



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİŞ MİNESİNİN OLUŞUMUNDA GÖREV ALAN
MMP20 (MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-20)
ve KLK4 (KALLİKREİN-4) GEN
POLİMORFİZMLERİ İLE DİŞ ÇÜRÜKLERİ
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN 3-5 YAŞ GRUBU
ÇOCUKLARDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

Zerrin ABBASOĞLU
DOKTORA TEZİ

PEDODONTİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. İlknur TANBOĞA

İSTANBUL-2013



REPUBLIC OF TURKEY
MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

**EVALUATION OF THE RELATIONSHIP
BETWEEN POLYMORPHISMS of MMP20
(MATRIX METALLOPROTEINASE-20) and KLK4
(KALLIKREIN-4) GENES WHICH ARE CRITICAL
in ENAMEL FORMATION AND DENTAL CARIES
on CHILDREN of AGE of 3-5 YEARS**

Zerrin ABBASOĞLU
DOCTORATE THESIS

DEPARTMENT of PEDIATRIC DENTISTRY

SUPERVISOR
Prof. Dr. İlknur TANBOĞA

ISTANBUL-2013

TEZ ONAYI

Kurum:Marmara :Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi :Yüksek Lisans () Doktora (X)

Anabilim Dalı :Pedodonti A.D.

Tez Sahibi :Zerrin Abbasoğlu

Tez Başlığı :Diş Minesinin Oluşumunda Görev Alan MMP20 (Matriks Metalloproteinaz-20) ve KLK4 (Kallikrein-4) Gen Polimorfizmleri ile Diş Çürükleri Arasındaki İlişkinin 3-5 Yaş Grubu Çocuklarda Değerlendirilmesi

Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Sınav Tarihi : 10.10.2013

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan ve Adı)

Kurumu

İmza

Prof. Dr. İlknur Tanboğa

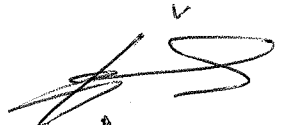
M.Ü. Diş Hek Fak. Pedodonti A.D.



Sınav Jüri Üyeleri (Unvan ve Adları)

Prof. Dr. Nüket Sandallı

Y.Ü. Diş Hek. Fak. Pedodonti A.D.



Prof. Dr. Serap Akyüz

M.Ü. Diş Hek. Fak. Pedodonti A.D.



Prof. Dr. Ali Recai Menteş

M.Ü. Diş Hek. Fak. Pedodonti A.D.



Yrd. Doç. Dr. MayAli Korachi

Y.Ü. Genetik ve Biyomühendislik B.



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 31/10/2013 tarih ve 18. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Velvet

Prof. Dr. İnci ALICAN



BEYAN

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

Zerrin ABBASOĞLU

2.10.2013



TEŞEKKÜR

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'na girişimde büyük desteği olan; samimi ilgisini, iyi niyetini ve sevgisini bizden hiç esirgemeyen, doktora eğitimim süresince, tüm tecrübelerini ve bilgisini benimle paylaşan, tezimin her aşamasında bana destek olan, yol gösteren ve ihtiyacım olan her an bilgi ve düşüncelerine başvurduğum değerli danışman hocam Sayın **Prof. Dr. İlknur TANBOĞA'ya**,

Pedodonti Anabilim Dalı'na girdiğim ilk günden beri ilgi ve desteklerini esirgemeyen, Pedodonti'nin esaslarını öğrenmemi sağlayan çok değerli hocalarım Sayın **Prof. Dr. Serap AKYÜZ, Prof. Dr. Ali MENTEŞ ve Prof. Dr. Betül KARGÜL'e**,

Tez izleme komitemde bulunan, Pedodonti ile tanışmamı sağlayan ve yol gösteren, Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Nüket SANDALLI'ya**,

Çalışmamın deney düzeneğinin hazırlanmasında çok büyük katkısı olan, tüm çalışmam boyunca daima yanımda bulunan, emeklerini esirgemeyen ve tez jüri komitemde bulunan Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümünden Sayın **Yrd. Doç. Dr. May Ali KORACHI'ye**,

RT-PZR çalışmamın gerçekleştirilmesinde imkan ve her türlü desteği sağlayan ve fikirleriyle yanımda olan Pittsburgh Üniversitesi Oral Biyoloji ve Genetik Bölümünden Sayın **Prof. Dr. Alexandre ResendeVieira' ya**,

Çalışmalarımda ihtiyacım olan yardımı hiçbir zaman esirgemeyen Sayın **Yrd. Doç. Dr. Eda HAZNEDAROĞLU, Yrd. Doç. Dr. Nida HÜROĞLU, Yrd. Doç. Dr. Sertaç PEKER, Yrd. Doç. Dr. Işıl Özgül KALYONCU, Dr. Figen EREN GİRAY, Dr. Başak DURMUŞ ve Dr. Ahu DURHAN'a**,

Tezimin yazım aşamasında deneyimleri ve bilgisiyle bana destek olan, yardımını hiç esirgemeyen, emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim, en iyi dostum, meslektaşım ve sevgili ağabeyim **Dr. Ahmet ABBASOĞLU'na**,

Araştırmam boyunca bana yol gösteren, yardımcı olan, genetik alanında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan arkadaşlarım **Dr. Erika Calvano KUCHLER, Dr. Kathleen DEELEY, Dr. Kübra AYDIN'a**,

Pedodonti Anabilim Dalı'nda bulunduğum yıllar boyunca bana anlayış gösteren ve özverili yaklaşımlarıyla yardımlarını benden esirgemeyen, her zaman yanımda olduklarını hissettiğim arkadaşlarım, **Gizem ÖZBAY, Sezin DEMİREL, Didem KURAL, Damla AKSİT, Dilara Özenay DERGİN, Sevi AKGÜN, Fatma Varol CALISKAN'a**, bana destek olan **tüm asistan arkadaşlarıma ve BahtışenÜRER'e**,

Beni her durum ve şartta en iyi koşullarda büyütüp yetiştiren, her zaman daha iyiye ulaşma çabası içinde olmamı sağlayıp başarıma gücü veren, hayatım boyunca bana sürekli destek olup bugünlere gelmemi sağlayan, varlığımı borçlu olduğum, teşekkürlerin yetmeyeceği sevgili anneciğim **Güliden ABBASOĞLU**, canım babam **Kenan Metin ABBASOĞLU**

En içten teşekkürlerimi sunuyorum...

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-140312-0040 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
RESİMLER LİSTESİ.....	x.
TABLOLAR LİSTESİ.....	xi
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1 Diş Çürüğü.....	5
4.1.1 Diş çürüğü tanımı.....	5
4.1.2 Diş çürüğü etiyolojisi.....	7
4.1.2.1 Beslenme ve diyet faktörleri.....	9
4.1.2.2 Diş yapısı.....	10
4.1.2.3 Tükürük.....	13
4.1.2.4 Zaman.....	14
4.1.2.5 Bakteriler.....	15
4.1.2.6 Ağız bakımı.....	17
4.1.2.7 Çevresel faktörler.....	17
4.1.2.8 Genetik faktör.....	17
4.2 Genetik.....	18
4.2.1 Genetik terminoloji.....	18
4.2.2 Hastalıkların genetik temelleri.....	23
4.2.3 Temel Mendel hastalıkları.....	24
4.2.4 Kompleks genetik hastalıklar.....	24

4.2.5 Genetik polimorfizmler.....	25
4.2.5.1 Mutasyon ve genetik polimorfizm arasındaki fark.....	27
4.2.5.2 Tek nükleotid polimorfizmleri—“Single Nucleotide Polymorphisms” (TNP).....	28
4.2.6. Genetik polimorfizmlerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler.....	29
4.2.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	29
4.2.6.2. RealTime (RT) PZR—(Gerçek Zamanlı PZR).....	32
4.2.6.3 DNA dizi analizleri.....	36
4.2.6.4 Kesim Parça Uzunluğu Polimorfizmleri—Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP).....	38
4.2.6.5. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmleri (SSCP).....	38
4.2.6.6. Allel Spesifik Oligonükleotidler (ASO).....	39
4.2.7. Genetik analiz metodları.....	39
4.2.7.1. Bakteri genetiği çalışmaları.....	39
4.2.7.2. Hayvan modellerinde deneysel çalışmalar.....	40
4.2.7.3. Ailesel agregasyon.....	41
4.2.7.4. İkiz çalışmaları.....	42
4.2.7.5. Segregasyon analizleri.....	43
4.2.7.6. Bağlantı analizleri ve ilişki çalışmaları.....	44
4.2.8. Diş çürüğü oluşumunda genetiğin rolü.....	47
4.2.8.1. Diş çürüğü oluşumunda gen polimorfizmleri.....	47
4.3. MMP20 (Matriks metalloproteinaz-20) geni.....	53
4.4. KLK4 (Kallikrein-4) geni.....	56
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	61
5.1 Gereç.....	61
5.1.1. Kullanılan aletler.....	61
5.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	62
5.1.3. Kullanılan sarf malzemeler.....	62
5.1.4. Agaroz jel elektroforezi.....	63
5.2 Yöntem.....	64

5.2.1 Örneklerin seçimi ve toplanması.....	64
5.2.2 Örneklerden DNA izolasyonu.....	66
5.2.3 Agaroz jelin hazırlanması ve yürütülmesi.....	71
5.2.4 Örneklerin Seyreltilmesi.....	76
5.2.5 Reaksiyon karışımının hazırlanması.....	77
5.2.6 Kullanılan tek nükleotid polimorfizmleri (TNP)	80
5.2.7 Gerçek zamanlı PZR programı.....	80
5.2.8 Reaksiyon plağının okunması.....	81
5.2.9 İstatiksel analizler.....	82
6. BULGULAR.....	83
6.1. Çevresel Faktörlere Bağlı Bulgular.....	83
6.2. Gerçek zamanlı-PZR bulgularının allel dağılım grafikleri.....	90
6.3 Genetik Bulgular.....	93
7 TARTIŞMA.....	99
7.1 SONUÇLAR.....	111
8.KAYNAKLAR.....	113
9.EKLER.....	134
EK1 : Hasta Onam Formu.....	134
EK2 : Etik Kurul Kararı.....	136
EK3 :Hasta Takip Formu.....	140
EK4:Referans Mektubu.....	141
11.ÖZGEÇMİŞ.....	142

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

A	:Adenin
ASO	:Allel Spesifik Oligonükleotid
C	:Sitozin
DSÖ	:Dünya Sağlık Örgütü
DMFT	: Çürük, kayıp, dolgulu daimi diş sayısı
DNA	:De-oksiribonükleik asit
dNTP	:Deoksiribonükleoidtrifosfat
EDTA	:Etilen Di-amintetra asetik asit
G	:Guanin
RT-PZR	:Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
KLK4	: Kallikrein-4
mRNA	: messenger-ribonükleik asit
MMP20	: Matriks Metalloproteinaz-20
rDNA	:Ribozomaldeoksiribonükleik asit
RNA	:Ribonükleik asit
RFLP	:RestrictionFragmentLengthPolymorfism = Restriksiyon parça uzunluklu polimorfizm
SSCP	:SingleStrandedConformationalPolimorphism = tek zincir konformasyonpolimorfizmi
T	:Timin
TAE	:Tris, Asetik asit ve EDTA
TNP	:Tek Nükleotid Polimorfizmleri
TagMan	:Thermusaquaticus
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1: Polimeraz Zincir Reaksiyonunun şematik olarak gösterilmesi

Şekil 2: TaqMan sistemi

Şekil 3: rs 1784418 (MMP20) SNP bölgesinin allel dağılım grafiği

Şekil 4: rs 2235091 (KLK4) SNP bölgesinin allel dağılım grafiği

Şekil 5: rs 198968 (KLK4) SNP bölgesinin allel dağılım grafiği

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1: Falkon tüpleri, Pamuk çubuklar (Steril swap, Copan)

Resim 2: Falkon tüplerine PBS solüsyonunun aktarılması

Resim 3: QIAMP DNA Mini Kit-Qiagen

Resim 4: DNA izolasyonu için gereken malzemeler

Resim 5: Mikro 22R santrifüj cihazı (Hettich)

Resim 6: Vorteks cihazı

Resim 7: OLS 200 Su banyosu (Grant Scientific)

Resim 8: Nanospektrofotometre (IMPLEN) cihazı

Resim 9: DNA örneklerinin yükleme boyası ile karıştırılması

Resim 10: Kuyucuklara DNA yüklemesi

Resim 11: Jel elektroforez işlemi

Resim 12: Nüve BM 402 UV kaynağı

Resim 13: Jel görüntüleme cihazında UV altında çekilen jel fotoğrafı ,DNA kontrol için %0.8'lik agaroz jel. (Soldan sağa sırasıyla örnekler: 4, 12, 50, 101, 38, 213 ve 250 ile en sağda DNA merdiveni (DNA ladder) yer almaktadır.)

Resim 14: TE Buffer solüsyonu

Resim 15: 96'lık plak

Resim 16: Reaksiyon plağının hazırlanması için gereken malzemeler

Resim 17: Çoklu pipetler yardımıyla karışımın reaksiyon plağına aktarılması

Resim 18: Hazırlanan reaksiyon karışımı

Resim 19: Optikal film yerleştirilen reaksiyon plağı

Resim 20: MMP20 geni

Resim 21: RT-PZR ısıtıcı döngüleyici (DNA Engine Tetrad 2, Bio-Rad My Cycler)

Resim 22: ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (SDS) cihazı

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Grupları gösteren tablo

Tablo 2: Kullanılan tek nükleotid polimorfizmleri (TNP)

Tablo 3: Diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarının ortalama yaşları

Tablo 4: Diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarının cinseyete göre dağılımı

Tablo 5: Diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarının ortalama doğum kilosu

Tablo 6: Diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarının ortalama boy uzunluğu

Tablo7: Diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarının ortalama kilosu

Tablo8: Biberon kullanımının diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarına göre dağılımı

Tablo9: Biberon kullanım süresinin diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarına göre dağılımı

Tablo10: Süt içeriğinin diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarına göre dağılımı

Tablo11: Uyumadan önce kullanımının diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarına göre dağılımı

Tablo12: Diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarının ortalama ara öğün sayısı

Tablo13: Diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarının ortalama haftalık şekerli ve asidik içecek tüketimi

Tablo14: İlk diş fırçalama yaşının diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarına göre dağılımı

Tablo15: Uyumadan önce dişfırçalama yaşının diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarına göre dağılımı

Tablo16: : Diş fırçalama sıklığının diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarına göre dağılımı

Tablo17: Diş çürüğü olan ve diş çürüğü olmayan bireylerin allel dağılımı

Tablo18: Diş çürüğü olan ve diş çürüğü olmayan bireylerin genotip dağılımı

Tablo19: Diş çürüğü oluşumunda etkili olan risk faktorlerinin belirlenmesinde uygulanan lojistik regresyon sonuçları

1. ÖZET

Diş Minesinin Oluşumunda Görev Alan MMP20 (Matriks Metalloproteinaz-20) ve KLK4 (Kallikrein 4) Gen Polimorfizmleri ile Diş Çürükleri Arasındaki İlişkinin 3-5 Yaş Grubu Çocuklarda Değerlendirilmesi

Diş çürüğü bulaşıcı enfeksiyöz bir hastalık olarak tanımlanmakta ve birçok ülke için önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. Diş çürüğü oluşumundaki çoklu faktörlerden biri de genetikdir. İnsan Genom Projesi'nin sonuçlarının oral biyoloji ve tıp için kullanılmaya başlamasıyla birlikte birçok araştırmacı diş çürüklerinin oluşumunda önemli rollere sahip muhtemel genleri ve bu proteinleri araştırmıştır. Ancak toplumumuzda sık görülen bu olgunun genetik yapısını inceleyen araştırmalar, kısıtlı sayıda kalmaktadır. Bu çalışmanın amacı, MMP20 (Matriks Metalloproteinaz-20) ve KLK4 (Kallikrein-4) gen polimorfizmleri ile diş çürükleri arasındaki ilişkinin Türk toplumundaki çocuklarda değerlendirilmesidir. Çalışma kriterlerine uygun 3-5 yaş aralığında bulunan 259 çocuk arasındaki gruplandırmada diş çürüğü olan 136 çocuk çalışma grubunu ve diş çürüğü bulunmayan 123 çocuk kontrol grubunu oluşturmuştur. Yanak içi sürüntü örnekleri toplanmış ve bunlardan DNA izole edilmiştir. Gerçek zamanlı-PZR yöntemi uygulanmıştır. Çalışma sonucunda gruplar arasında MMP20 geninin rs1784418 polimorfik bölgesinde ve KLK4 geninin rs2235091, rs198968 polimorfik bölgelerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Tekdeğişkenli analize göre MMP20 geninin promotor bölgesindeki rs1784418 polimorfizmi ile KLK4 geninin promotor bölgesindeki rs2235091 ve rs198968 polimorfizmleri bu genlerin transkripsiyonel işlevleri ve diş çürükleri üzerine etki etmediği sonucuna ulaşılmıştır. Fakat çokdeğişkenli analize göre KLK4 geninin rs198986 polimorfik bölgesinde AG ve GG genotiplerinin, çürük oluşumuna karşı koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, diş çürüğü oluşumunda çevresel faktörlerle beraber genetik faktörlerinde etkili olduğu, bu iki faktörün birlikte diş çürüğü riskini arttırdığı saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Polimorfizm, gen, MMP20, KLK4, diş çürüğü

2. SUMMARY

Evaluation of The Relationship between Polymorphisms of MMP20 (Matrix Metalloproteinase-20), KLK4 (Kallikrein-4) Genes which are Critical in Enamel Formation and Dental Caries on Children of Age of 3-5 Years

Dental caries is a transmissible infectious disease that still represents a significant public health problem in many countries. Genetic factors play a role in the formation of dental caries. As the outcomes of Human Genome Project are started to be applied in the oral medicine, many researchers studied genes and their protein products that may contribute to tooth decay. However, rare studies are present to show any clues about the etiological factors beyond this disease in Turkish population. The aim of this study is to evaluate the relationship between MMP20 (Matrix Metalloproteinase-20), KLK4 (Kallikrein-4) gene polymorphisms and dental caries on children. From 259 children at the ages of between 3-5 years, 136 children with tooth decays / dental caries are included in the study group and 123 children without tooth decays are in the control group. Buccal swabs were collected from each individual and DNA was extracted. RT-PCR method was used. The outcomes suggest rs1784418 single nucleotide polymorphism of MMP20 genes and rs2235091, rs198968 single nucleotide polymorphisms of KLK4 genes are not statistically associated with dental caries ($p>0.05$). The result of univariant analyses indicate that rs1784418 polymorphism in the promoter region of MMP20 gene, rs2235091 and rs198968 polymorphisms in the promoter region of KLK4 gene don't have an influence on the transcriptional factors and are not associated with dental caries. However the genotypes AG and GG in the rs198986 in KLK4 were associated a protective factor in the multivariate analyze. As a results, environmental factors and genetic factors are affective, these two factors increase the risk of dental caries together were found.

Keywords: Polimorphism, gene, MMP20, KLK4, dental caries

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Diş çürüğü, tüm dünya genelinde çocukluk döneminde en sık görülen kronik hastalıktır. Diş çürüğü, dişin kimyasal yapısında ortaya çıkan, geri dönüşü olmayan, multifaktöriyel, patolojik bir değişimdir. Çürük oluşumu ve ilerlemesinde bakteriyel flora, beslenme alışkanlıkları, fluora maruz kalma, ağız hijyeni, tükürük akış hızı, tükürük kompozisyonu ve diş yapısı gibi etkenlerin dışında, çevresel ve genetik faktörlerin etkileşimi rol oynamaktadır (Alberts et al 1994).

Genetik faktörlerin, insanlarda çürük oluşumunu ve gelişimini direkt olarak etkilemelerinin yanı sıra, çeşitli anatomik, fizyolojik ve immünolojik katkılarından gelen indirekt yoldan etkileşimlerin olduğu düşünülmektedir (Anusavice 1998).

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda, mine yapısı ve genin rolü üzerine durulmuştur. Bu çalışmalar, genlerin insanlarda mine oluşumu ve çürük duyarlılığı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Araştırılan genlerdeki genetik varyasyonlar, mineda yüksek oranda mineralkaybınanedenolanyapısal değişikliklere neden olmuştur (Arda 1995, Ayala 1994).

Düşük sosyoekonomik statü, zayıf oral hijyen alışkanlıkları, çürük yapısı, diyet ve diş bakımına dair karşılanmamış ihtiyaçlar, diş çürüklerinin oluşmasına neden olan değişkenlerdir. Fakat bu faktörlerin birleşimi, hastalık neticesini tamamiyle açıklamamaktadır. Aynı seviyede çevresel risk faktörlerine maruz kalan bireylerin değişik DMFT indeksleri hakkındaki genetik faktörlerin, hastalığın etiopatogenezine etkili olabileceği düşünülmektedir.

Çocuk diş hekimliğinde genetik çalışmalar; çürüklerin erken teşhisi ve tedavi planlaması, diş yapısının korunması ve önlenmesi açısından büyük bir önem taşımaktadır.

Araştırmamızın amacı;3-5 yaş arası çocuklarda, diş minesinin oluşumunda görev alan MMP20 (Matriks Metalloproteinaz-20) ve KLK4 (Kallikrein 4) gen polimorfizmleri ile diş çürükleri arasındaki ilişkinin incelenmesi ve çevresel faktörlerin hastalığın oluşumundaki etkisinin değerlendirilmesidir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Diş Çürüğü

4.1.1 Diş çürüğü tanımı

Diş çürüğü; kalsifiye dokuların yıkımı ve lokalize çözünmesiyle sonuçlanan dişlerin mikrobiyolojik enfeksiyöz hastalığıdır. Çürük, diş minerali ve plak arasındaki fizyolojik dengenin bozulmasıyla oluşmaktadır. Diş yüzeyinde “kavite” ya da defekt oluşturarak yıkımı, bakteri enfeksiyonunun işaretidir. Diş çürüğüne neden olan bakteriler, aynı zamanda dişin enfeksiyonu sonucu hastalığın ilerlemesine sebep olurlar. Çürük lezyonları, asidik ortam üretebilme yeteneği olan çok sayıda bakterinin diş yapısını demineralize etmesiyle oluşmaktadır (Alberts et al 1994, Anusavice 1998, Arda 1995).

Diş plağı, diş yüzeyine yapışan çok sayıda bakteriden meydana gelmektedir. Bu plak, bakterileri enerji sağlamak için karbonhidratları metabolize eder ve yan ürün olarak organik asitler üretir. Bu asitler, dişin kristal yapısının çözünmesi ile çürük lezyonu oluşmasına sebep olmaktadır. Çürük aktivitesindeki artış, bakteri aktivitesinin yüksek ve diş yüzeyindeki plak pH değerinin düşük olduğunu gösterir. Karbonhidrat olmadığı zaman, çok az bir bakteri aktivitesi olur ve diş yüzeyi civarında pH artar (Alberts et al 1994). Kritik pH değeri 5,5 olup, bu değer yükseldikçe zarar görmüş diş yüzeyi remineralize olmaya başlar. Tükürük içinde yüksek konsantrasyonda bulunan kalsiyum ve fosfat iyonları, remineralizasyon olayında önemli rol oynar (Alberts et al 1994, Anusavice 1998, Arda 1995).

Diş yüzeyi, insan yaşamı boyunca sürekli olarak asit saldırılarından etkilenir. Hemen hemen dişlerin tüm ara yüzeyleri, plak tarafından üretilen asitten etkilenir ve kısmi olarak demineralize olur. Plak ve asitle kısmi demineralize olan diş yüzeyinde kavitasyon meydana gelir. Demineralizasyon ve remineralizasyon arasındaki dengeyi anlaşılmaması, bilinçli çürük mücadelesinin anahtarıdır (Alberts et

al 1994, Anusavice 1998, Arda 1995).

Normal koşullarda dişin sert dokuları ile tükürük arasında sürekli bir iyon alışverişi olmaktadır. Bu iyon alışverişi, fizyolojik bir durum olarak belirtilmektedir. Ortamın asite kayması sonucunda dişin sert dokularındaki kalsiyum tuzları iyonize olup, dişten uzaklaşmaktadır. Ortam tekrar alkale duruma gelirse dişten çözünmüş olan iyonlar, sert dokulara çökelerek tuz kompleksleri oluşturmaktadır (Cengiz 2004, Featherstone 2000, 2008)

Dişin sert dokularındaki kalsiyum (Ca^{++}) tuzlarının iyonize olmasına “demineralizasyon”; kayıp diş sert dokularına tekrar tuz kompleksleri oluşturarak çökelmesine ise “remineralizasyon” adı verilmektedir. Demineralizasyon ve remineralizasyon olayları belli bir denge içinde gerçekteşmektedir. Bu denge mikrobiyal dental plak varlığında rahatlıkla bozulabilmektedir (Granath et al 1995, Deligezer, Akışık ve Dalay 2004, Hannas, Pereire, Granjeiro and Tjaderhane 2007).

Diş çürüğü, multifaktöriyel bir hastalık olarak tanımlanmakta ve oluşumunda dört ana faktörün rol oynadığı bildirilmektedir. Bu faktörler; konak (tükürük ve diş), mikroorganizma, diet ve zaman olarak belirtilmektedir. Diş çürüklerinin oluşumu için bu dört faktörün aynı anda bir arada bulunması gerektiği vurgulanmaktadır (Lu et al 2008, Mandel 1994, Sambrook, Fritsch and Maniatis 1989).

Çürüğün genel ve ağız sağlığına etkisi; lezyonun yaşına, lezyonun derinliğine ve lezyonun dentisyondaki yerine bağlıdır. Hastalığın etkisi; kronik hastalığı olan çocuklarda ve yeterli diş sağlığı hizmetlerinden yeteri kadar faydalanamayan çocuklarda görülür. Bu durum, küçük çocuklarda ise daha ciddidir.

Diş çürüğü, dış etkenlerle oluşan dişin sert dokusunda yıkıma yol açan, başlangıçta bulgu vermeyen, geri dönüşü olmayan bir hastalıktır. Ayrıca sistemleri de etkilemesi, gerekli korunma önlemleri alınmadığı durumda tanı ve tedavisi için zaman, personel ve maddi kayıplara yol açması nedeniyle halk sağlığı açısından önemle ele alınması gereken bir sorundur. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde, sosyoekonomik problemlere, beslenme ve ağız temizliği alışkanlıklarının olumsuz etkilerine vb. nedenlere bağlı olarak diş çürüğü prevalansının 5-10 kat arttığı rapor edilmektedir (Alberts et al 1994)..

Diş çürükleri, dişin kimyasal yapısında ortaya çıkan, geri dönüşü olmayan, multifaktöriyel, patolojik bir değişimdir. Çürük oluşumu ve ilerlemesinde bakteriyel flora, beslenme alışkanlıkları, fluora mağruz kalma, ağız hijyeni, tükürük akış hızı, tükürük kompozisyonu ve diş yapısının etkisi dışında, çevresel ve genetik faktörlerin etkileşimi rol oynamaktadır (Alberts et al 1994).

Genetik faktörlerin insanlarda çürük oluşumunu ve gelişimini direkt olarak etkilemelerinin yanı sıra çeşitli anatomik, fizyolojik ve immünolojik katkılarından gelenindirektyoldan etkileşimlerin olduğu düşünülmektedir (Anusavice 1998).

Diş çürükleri, dünya nüfusunun büyük bir kısmını etkileyen karmaşık, multifaktöriyel bir hastalıktır. Pek çok sağlık sorunu ve diş kaybına neden olduğu için önemli bir sorun olarak ele alınmaktadır. Çürüğü meydana getiren pek çok neden vardır. Mikroorganizma, zaman, substrat ve konak, çürüğün iyi bilinen nedenlerindendir. Bu faktörlerden konak faktörü, diş yapısını ve morfolojisini, tükürük akış hızını ve tamponlamak kapasitesini, genetik faktörleri içermektedir (Azevedo et al 2010).

4.1.2 Diş çürüğü etiyolojisi

Diş çürüğü kontrol edilebilir bir hastalıktır ve bunun için ilk basamak “çürük risk faktörlerinin” saptanmasıdır. Hastalığın klinik belirtisinden önce risk

faktörlerinin belirlenmesi ile hastalığın tekrarlama riski önlenecek ve yüksek çürük riski bulunan bireylere uygulanacak koruyucu uygulamalarla ağız diş sağlığı korunacaktır (Alberts et al 1994).

Diş çürüğü, multifaktöriyel etiyolojiye sahiptir. Birbiriyle etkileşim içinde olan bu faktörler: konak (tükürük ve dişler), mikroflora (plak), substrat (diyet) ve zamandır. Bu faktörlerin her birini değerlendirmeye alan ve kişilerin çürüğe yatkınlığını tam olarak tespit etmeye yardımcı olan tek bir test bulunmamaktadır. Diş çürüğü riski neden olan çeşitli faktörlerin analizi ile değerlendirilebilmektedir (Anusavice 1998).

Bu durum; diş çürüğü deneyimini (başlangıç çürük lezyonları, var olan çürük lezyonları, sekonder çürükler ve çürük aktivitesi), fluor kullanımı, plağın miktarı, diyet, tükürüğün biyokimyasal ve mikrobiyolojik olarak incelenmesi ve sosyal ve davranışsal faktörleri içermektedir (Anusavice 1998).

Diş hekimi, var olan risk faktörlerinin nasıl nedenini bulmak için bu faktörleri derinlemesine incelemelidir. Neden, hastanın davranış alışkanlıklarına bağlı olabileceği gibi tıbbi, farmakolojik, yetersiz ağız hijyeni, diyet alışkanlıkları ve genetik gibi belirlemesi genellikle zor olan diğer birçok soruna da bağlı olabilmektedir. Bu aktif faktörler, belirlenmez ve nötralize edilmez ise gelecekte diş çürüğü gelişimi ve restoratif tedavilerde başarısızlık nedeni olmaktadır (Alberts et al 1994, Azevedo et al 2010, Beck 1998).

Günümüzde diş hekiminin en önemli görevinin, yüksek risk grubundaki hastaları klinik bulgular oluşmadan saptayıp, bu konuda hastaları bilgilendirerek iyileşmeye katkıda bulunmalarını sağlamak olduğu vurgulanmaktadır (Alberts et al 1994).

Diş çürüğünün kompleks ve multifaktöriyel etiyolojiye sahip olması nedeniyle, bir çok risk faktörünün birlikte değerlendirilmesi ve önemli risk faktörlerinin ve bu faktörlerin birbirleri arasındaki ilişkilerinin belirlenmesi

gerektiği bildirilmektedir (Beyar 2003, Boynes and Dominichzak 1999).

4.1.2.1 Beslenme ve diyet faktörleri

Gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde, rafine edilmiş karbonhidrat kullanımının artmasından sonra doğal besinlerin yerini giderek işlenmiş gıdaların almaya başladığı ve kompleks karbonhidratların da protein, doymuş yağ asidi ve rafine karbonhidratlarla yer değiştirdiği gözlemlendiğinden diş çürüğünden etkilenmiş birey sayısında büyük bir artış olduğu görülmektedir (Thylstrup and Fejerskov 1994)

Tüm karbonhidratlar, ister besinlerde doğal olarak bulunsun, ister katkı maddesi olarak ya da pişmişnişastaformunda olsun; diş yüzeyinde asit oluşumuna neden olmaktadır. Ancak karbonhidratın konsantrasyonu ile oluşan asit miktarı arasında bir ilişki bulunmamaktadır. % 0,025’lik bir sakkaroz solüsyonu dahi ara yüz plaklarında pH değerini 5,7’nin altına düşürebilmekte ve hemen hemen tüm karbonhidratlar ağızda bakteriler tarafından fermante edilebilmektedir. Sakkarozun yalnızca alınma sıklığı değil, alınma şekli de önemlidir. Sakkaroz içeren yapışkan formdaki yiyeceklerin çabuk temizlenenlere göre daha fazla çürük yapıcı etkisi olduğugörülmüştür (Ermiş, Koray ve Akdeniz 2003).

Bireyin her gün aldığı yiyecek ve içeceklerin bir bütünü olan diyet, mine yüzeyini etkilediği ve mikroorganizmalar tarafından substrat olarak kullanıldığı için çürük oluşumu açısından lokal etiyolojik faktör olarak kabul edilmektedir. Nitekim, streptokok mutans düzeyi yüksek olduğuhâldebazı çocuklarda çürük bulunmadığı gözlenerek, bu bakterilerin tek başına çürük için yeterli olmadığı ve streptokok mutansların ancak sükroz varlığında diş yüzeylerinde kolonize olabildikleri, (Mattos Graner, Smith, King and Mayer 2000) dolayısıyla karyojenik diyetin diş çürüğü oluşumunda önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Newman 1986, Litt, Reisine and Tinanoff 1995, Milgrom et al 2000).

Çürük oluşumunda genellikle tüketilen besinlerden ziyade, alınan şekerin şekli ve tüketim sıklığının rolü olduğu kabul edilmektedir. Zira şekerin şekli ve alım sıklığı, şekerin dişler üzerindeki kalması üzerine etkilemektedir (Sreebny 1982).

Diş çürüğü ile diyetel alışkanlıklar arasındaki ilişkiyi incelemek üzere yapılan çalışmaların sonuçlarına göre; şeker içeren besinlerin diş üzerinde uzun süre kalmasının diş çürüğünü kolaylaştırdığı ve şeker alımındaki artış ya da azalmayla birlikte çürük prevalansında değişiklik olduğu gösterilmiştir. Ancak toplam şeker tüketimi, tüketim sıklığı ve alınan besinlerin şekli ile çürük arasındaki ilişkiye ait verilerin eksik olması, günlük şeker alımı hakkındaki bilgilerin güvenilir olmaması gibi nedenlerle diş çürüğü ile şeker arasındaki ilişki tam olarak kurulamamıştır (Sreebny 1982).

Diyetin plak metabolizması ve özellikle de asit üretimi üzerindeki lokal etkisi, diş gelişimi ve tükürük komponentleri üzerindeki sistemik etkisine göre çok daha önemli olsa da diyet ve diş çürüğü arasındaki ilişkinin tam olarak anlaşılabilmesi için hem lokal hem de sistemik etkinin ayrı ayrı yorumlanması gerekir (Thylstrup and Fejerskov 1986).

4.1.2.2 Diş yapısı

Diş çürüğü oluşumunu etkileyen üçüncü bileşen ise diştir (veya konak). Klinik gözlemler, oral hijyeni kötü olan ve sık şeker tüketen her bireyde diş çürüğü görülmediğini; laboratuvar çalışmaları ise aynı asit tamponun uygulandığı dişlerde oluşturulan çürük lezyonlarının her dişte farklı boyutta ve farklı düzeyde geliştiğini ortaya koymuştur (Thylstrup and Fejerskov 1994). Diş yüzeyleri üzerindeki mikrobiyal birikimin de çürük nedeni olarak gerekli ama tek başına yeterli olmadığının gösterilmesi (Thylstrup and Fejerskov 1994), dişlerin çürüğe karşı dirençlerinin farklı olabileceği düşüncesinin ağırlık kazanmasına neden olmuştur (Thylstrup and Fejerskov 1986).

Çürük oluşumu, dişlerde düz yüzeylerden daha fazla pits ve fissürlerde, temizlenme kapasitesi daha zayıf plak birikimine müsait bölgelerde görülmektedir. Fissür derinliği ile doğru orantılı olarak mikroorganizma sayısı da artacak ve çürük olasılığı yükselecektir. Karışık dişlenme döneminde olduğu gibi çene kavsi bozukluğu veya çapraşıklıklar çürük artırıcı bir başka etken olmaktadır. Karışık dişlenme döneminde var olan çürükler ve yüksek çürük potansiyeli sonucunda yeni sürmüş dişlerin yüzeylerine bakteriler daha hızlı yerleşirler.

Bakterilerin

yerleşme

kapasitesioluşturduklarıekstrasellülerpolisakkaritleorantılıdır (Saydam 2002).

Mineyi oluşturan ameloblastlar ilk olarak mine proteinlerini salgılayarak bir protein matriks meydana getirirler. Minenin olgunlaşması sırasında ise ameloblastlar bir taraftan salgıladıkları proteinazlar ile protein matriksini ortadan kaldırırken, bir taraftan da bikarbonat, kalsiyum ve fosfat iyonu salıp ortamdaki suyu uzaklaştırırlar. Bu sayede, kristallerin genişleyip kalınlaşarak kaybolan organik matriksin yerini aldığı ve minenin sertleştiği görülür (Tomes 1896, Deakins 1942, Brudevold, Steadman and Smith 1960, Travis and Glimcher 1964; Aoba 1997, Wentrup-Byrne et al 1997, Simmer and Hu 2001). Minenin yapısındaki minerallerin büyük çoğunluğunun minenin olgunlaşması sırasında depolandığı (Simmer and Hu 2001) ve minenin inorganik içeriğinin minenin gelişim süresi boyunca 5 misli arttığı ifade edilmektedir (Deakins 1942). Maturasyon aşamasında kristallerin etrafını saran sıvının pH'sı 6 ile 7,2 arasında değişmektedir. Bu pH aralığı, doğal ağız içi ortamını yansıtır. Ancak, minenin gelişimi sırasında mineral yapının homojen olmadığı ve asit solüsyonlara karşı duyarlı olan karbonat iyonundan zengin mine kristallerinin düşük pH'da ortamdan uzaklaştıkları görülür. Böylece, maturasyon süreci içinde aside duyarlı mineraller aside daha dirençli minerallerle yer değiştirirler (Simmer and Hu 2001, Aoba 1997). Bu süreç, dişin sürmesinden sonra da devam ettiği için yaşa bağlı olarak kristalinitenin arttığı dolayısı ile zaman içerisinde mineda aside daha dirençli bir yapının geliştiği gösterilmiştir (Grynepas, Bonar and Glimcher 1984, Aoba 1997, Simmer and Hu 2001). Dişin sürmesi ile birlikte mine yüzeylerinin tükürük proteinleri (pelikül) ile kaplanarak plak birikiminin başladığı ve erüpsiyon anında

çürüğe karşı son derece duyarlı olan mine yüzeyindeki çözünür minerallerin bu plak içindeki kalsiyum, fosfat ve flor gibi daha az çözünür minerallerle yer değiştirdiği dolayısı ile karbonat iyonundan zengin HAP'lerin yerini olgunlaşma süreci içinde aside dirençli olan HAP veya FHAP'lerin aldığı görülmektedir (Hicks, Garcia-Godoy, Flaitz 2004-a). Ayrıca, yeni sürmüş dişlerde minenin su ve organik içeriği yüksek olduğundan geçirgenliğin de oldukça fazla olduğu ve çözünür sıvıların minenin 200 mikrometre kadar içine sızabildiği görülür. Minenin olgunlaşma sürecinde çözünür minerallerin yerini daha az çözünür minerallerin alması organik matriks alanını daraltarak 24 geçirgenliğin 20 mikrometrelilik derinlikte sınırlı kalmasını sağlar (Hicks, Garcia-Godoy, Flaitz 2004-a).

