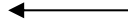
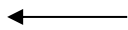


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**SÜT DİŞLENME DÖNEMİNDEKİ ÇOCUKLARIN AĞIZ
MİKROBİYOTASININ OTİZM SPEKTRUM
BOZUKLUKLARI İLE İLİŞKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

GÜLSEVİM USTA

**DANIŞMAN
PROF. DR. GAMZE AREN**

**PEDODONTİ ANABİLİM DALI
PEDODONTİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda 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 olmadığı beyan ederim.

GÜLSEVİM USTA



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana her konuda yol gösteren, sevgisini, anlayışını ve desteğini her zaman hissettiğim değerli danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Gamze Aren'e**,

Tez çalışmamın tasarımında ve geliştirilmesinde emeği geçen, büyük sabır ve özveriyle bana yol gösteren hocam Sayın **Prof. Dr. Güven Külekçi'ye**,

Tez izleme komitemde olan ve tezimin mikrobiyoloji analiz ve değerlendirmesinde bana yardımcı olan hocam Sayın **Doç. Dr. Nursen Topçuoğlu'na**,

Pedodonti eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Pedodonti Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarım, Tez İzleme Komitesi hocam Sayın **Doç. Dr. Arzu Pınar Erdem** olmak üzere, **Prof. Dr. Oya Aktören, Prof. Dr. Koray Gençay, Prof. Dr. Figen Seymen, Prof. Dr. Elif Bahar Tuna İnce, Doç. Dr. Yeliz Güven, Doç. Dr. Mine Koruyucu ve Dr. Yelda Kasımoğlu'na**,

Doktora eğitimimin ilk gününden itibaren tüm zorluklarda yanımda olan, birlikte güzel anılar biriktirdiğimiz sevgili arkadaşlarım **Dr. Merve Esen, Dr. Sabiha Ceren İlisulu, Dr. Dilara Dinç ve Dr. Cansu Akay Tekin'e**,

Birlikte çalıştığımız yıllar süresince destek ve yardımlarını esirgemeyen **Pedodonti Anabilim Dalı çalışanlarına**,

Hayatım boyunca beni her zaman destekleyeni sevgi ve anlayışlarıyla her anımda yanımda olan **canım aileme**,

Hayatıma girdiği günden itibaren her zaman sevgi ve desteği ile hayatımı kolaylaştıran **Dr. Mehmet Oda'ya**,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:32496

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Otizm Spektrum Bozuklukları (OSB).....	3
2.1.1. OSB Tanısı ve Klinik Özellikleri.....	3
2.1.2. OSB Epidemiyolojisi	7
2.1.3. OSB Etiyolojisi	8
2.1.3.1. Genetik Faktörler	9
2.1.3.2. Çevresel Faktörler	11
2.1.3.3. Gen-Çevre Etkileşimi.....	13
2.2. Mikrobiyota, Mikrobiyom ve Metagenom	14
2.3. İnsan Mikrobiyomu ve Ağız Mikrobiyomu	17
2.3.1. İnsan Mikrobiyom Projesi.....	17
2.3.2. Ağız Mikrobiyotası	18
2.3.2.1. İnsan Ağız Mikrobiyomu Veritabanı	22
2.3.2.2. Ağız Mikrobiyomunu Tanımlama Araçları	23
2.3.2.3. 16S rRNA Gen Analizi	24
2.4. OSB ve Mikrobiyota ilişkisi	27
2.4.1. Bağırsak-Beyin İletişimi Arasındaki Çift Yönlü Yollar	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. GEREÇ	36
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kitler	36

3.2. YÖNTEM	36
3.2.1. Örneklem Seçimi	36
3.2.2. İndeks Ölçümleri.....	37
3.2.2.1. Çürük İndeksi	38
3.2.2.2. Plak İndeksi.....	38
3.2.2.3. Modifiye Dişeti İndeksi	39
3.2.3. Çocukluk Otizmi Değerlendirme Ölçeği (ÇODÖ)	39
3.2.4. Tükürük Örneklerinin Elde Edilmesi.....	40
3.2.5. Tükürük Örneklerinin Oral Mikrobiyom Açısından İncelenmesi.....	41
3.2.6. İstatistiksel Değerlendirme	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. OSB’li ve Kontrol Grubundaki Çocukların Sosyodemografik Özellikleri Açısından Değerlendirilmesi	44
4.2. OSB’li ve Kontrol Grubundaki Çocukların Klinik Değerleri Açısından Değerlendirilmesi.....	46
4.3. OSB’li ve Kontrol Grubu Çocukların Ağız Mikrobiyota Kompozisyonunun Değerlendirilmesi.....	48
4.4. OSB’li ve Kontrol Grubunda Bulunan Çocukların Ağız Mikrobiyotalarının Karşılaştırılması	50
4.5. OSB’li ve Kontrol Grubundaki Çocukların Ağız Mikrobiyotalarının Alfa ve Beta Çeşitlilik Tahminlerinin Karşılaştırılması.....	64
4.6. OSB’li ve Kontrol Grubundaki Çocukların Ağız Mikrobiyotalarındaki OTU’ların Klinik Verilerle İlişkininin Değerlendirilmesi.....	66
5. TARTIŞMA	70
5.1. Gereç ve Yöntemin Değerlendirilmesi	70
5.2. Bulguların Değerlendirilmesi.....	75
5.2.1. OSB’li ve Kontrol Grubunun Klinik Özelliklerin Değerlendirilmesi.....	75
5.2.2. OSB’li ve Kontrol Grubunun Ağız Mikrobiyotalarının Değerlendirilmesi.....	76
KAYNAKLAR	92
HAM VERİLER	136
FORMLAR	138
ETİK KURUL KARARI	154
PATENT HAKKI İZNİ	155

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	156
ÖZGEÇMİŞ	157



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: OSB Belirti Kümeleri (APA 2013).....	4
Tablo 2-2: İnsan Ağız Mikrobiyomu Veritabanı (sürüm 10)'na göre 619 taksonun filogenetik dağılımı (Dewhirst ve ark. 2010).....	23
Tablo 3-1: Plak indeksi değerlendirme kriterleri.....	38
Tablo 3-2: Modifiye dişeti indeksi değerlendirme kriterleri	39
Tablo 4-1: OSB'li grup ve kontrol grubunun sosyodemografik ve klinik özellikleri	44
Tablo 4-2: OSB'li ve kontrol grubunun anne-baba eğitimi durumu ve diş fırçalama sıklıklarının incelenmesi	46
Tablo 4-3: Çalışmaya dahil edilen tüm çocukların çürük indeksi, plak indeksi ve modifiye dişeti indeks değerleri.....	47
Tablo 4-4: OSB'li ve kontrol grubundaki çocukların çürük indeksi, plak indeksi, modifiye dişeti indeks değerleri.....	48
Tablo 4-5: OSB'li ve kontrol grubunun ağız mikrobiyotasında saptanan filumların göreceli bolluklarına göre sıralaması.....	51
Tablo 4-6: OSB'li ve kontrol grubunun ağız mikrobiyotasında saptanan sınıfların göreceli bolluklarına göre sıralaması.....	52
Tablo 4-7: OSB'li ve kontrol grubunun ağız mikrobiyotasında saptanan takımların göreceli bolluklarına göre sıralaması.....	53
Tablo 4-8: OSB'li ve kontrol grubunun ağız mikrobiyotasında saptanan ailelerin göreceli bolluklarına göre sıralaması.....	55
Tablo 4-9: OSB'li ve kontrol grubunun ağız mikrobiyotasında saptanan cinslerin göreceli bolluklarına göre sıralaması.....	56
Tablo 4-10: OSB'li ve kontrol grubunun ağız mikrobiyotasında saptanan türlerin göreceli bolluklarına göre sıralaması.....	58
Tablo 4-11: OSB'li ve kontrol grubundaki çocukların ağız mikrobiyotasını çekirdek profili	60
Tablo 4-12: Göreceli miktarı >%1 olan OTU'ların OSB'li ve kontrol gruplarına göre dağılımları.....	61
Tablo 4-13: OSB'li ve kontrol gruplarının alfa çeşitlilik değerlerinin karşılaştırılması.	64

Tablo 4-14: OSB’li grupta OTU’lar ve klinik değişkenler arasındaki korelasyon ilişkisi	67
Tablo 4-15: Kontrol grubunda OTU’lar ve klinik değişkenler arasındaki korelasyon ilişkisi.....	68



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Yeni nesil sekanslama yönteminin ayrıntılı açıklaması ve işlem basamakları (Kilian ve ark. 2016).....	26
Şekil 4-1: OSB’li ve kontrol gruplarında saptanan taksonların değerleri.....	49
Şekil 4-2: OSB’li çocukların ağız mikrobiyotasında saptanan bakterilerin filum düzeyinde göreceli bolluk dağılımları. Her bir bar bir örneği temsil etmektedir ve her filotip farklı bir renkle gösterilmiştir.	49
Şekil 4-3: Kontrol grubundaki çocukların ağız mikrobiyotasında saptanan bakterilerin filum düzeyinde göreceli bolluk dağılımları. Her bir bar bir örneği temsil etmektedir ve her filotip farklı bir renkle gösterilmiştir.	50
Şekil 4-4: OSB’li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotasının filum düzeyinde göreceli bolluk dağılım grafiği	51
Şekil 4-5: OSB’li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotasının sınıf düzeyinde göreceli bolluk dağılım grafiği	53
Şekil 4-6: OSB’li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotasının takım düzeyinde göreceli bolluk dağılım grafiği	54
Şekil 4-7: OSB’li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotasının aile düzeyinde göreceli bolluk dağılım grafiği	56
Şekil 4-8: OSB’li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotasının cins düzeyinde göreceli bolluk dağılım grafiği	58
Şekil 4-9: OSB’li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotasının tür düzeyinde göreceli bolluk dağılım grafiği	59
Şekil 4-10: OSB’li ve kontrol grubunun fülum düzeyinde Firmicutes/Bacteroidetes oranları	59
Şekil 4-11: OSB’li ve kontrol gruplarının alfa çeşitlilik indeks değerlerinin dağılımları	65
Şekil 4-12: OSB’li ve kontrol grubunun alfa çeşitlilik değerlerinin grafiği	66
Şekil 4-13: Tüm örneklerdeki beta çeşitlilik indeks değerlerinin dağılımını gösteren plotordination grafiği	66

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

OSB: Otizm Spektrum Bozukluğu

APA: American Psychiatric Association (Amerikan Psikiyatri Derneği)

WHO: World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

DSM-5: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5. Edition (Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı, Beşinci Baskı)

YGB: Yaygın Gelişimsel Bozukluklar

ICD-11: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (Uluslararası Hastalık Sınıflaması 11. Revizyon)

AAP: American Academy of Pediatrics (Amerika Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Akademisi)

RNA: Ribonükleik asit

DNA: Deoksiribonükleik asit

CNVs: Copy Number Variations (Kopya Sayısı Değişkenliği)

HMP: Human Microbiome Project (İnsan Mikrobiyom Projesi)

NIH: National Institute of Health (Ulusal Sağlık Enstitüsü)

HOM: Human Oral Microbiome (İnsan Ağız Mikrobiyomu)

HOMD: Human Oral Microbiome Database (İnsan Ağız Mikrobiyom Veritabanı)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

qPCR: Kantitatif - Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

NGS: Next-Generation Sequencing (Yeni Nesil Sekanslama)

HPA: hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen

OHI-S: Simplified Oral Hygiene Index (Basitleştirilmiş Ağız Hijyen İndeksi)

SSS: Santral Sinir Sistemi

GABA: γ -aminobutyric asit

LPS: lipopolisakkarid

ÇODÖ: Çocukluk Otizmi Değerlendirme Ölçeği

ÖZET

Usta, G. (2020). Süt Dişlenme Dönemindeki Çocukların Ağız Mikrobiyotasının Otizm Spektrum Bozuklukları ile İlişisinin Değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Pedodonti ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB), ağız mikrobiyotasındaki bozulmalarla birlikte orofaringeal bölgede anormalliklerle ilişkilidir. Gastrointestinal sistemin başlangıcı olarak ağız boşluğu, OSB’de mikrobiyal bağırsak-beyin eksenini aracılı iletişimin bir parçası olarak kabul edilmektedir. OSB’li çocukların ağız mikrobiyotalarındaki değişiklikleri bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, OSB’li çocukların tükürük mikrobiyotasındaki olası değişikliklerin sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılarak incelenmesidir. Çalışma kapsamında, 36-60 ay (ortalama $47,78 \pm 8,54$ ay) arasındaki OSB’li (n=9) ve sağlıklı kontrol (n=9) grubunu oluşturan erkek ve süt diş dizisine sahip çocukların tükürük mikrobiyotası 16S rRNA gen sekanslama analiz yöntemi ile değerlendirilerek OSB ile ilişkili farklılıklar araştırılmıştır. *Flavobacteriales* takımının OSB’li grupta göreceli bolluk miktarı kontrol grubuna oranla daha yüksek bulunurken, *Fusobacteriales* takımının OSB’li gruptaki göreceli bolluk miktarı kontrol grubuna oranla daha düşük bulunmuştur. OSB’li grupta *Granulicatella elegans*, *Streptococcus anginosus* SK52 = DSM 2563, *Streptococcus cristatus* AS 1.389, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* subsp. *dentisani*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Neisseria zalophi* taksonları anlamlı farklılık göstererek daha yüksek oranda gözlenmiştir. Gruplar arasında alfa çeşitlilik indeksleri açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bunun yanında OSB’li grupta Firmicutes filumu, Bacilli sınıfı ve Lactobacillales takımı ile vücut kitle indeksi arasında pozitif yönlü güçlü bir ilişki bulunmuştur. Çalışmadan elde edilen veriler OSB’li çocukların ağız mikrobiyotasının sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında bazı taksonların farklı seviyelerde artan ve azalan eğilimlerini göstermektedir. OSB ve ağız mikrobiyotası arasındaki ilişkinin anlaşılabilmesi ile, OSB ile ilişkili fenotiplerin araştırılmasında ağız mikrobiyotasının potansiyel bir araç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: ağız mikrobiyotası, otizm spektrum bozukluğu, beyin-bağırsak eksenini, 16S rRNA analizi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:32496

ABSTRACT

Usta, G. (2020). Assessment of the relationship between oral microbiota and autism spectrum disorders in children with primary dentition. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Paediatric Dentistry. PhD Thesis. İstanbul.

