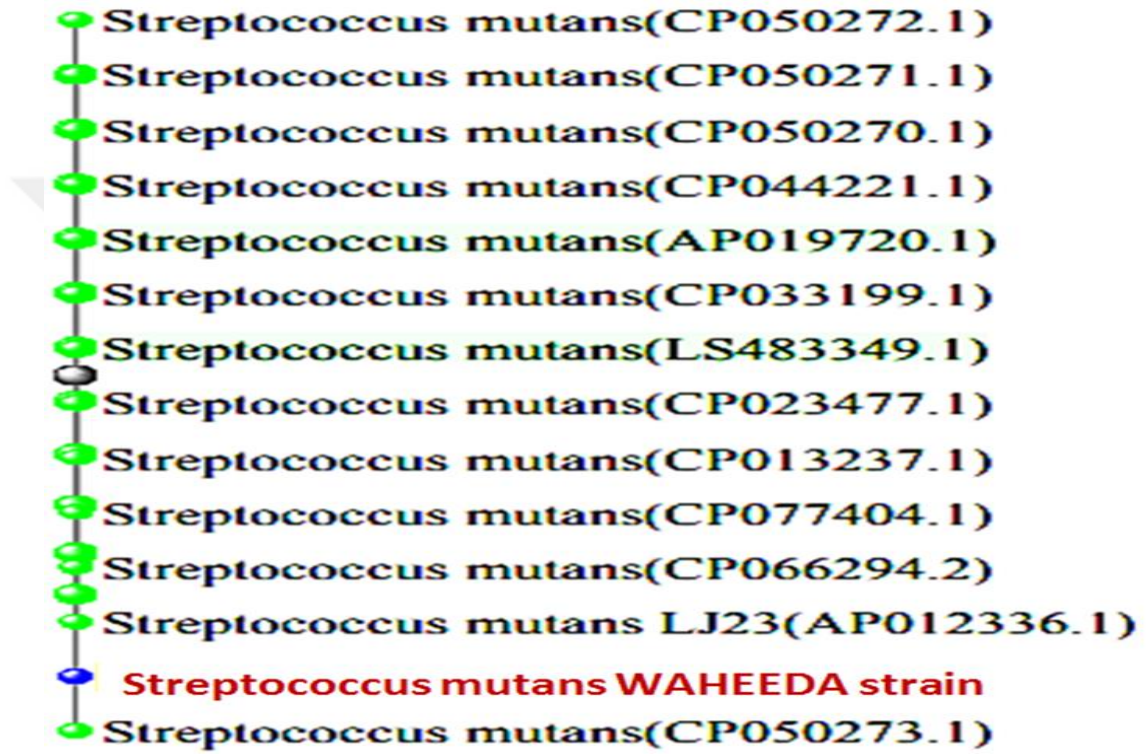
Şekil 4.15 Geneious prime yazılımı tarafından gerçekleştirilen hizalama

Geneious prime yazılımına dayanan çoklu hizalamaların sonuçları, *S. mutans*'ın 8 suşunda, genotip 1'de sekizde 5'inde (homozigot C>T gösterilen 3 suşa 1,4,7; 2 dahil) mikro evrimin son derece keskin bir görünümünü göstermiştir. Heterozigot gösterilen suşlar 2 ve 3 suşu içeriyordu, sitozin mutanlığı timine karşı yabancı alel olarak tespit edildi. Genotip 2, 2. türü içeren yabancı tipte, Genotip 3, sekiz suştan 1 mutanlığı göstermektedir. Yabancı alel sitozin mutanlığından timine kadar homozigot aleli gösteriyordu. Genotip 4 ise dört suşa mutasyon gösterirken, bir suşa homozigot, diğer suşa ise sitozinden timine heterozigot mutasyon görülmüştür.

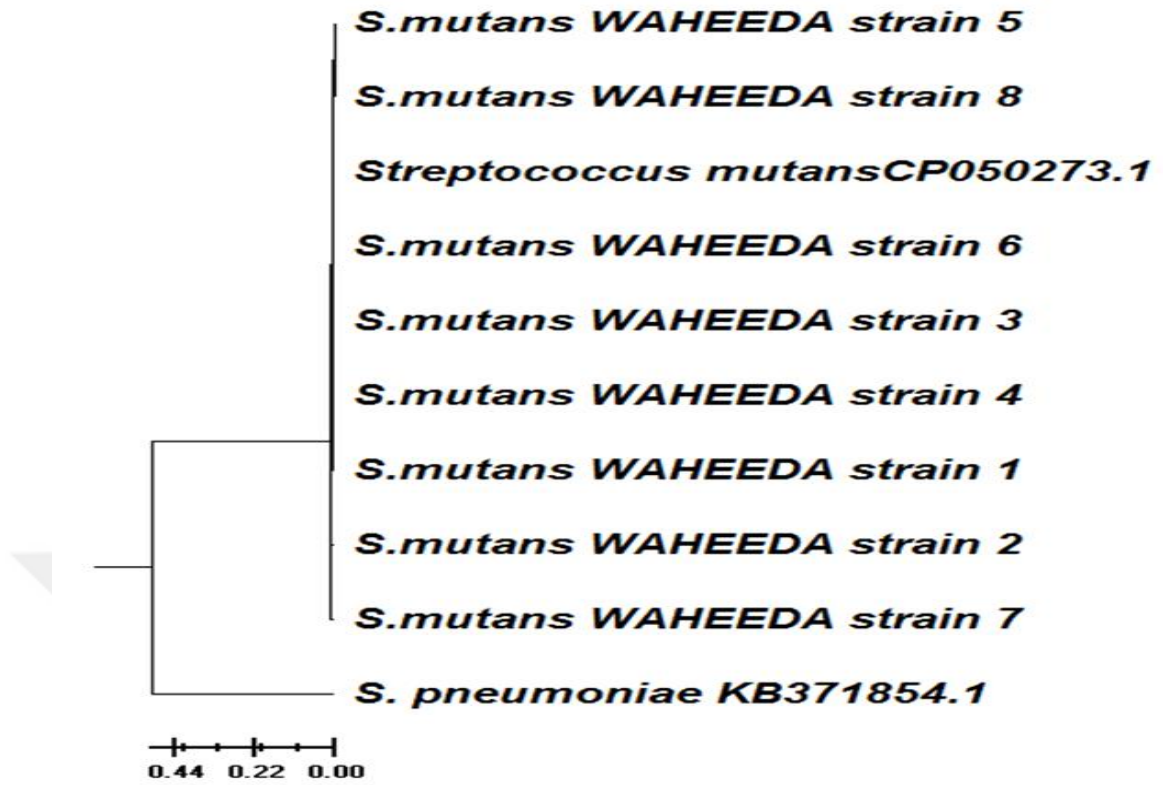
4.4.7 *S. mutans*'ın çevrimiçi çoklu hizalama dizi analizine ve MEGA 6 yazılımına dayalı filogeni ağacı

İkili hizalamadan elde edilen on üç referans suş ve *S. mutans*'ın yerel suşunun (1-8WHEEDA izolatları) filogeni ağacı oluşturmuştur: ilk olarak, Şekil 4.16'da *S. mutans*'ın sekiz yerel suşunun (1-8WHEEDA izolatları) çevrimiçi hizalama ve MEGA 6 yazılımı

ile filogeni ağacı oluşturmuştur. Şekil 4.17’de Filogeni ağacını oluşturmak için yakın ilişkili bakteri dizileri ile iki amaç sağlanmıştır. Bunlardan ilki *S. mutans* veya diğer *Streptococcus* spp. için tasarlanan primer çiftinin spesifikasyonunu doğrulamak, diğeri ise, *S. mutans* 1 ve 8'in CP050272.1, CP050271.1, CP050270.1, CP033199.1, LS483349.1 erişim numaralarına sahip referans *S. mutans* suşlarından kaynaklandığını göstermektir.