Minenin yapısı oluşum, gelişim ve kalsifikasyon döneminde dolaşım sistemindeki besin öğelerinden (protein, kalsiyum, fosfor, fluor gibi) etkilenmektedir. Olgunlaşma safhası veya mineralizasyonun erken safhalarındaki yeni sürmüş diş minesinin dış yüzeyi ağız ortamı ile iyon alışverişi içindedir. İçme sularındaki mineraller, ağız gargaraları, diş macunu, tükürük içindeki eser elementlerin iyon alışverişi yolu ile mineye girebildikleri saptanmıştır. Dişi bir kalkan gibi saran minenin yapısındaki bu etkilenmeler, çürük meydana gelmesi açısından önem taşımaktadır (Reich 2000).

Eser elementler dişin çözünürlüğünü, apatit kristallerinin kristalinitesini, dolayısıyla minenin özelliklerini değiştirerek, dişin çürüğe karşı duyarlılığını etkilerler(Eugene 1976, Shashikiran et al 2007). Eser element konsantrasyonunun genellikle mine yüzeyinde daha fazla olduğu ve mine dentin sınırına doğru giderek azaldığı görülür. Yapılan çalışmalar, sağlam sürekli diş minesindeki fluor, stronsiyum, potasyum, alüminyum ve demirkonsantrasyonlarının çürük dişlerdekinden yüksek olduğunu göstermiştir. Sağlam süt dişi minesinde ise fluor, potasyum ve silisyum konsantrasyonlarının çürük süt dişi minesine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir(Shashikiran, Subba-Reddy and Hiremath 2007).

Mortimer (1970), süt dişlerinde çürüğün yayılım şekli ile minenin

kompozisyonu arasındaki ilişkiyi daimi dişlerle karşılaştırmalı olarak incelediği bir çalışmada, süt dişi minesindeki prizmaların genişliğinin daimi diş minesindeki prizmalardan daha küçük olduğunu dolayısı ile interprizmatik alanın daha geniş olduğunu ve bunun çürüğün yayılım hızını arttırdığını, prenatal minenin postnatal mineye göre %3-4 oranında daha az mineralize olduğunu gözlemiştir

Le Geros ve ark. (1996), süt dişleri ile daimi dişlerin bazı fizikokimyasal özelliklerini karşılaştırdıkları çalışmalarında ise karbonat, asit fosfat ve magnezyum iyonu içeriğinin daimi dişlere oranla süt dişlerinde daha fazla olduğunu, mine prizmalarının bir miktar daha küçük olduğunu ve asitlemenin etkisinin daimi dişlere göre daha derin kısımlara kadar indiğini gözleyerek, süt ve sürekli dişler arasındaki bu yapısal farklılıkların yaşla birlikte çürük prevelansında azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir.

Le Geros ve Le Geros'e göre (1983) mine yüzeyindeki karbonat konsantrasyonunun süt ve sürekli dişler arasında farklı olduğunu gözlemişlerdir.

Diş çürüğü oluşumunda, dişin yapısının ve morfolojisinin kalıtımının da rolü bulunmaktadır. Örneğin, dişlerin morfolojik şekilleri kalıtsal olarak farklılık göstermektedir. Ayrıca kalıtımın diş çürüğüne dayanaklılığı ve duyarlılığı da etkilediği ileri sürülmektedir (Azevedo et al 2010, Connor and Smith-Ferguson 1997, Mandel 1994, Pehlivan 2005, Petti et al 2000, Roberson et al 2010, Tannure et al 2012).

4.1.2.3 Tükürük

Tamponlayıcı etkisi ve yıkayıcılık özelliğiyle tükürük, diş çürüklerinde önemli bir faktörü oluşturmaktadır. Dişler üzerine yerleşen besin artıklarının tükürükle yıkanarak uzaklaştırılması, çürük oluşumuna negatif faktör olarak etkietmesinisaglar (Thylstrup and Fejerskov 1986).

Ağızda savunma maddesi olarak bilinen tükürüğün bakteriler üzerinde etkili olduğu kanıtlanmıştır. Tükürüğün % 99'u sudur. % 1'i ise pityalin, müsin, maltoz,

lizozim, serum albümin, globülin, lipitler, glikoz, üre gibi inorganik, kalsiyum klorür, sodyum bikarbonat, kalsiyum karbonat, fosfat, asit ve alkali fosfat gibi inorganik maddelerden oluşur. Tükürüğün içinde ayrıca çözünmüş gazlar da vardır(Thylstrup and Fejerskov 1986).

Tükürük, diş çürüklerini ağız içinde ve mikrobiyal plakta ortamın pH'ını nötraleştirerek önler. İstirahat hâlinde en önemli tamponlayıcı elemanlar inorganik fosfatlar, uyarılmış tükürükte karbonik asit-bikarbonat sistemi devreye girer. Tamponlama kapasitesinin azalması ile diş çürüklerinde artış saptanmış olmasına rağmen tükürükte hissiyotemiyolarak kullanılamazlar (Ermiş, Koray and Akdeniz 2003).

Beslenme tükürük kompozisyonunu etkilemekle birlikte, farklı diyet uygulamalarından sonra tükürüğün tamponlama kapasitesi ve elektrot konsantrasyonunda gözlenen değişikliklerin de diş çürüğü açısından çok önemli olmadığı gözlenmiştir (Dawes 1970, Thylstrup and Fejerskov 1986). Ancak beslenme eksikliğinin görüldüğü dönemlerde, antimikrobiyal tükürük proteinlerinin ve tükürük sekresyon oranının bozulmasına bağlı olarak plak oluşumunda artış olabileceği belirtilmiştir (Thylstrup and Fejerskov 1994).

4.1.2.4 Zaman

Diş çürükleri, uzun zaman aralıkları ile gelişen kronik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Karyojenik yiyeceklerin ağız içinde kısa süre kalması çürük açısından önemli bir etken oluşturmamasına rağmen, uzun bir süre kalması asit oluşumunu artırarak çürük oluşumunu pozitif bir katkı sağladığı belirlenmiştir(Thylstrup and Fejerskov 1986). Çürüğün oluşabilmesi için duyarlı bir konak ile karyojenik bir ağız florası ve karyojenik gıdaların yeterli süre bir arada bulunması gerektiği düşüncesi genel olarak kabul edilmiştir (Newbrun 1989).

4.1.2.5 Bakteriler

Çürükte etkili olan bakterilerin etkisinden söz edebilmek için diş yüzeyine yapışabilme, laktik asit üretebilme, düşük pH'da canlı kalabilme ve üreyebilme, yüksek sakkaroz konsantrasyonlarına dayanabilme, extrasellüler ve intrasellüler polisakkarit yapabilme gibi temel özelliklere sahip olması gerekmektedir. Çürük yapıcı bakteri türleri; streptokok, laktobasil, aktinomiçeslervemayalardır.

Çürük oluşturan bakteriler içinde en önemlisi streptokoklardır. Bu grup birçok türü barındırır da insanlarda çürükle en yakın ilişkisi olan streptokok mutans ve streptokok sobrinuslardır (Thylstrup and Fejerskov 1994, Tanzer et al 2001). İnsanda, streptokok mutansların başlangıç hâlindeki çürük lezyonlarında büyük oranda bulundukları oysa sağlam diş bölgelerinde ya az sayıda oldukları ya da hiç bulunmadıkları görülmektedir. Diş çürüğü prevelansının yüksek olduğu bireylerde ise hem daha çok sayıda diş yüzeyinin streptokok mutanslar ile enfekte olduğu hem de plak ve tükürük streptokok mutans konsantrasyonunun daha fazla olduğu belirtilerek, çürük diş sayısındaki artışla streptokok mutans sayısı arasındaki ilişkiye dikkat çekilmiştir (Hunter 1988). Buna göre ekstrasellüler polisakkarit üretimi, asidojenite (asit üretme kabiliyeti), asidürite (asit içerisinde yaşama kabiliyeti) ve intrasellüler polisakkarit üretimi gibi biyokimyasal özellikleri nedeniyle streptokok mutansların çürük gelişiminde başlıca rolü üstlendikleri (Krasse 1988, Balakrishnan, Simmonds and Tagg 2000, Anderson 2001) ve streptokok mutansların, özellikle okul öncesi dönemdeki çocuklarda geleceğe yönelik çürük tahmin aracı ve çürük aktivitesinin göstergesi olarak kullanıldığı görülmektedir (Shi et al 2003).

Ancak streptokok mutansların insanda diş çürüğüne neden olduğuna ilişkin önemli kanıtlar sağlanmış olsa da bunun kesin olmadığına dikkat çekilmektedir (Newbrun 1989). Nitekim araştırmacılarda çürük belirtisi olmadan da dental plakta streptokok mutans bulunabildiğini ya da streptokok mutans bulunmamasına rağmen çürük görülebildiğini dolayısı ile streptokok mutansın

diagnostik değerinin göreceli olduğunu ve bu bakterilerin varlığının çürük oluşunu için yeterli olmadığını ileri sürmektedirler (Krasse 1988, Grindefjord, Dahllhof, Modeer 1995, Messer 2000).

Diş rğnn belli bir mikroorganizmadan ziyade bir takım organizmalar tarafından oluşturulan özel bir ekosistemin aktivitesi sonucu ortaya çıktığını dolayısı ile çürük gelişen bir ekosistemde her zaman streptokok mutans ve laktobasillus bulunmayabileceğini belirten araştırmacılar vardır. Bu araştırmalarda çürük oluşumuna neden olan mikroorganizmanın o ortamın koşulları içinde bulunan mikroorganizma tipleri arasından belirlenmesi gerektiğini savunmaktadır (Hunter 1988, Newbrun 1989, Hirasawa and Takada 2003). Zira diş çürüğü ile ilişkisi olan bakterileri tanımlamak için yapılan çalışmalar, streptokok mutans ve laktobasillusun yanı sıra actinomyces türlerinin de karyojenik mikrofloranın göstergesi olduğuna ve mikrobiyal profile göre çürük aktif bireylerin belirlenmesinin mümkün olabileceğine dikkat çekmektedir (Ramos-gomez et al 2002; Tang et al 2003, Tang et al 2004; Corby et al 2005).

Dental plağın mikroflora kompozisyonunun diş yüzeyleri arasında da farklılık gösterdiği, fissrlerdeki mikrofloranın nispeten daha basit olduğu ve çoğunlukla gram pozitif bakterilerden (streptokoklar) oluştuğu buna karşılık aproksimal plaktaki mikrofloranın ise yarısından fazlasını streptokok ve actinomyceslerin oluşturduğu gözlenmiştir (Marsh 1999).

Keyes (1960), hamsterlar ile yaptığı çalışmasında, yüksek oranda sükroz içeren bir diyetle beslediği hamsterlarda çürük oluşmadığını, ancak bu hayvanları çürük aktif olan diğer hamsterlarla aynı kafese koyduklarında ya da çürük aktif hamsterların feeslerini oral olarak inoküle ettiğinde çürük oluşumuna rastlamıştır. Dolayısıyla diş çürüğünün enfeksiyoz ve aktarılabilen bir hastalık olduğu sonucuna varmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda insan rğnden izole edilen streptokokların hayvanlardaki deneysel çürükleri indüklediği grlmştir (Keyes 1960, Krasse 1966, Beyar 2003).

Bakteriyolojik kriterlerin bir bireyin çürük aktivitesini tek başına tahmin etmekte başarılı olmadığını belirten araştırmacılar; diyetteki sükröz içeriği, beslenme ve fırçalama alışkanlıkları, dişin ve plağın flor içeriği, tükürükteki bazı immün mekanizmalar, genetik faktörler ve streptokok mutansın kalıtsal karakteristiklerinin de göz önünde bulundurulması gerektiğini ifade etmektedirler (Loesche, Rowan, Straffon, Loos 1975, Newman 1986, Vandas 1986, Leverett et al 1993, Litt et al 1995, Mattos Graner et al 2000, Milgrom et al 2000).

4.1.2.6 Ağız bakımı

Kötü ağız hijyeni çocuklarda çürük görülmesine neden olmaktadır. Bu nedenle ailelerin dişlerin sürmeye başladığı dönemden itibaren çocuklarının ağız bakımlarını düzenli bir şekilde gerçekleştirmeleri gerekmektedir. Ailelerin ve bakıcıların, çocukların dişlerini günde en az 1 defa 2 dakika süre ile fırçalamalarının, çürük oluşumunu engelleyeceği belirtilmektedir (Grauwe, Aps and Martens 2004, Ismail et al 2003)

4.1.2.7 Çevresel faktörler

Gelenek ve görenekler, düşük sosyo-ekonomik çevre ve eğitim yetersizliği gibi faktörlerin çocuklarda çürük görülmesinde etkisi olduğu belirtilmektedir. İtalya’da ilkokullarda okuyan 2-6 yaş arasında 418 çocuğun ağız diş sağlığı durumunu araştırdıkları çalışmanın sonucunda, düşük sosyo-ekonomik düzeydeki ailelerin çocuklarında çürük görülme riskinin daha fazla olduğu saptanmıştır (Campus et al 2004).

4.1.2.8 Genetik faktör

Diş çürümelerini başlatan ve ilerlemesine sebep olan olayların açıklığa

kavuşturulabilmesi için uzun yıllardır devam eden çalışmalar bulunmaktadır. Çürük, birbirini izleyen olaylar dizisidir. Bireyler arasında çürüğe yatkınlığın farklı oluşu, bilinen bir gerçektir (Özata ve Kaya 2001).

Asit ataklarına sebep olabilen kolay fermente olan karbonhidratların alınma sıklığı şekli ve miktarındaki farklılıkların, çürük oluşumunu etkilemesine rağmen karşılaştırma yapıldığında çürük oluşumuna sebep olan başka faktörlerin olduğu akla gelmektedir. Bu aşamada herediter (genetik) faktörlerin çürük gelişimini etkileyebileceği düşünülmektedir (Özata ve Kaya 2001).

4.2 Genetik

4.2.1 Genetik terminoloji

Genetik analizlerde sıkça kullanılan bazı terimlerin anlaşılması, genetik konuların tartışılmasında önemlidir. Kalıtımın temel elemanı olan genler, ebeveynlerin çocuklarına kalıtlarını aktarmalarını sağlayan ögelerdir. Kimyasal olarak genler DNA molekülü boyunca dizilen nükleotid dizileridir. Bir toplumda bulunan canlılar, genlerinde aynı nükleotid dizilerini içermeyebilmektedir. Örneğin bir gen bir kodonunda “alanin” peptidini kodlayan GCA nükleotidlerini içerirken, başka bir bireye ait genin aynı bölgesi gene “alanin”i kodlayan GCC nükleotid dizisini içerebilmektedir (Lewin 2000).

Genler farklı nükleotid dizilerine sahip olmalarına karşın aynı proteini üretebilmektedir. Bir genin alternatif formlarına, bu genin “allel”leri denmektedir. Değişik “allel”ler bazen ciddi sonuçlar ortaya çıkarabilen değişik aminoasit sekansları kodlayabilmektedir. Örneğin fenilalenin hidroksilaz genindeki 408. kodonda sitozinin timine dönmesi sonucu aminoasit yapısında “argigin” yerine “triptofan” geçmekte ve bu da sonuçta fenilketonuri hastalığına yol açan inaktif bir enzim oluşmasına yol açmaktadır (Lewin 2000).

Organizmada yer alan tüm DNA, genom olarak adlandırılır. İnsan

genomunda 3 milyar baz çifti bulunmaktadır. Genomun içinde tüm organizmaların yaşamı için gereken proteinlerin sentezi hakkında bilgi taşıyan genler bulunmaktadır(Özata ve Kaya 2001, Öztürk 2009). Yaşayan organizmalar çoğunlukla proteinden yapılmıştır. Proteinler, hücreler ve dokular için yapı malzemesi teşkil etmekle beraber, gerekli kimyasal reaksiyonlar için de özel enzimler oluşturmaktadır. Bu proteinler organizmanın karakteristiklerini, fonksiyonunu ve hattabazendavranışını belirlemektedir.

Proteinler sayesinde genlerimiz, besinleri ne kadar efektif metabolize edeceğimizi, vücudumuzu zehirlerden ne kadar arındırabileceğimizi ve enfeksiyonlara karşı nasıl savunacağımızı belirlemektedir(Kinane and Hart 2003, Nauwink 1974). Proteinler 20 farklı amino asidindeğişik kombinasyonlarından oluşur ve her proteinde birkaç yüz amino asit bulunmaktadır(Kinane and Hart 2003, Neumaier et al 1998, Özata ve Kaya 2001).

Genlerin asıl görevi bu amino asitlerin sekanslarını belirleyip, proteinleri oluşturmaktır(Neumaier, Braun and Wagener 1998).

Genomun sadece % 3'ü genlerden oluşur. Diğer kısmı henüz görevini bilmediğimiz ve hiçbir proteini kodlamayan DNA'dır(Orita, Suzuki, Sekiya and Hayashi 1989, Pol 2011). Yaşayan varlıklar birbirlerinden çok farklı görünmekle beraber, DNA seviyesinde hayret edilecek kadar benzemektedir. Tüm yaşayan varlıkların DNA'sının % 99'u aynıdır. Ayırt edici özellikleri belirleyen ise geri kalan % 1 DNA'dan ibarettir(Orita et al 1989, Pol 2011).

Hücre çekirdeğinin içinde, yaşayan organizmaları oluşturmak için gereken genetik bilgiyi taşıyan madde DNA'dır(Russel 1994, Roberson et al 2010). Deoksiribo Nükleik Asit; baz çifti veya nükleotid olarak adlandırılan tekrarlanan yapı ünitelerinden meydana gelmiş uzun zincirlerdir. DNA molekülünde birbirlerinin etrafında sarılarak dönen iki nükleotid zinciri, DNA'nın burgulu bir merdiveni andıran çift sarmal yapısını oluşturmaktadır. Merdivenin uzun kenarları şeker (deoksiriboz) ve fosfat gruplarından yapılmış olup, basamaklarda adenin (A), timin (T), sitozin (C) ve guanin (G) baz çiftlerinin kombinasyonlarından

oluşmaktadır(Sambrook et al 1989). 3,2 milyar baz çiftinin yapılanmasına da DNA sekuensi adı verilir. DNA'nın üçboyutlu yapısı onun çok önemli işlevini yerine getirmesini sağlamaktadır(Nussbaurn, McInnes and Willard 2001, Santos,Sakai, Machado and Schippers 2004, Saxena, Li and Caufield 2005).

DNA, nükleotid bazı olarak pürin ve pirimidinleri içerir. Bunlar iki tip pürin, adenin birimi olan nükleotidin bir bölümüdür. Nükleotid; dört nükleotid bazından biri, bir şeker ve bir de fosfat grubundan oluşur. Pürinin 9 no'lu pozisyonundaki veya pirimidinin 1 no'lu pozisyonundaki azot atomu, şekerin 1 no'lu pozisyonundaki C atomuna bağlanır(Russel 1994, Sambrook et al 1989).

DNA; deoksiribonükleotid birimlerinin bir polimeridir. Nükleotid zincir bir nükleotid şekerin bir hidroksil grubuyla, diğer bir nükleotidin şekerine bağlı fosfat grubunun bağlanmasıyla oluşur. Birbirlerine fosfat grubu ile bağlanmış şekerler DNA'nın değişmez bölümünü oluşturan nükleotid bazlarının dizisidir. DNA nükleotid zinciri polardır. Polarite şekerlerin birbirine bağlanma biçiminden kaynaklanır. Nükleotid bazları arasında uzaysal ilişkilerin sonucu olarak sitozinin karşısında daima bir guanin ve timinin karşısında daima adenin yer alır. DNA'nın bir zinciri komplementerdir(Milgrom et al 2000, Saydam 2002, Sambrook et al 1989, Russel 1994).

Baz eşleşmesi, DNA'nın en önemli yapısal özelliğidir. DNA'nın çift sarmal yapıda olması gerektiği tespit edilmiştir(Sambrook et al 1989, Saxena et al 2005). Bu yapı, replikasyonu ve genetik bilginin geçişi gibi iki önemli işlevi açıklamaktadır. DNA yapısının aydınlatılması, modern genetiğin gelişiminin başlangıcı olarak kabul edilmektedir. Bu sayede gen yapısı ve işlevi moleküler düzeyde anlaşılabilir. Çift sarmalda birbirine zıt yönde uzanan nükleotid zinciri tam olarak komplementer olduklarından, sarmal açıldığında her biri, yeni bir zincirin oluşumu ve replikasyon için kalıp olarak işlev görebilmektedir. DNA replikasyonu semi-konservatiftir, yani yeni bir zincir oluşurken, diğer zincir eskisi gibi kalmaktadır(Mullis 1990, Morris, Robertson and Gallagher 1996, Saydam 2002).

Nükleotid baz çiftleri arasındaki kovalent olmayan hidrojen bağları zayıftır. Bununla beraber DNA, çok uzun bir molekül olduğundan fizyolojik sıcaklıklarda stabildir. İki komplementer zincir, nispeten zayıf kimyasal araçlar aracılığıyla ya da dikkatlice ısıtılarak birbirinden ayrılabilir ve bu işleme denatürasyon adı verilmektedir. Ortaya çıkan tek zincirler oldukça dayanıklıdır. Soğutma ile komplementer zincirler, çift zincirli molekülleri oluşturmak üzere tekrar bir araya gelebilirler; buna da renatürasyon denir (Morris et al 1996, Ozturk ve ark 2009, Piwat, Teanpaisan, Thitasomakul, Thearmontree and Dahlén 2010, Olszowski, Adler, Janiszewska-Olszowska, Safranow and Kaczmarczyk 2012).

Gen bir polipeptidin oluşumundan sorumlu DNA bölgesi olarak tanımlanabilir. Bir ya da daha fazla polipeptid, bir proteini oluşturur. Yani bir protein yapımı için birkaç gen gerekebilir. Biyokimyasal olarak karmaşık olmasına rağmen, DNA replikasyonu genetik olarak oldukça basittir (Shaffer et al 2011).

DNA’da saklı olan bilginin bir protein sekuensini belirleyebilmesi için başka bir makromolekülün aracılığını kullanması gerekir. Bu, makromolekül Ribo Nükleik Asittir (RNA). DNA ve RNA’daki bilgi, polinükleotid zincirindeki pürin ve pirimidin baz sekuensinde bulunmaktadır. Pürin ve pirimidinler amino asit sekuensini kodlarlar ve her üç baz, bir amino asit kodlamak ile görevlidir. Hücre bölünürken, genetik bilginin de bölünmesi üç basamaktan oluşmaktadır:

—**Replikasyon:** Genetik bilgiyi taşıyan çift zincirli DNA, kopyalanarak dört zincir oluşturmaktadır.

—**Transkripsiyon:** DNA’daki bilgi RNA’ya aktarılmaktadır. Bilgi taşıyan RNA’ya mesajcı RNA (mRNA) adı verilmektedir.

—**Translasyon:** mRNA’daki baz sekuensi üç bazlık kodonlar halinde amino asitleri belirler. Bu protein sentezi, ribozomlarda oluşmaktadır (Morris et al 1996, Neumaier et al 1998, Milgrom et al 2000, Kinane and Hart 2003, Öztürk et al 2009, Feenstra et al 2011).

Genler, hücrelerde sarmal bir yapı olan kromozomlar içinde bulunurlar. İnsanlarda 23 çift kromozom bulunmaktadır ve her bir insan hücresi 3×10^9 baz çifti içermektedir. Tüm kromozomlarımızda yaklaşık olarak 40.000 civarında gen bulunmaktadır. Her bir kromozom, uzunluğu boyunca sarmal bir hâle gelmiş çift sarmallı bir DNA içermektedir. Bir kromozomdaki DNA uzatılacak olursa 25 millik bir uzunluğa sahip olduğu görülecektir. Bir genin kromozom üzerindeki yeri, o genin “lokus”u olarak adlandırılmaktadır (Lewin 2000).

Kromozomlar, genlerin organizasyonunu sağlamaktadır. Değişik organizmalarda değişik sayıda kromozomlar vardır. İnsanlarda 23 çift yani toplam 46 kromozom bulunmaktadır. Bunların ikisi seks kromozomudur. Eşleşme esnasında her ebeveyn, kromozom çiftlerinden birini sağlar ve böylelikle her çocuk sahip olduğu kromozomların yarısını annesinden, yarısını da babasından edinmiş olur (Nauwink et al 1974, Nelson 1991). Biliminsanları, kromozomları; boyutları, boyanma paternleri ve birtakım diğer karakteristikleriyle birbirinden ayırmaktadır (Nauwink et al 1974, Mullis 1990, Neumaier et al 1998).

Yüksek canlıların çoğunda sperm ve yumurta hücreleri haricindeki hücrelerde, her kromozomdan biri anneden birisi de babadan gelmek üzere bir çift bulunmaktadır. Bu kromozomlara “homolog kromozom”lar ismi verilmektedir. Bu nedenle bireyler her “lokus”ta biri anneden birisi de babadan gelen iki “allel” taşımaktadır (Lewin 2000).

Genotip, bir bireyin sahip olduğu genetik yapıyı ifade etmektedir. Herhangi bir “lokus”taki genler, birbiriyle tamamen aynı ise buallel için bireyin “homozigot” olduğu söylenebilmektedir. Eğer “lokus”taki “allel”ler farklı ise bu bireyin o gen için genotipinin “heterozigot” olduğu söylenebilmektedir (Lewin 2000).

Bir bireyin “allel”leri onun genotipini belirlerken genotipin fiziksel veya

biyokimyasal ekspresyonu onun “fenotip”ini belirlemektedir. Buna göre genotip allellerin içinde ne olduğunu fenotip ise dışarıdan gözlenenin ne olduğunu tanımlamaktadır. Genotip ve fenotipin anlaşılması hayati bir öneme sahiptir. Çünkü belli genler ile bu genlerle ilgili bazı özellikler her zaman birebir uyuşmayabilir. Saç rengi, ten rengi, boy, ağırlık gibi pek çok özellik, birden fazla gen tarafından belirlenmektedir ve çevresel faktörler fenotipe etki etmektedir. Bu aynı genotipin farklı çevresel koşullara bağlı olarak farklı fenotipler oluşturabileceğini göstermektedir. Örneğin, bunu akciğer kanserine yakalanma riski olan bir genotipte açıklayabiliriz (Lewin 2000).

Çevresel etki, aynı zamanda bir fenotipin arkasında farklı genotiplerin yatabileceğini göstermektedir. Bir başka deyişle, akciğer kanserine yakalanma riski genetik olarak zayıf olan birisinde sigara kullanımına bağlı olarak akciğer kanseri gelişebilmektedir. Çeşitli alleller şeklindeki genetik varyasyonlara her türden canlıda rastlanır. Bu tür genetik farklılıklar, çeşitli DNA markerleri ile izlenebilmektedir. Bu polimorfizmlerin belirlenmesinde pek çok yöntem kullanılmaktadır ve pek çok yeni yöntem geliştirilmektedir (Lewin 2000).

4.2.2 Hastalıkların genetik temelleri

Genetik varyans ve çevresel faktörler, bireyler arasındaki fenotipik farklılıkların temel sebepleridir. Nadiren çevresel faktörler veya genetik faktörler kendi başlarına patolojiye sebep olabilir. Çevresel olarak yüksek dozda radyasyona maruz kalmak, genetik yapıdan bağımsız olarak patolojiye sebep olduğu gibi trizomi 21’de de çevresel faktörlerden bağımsız olarak genetik bozukluk patolojiye sebep olmaktadır. Fakat toplumdaki pek çok hastalıkta çevresel ve genetik faktörlerin belli oranlardaki etkileri patolojiye sebep olmaktadır (Kornman and Newman 2000).

İnsanlarda görülen pek çok hastalığın etiyolojisinde genetik faktörlerin bir

katkısı olmaktadır. Bu katkı değişik hastalık türleri için değişik oranlarda olmaktadır. Genetik bilimi uzmanları genetik hastalıkları “temel Mendel hastalıkları” ve “kompleks genetik hastalıklar” olarak ikiye ayırmaktadır. Bu gruplar arasındaki temel farklılık; hastalıkların kalıtım ile ilgilidir (Kornman and Newman 2000).

4.2.3 Temel Mendel hastalıkları

Kalıtım gösteren hastalıklara, Mendel hastalıkları denmektedir. Klinik hastalık fenotipinin oluşmasında genellikle tek bir gen lokusunun etkili olduğu aile içinde geçişi takip edilebilen hastalıklardır. Bu hastalıklar otozomal dominant, otozomal resesif veya X kromozomuna bağlı kalıtım göstermektedirler. Bu hastalıklar, genellikle nadir görülen hastalıklardır, izole birtakım popülasyonlar haricinde görülme sıklıkları % 0.1’den daha azdır (Kinane and Hart 2003).

Bir Mendel hastalığının sebebi aydınlatıldığında, muhtemelen bir gen lokusundaki mutasyondan kaynaklandığı görülecektir. Hastalık fenotipi geniş bir çevresel ortamda ortaya çıkabilmekte, diğer genler ve çevresel faktörler de etkili olabilmesine karşın, birbirine çok benzer fenotip oluşmaktadır. “Amelogenesis imperfekta”, “Crouson sendromu”, “Cleidocranial dysplasia” bu grubun içinde bulunan hastalıklardan bazılarıdır. Hastalığa sebep olan gen belirlendikten sonra bu geni taşıyan kişilerin tespiti için testler üretilebilmekte, bu testler yardımıyla hastalığa doğacak bir çocukta görülme riski bile önceden tayin edilebilmektedir (Kinane and Hart 2003).

4.2.4 Kompleks genetik hastalıklar

Kompleks genetik hastalıklar, bazı önemli noktalarda Mendel hastalıklarından ayrılmaktadır. Genetik olarak kompleks hastalıklar, Mendel hastalıklarına göre daha siktir; toplumda % 1’den daha sık gözlenmektedir ve

klasik bir ailesel geçiş göstermezler. Tek bir genin sebep olduğu basit geçiş gösteren hastalıkların aksine, pek çok genin olaya katıldığı karmaşık bir kalıtım söz konusudur. Ayrıca, evresel faktörler fenotip üzerinde etkili olmaktadır (Kinane and Hart 2003).

Mendel hastalıklarındaki nadir mutasyonların aksine, kompleks genetik hastalıklarda görülen genetik farklılıklar, toplumda sık görülmekte ve hastalıklı bireyler kadar hasta olmayan bireylerde de bulunabilmektedir. Mendel hastalıklarında meydana gelen genetik mutasyonlar, ilgili genin ürettiği proteinin fonksiyonunu ciddi şekilde etkilemekte, hatta iş göremez duruma getirmektedir. Ancak kompleks genetik hastalıklarda meydana gelen mutasyonların sonuçları bu kadar ciddi olmamakta, genellikle normal fonksiyonlar devam edebilmektedir.

Bir hastalık ile ilgili olduğu bilinen genetik polimorfizm kendi başına hastalığı oluşturabilecek yeterlilikte değildir. Bununla beraber hastalıkla ilişkili bir allelin tespiti kompleks genetik hastalıklarda, hastalığın teşhisini sağlamaz. Toplumda hastalıkla ilişkisi bilinen bir allel, hastalığı göstermeyen pek çok kişide de bulunabilmektedir. Bu alleller risk belirtmesine karşın belirleyici olarak kullanılamazlar. Mendel hastalıklarında hastalıkla ilişkili olduğu bilinen allelin tespiti hastalığın teşhisi için yeterli olmasına karşın, kompleks genetik hastalıklarda hastalıkla ilişkili olduğu bilinen bir allelin tespiti sonrası, bunun yorumlanması güçtür ve hastalıkla ilgili diğer faktörlerin de bilinmesi gerekmektedir(Kinane and Hart 2003).

4.2.5 Genetik polimorfizmler

“Poli” ve “morfizmos” kelimelerinden oluşan polimorfizm, eski Yunanca’da “ok ekillilik” anlamına gelmektedir. Genetik polimorfizm, bir popülasyonda, farklı allellere bağlı olarak, genetik olarak belirlenmiş iki ya da daha çok alternatif fenotipin görülmesidir.

Polimorfizmlerin anlaşılmasında hastalıkla ilişkili olduğu bildirilen

“Allel”lerin sağlıklı kimselerde de bulunabildiği ve hastalıklı bazı bireylerde ise bu “Allel”lerin bulunmadan bilinmesi önemlidir. Mutasyonlardan farklı olarak polimorfizmlerin varlığında hastalık ortaya çıkmaz; ancak hastalıkla ilişkili allellerin hastalarda sağlıklı bireylere nazaran daha sık görüldüğü bilinmektedir. Etiyolojide çevreselfaktörlerinde kritikbirönemivardır (Kornman and Newman 2000).

Etiyolojilerinin karmaşık olması, birçok etkenin görev aldığı hastalıklarda özel bir etkenin hastalığı ne kadar etkilediğini belirlemeyi güçleştirmektedir. Kronik hastalıklar ilerleyen yaşlarda başlamakta ve gelişmeleri yıllar almaktadır. İmmün cevabı ve enflamasyonu etkileyen genetik faktörler de olaya katılmaktadır. Bu fizyolojik ve biyolojik olguların pek çok dengeleyici mekanizmaları bulunmaktadır ve buna bağlı olarak tek bir genetik varyasyonun hastalık üzerinde ne derece etkili olduğunu saptamak çok güçtür. Eğer bir bireyde bir hastalıkla ilişkili polimorfizm gözleniyorsa, bunun klinik sonuçlarını sadece polimorfizme bakarak tahmin etmek mümkün değildir(Kornman and Newman 2000).

Evrimsel süreçte tüm türlerin farklılaşmasından ve bir türün üyeleri arasındaki farklılıklardan genetik çeşitlilik sorumludur. Genlerde, genetik çeşitliliğe yol açan bu değisikliklerden biri polimorfizmdir. Genomda çoğunluğu tek nükleotid düzeyinde olmak üzere (insanda on milyon kadar), ikili, üçlü nükleotid tekrar sayılarında değişiklikler ve kromozom düzeyinde bazı yapısal düzenlemeler şeklinde genetik polimorfizmler vardır.

Genetik hastalıklar, DNA’daki bir değişiklik sonucu genin, mRNAyada protein ürününün niteliğinin yada niceliğinin (bazen her ikisinin) değişmesisonucuoluşanhastalıklardır (Ekmekçi, Konaç ve Önen 2008)

4.2.5.1 Mutasyon ve genetik polimorfizm arasındaki fark

Mutasyon; gen ya da kromozomda meydana gelen kalıcı kalıtılabilir sonuçlara yol açan değişikliklerdir. Herhangi bir genin, bir kromozom üzerinde yerleştiği bölge, lokus olarak adlandırılır. Her gen, biri anneden diğeri babadan gelen ve allel olarak adlandırılan, 2 alternatif kopyadan oluşur (Brown 1992)..

Genleri, DNA dizileri oluşturur ve sıklıkla protein olan ürünleri, hücre yapısı, fonksiyonlarının düzenlenmesi, enzim aktivitesi ve metabolik yolların kontrolünde rol oynar (Brown 1992).

Baz çiftlerinin kompozisyonundaki değişiklikler her zaman hastalıkla sonuçlanmayabilir; bu durum polimorfizm olarak adlandırılır. Mutasyon olarak adlandırılan değişiklikler ise çeşitli derecede klinik yansımalarla neden olarak, gen fonksiyonunda bozulmalara yol açmaktadır(Brown 1992).

Temel Mendel hastalıkları ile kompleks genetik hastalıklar arasındaki farklardan birisi de hastalık meydana getirmek için gereken gen sayısı yanında, ilgili genlerin hastalıklı fenotipin ortaya çıkmasında etkili olma derecesidir. Mendel hastalıklarında bir gen lokusunda meydana gelen “mutasyon” ciddi fizyolojik sorunlara yol açabilmekte ve hastalık için belirleyici olarak kabul edilmektedir. Genetik olarak tespit edilen durumun fenotipte ortaya çıkması ve biyolojik sistemin temelinde bulunan genetik problemi dengeleyemediğini gösteren durumlar “mutasyon” olarak isimlendirilmektedir. Çevresel faktörler de genetik faktörler kadar bazı hastalıkların ortaya çıkmasında etkili olmaktadır. Kompleks hastalıklarda ise hastalığın görülmesinde bir genin etkisi oldukça azdır. Bu tür genetik varyasyonlar ise “genetik polimorfizmler” olarakadlandırılmaktadır.

4.2.5.2 Tek nükleotid polimorfizmleri—“Single Nucleotide Polymorphisms”

(TNP)

Tek nükleotid değişimlerini (varyasyonları, polimorfizmleri) içeren genler, toplumda % 1'den daha fazla sıklıkta bulunan allel genler olarak tanımlanır. İnsan genom dizilim çalışmaları her insan genomunda DNA'nın % 99,9 benzerlik gösterdiğini kanıtlamıştır. Geriye kalan % 0,1'lik fark, bireysel genotip ve fenotipik değişikliklerin sorumlusudur. Tek nükleotid değişimleri insan genomunda en çok bulunan (ortalama her 1.000 nükleotidde bir) DNA dizi değişimleridir (Deligezer ve ark 2004).