Autism Spectrum Disorder (ASD) is associated with several abnormalities in the oropharyngeal region together with dysbiosis in oral microbiota. As the beginning of the gastrointestinal system, the oral cavity is accepted as a part of the link mediated by the microbiota gut-brain axis in ASD. There are studies reporting alterations in oral microbiota of children with ASD. The aim of this study was to investigate possible alterations of the saliva microbiota in children with ASD compare with healthy controls. The saliva microbiota of children with ASD (n = 9) and healthy controls (n = 9) between 36-60 months (mean 47.78 ± 8.54 months) were analyzed using 16S rRNA gene sequencing analysis method and investigated the differences related to ASD. In results, while the relative abundance amount of Flavobacteriales order in the group with ASD was higher than the controls, the relative abundance amount of the Fusobacteriales order in the group with ASD was found to be lower than the control group. In the group with ASD, *Granulicatella elegans*, *Streptococcus anginosus* SK52 = DSM 2563, *Streptococcus cristatus* AS 1.389, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* subsp. *dentisani*, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria zalophi* taxa were observed at higher rates with significant differences. There was no significant difference between the groups in terms of alpha diversity indices. In addition, positive correlation was found between Firmicutes phylum, Bacilli class and Lactobacillales order and body mass index in the group with ASD. The data obtained from the study show the increasing and decreasing tendencies of some taxa at different levels when the oral microbiota of children with ASD is compared with healthy controls. With understanding the relationship between ASD and oral microbiota, it is thought that oral microbiota can be used as a potential tool in the investigation of phenotypes associated with ASD.

Key Words: oral microbiota, autism spectrum disorder, brain-gut axis, 16S rRNA analysis

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 32496

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), belirtileri erken çocukluk çağında başlayan, sosyal-iletişimsel alanda belirgin yetersizlik ve kısıtlı, tekrarlayıcı davranışlar ve ilgi alanlarının karakterize olduğu nörogelişimsel bozukluklardan biridir (APA 2013). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-WHO), uluslararası OSB prevalansını %0,76 olarak tahmin etmektedir (Baxter ve ark. 2015). OSB'li çocuk sayısının geçtiğimiz 10 yılda hızla arttığı (Boyle ve ark. 2011) ve erkeklerde kadınlara oranla daha yaygın olarak görüldüğü bildirilmektedir (Demily ve ark. 2017; Tartaglia ve ark. 2017). OSB patogezinde hem genetik hem çevresel faktörlerin rol oynadığı bilinmektedir (Sandin ve ark. 2014). Mevcut ikiz çalışmaları çevresel faktörlerin genetik yatkınlıktan daha önemli bir role sahip olduğunu öne sürmektedir (Hallmayer ve ark. 2011). Bu faktörler arasında sayılan mikrobiyal disbiyoz, bağırsak mikrobiyotasındaki yıkıcı değişiklikleri OSB semptomları ile ilişkilendiren hayvan ve insan epidemiyolojik çalışmaları sayesinde giderek ön plana çıkmaktadır (Hsiao ve ark. 2013; Finegold ve ark. 2010; Son ve ark. 2015; Williams ve ark. 2012; Adams ve ark. 2011; Kang ve ark. 2013).

Gastrointestinal mikrobiyomun, mikrobiyata-bağırsak-beyin eksenini aracılığıyla konakçı davranışını ve nörogelişimini etkilediği yönündeki kanıtlar giderek artmaktadır (Cryan ve O'Mahony 2011). Her ne kadar altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamış olsa da, gastrointestinal mikrobiyomun ve beyin-bağırsak eksenindeki değişikliklerin otizm spektrum bozukluğu da dahil olmak üzere bir dizi nöro-psikiyatrik ve nörogelişimsel bozuklukta rol oynadığı bilinmektedir (Mayer ve ark. 2014). Mikrobiyal disbiyozun, konağın metabolizmasının aracılık ettiği bir yol ile zihinsel bozuklukların gelişiminde nedensel bir rol oynayabileceği düşünülmektedir.

OSB'de bağırsak mikrobiyotasının oynadığı role yönelik kanıtlar gün geçtikçe artarken, ağız boşluğunda yaşayan mikroorganizmaların nörolojik etkileri göz ardı edilmiştir. Ağız boşluğunda bulunan mikroorganizmaların tümü oral mikrobiyota olarak adlandırılır ve insan vücudunda en fazla bakteri çeşitliliğini barındıran ortamlardan biri olarak kabul edilir. Ağızda bulunan mikrobiyal topluluklar çeşitli içsel ve dışsal faktörlere yanıt olarak dinamik dalgalanmalara uğrayabilmekte ve bunun sonucu olarak da beyin işleyişini etkileyebilmektedir (Ding ve Schloss 2014). Ağız boşluğunda bulunan 700 baskın taksonun sinir sistemi de dahil olmak üzere vücuttaki birçok bölge

için enfeksiyon kaynağı olarak görev alabileceği belirtilmektedir (Rosenfeld 2015; Krishnan ve ark. 2017). Ağız mikrobiyotasının nöral fonksiyon üzerindeki etkilerini araştıran birçok çalışmada, oral mikrobiyal düzensizlik ile Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, multiple skleroz ve migrenin ilişkili olabileceği bildirilmektedir (Pereira ve ark. 2017; Shoemark ve Allen 2015; Singhrao ve ark. 2014; Gonzalez ve ark. 2016; Farrokhi ve ark. 2013). Ancak, oral mikrobiyotadaki değişikliklerinin OSB ile ilişkisini araştıran çalışma sayısı oldukça yetersizdir.

Kültürden bağımsız ileri yöntemlerin ortaya çıkması, birçoğu henüz kültürde yetiştirilemeyen mikroorganizmaların saptanmasına büyük ölçüde katkı sağlamıştır (Zarco ve ark. 2012). Mikrobiyom analizinde kullanılan en yaygın kültürden bağımsız teknik 16S ribozomal RNA (16S rRNA) gen topluluğunun profillenmesine dayanmaktadır (Zarco ve ark. 2012).

Bu çalışmada OSB'li hastaların ağız mikrobiyotalarını nörotipik bireylere göre karakterize edebilmek, OSB tanısında kullanılabilecek mikrobiyom belirteçleri belirleyebilmek ve ek olarak da OSB klinik komorbid durumların değerlendirilmesi amacıyla tükürük örnekleri 16S rRNA (ribozomal RNA) gen amplikon dizilimi yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışması, 3-6 yaş grubunda bulunan, erkek, OSB'li çalışma grubu ile OSB'li olmayan çocuklardan oluşan kontrol grubundan elde edilen tükürük örneklerinin analiz edilerek ağız boşluğundaki bakteri varlığı ve çeşitliliğinin incelenmesini ve ağız mikrobiyotalarının karşılaştırılmasını amaçlamaktadır. Bir diğer amaç ise, ağız mikrobiyotası ile ağız içi indeks verileri ve OSB derecesi arasındaki ilişkinin değerlendirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Otizm Spektrum Bozuklukları (OSB)

2.1.1. OSB Tanısı ve Klinik Özellikleri

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), DSM-5 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5. Edition - Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı, Beşinci Baskı) kriterlerinde tanımlanan; sosyal iletişim ve etkileşimdeki eksiklikler, sınırlı ilgi alanları ve tekrarlayan davranışlarla karakterize nörogelişimsel bir durumdur (APA 2013; Bölte ve ark. 2019). Bu tür belirtiler erken gelişim döneminde kendini gösterse de bireyin sosyal talepleri sınırlı kapasiteleri aşana kadar tam olarak ortaya çıkamayabilir ya da yaşamın ilerleyen dönemlerinde öğrenilen stratejilerle maskelenebilir (APA 2013).

Otizm olarak da bilinen otizm spektrum bozukluğu, heterojen klinik özellikler gösteren bir durumdur. Otizm terimi, ‘yaygın gelişimsel bozukluklar (YGB)’ genel tanı kategorisinde bir alt grup olarak ele alındıktan sonra hem daha geniş bir ifadeyi hem de spesifik bir tanıyı tarif etmek için çeşitli şekillerde kullanılmaktadır. Sosyal iletişim alanındaki eksiklikleri daha geniş anlamda ifade eden yaygın gelişimsel bozukluklar arasındaki sınırların belirgin olmaması ve bu bozuklukları ayırt etmedeki zorluklar nedeniyle en son tanı sistemleri olan Uluslararası Hastalık Sınıflaması 11. Revizyon (ICD-11) ve DSM-5, OSB şemsiye terimini kullanmaktadır. Böylelikle ek klinik belirteçler ve değişkenler kullanılarak bireyler farklılıklarına göre sınıflandırılmaktadır (Lord ve ark. 2020). Otizmin genel belirtileri; sosyal iletişim ve etkileşimde bozukluklar, duyuşsal anormallikler, tekrarlayan davranışlar ve farklı şiddetlerde zihinsel engellilik olarak sıralanabilir (APA 2013).

OSB’nin klinik tanısı, temel davranış alanlarında önemli bozulmaların bir uzman tarafından değerlendirmesine dayanmaktadır. Tanı, ebeveynlerden çocuğun ayrıntılı bir gelişim öyküsü alındıktan ve çocuğun ebeveynleri veya diğer bireylerle etkileşim kurması gözlemlendikten sonra konmaktadır (Lord ve ark. 2006; Risi ve ark. 2006). Otizmlili çocukların iletişim kurmada yaşadıkları yaygın zorluklar nedeniyle erken tanı ve müdahale önem kazanmaktadır. Bu bireylerde kullanılan müdahale yöntemleri yaşam boyunca çeşitlilik göstermektedir; çocukluk döneminde ebeveyn

aracılı girişimlere ve/veya terapist tarafından yapılan girişimlere başvurulurken, yetişkinlik döneminde bağımsızlığı teşvik edebilmek için okul temelli stratejiler ya da teknikler gerekmektedir. Farmakolojik terapiler, otizim ile ilişkili sinirlilik gibi semptomları ya da anksiyete gibi komorbiditeleri tedavi etmede kullanılmaktadır (Lord ve ark. 2020). OSB tanısında net bir biyobelirteç veya tanı ölçütü mevcut olmamakla birlikte, ilk tıbbi değerlendirmenin bir parçası olarak klinik genetik testler önerilmektedir (Miller 2010).

DSM-5’de tanımlanan OSB tanı kriterleri beş belirti kümesini (A – E) içermektedir (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: OSB Belirti Kümeleri (APA 2013).

A. Sosyal iletişim ve sosyal etkileşimdeki yetersizlikler Geçmişte veya şu anda aşağıda bulunan üç alt alanın hepsinde birden çok bağlamda kanıt bulunmalıdır. - Sosyal – duygusal karşılık vermede yetersizlik - Sözel olmayan iletişimsel davranışlarda yetersizlik - İlişkilerin geliştirilmesi, sürdürülmesi ve anlaşılmasında yetersizlik (Akran ilişkisini başlatma veya sürdürmedeki zorluklar)
B. Sınırlı, tekrarlayan davranışlar ve ilgi alanları Geçmişte veya şu anda aşağıda bulunan 4 alt alanın en az ikisi kanıt olarak bulunmalıdır. - Tekrarlayıcı motor hareketler, nesne kullanımı ya da konuşma, ekolali - Aynılıkta ısrarcılık, rutinlere sıkı bağlılık, ritüelleşmiş sözel ve sözel olmayan davranışlar - Kısıtlı ilgi alanları - Artmış ya da azalmış duyuşsal ilgi ya da tepkiler
C. Belirtiler erken gelişim döneminde mevcut olmalıdır; ancak sonrasında tam olarak gözlenmeyebilir veya yaşamın ilerleyen dönemlerinde

öğrenilen yollarla maskelenebilir.
D. Belirtiler bireyin mevcut fonksiyonlarında (toplumsal ya da diğer işlevsel alanlarda) klinik olarak anlamlı bozulmaya neden olmalıdır.
E. Zihinsel engellilik ya da gelişim geriliği ile açıklanamayan bozukluklar bulunmalıdır.
Not: Asperger sendromu da dahil olmak üzere önceden DSM-IV e göre belirlenmiş herhangi bir yaygın gelişimsel bozukluğun DSM-5'e göre OSB'ye eşdeğer olduğu varsayılmalıdır. OSB, dikkat eksikliği/hiperaktivite bozukluğu, zihinsel engellilik, konuşma bozukluğu ve genetik sendromlar da dahil olmak üzere birçok bozuklukla birlikte ortaya çıkabilir.

OSB'li bireylerin çoğunda öğrenme güçlüğü bulunduğu bildirilmektedir (Hoirisch-Clapauch ve Nardi 2019). OSB'li bireylerin beyinlerinin yapısal ve difüzyon manyetik rezonans görüntülemesi, düzensiz nöronal göç nedeniyle nöral bağlantının bozulduğunu göstermektedir (Di Martino ve ark 2014). OSB semptomları genellikle 3 yaşa kadar ortaya çıkmakta olup bazı durumlarda belirtiler okul çağına kadar veya daha sonrasında tam olarak kendini gösteremeyebilir. Bazı araştırmalarda semptomların 6-18 ay arasında bile belirlenebileceği düşünülmektedir (Szatmari ve ark. 2016). Daha ciddi şekilde etkilenen çocukların daha hafif etkilenmiş çocuklardan daha küçük yaşlarda güvenilir teşhis edilmesi daha olası olarak bildirilmiştir (Zwaigenbaum ve ark. 2016). OSB'li çocukların birkaç anlamlı kelime söyledikten sonra konuşmayı bıraktığı ve sosyal becerilerde gerileme sergilediği ebeveynleri tarafından bildirilmiştir (Volkmar ve ark. 2005).

Amerika Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Akademisi (American Academy of Pediatrics-AAP) kılavuzları, 9, 15 ve 30 aylık kontrollerde gelişimsel gözetimin yapılmasını ve 18, 24 ve 30 aylık kontrollerde de otizme özel taramaların yapılmasını önermektedir (Johnson ve Myers 2007; Ellerbeck ve ark. 2015). OSB'nin erken belirtileri arasında zayıf göz teması, ismiyle seslenildiğinde zayıf yanıt gösterme ve paylaşma eksikliği, 12 aya kadar el hareketliliğinin olmaması ile dil veya sosyal becerilerin kaybı sayılabilir.