Şekil 4.16 WAHEEDA ile hizalanan 12 referans *S. mutans* suşunun çevrimiçi filogeni ağacı



Şekil 4.17 Seçilen genin sekiz *S. mutans* dizisinin filogeni ağacının Mega 6 yazılımı ile oluşturulması

4.5 IL-10'un Polimorfizmi

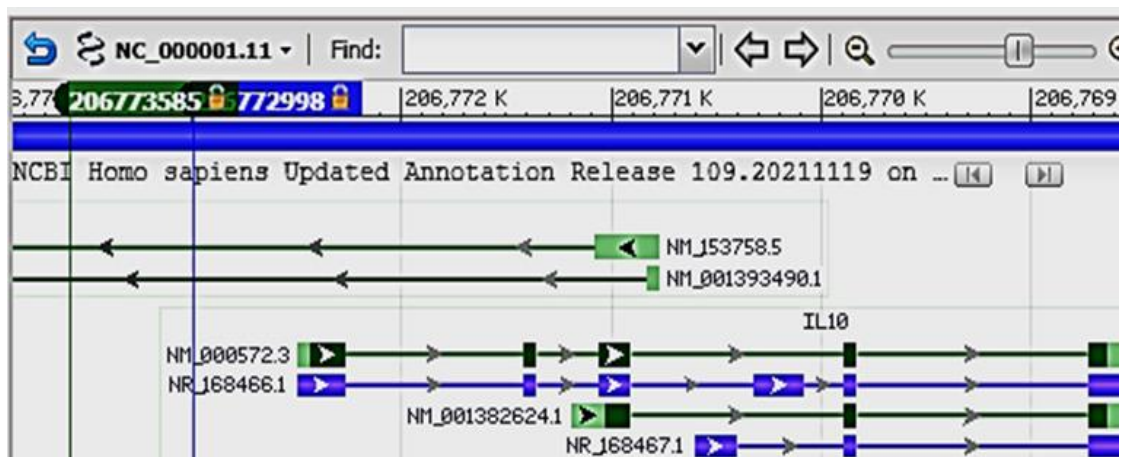
IL-10 geni, kromozom 1'in kısa kısmında 206772998-206773585 dizisinde 588bp uzunluğunda bulunur (Şekil 4.18). Bu gen, çeşitli mikrobiyal patojenlere ve diğer mikrobiyal enfeksiyonlara karşı doğuştan gelen savunmada önemli bir rol oynar. Bazı mutasyonların IL-10 protein eklemlenmesini olumsuz etkilediği görülmektedir. Bu gen, doğuştan gelen antimikrobiyal bağışıklık için önemli bir sinyal düzenleyicisidir. Bu da bizi çeşitli mikrobik enfeksiyonlara karşı korur.

ATCCAAGACAACACTACTAAggcttctttgggaaggggaagtagggatag
 gtaagaggaaagtaagggacctctatccagcctccatggaatcctgact
 tcttttccttggtattttcaacttcttcaccccatcttttaaactttaga
 ctccagccacagaagcttacaactaaaagaaactctaaggccaattta
Ccaaggtttcattctatgtgctggagatgggtgtacagtaggggtgaggaaa
 Ccaaattctcagttggcactgggtgtaccctgtacaggtgatgtaatac
 Tctgtgcctcagtttgctcactataaaatagagacggtaggggtcatggt
 Gagcactacctgactagcatataagaagctttcagcaagtgcagactact
 Cttaccacctcccccaagcacagttgggggtgggggacagctgaagaggt
 ggaaacatgtgcctgagaatcctaataaatacggggtaaaggagcctgga
 acacatcctgtgaccccgctgtactgtaggaagccagtcctctggaaagt
 aaaatggaagggctgctt**GGA**ACTTT**GAGGATATTTA**

Şekil 4.18 Primerin amplikon sekansı ve yan bölgesi

4.5.1 IL-10'un ve primerlerin yan bölgelerinin konumları

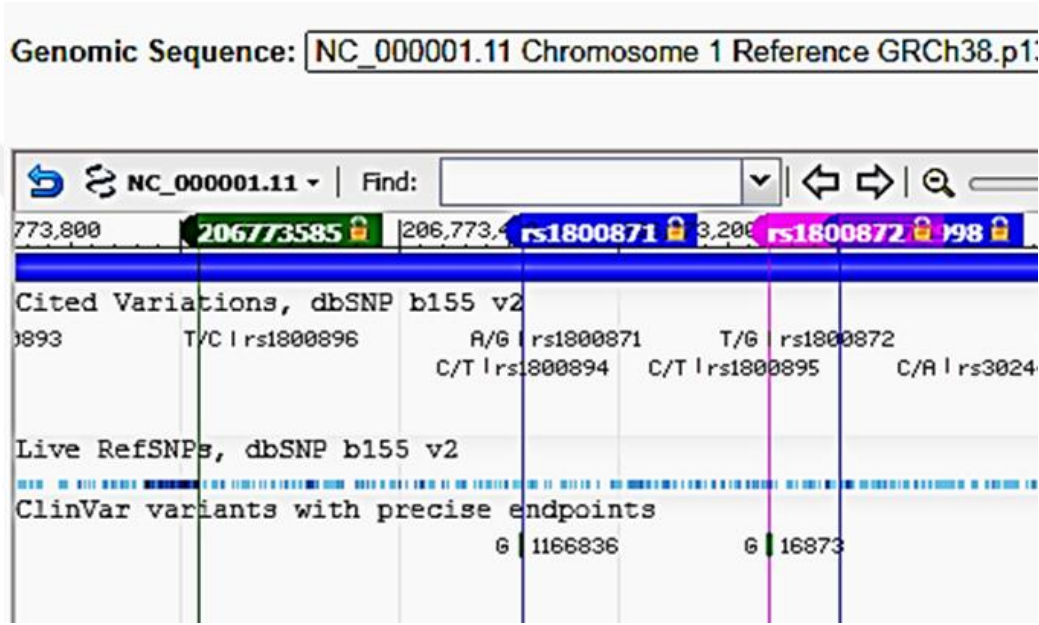
IL10, kromozom 1'de 1q32.1 bölgesinde 206767602-206772494 arasında 7 ekzon ile yer alır ve isimleri CSIF; TGIF; GVHDS; IL-10; IL-10A olarak bilinir: IL-10 4892bp uzunluğundadır (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 SNP'leri kapsayan F10 primer çifti tarafından amplifiye edilen IL-10'un promotör bölgesinin hedeflenen bölgesi