Diğer genetik polimorfizm tipleri; değişik uzunlukta ikili ya da üçlü nükleotid tekrarları ve DNA'da eksilme ya da artmaları içermektedir. İster döngü düzenleyici molekül, isterse yüzlerce hücrel işlevden birinden sorumlu olan herhangi bir genin kodlayıcı bölgesindeki değişiklik, genin ürünü olan fenotipi etkilemektedir (Dirican ve Bilgen 1995).

Tek nükleotid polimorfizmleri, toplumda DNA zincirinin belli bir bölgesindeki nükleotid çiftinin sıklıkla değiştii bölgeler olarak tanımlanabilir. Örneğin, DNA üzerinde belirli bir noktada bulunan T-A baz çifti, popülasyondaki diğer bazı bireylerde G-C baz çifti olarak bulunuyorsa, bu bölgede bir TNP vardır diyebiliriz. TNP farklı iki allelin bulunduğunu, buna bağlı olarak da üç farklı genotip oluşacağını göstermektedir. Bunlar homolog kromozomların her ikisinde de T-A baz çiftinin bulunduğu homozigot T-A genotipi, homolog kromozomların birisinde T-A diğerinde G-C olan heterozigot genotip ve homolog kromozomların her ikisinde de G-C nükleotidleri bulunan homozigot G-C genotipidir (Lewin 2000).

TNP'ler bir genin kodlanmayan bölgesinde de bulunabilmektedir. Rastgele seçilen iki insanın DNA'sı protein kodlayan kısımda 1.000-3.000 bp civarında farklılık gösterirken, kodlanmayan bölgelerde yaklaşık olarak 500-1.000 bp farklılık göstermektedir. DNA dizisindeki bir farklılığın TNP olarak kabul

edilebilmesi için popülasyonda % 1'den daha sık görülüyor olması gerekmektedir. Daha nadir olarak görülen değişiklikler, mutasyon olarak kabul edilmektedir. TNP'ler insanlar arasındaki genetik farklılıkların en genel türleridir ve hem insanlar hem de kromozomlar arasında eşit dağılımlar göstermektedir. İnsanlarda 2001 yılına kadar 300.000 TNP tanımlanmıştır(Lewin 2000).

4.2.6. Genetik polimorfizmlerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler

Genetik polimorfizmlerin belirlenmesinde PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), gerçek zamanlı PZR, DNA dizi analizi, Southern-blot, Dot-blot, Reverse hybridizasyon tekniği, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism: Restriksiyon Parça Uzunluklu Polimorfizmi), SSCP (Single Stranded Conformational Polymorphism: Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi), Allel Spesifik Oligonükleotid (ASO) gibi laboratuvar yöntemleri kullanılmaktadır. Polimorfizm çalışmalarında elde edilen bulgular, hastalıklara yatkınlığın veya dirençliliğin belirlenmesinde ve tedavinin yönlendirilmesinde önem taşımaktadır(Lüleci, Sakızlı ve Alper 1995).

4.2.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR, spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan in vitro bir yöntemdir. Kolay uygulanabilir olması ve hızlı sonuç vermesi gibi avantajları nedeniyle; kalıtsal hastalıkların tanısında, prenatal (doğum öncesi) tanıda, klinik örneklerde patojen (hastalık yapabilecek) organizmaların saptanmasında, adli tıpta, klonlamada; gen tanımlaması araştırmaları, adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesi (annelik-babalık tayini), doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesi gibi tıp alanlarında; tarımda (tohum saflığının belirlenmesi), sistematik ve evölüsyon çalışmaları gibi birçok farklı alanda (doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı) kullanılabilmektedir(Mullis 1990,Siqueira and Rôças 2003, Temizkan ve Arda 2005).

PZR, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef diziyi iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanmaktadır. Kalıp DNA molekülü, yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra primerler, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle hibridleşmektedir. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması, düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşmektedir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dNTP varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlamaktadır (Temizkan ve Arda 2005).

PZR, denatürasyon, primerlerin bağlanması ve DNA sentezi olmak üzere üç basamaktan oluşan döngülerin tekrarlanması ile gerçekleştirilmektedir. Her tekrarlanışta iki primer arasında kalan hedef DNA'nın iki zincirine ait kopyaları çıkartılmaktadır:(Santos, Sakai, Machado, Schippers and Grene 2004)

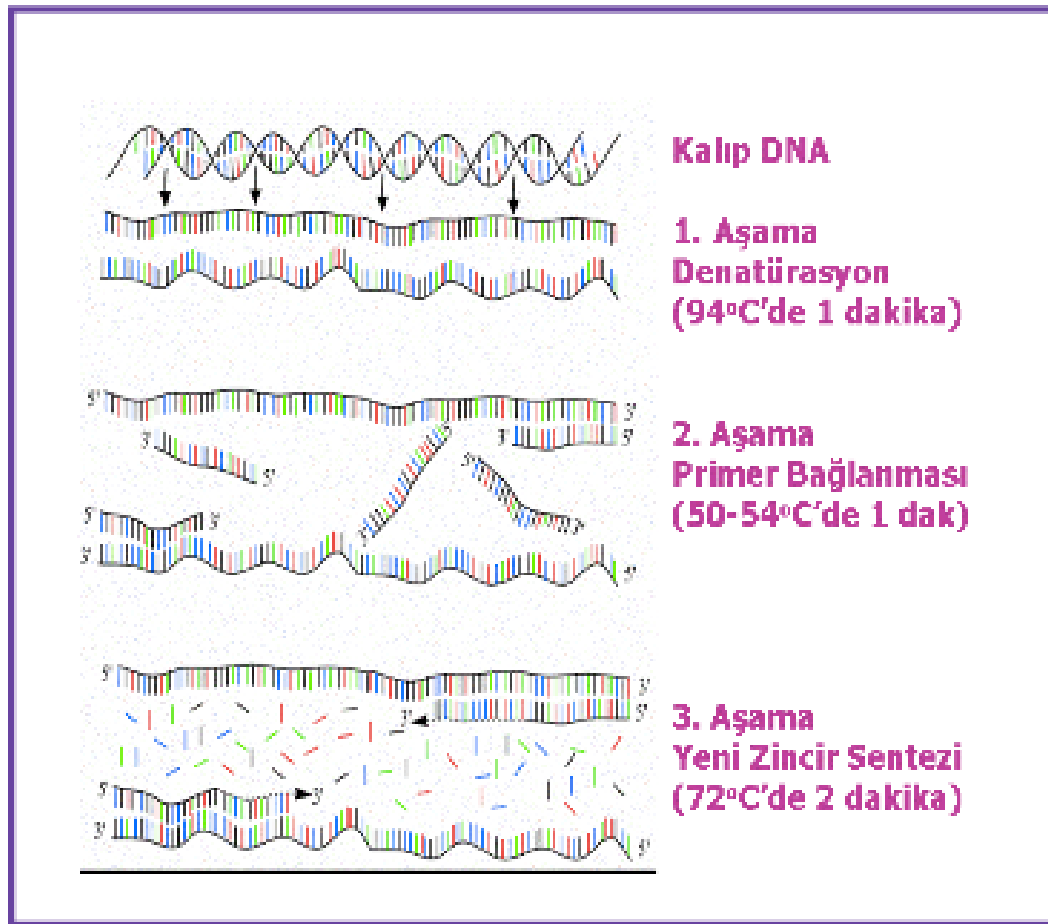
—**Denatürasyon:**Çoğaltılması istenen çift zincirli kalıp DNA, 94-96 °C'ye kadar ısıtılarak zincirleri birleştiren hidrojen bağlarının kopması sonucunda birbirinden ayrılmaktadır. Eger çalışılacak genetik materyal RNA ise önce revers transkriptaz enzimi ile komplementer DNA (cDNA) oluşturulmakta ve daha sonra oluşturulan cDNA primere kalıplık etmektedir(Santos et al 2004, Tony 1995).

—**Bağlanma (Annealing):**Sıcaklığında düşürülmesiyle, çoğaltılması düşünülen DNA için spesifik primerler kendilerine özgü dizileri tanıyıp bağlanmaktadır. Her primer, örnekteki orijinal DNA sarmalının 3' veya 5' sarmalından birinin tamamlayıcısıdır.Ortam sıcaklığının, primerlerin optimum koşullarda bağlanabildiği sıcaklığa kadar soğutulması ile primerler kendileri için özgül dizileri tanıyarak 5'—>3' yönünde bağlanmaktadır. Primerlerin özgül olarak bağlanması için kullanılan sıcaklık genellikle 55-65 °C arasında değişmektedir(Mackay 2004).

—**Uzama (Elongasyon):**Her primer hibridleştiği tek ipliğin karşılığını sentezlemektedir. Bu sentezin gerçekleşmesi için termostabil özelliği olan ve *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen Taq DNA polimeraz enzimine gereksinim vardır. Ortam sıcaklığı Taq DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklık 72 °C'ye getirildiğinden, enzim molekülleri primerlerin 3' uçlarına

bağlanarak DNA sentezine başlar. Enzim, primerlerin 3' ucuna dNTP'leri ekleyerek her iki zincir üzerinde 5'—>3' yönünde DNA sentezi yapar. DNA sentezi diğer uçtaki primer bölgesine de geçmektedir. Dolayısıyla yeni zincirler ile birlikte yeni primer bağlanma bölgeleri oluşturulmaktadır(Mackay 2004, Santos et al 2004) (Şekil 1).

PZR protokolü üç aşamalı bir döngü olarak kabul edilir ve tipik olarak 30-50 döngüden oluşmaktadır.



Şekil 1: Polimeraz ZincirReaksiyonununşematik olarak gösterilmesi

Arka arkaya tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleri ile DNA parçaları üssel olarak artmaktadır. Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PZR döngüsü DNA molekülü

üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanmaktadır. PZR boyunca biriken ürünlerin boyu iki primerin boyu ve hedef DNA bölgeleri arasındaki mesafelerin toplamı kadardır. Çoğaltılan PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile görünür hâle getirilmektedir(Temizkan ve Arda 2005).

Agaroz jel elektroforezi, elektriksel güç uygulanarak DNA'nın katoddan anoda doğru göç etmesi ilkesine dayalı olan ve DNA'nın moleküler ağırlığının ve/veya saflığının belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir(Neumaier et al 1998).

4.2.6.2. RealTime (RT) PZR—(Gerçek Zamanlı PZR)

Farklı terminolojilerle adlandırılabilen (Floresan kantitatif PZR, Kantitatif-kinetik PCR, vb.) bu sistem genel olarak gerçek zamanlı-PZR olarak adlandırılır.

Reaksiyon sırasında oluşan ürünlerin devamlı ölçülmesi ile karakterize olduğu bildirilmektedir. Gerçek zamanlı PZR'de DNA, işaretli bir probun yardımıyla çoğaltılmaktadır. Bu yöntemde; her bir PZR döngüsünde oluşan floresans ısınımı aracılığı ile son ürün miktarı gerçek zamanlı olarak saptanabilmektedir. Cihaz boyayı ışık ile yaymakta ve optik sistem ile oluşan floresan miktarını okumaktadır. Gerçek zamanlı-PZR kapalı bir sistem içinde gerçekleştiğinden, bu yöntemde çok sayıdaki örneklerle son derece az kontaminasyon riskiyle güvenli çalışılabilmektedir(Martin, Nadkarni, Jacques and Hunter 2002, Temizkan ve Arda 2005).

PZR teknolojisinde yakın zamanda yaşanan belki de en önemli gelişme, tek bir kapalı sistemde floresan amplikon tespiti ile eşzamanlı yapılan hızlı döngülü nükleik asit amplifikasyonunun kullanılmasıdır (saatler ve günler süren geleneksel PZR'a göre bu PZR 30 dakikada yapılır), bu ayrıca gerçek zamanlı PZR olarak da bilinmektedir(Wolk 2001, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü 2003, Cockerill 2003).Gerçek zamanlı-PZR amplikonun çapraz kontaminasyon riskini en aza indirir ve çok esnek, hızlı ve duyarlı PZR platformlarıdır.

Gerçek zamanlı-PZR protokolleri, daha özgül hibridizasyon ve ürün sağlamak için spesifik internal floresan prob lar ile eriyen kıvrım belirleyicilerini (solüsyonda dizilerin yarısının ayrıldığı sekans bağımlı sıcaklık) eşleştirmektedir (Wolk 2001).Değişik internal prob biçimi mevcuttur; hibridizasyon problemleri, floresan rezonans enerji transfer (FRET) problemleri, Taqman (Applied Biosystems) kimya kullanan hidroliz problemleri ve moleküler işaret problemleri gibi (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü 2003; Wolk 2001).

Gerçek zamanlı PZR çok duyarlı nicel bir tespit ölçümü olarak uygulanabilir veya bir numunede patojene özgü nükleik asit miktarının tayininde kullanılabilir. Özellikle gerçek zamanlı nicel PZR ölçümleri, sıklıkla geleneksel PZR ölçümlerinden daha geniş lineer sınırlar sağlamaktadır (Wolk 2001). Artık birçok yüksek otomatize gerçek zamanlı-PZR araçları mevcuttur. Bu araçlar değişik dalga boylarında floresan yayımı belirleyecek optik sistemleri içermektedir ve PZR reaksiyonlarının hızını ve multiplex PZR becerisini artırma potansiyelleri vardır (Wolk 2001). Mevcut sistemler şunlardır: LightCycler malzemesi (Roche), ABI Prism (Applied Biosystems), SmartCycler malzemesi (Cepherid) ve iCycler instrument (Bio-Rad) (Wolk 2001, Cockerill 2003).

Nükleik asit çoğalmasıyla gerçek zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalinin ölçülmesiyle, kısa sürede kantitatif sonuç verebilen bir PZR yöntemidir. Ticari olarak geliştirilmiş üç tipi bulunmaktadır. Bunlar; LightCycler (Roche), TaqMan (PE Biosystem) ve iCycler (BIO-RAD)'dır.

LightCycler sisteminin uygulanmasında; yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (Syber green 1) kullanılarak, çoğalmaya bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarıyla ölçülmektedir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hâle gelmesiyle DNA'ya bağlanan Syber green 1 miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir (Heid, Stevens, Livak and Williams 1996, Kubista et al 2006).

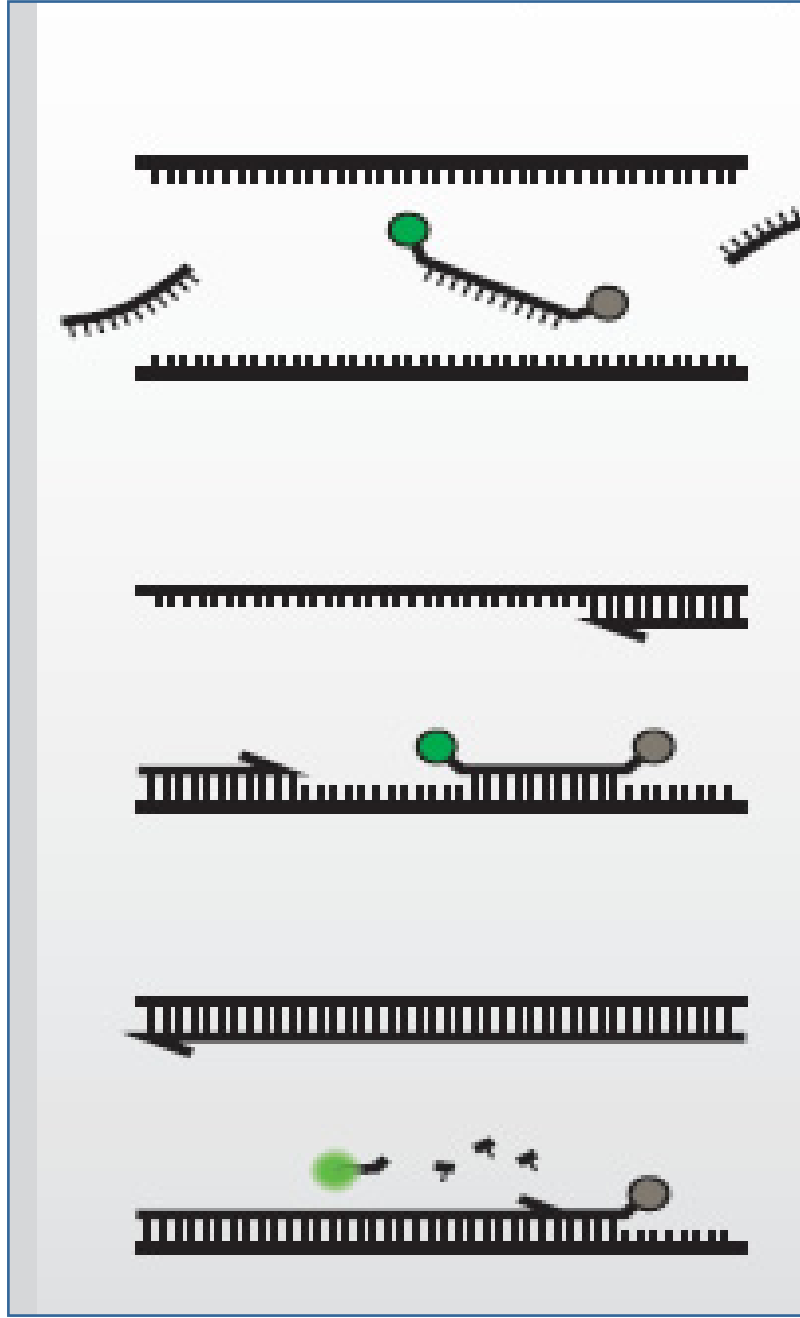
Bu uygulamada, floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonu göstermemektedir. Çünkü çift sarmal DNA'ya entegre olan Syber green 1 ortamda hedef moleküller olmadığında primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimer) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin melting curve (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, kendine özgü melting temperature (T_m , çift sarmal DNA'nın % 50'sinin tek sarmal hale gelmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. PZR çoğalmasının ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca Syber green 1 boya serbest kalmakta ve floresans miktarı azalmaktadır. Denatürasyon olduğunda floresans sinyal aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak amplikonun T_m derecesi saptanabilmektedir. İncelenen örneğe ait T_m derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün T_m derecesiyle karşılaştırılarak, PZR sonucunun doğru veya hatalı olduğuna karar verilmektedir.

LightCycler'in diğer bir uygulama şekli; hedefe özgül problemler kullanmaktır. Burada problemlerle testin özgüllüğü arttırılmaktadır. Problemlerden biri 3' ucundan floresans boyayla işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boyayla (acceptor boya) işaretlenmiştir. Problemler, hedef amplikonlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotid uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci problem üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine, diğer bir ifadeyle PZR siklusu süresince oluşan amplikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır (Livak ve ark. 1995).

TaqMan sisteminde, 5' ve 3' uçlarından florokrom (floresans veren) maddelerle işaretli problem kullanılmaktadır. Problemün 5' ucunda raportör florokrom (6-carboxyfluorescein = 6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı (quencher) florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine = TAMRA) bulunmaktadır. Problem, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında

kalan yere bağlanmaktadır. Probla hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturmaya, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusa üretilen ampikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır(Livak ve ark. 1995) (Şekil 2).

Gerçek zamanlı-PZR, kısa sürede kantitatif sonuç verebilmektedir. Tüpler açılmadan tanıya gidildiği için kontaminasyon riski düşüktür. Elektroforeze gerek kalmadan çoğalma esnasında sonuç alınabilmektedir. Ayrıca floresan veren problemler kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilmektedir (Morris et al 1996).



Şekil 2: TaqMan sistemi

4.2.6.3 DNA dizi analizleri

Bu yöntem enzimatik DNA sentezine dayanır ve günümüzün en yaygın kullanılan DNA dizi analizi tekniğidir. Bu yöntemde dizisi saptanacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılmaktadır. DNA sentezini

sağlamak için Klenov, Taq DNA polimeraz, ters transkriptaz ya da sekuenaz enzimlerinden birisi kullanılabilir. Yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP'lerin (deoksiribonükleozit trifosfat) yanısıra deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan dNTP'leri de (dideoksiribonükleozit trifosfat) substrat olarak kullanabilmesine dayanmaktadır. Sentezlenen DNA'ya bir dNTP'nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurmaktadır. Dizi analizi yapılırken dört ayrı reaksiyon karışımı hazırlanmaktadır. Her bir karışım kalıp DNA zinciri, bir primer, dNTP'lerin dördü ve az miktarda dNTP'lerden birini içermektedir. Özgül zincir sonlanması için her bir reaksiyonda farklı bir dNTP bulunmaktadır.

Reaksiyonların her birinde çok az miktarda modifiye nükleotid kullanıldığı için yeni zincir sentezi rastgele sonlanarak bir dizi DNA fragmenti meydana gelmektedir (Klug and Cummings 2000). Reaksiyonlar sonucu elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanarak jel üzerinde yanyana yürütülmektedir. Uygulanan elektriksel alanın etkisi ile DNA parçacıkları en kısıf en önde olmak üzere jel üzerinde bir merdiven görüntüsü oluşturmaktadır. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde, tespit edilen parçacıklarreaksiyonkarışımınakonulandNTP'nin tipine göre okunmaktadır (Klug and Cummings 2000).

İnsan Genom Projesi gibi büyük projeler çok sayıda DNA dizi analizi yapılmasını gerektirmektedir. Artan analiz sayısı,uzunzaman ve yüksek iş gücü gerektirir. Bu gelişmeler sonucunda otomasyon kaçınılmaz olmuştur. Otomatik DNA dizi analizleri zaman kazancı yanında, standart çalışma koşulları ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde de yarar sağlamıştır. Otomatik analizde de Sanger'in enzimatikDNAsentezinedayanan zincirsonlanmayöntemikullanılmıştır.

Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA'nın bulunduğu jelmatriks bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga

boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilmektedir. Kaydedilen veriler, bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1.000 bazakadargüvenliokumayapılabilmektedir (Sambrook et al 1989).

4.2.6.4 Kesim Parça Uzunluğu Polimorfizmleri—Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)

Pek çok TNP'nin tespiti DNA dizi analizi gerektirirken, bir enzimin kesme bölgesine rastlayan polimorfizmler “Southern Blot” yöntemi kullanılarak incelenebilir. Bu yöntemde enzimin tanıma bölgesine uyan allel enzim tarafından parçalanmakta, diğer allel ise bütün olarak kalmaktadır. Kesilme işlemi tamamlandıktan sonra örnekler jel elektroforezi ile yürütülmekte ve oluşan görüntülerincelenerekgenotiplerbelirlenmektedir (Hartl and Jones 2000).

4.2.6.5.Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmleri (SSCP)

Bu yöntemde PZR ürünleri denatüre edilir ve denatüre edici olmayan poliakrilamid jel elektroforezine uygulanmaktadır. Bu durumda DNA'nın tek zinciri nükleotid içerisine bağlı olarak sulu ortamda yeni bir konformasyona sahip olacaktır. Bu konformasyon, esas olarak zincir içi baz çiftleşmelerine bağlı olarak oluşan ikincil yapıdır. Teorik olarak, dizideki herhangi bir baz değişikliği bu konformasyonda değişikliğe neden olabilecektir. Çoğu konformasyonlar, mutant dizi aynı yüke sahip olsa bile fiziksel şekil veya büyüklüğü yeterince değiştirirler ve akrilamid gibi bir matriks ile yapılan elektroforezde hareket farklılığına neden olurlar. Elektroforezdeki farklı hareket, tek zincirli DNA parçalarının ikincil yapılarında değişik şekillerin oluşumuna bağlıdır. Optimal bir SSCP stratejisi belirlemek için beş önemli parametrenin düzenlenmesi gereklidir: Bunlar, analiz edilecek DNA parçasının uzunluğu, elektroforez sırasında tercih edilen sıcaklık,

PZR denatürasyon yöntemi, jelin özellikleri (jel matriksi, iyon konsantrasyonu, denatüran ajan varlığı) ile mutasyonun tipi ve bulunduğu yerdir (Orita, Suzuki, Sekiya and Hayashi 1989)

4.2.6.6. Allel Spesifik Oligonükleotidler (ASO)

Değişen baz ve mutasyon bölgesini çevreleyen nükleotid sırası biliniyor ise kalıtsal bozukluk ASO hibridizasyon problemleri kullanılarak saptanabilmektedir (Arda 1995). Restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgelerini değiştirmeyen baz değişimleri, 1 ila 4 baz çifti uzunluğundaki kopmalar veya eklemeler, özel ASO ile belirlenebilir (Wood and Langlois 1991).

4.2.7. Genetik analiz metodları

Genetikçiler bir hastalığın genetik temellerini tespit etmek için pek çok teknik kullanmaktadırlar. Bu metodlardan bazıları genel metodlar olmalarına karşın, bazıları da hastalığa etki eden unsurları çok hassas bir şekilde saptayabilmektedir. Bu metodlardan bazıları aşağıda anlatılmaktadır (Kinane and Hart 2003).

4.2.7.1. Bakteri genetiği çalışmaları

Diş çürüklerine neden olabilecek genetik faktörler üzerindeki araştırmalar genellikle karyojenik bakterilerin genetik yapıları üzerine olmuştur (Russel 1994). Karyojenik bakterilerin genetik yapılarının deşifre edilmesi ile bakterilerin diş çürüklerine neden olan metabolizmaları aydınlanacak, yeni ve etkin tedavilerin uygulanması sağlanacaktır. Konak organizmanın immün sisteminin veya dişin mine-dentin yapılarının oluşumundan sorumlu genler ile diş çürükleri arasındaki ilişkiye dayalı çalışmalar yapılmış ancak çelişkili sonuçlara ulaşılmıştır (Wang et al 2010, Schuler 2001).

Russell (1994), çürüğü oluşturan bakterilerin moleküler genetik yapısının açığa çıkmasının çürüğün önlemesine katkısı olacağı ve bakteri popülasyonundaki genetik farklılıkların moleküler temelinin bilinmesi gerektiği vurgulanmış ve insandan insana yayılırken bazı kişilerde hastalık oluşturabilmelerinin sebebinin moleküler biyoloji, bakteriyel fizyoloji, karbonhidrat kimyası gibi pek çok alanda araştırılması gerektiği bildirilmiştir. Ayrıca bakteriler tarafından çürütülen konağın, genetik yapısı ve çevresel özelliklerinin belirlenmesinin de gerekli olduğu belirtilmiştir.

4.2.7.2.Hayvan modellerinde deneysel çalışmalar

Çürük oluşumuna katkıda bulunan genlerin belirlenmesine yönelik ilk çalışmalar deneysel çalışmalardır. Pek çok faktör ile oluşan hastalık üzerindeki bir faktörün etkisinin belirlenebilmesi için deneysel şartlarda üremesi için kolayca kontrol edilebilen hayvan çalışmaları yapılmaktadır. Deneysel olarak çalışılabilecek hayvan modellerinin genetik yapılarının bilinmesinin önemli olduğu bildirilmektedir. Bu konuda henüz yeterli bilginin olmadığı fakat sıçanlar hakkındaki genetik bilginin diğer deneysel hayvan modellerinden daha fazla olduğu için çürük çalışmalarda yaygın sıçanların kullanıldığı bildirilmektedir. Eğer çürük lezyonları sıçanlarda deneysel olarak oluşturulabilirse çürük mekanizmasındaki genetik katkının daha anlaşılır olabileceği belirtilmektedir (Sofaer 1993, Mandel 1994)

Sıçanlarda bu konuda oldukça önemli çalışmalar yapan gruptan biri olan Hunt, Hoppert ve Erwin (1944), çürüğe hassas kabul edilen soyda 25 jenerasyonda 35. günde ilk çürük lezyonlarına rastlanırken, dirençli kabul edilen soyda 17 jenerasyonda 505. günde ilk çürük lezyonu gördüklerini bildirmişlerdir. Bu sonuç, yazarlarca seçilmemiş anne baba stokundan elde edilen yavrularda çürük aktivitesine genetik katkının %50 olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Aynı grubun daha sonraki çalışmalarında, yüksek sukroz içeren diyetile

beslenen sıçanlarda yüzey lezyonlarının çürüğe yatkın grupta dirençli guruptan daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu da beslenmenin çürük oluşumuna katkıda bulunmasına rağmen genetik yapının çürük oluşumuna yatkın olmasının önemli olduğunu vurgulamaktadır. Sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada, çürüğe yatkınlıkta soy farklılıkları incelenmiş ve kontrollü çevre şartlarında deneysel çürüğe yatkınlıkta konak sıçanlarda genetik katkı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu konuda yapılan ön çalışmada çürük skoru üzerine genetik etkinin katkısının kontrol altındaki çevresel etkilerin katkılarında daha fazla olduğu belirlenmiştir. Devam eden çalışmada ise, bir soy çürüğe hassas iken iki soy orta derecede hassas, bir soyun ise çürüğe dirençli olduğu görülmüştür. Bu durum sıçanlarda çürük prevalansında genetik faktörlerin önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (Kanamoto, Nonaka and Nakata 1994).

4.2.7.3. Ailesel agregasyon

Bir hastalığın ailesel geçiş göstermesi bu hastalığın genetik bir etiyolojisi olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte aileler ortak bir çevresel ortamı paylaştıkları için beslenme, sigara kullanımı, kirlilik gibi bir çok ortak çevresel faktör taşımaktadırlar. Bundan dolayı “ailesel agregasyon”lar ortak genetik, çevresel ve sosyo-ekonomik faktörlerin bir birleşimi olabilir. “Ailesel agregasyon”larda genetik faktörlerin incelenmesinde çok dikkatli olunmalıdır (Shapiro, Scklesinger and Bimstein 1997).

Bu alanda yapılan ilk çalışmalar 1930'larda çürük indekslerine bakılmak suretiyle yapılmıştır. Bu çalışmalarda yaklaşık 4500 çocukta tarama yapılması ve çürüğe yatkın çocukların kardeşlerindeki çürük görülme sıklığının çürüğe dayanıklı çocukların kardeşlerinininkinden iki kat daha fazla olduğunu bulmuşlardır.

Aynı zamanda yapılan bir başka çalışmada, içme suyu doğal olarak fluoriçeren bir bölge seçilmiş, çürüğe yatkın ve dirençli anne babaların 205 çocuğundaki çürük seviyeleri anne babalarındaki çürük seviyelerinin modeli

olmuştur. Bu çalışma, sadece çürüklerde genetik komponentin önemini destekleyici olmakla kalmamış florür içeriği zengin sulardan kaynaklanan mine değişikliklerinin genetik faktörümaskelemeyeyeterli olmadığını göstermiştir(Mandel 1994).

Granath Kinnby ve ark. (1995) yaptıkları çalışmada ise, 4 yaşında 177 çocuk üzerinde aynı sosyal faktörün etkileri incelenmiş ve sonuç olarak anne yaşı, genetik faktörler ve çocuğun yaşının istatistiksel olarak önemli olduğu bildirilmiştir.

Segura ve Jimenez-Rubio' nun (1999) yaptıkları çalışmada, bir ailenin iki üyesinde çürük oluşumu ve okluzal düzensizlik gibi klinik sorunlara neden olan talon tüberkülü vakasına rastlanmıştır. Aynı ailenin iki üyesinde dişsel anomali varlığı genetik miras olarak değerlendirilmiş ve ailesel izlem sonucu talon tüberkülünün erken teşhisiyle okluzaldüzensizliklerin ve çürüğün önlenebileceği ileri sürülmüştür.

4.2.7.4. İkiz çalışmaları

Tek yumurta ikizleri birbirleriyle aynı genetik yapıyı taşımaktadırlar. Bu nedenle ikizler bir genetik hastalığın çevresel faktörlerden ne kadar etkilendiğini araştırmak için mükemmel bir olanak sunmaktadırlar. Çift yumurta ikizleri ise birbirlerine ancak kardeşler kadar benzemektedirler ve genetik olarak birbirlerine yaklaşık %50 benzerlik göstermektedirler. Tek yumurta ikizlerinde görülen hastalıklardaki farklılıklar, tamamen çevresel faktörlerden kaynaklanırken çift yumurta ikizleri arasındaki hastalık farklılıkları çevresel ve genetik farklılıkların bir bileşiminden kaynaklanmaktadır. İkiz çalışmalarından elde edilen sonuçlar, bir fenotipe genotipin ne oranda etki ettiğini hesaplamakta kullanılabilmektedir. “Konkordans oranları”nın tespiti ikiz çalışmalarının temel ögesidir. Eğer ikizlerin ikisi de hastalıktan aynı şekilde etkilenmişse konkordans %100'dür (Kornman and Newman 2000).

Ailesel çalışmalar genetik katkının doğrudan ilişkili olduğu ikiz çalışmaları ile desteklenmiştir. İnsanların davranışsal ve fiziksel gelişiminin belirlenmesinde ikizlerin rolunu ilk kez 1875'te Goltan tarif etmiştir. Tek yumurta ve çift yumurta ikizlerinin karşılaştırılmaları pek çok yönden faydalı olmuştur. Çeşitli klinik ve analitik yöntemlerin kullandığı pek çok ikiz çalışması bildirilmiştir. Bunlarda tek yumurta ikizlerinin çift yumurta ikizlerinden daha fazla benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Mandel 1994, Fairpo 1979). Özellikle alt ön diş çürüklerinde ve aproksimal lezyonlarda tek yumurta ikizlerinin daha çok benzeştiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda genetik olarak farklı bireylerde sistematik çevrenin etkisinin de farklı algılandığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, ayrı çevrelerde yaşayan tek ve çift yumurta ikizleri karşılaştırıldığında tek yumurta ikizlerinin büyük oranda benzerlik göstermesinin ilk bulguları desteklediği belirlenmiştir (Hauwink, Backer Dirks and Kwant 1974, Boraas, Messer and Till 1988).

4.2.7.5. Segregasyon analizleri

Genler ebeveynlerden çocuklarına tahmin edilebilir bir şekilde geçmekte ve aile içinde de Mendel kanunlarına göre tahmin edilebilen şekilde dağılmaktadır. Genetikçiler genetik özelliklerin aileler içindeki geçişlerini segregasyon analizi ismi verilen bir yöntem ile tespit etmektedirler. Segregasyon analizi ile genlerin aile içindeki farklı geçiş türleri değerlendirilebilmektedir ve geçişin Mendel kurallarına göre mi yoksa farklı bir tarzda mı gerçekleştiği tespit edilmektedir. Genler, otozomal, X'e bağlı, "çekinik", "baskın", "karmaşık", "multi-lokus" veya "rastgele" çevresel bir modele göre geçiş gösterebilir. Genin "penetransı", "fenotip oranı", hastalığın sıklığını, hastalık oluşturmamayan "allel"ler bu modelde incelenebilmektedir. Segregasyon analizlerinin her zaman gerçek modeli yansıtamayacağı bilinmelidir. Bunlar, iki modelin karşılaştırılması türünde oldukları için test edilen modele benzerliği ölçüsünde başarılı sayılacaklardır. Eğer değerlendirilen modele göre önemli farklılıklar içeriyorsa sonuçlara şüphe ile

yaklaşılmalıdır. Segregasyon analizlerinde amaç, bir hastalıktan sorumlu olan geni bulmak değildir. Avustralya’da yaşayan ve amelogenezis imperfekta ve taurodontizmin birlikte görüldüğü bir ailenin beş kuşaktan toplam yetmiş bireyinin incelendiği bir çalışmada hastalığın otozomal dominant bir kalıtım gösterdiği bildirilmiştir (Aldred, Savarirayan, Lamande ve Crawford 2002).

4.2.7.6. Bağlantı analizleri ve ilişki çalışmaları

Bağlantı analizlerinin amacı bir hastalıktan sorumlu olduğu bilinen bir genin kromozom üzerindeki yerini tespit etmektir. Genetik bağlantı analizlerinde birbirlerine yakın olan gen lokuslarının birlikte geçmesi prensibi dikkate alınır. Bu tür kromozom üzerinde birbirine yakın olan genler genellikle beraber geçiş gösterir ve Mendel’in geçiş kurallarını ihlal ederler. Bu tür genlere, birbirine bağlı genler denir. Genetikçiler, birbiriyle birlikte geçiş gösteren genleri nicel “kantitatif” yöntemlerle tespit edip bunların kromozomlar üzerinde hangi bölgede bulunduklarını tespit edebilmektedirler (Dowsett et al 2002).

Son 20 yıl içinde insan genomunda milyonlarca genetik polimorfizmin kromozomları üzerindeki haritası çıkarılmıştır. Bilim adamları, ilgilendikleri bir ailede genetik özelliğinin aile içinden nasıl geçiş gösterdiğini segregasyon analizi ile inceleyebilmekte, eğer bu özellik bilinen bir polimorfizmle birlikte geçiş gösteriyorsa bunun kromozom haritasındaki yerini tespit edebilmektedirler. Böylece belirli bir genetik özelliğin bilinen bir belirteç “marker” ile birlikte geçiş gösterip göstermediği tespit edilebilmektedir. Eğer özellik belirteç ile birlikte geçiş gösteriyorsa belirtecin kromozomdaki yerinin yakınlarındaki ilgili özelliğin geni araştırılmaktadır. Eğer bir bağlantı tespit edilebilmişse bu hastalığın genetik kökenlerinin olduğunu gösterir ve daha sonra yapılacak olan ayrıntılı çalışmalarla ilgili gendeki farklılıklar tespit edilebilmektedir (Dowsett et al 2002).

Bağlantı çalışmaları, genellikle Mendel hastalıklarının tespitinde faydalı olmaktadır. Ancak kompleks hastalıklar pek çok genin küçük katkılarıyla oluştukları için bağlantı analizleriyle bir sonuç alınması zordur. Buna karşın kompleks hastalıkları çözümlenmesi için analiz yöntemleri geliştirilmektedir (Dowsett et al 2002).

Spesifik bir genetik modele uymayan hastalıkların etiyolojileri “multifaktöriyel” olarak tanımlanmaktadır. Bu tanım genetik yapıda çeşitli farklılıkların birlikte etki ettiği ve çeşitli çevresel faktörlerin katkısıyla hastalığın meydana geldiği durumları tanımlamaktadır. “Obezite”, “dudak damak yarıkları” gibi kompleks genetik hastalıklarda bağlantı çalışmaları ya negatif cevaplar vermekte ya da tekrarlanamayan zayıf pozitif bulgular elde edilmektedir. Bunun birinci sebebi eğer bir gen hastalığa direkt olarak yol açmıyor veya bulunması hastalık için gerekli ve yeterli değilse “modifiye edici gen” olarak tanımlanan başlangıçta da sıfır olmayan hastalık riskini bulunması durumunda artırıyorsa bunun klasik parametrik bağlantı analizleri ile tespiti mümkün olmamaktadır (Kornman and Newman 2000).