OSB tanısı alan çocukların, ilk altı ayda çevresindeki insanlara daha az baktıkları ve onları daha az arama davranışında bulundukları bildirilmiştir. Bu çocukların ilk bir yılda, sosyal-iletişimsel yetersizlik ile ilişkili olarak nötr duygulanım, kucağa alınmaktan hoşlanmama, sosyal gülümsemenin daha az gözlenmesi, babıldamanın olmaması ya da nadir olması, anormal yüksek tonda ciyıklama gibi davranışlar sergiledikleri de aileleri tarafından bildirilmiştir. Bunun yanında, duyuşal uyarılara aşırı ya da az tepki verme, eklem bölgelerinde hipotoni ve genel motor gelişiminde gecikme gibi belirtilerin de görüldüğü belirtilmiştir (Motavallı 2013; Landa ve Garrett-Mayer 2006).

Nörogelişimsel koşullar, gelişmekte olan beynin olgunlaşması, mimarisi ve işleyişindeki aşırı değişkenliklerden veya niteliksel değişikliklerden kaynaklanan bozuklukları içeren bir şemsiye terimi ifade etmektedir ve genel nüfusun önemli bir azınlığında (%10-15) bulunmaktadır (Boyle ve ark. 2011). OSB tanısında kullanılan DSM-5 kriterleri, tıbbi ve genetik koşulların potansiyel rolü ile birlikte OSB'ye yol açan atipik nörogelişme ile ilişkili çevresel faktörlerin göz önünde bulundurulmasını öneren bir belirteci içermektedir. OSB'de gözlenen nörogelişimsel değişiklikler, bilişsel yetenekler (örneğin; yürütme işlevi, yukarıdan aşağıya işleme, sosyal biliş), sosyal beyin ve diğer nöral yapılar üzerinde geniş bir etkiye sahiptir (Happé ve Frith 2014; O'Hearn ve ark. 2008; Happé ve Frith 2006; DiCicco-Bloom ve ark. 2006). OSB'li bireylerde bağışıklık, endokrin ve bağırsak mikrobiyotasını da içeren önemli fizyolojik sistemlerin de etkilendiği bildirilmektedir (Kelly ve ark. 2017; Edmiston ve ark. 2017; James 2008; Estes ve McAllister 2015).

OSB'de davranışsal anormalliklerin yanında, nöbetler, anksiyete, uyku bozuklukları ve metabolik bozukluklar gibi tıbbi komorbiditeler de görülmektedir (Bercum ve ark. 2015; Antshel ve ark. 2016; Becker 2007; Kohane ve ark. 2012; Meyer ve ark. 2011). OSB'li bireylerin beyinlerinde prefrontal kortekste %67 daha fazla nöron, beyin ağırlığında %17'den fazla artış ve anormal kortikal modelleme şeklinde değişiklikler bulunmuştur. Daha ileri transkriptomik analizlerde prefrontal korteks ve serebellumda fonksiyonel sinaptik aktivite için önemli olan proteinlerin ekspresyonlarında değişiklikler olduğu tespit edilmiştir (Courchesne ve ark. 2011; Voineagu ve ark. 2011; Chow ve ark. 2012; Broek ve ark. 2014). Bunlara ek olarak hastalar üzerinde yapılan birçok beyin görüntüleme çalışmasında nörotipik kontrollere

kıyasla OSB’li bireylerde anormal frontal lob bağlantısı, kortikal morfoloji, amigdala aktivasyonu ve dil kontrol merkezleri arasında korelasyonlar olduğu bildirilmiştir (Catani ve ark. 2016; Yang ve ark. 2016; Herrington ve ark. 2016; Ha ve ark. 2015).

Fragile X, Down sendromu, Rett sendromu ve tüberoz sklerozun da dahil olduğu bazı genetik hastalıklarda ortalama popülasyona göre OSB tanısında artış gözlemlendiği belirlenirken, OSB’nin eşlik ettiği bu genetik bozuklukların genel OSB vakalarının çok az bir kısmını oluşturduğu da bildirilmektedir (Sztainberg ve Zoghbi 2016; Johnson ve Myers 2007; Reddy 2005; Yoo 2015).

2.1.2. OSB Epidemiyolojisi

OSB’li çocuk sayısının son yıllarda hızla arttığı bildirilmektedir (Boyle ve ark. 2011). Güncel nüfusta OSB görülme sıklığının gelişmiş ülkelerde ~%1,5 olduğu tahmin edilmektedir (Christensen ve ark. 2016; Baxter ve ark. 2015). Farklı popülasyonlarda otizm prevalansı ile ilgili yapılan tahminler, çalışmada kullanılan yöntem; örneklem belirleme, hastalığın tanımı, idari kaynaklı ya da bağımsız toplum temelli bir çalışma olup olmamasına bağlı olarak farklılık göstermektedir (Lord ve ark. 2020). “2010 Global Burden of Disease” çalışması, küresel olarak yaklaşık 52 milyon insanda OSB bulunduğunu ve bu sayının 132 kişiden 1’i prevalansına eşit olduğunu bildirmektedir (Baxter ve ark. 2015). Dünya genelinde, farklı bölgelerin, etnik kökenlerin, yapılan hizmetler ve kullanılan kaynakların otizm görülme sıklığında çok az yorumlanabilir bir değişikliğe yol açtığı bildirilmektedir (Lord ve ark. 2020). Sistematik bir derleme çalışması etnik, kültürel veya sosyoekonomik faktörlerin otizm görülme sıklığı üzerinde güçlü bir etkisi olmadığını vurgulamaktadır (Elsabbagh ve ark. 2012). Bazı çalışmalarda da göçmen gruplarında otizm görülme sıklığının arttığı gösterilmektedir (Magnusson ve ark. 2012). Yüksek gelirli ülkelerde herhangi bir coğrafi varyasyon kanıtı olmaksızın Afro-Karayip nüfusunda otizmin daha fazla yaygınlık gösterdiği bildirilmiştir (Goodman ve Richards 1995; Dyches ve ark. 2004; Keen ve ark. 2010). Bununla birlikte, genel popülasyondaki yetişkinlere yönelik bir araştırmada, siyahi ve azınlık etnik gruplarında otizm görülme sıklığının nüfusun geri kalanına oranla daha düşük olabileceği gösterilirken yerli ve Aborjin kültürlerinden elde edilen verilerin oldukça sınırlı olduğu da belirtilmiştir (McManus ve ark. 2016).

OSB, önemli seviyelerde bakıcı, aile ve mali yükler ile ABD’de en ciddi nörogelişimsel durumlardan biri olarak değerlendirilmektedir (Lyll ve ark. 2017).

ABD’de OSB’li vaka sayısı 2002 yılından 2010 yılına kadar %123 oranında artarken 8 yaşındaki her 68 çocuktan 1’inde OSB görüldüğü yönünde tahminde bulunan çalışmalar bulunmaktadır (CDC 2014). Kanada’da yapılan bir çalışmada; 2003 yılından 2010 yılına kadar OSB görülme sıklığının Prince Edward Island’da %70 ve Southeastern Ontario’da %95 oranında arttığı bildirilirken; 2003 yılında 6-9 yaş arasındaki 106 çocukta 1 görülen hastalığın 2010 yılında 63 çocuğun 1’inde görülecek şekilde arttığı bildirilmiştir (NEDSAC 2012). OSB farkındalığının artması ve tanı kriterlerindeki değişiklikler görülme sıklığının artmasına katkıda bulunmuş olabilir (Rutter 2005), ancak tüm bunlar artmış sıklığın sadece bir kısmını açıklayabilmektedir (King ve Bearman 2009; Hertz-Picciotto ve Delwiche 2009). OSB etiyolojisinde genetik katkının rol oynadığı bilinse de OSB prevalansındaki bu hızlı artış sadece genetik faktörler ile de ilişkilendirilememektedir (Hallmayer ve ark. 2011).

Epidemiyolojik ve toplum temelli çalışmalarda, otizmin erkeklerde kadınlara oranla daha yaygın görüldüğü ve bu oranların 2:1 ve 5:1 oranında değiştiği bildirilmiştir (Loomes ve ark. 2017; Brugha ve ark. 2016). 2015 yılında yapılan bir çalışmada ise otistik bozuklukların erkeklerde kadınlara oranla 3 kat daha yaygın görüldüğü ifade edilmiştir (Baxter ve ark. 2015).

OSB’nin cinsiyete göre görülme sıklığını değerlendiren klinik veriler ışığında, cinsiyet oranının erkek/kız 4:1 ile 5:1 arasında değiştiği gözlenmiştir (Fombonne ve ark. 2011; Christensen ve ark. 2016). Ancak aktif vaka incelemesi içeren çok sayıda büyük ölçekli, populasyon temelli epidemiyolojik çalışmada bu oranın 2:1 ve 3:1 olarak erkeklerin üstünlüğü ile seyrettiği gösterilmiştir (Kim ve ark. 2011; Mattila ve ark. 2011; Idring ve ark. 2012; Jensen ve ark. 2014; Baxter ve ark. 2015).

Cinsiyet kromozomu anöploidi olan çocuklar üzerinde yapılan çalışmalar, erkeklerin otizme karşı daha savunmasız olduklarını gösteren spesifik bir sosyal işlev profili tanımlamıştır (Demily ve ark. 2017; Tartaglia ve ark. 2017- Ross ve ark. 2012- Bardsley ve ark. 2013).

2.1.3. OSB Etiyolojisi

OSB’nin etyopatogenezi tam anlamıyla açıklanamamış olsa da son yıllarda bazı nörolojik ve genetik temelleri ve risk faktörlerini belirleme konusunda ilerleme kaydedilmiştir (Lyll ve ark. 2017). Özellikle son 20 yılda OSB etiyolojisinde, spesifik genetik faktörlerin önemli bir rolü olduğu ve karmaşık biyolojik ve psikolojik

mekanizmaların da bu sürece katkıda bulunduğu görüşü ön plana çıkmaktadır (Lord ve Bailey 2002). OSB etyopatogenezinin özellikle nöral bağlantılar gibi beyin gelişimini değiştirebilen genetik faktörlerden kaynaklandığı ve bunun sonucu olarak da sosyal iletişimde bozukluklar ve kısıtlı ilgi alanları ve tekrarlayıcı davranışların görüldüğü varsayılmaktadır. Anormal bir genin fetal gelişimin erken dönemlerinde aktif hale geldiği ve birincil DNA dizilimini değiştirmeden diğer genlerin ekspresyonunu etkilediğini öne süren epigenetik teori de bu varsayımı desteklemektedir (Augustyn 2018). Genetik çalışmalar doğrultusunda çok sayıda nadir de novo mutasyon saptanmış, poligenik riskler, epigenetik ve gen-çevre etkileşimi üzerine ilerlemeler kaydedilmiştir. OSB'nin son derece kalıtsal olduğu öne sürülmekte olup çevresel faktörlerin de bu hastalığın gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir (Hallmayer ve ark. 2011; Risch ve ark. 2014). Genetik olmayan faktörlere odaklanan epidemiyolojik araştırmalarda; ileri ebeveyn yaşı, erken doğum, prenatal hava kirliliğine maruz kalma, iki gebelik arasındaki sürenin kısalığı OSB'nin risk faktörleri arasında sayılmaktadır ve bazı prenatal besinler, metabolik koşullar ve endokrin bozucu kimyasallara maruz kalmanın araştırılması gerektiği belirtilmiştir (Lyll ve ark. 2017). Çok sayıda kanıt OSB etiolojisinin prenatal kökenli olduğunu göstermektedir (Bauman ve Kemper 2005).

Bunun yanında OSB etiolojisinde, genetik ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimin yanı sıra hem sistemik hem de merkezi sinir sistemi enflamasyonunun da rol oynayabileceği düşünülmektedir (Karimi ve ark. 2017; Wu ve ark. 2017; Siniscalco ve ark. 2018).

2.1.3.1. Genetik Faktörler

OSB etiolojisine genetik faktörlerin katkısı olduğu görüşü ikiz ve aile çalışmaları ile desteklenmektedir. ABD ve Avrupa'daki son çalışmalarda genetik katkının %50 ile %95 arasında değiştiği tahmin edilmektedir (Colvert ve ark. 2015; Hallmayer ve ark. 2011; Sandin ve ark. 2014). Ayrıca, OSB'li çocukların kardeşlerinde de OSB görülme riskinin %3 ile %18 arasında değiştiği bildirilmiştir (Gronborg ve ark. 2013; Ozonoff ve ark. 2011; Sandin ve ark. 2014).