4.5.2 IL-10 geni üzerindeki SNP'lerin konumu

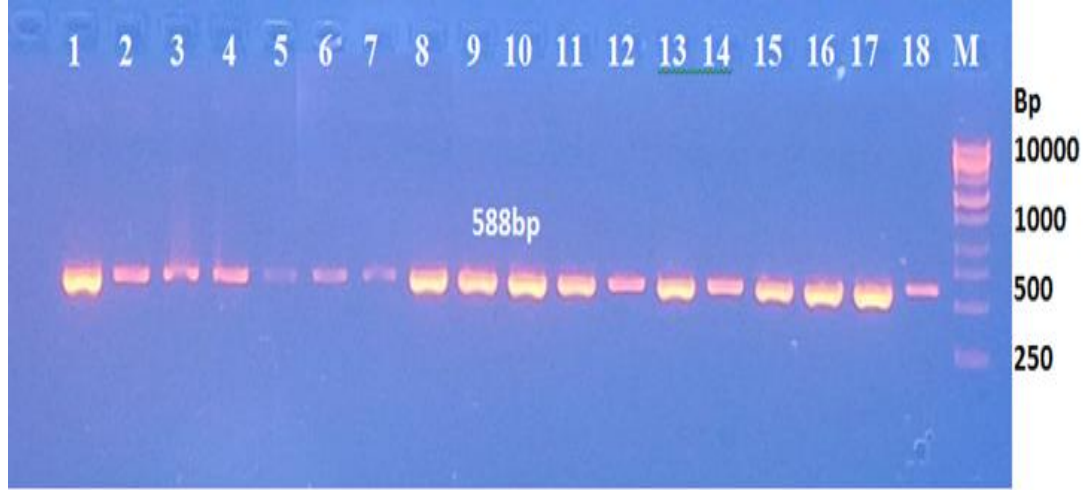
SNP'lerin (rs1800871 T>C, rs1800872 A>C) konumunu belirlemek için, rs1800871 T>C, rs1800872 A>C SNP'leri kromozom 1'in bir kısmında ve NC_000001.11 dizi konum numarasında yer almıştır, bu yerel örneklerin gözlemlenen DNA dizileri, alınan DNA dizileri (GenBank NC_000001.11) ile karşılaştırılarak, alınan PCR parçalarının yaklaşık konumları ve diğer ayrıntıları belirlenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 SNP'leri kapsayan F10 primer çifti tarafından amplifiye edilen IL-10'un kısmi dizisinin hedeflenen bölgesi

4.5.3 IL-10 geninin amplifikasyon kısmını içeren SNP'ler (rs1800871 T>C, rs1800872)

IL-10 geninin promotörünü çevreleyen primer çifti, amplifikasyon altındaki hedefi başarılı bir şekilde çoğaltmıştır. IL-10 hedefinin PCR ürünleri 588bp olarak gösterilmiştir (Şekil 4.21). IL-10 promotörünün yanındaki primer çifti gen, amplifikasyon altında hedefi başarıyla çoğaltmıştır. IL-10 hedefinin PCR ürünleri 588bp'yi göstermektedir.



Şekil 4.21 IL10'un hedef DNA bölgesindeki SNP'ler

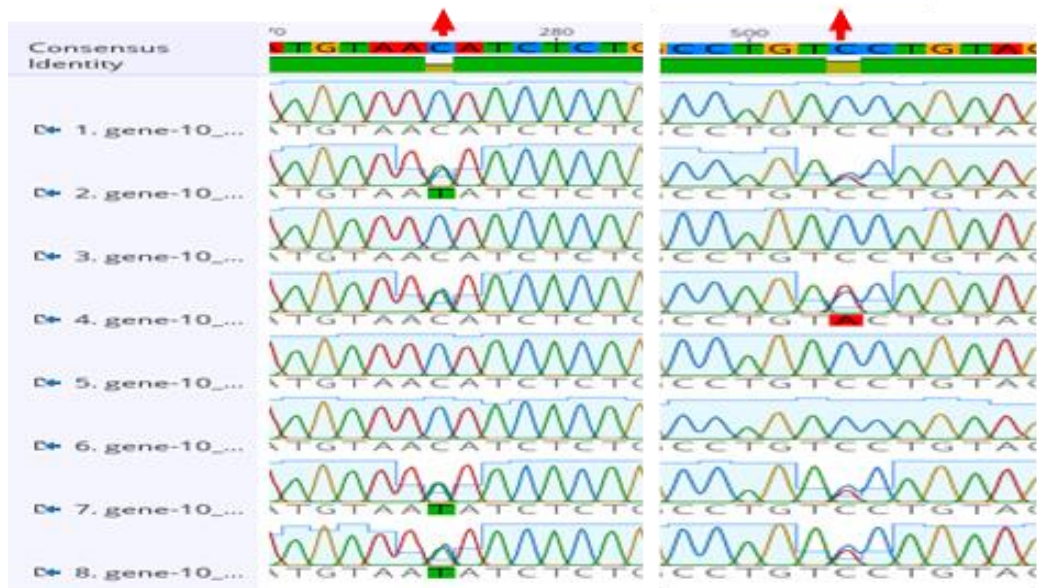
4.5.4 Hedeflenen bölgenin kromatogramlarının çoklu hizalamaları

Hedeflenen bölgenin Şekil 4.18'deki çoklu hizalama sonuçlarında 206772998-206773585 iki SNP gözlemlenmiştir: rs1800871 T>C, rs1800872 A>C. rs1800871 T>C, rs1800872 A>C SNP'lerinin her ikisinin de hastalık risk aleli ile ilişkili olma sıklığı yüksektir.

rs1800871 T>C SNP alel ve genotip frekansları hastalar ve kontrol arasında anlamlı farklılıklar göstermiştir. Sonraki SNP'nin (rs1800871 T>C) hastalarda üç genotipe (CC, CT ve TT) sahip olduğu görülürken, kontrollerde sadece CC ve CT genotipleri fark edilmiştir (Şekil 4.22) (Şekil 4.23).