İkincil olarak, eğer bir genin hastalığa katkısı çok büyük değilse örneğin hastalık riskini iki kattan daha az artırıyorsa bağlantı analiz yöntemi bu geni tespit etmek için yeterince güçlü değildir. Bunlardan dolayı periodontitis gibi tek bir genin katkısının zayıf olduğu etiyolojisinde birçok etkenin yer aldığı “multifaktöriyel” hastalıkların değerlendirilmesinde zayıf ilişkileri de tespit edebildiği için ilişki araştırmaları daha faydalı olmaktadır (Kornman and Newman 2000).

Genetik araştırmalarda toplumsal veya aile tabanlı çalışmalar olmak üzere iki tür ilişki araştırması yapılabilmektedir. Toplumsal çalışmalarda klasik olarak olgu-kontrol tarzı kullanılmakta ve belirteç “allel” görülme sıklıkları olgular ve kontroller arasında karşılaştırılmaktadır. Doğrusal ilişki bulunduğu takdirde aşağıdaki yorumları yapmak mümkündür, 1) Bu “allel” kendi başına hastalık için “predispozan” bir “allel”dir. 2) Bu allel hastalıkla gerçekten ilişkili olan başka bir genle yakın bir lokusta bulunmaktadır. 3) Bu ilişki, toplumsal bir sınıflanmadan

kaynaklanmaktadır. 4) Bu ilişki bir örnekleme veya istatistik hatasıdır. İlk iki yorum, gen haritası yöntemine bir alternatif sunmaktadır. İlk durumda belirtecin kendisi hastalık için etkili bir lokustur ve birincil önemdedir. Bu aşamadan sonra bu varyasyonun yol açtığı fonksiyonel rolün aydınlatılması için çalışmalar yapılabilir. İkinci durumda ise belirtecin kendisi hastalık ile ilişkili olmasa bile fiziksel olarak hastalık ile ilişkili gene yakın bir bölgede bulunmaktadır. Bu bilgiler kullanılarak ilgili gene ulaşılmaya çalışılmaktadır (Kornman and Newman 2000).

Çürük hastalığının genetik idaresinin çok genli doğası 1970'lerden beri tartışılmaktadır. Muhlemann(1972) göre, bir gen takımının mine direncini, diğerinin tükürük içeriğini ve enfeksiyona konak direncini etkilemektedir. Yine de ancak yakın zamanda, diş çürüğüyle ilgili genomik bölgeleri ve polimorfizmleri saptamak için bağlantı ve beraberlik (association) çalışmaları yapılmaya başlandı.

Diş çürümesiyle ilgili ilk bağlantı araştırması 2008'de gerçekleştirildi. Diş çürüğüne yol açma ihtimali olan genom bölgelerini saptamak için genom çapında (392 marker) bir tarama yapıldı. Çalışmanın nüfusu Filipinler'de aynı bölgede yaşayan 46 aileden (624 kişi) oluşuyordu. Beş muhtemel lokus tespit edildi: Üçü düşük çürük yatkınlığı (5q13.3, 14q11.2 ve Xq27.1) ve ikisi yüksek çürük yatkınlığı için (13q31.1 ve 14q24.3) (Vieira et al 2008). Yazarlar 13q31.1, 14q24.3 ve 14q11.2 bölgelerinde tükürük akışını ve beslenme tercihlerini kontrol eden genlerin varlığını vurgulamışlardır. Yazarlar detaylarının raporda bulunmadığı, bir CSA'dan parametreler kullanarak parametrik bağlantı analizi uygulamışlardır.

Her ne kadar genetik polimorfizmler ile diş çürükleriyle ilişkili çalışmalarda hayvan modelleri kullanılarak 1980'ler sırasında başlarken, sadece 2005'de insan üzerinde yapılan ilk çalışmalar yayınlanmıştır.

4.2.8. Diş çürüğü oluşumunda genetiğin rolü

Diş çürüklerine neden olabilecek genetik faktörler üzerindeki araştırmalar genellikle karyojenik bakterilerin genetik yapıları üzerine olmuştur (Russel 1994). Karyojenik bakterilerin genetik yapılarının deşifre edilmesi ile bakterilerin diş çürüklerine neden olan metabolizmaları aydınlanacak, yeni ve etkin tedavilerin uygulanması sağlanacaktır. Konak organizmanın immün sisteminin veya dişin mine-dentin yapılarının oluşumundan sorumlu genler ile diş çürükleri arasındaki ilişkiye dayalı çalışmalar yapılmış ancak çelişkili sonuçlara ulaşılmıştır (Wang et al 2010, Schuler 2001).

Diş çürükleri enfeksiyöz bir hastalık olarak görülmekle birlikte, bireylerde diş çürüklerine yatkınlığa neden olduğu düşünülen bazı genetik faktörlerin varlığı ve diş çürüklerine neden olan mikroorganizmaların da birtakım genetik belirteçlere sahip olduğudüşünülmektedir. Monozigotik ve dizigotik ikizleri de kapsayan genişpopülasyon çalışmaları ile diş çürüklerinin genetik temelleri araştırılmıştır. İnsan Genom Projesi'nin sonuçlarının oral biyoloji ve tıp için kullanılmaya başlamasıyla birlikte birçok araştırmacı diş çürüklerinin oluşumunda önemli rollere sahip muhtemel genleri ve bu proteinleri araştırmıştır. Bazı araştırmacıların, küçük gruplarhâlinde, belirli polimorfizmlerle diş çürükleri arasında ilişki kurmasına rağmen, güncel olarak diş çürüklerine yüksek yatkınlık oluşturan ya da diş çürüklerinden korunmayı sağlayan moleküler belirteçler günümüze kadar tanımlanamamıştır(Ulucan, Paul ve Akcay 2010)

4.2.8.1.Diş çürüğü oluşumunda gen polimorfizmleri

Gen polimorfizmleri (tek nükleotid polimorfizmler), genomik DNA'nın bir popülasyonun normal bireyleri arasında farklılık gösterdiği tek baz-çiftli değişikliklerdir. Gen polimorfizmleri popülasyonda yaygın görülür, etnik ve coğrafi farklılıklar gösterirler. Bazı durumda genin kodladığı proteinin fonksiyonu

ya da enzim aktivitesi bu değişikliklerden önemli ölçüde etkilenebilir. Hücre metabolizması için önem taşıyan proteinlerin fonksiyonlarının bozulması çeşitli hastalıklara (diş çürüğü) veya bazı hastalıklar için riski artırmaktadır.

Mine gelişimi ve mineralizasyonla ilişkili genler: Amelogenin (AMELX), ameloblastin (AMBN), tuftelin (TUFT1), enamelin (ENAM), tuftelin-interacting protein (TFIP11) ve kallikrein 4 (KLK4) araştırılmıştır (Slayton, Cooper and Marazita 2005). Bu gönüllü genlerin markerları, 3-5 yaş arası çocuklarda vaka-kontrol dizaynı kullanılarak ilişkileri açısından test edilmiştir. Çürük varlığı ile araştırılan bağımsız genler arasında ilişki olduğuna dair kanıt bulunamamıştır. Fakat çok değişkenli analizler uygulandığı zaman, yüksek seviyede S. mutans ile TUFT1 geninin etkisi, diş çürüğü duyarlılığını arttırmıştır (Slayton et al 2005). Başka bir çalışmada ise AMELX, AMBN, TUFT1, ENAM ve TFIP11 genleri ile Guatemalan toplumundaki çürük ilişkisi araştırılmıştır. AMELX marker'larından biri ile yüksek DMFT (DMFT>20) arasında ilişki olduğuna dair güçlü kanıt vardır (P = 0.0000001) (Deeley et al 2008).

Mine yapısının oluşumundan sorumlu genlerden biri Xp22.31'de yer alan amelogenin (AMELX) genidir. Genin ürünü olan protein mine matriksinin %90'ını oluşturmaktadır. AMELX geni ile diş çürüğü oluşumu arasındaki ilişki yapılan çalışmalarla ortaya konmuş, ameloblastin geninin 'C' Allelinin çürük oluşumu ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir (Deeley et al 2008, Patır et al 2008). Başka bir çalışmada ise 12 yaşın üzerinde 120 çocuktan DNA örnekleri kullanılmıştır. Saç örneklerinden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra AMELX için TNP'ler genotiplenmiştir. AMELX geninde 3 TNP bölgesi (rs17878486, rs5933871, rs5934997, intron) direkt sekanslama yöntemiyle teşhis edilmiştir. rs5933871 ve rs5934997 TNP bölgeleri ile çürük duyarlılığı olan grup arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Kore popülasyonunda AMELX genindeki TNP'ler ile çürüğe yatkınlık arasında ilişki olabileceği düşünülmektedir.

D vitamini kemik ve diş gelişiminde rolü olan önemli bir vitamindir ve biyolojik aktivitesini hücre içerisinde bulunan reseptörüne bağlanarak gösterir

(Zhang, Beck, Rahemtulla and Thomas 2009).

Sengün ve ark.(2003) kemik ve dişlerin gelişiminde önemli rol oynayan D vitamin reseptörünün çürük oluşumu ile ilişkisini araştırmıştır. D vitamin reseptör genindeki BsmI ve ApaI polimorfizmleri ile bireylerde diş çürüklerine yatkınlık arasında bir ilişki bulunamamış ancak bu gen üzerindeki diğer polimorfizmlerin bireylerde çürük oluşumunda yatkınlığa neden olabileceği bildirilmiştir.

Beslenme alışkanlıkları ve tat alma reseptör polimorfizmleri son yıllarda sıkça çalışılan konulardan biridir. Oldukça yeni olan bu konu ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamakla beraber, bazı tek nükleotid polimorfizmlerinin diş çürümeye yatkınlık sağladığı belirtilmiştir. Yapılan araştırmada tat genleri olan TAS2R38, TAS1R2 ve GNAT3 genleri ile diş çürükleri arasındaki ilişkiye bakılmış TAS2R38, TAS1R2 ile diş çürüğü arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Wendell et al 2010).

Tükürük protein olan laktotransferrin antibakteriyel aktivite göstermektedir. Fakat laktotransferrin geni promotor bölgesindeki polimorfizmler ile çürük arasındaki ilişkiye bakan az çalışma vardır. Çalışmada, 12 yaşındaki çocukların diş çürükleri ile tespit edilen polimorfizmler arasındaki ilişki araştırılmıştır. 678 çocuktan seçilen 50 çocuk, çürük deneyimlerine göre (DMFT=0) olan 25 kişi ve (DMFT≥4) olan 25 kişi olarak iki gruba ayrılmıştır. Seçilen 50 bireyin, laktotransferrin geni olası promotor bölgesi (+39-1143) yüksek çözünürlüklü eritme tekniği ile analiz edilmiştir. Laktotransferrin genindeki olası promotor bölgesinde polimorfizm tespit edilmemiştir. Buna bağlı olarak diş çürükleriyle ilişki bulunamamıştır (Brancher et al 2011).

Başka bir çalışmada ise laktotransferrin gen polimorfizmi ile diş çürüğü arasındaki bağlantı incelenmiştir. Allel 1'e sahip laktotransferrin polimorfizminin, düşük DMFT değeri ile aralarında ilişki olduğunu ortaya çıkarmış, çürük oluşumuna karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir (Azavedo et al 2010).

Tükürük bileşenleri ile çürük oluşumunun ilişkisini araştırmaya yönelik bir

başka çalışma da MUC7 proteinini kodlayan MUC7 genidir. MUC7 proteininin en önemli görevi oral dokuların bakterilerden temizlenmesidir. Öztürk ve ark.'nın (2009) yaptığı çalışmada çürük oluşumu ile MUC7 geni arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Pol'un (2011) yaptığı çalışmada ise düşük molekül ağırlıklı müsin MG2 kodlayan MUC7 gen polimorfizmi ile çürüğe yatkınlık arasında ilişkiye bakmıştır. 158 kişiden alınan DNA örneklerinden, PCR-RLFP yöntemi kullanılarak MUC7 genotipleri tespit edilmiştir. İstatiksel analizlere göre MUC7*6/*6 genotipinin diş çürüğü olasılığını arttırdığı görülmüştür. Aynı zamanda ağız hijyeni ile MUC7*6/*6 genotipi arasında pozitif korelasyon olduğu bulunmuştur.

Bir grup tükürük proteini, içerdikleri yüksek oranda asit olan prolin sebebiyle prolinden zengin proteinler (PRP) olarak adlandırılırlar. Bunlar pelikül oluşumuyla ilişkilidirler. Bu proteinler, mine matriksinin birleşimi ve yapısına oldukça benzerlik gösterirler ve hidroksiapatit kristallerine sıkça bağlanırlar. En az 8 farklı polimorfik PRP bilinmekte ve bu genler tarafından kodlanıp tükürük proteinkompleksi olarak adlandırılırlar. Yu ve ark.'na göre (1986) , 2 spesifik PRP fenotipi (Pa+ ve Pr22) ile 5-15 yaş arası çocukların sürekli dişlerindeki çürük skorundaki artış arasında bir ilişki olduğunu rapor etmişlerdir. Bunun sonucunda Pa+ ve Pr22 genotipli bireylerin çürüğe eğilim riskinin arttığı gözlemlenirken; allelik genler olarak adlandırılan Pa- ve Pr11 genlerinin çürügedirençsağladığı tespit edilmiştir.

Wang ve ark. (2012), dentin ekstrasellüler matriksinde yer alan DSPP (dentin sialophosphoprotein), mine oluşumunda görev alan KLK4 (kallikrein 4) ve farklı bir tükürük proteini olan AQP5 (Aquaporin-5) gen polimorfizmlerinin diş çürüklerine karşı koruyucu etkisi olduğunu saptamıştır. Aynı zamanda mine oluşumundan sorumlu olan MMP20 gen polimorfizmi ile çürük arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

MBL2 C(-290)G ve G161A, MASP2 A359G, AMELX C287T ve C522T,

ENAM C2452T polimorfizmlerinin incelendiği başka bir çalışmada diş çürükleriyle arasında ilişki olup olmadığına bakılmıştır. Yanak mukozasından toplanıp izole edilen DNA örnekleri 5 ve 13 yaşlar olmak üzere iki gruba bağlı 84 çocuk düşük çürük deneyimli, 95 yüksek çürük deneyimli olacak şekilde ayrılmıştır. PZR-RFLP yöntemi kullanılarak genotipleme yapılmıştır. 5 yaş aralığındaki çocuklar arasında, yüksek çürük riski olanlarda MBL2 (-290) geni GAllelini taşıma yüzdesinin yüksek olduğu ortaya çıkmıştır (43.2%vs 17.6%, $P = 0.023$). MBL2 C(-290)G–G161A C–G haplotipi, düşük çürük deneyimi olan 5 yaşındaki çocuklar arasında daha fazla görülürken($p=0,01$), 13 yaşındaki çocuklar arasında C-G haplotipi yüksek çürük deneyimi olan çocuklarda daha fazla oranda görülmüştür($p=0,028$). 5 yaşındaki çocuklarda, MBL2 G-G haplotipi görülme sıklığı yüksek çürüklü grupta fazlayken ($p = 0.045$), 13 yaşındaki çocuklarda tersi görülmektedir($p = 0.057$). MASP2, AMELX ve ENAM polimorfizmleri ile diş çürükleri arasında ilişki olmadığı tespit edilmiştir. Polonyalı çocuklarda, MBL2 geni polimorfizmi ile diş çürükleri arasında ilişki bulunmuştur fakat ilişkinin yönü süt ve sürekli dişlerde farklıdır (Olszowski et al 2012).

Diş çürüklerini etkileyen genetik lokuslar ve aday genler için ilk genom taraması, 3-12 yaş aralığındaki Amerikalı çocuklara yapılmıştır. Tarama sonuçlarına göre anlamlı bir fark bulunamamıştır. Fakat biyolojik rolleri olduğu düşünülen bazı lokuslarda (ACTN2, MTR, and EDARADD, MPPED2, and LPO) bağlantıya dair bulgular bulunmuştur. Bu çalışma, diş çürüklerinin multifaktöriyel olduğunu güçlendirmiştir. Birçok lokusun diş çürüğü oluşumuna minimal etkileri olduğu ortaya çıkmıştır (Shaffer et al 2011).

Beta defensin 1 (DEFB1) geni ağız içinde yer almaktadır. DEFB1 geni, diş çürüğü ve periodontitisle ilişkili olup olmadığına bakılmıştır. Rs11362(G-20A) marker'ının DMFT ve DMFS skorunu arttırdığı görülmüştür. Ayrıca rs179946(G-52A) markerı da düşük DMFT skoru ile ilişkili bulunmuştur. DMFT skorunu arttıran yüksek çürük deneyimi haplotipi (GCA) bulunmuştur. Düşük çürük deneyimi haplotipi(ACG), DMFT skorunu düşürdüğü görülmüştür. DEFB1 polimorfizmleri çürükiçinpotansiyelmarkerlarolduğudüşünülmektedir (Ozturk,

Famili and Vieira 2010).

Guatemalalı çocuklar üzerinde yapılan bir araştırmada ise mine oluşumunda etkili olan ameloblastin, amelogenin, enamelin, tuftelin-1, tuftelin interacting protein-11 genlerindeki TNP markerlarına bakılmıştır. Amelogenin marker allelinin artan yaşa bağlı çürük deneyimiyle ilişkili olduğu bulunmuştur. Yüksek DMFT skorlarında bu ilişkinin arttığı gözlemlenmiştir (DMFT > or = 20; p = 0.0000001). Farklı çürük deneyimlerine sahip bireyler arasında karşılaştırma yaklaşımı genetik çalışmalarda çevresel faktörlerin potansiyel etkisini azaltmak için önemlidir (Dowsett et al 2002)

Başka bir çalışmada ise çocuklarda Mannose-binding lectin(MBL) gen polimorfizmleri ile diş çürükleri arasında ilişki olup olmadığını araştırmışlardır. 42 çürük deneyimi olan ve 40 çürüksüz çocukta toplanan kan örneklerinden DNA izole edilmiş PZR-RFLP yöntemi kullanılarak polimorfizm saptanmıştır. İki grupta genotiplerarasındakidağılımdabirfarkbulunmamıştır(Olszowski et al 2012).

Matriks metalloproteinazların (MMPs) ve doku inhibitörlerinin çürük oluşumuyla alakalı olduğu düşünülmektedir. Tannure ve ark. (2012) de yaptığı çalışmada MMP2 (rs243865), MMP9 (rs17576), MMP13 (rs2252070) ve TIMP2 (rs7501477) gen polimorfizmleri ile diş çürükleri arasındaki ilişkiye bakmışlardır. Gerçek zamanlı-PZR yöntemi kullanılarak polimorfizmler incelenmiştir. MMP2, MMP13 ve TIMP2 için Allel sıklıkları çürüklü ve çürüksüz bireylerde farklı bulunmuştur. MMP13 mutant Allel taşıyıcıları, çürük riskinin azaldığını göstermişlerdir (OR = 0.538, 95% CI 0.313-0.926). MMP9 polimorfizminde Allel ve genotip sıklıkları çürük ve çürüksüz bireylerde aynı olduğu görülmüştür. MMP13'deki genetik varyasyonlar çürük ve genç çevrele etkileşimlerin çürük duyarlılığını arttırabileceğini öne sürmüştür (Tannure et al 2012).

İki yaşındaki 15 çürüklü ve 15 çürüksüz çocuğun dental plağından streptokokkus mutans izole edilmiştir. İzole edilen S. mutans dan genomic DNA

çıkarılmıştır. DNA fragmanlarında yer alan srt A geni, PZR ile amplifiye edilmiştir. PZR ürünleri sekans ve analiz edilmiştir. İki grubun mutasyon oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. Sortase A geni polimorfizmleri ile erken çocukluk dönemi çürükleri arasında ilişki bulunamamıştır (Zhang, Zhou, Zhi, Tao and Lin 2012)

4.3.MMP20 (Matriks metalloproteinaz-20) geni:

MMP'ler diş morfogenezi esnasında hücre matriks etkileşiminin düzenlenmesi ve dokuların yeniden şekillenmesi işleminde rol alırlar. Dişi oluşturan hücreler tarafından neredeyse sadece MMP-20'nin (enamelisin) salgılandığı bilinmektedir. Mine matriksinin en büyük yapısal bileşeni amelogeninlerdir. Enamelisinin benzersiz yapısal ve enzimatik özellikleri, amelogeninin bozunmasını sağlayabilmesi ve mine gelişiminde önemli rol oynamasının esas sebebidir (Caterina et al 2002, Bartlett, Beniash, Lee and Smith 2004). Enamelisin doğal insan odontoblastları tarafından dentinal sıvı içine salgılanabilmektedir. Süt dişlenme dönemi sırasında üretilmeye başlanan ve dentinin yapısına katılan MMP-20 çürük gelişim süreci boyunca serbest kalmaktadır (Sulkala, Larmas, Sorsa, Salo and Tjaderhane 2002).

Mine formasyonu ile ilgili bir diğer bir enzim ise MMP-2'dir. MMP-2 diş gelişiminde önemli rol üstlenmektedir. MMP-2 amelogenini parçalayabilir. MMP-2 ve onun aktivatörü olan membrane tip-1 MMP (MT-1MMP); ameloblastlar, odontoblastlar ve pulpa tarafından üretilmektedir (Caron, Xue, Sun, Simmer and Barlett 2001)

MMP-20; uygun mine formasyonun oluşturulmasında MMP-2 'ye göre daha önemlidir. MMP-20 gen yıkımlı farelerle yapılan bir araştırma sonucunda amelogeninin düzgün işlenmediği ve buna bağlı olarak mine matriksinde değişimlerin olduğu görülmüştür. Sonuçta oluşturulan mine; normalden ince, prizmatik yapısı bozuk, tabakalar halinde dentinden uzaklaşan, pürüzsüz hipoplastik amelogenezis imperfektaya benzer yapıdadır (Caterina et al 2002).

MMP-20 gen yıkımlı farelerin minelerinin mineral içeriğinin; sağlıklı farelerdekinin yaklaşık olarak yarısı, mine sertliğinin ise 2\3 oranında olduğugörölmüştür (Bartlett et al 2004).

Dental florozis, ilk olarak Black ve McKay tarafından 1916'da ortaya konmuştur (Hannas et al 2007). Dişgelişimi sırasında yüksek oranda fluoramaruz kalma nedeniyle oluşan artmışpöröziteyle karakterize mine mineralizasyonundaki bir defekt olarak tanımlanmıştır (Fejervskov, Thylstrup and Larsen 1977). Mine oluşumu sırasında yüksek miktarda fluoramaruz kalma, proteinazlar tarafından hidrolize edilmesi gereken amelogeninin uzaklaştırılmasını geciktirmektedir. Protein hidrolizindeki bu gecikmenin sebebi; mine proteinlerinin bozunmasından sorumlu ekstrasellüler proteinazlardaki bir sorun olabileceği düşünülmektedir. Vücuda alınan fluorun mine matriksindeki proteinazların özellikle MMP-20'nin işlerliğiyle ilişkisi araştırılmış; yapılan in vivo çalışma sonucunda fluor alımının, yüksek miktarda aktif MMP-20 değişimiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Denbesten et al 2002). In vitro çalışmalarda; fluorun mikromolar konsantrasyonlarının metalloproteinaz aktivitesinde değişimlere yol açtığı, MMP-20 tarafından yapılan amelogenin hidrolizinde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Bu bulguların ışığında; fluorun MMP-20'nin salgılanması ve aktivitesi üzerine olan etkisinin; minedeki ya da diğer mineralize dokulardaki fluorozisin etiyolojisine dâhil olduğu düşünülebilmektedir.

Enamelisin (MMP20), salgılama safhası süresince ve erken olgunlaşma döneminde ameloblastlar tarafından sentezlenmektedir. MMP20'nin, salgılama safhasında, kristal uzamasını gerçekleştirdiği ve bu süreçte gerekli olduğu düşünülmektedir (Lu et al 2008).

Matriks metalloproteinazlar (MMP); yıkımdan sorumlu birçok ekstrasellüler matriks proteini ile organogenez, büyüme ve doku dönüşümü sırasında uyum içinde çalışan enzim grubudur. Matriks metalloproteinazları; matriksin ve ekstrasellüler matriksinhidrolizekomponentleriolarak dagösterilmektedir (Brinckerhoff and Matrisian 2002).

MMP'ler diş morfogenezi esnasında hücre matriks etkileşiminin düzenlenmesi ve dokuların yeniden şekillenmesi işleminde rol alırlar. Dişi oluşturan hücreler tarafından neredeyse sadece MMP-20'nin (enamelisin) salgılandığı bilinmektedir. Mine matriksinin en büyük yapısal bileşeni amelogeninlerdir. Enamelisinin benzersiz yapısal ve enzimatik özellikleri amelogeninin bozunmasını sağlayabilmesi ve mine gelişiminde önemli rol oynamasının esas sebebi olmaktadır(Caterina et al 2002, Bartlett 2004).

MMP-20, salgılama safhası süresince ve erken olgunlaşma safhasında ameloblastlar tarafından sentezlenmektedir. MMP20'nin, salgılama safhasında, kristal uzaması sırasında sentezlendiğı ve bu süreçte gerekli olduğı düşünölmektedir. MMP-20, mine proteinlerini yavaşça çözerek, mine kristallerinin kalınlığını ve genişliğini arttırmaktadır. Böylece mineralin protein ile yer değıştirmesi net bir şekilde görölmektedir (Hu, Chun, Hazzazzi and Simmer 2007)

MMP-20 (Enamelisin) doğıal insan odontoblastları tarafından dentinal sıvı içine salgılanabilmektedir. Süt dişlenme dönemi sırasında üreilmeye başlanan ve dentinin yapısına katılan MMP-20 çürük gelişim süreci boyunca serbest kalmaktadır (Sulkala, Larmas, Sorsa, Salo and Tjaşderhane 2002)

MMP-20 gen yıkımlı farelerle yapılan bir araştırma sonucunda amelogeninin düzgün işlenmediğı ve buna bağılı olarak mine matriksinde değışimlerin olduğı görölmüştür. Sonuçta oluşturulan mine; normalden ince, prizmatik yapısı bozuk, tabakalar halinde dentinden uzaklaşan, pürüzsüz hipoplastik amelogenezis imperfektaya benzer yapıdadır (Caterina et al 2002). MMP-20 gen yıkımlı farelerin minelerinin mineral içeriğinin; sağılıklı farelerdekinin yaklaşık olarak yarısı, mine sertliğinin ise 2/3 oranında olduğı görölmüştür (Bartlett 2004).

4.4. KLK4 (Kallikrein-4) geni:

Kallikrein, 15 genlik bir küme tarafından kodlanmış, 19q13.3-q13.4'li insan kromozomunun üzerinde bulunan serin proteazlardır. Orijinal insandan salgılanan kallikrein genleri (KLK1, KLK2, and KLK3) genom haritalaması sırasında, daha büyük ilişkili bir gen kümesinin parçası olarak bulunmuştur ve bu genler için resmi adlandırma, kromozom 19 üzerinde doğrusal sırayla yansıtılmış olarak KLK4'den KLK15'e kadar değişiklik gösterir (Gan et al 2000, Harvey et al. 2000, Yousef and Diamandis 2000). Bu kallikreinler, serin proteazların S1A ailesindeki peptidazlarla ilişkili bir grubu ifade etmektedir.

Proteaz, mine matriks serin proteaz 1 olarak tayin edilmiştir. İnsan ve fare, KLK4 cDNA kopyaları aynı zamanda gelişmiş diş dokularından izole edilmiştir (Hu et al. 2000a, Simmer et al. 2000). Gen yapısını işaret etmek ve KLK4 promotor bölgeyi teşhis etmek için insan ve hayvan KLK4 genleri klonlanmış ve sınıflandırılmıştır. Kallikreinler, 15 genlik bir küme tarafından kodlanmış, insan kromozomu 19q13.3-q13.4 ve diğer türlerdeki homologları üzerinde bulunan serin proteazlardır. Orijinal insan salgı bezi kallikrein genleri (*KLK1*, *KLK2*, and *KLK3*) genom haritalaması sırasında, ilişkili daha büyük bir gen kümesinin parçası olarak bulunmuştur ve bu genler için resmi adlandırma kromozom 19 üzerindeki doğrusal sıralarını yansıtacak biçimde KLK4'den KLK15'e kadar değiştirilmiştir. (Gan et al. 2000, Harvey et al. 2000, Yousef and Diamandis 2000). Bu kallikreinler, serin proteazların S1A ailesindeki peptidazlarla ilişkili bir grubu oluşturmaktadır.

KLK4 üzerine olan bilgimizle ilgili büyük atılım, gerçek zamanlı-PZR (ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu) tarafından KLK4 cDNA'yı spesifik olarak çoğaltan dejenere oligonukleotid primer çiftlerinin sentezine ve dizaynına izin veren, gelişmekte olan diş minesinden izole edilen proteazın kısmi protein sıralaması (sequencing) sırasında gelmiştir. PZR ürünleri klonlanmış ve domuz dişine özgü cDNA kütüphanesinin araştırılması için kullanılmıştır. Bu da ilk tam uzunlukta KLK4 cDNA klonuna giden yolu döşemiştir (Simmer et al 1998).

Proteaz, mine matriks serin proteinaz 1 olarak (EMSP1) tayin edilmiştir. İnsan ve fare, KLK4 cDNA klonları da gelişmiş diş dokularından izole edilmiş ve vasıflandırılmıştır (Hu et al 2000a; Simmer et al 2000). Gen yapısını sınıflandırmak ve KLK4 promotor bölgeyi tespit etmek için insan ve fare KLK4 genleri klonlanmış ve sınıflandırılmıştır. Fare ve insanın gelişmekte olan dişlerinden izole edilen KLK4 mRNA'ların 5' uçları, cDNA ucunun 5' hızlı çoğaltılmasıyla sınıflandırılmıştır (Hu et al 2000c). cDNA ve genom dizileri karşılaştırıldığı zaman fare, domuz ve insanda gelişmekte olan dişlerde dışa vurulan (express) KLK4 genlerinin hepsi altı ekson içerdiği gösterilmiştir. Bunların beşi kodlayan eksonlardır. Ekson 1'in tamamıyla kodlama özelliği yoktur. İnsan ve fare KLK4 genom dizileri transkripsiyon başlangıç bölgelerini en uzun KLK4 cDNAların 5' uçlarının sırasıyla 8 ve 16 nükleotid yukarısındadır (Hu et al. 2000c). Böylece gelişen dişte ifade edilen KLK4 geninin yapısı iyice oturtulmuştur.

Gelişmekte olan dişlerdeki KLK4'ün ekspresyonu, evreye spesifik Northern blot hybridizasyon, in situ hybridizasyon ve immunohistokimya ile sınıflandırılmıştır. (Hu et al. 2000b; Hu et al. 2002; Simmer et al. 2000, Simmer et al. 2004). KLK4, mine oluşumunun geç safhasında ameloblastlar tarafından eksprese edilip, geçiş safhasının başlangıcından başlayarak olgunlaşma safhası ve diş sürmesi safhasında devam etmektedir.

Gelişen diştten izole edilen aktif KLK4'ün yapısal ve fonksiyonel özellikleri test edilmiştir. Domuz enziminin 3 tane N-bağlı glikozilasyon bölgesine sahiptir ve jelatin zımogramlarında 31- ve 34-kDa da "doublet" olarak göç etmektedirler. Moleküler modelleme glikozilasyonların enzimin "sırt" bölgesinde olduğu, aktif bölgeden uzak olduğunu göstermiştir (Scully et al. 1998). Türler arasındaki KLK4 glikozilasyon seviyelerindeki farklılıklar açıktır. Domuz ve farenin her ikisi de glikozilasyon için uygun içerikte üç asparagin kalıntısına sahipken insan KLK4'ü sadece bir potansiyel bölgeye sahiptir. Glikopeptidaz F ile deglikozilasyonu takiben domuz KLK4'ü görünürde moleküler ağırlığı 28-kDa

olan tek bir inaktif banda dönüşür (Ryu et al. 2002). Bu gözlem, yakın zamandaki glikozile olmamış rekombiant insan KLK'sinin aktivite göstermesi bulgusuyla uyuşmamaktadır (Yoon et al. 2007). Farklılıklar türlere göre çeşitlilikler olabilir (insan KLK4'u 1 glikolizasyona sahipken domuzda 3 tane vardır). Başka bir açıklamaya göre domuz KLK4'un deglikolizasyonu, enzim bölgelerini açığa çıkarıp proteolitik yarıklanmaya açikhale getirdiği üzerinedir.

Gelişmekte olan dişte KLK4 için ana fizyolojik substrat, amelogenindir. Gelişmekte olan domuz dişlerinden izole edilen KLK4 amelogenini in vitro olarak bir sürü bölgede ve bir çok farklı aminoasit çeşidinde yer almaktadır (Ryu et al 2002). KLK4, MMP-20 tarafından daha ileri yıkılmaya dirençli olan glikozile enamelın yıkım ürünlerini sindirir (Yamakoshi, Hu, Fukae, Iwata and Simmer 2006). Rekombinant insan KLK4'ü bir çok aminoasit içeriğinde yarıklanmayı katalize eder (Matsumura et al. 2005) ve bütün kallikreinler içinde kendisi dışında diğer KLK'lerin zimojenlerinden pro-dizileri yarıklamada en aktif olanıdır (Yoon et al 2007). MMP-20 (ve termolizin) proKLK'ni in vitro elde edebilir, fakat bunu in vivo gerçekleştirebildiğinet değildir (Ryu et al 2002).

KLK4 bazal laminanın ameloblast plazma membranının distal yüzeyi (mine yüzeyiyle temas halinde olan parçası) boyunca oturduğu zaman salınmaktadır. Bu bazal lamina, bazı yönleriyle ameloblasta özgüdür ve amelotin (AMTN) ve apin (ODAM) gibi yeni komponentler içermektedir(Moffatt et al 2006b; Moffatt, Smith, Arnaud and Nanci2008). Bu bazal lamina proteinleri mine yüzeyine sıkıca yapışmış görünmektedir ve olgunlaşma safhasındaki ameloblastlar için bağlantı aracı olarak görev yaparlar ve mine kristallerinin ucunda ek mineral depolanmasını inhibe etmektedir. KLK4'ün bu bazal lamina proteinlerini nasıl yardığına dair veri olmamakla beraber, bir araya getirilmeleri ve idame edilmelerinin KLK4 hücre dışı mesafede iken olması gerçeği, KLK4 tarafından aşındırmaya karşı bir miktar koruma sağladığını göstermektedir.

Amelogenezin olgunlaşma safhasında, ameloblastlar değişime uğramaktadır; mine proteinlerini salgılamaları azalmakta, kallikrein 4 (KLK4)

salgılanması başlamaktadır. Bir serin proteaz olan KLK4, organik matriksi indirgeyerek, hücre dışı alandan ayrılmasına olanak sağlayan bir gendir. Bu değişiklikler, mine kristallerinin uzunlamasına büyümesini sonlandırmakta, enine büyümesini hızlandırarak genişliğinin artmasını sağlamaktadır. Büyümesi engellenmiş mine proteinlerinin uzaklaştırılması ve yıkılması, ince kristallerin yan kısımlarınıyon birikimi içinaçıgaçkarmaktadır (Lu et al 2008).

Sentezlenme zamanları farklı olmasına karşın, MMP20 ve KLK4 mutasyonları, insanlarda benzer görünümün (otozomal resesif pigmente hipomaturasyon AA II) ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Mine tabakasının kalınlığınormalsınırlarıçerisindeolup, lekeli ve anormal şekilde yumuşaktır (Hu et al 2007, Forestier, Molla, Verloes and Bardal 2008).

KLK4 mine proteinlerini bozabilen geniş hedef dizi spesifikliği olan bir proteazdır. Matriksteki mine proteinlerinin miktarının dik bir biçimde düşmesinin hemen öncesinde amelogenezin geçiş ve olgunlaşma evresinde salınmaktadır. KLK4'ün mineden ayrılmasını kolaylaştıracak şekilde rezidüel mine matriksini agresif bir biçimde yardığı düşünölmektedir. KLK4, aynı mine proteinlerini in vitro olarak çözmektedir. Her iki KLK4 allelinde defektlerle oluşmuş otozomal resesif amelogenezis imperfektalı insanlarda, mine daha az mineralize ve mineralin organik matriksin yerini almadaki başarısızlığından dolayı pigmentedir. Beraber alındığında ise bu bulgular KLK4'ün fonksiyonlarında diş mine oluşumunun geç evrelerinde, birikmiş mine matriksini çözmek için fonksiyon göstermektedir. Bu kristallerin birbirleriyle temas edene kadar enine ve kalınlığına büyümesini sağlamaktadır. Minekatmanınıninsertleşmesiçintemeldir.

KLK4, matriksteki mine proteinlerinin hızlan düştüğü noktanın hemen öncesinde, amelogenezin geçiş ve olgunlaşma safhası sırasında salgılanmaktadır. Mine katmanından ayrılmasını kolaylaştırarak, KLK4'ün rezidüel mine matriksini agresif biçimde yardığı düşünölmektedir (Tannure et al 2012).