Yapılan ikiz çalışmalarında da monozigot ikizlerde OSB konkordans oranının %36-96, dizigot ikizlerde ise konkordans oranının %0-27 arasında değiştiği gösterilmiştir (Sadock ve Sadock 2008). Kardeşlerde artan prevalans, cinsiyetler arası

eşit olmayan dağılım, monozigotik ikizlerdeki yüksek konkordans ve akrabalık derecesinin artması ile OSB bulunma riskinin artması OSB etiyojisinde güçlü bir genetik katkının olduğu düşüncesini desteklemektedir (Augustyn 2018). OSB'nin genetik geçişli bir hastalık olduğuna ilişkin kanıtlar yüksek oranda bulunsada genetik faktörler heterojen, karmaşık ve net olarak anlaşılamamıştır (Freitag 2007). Genetik faktörlerin altında yatan mekanizmalar genellikle tüm genom taraması, sitogenez ve aday genlerin değerlendirilmesi ile araştırılmaktadır (Fuentes ve ark. 2014). Geçtiğimiz on yılda, genetik çalışmalar OSB ve otistik davranışlarla ilişkili kalıtsal, de novo mutasyonlar ve kopya sayısı değişkenliği (copy number variations (CNVs)) de dahil olmak üzere ender genetik varyasyonun tanımlanmasında oldukça başarılı olmuştur (Bourgeron 2015). Bununla birlikte, ender görülen spesifik de novo ve kalıtsal kopya sayısı değişkenliği üzerine yapılan gözlemler, sendromik olmayan otizmlili çocukların yaklaşık %10 gibi küçük bir kısmı ile sınırlı kalmıştır (de la Torre-Ubieta ve ark. 2016). Postsinaptik iskele genleri (örn; SHANK3), kontakın genleri (örn; CNTN4), nöreksin aile genleri (örn; CNTNAP2) ve kromatin yeniden modelleme genleri (örn. CHD2)'nin de dahil olduğu birçok güçlü aday genler tanımlanmıştır (Lyll ve ark. 2017). Son yıllarda OSB etiyojisindeki genetik keşifler arasında yer alan ve ortak biyolojik süreçleri tanımlamada kullanılan genomiklerden de yararlanılmakta olup OSB'li bireyler arasında tanımlanan genetik risk değişkenlerinin ortak genetik yollarda kesiştiğini gösteren bulgular artmaktadır (Lyll ve ark. 2017). OSB ile bağlantılı nadir değişkenlerin analizi, 3 ortak yolu ortaya koymuştur; kromatin yeniden şekillenmesi, sinaptik hücre adezyonu ve iskelesi, nöronal sinyalleşme ve gelişme (Bourgeron 2015; Pinto ve ark 2014). Otopsi sonrası beyindeki OSB ile ilişkili ko-ekspresyon paternlerini değerlendiren çalışmalarda, OSB'de yer alan beyin gelişim gen ağları tanımlanmış (Voineagu ve ark. 2011) ve OSB nöropatolojisinin başlaması için orta fetal gelişimin kritik bir dönem olduğu belirtilmiştir (Willsey ve ark. 2013). Ek olarak, bu çalışmalarda OSB'li bireylerin beyinlerinde bağışıklık yanıtı (Gupta ve ark. 2014; Voineagu ve ark. 2011) ve M2 mikrogliya'nın aktivasyonu (Gupta ve ark. 2014) ilgili gen ağlarının farklı şekilde koaktif olduğu bulunmuştur. Bu sonuçların etiyojik etkilere sahip olup olmadıkları veya diğer olayların bir sonucu olup olmadığı konusunda soru işaretleri bulunmaktadır (Lyll ve ark. 2017).

Günümüzde, çok sayıda genetik değişkenin yani poligenik riskin kümülatif etkisi OSB ve diğer psikiyatrik bozukluklar için önemli bir risk faktörü olarak kabul

edilmektedir (de la Torre-Ubieta ve ark. 2016; Gaugler ve ark. 2014). OSB etiyolojisinde poligenik riske katkıda bulunan ortak değişkenlerin diğer nörogelişimsel ve psikiyatrik bozukluklarla kısmen de olsa paylaşıldığı düşünülmektedir (Cross-Disord. Lee ve ark. 2013). Ortak genetik değişkenlerin olası küçük etkilerini tahmin edebilmek için yeterli istatistiksel güce sahip büyük ölçekli genom çapında OSB ve çapraz bozukluk ilişkisi üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Lyal ver ark. 2017).

2.1.3.2. Çevresel Faktörler

OSB etiyolojisinde çevresel faktörlerin genetik faktörlerden daha etkili olduğunu öne süren çalışmalar da bulunmaktadır (Modabbernia ve ark. 2017). OSB’de çevresel biyolojik risk faktörleri; ileri ebeveyn yaşı, fetal ortam (örn; seks steroidleri, annenin geçirdiği enfeksiyonlar/bağışıklık aktivasyonu, obezite, diyabet, hipertansiyon veya ultrason muayeneleri), perinatal ve obstetrik olaylar (örn; hipoksi), ilaç kullanımları (valproat, selektif serotonin geri alım inhibitörleri), sigara ve alkol kullanımı, beslenme (örn; D vitamini, demir, çinko ve bakır), kısa gebelik aralığı, aşılama ve toksik maruziyetleri (hava kirliliği, ağır metaller, böcek ilaçları, organik kirleticiler) içermektedir (Bölte ve ark. 2019). Bununla birlikte, bu faktörlerin OSB için nedensel kabul edilemeyeceği ancak tepkisel, bağımsız ve katkıda bulunan birer etken olabileceği bildirilmektedir (Lord ve ark. 2020). Diğer faktörler arasında; uzamış doğum süresi, sezaryen doğum şekli veya yardımcı vajinal doğum, membranların erken yırtılması (prematür doğum) ve yardımcı üreme teknolojilerinin kullanılması da sayılmaktadır (Lord ve ark. 2020). Çevresel risk faktörlerinin genetik ve epigenetik etkiler, inflamasyon ve oksidatif stres veya hipoksik ve iskemik hasar gibi birkaç karmaşık mekanizma yoluyla OSB riskini tetikleyebileceği düşünülmektedir (Modabbernia ve ark. 2017).

Birçok derleme ve metaanaliz çalışmasında çocuğun cinsiyetinden bağımsız olarak hem ileri baba yaşının hem de ileri anne yaşının OSB için risk yarattığı (Guinchat ve ark. 2012; Idring ve ark. 2014; Sandin ve ark. 2012) ancak ileri baba yaşının daha önemli bir risk faktörü oluşturabileceği bildirilmiştir (Hultman ve ark. 2011). Bununla birlikte ileri anne yaşının da risk faktörü yarattığına yönelik kanıtlar giderek artmaktadır (Sandin ve ark. 2016; Quinlan ve ark. 2015). Ayrıca ebeveynler arası yaş kombinasyonları arasında da risk farklılıkları bulunduğu (Shelton ve ark.

2010) ve ebeveynler arası yaş farkının artmasıyla riskin de artabileceği belirtilmektedir (Sandin ve ark. 2016). Anne ve baba yaşının etkilerinin biyolojik mekanizmaları üzerine çeşitli hipotezler öne sürülürken, ileri ebeveyn yaşı ile artan malign de novo mutasyonları olasılığı arasında bir ilişki olabileceği ön plana çıkmaktadır (Goldmann ve ark. 2016) Bu ilişki büyük olasılıkla yaşam süresi boyunca spermatogenez sırasında oluşan mutasyonların yarattığı kümülatif bir risk ile açıklanmaktadır (Jónsson ve ark. 2017).

İki gebelik arası sürenin kısa olmasının (<12 ay) OSB riskinde artış sağladığına yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Cheslack-Postava ve ark. 2011; Cheslack-Postava ve ark. 2014; Coo ve ark. 2015; Dodds ve ark. 2011; Durkin ve ark. 2015; Gunnes ve ark. 2013; Zerbo ve ark. 2015). Daha sınırlı sayıda kanıtlar bulunmasına rağmen üç çalışmada da iki gebelik arası sürenin uzamasıyla da (>60-84 ay) riskin artabileceği bildirilmektedir (Cheslack-Postava ve ark. 2014; Durkin ve ark. 2015; Zerbo ve ark. 2015). Bu tür ilişkilerin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılabilmiş olmasa da annenin besin tüketimi, enflamasyon, stres, kısırlık veya diğer üreme özellikleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Lyll ve ark. 2017).

Gelişmekte olan fetüsün yakın çevresinde seks hormonu değişiklikleri, maternal obezite, diyabet, hipertansiyon, enfeksiyonlar ve bağışıklık aktivitesi ve ultrason maruziyeti gibi çok sayıda çevresel prenatal etkileşimin OSB etiolojisinde etkili olabileceği belirtilmiştir. Bu risklerin kökenleri genetik eğilimi ön plana çıkarsa da, hem anne hem de fetusu içeren fetal-maternal plasenta sistemini tehlikeye sokabilecek çevresel etkileşimler göz ardı edilmemelidir (Bölte ve ark. 2019). Bu faktörlerin çoğu kritik zaman aralıklarında dengesiz fetal cinsiyet hormonuna maruz kalımının gen ekspresyonu ve transkripsiyonunu olumsuz etkilemesi gibi bazı patofizyolojik süreçlerin sonucu olabileceği düşünülmektedir (Auyeung ve ark. 2013; Kosidou ve ark. 2017).

İkizler üzerinde yapılan bir çalışma; ortak çevresel faktörlerin OSB den sorumlu varyans faktörlerinin %58'ini oluşturduğunu göstermektedir (Hallmayer ve ark. 2011). Çocukların prenatal ve erken bebeklik dönemlerinin, özellikle çocukluk hastalıklarına yol açabilecek çevresel tehlikelere karşı savunmasız oldukları kritik büyüme dönemleri olduğu bilinmektedir (Wigle ve ark. 2007). Ancak yine de, çevresel faktörlerin OSB başlangıcındaki rolü hala büyük ölçüde bilinmemektedir.

Glikoz anormallikleri ile obezite, aşırı maternal kilo alımı veya diabetes mellitus gibi risk faktörleri arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir. Embriyo, fetus veya yenidoğanda glikoz anormalliklerinin de OSB patogeneğinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (Hoirisch-Clapauch ve Nardi 2019).

2.1.3.3. Gen-Çevre Etkileşimi

OSB oluşumunda açık bir genetik katkı olmasına karşılık, önemli fenotipik ve genetik heterojenite çok faktörlü bir etiyolojiyi desteklemektedir. Çevresel faktörlerin OSB etiyolojisine katkısı konusunda çelişkili kanıtlar bulunmaktadır; ilave genetik etkilerin baskın etkisini gösteren çalışmalar olduğu gibi, kalıtsal olan ve olmayan ortak çevresel faktörlerin neredeyse eşit bir etkiye sahip olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Tick ve ark. 2016). OSB etiyolojisinde gen-çevre etkileşiminin değerlendirilmesine olan ilgi giderek artmaktadır, ancak bugüne kadar bu konu ile ilgili yapılan çalışmalar kısıtlı olmuştur (Mazina ve ark. 2015; Schmidt ve ark. 2011; Volk ve ark. 2014). Çalışmalarda *MET* gen risk varyantı ile prenatal hava kirliliğine maruziyet arasında (Volk ve ark. 2014), karbon metabolizması aşamasındaki varyantlar ile annenin doğum öncesi vitamin kullanımı arasında (Schmidt ve ark. 2011) ve annenin doğum öncesi enfeksiyonu ile bir dizi OSB kopya sayısı varyantı arasında (Mazina ve ark. 2015) ilişkilerin bulunabileceği bildirilmiş olsa da bu bulguların tekrarlanması gerektiği de belirtilmiştir (Lyall ve ark. 2017).

Çalışmalar, bir tür epigenetik değişiklik olan DNA metilasyonunun (DNAm) genetik varyasyonla kontrol edilebildiğini (Liu ve ark. 2014) ve çevresel faktörlere maruz kalındığında değişebileceğini göstermektedir (Argos 2015; Joubert ve ark. 2016; Ladd-Acosta ve ark. 2016). Rett sendromu, Fragile X sendromu ve Angelman sendromuna epigenetik düzensizliğin neden olduğu bilinmektedir ve bu sendromların her biri OSB ile fenotipik olarak örtüşmektedir (Amir ve ark. 1999; Buiting ve ark. 1995; Pieretti ve ark. 1991). OSB'li bireylerin beyinlerinde hipo ve hipermetilasyon (Ladd-Acosta ve ark. 2014) ve histone 3 lysine 4 trimetilasyon izlerinin yayılması (Shulha ve ark. 2012) gibi epigenetik değişiklikler bulunmuştur. Bu bulgular gelecekte epigenetiği hastalığın belirleyicisi olarak hizmet etmesinde bir potansiyel olarak ön plana çıkarmaktadır. OSB için nadir genetik varyantlardan biri olan kromatinin yeniden şekillenmesi de epigenetik düzenlemeye dahil olmaktadır (Lyall ve ark. 2017).

2.2. Mikrobiyota, Mikrobiyom ve Metagenom

Mikrobiyota terimi, tanımlanmış bir ortamda bulunan mikroorganizmaların birleşimini ifade etmektedir ve ilk olarak sağlık ve hastalıkta insan vücudunda yaşayan mikroorganizmaların önemini vurgulayan Lederberg ve McCray tarafından tanımlanmıştır (Lederberg ve McCray 2001). Bu mikrobiyal sayım, ağırlıklı olarak verilen biyolojik numunelerden çoğaltılan ve sekanslanan 16S rRNA genlerinin, 18S rRNA genlerinin veya diğer marker genlerin ve genomik bölgelerin analizine dayanan moleküler yöntemler kullanılarak oluşturulmaktadır. Taksonomik atamalar, her sekansı filumdan türe farklı taksonomik seviyelerde bir mikrobiyal taksona (bakteri, arkea veya düşük ökaryotlar) atanan çeşitli araçlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Marchesi ve Ravel 2015).

Mikrobiyom terimi, mikroorganizmaları (bakteri, arkea, lower and higher ökaryotlar ve virüsler), mikroorganizmaların genomlarını (i.e., genes) ve çevresel koşulları içeren tüm habitatı ifade etmektedir (Marchesi ve Ravel 2015). Joshua Lederberg mikrobiyomu, “vücut alanımızı paylaşan kommensal, simbiyotik ve patojenik mikroorganizmaların ekolojik topluluğu” olarak tanımlamaktadır (Lederberg and McCray 2001). Bu terim, insanla birlikte yaşayan mikroorganizmaların ve insan vücudunun bir kompleks interaktif sistem yani ‘süperorganizma’ olarak ele alınması görüşünden doğmuştur (Külekçi 2013). Bu tanım belirlenen bir ortamdaki biyotik ve abiyotik faktörleri kapsayan “biyom” a dayanmaktadır (Marchesi ve Ravel 2015).

Metagenom, bir mikrobiyota üyelerinden genom ve genlerin toplanmasını ifade etmektedir; ve bir örnekten ekstrakte edilmiş DNA’nın shot-gun sekanslama sonrası bir referans veritabanıyla birleştirilmesi, eşleştirilmesi ve açıklanmasını içermektedir. Metagenomik analizler, mikrobiyotanın potansiyel işlevi hakkında bilgi edinilebilen metagenomu karakterize etmekte kullanılan süreçleri ifade etmektedir (Marchesi ve Ravel 2015).