Şekil 4.22 IL10'un hedef DNA bölgesi olarak hedeflenen bölge chr1:206772998-206773585'in kromatogramlarının çoklu hizalaması: rs1800871 T>C, rs1800872 A>C, hasta hastalığı vakaları



Şekil 4.23 IL10'un hedef DNA bölgesi olarak hedeflenen bölge chr1:206772998-206773585'in kromatogramlarının çoklu hizalaması: rs1800871 T>C, rs1800872 A>C, Kontrol vakaları

Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te IL-10 genotiplerinin karşılaştırılması, hasta ve kontrol gruplarının SNP rs1800871 T>C, rs1800872 A>C'sini içermektedir; P değeri (0,05), Tek Oran (OR) değerleri ve %95 GA gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 SNP'nin yabani tip alel ve mutant allelinin genotip dağılımı ve alel sıklığı: kontrol grubu

rs1800871T>C	Hasta (N=50)		Kontrol (N=50)	OR (95%GA)	P değeri
Genotipler	TT	13 (%26)	25 (%50)	Referans Grubu	
	TC	8 (%16)	13 (%26)	0,55 (0,2-1,4)	0,2
	CC	29 (%58)	12 (%24)	4,3 (1,8-10,3)	0,0008
Alel	T	34	63 (%55)	0,3 (0,16-0,5)	0,0001
	C	66	37 (%45)	3,3 (1,8-5,9)	0,0001

Çizelge 4.3 SNP'nin yabani tip alel ve mutant allelinin genotip dağılımı ve alel sıklığı: hasta grubu

rs1800872A>C	Tokso plazma Talasemi		Kontrol	OR (95%GA)	P değeri
Genotipler	AA	18 (%36)	19 (%38)	Referans Grubu	
	AC	7 (%14)	19 (%38)	0,2(0,09-0,7)	0,008
	CC	25 (%50)	12 (%24)	3,1 (1,3-7,4)	0,008
Alel	A	43 (%28,75)	57 (%55)	0,6 (0,3- 1,2)	0,2
	C	57 (%71,25)	43 (%45)	1,4(0,8-2,5)	0,2

Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi, IL-10 SNP polimorfizmi rs1800871'de CC genotipinin ve IL-10 alelinin rs180072'sinde AA genotipinin varlığı, kontrol grubunda hasta grubuna göre temelde daha yüksektir. Dahası, stratejik nüks modeli CC genotipine sahip kişiler arasında hastaların iyileşme tehlikesinin azaldığını göstermiştir (OR=4,3; p=0,008). Bu sonuçlar, 1'den fazla OR değerine dayalı olarak C risk alelinin dış çürümesi ile ilişkili olduğunu, SNP rs1800871'deki (mutant alel olarak) C alel frekansının sağlıklı gruptaki (C=37) değeriyle karşılaştırıldığında hastalarda (66) yüksek olduğunu açıklamaktadır.

SNP rs1800872 A >T, CC genotipine sahip kişiler arasında hastaların iyileşmesi için azalan bir tehlike göstermiştir (OR=3,16; p 0,000). Bu sonuçlar, 1'den büyük OR değerine (CC'nin homozigot OR=3,1, SNP rs1800871'deki (mutant alel olarak) C alel frekansının

hastalarda (57) sağlıklı gruptaki (C=43) değerine kıyasla yüksek olduğunu dayanarak C risk alelinin diş çürümesi ile ilişkili olduğunu açıklamaktadır.

Sonuçlar, diş plağı olan Iraklı hastalarda (10-66 yaş arası) en sık rastlanan mutans streptokokun *S. mutans* olduğunu göstermiştir. Irak'taki diğer epidemiyolojik bilgilere göre, 35 Iraklı hastadan (10-66 yaş) fenotipik ve moleküler testlerle ayrı ayrı alınan dental plak testlerinin %93,1'inde *S. mutans* ayırt edilmiştir, sonuçlarımız Kim *et al.* (2012) yaptığı çalışmanın sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir. Japonya'da yapılan başka bir çalışmada, 3-5 yaş arasındaki 77 kişide PCR tekniği kullanılarak *S. mutans*'ın baskınlığı %72,8 olarak hesaplanmıştır (Okada *et al.* 2002). Wu *et al.* (2003) Çin'de biyokimyasal testler ve PCR kullanarak 126 diş plağı testinde (25-55 yaş arası) *S. mutans*'ın baskınlığını %75,4 olarak ortaya koymuştur. Benzer şekilde, *S. mutans* Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'da 5-13 yaş arası genç öğrencilerin %65-95'inde ayrı ayrı tespit edilmiştir (Qureshi *et al.* 1977). Deneklerin dönemleri ve kullanılan tanıma stratejileri benzersiz olsa da bizimki de dahil olmak üzere yukarıda belirtilen araştırmalarda ayrıntılı olarak açıklanan *S. mutans* dağılımı ve yaygınlığı, mevcut derlemedekilerle karşılaştırılabilir bir eğilim göstermektedir. Buna ilaveten, Birleşik Krallık'ta 5 ile 8 yaşındaki okul çocuklarından alınan mutans streptokokların %90'ı *S. mutans* olup, nadiren *S. sobrinus* örneklerine rastlanmıştır (Beighton *et al.* 1987). 10-25 yaş arası Avustralyalılarda *S. mutans* %30 oranında tespit edilmiştir (Rogers 1973). Sonuç olarak, *S. mutans*'ın dağılımı, topografik insan popülasyonlarındaki zıtlıklarla ilişkili olmanın tüm işaretlerini taşımaktadır.

Bu çalışmanın sonuçları *S. mutans*'ta sekans yöntemlerine dayalı yüksek polimorfizm göstermiştir, bu genetik yaklaşım RFLP-PCR yöntemi veya RAPD-PCR yöntemi ile karşılaştırıldığında polimorfizmi izlemek için altın yöntem olarak kabul edilmiştir. Önceki birçok çalışma RFLP-PCR gibi düşük verimli genetik yöntemleri izlemiştir. Dex tarafından belirlenen PCR-RFLP ve biyokimyasal testlerde Anter çalışmalarında s16 RNA gibi evrensel primer çifti kullanılmış, taranan suşlar 16S rDNA dizileme korelasyon stratejisi kullanılarak tür düzeyinde ayırt edilmiştir. PCR-RFLP ile mutans streptokok olarak tanınmayan klinik sekeller mutans olmayan streptokokal canlılar olarak gruplandırılmıştır (Yoo *et al.* 2005, Lee *et al.* 2006).

Çürük nebulalarının klinik modelleri için PCR bantlama yöntemlerine dayalı doğrudan genotipleme, ilgilenilen mikrobun çok aşamalı implantasyonu, izolasyonu, ekstraksiyonu ve örneklenmesini atlayan öncü ve hızlı bir yöntemdir. PCR'a bağlı genotipleme için mevcut sistemler orta derecede yüksek saflıkta DNA gerektirdiğinden, geniş bir test türü yelpazesine ayarlanan ve DNA ekstraksiyonundan kaçınan doğrudan genotipleme yöntemini takip etmek test edilmektedir. Her ne olursa olsun, tükürük, kurutulmuş kan lekesi ve bukkal sürüntü gibi klinik ortamlarda normal olarak kullanılan testlerin, hücre katmanları hücre hasarını ve DNA ekstraksiyonunu önlediğinden, DNA ekstresi olmadan genotiplenmesi zordur. Sonuç olarak, DNA ekstraksiyonu olmadan farklı örnek türlerini inceleyen bir genotipleme yöntemi için genel bir metodolojinin teşvik edilmesi zayıf kalmaktadır. Salivasyondan DNA ekstraksiyonu olmadan PCR geliştirmesi yapan birkaç çalışma (Ambers *et al.* 2018) oluşturulmuş olsa da aslında ekstra uzman ve önemli güç kullanımı gerektirmektedir. Bu testi başarmak için, nükleik asitlerin verimli bir şekilde gelişini güçlendiren ve bir örnekte normal PCR inhibitörlerini etkisiz hale getiren basit bir döngü kullanarak doğrudan PCR'yi pratik hale getiren başka bir metodoloji oluşturduk. Çok sayıda strateji, genotipleme için hassas ve açık metodolojiler sunmuştur. Ayrıca, sonuçlar genellikle agaroz jel elektroforezi ile parçalanmaktadır (Ramírez-Expósito *et al.* 2016).