Çocuklarda diş çürükleriyle ilişkili genetik ve çevresel faktörlerin

incelendiği bir araştırmada, 2-7 yaş aralığında 575 ocukdan DNA rnekleri toplanmıştır. Yaş, diş fırçalama sıklığı, sudaki fluor seviyesi, farklı çürük risk özelliklerinden 1 veya daha fazlasıyla istatistiksel olarak aralarında korelasyon bulunmuştur. DSPP, KLK4 ve AQP5 gen polimorfizmlerinin re karşı koruyucu etkilerinin olduğu bulunmuştur. KLK4 için risk fenotiplerinin sonuçları, düz yüzey rklerdeki koruyucuallellerle uyumlu bulunmuştur. Diğer allele artmış çürük riskiyle bağlantılı bulunmuştur. Bunun yanında MMP20'deki tek nükleotid polimorfizmleri, düz yüzey çürük riskiyle sınırlı bir bağlantısı olduğu bulunmuştur (Tannure et al 2012)

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1 Gereç

5.1.1. Kullanılan aletler

- pH metre (Hanna instruments PH211)
- Nanospektrofotometre (IMPLEN)
- RT-PZR ısı döngüleyici (DNA Engine Tetrad 2, Bio-Rad My Cyclor)
- UV Spektrofotometre (BIO-RAD)
- Mikropipetörler (Eppendorf)
- Vorteks (Werthhemann)
- Vorteks (Velp Scientifica)
- -20°C ve +4 °C dondurucu (Arçelik)
- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- EDTA Tüpleri (2 mL)
- Mikro 22R santrifüj cihazı (Hettich)
- Allegra 64R Santrifüj cihazı (Beckman Coulter)
- OLS 200 Su banyosu (Grant Scientific)
- Nüve BM 402 UV kaynağı
- 7900 HT Fast-RT PCR System (Applied Biosystems®)
- GeneAmp 9700 PCR System (Applied Biosystems®)
- Otomatik pipetör (Finnpipette Novus, Thermoscientific)
- Çokbaşı pipetör (Finnpipette F1 Multichannel, Thermoscientific)
- Pipetörler (1-10µl, 10µl-100µl, 0,2-2µl) (Thermoscientific)
- Explorer Pro hassas terazi (OHAUS)
- EC250-90 Agaroz jel elektroforez güç kaynağı (E-C Apparatus Corporation)
- Elektroforez Sistemi (CLEAVER)
- MilliporeEtüv
- Shimadzu Ax200ısısal döngü cihazı
- EppendorfMastercycler personal Laminar flow
- Olympus CH-2 Otoklav

- Safe Fast Elite mikrobiyolojik güvenlik kabini (Elix scientific)

5.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

- Tetra asetik asit (EDTA)
- Borik asit
- Agaroz (Invitrogen)
- Hyclone (Phosphate Buffered Saline) PBS (Thermo)
- Tris-EDTA Tamponu pH 8.0 (TE buffer, Ambion)
- %100 Etanol (Fisher Scientific)
- Proteinaz K (QIAGEN)
- Genomik DNA izolasyon kiti (QIAamp DNA Mini kit, QIAGEN)
- Deoksi nükleotid trifosfat (dNTP) karışım (Fermentas)
- TaqMan 2x Universal PCR Master Mix 50ml (Applied Biosystems®)
- 25mMMgCl₂ (Fermentas)
- DNA Loading Dye (SIGMA)
- DNA Ladder (Fermentas)
- Agaroz (Sigma)
- Etidyum Bromid (EtBr, Sigma)
- İzooamil alkol (Merck)
- Steril su

5.1.3. Kullanılan sarf malzemeler

- Cam balon 2000 ml (Isolab)
- Cam tüp (10 ml) Eppendorf tüpü (0.2 ml,0.5 ml,1.5 ml)
- Falcon tüpü (Isolab)
- Pamuk çubuklar (Steril swap, Copan)
- (15 ml,50 ml) Immersiyon yağı

- Merck (840257131) Kalaycı pamuğu
- Steril eküvyon çubuğu, steril ependorf tüpü (0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml, 2ml)(Fisher)
- Steril petri kutusu, Steril pipet ucu (10µl,100 µl,1000 µl)
- Steril plastik pipet (1 ml,10 ml)
- Mikropipetler 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl (Thermo Scientific)
- Poliprofilen santrifüj tüpleri, 2ml, 1ml, 0.5 ml (Isolab)
- Alüminyum folyo (VWR International)
- 96 kuyucuklu plaklar (ISC Bioexpress)
- 384 kuyucuklu plaklar (Applied Biosystems®)
- Parafilm (Isotherm)
- Şerit kapaklar (ISC BioExpress)
- Optikal adeziv film (Applied Biosystems®)

5.1.4. Agaroz jel elektroforezi

10X TBE Tamponu çözeltisi (1Lt):

54 gr Tris baz

27 gr Borik asit

20 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0)

Bir miktar su ile çözüldükten sonra çözelti 1 litreye kadar dH₂O ile tamamlandı.

5.2 Yöntem

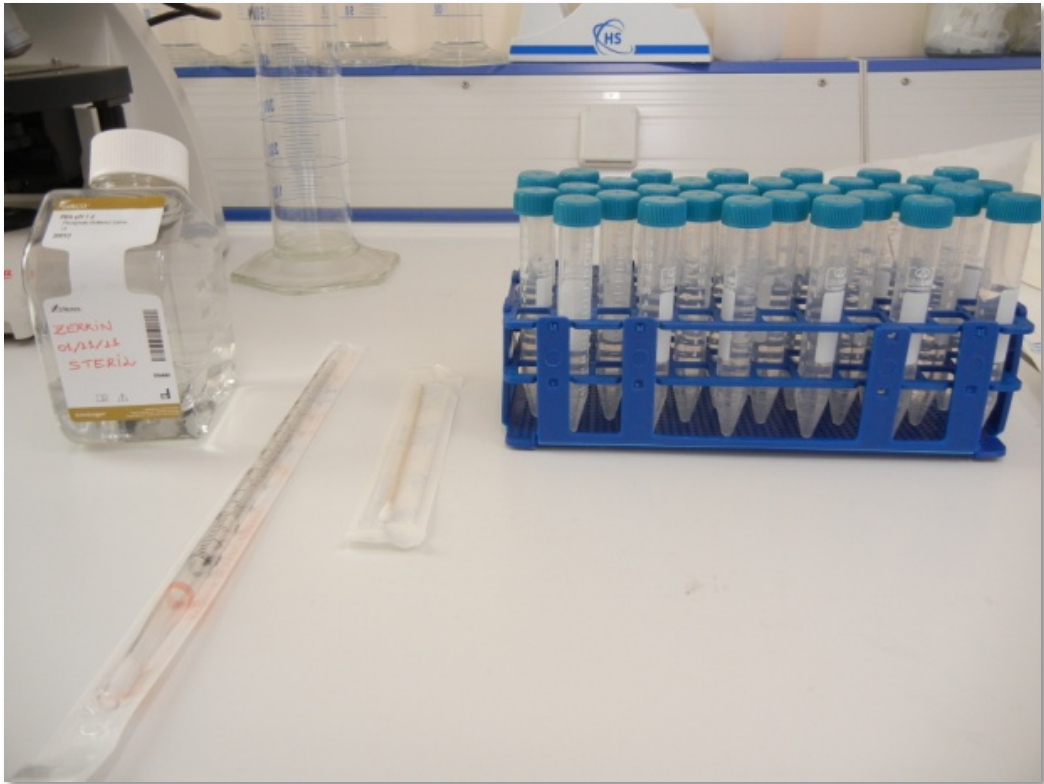
5.2.1 Örneklerin seçimi ve toplanması

Araştırma grubuna, Şubat 2012 tarihi ile Temmuz 2012 tarihi arasında Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti kliniğine diş tedavileri için başvuran, sistemik ve genetik hastalığı olmayan, ortodontik tedavi görmemiş olan ve toplam 259 hasta dâhil edildi. Çalışmaya dâhil edilen hastaların ebeveynlerine araştırmanın amacı ve içeriği anlatıldı ve gönüllü olarak çalışmaya katıldıklarına dair bilgilendirilmiş onam formu imzalatıldı (Ek 1. Hasta Onam Formu). Araştırma, Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Ek 2. Etik Kurul Kararı)

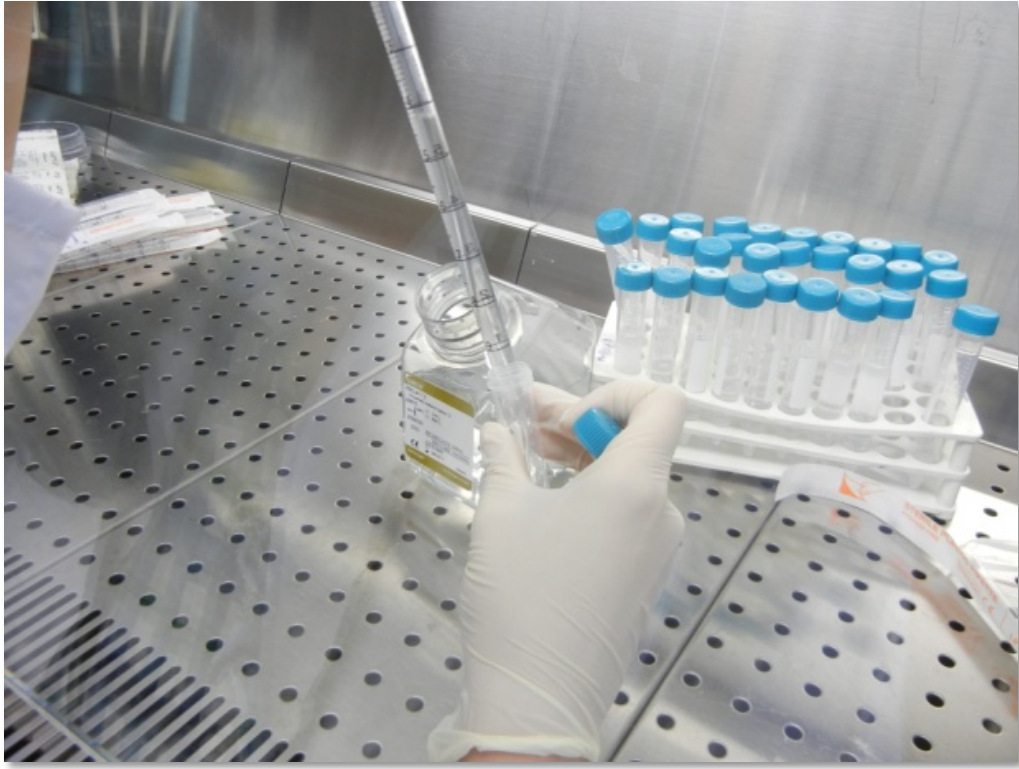
Araştırma grubu, Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'na başvuran 3-5 yaş aralığındaki 259 bireyden, diş çürüğü olan 136 çocuk çalışma grubunu ve diş çürüğü bulunmayan 129 çocuk kontrol grubunu oluşturmuştur (Tablo 1)

Ebeveynler; yapılacak muayene ve toplanacak ağız içi sürüntü örnekleri açısından bilgilendirilmiştir. Çalışmaya dâhil edilen çocukların ebeveynleri ile yapılan anketler ile çocukların genel sağlık durumları, beslenme alışkanlıkları, ağız hijyen durumu ve sosyo-ekonomik durumları belirlenmiştir (Ek 3. Hasta Takip Formu). Çocukların dental muayene ve diş çürükleri tespitinde Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2003 Kriterleri kullanılmıştır. Çürük, dolgulu ve eksik dişler belirlenerek deft (çürük, çekilmiş, dolgulu diş) ve defs (çürük, çekilmiş, dolgulu yüzey) skorları kaydedilmiştir. Ebeveyn onayı ile çocukların Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Kliniği'nde, dental ünitlerde, oturur pozisyonda, steril ayna ve sond kullanılarak reflektör ışığı altında ağız içi muayeneleri yapılmış ve her çocuktan ağız içi sürüntü örneği alınmıştır. Örnek alınırken dikkat edilen protokoller şunlardır:

- 1- Hastadan, yemek artıklarını uzaklaştırması için 15 saniye ağzını çalkalaması istendi.
- 2- Pamuk uçlu çubuk(Steril swap, Copan)yardımıyla yanak mukozasında 3 saniye için döndürülerek ve sürtülerek örnek toplandı. Çok sert olunmamalıdır. Yanak mukozası kanayabilir.
- 3- Hücrenin canlılığını sağlamak için PBS (Phosphate Buffered Saline) solüsyonu içeren tek kullanımlık steril falkon tüplerine çubuklar kondu (Resim1ve Resim2).
- 4- Tüpün en üst kısmında pamuk uçlu çubuğun fazla olan kısmı makas yardımıyla kesildi ve kapatıldı. Tüplerin üzerine karışmaması amacıyla etiket yapıştırılarak tarih, hangi gruba ait olduğu ve sayısı belirtildi.
- 5- Laboratuvara götürülene kadar -20°C buzlukta saklandı.



Resim 1:Falkon tüpleri, Pamuk çubuklar (Steril swap, Copan)



Resim 2:Falkon tüplerine PBS solüsyonunun aktarılması

GRUPLAR		SAYI
Grup1 (Çalışma Grubu)	Diş çürüğü bulunan 3-5 yaş aralığındaki çocuklar; deft ve defs > 1	136
Grup 2 (Kontrol Grubu)	Diş çürüğü bulunmayan 3-5 yaş aralığındaki çocuklar; deft ve defs = 0	123

Tablo 1: Grupları gösteren tablo

5.2.2 Örneklerden DNA izolasyonu

Genetik materyalle yapılacak çalışmalarda moleküler biyoloji tekniklerini uygulayabilmek için öncelikle DNA molekülünün saf bir şekilde elde edilmesi gerekmektedir. DNA izolasyon yöntemlerinde birbirini izleyen 3 temel aşama vardır. Birinci aşamada, hücre parçalanarak yüksek molekül ağırlıklı DNA açığa

çıkarılır. İkinci aşamada, denatürasyon ve proteoliz ile DNA-protein kompleksinin ayrılması ve DNA'nın çözünür duruma getirilmesi sağlanır. Son aşamada ise DNA'nın kimyasal yöntemlerle proteinler, RNA ve diğer makromoleküllerden ayrılması sağlanır. Örneklerden DNA izolasyonu ve agaroz jelin yürütülmesi işlemleri Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

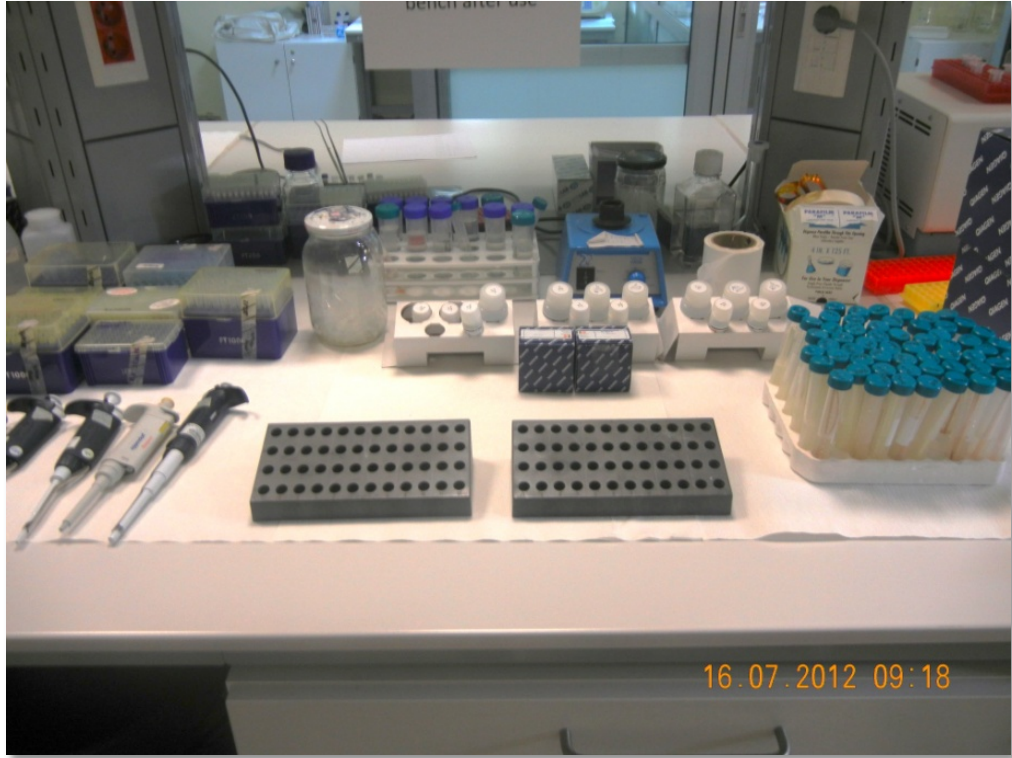


Resim 3: QIAMP DNA Mini Kit-Qiagen

DNA izolasyonu, sürüntüden (QIAMP DNA Mini Kit-Qiagen) kitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Resim 3). Yöntem, üretici firmanın yönergesine göre uygulanmıştır (QIAMP DNA Mini Handbook, 2007) (Resim 4). Özetle;

- 1- 2ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Örneklerini 5dk. santrifüj yapıldı (Resim 5).
- 2- PBS'li doku, 2ml'lik tüpe aktarıldı.

- 3- 20 µl Proteinaz K pipetlenerek, 2ml'lik tüpe eklendi.
- 4- 400 µl Buffer AL eklenerek, 15 sn. vurum-vorteks yapılarak karıştırıldı (Resim 6).
- 5- 56 C°'ye ayarlanmış etüvde, bu tüp 10 dk.süresince inkübe edildi (Resim7).
- 6- Tüpün çeperlerine yapışması olası damlacıkların toplanması amacıyla, kısa bir süre için santrifüj yapıldı.
- 7- 400 µl etanol (96-100%) ilave edilerek, vurum-vorteks yapıldı.
- 8- Bu karışımın 700µl QiAamp Mini Spin kolonlara aktarıldı.
- 9- 6000xg (8000rpm)'de 1 dk. süresince santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
- 10- Atık tüpü atıldı. Spin kolon, yenibiratıkkolontüpüiçineyerleştirildi.
- 11- Spin kolonuna 500 µl AW1 tamponu eklendi. 6000 xg (8000rpm)'de 1 dakika süresince santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Atık tüpü değiştirildi.
- 12- Spin kolonuna 500 µl AW2 tamponu eklendi. 20.000xg (14000rpm)'de 3 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Atık tüpü değiştirildi.
- 13- 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 100 µl AE elüsyon tampon konuldu. Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı.
- 14- En son aşamada ise 6000xg(8000rpm)'de 1dakika santrifüj yapıldı ve elde edilen DNA örneği kolondan tüpe aktarıldı.



Resim 4:DNA izolasyonu için gereken malzemeler



Resim 5: Mikro 22R santrifüj cihazı (Hettich)



Resim 6: Vorteks cihazı



Resim 7: OLS 200 Su banyosu (Grant Scientific)

Elde edilen örneklerin saflığını ve nükleik asit konsantrasyonunu belirlemek amacıyla Nanospektrofotometre (IMPLEN) cihazı ile 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçümler yapıldı (Şekil 8). Ölçüm yapmadan önce her bir örnekten önce üretici firmanın önerileri doğrultusunda cihazın balans ayarı yapılmıştır. 2ml'lik pipetler ile cihazın ucuna distile su damlatılmış nanospektrofotometre ile ölçümü yapıp, kaydedilmiş arkasından TE Buffer solüsyon yine 2ml olacak şekilde damlatılmış ve kalibrasyon sağlanmıştır. Kalibrasyon işleminden sonra elde edilen sonuçlara göre saflık derecesini gösteren 260/280 oranının 1,8 ile 2,0 arasında yoğunlaştığı görüldü. Konsantrasyonun en az 2ng/µl olduğu örnekler çalışmaya dâhil edildi.



Resim 8: Nanospektrofotometre (IMPLEN) cihazı

5.2.3 Agaroz jelin hazırlanması ve yürütülmesi

Elektroforez yönteminde çözülmüş durumdaki yüklü moleküller jele yüklenip elektrik akımı altında yürütülürlerse büyüklükleri, yükleri ve biçimlerine

göre farklı hızlarda hareket ederler ve böylece bu moleküller görüntülenebilmektedir. 200-50.000 bp boyutları arasındaki DNA ve RNA moleküllerini tanımlamakta kullanılan standart yöntem destek ortamı olarak agarozun kullanıldığı elektroforezdir. Agarozun konsantrasyonu değiştirilerek por çapı ayarlanabilmektedir. Bu nedenle küçük DNA fragmanları için yüksek, büyük DNA fragmanları için düşük agaroz konsantrasyonu kullanılarak DNA'nın jelde en uygun yürümesi sağlanabilmektedir (Livak et al 1995).

DNA'nın jelde görünür hale gelebilmesi etidyum bromürün (EtBr) DNA bağları arasına bağlanarak 300 veya 360nm de ışığı emmesi sonucu floresan etki göstermesi ile olmaktadır. Bu etki DNA konsantrasyonuna bağlı olarak değişebilmektedir.

Agaroz jel elektroforezi, elektriksel güç uygulanarak DNA'nın katoddan anoda doğru göç etmesi ilkesine dayalı olan ve DNA'nın moleküler ağırlığının ve/veya saflığının belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. % 1'lik agaroz jel hazırlamak için:

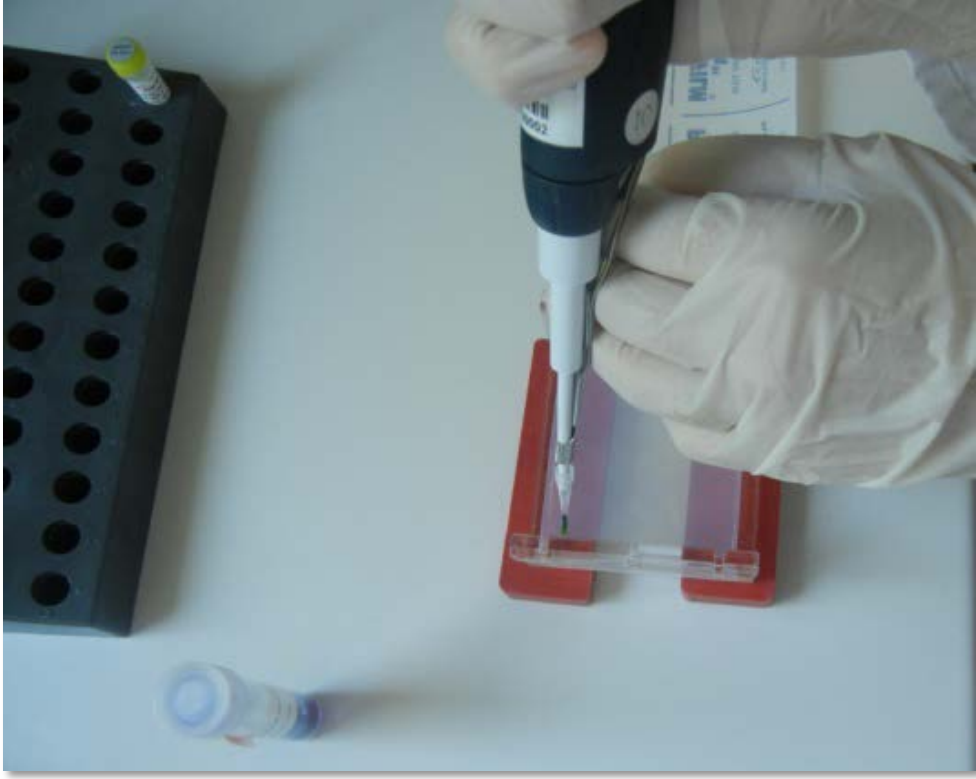
1. 10X TBE tamponu stok çözeltisi hazırlandı.
2. 10X TBE stok çözeltisinden 0,5X TBE çözeltisi yapıldı.
3. 0,4 gr agaroz tartıldı ve behere alındı. 0,5X TBE ile 50 ml'ye tamamlandı.
4. Karışım mikrodalgada 1 dakika boyunca agaroz tamamen eriyene kadar durdu.
5. 1,2µl EtBr eklendi ve çözelti karıştırıldı.
6. Tankı önceden 1X TBE tampon ile doldurulmuş sualtı elektroforez cihazı için jel döküldü.
7. Jel polimerize olduktan sonra tankı içerisine yerleştirildi.
8. DNA örneklerinin her birinden 2,5µl alındı ve 2µl yükleme boyası ile karıştırıldı (Resim 9).
9. Karışım agaroz jelin kuyucuklarına otomatik pipet ile yüklendi (Resim 10).
10. Örnekler güç kaynağından sağlanan elektrik akımı (100v, 60mA) ile 20

dk.elektroforez işlemine tabi tutuldu (Resim 11).

11. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel, Nüve BM 402 UV kaynağı altında incelenerek örneklerin pozitifliği değerlendirilip, fotoğrafı çekildi (Resim 12, Resim 13).



Resim 9:DNA örneklerinin yükleme boyasıile karıştırılması



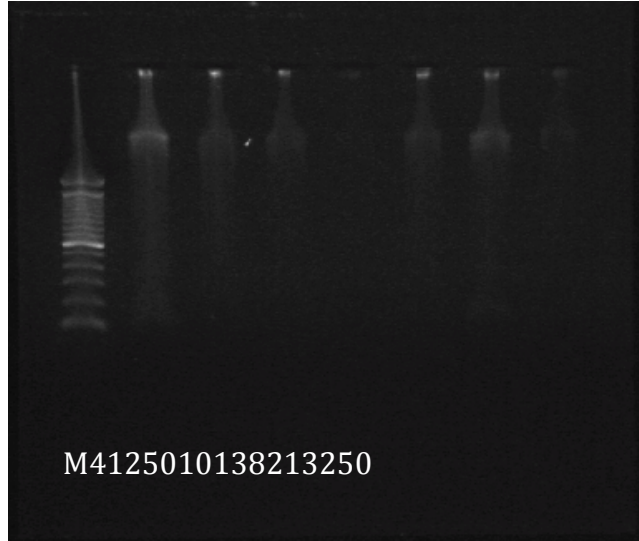
Resim 10:Kuyucuklara DNA yüklemesi



Resim 11:Jel elektroforez işlemi



Resim 12: Nüve BM 402 UV kaynağı



Resim 13: Jel görüntüleme cihazında UV altında çekilen jel fotoğrafı, DNA kontrol için %0,8'lik agaroz jel. (Soldan sağa sırasıyla örnekler: 4, 12, 50, 101, 38, 213 ve 250 ile en sağda DNA merdiveni (DNA ladder) yer almaktadır.)

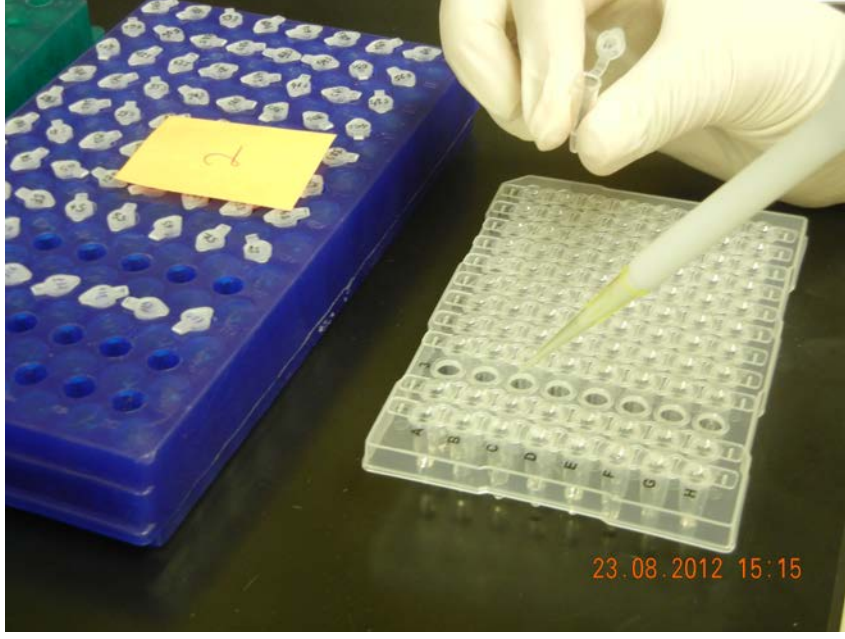
5.2.4 Örneklerin Seyreltilmesi

İzole edilen DNA örnekleri, genetik incelemenin yapılması için uygun şartlar altında Pittsburgh Üniversitesi Oral Biyoloji Departmanı, Dental Genetik Laboratuvarı'na gönderilmiş olup, incelemeleritarafımdangerçekleştirilmiştir(Ek 4.Referans Mektubu).

DNA örneklerinin hacmi 50µl/10ng olacak şekilde TE Buffer solüsyon ile dilüe edilmiştir (Resim 14). Önceden belirlenen formüle uyularak, 96'lık plağa çoklu pipet tutucu yardımıyla TE Buffer solüsyonu eklenerek örnekler 10ng hacime kadar seyreltilmiştir. Tüm plakların üzeri kapaklar yardımı ile kapatılmıştır (Resim 15). Örnekleri 100µl/2ng'a seyreltme işlemi için yeni steril plaklar hazırlanmıştır. Çoklu pipet yardımı ile her örnekten 20ng hacminde tükürük alınmış ve üzerine 80 ng TE Buffer solüsyon eklenmiştir. Plakların kapakları kapatılmış ve +40°C de buzdolabında saklanmıştır.



Resim 14: TE Buffer solüsyon



Resim 15: 96'lık plak

5.2.5 Reaksiyon karışımının hazırlanması

Reaksiyon karışımının hazırlanması aşağıda izlenen formüle bağlıdır. Her kuyucuk başına;

TaqMan Universal PZR Master Mix- 1.5 μ l

40X TNP- 0.037 μ l

Steril Su- 0.462 μ l

Toplam= 2 μ l

Gerçek zamanlı-PZR için 112'lik plaklara incelenecek marker ismi ve örneklerin kod numaraları kaydedilmiştir (Resim 16). Çoklu pipetler yardımıyla önceki plakanın 1. Dikey sırası, 112'lik plakanın A hizasına gelecek şekilde, eski plakanın 2. Dikey sırası 112'lik plakanın B hizasına gelecek şekilde izole edilen DNA örnekleri yeni plağa aktarılmıştır (Resim 17). Negatifkontrol için son

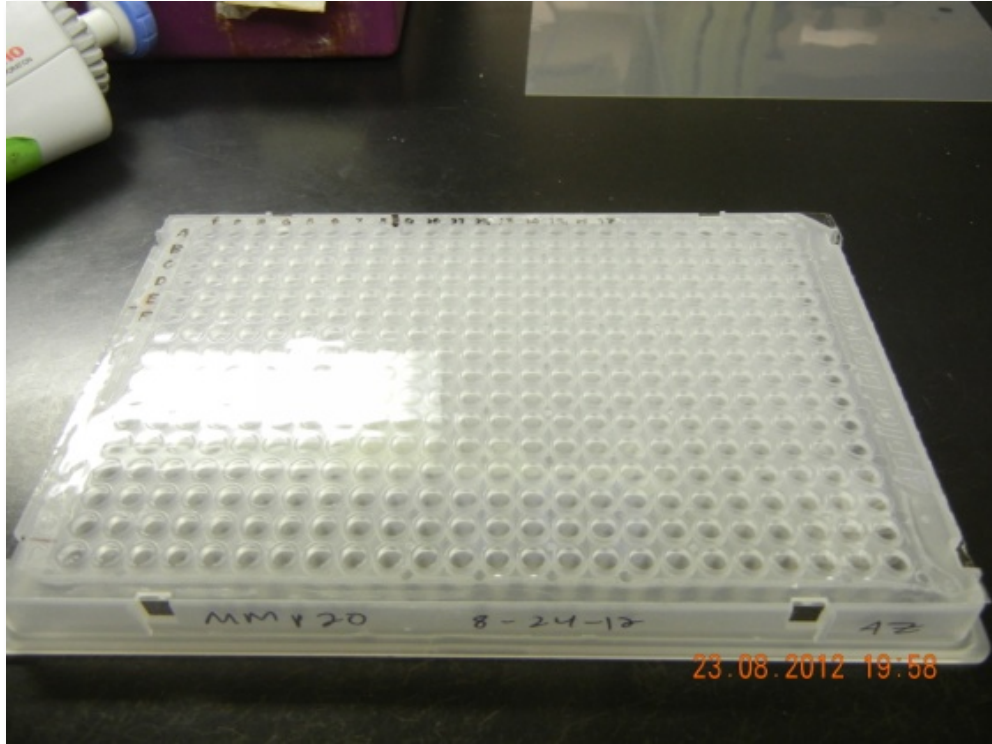
A photograph of laboratory equipment on a dark surface. In the center is a blue multi-channel pipette with a black label that reads "1.0-10.0" and "Biohit". To the left of the pipette are three clear plastic microplate racks, each containing a white 96-well microplate. To the right of the pipette is a blue and purple microplate rack containing a purple 96-well microplate. Below the pipette is a white 96-well microplate. In the bottom right corner, there is a red timestamp that reads "23.08.2012 16:59".

A multi-channel pipette is shown dispensing liquid into a 96-well plate. The pipette has a blue body and white tips. The plate is clear with black lettering on the bottom. A gloved hand is visible in the foreground. A red timestamp "23.08.2012 16:46" is in the bottom right corner.

78



Resim 18:Hazırlanan reaksiyonkarışımı



Resim 19:Optikal film yerleştirilen reaksiyon plağı

5.2.6 Kullanılan tek nükleotid polimorfizmleri (TNP)

Applied Biosystem tarafından önceden dizayn edilmiş TNP ler kullanıldı (Tablo 2) (Resim 20).

ID gen	rs numarası	Kromozom yerleri	Allelleri (VF)
MMP20	rs1784418	Chr11	CT
KLK4	rs2235091	Chr19	GA
KLK4	rs198968	Chr19	AG

Tablo 2:Kullanılan tek nükleotid polimorfizmleri (TNP)



Resim 20:MMP20 geni

5.2.7 Gerçek zamanlı-PZR programı

DNA örneklerinin, gerçek zamanlı-PZR (DNA Engine Tetrad 2, Bio-Rad My Cycler) cihazı ile istenilen bölgeler TNP'ler tarafından yönlendirilerek

enzimatik olarak sentezlenmesi sağlandı (Resim 21). Bakılan TNP'ler için gerçek zamanlı-PZR ısıt döngü programına göre: DNA'nın iki zinciri 95°C'de 10 dakika boyunca birbirinden ayrılmıştır (Denatürasyon). Sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması için 92°C'de 15 saniye(eşleşme) ve 60°C'de 1 dakika 40 döngü olacak şekilde zincir, yeni çift zincirli DNA'lar oluşturmaküzereuzamıştır(Extension).



Resim 21: Gerçek zamanlı-PZR ısıt döngüleyici (DNA Engine Tetrad 2, Bio-Rad My Cycler)

5.2.8 Reaksiyon plağının okunması

Gerçek zamanlı-PZR reaksiyonu bittikten sonra plaklar, ışık görmeyecek şekilde alüminyum folyo ile kapatıldı. ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (SDS) cihazına reaksiyon plağı yerleştirildi. Plakların okunması için program başlatıldı (Resim 22). Okuma bittikten sonra SDS 2.2.2 Allelic Discrimination Software (Applied Biosystems, Foster City, CA) programında allelik diskriminasyonu yapılarak genotipleri belirlenmiş ve örneklerin allel

dağılımları grafikte gösterilmiştir.



Resim 22:ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (SDS) cihazı

5.2.9 İstatiksel analizler

Hasta ve kontrol gurubuna ait özellikler ve gerçek zamanlı-PZR tekniği ile elde edilen değerler the Epi Info 3.3.2 statistical software package (<http://www.cdc.gov/epiinfo>) programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Genotip dağılımı, Hardy-Weinberg eşitliği, Ki-kare testi ve Fisher's exact testi ile belirlendi ve t testi ölçümü ile verilerin anlamlılık gücü ölçüldü. Gruplar arası ilişki, Odds Oranı (OR) ile değerlendirildi ve sonuçlar tablo halinde düzenlendi. Anlamlılık seviyesi 0,05 olarak alındı. Her genetik markerın etkini ölçümlemek için lojistik regresyon analizi yapıldı. Dış çürüğüne etki eden olası çevresel faktörleri, çokdeğişkenli analizde gen-çevre etkileşimlerinin değerlendirilmesi için kovaryant olarak dâhil edildi. Alfa değeri %5 alındı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p<0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

6. BULGULAR

6.1Çevresel Faktörlere Bağlı Bulgular

Bu çalışmada yer alan 259 birey içinde 123'ü çürük olmayan, 136' sı çürük deneyimiyle gelen çocuklardır. Diş çürüğü bulunan grubun ortalama yaşları 4,60, kontrol grubunun ortalama yaşları 4,14 olarak bulunmuştur. Grupların yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). Dişlerinde çürük olan çocuklarçürük olmayanlara göre daha yaşı büyük bulunmuştur ($p=0,000$) (Tablo 3).

Demografik Veriler	Toplam Çocuk Sayısı (n=259)	Çalışma Grubu (n=136)	Kontrol Grubu (n=123)	Odds Oranı 95% GA	P
Ortalama Yaş (SS)	4,38(0,800)	4,60(0,612)	4,14 (0,908)	0,45(0,32-0,64)	0,000*

Tablo 3: Diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarının ortalama yaşları

Çalışmaya dâhil edilen diş çürüğü bulunan bireylerden 70'i erkek, 66'sı kız; sağlıklı bireylerden59'u erkek, 64'ükızıdır. Cinsiyetin gruplara göre dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4).

Demografik Veriler	Toplam Çocuk Sayısı (n=259)	Çalışma Grubu (n=136)	Kontrol Grubu (n=123)	Odds Oranı 95% GA	P
Cinsiyet(%)					
Erkek	129(49,8)	70(51,5)	59(48,0)	0,86(0,53-1,41)	0,573
Kız	130(50,2)	66(48,5)	64(52,0)	Referans	

Tablo 4: Diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarının cinsiyete göre dağılımı

Diş çürüğü bulunan grubun ortalama doğum kilosu 3,210 gr, kontrol grubunun ortalama doğum kilosu 3,250 gr olarak bulunmuştur (Tablo5).Doğum kilosunun gruplara göre dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Demografik Veriler	Toplam Çocuk Sayısı (n=259)	Çalışma Grubu (n=136)	Kontrol Grubu (n=123)	Odds Oranı 95% GA	P
Ortalama doğum kilosu(SS)	3,23(579,4)	3,21(591,0)	3,25(568,1)	1,00(1,00-1,00)	0,580

Tablo5: Diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarının ortalama doğum kilosu

Diş çürüğü bulunan grubun ortalama boy uzunluğu 101,9 cm, kontrol grubunun ortalama boy uzunluğu 101,1 cm olarak bulunmuştur (Tablo6).Boy uzunluğunun gruplara göre dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Demografik Veriler	Toplam Çocuk Sayısı (n=259)	Çalışma Grubu (n=136)	Kontrol Grubu (n=123)	Odds Oranı 95% GA	P
Ortalama boy uzunluğu(SS)	101,5(9,06)	101,9(9,1)	101,1(9,0)	0,9(0,96-1,01)	0,458

Tablo6: Diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarının ortalama boy uzunluğu

Diş çürüğü bulunan grubun ortalama kilosu 17,6 kg, kontrol grubunun ortalama kilosu 17,2 kg olarak bulunmuştur. Şimdiki kiloların gruplara göre dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo7).