Metagenomik yöntemde bir örnekte bulunan mikrobiyal topluluğun genetik kompozisyonu incelenirken, metatranskriptomik yöntemde aktif olarak kopyalanmış genler incelenmektedir (Gilbert ve Hughes 2011). Metatranskriptom, sadece mikrobiyal kompozisyonu gösteren metagenomun aksine, karmaşık bir mikrobiyal topluluğun taksonomik kompozisyonunu ve aktif fonksiyonlarını da ortaya çıkarmaktadır (Solbiati ve Frias-Lopez 2018). Bir mikrobiyal topluluğun bileşimi her zaman topluluğun aktif

üyelerini yansıtmayabilir, bu da mikrobiyomun fonksiyonel analizi ihtiyacını gerekli kılmaktadır. Aynı örnekten elde edilen metagenomik (mikrobiyal kompozisyon) ve metatranskriptomik (global gen ekspresyonu) profillerin filogenetik kompozisyonunda farklılıklar olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Benítez-Páez ve ark. 2014; Duran-Pinedo ve ark. 2014; Franzosa ve ark. 2014; Yost ve ark. 2015). Bu çalışmalardan elde edilen bilgiler ışığında, metagenomda az sayıda bulunan topluluk üyelerinin, topluluk için gerekli olan metabolik aktiviteleri sürdürmede hala kritik bir önemi olduğu öne sürülmektedir (Solbiati ve Frias-Lopez 2018).

Metagenomik ve metatranskriptomi yöntemlerinde halen teknik zorluklar bulunmaktadır, ancak ağız mikrobiyomunun kolektif genomunu ve gelecekteki metabolik etkileri hakkında bilinenleri geliştirmede büyük fırsatlar sunmaktadır (Kilian ve ark. 2016). Kültürden bağımsız yöntemler, mikrobiyomun çeşitliliği hakkında faydalı bilgiler sağlamıştır, ancak bir organizmanın özelliklerini ve potansiyelini araştırmak için kültürde yetiştirilmesi gerekmektedir (Kilian ve ark. 2016). Günümüzde oral mikrobiyomda bulunan türlerin yaklaşık üçte biri kadarının 16S rRNA gen dizileri bilinmektedir; kültür edilememiş mikroorganizmaların tanımlanması için yeni yöntemlerin arayışı devam etmektedir (Vartoukian ve ark. 2016). Moleküler biyoloji, biyoinformatik yaklaşımlar ve artan hesaplama gücüyle birlikte yeni kültür yöntemlerinin bulunması yoluyla hem ağız mikrobiyomu hakkındaki bilinenleri arttıracığı hem de gelecekte sağlığı ve hedef hastalığı korumak için yeni stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunacağı düşünülmektedir (Kilian ve ark. 2016).

Mukoza ve deri de dahil olmak üzere insan vücudunun tamamında kolonize olmuş mikrobiyal hücreler en az somatik hücrelerimiz kadar sayıca bolluk göstermektedir (Sender ve ark. 2016) ve insan genomundan çok daha fazla sayıda gen içermektedir (Gilbert ve ark. 2018; iHMP 2014). İnsan vücudunda 500-1000 kadar bakteri türü bulunduğu tahmin edilmektedir (Turnbaugh ve ark. 2007). Bununla birlikte alt türlerin genotiplerinin sayısının bundan daha fazla olabileceği de düşünülmektedir (Locey ve Lennon 2016). Her bakteri suşu, insan genomundan çok daha fazla sayıda genetik çeşitlilik sergileyen ve dolayısıyla da daha fazla esneklik sunan bir genoma sahiptir (Gilbert ve ark. 2018). İnsan vücudunda zaman içerisinde gelişen mikrobiyal varyasyonun ya da farklı insanlar arasındaki mikrobiyal varyasyonun genel sağlığı, sağlığın korunmasını veya bir hastalık başlangıcı ve ilerlemesini nasıl etkilediği henüz

anlaşılamamıştır (Gilbert ve ark. 2018). Ancak mikrobiyom ve mikrobiyal metabolomdaki değişikliklerin ve bunların bağışıklık, endokrin ve sinir sistemleri ile etkileşimlerinin enflamatuar bağırsak hastalığı (Frank ve ark. 2007), kanser (Kostic ve ark. 2013; Matson ve ark. 2018), majör depresif bozukluk (Jiang ve ark. 2015; Zheng ve ark. 2016) ve otizm (Hsiao ve ark. 2013) gibi bir dizi hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir.

Mikron ölçekli biyocoğrafya, mikrobiyal topluluğun fizyolojisini ve ekolojisini, sistem biyolojisini ve insan sağlığı ve hastalığı üzerindeki etkilerini anlamada oldukça önemlidir. İki mikrop arasındaki yakınlık veya fiziksel bir temas mikropların fizyolojilerini önemli ölçüde değiştirebilmektedir; örneğin bir aneoraba aerobik bir ortamda hayatta kalma kabiliyeti kazandırabilir (Diaz ve ark. 2002) ya da aynı organizma tarafından üretilen metabolitleri önemli ölçüde değiştirebilir (Wright ve ark. 2013). Bu nedenle fizyolojinin nasıl işlediğini anlayabilmenin yaygın olarak etkileşimde bulunan komşuların kimliğini bilmeye bağlı olduğu bildirilmektedir (Mark Welch ve ark. 2016). Mikrobiyota fizyolojisi ve ekolojisi, mikron ölçeğinde konakçı ile yakından ilişkilidir ve bu ilişki sağlık durumunun sürdürülmesini ya da hastalığa doğru ilerlemesini etkileyebilmektedir. Dolayısıyla mikropların sadece kimin yanında olduğunun değil neyin yanında olduğunun bilinmesinin de gerekli olduğu ileri sürülmektedir (Mark Welch ve ark. 2016).

İnsan mikrobiyomunun bileşimi her birey için benzersizdir ve bireyler arasındaki mikrobiyom farklılıkları bireyin mikrobiyomunda zaman içerisinde ortaya çıkan tipik kimyasal farklılıklardan daha fazladır (iHMP 2014; Lax ve ark. 2014). İkizler üzerindeki çevresel faktörlerin incelendiği bugüne kadar yapılan çalışmalar, tek yumurta ikizlerinin mikrobiyal bileşimi ve yapısının birbirine çok da benzemediğini ancak çift yumurta ikizlerine göre de daha benzer olduğunu göstermiştir (Goodrich ve ark. 2014). Mikrobiyal topluluğun bir araya getirilmesinde insan genomunun etkisinin sınırlı olduğu ve çoğunlukla çevresel faktörler aracılığıyla belirlendiği düşünülmektedir (Gilbert ve ark. 2018). Tek yumurta ikizlerinin genel bağırsak mikrobiyotalarının çift yumurta ikizlerine oranla daha benzer olmadığını öne süren çalışmalar bulunsada (Ridaura ve ark. 2013; Turnbaugh ve ark. 2010; Turnbaugh ve ark. 2009); daha büyük boyuttaki ikiz kohort çalışmaları Christensenella gibi bazı taksonların yüksek oranda kalıtsal olarak tanımlandığını ve genetiğin mikrobiyom kompozisyonu üzerinde küçük

ama istatistiksel olarak anlamlı bir etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Goodrich ve ark. 2014).

Her insan, yaşamının erken evresinde edindiği ortamlar ve popülasyonlar arasında farklılık gösteren ve büyük ölçüde bireysel olan mikrobiyal suşları taşımaktadır (iHMP 2019). Doğum sırasında ve doğumdan hemen sonra yenidoğan, bağırsak mikrobiyomunun oluşumunu başlatan anneden ve çevresel faktörlerden kaynaklı mikrobiyoma maruz kalmaktadır (Koenig ve ark. 2011). Yaşamın ilk yılında 500-1000 tür içeren tahmini 10^{13} ile 10^{14} arasında mikrop gastrointestinal sistemi kolonize etmektedir (Weng ve Walker 2013). Anne sütü ile beslenme bırakıldıktan sonra bağırsak mikrobiyotası kesin olarak yerleşmekte ve sağlıklı bireylerde yaşam boyu bir mikrobiyom imzaya yol açmaktadır (Maynard ve ark. 2012).

Mikrobiyal çeşitlilik, vücudumuzun farklı ekolojik bölgelerinde farklı şekilde kendini göstermektedir; örneğin genellikle bağırsakta daha fazla mikrobiyal çeşitlilik beklenmektedir, ancak bu durum disbiyotik rahatsızlıklar ve kadın üreme sistemindeki bir takım olumsuzluklar ile de ilişkili olabilmektedir (iHMP 2019). Mikrobiyom, enflamatuvar bağırsak hastalığı ve diyabet gibi rahatsızlıklarla bozulabilmektedir, ancak mikrobiyomla bağlantılı çeşitli sağlık durumları ve bu bağlantıların temelleri henüz keşfedilememiştir. Ulusal Sağlık Enstitüleri İnsan Mikrobiyom Projesi (The National Institutes of Health Human Microbiome Project) bu alandaki soruları ele alan ilk büyük ölçekli girişimlerden biridir.

2.3. İnsan Mikrobiyomu ve Ağız Mikrobiyomu

2.3.1. İnsan Mikrobiyom Projesi

İnsan Mikrobiyom Projesi (Human Microbiome Project, HMP) insanlar ve mikrobiyomları arasındaki etkileşimleri ve bu etkileşimin sağlıkla ilgili sonuçlarını araştıran kaynaklar, yöntemler ve keşifleri sağlamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. İki aşamada düzenlenen İnsan Mikrobiyom Projesinin (Human Microbiome Project, HMP (HMP1, HMP2)) on yıllık programı kapsamında referans dizileri, çoklu omik veri setleri, istatistiksel araçlar ve klinik protokoller geliştirilmiştir. Projenin birinci aşaması (HMP1), sağlıklı yetişkinler üzerinde temel bir çalışma olarak birçok vücut bölgesindeki (oral (7 bölge), nazal, vajinal, bağırsak ve cilt) mikrobiyal toplulukların karakterizasyonuna odaklanmıştır ve belirli hastalık ve bozukluklara odaklanan bir dizi

gösteri projesini içermektedir. Projenin ikinci aşaması (HMP2), temsili mikrobiyom ile ilişkili durumların araştırıldığı üç longitudinal kohort çalışma ile hem konak hem de mikrobiyom için analiz edilen biyolojik özelliklerin repertuarını genişletmiştir: gebelik ve erken doğum (hamile kadınların vajinal mikrobiyomları), inflamatuvar bağırsak hastalıkları (bağırsak mikrobiyomu) ve prediyabet (bağırsak ve burun mikrobiyomları). Bu çalışmalar zaman içerisinde mikrobiyal toplulukların kompozisyonundaki değişikliklerin belirlenmesi, metabolik profillerin tanımlanması, hem konakçı hem de mikrobiyomdan gen ekspresyonu ve protein profilinin tanımlanması, konakçıya özgü genetik, epigenomik, antikor ve sitokin profillerinin tanımlanması gibi çoklu ölçüm çeşitleri ile de devam etmiştir. Tüm sekanslar ve çoklu omik veriler ile HMP1 ve HMP2 çalışmalarında elde edilen klinik bilgiler ve araçlar HMP Veri Koordinasyon Merkezi'nde veya araştırma topluluğu için merkezi bir kaynak olarak hizmet veren kontrollü erişim depolarında bulunmaktadır (iHMP 2019).

HMP analizlerinden elde edilen sonuçlar, bireye özgü mikrobiyotanın çeşitliliği ve bolluğunun birçok faktöre bağlı olarak büyük ölçüde değiştiğini ve klinik meta verilerde en güçlü ilişkinin etnik/ırksal arka plan ile mikroorganizmalar arasında olduğunu göstermektedir (Human Microbiome Project, 2012b). Bu tür çalışmalar ile insan vücudundaki her organın veya mukozanın normal mikrobiyotasının bileşeni hakkında bilgiler sunulmakta ve insan sağlığını nasıl etkilediğinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır. İnsan vücudunun gelişimi sırasında, insan mikrobiyomu vücut bölgesine özgü yörüngeleri takip etmektedir böylece her vücut bölgesi için belirli bir biyocoğrafya gelişmektedir. Örneğin deri, mikrobiyom bileşimi ve yapısı açısından farklı fiziksel ve topografik özellikleri olan alanlarda dramatik varyasyonlar sergilemektedir (Grice ve Segre, 2011; Grice ve ark. 2009).

2.3.2. Ağız Mikrobiyotası

Ağız ortamı vücudumuzun en yoğun şekilde kolonize olmuş bölümlerinden biridir. Ağız boşluğunda bulunan birkaç farklı habitat, ağız ve genel sağlık arasında önemli bir bağlantı olan heterojen mikrobiyal toplulukları desteklemektedir (Kilian ve ark. 2016).

İnsan evrimi boyunca, çevremiz sürekli olarak mikrobiyomumuzun bileşiminin şekillendirilmesinde rol oynamıştır ve neolitik dönem, sanayi devrimi ve modern

çağlarda bu değişim daha da hız kazanmıştır (Gillings ve ark. 2015). Ateşin keşfi, tarımda ilerlemeler, sanayi devrimi ile rafine şeker de dahil olmak üzere işlenmiş gıdalara artan erişim ve antimikrobiyal tedavilerin ortaya çıkması ile insan mikrobiyom kompozisyonunun etkilenmiş olabileceği düşünülmektedir (Gillings ve ark. 2015). Özellikle rafine şekerin diyetimize dahil olmasıyla, bazı oral bakteriler bu değişikliklere uyum sağlayabilmek için metabolizmalarını genetik olarak geliştirmiştir. Örneğin, *Streptococcus mutans*'ın, artan oksidatif strese karşı savunma geliştirerek kendi yeni ve etkili karbonhidrat metabolizması sayesinde asidik yan ürünlere karşı direnç geliştirerek diğer oral bakteri türleri ile rekabet edebildiği bildirilmektedir. Bu adaptasyonla diğer aside karşı toleranslı türlerle birlikte ağız boşluğundaki prevelansının arttığı belirtilmektedir (Cornejo ve ark. 2013).