Bu çalışmada, sonuçları hızlı bir şekilde incelemek ve maliyetleri düşürmek için kültürleme yöntemleri ile ekstraksiyon olmadan DNA geliştirmede doğrudan bir PCR incelemesi uygulanmıştır. Bu uygulama, daha az işgücü, maliyet, taşınabilirlik ve kantitatif genotipleme avantajlarını sağlarken mevcut stratejilerde oluşacak sorunları da ele almaktadır. Bu yenilik, nihayetinde hızlı klinik seçimlere rehberlik edebilecek kalite testlerinin her yerde erişilebilirliğini anlamına gelmektedir.

Bağışıklık yanıtının standart baskılayıcı sitokini IL-10'un insanlarda periodontitisin şiddeti ile karşılıklı bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Rizzuti *et al.* 2015). Periodontitisin hayvan modelleri, insanlarda elde edilen doğrulamayı desteklemektedir ve IL-10 seviyeleri ile siyanoz (kemik olayı) arasında nedensel bir bağlantı olduğunu göstermiştir (Murdock *et al.* 2014).

Dolayısıyla, IL-10 seviyelerini etkileyen herhangi bir faktörün, prensip olarak, bu bağlamda periodontitisin varlığı, güncelliği ve şiddeti üzerinde bir etkiye sahip olabileceği sonucu çıkmaktadır. IL-10-592 C/A polimorfizminin daha önce daha düşük IL-10 ekspresyonu ve bu varyantı miras alan kişilerde daha yüksek kronik periodontitis insidansı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Claudino *et al.* 2008).

Bununla birlikte, IL-10 bakteriyel enfeksiyonun yaygın olduğu ortamlarda yanıcı sitokinlerin ekspresyonundaki artışla da ilişkilendirilmiştir (Gemmell *et al.* 1998) Ayrıca, IL-10 polimorfizmleri bir dizi çevresel strese karşı duyarlılıkla ilişkilidir (Kim *et al.* 2012). Bu çalışma, IL-10 polimorfizmlerinin genotip tarafından kesin olarak belirlendiğini ve periodontal mikroorganizmaların varlığının/bakteriyel yığınının bu inhibitör sitokinin ekspresyonu üzerinde temel bir etkisi olmadığını göstermektedir.

Bulgularımız, konağın içsel özelliklerinin bu bağlamda IL-10 polimorfizm kuralını güçlü bir şekilde etkilediğini ve mikrobiyolojik uyarımın yalnızca konağın telafi edici bir yönetim aracı olarak hizmet ettiğini işaret etmektedir (Redford *et al.* 2011). Farklı hücre tipleri, harici güçlendirmelerden bağımsız olarak IL-10'u ifade edebilir, ancak farklı bağlamlarda, güçlendirmelerin gücü veya şekli IL-10'un ifadesini önemli ölçüde değiştirir. Spekülatif olarak, konakçı bakteriyel enfeksiyonla savaşırken çevredeki bağışıklık tepkisinin neden olduğu geri tepmeyi azaltmak için IL-10'u işe alır (Redford *et al.* 2011).

Bu sonuçlar, IL-10-592 C/A SNP polimorfizmi gibi IL-10 polimorfizmindeki varyasyonların diş eti altında mikrobiyal kolonizasyonun yaygınlığını etkileyebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, defilasyon profilini etkileyen IL-10-592 C/A polimorfizmi için genotipe dayanmaktadır. IL-10 immünosupresanlarının etkilerinin çeşitli hastalıklarda kirletme kontrolü ihtiyaçları ile bağlantılı olduğunu unutulmamalıdır. Bununla birlikte genel olarak önceki ön modeller IL-10 açıklamasının dengesini (Treg'lerin sınırlandırılması veya kemoatraksiyonu yoluyla) mikroorganizmanın bolluğu ve saldırısı ile ilişkili göstermiştir. Bu sonuç Polak *et al.* (2013)'ün sonucu ile farklılık göstermektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar, incelediğimiz periodontal patojenlerin tekrar

alanındaki veya bakteriyel yükündeki varyasyonlar ile SNP IL-10-592 C/An için çeşitli alellerin varlığı arasında güçlü bir korelasyon olduğunu göstermektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, tükürük ve diş plaklarında *S. mutans*'ı belirlemek için iki spesifik primer tasarlanmıştır. Bu sayede, ilgilenilen klinik örneklerde patojenik bakterilerin (*S. mutans*) teşhis edilmesi hızlanmış ve ayrıca birçok *S. mutans* suşunda yüksek polimorfizm belirlenmiştir. Bu polimorfizm özel varyantlarda ortaya çıkmıştır ve *S. mutans* suşlarının 4 tipte genotiplenmesine yardımcı olarak *S. mutans*'ta mikроеvrım gerçeğini doğrulamıştır. İki farklı genin amplifikasyonu için iki spesifik primer çifti kullanarak *S. mutans*'ı tipleme yöntemi, *S. mutans*'taki genetik varyasyonun derecesini vurgulamış ve bunu bu patojenin çeşitliliği ile ilişkilendirmiştir. IL-10'un mikropların doğuştan tanınmasında oynadığı işlev, enfeksiyona karşı savunmada önemli bir adımdır. Antimikrobiyal bağışıklığı aktive etmek için, IL-10 kodlama mutasyonları, bağışıklıkla ilgili çok sayıda hastalıkla ilişkilidir ve bağışıklıkta IL-10 sinyalinin fizyolojik öneminin altını çizmektedir. Bu çalışmada, IL-10 alelindeki mutasyonu mikrop enfeksiyonlarına karşı güçlü bir koruyucu olarak kullanılmıştır. Bugüne kadar, klinik olarak bildirilen tüm homozigot veya bileşik heterozigot taşıyıcılarda IL-10 ekspresyonu yoktur veya IL-10 fonksiyon kaybı alelleri mantar enfeksiyonuna daha duyarlıdır (Moore *et al.* 2001, Claudino *et al.* 2008).

Bu çalışmada karşılaşılan en büyük sınırlamalardan birincisi, tükürük örneklerinden çıkarılan DNA'nın bazen PCR yapmak için çok az miktarda olması ve parlak bir bant vermesidir. Deney için gerekli olan ve birçok yöntemle elde edilen DNA'nın konsantre edilmesi gerekir, bu sınırlama soluk bandın görünmesini veya yokluğunu etkilemektedir. Tükürük örneklerinin toplanmasındaki ikinci olası sınırlama, hastalardan tükürük örneklerinin nasıl alınacağına dair belirli kılavuzlar olmasına rağmen hastane personelinin bu konudaki farklı tutumu ve koronavirüstür.