Demografik Veriler	Toplam Çocuk Sayısı (n=259)	Çalışma Grubu (n=136)	Kontrol Grubu (n=123)	Odds Oranı 95% GA	P
Ortalama kilosunu (SS)	17,4(3,62)	17,6(3,6)	17,2(3,53)	0,97(0,90-1,03)	0,383

Tablo7: Diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarının ortalama kilosunu

Diş çürüğü bulunan grupta 100 bireyin, kontrol grubunda 85 bireyin biberon kullandığı tespit edilmiştir (Tablo 8). Gruplar arasında karşılaştırma biberon kullanımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Demografik Veriler	Toplam Çocuk Sayısı (n=259)	Çalışma Grubu (n=136)	Kontrol Grubu (n=123)	Odds Oranı 95% GA	P
Biberon kullanımı(%)					
Evet	22,56(71,4)	100(73,5)	85(69,1)	Referans	
Hayır	74(28,6)	36(26,5)	38(30,9)	0,80(0,46-1,38)	0,431

Tablo8: Biberon kullanımının diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarına göre dağılımı

Çalışma grubundaki bireyler 22,5 ay, kontrol grubundaki bireyler 21,7 ay biberon kullanmıştır (Tablo 9). Gruplar arasında biberon kullananların süre ortalamalarının karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Demografik Veriler	Toplam Çocuk Sayısı (n=259)	Çalışma Grubu (n=136)	Kontrol Grubu (n=123)	Odds Oranı 95% GA	P
<i>Biberon kullanım süresi aylık(SS)</i>	22,1(11,22)	22,5(10,4)	21,7(12,12)	1,0(0,98-1,02)	0,635

Tablo9: Biberon kullanım süresinin diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarına göre dağılımı

Diş çürüğü bulunan grupta 34'ü şekerli süt içen, 67'si şekerli süt içen ve 35'i süt içmeyen bulunurken kontrol grubunda 37'si şekerli süt içen, 51'i şekerli süt içen ve 35'i süt içmeyen olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasında süt içeriği dağılımı karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$) (Tablo10).

Demografik Veriler	Toplam Çocuk Sayısı (n=259)	Çalışma Grubu (n=136)	Kontrol Grubu (n=123)	Odds Oranı 95% GA	P
<i>Süt içeriği(%)</i>					
Süt içmiyor	70(27,0)	35(25,7)	35(28,5)	-	-
Şekerli	71(27,4)	34(25,0)	37(30,1)	0,766(0,423-1,386)	0,439
Şekerli	118(45,6)	67(49,3)	51(41,5)	Referans	

Tablo10: Süt içeriğinin diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarına göre dağılımı

Diş çürüğü bulunan grupta 95'i gece yatmadan önce süt içerken kontrol grubunda 76'sı gece yatmadan önce süt tüketmiştir. Gruplar arasında uyumadan önce süt kullanımı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$) (Tablo 11).

Demografik Veriler	Toplam Çocuk Sayısı (n=259)	Çalışma Grubu (n=136)	Kontrol Grubu (n=123)	Odds Oranı 95% GA	P
<i>Uyumadan önce süt kullanımı(%)</i>					
Evet	171(66,0)	95(69,9)	76(61,8)	0,698(0,41-1,16)	0,171
Hayır	88 (34,0)	41(30,1)	47(38,2)	Referans	

Tablo11: Uyumadan önce kullanımının diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarına göre dağılımı

Diş çürüğü bulunan grubun ortalama ara öğün sayısı 2,59, kontrol grubunun ortalama ara öğün sayısı 2,39 olarak bulunmuştur. Ara öğün sayılarının gruplara göre dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Demografik Veriler	Toplam Çocuk Sayısı (n=259)	Çalışma Grubu (n=136)	Kontrol Grubu (n=123)	Odds Oranı 95% GA	P
<i>Ortalama ara öğün sayısı (SS)</i>	2,50(+1,10)	2,59(+1,11)	2,39(+1,08)	-	0,150

Tablo 12: Diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarının ortalama ara öğün sayısı

Diş çürüğü bulunan gruptaki bireyler ortalama haftada 1 kez şekerli ve asidik içecek tüketirken, kontrol grubunun haftada ortalama 1,61 kez şekerli ve asidik içecek tükettiği bulunmuştur. Ortalama haftalık şekerli ve asidik içecek tüketimi gruplara göre dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 13).

Demografik Veriler	Toplam Çocuk Sayısı (n=259)	Çalışma Grubu (n=136)	Kontrol Grubu (n=123)	Odds Oranı 95% GA	P
<i>Ortalama haftalık şekerli ve asidik içecek tüketimi (SS)</i>	1,29(+2,62)	1,00(+1,48)	1,61(+3,45)	-	0,075

Tablo13: Diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarının ortalama haftalık şekerli ve asidik içecek tüketimi

Gruplar arasında ilk diş fırçalama zamanı açısından karşılaştırma sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p=0,003$; $OR=0,707$; $0,553-0,904$). Çürük deneyimli grubun ilk diş fırçalama yaşı (4,368; 1,0170) çürüksüz gruba (3,976; 1,1556) göre daha büyük bulunmuştur (Tablo 14).

Demografik Veriler	Toplam Çocuk Sayısı (n=259)	Çalışma Grubu (n=136)	Kontrol Grubu (n=123)	Odds Oranı 95% GA	P
<i>İlk dişfırçalama yaşı (SS)</i>	4,18(+1,10)	4,36(+1,01)	3,97(+1,15)	-	0,003*

Tablo 14: İlk diş fırçalama yaşının diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarına göre dağılımı

Diş çürüğü bulunan grupta uyumadan önce 73'ü bazen, 51'i hergün diş fırçalarken 10'u asla diş fırçalamamıştır. Kontrol grubunda uyumadan önce 46'sı hergün, 65'ibazen diş fırçalarken 10'u asla diş fırçalamamıştır. Uyumadan önce diş fırçalama alışkanlığının gruplara göre dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 15).

Demografik Veriler	Toplam Çocuk Sayısı (n=259)	Çalışma Grubu (n=136)	Kontrol Grubu (n=123)	Odds Oranı 95% GA	P
<i>Uyumadan önce diş fırçalama(%)</i>					
Hergün	97(37,5)	51(37,5)	46(37,4)	1,0(0,11-8,5)	0,995
Bazen	138(53,3)	73(53,7)	65(52,8)	0,90(0,34-2,36)	
Asla	20(7,7)	10(7,4)	10(8,1)	0,89(0,34-2,27)	

Tablo15: Uyumadan önce dişfırçalama yaşının diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarına göre dağılımı

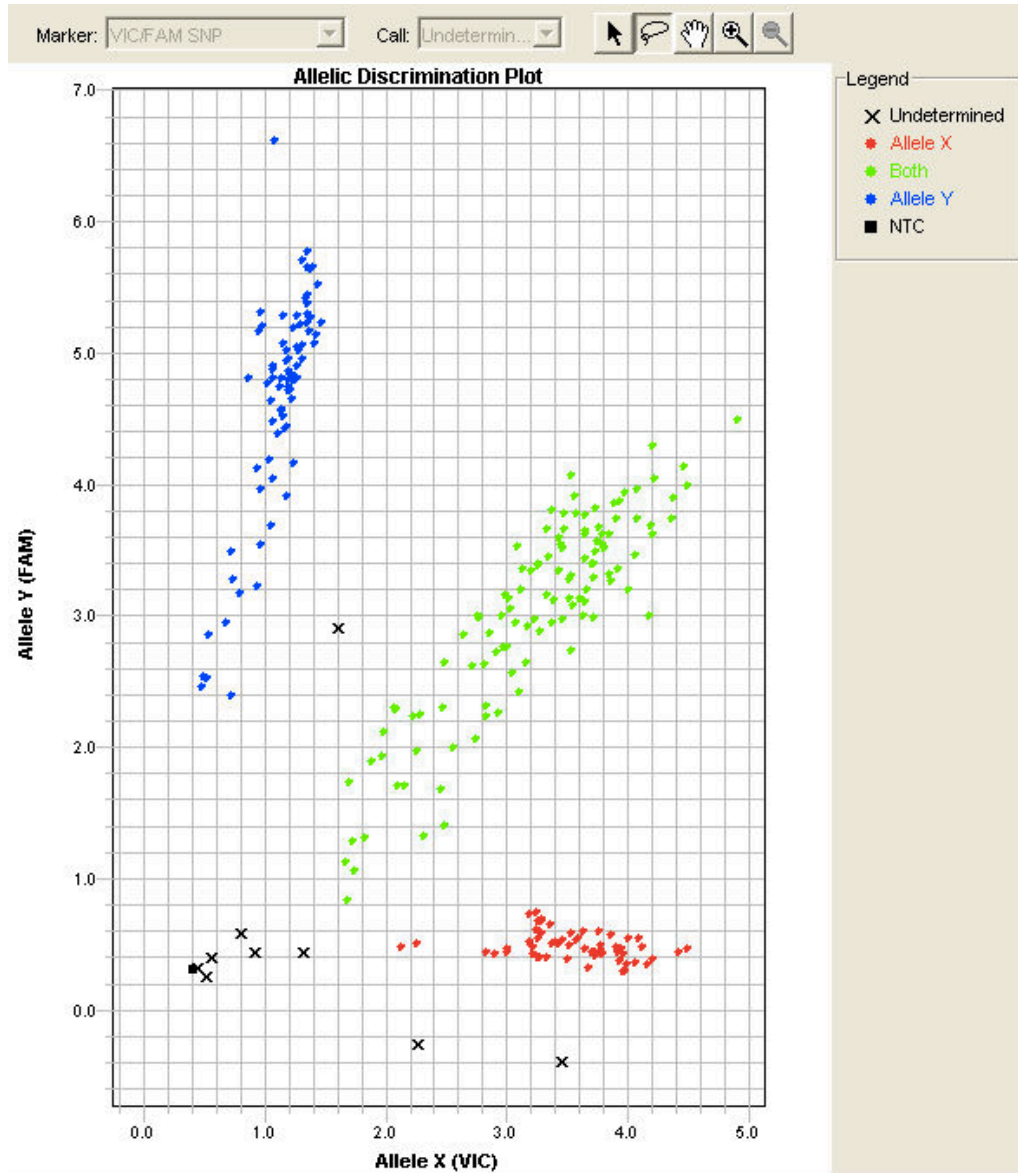
Diş çürüğü bulunan grupta 75'i günde 1 kez, 48'i günde 2 kez, 7'si haftada 2 veya 3 kez dişini fırçalarken 6'sı hiç diş fırçalamamıştır. Kontrol grubunda ise 63'ü günde 1 kez, 44'ü günde 2 kez, 11'i haftada 2 veya 3 kez dişini fırçalarken 5'i hiç diş fırçalamamıştır diş fırçalama sıklığının gruplara göre dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 16).

Demografik Veriler	Toplam Çocuk Sayısı (n=259)	Çalışma Grubu (n=136)	Kontrol Grubu (n=123)	Odds Oranı 95% GA	P
<i>Diş fırçalama sıklığı(%)</i>					
Diş fırçalamıyor	11(4,2)	6(4,4)	5(4,1)	Referans	0,671
Haftada 2 veya 3 kez	18(6,9)	7(5,1)	11(8,9)	0,90(0,25-3,19)	
Günde 1 kez	138(53,3)	75(55,1)	63(51,2)	1,71(0,61-4,81)	
Günde 2 kez	92(35,5)	48(35,3)	44(35,8)	0,91(0,54-1,55)	

Tablo 16: Diş fırçalama sıklığının diş çürüğü bulunan ve kontrol gruplarına göre dağılımı

6.2. Gerçek zamanlı-PZR bulgularının allel dağılım grafikleri

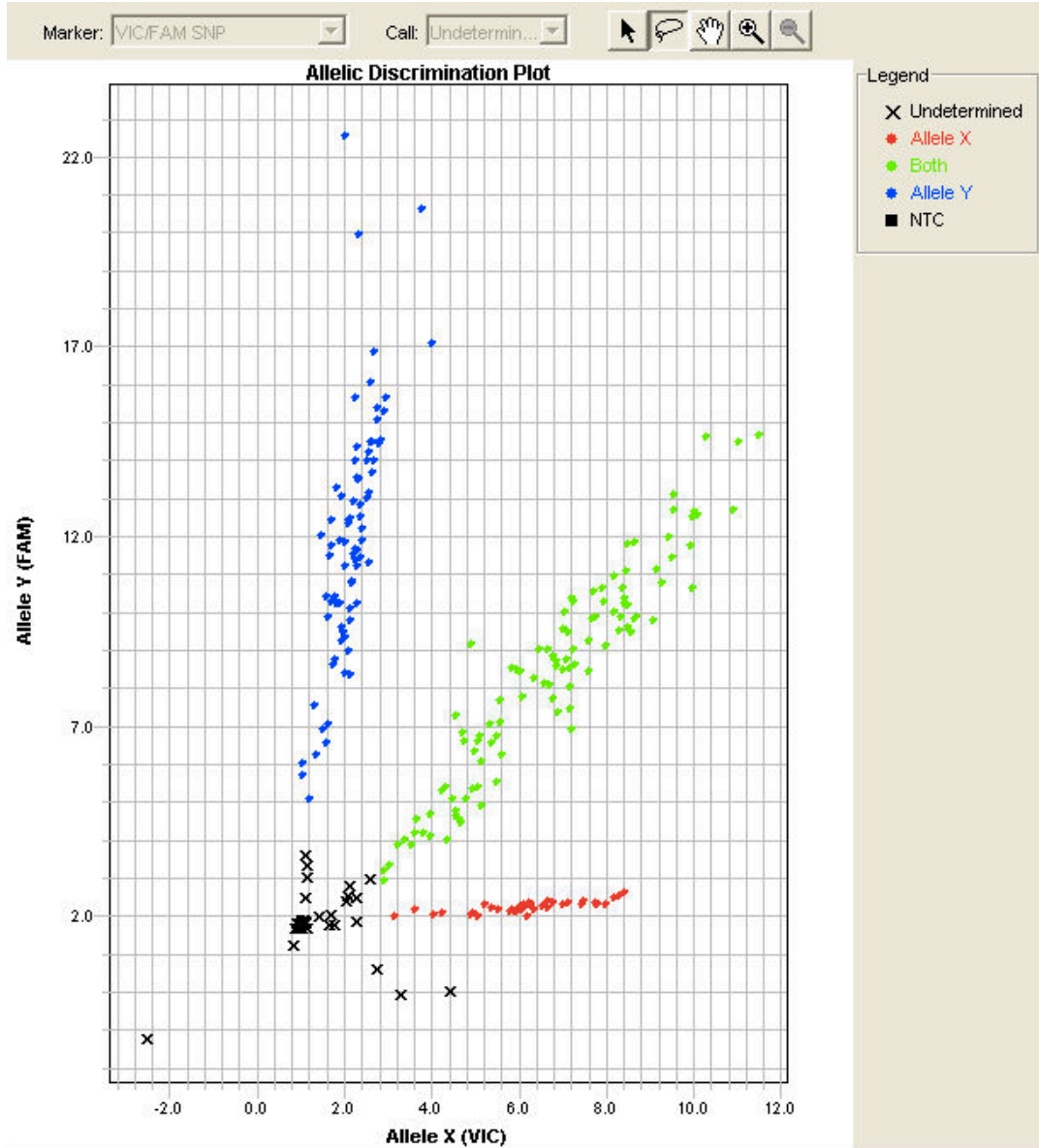
Grafik bize her örnek için farklı boyamaların konsantrasyonlarını göstermiştir. Allel X (kırmızı plotlar) ve Allel Y (mavi plotlar) homozigot, ikisinin birlikte görüldüğü örneklerde XY (yeşil plotlar) heterozigot, X olarak gözükenler ise bilinmeyen örneklerdir.



Şekil 3: rs 1784418 (MMP20) SNP bölgesinin allel dağılım grafiği

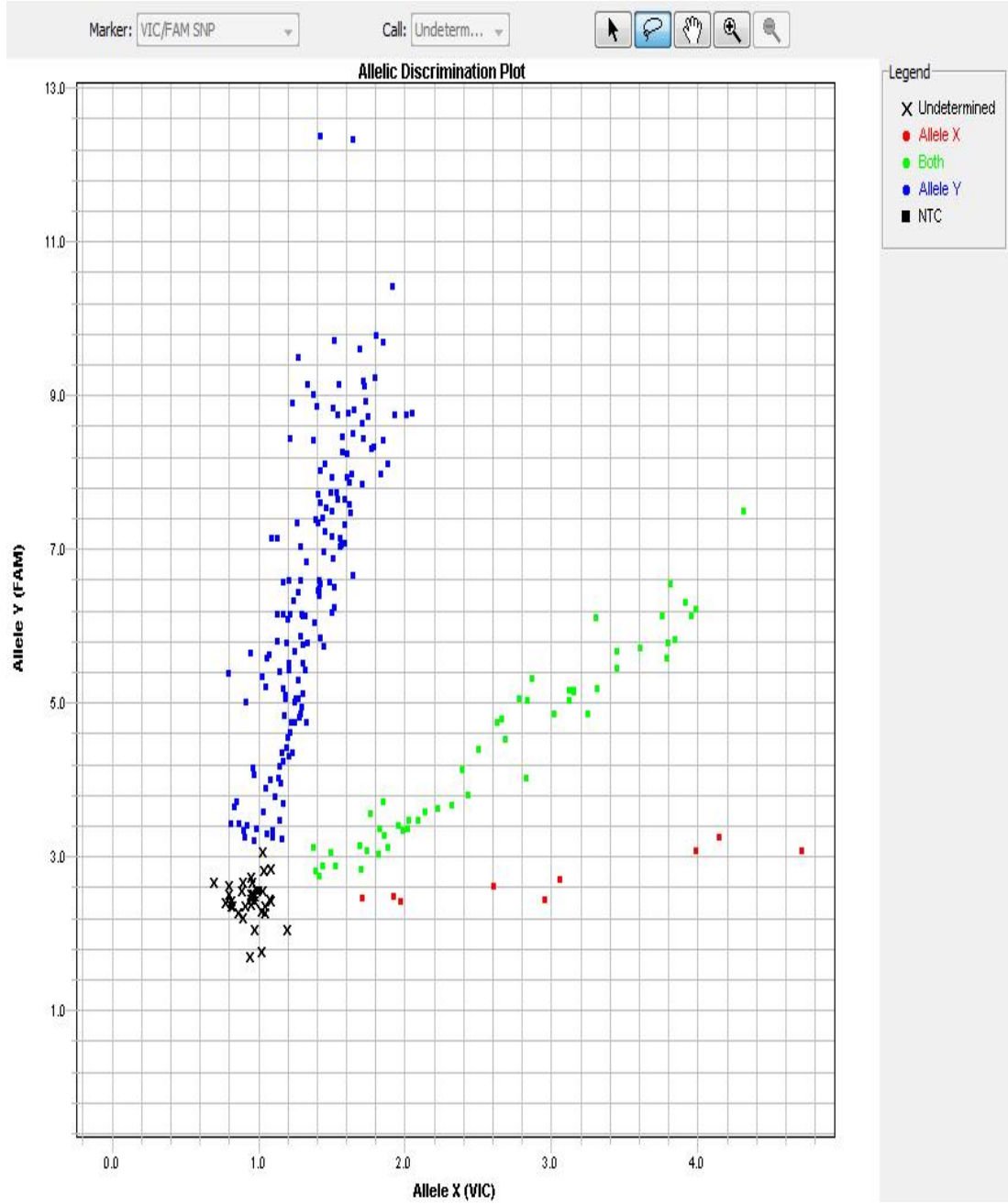
Rs 1784418 TNP' si için mavi renkteki örnekler TT allelini, kırmızı

renkteki plotlar CC allelini ve yeşil olan ise CT allelini ifade etmektedir (Şekil 3).



Şekil 4: rs 2235091 (KLK4) SNP bölgesinin allel dağılım grafiği

Rs 2235091 TNP' si için mavi renkteki örnekler GG allelini, kırmızı renkteki plotlar AA allelini ve yeşil olan ise GA allelini ifade etmektedir (Şekil 4).



Şekil 5: rs 198968 (KLK4) SNP bölgesinin allel dağılım grafiği

Rs 198968 TNP'si için mavi renkteki örnekler AA allelini, kırmızı renkteki plotlar GG allelini ve yeşil olan ise AG allelini ifade etmektedir (Şekil 5).

6.3 Genetik Bulgular

Çalışma grubundaki diş çürüğü olan 136 hasta ve çürüksüz bireylerden oluşan 123 kontrol grubu arasında MMP20 ve KLK4 gen polimorfizmleri açısından istatistiksel anlamlılık değerlendirmesi Ki-kare anlamlılık analizleri ile yapıldı. Hasta ve kontrol grubu arasındaki Allel dağılımlarına bakıldı ve karşılaştırma yapıldı. Bütün genotipler Hardy-Weinberg dengesindedir.

Yapılan gerçek zamanlı-PZR analizi sonucunda gruplar arasında MMP20 geninin rs1784418 polimorfik bölgesinde C Allelinin çalışma grubunda (diş çürüğü olan) görülme oranı %45,7 (118 kişi) ve kontrol grubunda %45,8 (110 kişi), olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. T allelinin kontrol grubunda bulunma oranı %54,1 (130 kişi), çalışma grubunda %54,2 (140 kişi) olarak bulunmuştur. Bu gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 17).

MMP20 geninin rs1784418 polimorfik bölgesinde TT, CT ve CC genotip frekansları çalışma grubunda sırasıyla %21,7 (28 kişi), %48,0 (62 kişi), %30,2 (39 kişi); kontrol grubunda ise sırayla %24,1 (29 kişi), %43,3 (52 kişi), ve %32,5 (39 kişi) olarak kayda geçmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmelere baktığımız zaman kontrol grubuyla hasta grupları arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadığı görülmüştür ($p>0,05$) (Tablo 18).

KLK4 geninin rs2235091 polimorfik bölgesinde G allelinin çalışma grubunda görülme oranı %14,3 (37 kişi) ve kontrol grubunda %17,1 (33 kişi) olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. A allelinin kontrol grubunda bulunma oranı %82,8 (159 kişi), çalışma grubunda %85,6 (221 kişi) olarak bulunmuştur. Bu gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 17).

KLK4 geninin rs2235091 polimorfik bölgesinde GG, GA ve AA genotip

frekansları çalışma grubunda sırasıyla %3,1 (4 kişi), %22,4 (29 kişi) ve %74,4 (96 kişi); kontrol grubunda ise sırasıyla %5,2 (5 kişi), %23,9 (23 kişi) ve %70,8 (68 kişi) olarak gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmelere bakıldığı zaman kontrol grubuyla çalışma grubu arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadığı görülmektedir ($p>0,05$) (Tablo 18).

Rs198968 polimorfizm bölgesindeki allellerin görülme oranlar ve gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar aşağıdaki gibidir; Bu polimorfik bölgedeki A allelinin kontrol grubunda %17,5 (34 kişi), çalışma grubunda %14,2 (37 kişi) olarak bulunmuştur. G allelinin kontrol grubunda bulunma oranı %82,4 (160 kişi) ve çalışma grubunda %85,7 (223 kişi) olarak bulunmuştur. Bu gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 17).

KLK4 geninin rs198968 polimorfik bölgesinde GG, AG ve AA genotip frekansları çalışma grubunda sırasıyla %3 (4 kişi), %22,3 (29 kişi) ve %74,6 (97 kişi); kontrol grubunda ise sırasıyla %5,15 (5 kişi), %24,7 (24 kişi) ve %70,1 (68 kişi) olarak gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmelere bakıldığı zaman, kontrol grubuyla hasta gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadığı görülmektedir ($p>0,05$) (Tablo 18).

Gen	rs#	Allel Dağılımı(%)				#p-değeri
		Kontrol Grubu		Çalışma Grubu		Allel
		d	D	d	D	
MMP20	rs1784418	110 (45,8) C	130(54,1) T	118 (45,7) C	140 (54,2) T	0,982
KLK4	rs2235091	33 (17,1) G	159(82,8) A	37 (14,3) G	221 (85,6) A	0,409
KLK4	rs198968	34 (17,5) A	160(82,4) G	37 (14,2) A	223 (85,7) G	0,339

Not: ddhomozigot; dD heterozigot; DD homozigot.

#p-değeri çalışma ve kontrol grubu arasındaki ilişkiyi belirtir; * istatistiksel önemli farklılıkları belirtir.

Tablo 17: Dişçürüğü olan ve dişçürüğü olmayan bireylerin allel dağılımı

Gen	rs#	Genotip Dağılımı(%)						#p-değeri
		Kontrol Grubu			Çalışma Grubu			
		dd	dD	DD	dd	dD	DD	
MMP20	rs1784418	29(24,1) CC	52(43,3) CT	39(32,5) TT	28(21,7) CC	62(48,0) CT	39(30,2) TT	0,751
KLK4	rs2235091	5(5,2) GG	23(23,9) GA	68(70,8) AA	4(3,1) GG	29(22,4) GA	96(74,4) AA	0,683
KLK4	rs198968	5(5,15) AA	24(24,7) AG	68(70,1) GG	4(3) AA	29(22,3) GA	97(74,6) GG	0,637

Not: dd homozigot; dD heterozigot; DD homozigot.

#p-değeri çalışma ve kontrol grubu arasındaki ilişkiyi belirtir; * istatistiksel önemli farklılıkları belirtir.

Tablo 18: Dişçürüğü olan ve dişçürüğü olmayan bireylerin genotip dağılımı

Değişkenler		Genotip	Tekdeğişkenli analiz		Çokdeğişkenli analiz	
	rs#		P-değeri	Odds Oranı (95%güven aralığı)	P-değeri	Odds Oranı (95%güven aralığı)
KLK4	rs2235091	AA	Referans	-	Referans	-
		AG	0,531	1,58(0,38-6,55)	0,518	1,65(0,36-7,57)
		GG	0,401	1,78(0,46-6,88)	0,467	1,70(0,40-7,18)
KLK4	rs198986	AA	Referans	-	Referans	-
		AG	0,265	0,43(0,09-1,90)	0,037*	0,15(0,03-0,89)
		GG	0,275	0,45(0,11-1,87)	0,040*	0,17(0,03-0,92)
MMP20	rs1784418	CC	Referans	-	Referans	-
		CT	0,484	1,25(0,66-2,37)	0,598	1,2(0,61-2,39)
		TT	0,919	1,04(0,52-2,05)	0,947	1,02(0,49-2,12)
Ortalama Yaş		-	0,0001*	2,19(1,55-3,10)	0,0002*	2,08(1,41-3,08)
İlk Diş Fırçalama Yaşı		-	0,0057*	1,41(1.10-1,80)	0,116	1,23(0,94-1,59)
Not: Çok değişkenli analizde her bir marker, yaş ve ilk diş fırçalama yaşına göre düzenlenmiştir Çok Değişkenli analizde yaş, tüm markerlar ve ilk diş fırçalama yaşına göre düzenlenmiştir. Çok Değişkenli analizde ilk diş fırçalama yaşı, tüm markerlar ve yaşa göre düzenlenmiştir.						

Tablo 19: Diş çürüğü oluşumunda etkili olan risk faktörlerinin belirlenmesinde uygulanan lojistik regresyon sonuçları

KLK4 geninin rs2235091 polimorfik bölgesinde bireylerin AG genotipini taşıması AA genotipini taşımasına göre diş çürüğü oluşumunda istatistiksel olarak etkili bir risk faktörü değildir ($p>0,05$ odds oranı 1,58, güven aralığı 0,38-6,55).

KLK4 geninin rs2235091 polimorfik bölgesinde bireylerin GG genotipini taşıması AA genotipini taşımasına göre diş çürüğü oluşumunda istatistiksel olarak etkili bir risk faktörü değildir ($p>0,05$ odds oranı 1,78, güven aralığı 0,46-6,88) (Tablo 19).

KLK4 geninin rs198986 polimorfik bölgesinde bireylerin AG genotipini taşıması AA genotipini taşımasına göre diş çürüğü oluşumunda istatistiksel olarak etkili bir risk faktörü değildir ($p>0,05$ odds oranı 0.43, güven aralığı 0.09-1.90).

KLK4 geninin rs198986 polimorfik bölgesinde bireylerin GG genotipini taşıması AA genotipini taşımasına göre diş çürüğü oluşumunda istatistiksel olarak etkili bir risk faktörü değildir ($p>0,05$ odds oranı 0,45, güven aralığı 0,11-1,87)(Tablo 19).

MMP20 geninin rs1784418 polimorfik bölgesinde bireylerin CT genotipini taşıması CC genotipini taşımasına göre diş çürüğü oluşumunda istatistiksel olarak etkili bir risk faktörü değildir ($p>0,05$ odds oranı 1,25, güven aralığı 0,66-2,37).

MMP20 geninin rs1784418 polimorfik bölgesinde Bireylerin TT genotipini taşıması CC genotipini taşımasına göre diş çürüğü oluşumunda istatistiksel olarak etkili bir risk faktörü değildir ($p>0,05$ odds oranı 1,04, güven aralığı 0,52-2,05) (Tablo 19).

Çokdeğişkenli analizde, ortalama yaş, ilk diş fırçalama yaşı, rs2235091 ve rs1784418 değişkenleri birlikte değerlendirildiği zaman, KLK4 geninin rs198968 polimorfik bölgesinde GG genotipini taşımasının, AA genotipini taşımasına göre diş çürüğü oluşumuna karşı 0,17 kat daha fazla koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir ($p<0,05$ odds oranı 0,17, güven aralığı 0,03-0,92).

Çok değişkenli analizde, ortalama yaş, ilk diş fırçalama yaşı, rs2235091 ve rs1784418 değişkenleri birlikte değerlendirildiği zaman, KLK4 geninin rs198968 polimorfik bölgesinde GA genotipini taşımasının da AA genotipini taşımasına göre diş çürüğü oluşumuna karşı 0,15 kat daha fazla koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir ($p<0,05$ odds oranı 0,15, güven aralığı 0,03-0,89)(Tablo 19).

Çok değişkenli analizde, ilk diş fırçalama yaşı, rs 2235091, rs1784418 ve rs 198968 değişkenleri birlikte değerlendirildiği zaman, bireylerin ortalama yaş artışının diş çürüğü oluşumuna 2,08 kat daha fazla etkili bir risk faktörü olduğunu göstermektedir ($p<0,05$ odds oranı 2,08, güven aralığı 1,41-3,08) (Tablo 19).

Çok değişkenli analizde, ortalama yaş, rs 2235091, rs1784418 ve rs 198968 değişkenleri birlikte değerlendirildiği zaman ilk diş fırçalama yaşı, diş çürüğü oluşumunda etkili bir risk faktörü değildir ($p>0,05$ odds oranı 1,23, güven aralığı 0,94-1,59) (Tablo 19).

.

7. TARTIŞMA

Bulaşıcı bir enfeksiyon hastalığı olarak tanımlanan diş çürüğünün özellikle çocuklar için başlıca ağız sağlığı sorunu olduğu ve erişkinlerin büyük çoğunluğunda ve okul çağındaki çocuklarda %60-90 oranında görüldüğü bildirilmektedir(Saxena, Li and Caufield 2005, Tao et al 2005 ,The World Oral Health Report 2003).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın 1999 Kopenhag Zirvesi'nde; 2020 yılına kadar 6 yaşındaki bireylerin en az %80'inin çürüksüz olması ve 12 yaşındaki bireylerin ortalama DMFT indeksinin 1,5'tan düşük olmasının hedeflendiği belirtilmektedir (Whobdell, Petersen, Clarkson and Johnson 2003).Gelişmekte olan Batı ülkelerinde son 20-25 yıldır diş çürüğü prevalansında hızlı bir düşüş görülmesine rağmen, aynı çevresel faktörlere sahip bazı bireylerde yüksek çürük aktivitesi bulunması, bazılarında ise hiç diş çürüğünün bulunmaması nedeniyle bu konudaki çalışmalar devam etmektedir (Tenovuo1991).

Çürük, birbirini izleyen olaylar dizisidir. Bireyler arasında çürüğe yatkınlığın farklı oluşu bilinen bir gerçektir. Asit ataklarına sebep olabilen kolay fermente olan karbonhidratların alınma sıklığı, şekli ve miktarındaki farklılıklar, çürük oluşumunu etkilemesine rağmen karşılaştırma yapıldığında çürük oluşumuna sebep olan başka faktörlerin olduğu akla gelmektedir. Bu aşamada herediter(genetik) faktörlerin çürük gelişimini etkileyebileceği düşünülmektedir (Özata ve Kaya 2001).

Genetik bilimi her geçen gün gelişmekte, yeni çıkan teknolojik imkanlar kullanılarak hastalıkların etiyolojisi daha detaylı olarak incelenip nedenlerinin tam olarak anlaşılması hususunda yol alınmaktadır. İnsan Genom Projesi bittikten sonra hangi genlerin hangi proteinleri kodladığı açığa çıkmış, bu sayede tündengelim metodu kullanılarak bir protein ile alakalı bozukluk ve hastalıkların genetik altyapısına inilmeye başlanmıştır. Günümüzde de bu çalışmalar hızla

devam etmektedir (İşman 2007).

Tüm bu sonuçlara baktığımızda, MMP20 ve KLK4 gen polimorfizmlerinin çürükle ilişkisinin olup olmadığının belirlenmesine bağlı koruyucu önlemlerin alınmasını sağlamak, bu çalışmanın başlıca amaçları arasında yer almaktadır.

Diş çürüğü; coğrafik, sosyolojik, ekonomik, biyolojik, davranışsal ve fizyolojik faktörlerin oluşturduğu çevresel faktörler ile bireye ait genetik faktörlerin karmaşık bir etkileşimi olarak ortaya çıkmaktadır (Zero 1999). Dolayısıyla bir bireyin çürük durumu, çevresel faktörlerin yaşam boyu süregelen birikimini yansıtmaktadır (Nicolau, Marcenes, Bartley and Sheiham 2003). Bu nedenle farklı coğrafik bölgelerde yaşayan çocuklarda çürük görülme sıklığı değişkenlik göstermektedir (Stecksen-Blicks, Arvidsson and Hom 1985, Blinkhorn and Davies 1996, Freire et al 1996, Pine, Burnside and Craven 2003). Buna göre, biyolojik faktörlerle birlikte sosyal ve fizyolojik faktörlerin çürük prevalansı üzerindeki etkilerinin birlikte değerlendirildiği araştırmaların, kozmopolit karakteri nedeniyle, şehirde yaşayan çocuk popülasyonu üzerinde yapılması önerilmektedir (Tinanoff 1995).

Çalışmamızda ise araştırma kapsamına alınacak çocukların kültürel, sosyal, ekonomik, davranışsal açıdan birbirine benzeyen ailelerden gelmesi ve standart bir toplumu temsil etmesi öngörülse de, çocukların sosyo-ekonomik durumları net olarak tespit edilemedi. Çalışmaya katılan gönüllüler aynı alanda değerlendirildi.

Bu çalışmada yer alan toplam 259 bireyden, 123'ü çürük olmayan, 136'sı çürük deneyimi olan çocuklardır. Gruplar arası yaş ortalamaları karşılaştırıldığında diş çürüğü bulunan çocukların yaşı, diş çürüğü bulunmayan çocukların yaşına göre istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde büyük olduğu tespit edilmiştir ($p=0,000$). Benzer şekilde Wang ve ark. (2012), aralığı 2-7 olan 575 çocuğun dahil olduğu araştırmada, 5 yaşından küçük çocuklarda dmft skoru 2'iken,

5-6 yaş aralığındaki çocuklardaki DMFT skorunun 3 olarak büyüdüğü tespit edilmiştir. Tannure ve ark. (2012) yaptıkları araştırma sonuçları ile paralellik göstermemektedir. Bu çalışmaya göre 388 birey içinde 161'i (%41,5) dişinde çürük olmayan, 41'i (%10,6) düşük, 63'ü (%16,2) orta ve 123'ü (%31,7) yüksek çürük deneyimiyle gelen çocuklar olarak saptanmıştır. Dişlerinde çürük olmayan çocukların yaşı çürük olanların yaşına göre daha büyük bulunmuştur ($p=0,01$). Benzer şekilde Patır ve ark. (2008), diş çürüğü bulunmayan çocukların yaşı, diş çürüğü bulunan çocukların yaşına göre daha büyük bulmuşlardır. Fakat Kapdan ve ark. (2010), 3-6 yaş aralığındaki 1,244 çocuk üzerinde yaptıkları çalışmada, $df(t)$ indeks değerleri 3 yaş grubunda 1,63; 4 yaş grubunda 2,72; 5 yaş grubunda 3,04; 6 yaş grubunda 3,64 olarak hesaplanmışlardır. Yaşlara göre $df(t)$ değerleri karşılaştırıldığında farklılık önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Doğum ağırlığı 2,500 gramın altında olan yenidoğan bebekler, düşük doğum ağırlıklı olarak ifade edilmektedir. Kemik mineral yoğunluğu, düşük doğum ağırlığı olan infantlarda normal ağırlıkta doğan infantlara göre düşük olduğu görülmüştür. Fakat 2 yaşına kadar hızlı bir şekilde kemik mineral yoğunluğu artış göstermektedir. Bu bulgular ışığında düşük doğum ağırlığının, süt dişlerindeki mine defektleri ve diş çürükleri ile ilişkili olabileceği söylenmektedir. Aynı zamanda gelişimsel mine defektlerinin normal mineye göre diş çürüğü oluşumuna daha yatkın olduğu belirtilmiştir (Burt and Pai 2001). Çalışmamızda diş çürüğü bulunan grubun ortalama doğum kilosu 3,210 gram, kontrol grubunun ortalama doğum kilosu 3,250 gram olarak bulunmuştur. Doğum kilosunun gruplara göre dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Wang ve ark. (2012), diş fırçalama sıklığı ($p=0,02/0,07$) ile içme suyundan flor alımının ($p=0,002/0,02$) diş çürüğü oluşumunda koruyucu etkiye sahip olduklarını bulmuşlardır. Tannure ve ark. (2012), yaptığı çalışmada ise çocukların florlu su sağlanan bir coğrafi alanda yaşadığı ve bütün deneklerin florlu macun kullandıkları tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada, örneklerini içme suyundan flor alıp almadığına bakılmış, DMFT indeksi ile florlu veya fluorsuz

içme suyu bulunan bölgeler arasında önemli bir farklılık tespit edilmemiştir (Kang, Yoon, Lee and Cho 2011). Bu çalışmada ise İstanbul'da tüketilen içme sularındaki fluor miktarları hakkında net bir bilgi bulunmadığı için araştırmaya bu veriler dâhil edilmemiştir. Fakat grupların standardizasyonu açısından sistemik veya topikal fluor uygulanmamış bireyler çalışmaya dâhil edilmiştir.