Ağız, yerleşik mikrobiyota için homojen bir ortam olmamakla birlikte mikrobiyal kolonizasyon için dişler, dişeti oluğu, yapışık dişeti, dil, yanak, dudak ve sert ve yumuşak damak gibi farklı habitatlar sunmaktadır (Dewhirst ve ark. 2010; Kilian ve ark. 2016). Bu habitatlar, oldukça heterojen bir ekolojik sistem oluşturmakta ve farklı mikrobiyal toplulukların gelişmesini de desteklemektedir (Xu ve ark. 2015). Ağız ortamının ılık ve nemli olması birçok mikroorganizmanın gelişimine olanak sağlamak ve tükürük proteinleri, glikoproteinler, dişeti oluğu sıvısı gibi konaktan üretilmiş besinler sunmaktadır (van't Hof ve ark. 2014). Dişler insan vücudundaki tek doğal dökülmeyen yüzeyler olup, kapsamlı biyofilm oluşumu için eşsiz fırsatlar sunar ve mikrobiyal kalıcılık için güvenli bir ortam sağlar (Marsh ve Devine 2011). Ağız boşluğundaki mikrobiyota ile mikrobiyotanın genetik elementlerini oluşturan genomların ve çevresel etkileşimlerin tümü oral mikrobiyom olarak tanımlanmaktadır (Külekçi 2013). Oral mikrobiyom bireyin doğumundan yaşlılığına dek hayatı boyunca değişiklik göstermektedir (Berkowitz ve Jones 1985; Asikainen ve Chen 1999; Preza ve ark. 2008). İnsan ağız mikrobiyomu hem kolay örnek alınabilen bir ortam olması hem de dünyanın en yaygın infeksiyon hastalıkları olan diş çürüğü ve diş eti hastalıkları ile olan ilişkisi nedeniyle üzerinde en çok çalışılan mikrobiyotalardan biridir (Külekçi 2013).

Hem tükürük hem de dişeti oluğu sıvısı mikrobiyal büyüme için gerekli besinleri sağlamak ve antimikrobiyal aktiviteler için gerekli bileşenleri içermektedir (van't Hof ve ark. 2014; Grant ve ark. 2010; Barnes ve ark. 2009). Tükürüğün ağız sağlığının

devamı açısından birçok görevi vardır; çiğneme, yutma ve konuşmayı kolaylaştırır, sindirime yardımcı olur ve dengeli bir mikrobiyota sağlamak için gerekli olan enzim ve proteinleri içerir (van't Hof ve ark. 2014). Çoğunlukla dil gibi oral mukoza yüzeylerinden elde edilen her mililitre tükürük başına 108 mikroorganizma tespit edildiği bildirilmiştir (Marsh ve ark. 2016). Salgı immünoglobulin A, laktoferrin, laktoperoksidaz, lizozim, statin ve histatinlerin de dahil olduğu çok sayıda tükürük bileşeni mikrobiyomu doğrudan ve dolaylı olarak düzenlemekte ve dengede tutmaktadır (van't Hof ve ark. 2014).

Ağızda bulunan toplam bakteriyel takson sayısına yönelik çok sayıda tahmin olmasına rağmen, genel olarak ağız boşluğunda toplamda 687 baskın türün olduğu kabul edilmektedir (www.homd.org)-HOMD 2016; Dewhirst ve ark. 2010). Bu tahminler, kültürel ve fenotipik karakterizasyon çalışmalarından elde edilen bakterilerin geleneksel olarak tanımlanmasına ve çoğunlukla da 16S rRNA gen analizleri sonucu bakterilerin tanımlanmasına dayanmaktadır (Paster ve ark. 2001; 2006; Aas ve ark. 2005; 2008; Dewhirst ve ark. 2010). Sadece subgingival alanda yaklaşık 400-500 oral taksonun tespit edildiği bildirilirken (Paster ve ark. 2001; Aas ve ark. 2005), geri kalan taksonların dil, diş yüzeyi, bukkal mukoza, bademcikler, yumuşak ve sert damak ve dudak vestibülünün de dahil olduğu birçok oral habitata dağıldığı belirtilmektedir (Aas ve ark. 2005; Human Microbiome Project 2012a; Human Microbiome Project 2012b; Segata ve ark. 2012).

Tükürük mikrobiyomunun tüm bölgelerden çıkarılan mikropların bir kısmını olduğu düşünülmektedir (Krishnan ve ark. 2017). Bazı Streptococcus, Gemella, Granulicatella, Neisseria ve Prevotella gibi belirli türler tüm oral bölgelerde örtüşme gösterse de, genellikle bölgeye özgü bir özellik göstermektedir. Örneğin, Rothia türleri tipik olarak dil ve diş yüzeylerini, Simonsiella sadece sert damağı, Streptococcus salivarius esas olarak dilde kolonize olup tükürükte de bulunurken, treponemler ise tipik olarak subgingival alanda sınırlı kalmaktadır (Kazor ve ark. 2003; Mager ve ark. 2003; Aas ve ark. 2005; Segata ve ark. 2012). Streptococcus türleri genellikle ağız boşluğunu kolonize eden ilk öncü mikroorganizmalardır ve zamanla Prevotella melaninogenica, Fusobacterium nucleatum, Veillonella, Neisseria ve pigmentsiz Prevotella türlerinin de dahil olduğu diğer mikrobiyal topluluklar dahil olmaktadır (Könönen ve ark. 1992). Dişlerin gelişimi ile birlikte Leptotrichia ve Campylobacter gibi cinslerin varlığında bir

artış gözlenirken, *Prevotella denticola* ve *Fusobacterium* ve *Selenomonas* cinslerinin üyeleri gibi ilave türlerin kolonizasyonu da gözlenmektedir (Könönen ve ark. 1994).

Aas ve ark. (2005) 16S rRNA yaklaşımı ile klinik olarak sağlıklı beş bireyin dil dorsumu, dilin yan tarafları, bukkal mukoza, sert ve yumuşak damak, damak, supragingival ve subgingival plak, maksiller ön vestibül ve bademcik bölgelerinin dahil olduğu ağız bölgelerinin analizi sonucu periodontitis ve çürük ile ilişkili türlerin saptanmadığını bildirmişlerdir (Aas ve ark. 2005). Zaura ve ark. (2009) da, yeni nesil sekanslama yöntemi kullanarak benzer şekilde birçok ağız içi bölgesinin analizini gerçekleştirmiş (Zaura ve ark. 2009) ve her iki çalışma da *Streptococcus*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas*, and *Fusobacterium* türleri ve filotiplerinin yaygın bulunduğunu bildirmiştir (Aas ve ark. 2005; Zaura ve ark 2009). Akraba olmayan sağlıklı bireylerde ağız boşluğunda bulunan çoğu taksonun benzer olduğu ve sağlıklı bir çekirdek mikrobiyom kavramını desteklediği sonucuna ulaşılmıştır (Aas ve ark. 2005; Zaura ve ark. 2009; Krishnan ve ark. 2017).

Birçok hastalıktan farklı olarak çürük ve periodontitis gibi oral bakteriyel hastalıklara tek bir tür sebep olmamaktadır, ağız boşluğunda muhtemelen çok daha az sayıda bulunan (genellikle tespit sınırının altında) zararsız olarak yaşayan bir konsorsiyumdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Özünde oral bakteriyel hastalıklar fırsatçı enfeksiyonlardır yani diyet, konak bağışıklık yanıtı, komplike sistemik ve genetik bozukluklar, pH, kötü ağız hijyeni ve yaşam tarzı gibi değişkenlerin sağladığı uygun koşullar oluştuğunda ortaya çıkmaktadır. Yeni moleküler tekniklerin kullanılmasıyla bakteriyel bağlantıların sağlık durumu ile olan ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır (Krishnan ve ark. 2017).

Ağız boşluğunu kolonize eden spesifik bakteriyel taksonların ağız sağlığı ve ağız hastalıkları veya diş çürüğü, periodontal hastalıklar, endodontik lezyonlar, kuru soket, ağız kokusu ve odontojenik enfeksiyonlar gibi rahatsızlıklarla ilişkili olduğu bilinmektedir (Socransky ve ark. 1998; Paster ve ark. 2001; 2006; Mager ve ark. 2003; Aas ve ark. 2005; 2008; Socransky ve Haffajee 2005; Dewhirst ve ark. 2010; Johansson ve ark. 2016). Bunun yanında oral bakterilerin pankreas kanseri (Farrell ve ark. 2012), tip II diyabet (Demmer ve ark. 2015), pediatrik Crohn hastalığı (Docktor ve ark. 2012), kalp hastalığı (Leishman ve ark. 2010), düşük doğum ağırlığı ve erken doğum (Shira

Davenport 2010) gibi bazı sistemik durum ve hastalıklar ile de ilişkili olabileceği veya bir biyobelirteç görevi görebileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, ağız mikrobiyomu ile sistemik bozukluklar arasında nedensel bir ilişki olup olmadığı henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Krishnan ve ark. 2017).

2.3.2.1. İnsan Ağız Mikrobiyomu Veritabanı

İnsan Ağız Mikrobiyomu Veritabanı'nın (Human Oral Microbiome Database HOMD) (www.homd.org) amacı insan ağız boşluğunda yaşayan baskın bakteri türleri hakkında bilimsel topluluğa kapsamlı bilgi sağlamaktır (Dewhirst ve ark. 2010). Bu organize 16S rRNA veritabanı, mevcut adlandırılmamış türler veya filotipler için geçici bir adlandırma şeması sağlamaktadır. Ayrıca İnsan Ağız Mikrobiyom Projesi kapsamında 687 oral taksonun dizi verileri fenotipik, filogenetik, klinik ve bibliyografik verilerle de ilişkilendirilmiştir. Çoğunlukla 16S rRNA çalışmalarından tespit edilen en baskın taksonlardan ve diğer anahtar taksonlardan oluşan 118 taksonun filogenetik ağacı oluşturulmuştur. Bu taksonlara örnek olarak Prevotella, Porphyromonas, Treponema, Tannerella, Fusobacterium ve Streptococcus türleri gibi çok iyi bilinen oral bakterilerin yanında daha az bilinen SR1, GN02 ve TM7, Fretibacterium, Solobacterium ve Abiotrophia filum üyelerinin filotipleri örnek verilebilir. Her bakteriyel filum ve aile üyelerinin filogenetik ağaçları HOMD web sitesinde mevcuttur. HOMD projesinde, HMP ve diğer sekanslama projelerinin bir parçası olarak bilinen oral türlerin %58'ini temsil eden yaklaşık 400 oral bakteriyel taksonun genom sekansları saptanmıştır (Krishnan ve ark. 2017). İnsan Ağız Mikrobiyom Projesi, sağlık ve hastalıkla ilgili türlerin karşılaştırılması, tedavinin ağız ekolojisi üzerine etkisinin izlenebilmesi, mikrobiyal kayma çalışmalarının yapılabilmesi ve ağız mikrobiyotasının sistemik sağlıkla ilişkisinin daha iyi anlaşılabilmesinde oldukça yararlı olmuştur (Külekcı 2013).

İnsan Ağız Mikrobiyom Projesi kapsamında belirlenen 619 taksonun filogenetik dağılımı Tablo 2-2'da gösterilmektedir (Dewhirst ve ark. 2010). Burda yer alan taksonların %65,6'sı kültür edilmiştir. Altı ana filum olan Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes, and Fusobacteria bu taksonların %96'sını oluşturmaktadır. Geri kalan filumlar olan Euryarchaeota, Chlamydia, Chloroflexi, SR1, Synergistetes, Tenericutes, and TM7 da taksonların kalan %4'ünü oluşturmaktadır (Dewhirst ve ark. 2010).

Tablo 2-2: İnsan Ağız Mikrobiyomu Veritabanı (sürüm 10)'na göre 619 taksonun filogenetik dağılımı (Dewhirst ve ark. 2010)

Filum	No.(%)of:			
	Takson ^a	Adlandırılmış türler ^b	Adlandırılmamış kültüre edilmiş takson ^c	Adlandırılmamış kültüre edilmemiş takson ^d
<i>Bakteri</i>				
<i>Firmicutes</i>	227 (36.7)	120 (52.9)	45 (19.8)	62 (27.3)
<i>Bacteroidetes</i>	107 (17.3)	39 (36.4)	27 (25.2)	41 (38.3)
<i>Proteobacteria</i>	106 (17.1)	70 (66.0)	9 (8.5)	27 (25.5)
<i>Actinobacteria</i>	72 (11.6)	37 (51.4)	25 (34.7)	10 (13.9)
<i>Spirochaetes</i>	49 (7.9)	11 (22.4)	3 (6.1)	35 (71.4)
<i>Fusobacteria</i>	32 (5.2)	12 (37.5)	4 (12.5)	16 (50.0)
<i>TM7</i>	12 (1.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (100.0)
<i>Synergistetes</i>	10 (1.6)	2 (20.0)	0 (0.0)	8 (80.0)
<i>Chlamydiae</i>	1 (0.2)	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>Chloroflexi</i>	1 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)
<i>SRI</i>	1 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)
<i>Arke</i>				
<i>Euryarchaeota</i>	1 (0.2)	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>Toplam</i>	619 (100)	293 (47.3)	113 (18.3)	213 (34.4)

^aTakson, kültür edilebilir üyeleri içeren veya içermeyen adlandırılmış tür ve filotiplere atıfta bulunmaktadır. Filotipler, üyeleri tam olarak %98.5 16S rRNA sekans benzerliğine sahip kümeler olarak tanımlanmaktadır. Bu tablodaki veriler İnsan Ağız Mikrobiyomu Veritabanı sürüm 10'a dayanmaktadır.

^bAdlandırılan türler, geçerli yayınlanmış isimlere sahiptir.

^c Adlandırılmamış kültür edilebilmiş taksonlar, en az bir mevcut izolatu olan filotiplerdir.

^dKültür edilememiş taksonlar, yalnızca klon dizilerinden bilinen filotiplerdir.

2.3.2.2. Ağız Mikrobiyomunu Tanımlama Araçları

Ağız mikrobiyomunun bileşimini analiz etmek için mikroskopi, kültür analizi, enzimatik analizler ve immünoanalizler de dahil olmak üzere çeşitli geleneksel yöntemler kullanılmaktadır (Krishnan ve ark. 2017; Zarco ve ark. 2012; Pedersen

2016). Ancak, birçok oral bakteri zor gelişim gösterirken ve yavaş büyürken, karmaşık büyüme ortamları, özel atmosferik koşullar ve uzun inkübasyon süreleri gerektirmektedir. Oral bakterilerin pek çoğu sıkı anaerob olup, örnek toplama, taşıma ve inkübasyonu sırasında oksijene maruz kalmaması açısından özen gerektirir (Kilian ve ark. 2016). Örneklerin kültür analizleri zor olup, az sayıda örneğin işlenmesine olanak sağlamaktadır. Seçici bakteriyolojik ortam, belirli ilgili türlerin incelenmesinde yararlı bulunurken ağız hastalıklarının mikrobiyal etiyojisinin anlaşılmasında hastalık özelliklerini bu koşullarda gelişen türlere atfedip diğer türleri saptamada başarısız olabilmekte ve önyargılı sonuçlar verebilmektedir (Kilian ve ark. 2016).