Bildirilen vakalar arasında IL-10 gen mutasyonlarının özellikleri, dağılımı, sıklığı ve genotipi ile *S. mutans* enfeksiyonları arasındaki ilişkiyi analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, diğer *Streptococcus* türlerinin diş plaklarındaki rolünün sürekli olarak ele alınması için önerilmiştir ve sonuçlarımız, tükürük örnekleri ve diş plaklarının toplanması ve *S. mutans* enfeksiyonu ile immünojenik açıklama arasındaki ilişkinin kurulmasında

önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca gelecekte benzer araştırmaların Orta Doğu'daki diğer insan popölasyonlarında da yapılarak genişletilmesi önerilmektedir.



KAYNAKLAR

- Acuña, B. H., Martínez, M. C. and Gamboa, F. 2004. Control microbiológico sobre *Streptococcus mutans* y su acción acidogénica. *Universitas Scientiarum*, 9(2): 45-55.
- Afzal, M. S., Tahir, S., Salman, A., Baig, T. A., Shafi, T., Zaidi, N. U. S. S. and Qadri, I. 2011. Analysis of interleukin-10 gene polymorphisms and hepatitis C susceptibility in Pakistan. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 5(06): 473-479.
- Albuquerque, C. M., Cortinhas, A. J., Morinha, F. J., Leitão, J. C., Viegas, C. A. and Bastos, E. M. 2012. Association of the IL-10 polymorphisms and periodontitis: a meta-analysis. *Molecular Biology Reports*, 39(1): 9319-9329.
- Al-Mudallal, N. H., Al-Jumaily, E. F., Muhimen, N. A. and Al-Shaibany, A. A. W. 2008. Isolation and identification of mutan's streptococci bacteria from human dental plaque samples. *Al-Nahrain Journal of Science*, 11(3): 98-105.
- Ambers, A., Wiley, R., Novroski, N. and Budowle, B. 2018. Direct PCR amplification of DNA from human bloodstains, saliva, and touch samples collected with microFLOQ® swabs. *Forensic Science International: Genetics*, 32(1): 80-87.
- Arévalo-Ruano, M. L., Canacúan-Melo, F. Y., Echeverry-Chica, J., Salazar-González, C. L., Martínez-Delgado, C. M., Martínez-Pabón, M. C. and Correa, M. M. 2014. Molecular identification and genotyping of *Streptococcus mutans* from saliva samples of children in Medellín, Colombia. *CES Odontología*, 27(2): 47-60.
- Arthur, R. A., Tabchoury, C. P. M., Mattos-Graner, R. D. O., Del Bel Cury, A. A., Leme, A. F. P., Vale, G. C. and Cury, J. A. 2007. Genotypic diversity of *S. mutans* in dental biofilm formed in situ under sugar stress exposure. *Brazilian Dental Journal*, 18(3): 185-191.
- Beighton, D., Rippon, H. R. and Thomas, H. E. 1987. The distribution of *Streptococcus mutans* serotypes and dental caries in a group of 5-to 8-year-old Hampshire schoolchildren. *British Dental Journal*, 162(3): 103-106.
- Belibasakis, G. N., Maula, T., Bao, K., Lindholm, M., Bostanci, N., Oscarsson, J. and Johansson, A. 2019. Virulence and pathogenicity properties of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Pathogens*, 8(4): 220-222.

- Bostanci, N. and Belibasakis, G. N. 2012. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, 333(1): 1-9.
- Cephas, K. D., Kim, J., Mathai, R. A., Barry, K. A., Dowd, S. E., Meline, B. S. and Swanson, K. S. 2011. Comparative analysis of salivary bacterial microbiome diversity in edentulous infants and their mothers or primary care givers using pyrosequencing. *PloS One*, 6(8): 23-50.
- Chatzopoulos, G. S., Doufexi, A. E. and Kalogirou, F. 2016. Association of susceptible genotypes to periodontal disease with the clinical outcome and tooth survival after non-surgical periodontal therapy: A systematic review and meta-analysis. *Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirugia Bucal*, 21(1): e14.
- Clarke, J. K. 1924. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *British Journal of Experimental Pathology*, 5(3): 141-142.
- Claudino, M., Trombone, A. P. F., Cardoso, C. R., Ferreira, S. B., Martins, W., Assis, G. F. and Garlet, G. P. 2008. The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. *Journal of Leucocyte Biology*, 84(6): 1565-1573.
- Cogulu, D., Onay, H., Ozdemir, Y., Aslan, G. I., Ozkinay, F., Kutukculer, N. and Eronat, C. 2015. Associations of interleukin (IL)-1 β , IL-1 receptor antagonist, and IL-10 with dental caries. *Journal of Oral Science*, 57(1): 31-36.
- Cowan, T. M. 1977. Organizing the properties of impossible figures. *Perception*, 6(1): 41-56.
- Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C., Yu, W. H. and Wade, W. G. 2010. The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*, 192(19): 5002-5017.
- Duarte, P. M., Bastos, M. F., Fermiano, D., Rabelo, C. C., Perez-Chaparro, P. J., Figueiredo, L. C. and Feres, M. 2015. Do subjects with aggressive and chronic periodontitis exhibit a different cytokine/chemokine profile in the gingival crevicular fluid? A systematic review. *Journal of Periodontal Research*, 50(1): 18-27.

- Figuerola-Gordon, M., Acevedo, A. M. and Alonso, G. 2009. Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental. *Acta Odontológica Venezolana*, 47(1): 227-240.
- Forssten, S. D., Björklund, M. and Ouwehand, A. C. 2010. Streptococcus mutans, caries and simulation models. *Nutrients*, 2(3): 290-298.
- Franco, T. C. C., Amoroso, P., Marin, J. M. and Ávila, F. A. D. 2007. Detection of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in dental plaque samples from Brazilian preschool children by polymerase chain reaction. *Brazilian Dental Journal*, 18(1): 329-333.
- Gemmell, E., Winning, T. A., Bird, P. S. and Seymour, G. J. 1998. Cytokine profiles of lesional and splenic T cells in Porphyromonas gingivalis infection in a murine model. *Journal of Periodontology*, 69(10): 1131-1138.
- Giannobile, W. V., Beikler, T., Kinney, J. S., Ramseier, C. A., Morelli, T. and Wong, D. T. 2009. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. *Periodontology 2000*, 9(5): 50-52.
- Gibson, A. W., Edberg, J. C., Wu, J., Westendorp, R. G., Huizinga, T. W. and Kimberly, R. P. 2001. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*, 166(6): 3915-3922.
- Govatati, S., Tangudu, N. K., Deenadayal, M., Chakravarty, B., Shivaji, S. and Bhanoori, M. 2012. Association of E-cadherin single nucleotide polymorphisms with the increased risk of endometriosis in Indian women. *Molecular Human Reproduction*, 18(5): 280-287.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., De Vries, J. E. and Roncarolo, M. G. 1997. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389(6652): 737-742.
- Grönroos, L. and Alaluusua, S. 2000. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. *Caries Research*, 34(6): 474-480.
- Guo, L. H., Shi, J. N., Zhang, Y., Liu, X. D., Duan, J. and Wei, S. 2006. Identification of genetic differences between two clinical isolates of Streptococcus mutans by