Araştırmamızda ilk diş fırçalama yaşı açısından karşılaştırma sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0,003$; $OR=0,707$; $0,553-0,904$). Diş çürüğü bulunan grubun yaşı, kontrol grubunun yaşına göre büyük bulunmuştur. Bu nedenle ağız ve diş sağlığının korunmasında, diş fırçalamaya nedeli erken başlanırsa o kadar iyidir. Doğumdan itibaren çocuğun diş etleri yumuşak bir fırçayla ve su ile temizlenmelidir. İlk dişin sürmesiyle birlikte çocuğun ağız diş sağlığı için vakit ayrılmalıdır. Çocuklar için ağız hijyeninin önem kazandığı bir diğer dönem ise süt dişlerinin tamamlandığı 2,5-3 yaşa kadar ki süredir. Bu dönemde biberon çürüklerine sık rastlanır (Akıncı 2008).

Diş fırçalama sıklığının diş çürüğü gelişimi üzerinde etkisi olduğu gösterildiğinden (Campus, Lumbau, Lai, Solinas and Castiglia 2001, Sundby ve Petersen 2003) kötü bir oral hijyen, çürük oluşumu için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmiştir (Grindejford, Dahloff and Modeer 1995). Günde 1 kezden daha az diş fırçalamanın çocuklarda diş çürüğü gelişimini önemli derecede etkilediği belirtilerek, dişlerin en az günde 1 kez fırçalanması gerektiğine dikkat çekilmiştir (Vanobbergen, Martens, Lesaffre, Bogaerts and Declerck 2001a, 2001b). Bu nedenlerden ötürü çalışmamıza katılan bireylerin uyumadan önce diş fırçalama alışkanlığı ve diş fırçalama sıklığı ile ilgili verileri toplanmış, fakat diş çürüğü bulunan grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Bireylere küçük yaşlarda doğru beslenme alışkanlıkları kazandırmanın daha etkili ve kalıcı olduğu bilinmektedir. Yanlış beslenme alışkanlıkları, ağız sağlığının bozulmasına, çocuk ve gençlerde diş çürüklerinin oldukça fazla görülmesine yol açmaktadır. Tannure ve ark. (2012), çalışmaya dâhil edilen bireyler

arasında öğünler arası şeker tüketiminin diş çürüğü oluşumunda etkili olduğunu tespit etmişlerdir (0,001). Bu çalışmada ise diğer çalışmalardan farklı olarak, diş çürüğü bulunan grubun ortalama ara öğün sayısı 2,59, kontrol grubunun ortalama ara öğün sayısı 2,39 olarak bulunmuştur. Ara öğün sayılarının gruplara göre dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Aynı zamanda haftalık ortalama şekerli ve asidik içecek tüketimi gruplara göre dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Ramos-Gomez ve ark.(1999), biberon bırakma yaşı ile çocuklardaki diş çürüğü durumu arasında doğrudan bir ilişki olmadığını belirtmelerine rağmen yapılan çalışmaların çoğu uzun süre biberon kullanımının çürük olasılığını arttırdığını göstermiştir (King, Pittter and Edwards 1983, Litt et al 1995; Dini, Holt and Bedi 2000; Kiwanuka, Astrom and Trovik 2004). Çalışmamızda ise gruplar arasında karşılaştırmada, biberon kullanımı ve biberon kullanım süresi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Moleküler epidemiyoloji çalışmalarında yanak içi sürüntü toplama daha ucuz, daha az zaman alan, en az invazif, laboratuvar şartlarında en az risk taşıyan yöntemdir (Gustaaf et al 2009). Çalışmamızda, Tannure ve ark. (2012), Azevedo ve ark.(2010) ile benzer şekilde yanak içi sürüntüsü ile DNA örneklerini topladık.

TaqMan PZR yönteminde primerlerin yanı sıra bir prob (modifiye edilmiş DNA oligonükleotid) kullanılır. Bu prob bilinen forward ve reverse primerlerin arasında hedef sekansa tutunmaya (annealing) uygun seçilir. Probun 5' ucunda reporter, 3' ucunda ise quencher (Q) florofor bulunur. Sönümleyici (Q) florofor genellikle uzun dalga boyuna sahip renkli bir boyadır ve reporter (R) floroforun floresansını durdurur. Reporter florofor genellikle kısa dalga boyuna sahip renkli bir boyadır. PZR işlemi sırasında denatürasyonu takiben TaqMan prob ve primerler 60°C de hedefe birlikte tutunurlar. Taq polimeraz primere dNTP'leri eklerken 5'-3' nükleaz aktivitesi ile karşılaştığı probu 5' ucundan başlayarak degrade eder. PZR sikluslarında eğer hedef DNA mevcut ise gittikçe artan oranda prob yıkılır ve her döngüde daha çok florofor serbest kalır. Sonuçta ışıma gittikçe

artar. Toplam enerji bilgisayar programı tarafından bilinen konsantrasyonlarda eklenmiş pozitif kontrol ile oluşturulan enerjiye kıyasla sayısal veriye dönüştürülür. TaqMan PZR, klasik PZR'a göre daha duyarlı ve özgün bir yöntemdir (Livak et al 1995). Bizim çalışmamıza benzer şekilde Tannure ve ark. (2012), KÜCHLER ve ark., PATIR ve ark. (2008), WENDELL ve ark. (2010), DEELEY ve ark. (2008), çalışmalarında TaqMan PZR yöntemini kullanmışlardır.

Floresanışma tekniklerinin rol aldığı hassas ölçüm aletlerinin PZR sistemine entegre edilmesi ile birlikte, reaksiyonun gerçek zamanlı ("Real Time") olarak izlenmesi ve müdahale edilmesi (örn. PZR döngülerinin sayısının vb. değiştirilmesi) mümkün hale gelmiştir. Ürün analizinin gerçek zamanlı yapılabilirdiği bu sistemlerde; PZR sonrası ikincil analiz (jel elektroforez, vb.) işlemlerinin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Böylece verimlilik artmakta, kontaminasyon riski ise azalmaktadır. Fakat çalışmamızda gerçek zamanlı-PZR yönteminden önce jel elektroforez uygulanarak izole ettiğimiz DNA'ların miktarını ve yoğunluğunu tespit etmiş olduk (Temizkan ve Arda 2005).

Gerçek zamanlı-PZR sistemlerinin başlıca avantajları, spesifik olmayan amplifikasyonlar analiz sonuçlarını etkileyememekte ve gerçek zamanlı analiz yapılabilir. Yaklaşık 30dk ile 2 saat arasında değişebilen hızlı döngü süreleri genel işlem süresini kısaltmaktadır. Dinamik aralık 10¹⁰'a kadar genişleyebilmektedir. Spesifik erime eğrisi analizleri (Melting Curve) ve spesifik amplifikasyonlar kolayca tanımlanabilir. Yüksek duyarlılık, özgüllük ve tekrarlanabilirliğe sahiptir. Sonuç olarak fonksiyon-fiyat oranı açısından konvansiyonel PZR'dan daha ekonomiktir. Bu nedenlerden ötürü bu çalışmada, gerçek zamanlı-PZR cihazı tercih edildi. Benzer şekilde Deeley ve ark. (2008), Wendell ve ark. (2010), KÜCHLER ve ark. (2011), Tannure ve ark. (2012), Wang ve ark. (2012) da çalışmalarında gerçek zamanlı-PZR cihazını kullanmışlardır.

MMP20 amelogenezin salgılama safhasında ameloblastini meydana getiren enzimlerden biridir (Chun et al 2010). MMP 20 gen ekspresyonu ODAM

(Odontojenik Ameloblast Bağlantılı Protein) ve RUNX2 (Runx2 Bağlantılı Transkripsiyon Faktörü 2) ile düzenlenmektedir (Lee et al 2010). Fonksiyonel Mmp20 üretmeyen fareler üzerinde yapılan bir araştırmada, yapı olarak ince ve anormal mine ürettikleri gözlemlenmiştir (Smith 2011). İnsanlarda, MMP20 haploetersizliğinin amelogenezis imperfektaya yol açtığı düşünülmektedir. MMP20'deki genetik varyasyonlar ve yüksek çürük yatkınlığı arasındaki bağlantı ışığında, hipomorfik MMP20'nin insanlarda çürüğe yatkınlığı, mine gelişimini değiştirerek etki ettiği düşünülmektedir (Lee et al 2010).

Intronlar, DNA'da birbirine komşu eksonları ayıran kodlanmayan DNA sekanslarıdır. Gen ekspresyonu sırasında intronlar mRNA'ya çevrilmektedir; fakat sonra intron dizileri pre-mRNA'dan ayrılmaktadır. Ne kadar polimorfizmimiz intronik bir bölgede bulunsan da, gen ekspresyonunu düzenleyen enzimatik fonksiyonel aktiviteleri değiştirebilmektedir. Daha önceki çalışmalar bu polimorfik çeşitliliğin diş agenezi (Kuchler et al 2011) ve böbrek yaşlanmasıyla ilgili olduğunu ortaya koymuştur (Wheeler 2009). Hipotezimiz bu genetik çeşitliliğin (rs1784418) transkripsiyon işlemi sırasında, MMP20 seviyelerini etkileyebileceği düşünülerek diş çürüğü ile ilişkili olabileceğidir.

Araştırmamızda, MMP20 geninin rs1784418 polimorfik bölgesinde C Allelinin diş çürüğü olan grupta görülme oranı %45,7 ve kontrol grubunda %45,8 olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Tannure ve ark. (2012), benzer şekilde MMP20 geninin rs 1784418 polimorfik bölgesindeki C Allelinin, diş çürüğü olan grupta görülme oranı %40,6 ve kontrol grubunda %59,3 olarak bulmuştur. T allelinin diş çürüğü olan grupta görülme oranı %57,4 iken kontrol grubunda %42,5 olarak bulunmuştur. T ve C allel sonuçları ayrı olarak değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bizim çalışmamızda T allelinin kontrol grubunda bulunma oranı %54,1, çalışma grubunda %54, olarak bulunmuştur. Bu gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Wang ve ark. (2012), 575 çocuk üzerinde yaptıkları çalışmada bizimkinden farklı olarak MMP20 geninin rs 2245803 ve rs7109663 polimorfik bölgelerine, bizim araştırmamıza benzer olarak ise rs 1784418 polimorfik bölgelerine bakmışlardır. Diş çürüğü bulunan ve kontrol grupları allel dağılımları açısından değerlendirildiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tannure ve ark.'nın (2012) 5-14 yaş aralığındaki 388 çocuktan alınan örneklerle yaptıkları çalışmada, TT, CT ve CC genotip frekansları diş çürüğü bulunan grupta sırasıyla %61,0 (47 kişi), %54,2 (96 kişi), %62,6 (84 kişi); kontrol grubunda ise sırayla %38,9 (30 kişi), %45,7 (81 kişi), ve %37,3 (50 kişi) olarak bulunmuşlardır. Kontrol grubuyla diş çürüğü bulunan grup arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Bizim sonuçlarımız da bu çalışmayla paralellik göstermektedir. TT, CT ve CC genotip frekansları çalışma grubunda sırasıyla %21,7 (28 kişi), %48,0 (62 kişi), %30,2 (39 kişi); kontrol grubunda ise sırayla %24,1 (29 kişi), %43,3 (52 kişi), ve %39 (32,5) olarak kayda geçmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmelere baktığımız zaman kontrol grubuyla hasta grupları arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Araştırmamızda KLK4 geninin rs2235091 polimorfik bölgesinde G allelinin çalışma grubunda görülme oranı %14,3 ve kontrol grubunda %17,1 olarak bulunurken, A allelinin kontrol grubunda bulunma oranı %82,8, çalışma grubunda %85,6 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz A ve G allelleri için ayrı olarak değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bizim sonuçlarımız Wang ve ark. (2012) yaptığı çalışmayla paralellik göstermemektedir. KLK4 geninin rs2235091 polimorfik bölgesinde A alleli ile diş çürüğü arasında anlamlı bir ilişki olduğunu bulunmuşlardır ($p=0,02$). G alleli ile diş çürüğü arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığını tespit etmişlerdir ($p=0,18$).

Düz ve pit/fissür yüzeyleri olarak iki gruba böldüklerinde ise, KLK4

geninin rs2235091 polimorfik bölgesinde AG haplotipinin pit ve fissür yüzeylerindeki çürük oluşumuna karşı koruyucu etkiye sahip olduğu, GG haplotipinin ise düz yüzeylerde çürük duyarlılığını arttıran bir etkisi olduğu bildirilmiştir (Wang et al 2012).

Wang ve ark. (2012), KLK4 geninin rs198969 TNP bölgesini incelerken çalışmamızda daha önceden dizayn edilmiş KLK4 geninin rs 19868 TNP bölgesi ile diş çürükleri arasındaki ilişkiyi değerlendirdik.

Düşük sosyo-ekonomik seviye, kötü ağızhijyeni alışkanlıkları, çürük yapan beslenme şekli ve karşılanmamış dental bakım ihtiyaçları çürük gelişiminde rol oynayan çevresel faktörlerdir. Fakat bütün bu faktörlerin birleşimi, hastalık sonucunu tamamen açıklayamamaktadır (Werneck, Mira and Trevilatto 2010). Aynı seviyede çevresel faktörlere mağruz kalan kişilerin DMFT indekslerinde farklılıklar gösterdiğine dair kanıtlar genetik faktörlerin hastalık etiopatogenezinde rolü olduğunu göstermektedir (Pine 2003).

Tannure ve ark. (2012) yaptığı çalışmada, MMP20 genotiplerinin etnik arka plana ve diyet alışkanlıklarına bağlı olarak çürüğe yatkınlıkla ilgili olduğunu ortaya koymuşlardır. Öğünler arası şeker atıştıran ve rs1784418 T alleleline sahip beyazların %74,61'inin çürük oluşturma riski olduğunu gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda ise bireylerin yaşı, ilkdış fırçalama yaşlarının ve rs1784418 polimorfik bölgesindeki TT, CC ve CT genotipleri ile çürük oluşumu arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (CT genotipi için Odds Oranı:1,2, TT genotipi için Odds Oranı:1,02).

İncelenen tüm dışsal faktörler arasında sadece yaş ve ilk diş fırçalamanın ne zaman olduğu diş çürüğü oluşumuyla ilişkili bulunmuştur. Bu nedenle bu unsurlar, çokdeğişkenli incelemeye eşdeğişken olarak dâhil edilmiştir. Diş çürüğünün muhtemel altyapı olarak genetik ve çevresel faktörlerin bir kombinasyonu olduğu bilinmektedir. Bu yüzden çevresel etkenler ve genetik

değişikliklerin açıklanmasında sıklıkla kullanılan çok değişkenli analiz, genetik incelemeler için çok uygundur (Leboyer et al 1998).

Araştırmamızda çok değişkenli lojistik regresyon analizi kullanılmıştır. KLK4 geninin rs198968 polimorfik bölgesinde GG genotipini taşımanın, AA genotipini taşımaya göre diş çürüğü oluşumuna karşı 0,17 kat daha fazla koruyucu etkisi olduğunu; GA genotipini taşımanın da AA genotipini taşımaya göre diş çürüğü oluşumuna karşı 0,15 kat daha fazla koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur.

MMP20 ve KLK4'teki mutasyonlar daha önce diş minesi eksikliğine neden olan amelogenesis imperfekta'da incelenmiştir (Özdemir et al 2005). Bu sayede, bu genlerin ortak genetik değişikliklerine dayanan hipotezin, diş minesinin belirti göstermeyen değişimlerini ve sonuç olarak da çürük duyarlılığındaki farklılıklarını gösterebileceği bildirilmiştir.

Toplumlararası gen polimorfizmlerinin farklı kombinasyonlarından dolayı ırklar arasında bir polimorfizmin etkisi farklı sonuçlara neden olabilmektedir. Bu sonuçlara çevresel faktörlerin farklılığı da eklendiğinde polimorfizmlerin sonuçları popülasyonlar arasında daha çok değişebilmektedir. Polimorfizmlerin genel frekansı etnik popülasyonlar arasında değişmektedir. Tannure ve ark. (2012), Kafkas kökenli çocuklarda MMP20 (rs1784418) genotip dağılımında çürüğü olmayan ve çürüklü çocuklar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlerken ($p=0,03$), aynı zamanda kötü ağız hijyeni olan çürük deneyimi olan çocuklarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0,02$). Fakat bu farklılıklar Afrika kökenli çocuklarda görülmemiştir. Afrika kökenli ve beyazlar arasında genotip dağılımındaki farklılıklar incelendiğinde Afrika kökenlilerde daha yüksek bir sıklıkta T alleli olduğu tespit edilmiştir. Bu allelin çürüğün ilerlemesini engelleyen koruyucu bir etkisi olabileceği üzerinde durulmuştur.

Brezilya'da yapılan bir araştırmada ise beyaz çocukların diğer etnik gruplara göre daha fazla çürük deneyimine sahip olabileceklerini tespit

etmişlerdir(Souza, Arrillaga, Ochoa and Rocha 1967). Ayrıca, Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2003 raporuna göre Afrika kökenli kişilerin tarihsel olarak daha az çürük deneyimine sahip olduklarını açıklamıştır(World Health Org).MMP20 ve KLK4 gen polimorfizmleri ve diş çürükleri ilişkisinin incelendiği Türk toplumuna ait bir araştırma bulunmamaktadır. Araştırmamızdaki kişilerin etnik kökenleri hakkında bilgilere ulaşamadığımız için değerlendirmeye alınamadı. Fakat İstanbul'da yaşayan toplumun %75'i Türk, geri kalan kısmın farklı etnik kökenlere sahip olduğu bildirilmiştir (Kürt, Yahudi, Ermeni, Yunan, vb.).

TNP'lerin, protein ekspresyonunu değiştirmesi hipotezi üzerine araştırma yapmak çok zordur. Aminoasit değiştiren kodlayan TNPlar'ın gen transkripsiyonu üzerine etkilerini araştırmak genelde ince çalışılmış araştırmalar ve in vitro sistem analizi kullanılmasını gerektirmektedir. Fakat bu yaklaşım intronik alanlarda TNP'lerin fonksiyonelliğini, bilinmeyen düzenleyici elemanları veya intergenik alanları ölçmeye izin vermemektedir(Olivier 2004).

Mine gelişiminin çürük riskini artıracak kadar etkilenip etkilenmediği ve MMP20 ekspresyonları altında gelişen minenin demineralizasyona daha yatkın olup olmadığına bağlı bir araştırma tasarlanmasının çok zor olduğunu düşünmekteyiz.

Hem diş çürüğünün moleküler alt yapısını anlama adına hem de değişik popülasyonlardaki varyasyonları incelemek ve değişken fenotiplerle genetik varyantlar arasındaki ilişkiyi daha iyi açıklamak adına ileride yapılacak çalışmalar hem KLK4 genini hem diğer aday genleri mercek altına almalıdır. Bu çalışmaların daha yüksek örneklem büyüklüğü ve daha net sonuç verdiği kanıtlanan güncel laboratuvar teknikleriyle desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Aynı zamanda KLK4 ve MMP20 gen polimorfizmlerinin fonksiyonel olup olmadığını ortaya koymak için genotip ve/veya allel frekansıyla ekspresyon çalışmaları için daha ileri araştırmalar yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak: Diş çürüklerinin kompleks oluşu, Mendelyen kalıtım modeli göstermemesi ve enfeksiyon ortamlı olması, tipik bir genotip-fenotip ilişkisinin kurulmasını engellemektedir. Türk toplumunu içeren daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle her toplumda olduğu gibi Türk toplumunda da diş çürüğü olan bireylerin incelenmesinde çevresel faktörlerin ve bundan sonraki araştırmalarla açığa çıkacak genetik etmenlerin göz önünde bulundurulduğu genetik birimlere ihtiyaç vardır.

Türk toplumundaki çocuklar arasında MMP20 ve KLK4 gen polimorfizmleri ile diş çürükleri arasındaki ilişkinin incelendiği ilk çalışma olması açısından önem taşımaktadır.

Bireyin çürük riskinin tahmin edilebilmesi genetik ve diş çürüğünü beraber ele alan çalışmalar için büyük bir ilerleme sağlayacaktır. Fakat bu metotlar hala görünür lezyonların fark edilmesine dayanmaktadır. Çürük yatkınlığını değiştirebilecek genetik varyantları tanımlayan çalışmamız, diş yapısının geri dönüşümsüz biçimde kaybedilmeden risk altındaki kişilerin belirlenmesini sağlayacaktır.

7.1 SONUÇLAR

MMP20 (Matriks Metalloproteinaz-20) ve KLK4 (Kallikrein 4) gen polimorfizmleri ile diş çürükleri arasındaki ilişkiyi incelediğimiz çalışmamızın sonuçları aşağıdaki gibidir:

1. Diş çürüğü bulunan ve bulunmayan gruplara göre yapılan karşılaştırmada cinsiyetin gruplara göre dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$). Gruplara göre karşılaştırmalar sonucunda, gruplar arasında doğum ağırlığı, boy uzunlukları ve şu anki ağırlıkları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$).
2. Gruplar arasında karşılaştırmada biberon kullanımı, biberon kullananların süre ortalamaları ve süt içeriği dağılımı karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$). Süt tüketimi, ara öğün sayısı, şekerli ve asidik içecek tüketim sıklığı ve diş fırçalama sıklığı bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$).
3. Gruplar arasında ilk diş fırçalama zamanı açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,003$; OR=0,707; 0,553-0,904). Çürük deneyimli grubun ilk diş fırçalama yaşı (4,368; 1,0170) çürüksüz gruba (3,976; 1,1556) göre daha yüksek bulunmuştur.
4. Yaş ortalamaları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Çalışma grubunun yaş ortalaması kontrol grubuna göre daha fazladır. Dişlerinde çürük olan çocuklar çürük olmayanlara göre daha yaşlı büyük bulunmuştur ($p=0,000$).
5. MMP20 geninin rs1784418 polimorfik bölgesinde TT, CT ve CC genotip genotiplerinde kontrol grubuyla çalışma grubu arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadığı görülmektedir ($p>0,05$).
6. KLK4 geninin rs2235091 polimorfik bölgesindeki GG, GA ve AA genotiplerinde kontrol grubuyla çalışma grubu arasında istatistiksel açıdan önemli

bir fark bulunmadığı görülmektedir ($p>0,05$).

7. KLK4 geninin rs198968 polimorfik bölgesinde GG, AG ve AA genotiplerinde kontrol grubuyla çalışma grubu arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadığı görülmektedir ($p>0,05$).

8. Çokdeğişkenli analizde KLK4 geninin rs2235091 bölgesi ile MMP20 geninin rs1784418 bölgesi, diş çürüğü oluşumuyla ilişkili bulunmamıştır.

9. Çok değişkenli analizde, ortalama yaş, rs 2235091, rs1784418 ve rs 198968 değişkenleri birlikte değerlendirildiği zaman ilk diş fırçalama yaşı, diş çürüğü oluşumunda etkili bir risk faktörü değildir .

10. Çokdeğişkenli analizde, ortalamayaş, ilk diş fırçalama yaşı, rs2235091 ve rs1784418 değişkenleri birlikte değerlendirildiği zaman KLK4 geninin rs198968 polimorfik bölgesinde GG genotipini taşımasının, AA genotipini taşımasına göre diş çürüğü oluşumuna karşı 0,17 kat daha fazla koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir. GA genotipini taşımasının da AA genotipini taşımasına göre diş çürüğü oluşumuna karşı 0,15 kat fazla koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.

11. Çok değişkenli analizde, ilk diş fırçalama yaşı, rs 2235091, rs1784418 ve rs 198968 değişkenleri birlikte değerlendirildiği zaman, bireylerin ortalama yaş artışının diş çürüğü oluşumuna 2,08 kat daha fazla etkili bir risk faktörü olduğunu göstermektedir .

Sonuç olarak, diş çürüğü oluşumunda genetik faktörlerin de etkili olduğu, çevresel faktörlerin tek başına etkili olmadığı, diş çürüğü riskini bu iki faktörün birlikte arttırdığı saptanmıştır.

Çürük oluşumuna yatkınlık oluşturan allellerin saptanması bu allellere sahip bireylerde, çürük oluşumuna neden olan çevresel faktörlerin kısıtlanması ve ağız hijyeninin artırılması yoluyla diş hekimlerinin daha etkili ve koruyucu tedaviler sunmalarına olanak sağlayacaktır.

8.KAYNAKLAR

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. (1994). Molecular Biology of the Cell. 3rd ed, Garland Publishing Inc., New York.
2. Aldred MJ, Savarirayan R, Lamande SR, Crawford PJM.(2002).Clinical and radiographic features of a family with autosomal dominant amelogenesis imperfecta and taurodontism.*Oral Diseases*, 8:62-68.
3. Anderson MH. (2001). Current concept of dental caries and its prevention. *Operative Dentistry*, 6:11–18.
4. Anusavice KJ. (1998). Management of dental caries as a chronic infectious disease. *JDent Educ.*,62(10):791-802.
5. Akıncı Z. (2008). Karma dişlenme dönemindeki öğrencilerin ağız diş sağlığı durumunun ve bu konudaki eğitim gereksinimlerinin beirlenmesi.Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
6. Aoba, T. (1997). The effect of fluoride on apatite structure and growth. *Crit. Rev. Oral. Dent. Med.*,8(2):136–153.
7. Arda M. (1995). Biyoteknoloji. Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara. s.211,358-368.
8. Ayala FJ, Kieger JA. (1994). Modern Genetics. 2nded, Benjamin/Cummings, Menlo Park, California.
9. Azevedo LF, Pecharki GD, Brancher JA., Cordeiro CA Jr, Medeiros KG, Antunes AA, Arruda ES, Werneck RI, de Azevedo LR, Mazur RF, Moyses SJ, Moyses ST, Faucz FR, Trevilatto PC. (2010). Analysis of the association between lactotransferrin(LTF) gene polymorphism and dental caries. *J. Appl. Oral Sci*, 18(2):166-170.
- 10.Balakrishnan M, Simmonds RS, Tagg JR. (2000). Dental caries is a preventable infectious disease. *Australian Dental Journal*, 45(4): 235-245.

11. Bartlett JD, Beniash E, Lee DH, Smith CE. (2004). Decreased mineral content in MMP-20 null mouse enamel is prominent during the maturation stage. *J Dent Res*, 83(12):909-913.
12. Beck JD. (1998). Risk revisited. *Community Dent Oral Epidemiol*, 26(4): 220-225.
13. Bertan M, Güler Ç. (1995). Halk Sağlığı (Temel Bilgiler). Güneş Kitabevi Ltd.Şti., Ankara.
14. Beyar I. (2003). Anneden bebeğine aktarılan çürük oluşturan bakterilerin etkisi. *Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Dergisi*, 20(1):57-63.
15. Blinkhorn AS, Davies RM. (1996). Caries prevention. A continued need worldwide. *International Dental Journal*, 46(3):119-25.
16. Boraas JC, Messer LB, Till MJ. (1988). A genetic contribution to Dental caries, occlusion, and morphology as demonstrated by twins reared apart. *J Dent Res* 67:1150-1153.
17. Boynes J, Dominichzak MH. (1999). Medical Biochemistry. Harcourt Brace and Company Limited, London, p.55-67.
18. Brancher JA, Pecharki GD, Doetzer AD, Medeiros KG, Cordeiro Júnior CA, Sotomaior VS, Bauer P, Trevilatto PC. (2011). Analysis of polymorphisms in the lactotransferrin gene promoter and dental caries. *Int J Dent*. 2011:1-9.
19. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. (2002). Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:207-214.
20. Brown TA. (1992). Genetics: A Molecular Approach. 2nd ed, Chapman&Hall, London.
21. Brudevold F, Steadman LT, Smith FA. (1960). Inorganic and organic compounds of tooth structure. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 85: 110–132.
22. Burt BA ve Pai S. (2001). Does Low Birthweight Increase the Risk of Caries? A

Systematic Review. *Journal of Dental Education*, 65(10):1024-1027.

- 23.Campus G, Lumbau A, Sanna AM, Solinas G, Luglie P, Castiglia P. (2004). Oral health condition in an Italian preschool population.*Eur J PaediatrDent*, 5(2):86-91.
- 24.Campus G, Lumbau, A, Lai S, Solinas G, Castiglia P. (2001). Socio- economic and behavioral factors related to caries in twelve year old Sardinian children. *Caries Research*, 35: 427-434.
- 25.Caron C, Xue J, Sun X, Simmer JP, Barlett JD. (2001). Gelatinase A (MMP-2) in developing tooth tissues and amelogenin hydrolysis. *J Dent Res*80(7):1660-1664.
- 26.Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding Y, Simmer JP, Birkedal-Hansen H, Bartlett JD. (2002). Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem*, 277:49598-49604.
- 27.Cengiz T. (2004). Tıp ve Dis Hekimliginde Genel ve Ozel Mikrobiyoloji. Günes Tıp Kitapevi, Ankara.
- 28.Chun YH, Yamakoshi Y, Yamakoshi F, Fukae M, Hu JC, Bartlett JD, Simmer JP. (2010). Cleavage site specificity of MMP-20 for secretory-stage ameloblastin. *Journal of Dental Research* 89(8):785–90.
- 29.Cockerill FR 3rd. (2003). Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory.*ArchPathol Lab Med*,127(9):1112-20.
- 30.Connor M, Ferguson-Smith M.(1997). Essential Medical Genetics. Blackwell Science Ltd, London.
- 31.Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T, Goss J, Corby AL, Junior HM, Weyant RJ, Paster BJ. (2005). Microbial risk indicators of early childhood caries. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:5753-9.
- 32.Dawes C. (1970). Effects of Diet on Salivary Secretion and Composition. *Journal of*

Dental Research, 49: 1263–1272.

33. Deakins M. (1942). Changes in the ash, water and organic content of pig enamel during calcification. *Journal of Dental Research*, 21:429–435.
34. Deeley K, Letra A, Rose EK, Brandon CA, Resick JM, Marazita ML, Vieira AR. (2008). Possible association of amelogenin to high caries experience in a Guatemalan-Mayan population. *Caries Res.*, 42(1):8-13.
35. Deligezer U, Akışık EE, Dalay N. (2004). Gen polimorfizm analizinde light cyclor floresan PCR tekniğinin kullanılması: Myeloid lösemili çocuk ve yetişkin hastalarda MTHFR C677T gen polimorfizm dağılımının belirlenmesi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 19:134-139.
36. DenBesten PK, Yan Y, Featherstone JDB, Hilton JF, Smith CE, Li W. (2002). Effects of fluoride on rat dental enamel matrix proteinases. *Arch Oral Biol*, 47(11):763-770.
37. Dini EL, Holt RD, Bedi R. (2000). Caries and its association with infant feeding and oral health-related behaviours in 3-4-year-old Brazilian children. *Community Dent. Oral. Epidemiol.*, 28(4): 241-8.
38. Dirican R., Bilgen N. (1993). Halk Sağlığı (Toplum Hekimliği). 2. baskı, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa.
39. Dowsett SA, Archila L, Foroud T, Koller D, Eckert G, Kowolik MJ. (2002). The effect of shared genetic and environmental factors on periodontal disease parameters in untreated adult siblings in Guatemala. *J Periodontol*, 73(10):1160-1168.
40. Ekmekçi A, Konaç E, Önen İ. (2008). Gen polimorfizmi ve kansere yatkınlık. *Marmara Medical Journal*, 21(3):282-295.
41. Ermiş B, Koray F, Akdeniz BC. Dental caries and fluorosis in low and high fluoride areas in Turkey. *Quintessence Int.* 2003; 34:354-360.
42. Fairpo C. (1979). Total caries experience in monozygotic and like-sexed dizygotic

- twins of caucasoid origin aged 5 to 15 years. *Arch Oral Bio1*, 24: 491-494.
43. Featherstone JD. (2000). The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc.*, 131(7):887-99.
44. Featherstone JD. (2008). Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J.* 53(3):286-91.
45. Forestier IB, Molla M, Verloes A, Berdal A. (2008). The genetic basis of inherited anomalies of the teeth: Part 1: Clinical and molecular aspects of nonsyndromic dental disorders. *Eur J Hum Genet*, 16(4):273-91.
46. Freire Mdo C, De Melo RB, Almeida E, Silva S. (1996). Dental caries prevalence in relation to socioeconomic status of nursery school children in Goiania-GO, Brazil. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 24(5):357-61.
47. Gan L, Lee I, Smith R, Argonza-Barrett R, Lei H, McCuaig J, Moss P, Paeper B, Wang K. (2000). Sequencing and expression analysis of the serine protease gene cluster located in chromosome 19q13 region. *Gene*, 257(1):119-30.
48. Ekmekçi A, Konaç E, Önen İ. (2008). Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık. *Marmara Medical Journal*, 21(3):282-295.
49. Granath Kinnby C, Lanke J, Linden A, Widenheim J, Granath L. (1995). Influence of social factors on sugary products behavior in 4-year old children with regard to dental caries experience and information at child health centers. *Acta Odontol Scand*, 53(2):105-111.
50. Grauwe A, Aps JKM, Martens LC. (2004). Early Childhood caries (ECC): What is in a name. *Eur J Paediatr Dent*, 5(2):62-70.
51. Grindefjord, M, Dahllof G, Modeer T. (1995). Caries development in children from 2.5 to 3.5 years of age: a longitudinal study. *Caries Research*, 29: 449-54.
52. Gryn timer MD, Bonar LC, Glimcher MJ. (1984). Failure to detect an amorphous

- calcium - phosphate solid phase in bone mineral: A radial distribution function study. *Calcified Tissue International*, 36:291-301.
53. Gustaaf A. Dekker, Eric A. Haan, Alastair H. MacLennan, The South Australian Cerebral Palsy Research Group, Gai L. McMichael, Catherine S. Gibson, Michael E. O'Callaghan, Paul N. Goldwater (2009). DNA from Buccal Swabs Suitable for High-Throughput SNP Multiplex Analysis". Research Ethics Committee of the Children, Youth and Women's Health Service, The National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine, National Institutes of Health.
 54. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. (2007). The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.*, 65(1):1-13.
 55. Hartl DL, Jones EW. (2000). DNA Structure and DNA manipulation in Genetics. Eds: Hartl DL, Jones EW, Jones and Bartlett Publishers, Boston, p.36-7.
 56. Harvey TJ, Hooper JD, Myers SA, Stephenson SA, Ashworth LK, Clements JA. (2000). Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (KLK) locus on proximal 19q13.4. *J Biol Chem.* 275(48):37397-406.
 57. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. (1996). Real-time quantitative PCR. *Gen. Res.*, 6: 986-994.
 58. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. (2003). Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 28(1):47-52
 59. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. (2004). Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 2). *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 28(2):119-124.
 60. Hirasawa M, Takada K. (2003). A new selective medium for *Streptococcus mutans* and the distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* and their serotypes in dental plaque. *Caries Research*, 37(3): 212-7.
 61. Hu C-C, Ryu OH, Chen JJ, Uchida T, Wakida K, Murakami C. (2000). Cloning of the

- murine EMSP1 cDNA and analysis of expression during tooth development. *J. Dent. Res*, 79:70–76.
62. Hu JC-C, Chun YP, Hazzazzi TA, Simmer JP. (2007). Enamel formation and amelogenesis imperfecta. *Cells Tissues Organs*, 186:78-85.
63. Hu JC, Ryu OH, Chen JJ, Uchida T, Wakida K, Murakami C. Localization of EMSP1 expression during tooth formation and cloning of mouse cDNA. *J Dent Res*.79:70–76.
64. Hu JC, Sun X, Zhang C, Liu S, Bartlett JD, Simmer JP. (2002). Enamelysin and kallikrein-4 mRNA expression in developing mouse molars. *Eur J Oral Sci*. 110 (4):307–315.
65. Hu JC, Zhang C, Sun X, Yang Y, Cao X, Ryu O. (2000). Characterization of the mouse and human PRSS17 genes, their relationship to other serine proteases, and the expression of PRSS17 in developing mouse incisors. *Gene*, 251(1):1–8.
66. Hunter P. (1988). Review of methods of the identification of high caries risk groups and individuals. *International Dental Journal*, 38:177-189.
67. Ismail AI, Nainar SM, Sohn W. (2003). Children's first dental visit: attitudes and practices of US pediatricians and family physicians. *Pediatr Dent*, 25(5):425-431.
68. İşman NE. (2009). Pax9 Genindeki G-1031A ve T-912C Polimorfizmleri ile Diş Eksikliği (Hypodonti ve Oligodonti) İlişkisinin İncelenmesi. S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, (Danışman: Doç. Dr. Z Sarı).
69. Kanamoto T, Nonaka K, Nakata M. (1994). Genetic variation in experimental denill caries in four inbred strains of rats. *Caries Res*, 28:156-160.
70. Kang SW, Yoon I, Lee HW, Cho J. (2011). Association between AMELX polymorphisms and dental caries in Koreans. *Oral Dis.*, 17(4):399-406.
71. Kapdan A, Kustarci A, Kapdan A, Buldur B, Arslan D. (2010). Sivas İlindeki Okul

Öncesi Yas Grubu Çocukların Dis Sağlığı Durumlarının Değerlendirilmesi. *Cumhuriyet Dental Journal*, 13(2):91-95.