Kültürden bağımsız ileri yöntemlerin ortaya çıkması, birçoğu henüz kültürde yetiştirilemeyen mikroorganizmaların saptanmasına büyük ölçüde katkı sağlamıştır (Zarco ve ark. 2012). Kültürden bağımsız olarak mikrobiyom analizinde kullanılan en yaygın teknik 16S ribozomal RNA (16S rRNA) gen topluluğunun profillenmesine dayanmaktadır (Zarco ve ark. 2012). 16S rRNA geni tüm prokaryotlarda bulunmakta olup mikroorganizmalar arasında benzersiz olan ve bir tanımlama aracı olarak kullanılabilen değişken bölgeler içermektedir (Kilian ve ark. 2016). 16S rRNA genleri heterojen örneklerden ekstrakte edilerek, çoğaltılabilir ve dizilenebilir. Daha sonra elde edilen dizi verileri ağız boşluğunda bulunan mikroorganizmaların fenotipik, filogenetik, klinik ve bibliyografik dizi verilerini barındıran İnsan Oral Mikrobiyom Veritabanı (Human Oral Microbiome Database (HOMD 2016.) üzerinden karşılaştırılır. Dizide bir eşleşme bulunursa mikroorganizma tanımlanabilirken, veritabanı ile eşleşen bir veri yoksa dizi önceden bilinmeyen bir filotip için kayıt olarak eklenebilir (Kilian ve ark. 2016).

2.3.2.3. 16S rRNA Gen Analizi

16S rRNA, saf bakteri kültürlerinin tanımlanması, sınıflandırılması ve çevresel örneklerdeki bakteri çeşitliliğinin tahmin edilmesinde evrimsel bir saat olarak kullanılmaktadır (Woese 1987; Rajendhran ve Gunasekaran 2011). Yaklaşık olarak 1500 baz uzunluğunda bir gen olan 16S rRNA geni, yüksek oranda korunmuş olması, bütün bakterilerde çok sayıda kopyasının bulunması, farklı bakteriler arasında önemli ölçüde dizi çeşitliliği göstermesi ve 9 hiper değişken bölge içermesi (V1-V9) gibi özellikleri sayesinde mikroorganizmaların moleküler yöntemlerle tanımlanmasında hedef gen bölgesi olarak tercih edilmektedir (Clarridge 2004). 16S rRNA dizilerinin

karşılaştırılmalı analizleri, ağız boşluğu da dahil olmak üzere birçok ortamda mikrobiyomu tanımlamanın temel dayanağı olmuştur (Krishnan ve ark. 2017).

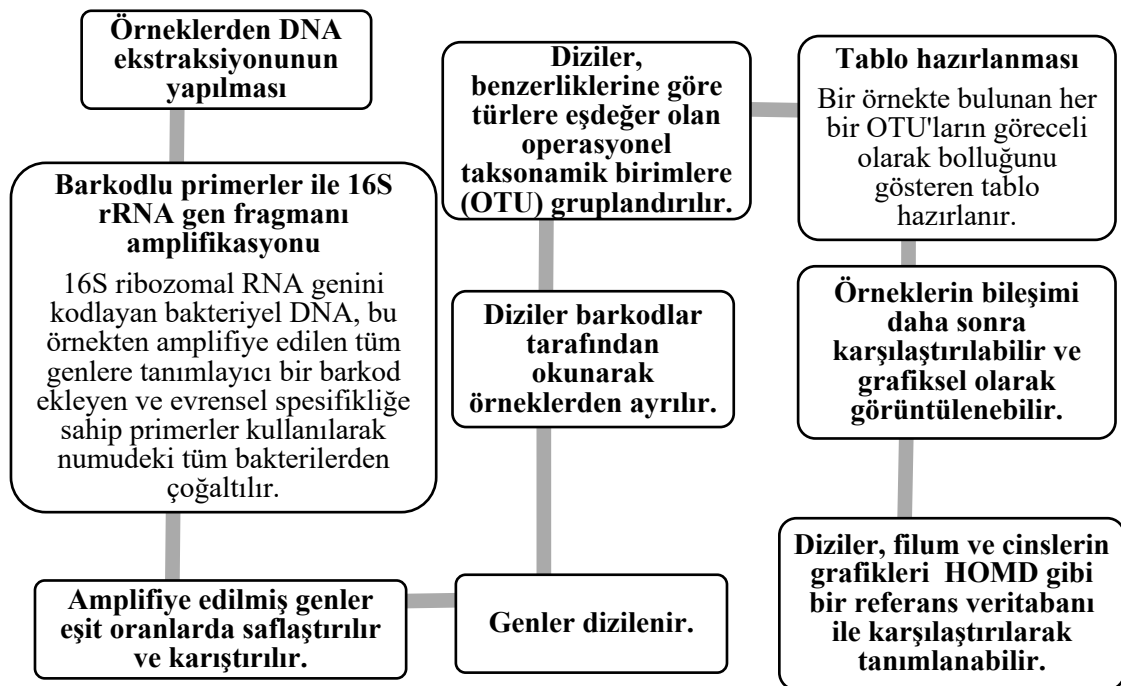
Nükleik asitlerin hibridizasyonuna dayalı olan moleküler tanımlama teknikleri arasında en çok uygulanan yöntem, yüksek duyarlılığı ile hedef nükleik asitlerin çoğaltılmasını sağlayan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniğidir. İlk olarak 1983 yılında Dr. Kary Mullis tarafından geliştirilmiş olan PCR tekniği, DNA üzerinde belirlenen hedef bölgenin o bölgeye özgü primerler ile çok sayıda kopyasının oluşturulduğu bir reaksiyona dayanmaktadır (Mullis ve ark. 1986). Üç ana basamaktan oluşan PCR yönteminde ilk olarak denatürasyon işlemi ile amplifiye edilecek çift iplikli DNA zinciri yüksek sıcaklığa (94 °C) maruz bırakılmakta ve tek iplikçikli hale dönüştürülmektedir. Sonrasındaki bağlanma basamağında, primerlerin ayrılmış DNA zincirleri üzerinde komplementer oldukları bölgelere eşleşerek burada DNA zinciri ile primer arasındaki hidrojen bağlarının oluşması sağlanmaktadır. Bu aşamada bağlanma sıcaklığı aynı zamanda erime noktası olup sıcaklık derecesi primer dizisinin baz içeriğine göre değişmektedir. Son basamak yani uzama basamağında ise sıcaklık 72 °C olup Taq polimeraz enziminin etkisi ile primerler uzamakta ve tamamlayıcı zincir sentezi gerçekleşmektedir (Lorenz 2012).

Yüksek oranda kontaminasyon riski bulunan PCR işleminde, bakteriyel DNA içermeyen reaktiflerin kullanımı ve ultraviyole ışığı bu riski önleyebilmektedir (Das ve ark. 2018). Gerçek Zamanlı PCR (Real Time PCR= qPCR) tekniği ise, PCR devam ederken ortaya çıkan ürünlerin eş zamanlı olarak değerlendirmeye alınabildiği bir yöntemdir ve çok kısa sürede kalitatif ve kantitatif sonuçlar verebilmektedir. Aynı cihaz içerisinde çoğaltma işlemleri ve çoğaltılan ürünleri saptama işlemlerinin eş zamanlı olarak yapılabilmesi, bu yöntemi çok daha hızlı ve pratik hale getirmekte ve tüpler açılmadan testlerin tamamlanabilmesi ile de kontaminasyon riskini azaltmaktadır. qPCR’da elde edilen ürünlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalar veya diziye özgün probalar kullanılmaktadır (Mullis ve ark. 1986; Fraga ve ark. 2008)

Saf bakteri kültürleri ile 16S rRNA genlerinin PCR ampliconları Sanger sekanslaması kullanılarak basitçe dizilenmiştir (Sanger ve ark. 1977). Bakteri taksonlarının filogenetik kimliği, ister kültür edilmiş olsun ister henüz kültür edilmemiş olsun dental plak gibi karmaşık bir populasyon sunan ortamlarda 16S rRNA analizleri

kullanılarak belirlenmiştir (Paster ve ark. 2006). Herhangi bir ortamdan izole edilen DNA, 16S rRNA genlerinin tanımlanabilmesi için evrensel olarak korunmakta olan PCR primerleri kullanılarak çoğaltılmaktadır. Ortaya çıkan amplikonlar *Escherichia coli*'ye klonlanarak, 16S rDNA ekleri tür kimliğinin belirlenebilmesi için sekanslanmaktadır (Hugenholtz ve Pace 1996; Paster ve ark. 2001). Tipik olarak %98,5 den fazla olan benzerlik bir tür/ filotip olarak tanımlanır. 16S rRNA dizileri daha önce tanımlanmış olan filotipler ile %98,5 den daha az bir benzerlik gösterdiği durumlarda yeni türlerin temsilcileri olarak kabul edilmektedirler (Dewhirst ve ark. 2010).

Son on yılda yeni nesil sekanslama yöntemleri ile büyük ölçekli sekanslama projelerinin birkaç gün veya bazen birkaç saat içerisinde tamamlandığı belirtilirken, bu özelliği sayesinde de mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında devrim yarattığı düşünülmektedir (Krishnan ve ark. 2017). Geleneksel 16S rRNA gen dizileme yönteminin maliyetli, zahmetli ve zaman alıcı olduğu belirtilmektedir. Bunun yanında, yeni nesil sekanslama (Next-Generation Sequencing-NGS) yöntemlerinin ortaya çıkmasıyla, tek bir çalışmada 27 milyona kadar sekans oluşturularak çok yüksek bir örnek verimi sağlanabildiği bildirilmektedir (Kilian ve ark. 2016). Yeni nesil sekanslamanın ayrıntılı açıklaması ve işlem basamakları Şekil 2-1'de gösterilmiştir.



Şekil 2-1: Yeni nesil sekanslama yönteminin ayrıntılı açıklaması ve işlem basamakları (Kilian ve ark. 2016)

Bakteri kimliklerinin tanımlanmasında ve miktarının belirlenmesinde kültürden bağımsız moleküler tekniklerin gelişmesi ve kullanımının artması sayesinde ağız mikrobiyotasının daha detaylı ve net tanımlanması sağlanabilmiştir. Kültür edilemediği için saptanamayan veya geleneksel kültür temelli yöntemlerle ayırt edilemeyen, fenotipik olarak benzer özellikler gösteren yakın ilişkili bakteri türlerinin belirlenmesinde ve ayırt edilmesinde 16S rRNA dizi bazlı analizler kullanılabilmektedir.

2.4. OSB ve Mikrobiyota ilişkisi

Otizm spektrum bozukluğu semptomları oldukça karmaşık bir sunum sergilemekte olup esas olarak karıştırıcı faktörlerin ve değişkenlerin bulunması sebebiyle tamamen konak genetiği ile ilişkilendirilmemektedir (Sahin ve Sur 2015). OSB etiolojisinin yaklaşık olarak %50'sinin genetik varyasyonlara (nükleotid polimorfizm ve kopya sayısı varyantları gibi) bağlı olduğu düşünülse de (Sandin ve ark. 2017), gastrointestinal mikrobiyomun etkisi altında gelişen gen-çevre etkileşimlerinin bağırsak- beyin eksenini aracılığıyla hareket edebileceği ve OSB riskini önemli ölçüde modüle edebileceği düşünülmektedir (Finegold ve ark. 2002). Bu nedenle birçok çalışmada, çevresel risk faktörlerinin ve ilişkili tıbbi komorbiditelerin hastalığın temel nörodavranışsal semptomlarına katkıda bulunma olasılığı vurgulanmaktadır (Vuong ve Hsiao 2017). Çevresel etkileşimlerin, potansiyel olarak da mikrobiyomun, hastalığın etiolojisini şekillendirmede rol oynayabileceği düşünülmektedir (McDonald ve ark. 2015; Kang ve ark. 2013).

Periferik, enterik ve nöro-immün sistemlerin OSB ile ilişkili anormalliklerini bildiren çalışmalara bakıldığında esas olarak immün disregülasyon ve gastrointestinal rahatsızlıklar ön plana çıkmaktadır (Vuong ve Hsiao 2017). OSB'li bireylerde nörotipik kontrollere oranla gastrointestinal bozuklukların daha fazla görüldüğünü ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (Adams ve ark. 2011; Williams ve ark. 2012; Wang ve ark. 2019; Marler ve ark. 2017). OSB popülasyonlarında görülen gastrointestinal bozukluklar arasında; ishal/kabızlık, karın ağrısı, reflü, kusma, gazlanma ve kötü kokulu dışkı sayılabilir (McElhanon ve ark. 2014; Horvath ve Perman 2002; Srikantha ve ark. 2019). Bu bulguların OSB şiddeti ile pozitif korelasyon gösterdiğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Chaidez ve ark. 2014; Adams ve ark. 2011). Ayrıca bağırsak

epitelinin bütünlüğünde eksiklik ve bağırsak geçirgenliğinin arttığını bildiren (Emanuele ve ark. 2010) çalışmalar olmakla birlikte, OSB’li çocuklarda bu tür semptomları düşük bakteri çeşitliliği ile ilişkilendiren çalışmalar da bulunmaktadır (Kang ve ark. 2013).

Hayvan çalışmalarında, bakteriyel metabolitlerin otizm benzeri davranışlara aracılık edebildiği (Hsiao ve ark. 2013) ve insanlarda fekal mikrobiyota transferinin, otizmin davranışsal ve gastrointestinal semptomlarında iyileşme sağladığı bildirilmiştir (Kang ve ark. 2017). Sonraki çalışmalarda, konak genetiği, davranış ve bağırsak mikrobiyomu arasındaki bağlantı kısmen açıklanmış; *Lactobacillus* ve bellek oluşumu arasında güçlü bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Snijders ve ark. 2016).