- suppression subtractive hybridization. *Oral Microbiology and Immunology*, 21(6): 372-380.
- Hahn, C. L., Al, M. B. and Tew, J. G. 2004. Comparison of type 1 and type 2 cytokine production by mononuclear cells cultured with streptococcus mutans and selected other caries bacteria. *Journal of Endodontics*, 30(5): 333-338.
- Heidari, Z., Hooshmand, B., Hajilooi, M. and Kadkhodazadeh, M. 2013. Study of IL-10, IL-18 polymorphisms in the sulfur agent patients with and without periodontitis. *Journal of Advanced Periodontology & Implant Dentistry*, 5(1): 23-28.
- Hughes, F. J., Turner, W., Belibasakis, G. and Martuscelli, G. 2006. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology 2000*, 41(1): 48-72.
- Jenkinson, H. F. and Lamont, R. J. 2006. Oral microbial ecology. *Oral Microbiology and Immunology*, 6(6): 89-106.
- Khabour, O. F. and Barnawi, J. M. 2010. Association of longevity with IL-10– 1082 G/A and TNF- α – 308 G/A polymorphisms. *International Journal of Immunogenetics*, 37(4): 293-298.
- Kim, J., Cho, Y. A., Choi, I. J., Lee, Y. S., Kim, S. Y., Shin, A. and Kim, Y. W. 2012. Effects of interleukin-10 polymorphisms, *Helicobacter pylori* infection, and smoking on the risk of noncardia gastric cancer. *PloS One*, 7(1): 29-43.
- Kinane, D. F. and Hart, T. C. 2003. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 14(6): 430-449.
- Könemann, H. and Visser, R. 1988. Selection of chemicals with high hazard potential: Part 1: WMS-scoring system. *Chemosphere*, 17(10): 1905-1919.
- Kreulen, C. M., De Soet, J. J., Hogeveen, M. and Veerkamp, J. S. 1997. Streptococcus mutans in children using nursing bottles. *Journal of Dentistry for Children*, 10(7): 2-6.
- Kuramitsu, H. K., Qi, M., Kang, I. C. and Chen, W. 2001. Role for periodontal bacteria in cardiovascular diseases. *Annals of Periodontology*, 6(1): 41-47.
- Lachmann, S., Kimmerle-Müller, E., Axmann, D., Scheideler, L., Weber, H. and Haas, R. 2007. Associations between peri-implant crevicular fluid volume, concentrations of crevicular inflammatory mediators, and composite IL-1A–889 and IL-1B+ 3954

- genotype: A cross-sectional study on implant recall patients with and without clinical signs of peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*, 18(2): 212-223.
- Lee, S. H., Yoo, S. Y., Kim, H. S., Kang, S. J., Lim, S. H., Kim, K. W. and Kook, J. K. 2006. Identification of *Enterococcus faecalis* on MSE Medium Selective for Mutans Streptococci. *International Journal of Oral Biology*, 31(1): 7-10.
- Lembo, F. L., Longo, P. L., Ota-Tsuzuki, C., Rodrigues, C. R. M. D. and Mayer, M. P. A. 2007. Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children. *Oral Microbiology and Immunology*, 22(5): 313-319.
- Li, Y. E. and Caufield, P. W. 1998. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. *Oral Microbiology and Immunology*, 13(1): 17-22.
- Li, Y., Caufield, P. W., Emanuelsson, I. R. and Thornqvist, E. 2001. Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. *Oral Microbiology and Immunology*, 16(1): 16-23.
- Linossier, A. C., Valenzuela, C. Y., Soler, E. R. and Contreras, E. M. 2011. Colonización de la cavidad oral por *Streptococcus* grupo mutans, según edad, evaluado en saliva por un método semi-cuantitativo. *Revista Chilena de Infectología*, 28(3): 230-237.
- Maney, P. and Owens, J. L. 2015. Interleukin polymorphisms in aggressive periodontitis: A literature review. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 19(2): 131-132.
- Mang-De La Rosa, M. R., Castellanos-Cosano, L., Romero-Perez, M. J. and Cutando, A. 2014. The bacteremia of dental origin and its implications in the appearance of bacterial endocarditis. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 19(1): 63-67.
- Mannino, M. H., Zhu, Z., Xiao, H., Bai, Q., Wakefield, M. R. and Fang, Y. 2015. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Letters*, 367(2): 103-107.
- Matsui, R. and Cvitkovitch, D. 2010. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiology*, 5(3): 403-417.
- Mattos-Graner, R. O., Li, Y., Caufield, P. W., Duncan, M. and Smith, D. J. 2001. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(6): 2313-2316.

- Metwalli, K. H., Khan, S. A., Krom, B. P. and Jabra-Rizk, M. A. 2013. Streptococcus mutans, Candida albicans, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathogens*, 9(10): 16-36.
- Mitchell, S. C., Ruby, J. D., Moser, S., Momeni, S., Smith, A., Osgood, R. and Childers, N. 2009. Maternal transmission of mutans streptococci in severe-early childhood caries. *Pediatric Dentistry*, 31(3): 193-201.
- Moore, K. W., De Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. and O'Garra, A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, 19(1): 683-765.
- Morse, H. R., Olomolaiye, O. O., Wood, N. A. P., Keen, L. J. and Bidwell, J. L. 1999. Induced heteroduplex genotyping of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 polymorphisms associated with transcriptional regulation. *Cytokine*, 11(10): 789-795.
- Murdock, B. J., Teitz-Tennenbaum, S., Chen, G. H., Dils, A. J., Malachowski, A. N., Curtis, J. L. and Osterholzer, J. J. 2014. Early or late IL-10 blockade enhances Th1 and Th17 effector responses and promotes fungal clearance in mice with cryptococcal lung infection. *The Journal of Immunology*, 193(8): 4107-4116.
- Nakano, K. and Ooshima, T. 2009. Serotype classification of Streptococcus mutans and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiology*, 4(7): 891-902.
- Nakano, K., Inaba, H., Nomura, R., Nemoto, H., Takeda, M., Yoshioka, H. and Ooshima, T. 2006. Detection of cariogenic Streptococcus mutans in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9): 3313-3317.
- Nakano, K., Nomura, R., Shimizu, N., Nakagawa, I., Hamada, S. and Ooshima, T. 2004. Development of a PCR method for rapid identification of new Streptococcus mutans serotype k strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11): 4925-4930.
- Napimoga, M. H., Höfling, J. F., Klein, M. I., Kamiya, R. U. and Gonçalves, R. B. 2005. Transmission, diversity and virulence factors of Streptococcus mutans genotypes. *Journal of Oral Science*, 47(2): 59-64.
- Napimoga, M. H., Kamiya, R. U., Rosa, R. T., Rosa, E. A., Höfling, J. F., de Oliveira Mattos-Graner, R. and Gonçalves, R. B. 2004. Genotypic diversity and virulence traits of Streptococcus mutans in caries-free and caries-active individuals. *Journal of Medical Microbiology*, 53(7): 697-703.