72. Kinane DF, Hart TC. (2003). Gene and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 14:430-449.

73. King JM, Pitter AF, Edwards H. (1983). Some social predictors of caries experience. *British Dental Journal*, 155: 266-8.

74. Kiwanuka SN, Astrom AN, Trovik TA. (2004). Dental caries experience and its relationship to social and behavioral factors among 3-5-year-old children in Uganda. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 14(5): 336-346.

75. Klug SW, Cummings WR. (2000). Concept of Genetics. Prentice Hall, New Jersey, p.745.

76. Koch G, Paulsen S. (2009). Pediatric Dentistry a Clinical Approach. 2nd ed, Blackwell Publishing Ltd., West Sussex.

77. Kornman KS, Newman MG. (2000). Role of genetics in assessment, risk, and management of adult periodontitis. *Periodontal Medicine*, 45-62.

78. Krasse B. (1966). Human streptococci and experimental caries in hamster. *Arch Oral Biol* 11(4):429-436.

79. Krasse B. (1988). Biological factors as indicators of future caries. *International Dental Journal*, 38:219-225.

80. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 27(2-3):95-125.

81. Kuchler EC, Menezes R, Callahan N, Costa MC, Modesto A, Meira R. MMP1 and MMP20 contribute to tooth agenesis in humans. *Archives of Oral Biology* 56(5):506–11.

82. Leboyer M, Bellivier F, Nosten-Bertrand M, Jouvent R, Pauls D, Mallet J. (1998). Psychiatric genetics: Search for phenotypes. *Trends Neurosci*, 21(3):102-105.
83. Lee HK, Lee DS, Ryoo HM, Park JT, Park SJ, Bae HS, Cho MI, Park JC. (2010). The odontogenic ameloblast-associated protein(ODAM) cooperates with RUNX2 and modulates enamel mineralization via regulation of MMP-20. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(3):755–67.
84. Lee SK, Seymen F, Kang HY, Lee KE, Gencay K, Tuna B, Kim JW. (2010). MMP20 hemopexin domain mutation in amelogenesis imperfecta. *Journal of Dental Research*, 89:46-50.
85. Legeros RZ, Sakae T, Bautista C, Retino M, Legeros, JP. (1996). Magnesium and carbonate in enamel and synthetic apatites. *Advances in Dental Research*, 10(2): 225-31.
86. Legeros RZ, Legeros JP. (1983). Carbonate Analyses of Synthetic, Mineral and Biological Apatites. *Journal of Dental Research*, 62:259.
87. Leverett DH, Featherstone JDB, Proskin HM, Adair SM, Eisenberg AD, Mundorff-Shrestha SA, Shields CP, Shaeffer CL, Billings RJ. (1993). Caries risk assessment by a cross-sectional discrimination model. *Journal of Dental Research*, 72(2): 529-537.
88. Lewin B. (2000). *Genes*. 7th Oxford University Press, Oxford.
89. Litt MD, Reisine S, Tinanoff N. (1995). Multidimensional causal model of dental caries development in low income pre school children. *Public Health Reports*, 110(5): 607-617.
90. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.*, 4(6):357-62.

91. Loesche WJ, Rowan J, Straffon LH, Loos PJ. (1975). Association of Streptococcus mutants with human dental decay. *Infect. Immun.*, 11(6): 1252-60.
92. Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu J C-C, Bartlett JD, Simmer JP. (2008). Function of KLK4 and MMP20 in dental enamel formation. *Biol Chem*, 389(6):695-700.
93. Lüleci G, Sakzı M, Alper Ö. (1995). Renkli Genetik Atlas.
94. Mackay IM. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*, 10(3):190-212.
95. Mandel ID. (1994). Nature vs. nurture in dental caries. *JADA*, 125:1345-1351.
96. Mange AP, Mange PJ. (1990). Genetics: Human Aspects. Sunderland, Sinauer Associates, Massachusetts.
97. Marsh, PD. (1999). Microbiologic aspect of dental plaque and dental caries. *Dental Clinics North America*, 43(4):599–614.
98. Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. (2002). Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: Association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J Clin Microbiol*, 40(5):1698-704.
99. Matsumura M, Bhatt AS, Andress D, Clegg N, Takayama TK, Craik CS, and Nelson PS. (2005). Substrates of the prostate-specific serine protease prostase/KLK4 defined by positional-scanning peptide libraries. *Prostate* 62(19), 1-13.
100. Mattos Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MPA. (2000). Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *Journal of Dental Research*, 79(6):1371–1377.
101. Messer, LB. (2000). Assessing caries risk in children. *Australian Dental*

Journal,45(1): 10-6.

102. Milgrom P, Riedy CA, Weinstein P, Tanner AC, Manibusan L, Bruss J. (2000). Dental caries and its relationship to bacterial infection, hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6- to 36- month-old children. *Community Dent Oral Epidemiol*,28(4):295-306.
103. Moffatt P, Smith CE, St Arnaud R, Nanci A. (2008). Characterization of Apin, a secreted protein highly expressed in tooth-associated epithelia. *J Cell Biochem*, 103(3):941–956.
104. Moffatt P, Smith CE, St-Arnaud R, Simmons D, Wright JT, Nanci A. (2006b). Cloning of rat amelotin and localization of the protein to the basal lamina of maturation stage ameloblasts and junctional epithelium. *Biochem J*, 399(1):37–46.
105. Morris T, Robertson B, Gallagher M. (1996). Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *J. Clin. Microbiol*, 34(12): 2933-2936.
106. Mortimer KV. (1970). The relationship of deciduous enamel structure to dental disease. *Caries Research*, 4(3):206–223.
107. Mühlemann HR. (1972). Genetic aspects of dental caries and periodontal diseases in man]. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd.*, 82(9):942-59.
108. Mullis K. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262:36-43.
109. Nauwink B, Backer Dirks O, Kwant GW. (1974). A nine year study of topical application with stannous fluoride in identical twins and the caries experience five years after ending the applications. *Caries Res*, 8(1):27-38.
110. Nelson DL. (1991). Applications of polymerase chain reaction methods in genome mapping. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1:62-68.

111. Neumaier M, Braun A, Wagener C. (1998). Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. International Federation of Clinical Chemistry Scientific Division Committee on Molecular Biology Techniques. *Clin Chem.*, 44(1):12-26.
112. Newbrun E. (1989). Cariology. Third edition. Quintessence Publishing. p.52-64.
113. Newman HN. (1986). The relation between plaque and dental caries. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 14:1-5.
114. Nicolau B, Marcenes W, BARTLEY M, SHEIHAM A. (2003). A life course approach to assessing causes of dental caries experience: the relationship between biological, behavioural, socio-economic and psychological conditions and caries in adolescents. *Caries Research*, 37:319-326.
115. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF.(2001). Genetics in Medicine.6th ed.,Thompson and Thompson,Philadelphia, p.51-78.
116. Olivier M. (2004). From SNPs to function: the effect of sequence variation on gene expression. *Physiological Genomics*, 16:182–3.
117. Olszowski T, Adler G, Janiszewska-Olszowska J, Safranow K, Kaczmarczyk M. (2012). MBL2, MASP2, AMELX, and ENAM gene polymorphisms and dental caries in Polish children. *Oral Disease*, 18(4):389-395.
118. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5(4):874-879.
119. Ozdemir D, Hart PS, Ryu OH, Choi SJ, Ozdemir-Karatas M, Firatli E, Piesco N, Hart TC. (2005). MMP20 active-site mutation in hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Dent Res*, 84(11):1031-5.
120. Ozturk A, Famili P, Vieira AR. (2010).The antimicrobial peptide DEFB1 is associated with caries. *J Dent Res*, 89(6):631-6.

121. Ozturk L, Yarat A, Ulucan K, Akyuz S and Furuncuoglu H. (2009). Investigation of salivary MUC7 gene alterations in dental students with and without caries. *IUBMB Life*, 61(3).
122. Özata F, Kaya AD. (2001). Diş çürüğü ve genetik. *EU Dişhek Fak Derg*, 22:13-21.
123. Patir A, Seymen F, Yildirim M. (2008). Enamel formation genes are associated with high caries experience in Turkish children. *Caries Res*, 42(5):394-400.
124. Pehlivan S, Koturoglu G, Ozkinay F, Alpoz AR, Sipahi M, Pehlivan M.(2005). Might there be a link between mannose-binding lectin polymorphism and dental caries. *Mol Immunol*, 42(9):1125-7.
125. Petti S, Cairella G, Tarsitani G.(2000). Rampant early childhood dental decay: an example from Italy. *J Public Health Dent*, 60(3):159-66.
126. Pine C, Burnside G, Craven R. (2003). Inequalities in dental health in the north-west of England. *Community Dental Health*, 20(1):55-6.
127. Pine C. (2005). Caries risk: individual and population perspectives. Proceedings of a Symposium at the 81st Annual Meeting of the International Association for Dental Research (IADR). *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 33(4):239-79.
128. Piwat S, Teanpaisan R, Thitasomakul S, Thearmontree A, Dahlén G.(2010). Lactobacillus species and genotypes associated with dental caries in Thai preschool children. *Mol Oral Microbiol*, 25(2):157-64.
129. Pol J.(2011). Association of the polymorphism of MUC7 gene encoding the low-molecular-weight mucin MG2 with susceptibility to caries. *Ann Acad Med Stetin*, 57(2):85-91.
130. Ramos-Gomez FJ, Tomar SL, Ellison J, Artiga N, Sintes J, Vicuna G. (1999). Assessment of early childhood caries and dietary habits in a population of migrant Hispanic children in Stockton, California. *ASDC Journal of Dentistry for Children*,

66(6): 395-403, 366.

131. Ramos-Gomez FJ, Weintraub JA, Gansky SA, Hoover CI, Featherstone JDB. (2002). Bacterial, behavioral and environmental factors associated with early childhood caries. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 26(2): 165-173.
132. Risch NJ. (2000). Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*, 405(6788):847-856.
133. Roberson TM, Heymann OH, Swift EJ. (2010). Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry. Ceviren: Grgan S, Yalcin Cakir F, Gnes Tıp Kitabevleri, Ankara, s.67-134.
134. Russel B. (1994). The application of molecular genetics to the microbiology of dental caries. *Caries Res*, 28(2):69- 82.
135. Ryu O, Hu JC, Yamakoshi Y, Villemain JL, Cao X, Zhang C. (2002). Porcine kallikrein-4 activation, glycosylation, activity, and expression in prokaryotic and eukaryotic hosts. *Eur J Oral Sci*. 110(5):358–365.
136. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory.
137. Santos CF, Sakai VT, Machado MA, Schippers DN, Grene AS. (2004). Reverse transcription and polymerase chain reaction: Principles and applications in dentistry. *J. Appl Oral Sci*, 12(1):1-11.
138. Saxena D, Li Y, Caufield PW. (2005). Identification of unique bacterial gene segments from *Streptococcus mutans* with potential relevance to dental caries by subtraction DNA hybridization. *J Clin Microbiol*, 43(7):3508-11.
139. Saydam GB. (2002). Türkiye’de ağız diş sağlığı hastalıkları dzeyi ve gereken ilk adım: Sağlık eğitimi. *TDBD*, 2002:24–28.
140. Sayitoğlu AM. Hematoloji’de Real Time PCR, İstanbl Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbl.

141. Schuler C. (2001). Inherited risks for susceptibility to dental caries. *J. of Dental Education*, 65(10):1038-45.
142. Scientific Division Committee on Molecular Biology Techniques. (1998). *Clin Chem.*, 44(1):12-26.
143. Segura JJ, Jimenez-Rubio A. (1999). Talon cusp affecting permanent maxillary lateral incisors in 2 family members. *Oral Radiol*, 88: 90-92.
144. Sengün A, Duran I, Erdal ME, Ozkaya M, Ozturk B and Ozer F. (2003). Vitamin D Receptor Gene Polymorphism is associated with Dental Caries, 81st Gen. Sess. Of Int. Assoc. for Dental Research.
145. Shaffer JR, Wang X, Feingold E, Lee M, Begum F, Weeks DE, Cuenco KT, Barmada MM, Wendell SK, Crosslin DR, Laurie CC, Doheny KF, Pugh EW, Zhang Q, Feenstra B, Geller F, Boyd HA, Zhang H, Melbye M, Murray JC, Weyant RJ, Crout R, McNeil DW, Levy SM, Slayton RL, Willing MC, Broffitt B, Vieira AR, Marazita ML. (2011). Genome-wide association scan for childhood caries implicates novel genes. *J Dent Res*, 90(12):1457-62.
146. Shapiro L, Scklesinger M, Bimstein E. (1997). Possible autosomal-dominant inheritance of prepubertal periodontitis in an extended kindred. *J Clin Periodontol*, 24(6):388-393.
147. Shashikiran ND, Subba Reddy VV, Hiremath MC. (2007). Estimation of trace elements in sound and carious enamel of primary and permanent teeth by atomic absorption spectrophotometry: an in vitro study. *Indian Journal of Dental Research*, 18(4):157-62.
148. Shi S, Deng Q, Hayashi Y, Yakushiji M, Machida Y, Liang Q. (2003). A follow-up study on three caries activity tests. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 27(4): 359-364.
149. Simmer, JP. (2001). Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry.

Journal of Dental Education, 65(9):896-905.

150. Simmer JP, Fukae M, Tanabe T, Yamakoshi Y, Uchida T, Xue J, Margolis HC, Shimizu M, DeHart BC, Hu CC, Bartlett JD.(1998). Purification, characterization, and cloning of enamel matrix serine proteinase.*J Dent Res*. 77(2):377-86.
151. Simmer JP, Ryu OH, Qian Q, Zhang C, Cao X, Sun X. (2000). Cloning and characterization of a cDNA encoding human EMSP1. *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues: Proceedings of the Sixth International Conference*; 1998, November 1998; Vittel, France. Vittel, France: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 6300 North River Rd, Rosemont, IL, 60018 USA.
152. Simmer JP, Sun X, Yamada Y, Zhang CH, Bartlett JD, Hu JC-C. (2004). Enamelysin and kallikrein-4 expression in the mouse incisor. In: Kobayashi I, Ozawa H, editors. *Biom mineralization: formation, diversity, evolution and application Proceedings of the 8th International Symposium on Biom mineralization*; Niigata, Hadano,Tokai University Press, p.348–352.
153. Slayton R, Cooper M, Marazita M. (2005). Tuftelin, mutans streptococci and dental caries susceptibility. *J Dent Res*, 84(8):711–714.
154. Smith CE, Richardson AS, Hu Y, Bartlett JD, Hu JC, Simmer JP. (2011). Effect of kallikrein 4 loss on enamel mineralization:comparison with mice lacking matrix metalloproteinase 20. *Journal of Biology & Chemistry*, 286:18149–60.
155. Sofaer JA. (1993). Nost gehes and dental caries. *Br Dent J*, 175:403-409.
156. Souza JMP, Arrillaga AN, Ochoa FV, Rocha O. (1967). Prevalence of dental caries in Whites and non-Whites. *Revista de Saude Publica*, 1:38–43.
157. Sreenby, L.M. (1982). The sugar-caries axis. *International Dental Journal*, 32(1):1-12.
158. Stecksen-Blicks C, Arvidsson S, Holm AK. (1985). Dental health, dental care, and

dietary habits in children in different parts of Sweden. *Acta Odontologica Scandinavica*, 43(1):59-67.

159. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjaderhane L. (2002). The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, Enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res*, 81(9):603-607.
160. Sunby A, Petersen PE. (2003). Oral health status in relation to ethnicity of children in the Municipality of Copenhagen, Denmark. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 13(3):150-7.
161. Tang G, Samaranayake LP, Yip HK. (2004). Genotypic diversity of oral *Actinomyces naeslundii* genospecies 1 and 2 in caries-active preschool children. *Oral Microbiol Immunol*, 19(6):371-8.
162. Tannure PN, Küchler EC, Falagan-Lotsch P, Amorim LM, Raggio Luiz R, Costa MC, Vieira AR, Granjeiro JM. (2012). MMP13 polymorphism decreases risk for dental caries. *Caries Res*, 46(4):401-7.
163. Tannure PN, Küchler EC, Lips A, Costa Mde C, Luiz RR, Granjeiro JM, Vieira AR. (2012). Genetic variation in MMP20 contributes to higher caries experience. *J Dent*, 40(5):381-6.
164. Tanzer JM, Livingston J, Thompson, AM. (2001). The microbiology of primary dental caries in humans. *Journal of Dental Education*, 65(10):1028-37.
165. Tao R, Jurevic RJ, Coulton KK, Tsutsui MT, Roberts MC, Kimball JR, Wells N, Berndt J, Dale BA. (2005). Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(9):3883-8.
166. Temizkan G, Arda N (Editörler), (2005). Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Sti., Istanbul.
167. The World Oral Health Report 2003. Continuous improvement of oral health in the 21st century- the approach of the WHO global oral health programme.

168. Thylstrup A, Fejerskov O. (1986). Textbook of Cariology. Munksgaard, Copenhagen, p.315–328.
169. Thylstrup A, Fejerskov O. (1994). Textbook of Clinical Cariology. 2nd ed, Munksgaard, Copenhagen, p.98-120.
170. Thylstrup A, Fejerskov O. (1986). Textbook of cariology. First edition. Munksgaard, Copenhagen, p.4-67.
171. Tinanoff, N. (1995). Dental caries risk assessment and prevention. *Dental Clinics North America*, 39(4):709-19.
172. Tomes, CS. (1896). On the Chemical Composition of Enamel. *The Journal of Physiology*, 19:217-223.
173. Tony JC. (1995). Impact of basic research on tomorrow's medicine: applications and limitations of polymerase chain reaction amplification. *Chest*, 108:1393-1404.
174. Travis DF, Glimcher MJ. (1964). The structure and organization of and the relationship between the organic matrix and the inorganic crystals of embryonic bovine enamel. *Journal of Cell Biology*, 23:447–497.
175. Ulucan K, Pul U, Akcay T. (2010). Diş Çürüklerinin Oluşumunda Moleküler Yaklaşım. *Journal of Cell and Molecular Biology* 8(2): 35-39.
176. Vanderas, AP. (1986). Bacteriologic and nonbacteriologic criteria for identifying individuals at high risk of developing dental caries. *Journal of Public Health Dentistry*, 46(2): 106-112.
177. Vanobbergen J, Martens L, Lesaffre E, Bogaerts K, Declerck D. (2001a). Assessing risk indicators for dental caries in the primary dentition. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 29(6): 424-34.
178. Vanobbergen J, Martens L, Lesaffre E, Bogaerts K., Declerck D. (2001b). The value

- of a baseline caries risk assessment model in the primary dentition for the prediction of caries incidence in the permanent dentition. *Caries Research*, 35(6): 442-50.
179. Versage JL, Severin DD, Chu MC, Petersen JM. (2003). Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J Clin Microbiol*, 41(12):5492-9.
 180. Voet D, Voet JD. (1995). *Biochemistry*. 2nd ed, John Wiley, New York.
 181. Wang X, Marazita M, Levy SM, Santiago S, Broffitt B, Smith BJ, Lidral AC, Willing M. (2008). Genetic and environmental factors associated with dental caries in children. 37th International Association for Dental Research & American Association for Dental Research.
 182. Wang X, Shaffer JR, Weyant RJ, Cuenco KT, De Sensi RS and Crout R. (2010). Genes and their effects on dental caries (tooth decay) may differ between primary and permanent dentitions. *Caries Res*, 44(3):277-284.
 183. Wang X, Willing MC, Marazita ML, Wendell S, Warren JJ, Broffitt B, Smith B, Busch T, Lidral AC, Levy SM. (2012). Genetic and environmental factors associated with dental caries in children: The Iowa fluoride study. *Caries Res*, 46(3):177-184.
 184. Wayne, Pennsylvania, USA—March, 2012—The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recently published *Nucleic Acid Amplification Assays for Molecular Hematopathology; Approved Guideline—Second Edition* (MM05-A2).
 185. Wendell S, Wang X, Brown M, Cooper ME, DeSensi RS, Weyant RJ, Crout R, McNeil DW, Marazita ML. (2010). Taste genes associated with dental caries. *J. Dent. Res*, 89(11): 1198-1202.
 186. Wentrup-Byrne E, Armstrong CA, Armstrong RS, Collins BM. (1997). Fourier Transform Raman Microscopic Mapping of the Molecular Components in a Human Tooth. *Journal Raman Spectros*, 28(3):151-158.
 187. Werneck RI, Mira MT, Trevilatto PC. (2010). A critical review: an overview of

- genetic influence on dental caries. *Oral Diseases*, 16(7):613–23.
188. Wheeler HE, Metter EJ, Tanaka T, Absher D, Higgins J, Zahn JM. (2009). Sequential use of transcriptional profiling, expression quantitative trait mapping, and gene association implicates MMP20 in human kidney aging. *PLoS Genetics* 2009;5:e1000685.
 189. Whobdell M, Petersen PE, Clarkson J, Johnson N. (2003). Global goals for oral health 2020. *Int Dent J*, 53:285-8.
 190. Wolk, 2001; Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü, 2003; Cockerill, 2004.
 191. Wood S, Langlois S.(1991). DNA typing in hereditary disease. *J Chromatogr*, 569(1-2):421-447.
 192. World Health Organization. The World Oral Health Organization Report 2003. 2003. p.38.
 193. WHO. Diet nutrition and the Prevention of the Chronic Diseases. Report of a WHO Study Group. Technical Report series. Vol 797. Geneva: World Health Organization, 1990.
 194. Yamakoshi Y, Hu JC-C, Fukae M, Iwata T, Simmer JP. (2006). How do MMP-20 and KLK4 process the 32 kDa enamelin. *Eur J Oral Sci*, 114(1):45-51.
 195. Yoon H, Laxmikanthan G, Lee J, Blaber SI, Rodriguez A, Kogut JM. (2007). Activation profiles and regulatory cascades of the human kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem*, 282(44):31852-31864.
 196. Yousef GM, Diamandis EP.(2000). The expanded human kallikrein gene family: locus characterization and molecular cloning of a new member, KLK-L3 (KLK9). *Genomic.*, 65(2):184-94.
 197. Yu PL, Bixler D, Goodman PA, Azen EA, Karn RC.(1986). Human parotid proline-rich proteins: correlation of genetic polymorphisms to dental caries. *Genet Epidemiol*,

3(3):147-52.

198. Zero, DT. (1999). Dental caries process. *Dental Clinics North America*, 43(4):635–664.
199. Zhang X, Beck P, Rahemtulla F and Thomas HF. (2009). Regulation of Enamel and Dentin Mineralization by Vitamin D Receptor. *Dental Growth and Development*,13: 71-6.
200. Zhang XH, Zhou Y, Zhi QH, Tao Y, Lin HC.(2012). Genetic polymorphisms of the sortase A gene and early childhood caries in two-year-old children.*Arch Oral Biol*, 57(7):948-53.
201. Zhang Y, Yan Q, Li W, DenBesten PK. (2006). Fluoride down-regulates the expression of matrix metalloproteinase-20 in human fetal tooth ameloblast-lineage cells in vitro. *European Journal of Oral Sciences*, 114(1):105-10.

9.EKLER

EK 1:Hasta onam formu

Bu çalışmanın amacı çocuğum'unçürük oluşumunda yatkınlığa neden olduğu düşünülen MMP20 (Matriks Metalloproteinaz-20), KLK4 (Kallikrein 4) gen polimorfizmlerinin yanak sürüntüsü örnekleri alınarak inceleneceği, bu sayede diş çürüğü oluşumu açısından erken tanı sağlanarak uygun tedavi yöntemleri ve koruyucu uygulamaların yapılabileceği ifade edildi. Çocuğuma ait kişisel bilgilerin ve DNA örneklerinin kesinlikle gizli tutulacağı belirtildi.

Araştırmaya ait hasta / kişi numarası:_____

Üniversite hastanesi protokol numarası: _____

Araştırmacı adı:_____

Marmara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı Araştırma Projesi Bilgilendirme yazısını okudum ve anladım. Sorularıma Dt. Zerrin Abbasoğlu tarafından beni tatmin eden cevaplar verildi. Adı geçen projeye kendi rızam ile hiçbir baskı altında kalmadan katılmayı kabul ediyorum. İstedğim anda çalışmadan çıkabileceğim ve bunun normal tedavi sürecini etkilemeyeceğini, çalışmadan kendi isteğimle çıkmam halinde tıbbi ve hukuki haklarımın saklı olduğunu biliyorum.

GÖNÜLLÜNÜNAÇIKLAMAYI YAPAN ARAŞTIRMACININ

Adı, soyadı:Adı, soyadı:

Adres:Adres:

Tel.Tel.

İmzaİmza

TarihTarih

VELAYET VEYA VESAYETRIZA ALMA İŞLEMİNDE
ALTINDA BULUNANLAR İÇİNTANIKLIK EDEN KİŞİNİN
VELİ VEYA VASİNİN

Adı, soyadı:Adı, soyadı:

Adres:Adres:

Tel.Tel

İmzaİmza

TarihTarih

EK 2: Etik Kurul Kararı



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Girişimsel Olmayan
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

PROJENİN ADI: Diş Minesinin Oluşumunda Görev Alan MMP20 (Matriks Metalloproteinaz-20) ve KLK4 (Kallikrein 4) Gen Polimorfizmleri İle Diş Çürükleri Arasındaki İlişkinin 3-5 Yaş Grubu Çocuklarda Değerlendirilmesi
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Prof. Dr. İlknur TANBOĞA
PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR: Zerrin ABBASOĞLU
ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI: 06.01.2012 – 5

Sayın Prof. Dr. İlknur TANBOĞA

5 protokol nolu “Diş Minesinin Oluşumunda Görev Alan MMP20 (Matriks Metalloproteinaz-20) ve KLK4 (Kallikrein 4) Gen Polimorfizmleri İle Diş Çürükleri Arasındaki İlişkinin 3-5 Yaş Grubu Çocuklarda Değerlendirilmesi” isimli projeniz Enstitümüzün ön değerlendirme komisyonunda incelenmiş ve araştırmanın Komisyonumuzun ön değerlendirme kriterlerine uygunluğuna karar verilmiştir.

Doç. Dr. Ebru IŞIK ALTURFAN
Komisyon Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Gül AYANOĞLU DÜLGER

Prof. Dr. Refika ERSU

Doç. Dr. Asım CİNGİ

Yrd. Doç. Dr. Murat ÇEKİN

Prof. Dr. Gülden Z. OMURTAG
Komisyon Başkanı

Prof. Dr. Serap AKYÜZ

Prof. Dr. Aysel PEHLİVAN

Doç. Dr. Oğuzhan DEYNELİ

Doç. Dr. Mustafa TAŞDEMİR

Öğr. Gör. Dr. Tolga GÜVEN

Marmara Üniversitesi Haydarpaşa Kampusu
34688 Üsküdar İSTANBUL

0 (216) 414 44 23
0 (216) 414 44 23/12 (Faks)

saglikogrenci@marmara.edu.
http://saglik.marmara.edu.

EK 3: Hasta Takip Formu

Demografik Bilgiler

Ad- Soyad:

Doğum Tarihi: ../../..Doğum yeri:

Tel:

Cinsiyet ☐Kız ☐Erkek

Doğum kilosu:Doğum boyu:

Şu anki kilosu:Şu anki boyu:

Doğum zamanı: ☐premature ☐normal

Medikal Bilgiler

Son zamanlarda (6ay) antibiyotikveya başka bir ilaç kullandı mı?

☐Evet ☐Hayır

Kalp veya tansiyon hastalığı var mı?

☐Evet ☐Hayır

Herhangi bir maddeye karşı allerjisi var mı?

☐Evet ☐Hayır

Şeker hastalığı var mı?

☐Evet ☐Hayır

Öğrenme bozukluğu veya dikkat dağınıklığı var mı?

☐Evet☐Hayır

Kan hastalığı var mı?

☐Evet☐Hayır

Bağışıklık sistemini etkileyen bir hastalığı var mı?

☐Evet☐Hayır

Akraba evliliği var mı?

☐Evet☐Hayır

Genetik bir hastalığı var mı?

☐Evet☐Hayır

Hormonlara bağlı bir hastalığı var mı?

☐Evet☐Hayır

Herhangi bir sistemik hastalığı var mı?

☐Evet☐Hayır

Beslenme

Biberon kullandı mı?☐Evet☐Hayır

Evet ise süresi:

☐Sade☐Şekerli, ballı süt

Akşam yatmadan hemen önce veya yatarken süt içiyor mu?

☐Evet☐Hayır

Ara öğün sayısı:

Ara öğünlerde ne tüketiyor?

Şekerli ve gazlı içecek tüketim sıklığı:

İlk dişleri ne zaman fırçalamaya başladı?

☐doğduğunda ☐ 6-11 aylıkken ☐1 yaş ☐2yaş ☐3yaş ☐4 yaş

Akşam yatmadan önce dişlerini fırçalıyor mu?

☐Hergün ☐bazen ☐hiçbir zaman

Dişlerini hangi sıklıkla fırçalıyorsunuz?

Fırçalamıyor	Haftada 2-3	Günde 1	Günde 2

Fluor tableti kullandınız mı veya kullanıyor mu?

☐Evet ☐Hayır

Topikal fluor uygulandı mı?

☐Evet ☐Hayır

Fluoridli gargara veya tooth mousse kullanıyor musunuz?

☐Evet ☐Hayır

Fırçalama kimin tarafından yapılıyor?

☐Ebeveyn ☐Kendi

Fırçalama kaç dakika sürüyor?

☐30sn ☐1dk ☐2dk ☐3dk

Hangi tip fırça kullanıyor?

☐yetişkin diş fırçası ☐çocuk diş fırçası

Hangi diş macununu kullanıyor?

☐çocuk diş macunu- fluorsuz

☐çocuk diş macunu-fluorlu

☐yetişkin diş macunu-fluorlu

☐yetişkin diş macunu-fluorsuz

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

deft:

defs:

EK 4: Referans Mektubu



University of Pittsburgh

School of Dental Medicine
Department of Oral Biology

Alexandre R. Vieira DDS, MS, PhD
614 Salk Hall
3501 Terrace Street
Pittsburgh, PA 15261
412-648-8972
Fax: 412-624-3080

August 31st, 2012

To Whom It May Concern:

Dr. Zerrin Abbasoglu visited the Vieira Lab at the University of Pittsburgh's School of Dental Medicine from August 22nd, 2012 to August 31th, 2012. Dr. Abbasoglu genotyped genes involved in caries susceptibility.

While at the Vieira Lab, Dr. Abbasoglu learned how to use a real time PCR machine, how to work with TaqMan chemistry, and how to apply her results and performed statistical analysis. Working in the Vieira Lab also gave Dr. Abbasoglu experience collaborating with different researchers from multiple countries.

It was a pleasure to work with Dr. Abbasoglu. If you have any questions regarding her time in the Vieira lab, please do not hesitate to contact me.

Sincerely,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Alexandre R. Vieira", with a long horizontal stroke extending to the right.

Alexandre R. Vieira, DDS, MS, PhD
Associate Professor
Director of Clinical Research
Director of Student Research
614 Salk Hall
Department of Oral Biology
Center for Craniofacial and Dental Genetics
Department of Pediatric Dentistry
School of Dental Medicine
Clinical and Translational Science Institute
University of Pittsburgh
3501 Terrace Street
Pittsburgh, PA 15261
Phone (412) 383-8972
FAX (412) 624-3080
E-mail: arv11@pitt.edu

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ZERRİN	Soyadı	ABBASOĞLU
Doğum Yeri	İSTANBUL	Doğum Tarihi	06.06.1983
Uyruğu	T.C	TC Kimlik No	12736009592
E-mail	zerinabbasoglu@gmail.com	Tel	05352324059

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti	2013
Yüksek Lisans	Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2007
Lisans	Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2007
Lise	Kadıköy Kız Lisesi	2001

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	iyi	iyi	iyi

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	78.750							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	73.722	75.765	75.284
(Diğer)Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi
Doctor Organizer	iyi
SPSS	orta

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

1. Tanboğa İ.,**Abbasoğlu Z.**, Kural D., Akşit D. & Dergin D. Ö. The evaluation of novamin toothpaste on enamel remineralization: in vitro study. 11thEuropean Academy of Paediatric Dentistry, Strasbourg, France, 24-27 May 2012.
2. **Abbasoğlu Z.**, Bakkal M., Kargül B. Effect of Tooth Mousse and MI Paste Plus on molar incisor hypomineralisation: a pilot study, 23rdInternational Association of Paediatric Dentistry, Athens-Greece, 15-18 June 2011.
3. Ozbay G.,**Abbasoğlu Z.**, Kargul B. Effect of a new NAF toothpaste on enamel remineralization of Artificial Caries-Like Lesion, 23rdInternational Association of Paediatric Dentistry, Athens-Greece, 15-18 June 2011.
4. Ozbay G.,**Abbasoğlu Z.**, Kargül B. Effect of Different Fluoride Toothpastes on Enamel Remineralization of Artificial Caries-Like Lesion in vitro, 18. Türk Pedodonti Derneği Bilimsel Kongresi, İstanbul-Türkiye, 1-3 Nisan 2011.
5. Akyüz S., Demirel S., Özbay G., **Abbasoğlu Z.** Süt Dişi Sürmesi ile Bazı Antropometrik Ölçümler ve Dental Bulguların Değerlendirilmesi, 18. Türk Pedodonti Derneği Bilimsel Kongresi, İstanbul-Türkiye, 1-3 Nisan 2011.
6. **Abbasoğlu Z.**, Bakkal M., Kargül B. Effect of CPP-ACP on Molar-Incisor-Hypomineralisation: A Pilot Study, 18. Türk Pedodonti Derneği Bilimsel Kongresi, İstanbul-Türkiye, 1-3 Nisan 2011.

7. Tanboğa I.,**Abbasoğlu Z.**, Demirel S., Kuveloğlu M., Cerebral Palcy on Etiologic Aspects and Oral Status, 20th Congress of International Association for Disability and Oral Health, Ghent-Belgium, August 25th–28th2010.
8. Tanboga I., Akgun S., **Abbasoglu Z.**, Demirel S. Gorkey S., Etnical and Legal Issues Invalving Mentally Retarded Children Treated with General Anesthesia Evaluation of 6 Months of Data, 20th Congress of International Association for Disability and Oral Health, Ghent-Belgium, August 25th–28th2010.
9. **Abbasoglu Z.**, Ozbay G., Gocmen G., Kargul B Tooth fragment lodged in the upper lip after dental traumatic dental injury: An unusual case report, 16th World Congress of Dental Traumatology, Verona-Italy, 11-13 June 2010.
10. Bakkal M.,**Abbasoglu Z.**, Ozbay G., Demirel S., Kargul B. Knowledge and Prevention of Traumatic Injuries in Handball in Istanbul, 16th World Congress of Dental Traumatology, Verona-Italy, 11-13 June 2010.
11. **Abbasoğlu Z.**, Bakkal M., Bekiroğlu N., Kargül B.Molar-Inscor-Hypomineralisation prevalance and putative associations, 10thEuropean Academy of Pediatric Dentistry Cogress, Harrogate-England,3-7 June 2010.
12. Bakkal M.,**AbbasogluZ.**, Kargul B.Effect of Casein Phospopeptide-Amorphous Calcium phosphate on MIH, 10thEuropean Academy of Pediatric Dentistry Cogress, Harrogate-England,3-7 June 2010.
13. Peker S.,**Abbasoglu Z.**, Kargul B. Prevalance of Molar-Incisor-Hypomineralisation among children in Dental School, Marmara University, Istanbul, 6th European Academy of Pediatric Dentistry Interm Seminar and Workshop, Helsinki-Finland, 14-16 May 2009.
14. Ofluoğlu O.,**Abbasoğlu Z.**, Yücelten D., Akyüz S., Noyan Ü., Kuru B. Papillon-Lefevre Sendrom’ lu Hastada Multidisipliner Tedavi Yaklaşımı: Bir

Olgu Sunumu, Türk Periodontoloji Derneği 39. Bilimsel Kongresi & 19. Bilimsel Sempozyumu, Ankara-Türkiye, 29-31 Ekim 2009

Uluslararası ve ulusal katıldığı bilimsel toplantı ve seminerler:

1. 11th European Academy of Paediatric Dentistry 24-27 May 2013 Strasbourg, France
2. 18. Türk Pedodonti Derneği Bilimsel Kongresi, İstanbul-Türkiye, 1-3 Nisan 2011.
3. 7thEuropean Academy of Paediatric Dentistry Interim Seminar and Workshop, 1 March-2 April 2011.
4. 20th Congress of International Association for Disability and Oral Health, Ghent-Belgium, August 25th–28th2010.
5. 14. Uluslararası TDB Kongresi, İstanbul, 14-16 Haziran 2007.

Ulusal ve uluslararası dergilerde yayınlanmış yayınlar:

1. Ozbay G, Bakkal M, **Abbasoglu Z**, Demirel S, Kargul B, Welbury R. Incidence and prevention of traumatic injuries in paediatric handball players in Istanbul, Turkey. Eur Arch Paediatr Dent. 2013 Feb;14(1):41-5.
2. **Abbasoglu Z**, Ozbay G, Gocmen G, Kargul B. Tooth fragment lodged in the upper lip after traumatic dental injury: an unusual case report . Acta Stomatol Croat. 2011;45(4):280-6.

Uluslararası ve ulusal katıldığı bilimsel kurslar :

1. Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Eğitim Sertifikası, 20 Haziran-1 Temmuz 2011, İstanbul.

2. Harvard University, externship programme in Boston Children Hospital, 15-20 December 2010, Boston, USA.
3. Vienna University, externship programme in the department of orthodontics, 17-27 June 2007, Vienna, Austria.