- Nibali, L. 2015. Aggressive Periodontitis: microbes and host response, who to blame?. *Virulence*, 6(3): 223-228.
- Nicolas, G. G. and Lavoie, M. C. 2011. *Streptococcus mutans* and oral streptococci in dental plaque. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(1): 1-20.
- Oho, T., Yamashita, Y., Shimazaki, Y., Kushiya, M. and Koga, T. 2000. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. *Oral Microbiology and Immunology*, 15(4): 258-262.
- Okada, M., Soda, Y., Hayashi, F., Doi, T., Suzuki, J., Miura, K. and Kozai, K. 2002. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. *Journal of Medical Microbiology*, 51(5): 443-447.
- Okahashi, N., Nakata, M., Sumitomo, T., Terao, Y. and Kawabata, S. 2013. Hydrogen peroxide produced by oral streptococci induces macrophage cell death. *PloS One*, 8(5): 62-65.
- Okayama, N., Hamanaka, Y., Suehiro, Y., Hasui, Y., Nakamura, J. and Hinoda, Y. 2005. Association of interleukin-10 promoter single nucleotide polymorphisms– 819 T/C and– 592 a/C with aging. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 60(12): 1525-1529.
- Polak, D., Shapira, L., Weiss, E. I. and Houry-Haddad, Y. 2013. Virulence mechanism of bacteria in mixed infection: attenuation of cytokine levels and evasion of polymorphonuclear leukocyte phagocytosis. *Journal of Periodontology*, 84(10): 1463-1468.
- Poli, F., Nocco, A., Berra, S., Scalamogna, M., Taioli, E., Longhi, E. and Sirchia, G. 2002. Allele frequencies of polymorphisms of TNFA, IL-6, IL-10 and IFNG in an Italian Caucasian population. *European Journal of Immunogenetics*, 29(3): 237-240.
- Qureshi, J. V., Goldner, M., Le Riche, W. H. and Hargreaves, J. A. 1977. *Streptococcus mutans* serotypes in young schoolchildren. *Caries Research*, 11(3): 141-152.
- Ramírez-Expósito, M. J., Martínez-Martos, J. M., Palomeque, T. and Lorite, P. 2016. A PCR-RFLP method for detection of the LNPEP encoding human insulin-regulated aminopeptidase (IRAP) rs4869317 polymorphism. *The Indian Journal of Medical Research*, 144(1): 120-121.

- Redford, P. S., Murray, P. J. and O'garra, A. 2011. The role of IL-10 in immune regulation during *M. tuberculosis* infection. *Mucosal Immunology*, 4(3): 261-270.
- Redmo Emanuelsson, I. M., Carlsson, P., Hamberg, K. and Bratthall, D. 2003. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiology and Immunology*, 18(1): 24-29.
- Reyes, E., Martin, J., Moncada, G., Neira, M., Palma, P., Gordan, V. and Yevenes, I. 2012. Activity and effects of urease and arginine deaminase in saliva and human oral biofilm. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia*, 23(2): 343-352.
- Rickard, A. H., Gilbert, P., High, N. J., Kolenbrander, P. E. and Handley, P. S. 2003. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology*, 11(2): 94-100.
- Rizzuti, D., Ang, M., Sokollik, C., Wu, T., Abdullah, M., Greenfield, L. and Jones, N. L. 2015. *Helicobacter pylori* inhibits dendritic cell maturation via interleukin-10-mediated activation of the signal transducer and activator of transcription 3 pathway. *Journal of Innate Immunity*, 7(2): 199-211.
- Rogers, A. H. 1973. The occurrence of *Streptococcus mutans* in the dental plaque of a group of Central Australian Aborigines. *Australian Dental Journal*, 18(3): 157-159.
- Saarela, M., Hannula, J., Mättö, J., Asikainen, S. and Alaluusua, S. 1996. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Archives of Oral Biology*, 41(8-9): 821-826.
- Salman, H. A., Senthilkumar, R., Imran, K. and Selvam, K. P. 2017. Isolation and typing of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* from caries-active subjects. *Contemporary Clinical Dentistry*, 8(4): 587-589.
- Sánchez-Pérez, L. and Gío, E. A. 2007. *Estreptococos cariogénicos predominantes, niveles de infección e incidencia de caries en un grupo de escolares. Estudio exploratorio.* *Revista de la Asociación Dental Mexicana*, 64(2): 45-51.
- Saravia, M. E., Nelson-Filho, P., Silva, R. A. B., De Rossi, A., Faria, G., Silva, L. A. B. and Emilson, C. G. 2013. Recovery of mutans streptococci on MSB, SB-20 and SB-20M agar media. *Archives of Oral Biology*, 58(3): 311-316.

- Shahabuddin, N., Boesze-Battaglia, K. and Lally, E. T. 2016. Trends in susceptibility to aggressive periodontal disease. *International Journal of Dentistry and Oral Health*, 2(4): 2-6.
- Song, G. G., Choi, S. J., Ji, J. D. and Lee, Y. H. 2013. Association between tumor necrosis factor- α promoter- 308 A/G,- 238 A/G, interleukin-6- 174 G/C and- 572 G/C polymorphisms and periodontal disease: a meta-analysis. *Molecular Biology Reports*, 40(1): 5191-5203.
- Takahashi, N. and Nyvad, B. J. C. R. 2008. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Research*, 42(6): 409-418.
- Toker, H., Gorgun, E. P., Korkmaz, E. M., Yüce, H. B. and Poyraz, O. 2018. The effects of IL-10 gene polymorphism on serum, and gingival crevicular fluid levels of IL-6 and IL-10 in chronic periodontitis. *Journal of Applied Oral Science*, 26(1): 1-3.
- Truong, T. L., Menard, C., Mouton, C. and Trahan, L. 2000. Identification of mutans and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Medical Microbiology*, 49(1): 63-71.
- Van Dyke, T. E. and Sima, C. 2020. Understanding resolution of inflammation in periodontal diseases: Is chronic inflammatory periodontitis a failure to resolve?. *Periodontology 2000*, 82(1): 205-213.
- Wong, H. C., Ooi, Y., Pulikkotil, S. J. and Naing, C. 2018. The role of three interleukin 10 gene polymorphisms (- 1082 A> G,- 819 C> T,- 592 A> C) in the risk of chronic and aggressive periodontitis: a meta-analysis and trial sequential analysis. *BMC Oral Health*, 18(1): 1-10.
- Wu, H., Fan, M., Zhou, X., Mo, A., Bian, Z., Zhang, Q. and Chen, Z. 2003. Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* on the permanent first molars of the Mosuo people in China. *Caries Research*, 37(5): 374-380.
- Yoo, S. Y., Kim, K. J., Lim, S. H., Kim, K. W., Hwang, H. K., Min, B. M. and Kook, J. K. 2005. First isolation of *Streptococcus downei* from human dental plaques. *FEMS Microbiology Letters*, 249(2): 323-326.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Suha Hamid Obaid AL-MAMOORI

Eğitim

Doktora	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı	2020-2023
Yüksek Lisans	Babil Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı	2012-2014
Lisans	Babil Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2006-2010