Mikrobiyota-bağırsak-beyin eksenini, santral sinir sistemi ve gastrointestinal yol arasındaki doğrudan nöral aktivasyonu, bağışıklık modülasyonu ve hormonal, peptiderjik ve epigenetik sinyal mekanizmalarının da dahil olduğu birkaç farklı yöntemle oluşan “mikrobiyal aracılı çapraz iletişim” kavramını temsil etmektedir (de Theije ve ark. 2014). Mikrobiyal değişikliklerin serotonin seviyeleri üzerindeki etkisini bildiren bir çalışma bu ilişkiye çarpıcı bir örnek sunmaktadır (O’Mahony ve ark. 2015). Serotonin taşıyıcı geni üzerindeki polimorfizimlerin OSB riskine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Yirmiya ve ark. 2001). Serotonin sentezinin büyük bir kısmı, bağırsak enterokromaffin hücrelerinde triptofanın triptofan hidroksilaz yoluyla serotonine dönüştürülmesi yoluyla meydana gelmektedir (Reigstad ve ark. 2015). Gastrointestinal mikrobiyomun, enterokromaffin hücrelerindeki kısa zincirli yağ asitlerine etki ederek serotonin sentezini arttırdığı bildirilmiştir (Yano ve ark. 2015). Serotonin sentezlendikten sonra bir kısmı bağırsak içinde hareketliliğin artırılması için hareket ederken, bir kısmı periferik dolaşıma geçerek özellikle erken beyin gelişimi sırasında santral sinir sistemini potansiyel olarak etkilemektedir. Tüm bunların sonucu olarak da bağırsak mikrobiyomunun bozulmasının serotonin sinyalini değiştirerek çocuğun genetik geçmişine uygun hareket edebileceği düşünülmektedir (Hicks ve ark. 2018).

Gen-çevre etkileşimi kavramından yola çıkarak OSB’li bireylerde bağırsak-beyin eksenindeki sinyal bozukluklarını araştıran çalışmalar bulunmaktadır (Frye ve ark. 2015). Buna örnek olarak regresif başlangıçlı otizmli ve GI komorbiditesi bulunan 13 çocuk üzerinde yapılan bir çalışmada, incelenen dışkı örneklerinde *Clostridium* ve spor oluşturmeyen anaerobların seviyelerinde tipik gelişim gösteren kontollere oranla

bir artış saptandığı bildirilmiştir (Finegold ve ark. 2002). Benzer iki çalışmada da, OSB'li bireylerin fekal mikrobiyomlarında *Clostridium* bolluğunda bozukluklar görüldüğü bildirilmiştir (Parracho ve ark. 2005; Song ve ark. 2004). OSB'li çocuklarda *Bacteroides/Firmicutes* oranında değişiklikler olduğunu belirten çalışmalar bulunsa da bu değişikliklerin yöneliminde çelişkiler olduğu da bildirilmiştir (Finegold ve ark. 2010; Tomova ve ark. 2015; Williams ve ark. 2011). Yine OSB'li bireylerde *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Sutterella*, *Desulfovibrio*, ve *Veillonellaceae* değişikliklerinin olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Adams ve ark. 2011; Vuong ve Hsiao 2017; Wang ve ark. 2013). Bu araştırmaların örnek boyutlarının göreceli küçük olması fikir birliği sağlanmasında güçlük yaratmaktadır; bu nedenle mikrobiyomun otistik davranış, GI patoloji ve bağışıklık fonksiyonu üzerindeki etkilerinin anlaşılmasında daha geniş ölçekli araştırmalara ihtiyaç vardır.

Gastrointestinal semptomların kısmen disbiyotik bağırsak mikrobiyotasına bağlı olarak gelişebileceği düşünülmektedir (Krajmalnik-Brown ve ark. 2015). Bu semptomların modüle edici metabolitler (örn., 4-etilfenilsülfat, indolpiruvat ve kortikosteron) üzerindeki eksik rollerinin bağırsak fonksiyonunu ve hatta OSB ve anksiyete gibi nörobiyolojik durumları etkileyebileceği düşünülmektedir (Hsiao ve ark. 2013; Bravo ve ark. 2011). OSB'li birçok çocuğun yaşamın ilk üç yılında oral antibiyotik tedavisi gördüğü bildirilmiş (Niehus ve Lord 2006) ve bunun sonucu olarak da bağırsak mikrobiyotasında dengesizliklerin oluşabileceği (Willing ve ark. 2011) ve OSB şiddetinin artmasında rol oynayabilecek rekabetçi potansiyel patojenlere fırsat yaratabileceği düşünülmektedir (Finegold ve ark. 2010; Williams ve ark. 2012; Kang ve ark. 2017). OSB'li çocukların bağırsak bakteri profilinin nörotipik kontrollerle karşılaştırıldığında değişiklik gösterdiğini bildiren çalışmalar olsa da (Finegold ve ark. 2010; Williams ve ark. 2012; Song ve ark. 2004; De Angelis ve ark. 2013; Wang ve ark. 2013; Tomova ve ark. 2015) bazı kohort çalışmalarında önemli bir farklılığın bulunmadığı bildirilmektedir (Gondalia ve ark. 2012; Son ve ark. 2015).

OSB'li çocuklarda *Prevotella copri* gibi fermantatif bakterilerin daha düşük oranda gözlenmesi ve genel olarak daha düşük bakteri çeşitliliğine sahip olmaları bu çocuklarda bağırsak mikrobiyotasındaki eksikliklerin nörolojik sağlığı etkileyebileceği hipotezini ortaya çıkarmıştır (Kang ve ark. 2013). Bu görüşle tutarlı olarak, OSB'li fareler üzerinde yapılan deneyler sadece *Bacteroides fragilis* augmentasyonunun

bağırsak mikrobiyotasının ve kan metabolitlerinin profilini değiştirebildiğini, artan bağırsak geçirgenliğini düzelttiği ve OSB ile ilişkili davranışları iyileştirebildiği gösterilmiştir (Hsiao ve ark. 2013). Otizm ve diğer nörolojik hastalıkların tedavisinde bağırsak mikrobiyotasının dengelenmesine yönelik yaklaşımlar giderek ön plana çıkmaktadır (Gilbert ve ark. 2013). Diyet düzenlenmesi, antibiyotikler, probiyotikler, prebiyotikler ve fekal mikrobiyota transferi bu konuda potansiyeli olan tedaviler olarak bildirilmektedir (Tillisch ve ark. 2013; Youngster ve ark. 2014; Pranter ve ark. 2012; Brandt ve ark. 2012; Moayyedi ve ark. 2014).

Disbiyozis yoluyla sosyal davranışların modüle edilebildiğini ve bağırsak mikroplarının restorasyonu ile otistik semptomların iyileştiğini gösteren çeşitli hayvan çalışmaları ile mikrobiyomun OSB'deki potansiyel rolüne yönelik kanıtlar giderek artmaktadır (Buffington ve ark. 2016; Kumar ve Sharma 2016). OSB'li bireylerde vankomisin ve sikloserin antibiyotik tedavisi (Urbano ve ark. 2014) ile bazı davranışsal semptomlarda geçici hafifleme gözlemlendiğini bildiren çalışmalar da bu bulgularla paralellik göstermektedir (Sandler ve ark. 2000). Kang ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada, OSB'li 18 çocukta fekal mikrobiyota transferi ile bakteri çeşitliliğinde iyileşmeler olduğunu göstermiş ayrıca ebeveynlerin GI ve OSB semptomlarında azalmaları bildirdiğini ileri sürmüştür (Kang ve ark. 2017).

2.4.1. Bağırsak-Beyin İletişimi Arasındaki Çift Yönlü Yollar

Mikrobiyotanın santral sinir sistemi üzerine etkisini inceleyen birçok çalışma bulunmaktadır (Diaz Heijtz ve ark. 2011; Clarke ve ark. 2013). Bu çalışmalara göre, bağırsak lümeninden türetilmiş nöroaktif bileşikler mukozaya nüfuz edebilmekte ve kan- beyin bariyerini geçerek bilişsel, psikiyatrik ve davranış bozukluklarına neden olabilmektedir (Wakefield 2002). Güncel çalışmalar bağırsak mikroplarının bağırsak-beyin iletişimi üzerindeki rolünün oldukça önemli olduğunu vurgulamaktadır (Wang ve Kasper 2014). Beyin bağırsak eksenindeki çift yönlü iletişim otonom sinir sistemini, enterik sinir sistemini, nöroendokrin sistemi ve bağışıklık sistemini içermektedir (Cryan ve Dinan 2012). Son çalışmalar, santral ve periferik sinir sistemi arasındaki bu iletişim ağı içinde mikropların özellikle de kommensal bakterilerin santral sinir sistemi üzerine 'aşağıdan-yukarıya' olan etkisini ön plana çıkarmaktadır (Foster ve Mcvey 2013). Bunun yanında, anksiyete veya stres gibi 'yukarıdan aşağıya' etkili olabilecek faktörler de bağırsak fonksiyonlarını ishal, bulantı ve rahatsızlık oluşturacak şekilde

bozabilmektedir (Farmer ve ark. 2014). Diyet alışkanlıklarındaki düzensiz değişikliklerin bağırsak mikrobiyotası üzerinde paralel şekilde dalgalanmalara neden olabileceği; ayrıca bağırsak-beyin eksenini üzerinde de etkili olabileceği, bunun sonucunda da kaygı ve depresyon gibi davranışların gözlenebileceği bildirilmektedir (Luna ve Foster 2015).

Gastrointestinal sistem ve beyin fonksiyonları arasındaki bağlantı ilk olarak 19. yüzyılın ortalarında tanımlanmıştır. 20. yüzyılın başlarında ise öncü araştırmacı Walter Cannon gastrointestinal motilite çalışmalarında, bağırsak fonksiyonları modülasyonunun beyin işleyişindeki süreçleri etkilediğine dikkat çekmiştir. Günümüzde ise yapılan çalışmalar doğrultusunda nöral, hormonal ve immünolojik yollarla çalışan bağırsak-beyin ekseninin çift yönlü ilişkisine olan ilgi giderek artmaktadır. Bu çift yönlü iletişim sistemindeki disfonksiyonların patofizyolojik sonuçlar doğurabileceği düşünülmektedir. Ek olarak, bağırsağın kendisi santral sinir sistemi ile bağlantısı kesildikten sonra bile bağımsız olarak çalışabilen yoğun bir sinir ağına sahiptir. Çift yönlü bu ağ sistemi içinde, beyinden gelen sinyaller gastrointestinal sistemin motor, duyuşsal ve salgı fonksiyonlarını etkileyebiliyorken, aynı şekilde bağırsağın da beyin fonksiyonlarını, özellikle de hipotalamus gibi stres düzenleme alanlarını etkileyebileceği düşünülmektedir (Cryan ve Dinan 2012; Reber 2012).

Beynin enterik sinir sistemini ve gastrointestinal fonksiyonları nasıl düzenlediğine ilişkin ayrıntılı araştırmalar sayesinde, beyin- bağırsak etkileşimindeki değişikliklerin bağırsak iltihabı, kronik karın ağrısı sendromları ve yeme bozuklukları ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca stres yanıtı ve davranışındaki değişikliklerin bağırsak-beyin eksenindeki fonksiyon değişikliklerinin bir sonucu olabileceği de tartışılan varsayımlar arasındadır (Rhee ve ark. 2009). Bağırsak- beyin eksenine yapılan müdahaleler obezite, duyudurum ve anksiyete bozuklukları gibi çeşitli rahatsızlıklarla irritabl bağırsak sendromu gibi gastrointestinal durumlar için yeni tedavi yöntemlerinin gelişmesinde umut vaatetmektedir (Cryan ve Dinan 2012).

Gastrointestinal yol, enterik sinir sistemi, otonom sinir sisteminin sempatik ve parasempatik dalları ve hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) eksenini aracılığıyla SSS tarafından modüle edilmektedir. Bu nedenle de bu yollar aracılığıyla yapılacak etkilerin ortamı değiştirerek dolaylı yoldan ve çok sayıda sinyal molekülü aracılığıyla da doğrudan enterik mikrobiyotayı etkileyebileceği düşünülmektedir (Rhee ve ark. 2009).

Bağırsak mikrobiyotası ile SSS arasındaki çift yönlü etkileşimin afferent kolunda, lenfositler bağırsak lümenini algılamada ve endokrin veya parakrin etkilerine sahip olabilen dahili sitokinleri serbest bırakmada rol oynayabilmektedir. Vagus siniri gibi duyuşal nöronal terminaller, enteroendokrin hücreleri tarafından salınan bağırsak peptitleri tarafından uyarılabilmektedir. Mikrobiyota metabolitleri olarak üretilmekte olan nörotransmitterler veya öncülleri, endokrin veya parakrin etkilerine sahip olarak bağırsak epteline ulaşabilir. Merkezi olarak beyin sapı bağlantılarından sonra (örn., Nükleus tractus solitarii) viseral girdilerin ana entegratörü olarak amigdala (Am) ve insüler kosteksi (IC) içeren bir nöronal ağ tanımlanmaktadır. HPA ekseninin aktivasyonu sonucu salınan efferent kol kortikosteroidleri, bağırsak mikrobiyota bileşimini modüle edebilmektedir. Nöronal efferent aktivasyon, “anti-inflamatuar kolinerjik refleks” ve/veya sempatik aktivasyonu içerebilmektedir ve bu iki süreç de bağırsak mikrobiyota bileşimini doğrudan etkileyebilecek nörotransmitterleri serbest bırakabilmektedir (Montiel-Castro ve ark. 2013)

Bağırsak bileşimindeki SSS kaynaklı değişiklikler nöroendokrin ve nöronal sinyalleme ile modüle edilmektedir. Katekolaminler, GABA, dinorfin, serotonin ve sitokinlerin de dahil olduğu sinyal molekülleri, nöronlar, enterokromaffin ve bağışıklık sistemi ile ilişkili hücreler tarafından bağırsak lümeninden salınabilmektedir (Lyte ve Freestone 2010; Lyte 2013; Yang ve ark. 1992; Santos ve ark. 1998). Katekolaminler, doğrudan konak-mikrop sinyalleşmesini mümkün kılan sinyal molekülleri olup, norepinefrin gibi çeşitli stres faktörleri plazma ve lokal katekolamin düzeyini artırabilmekte ve bağırsak lümenindeki seviyesini yükseltebilmektedir (Hughes ve Sperandio 2008). Bazı patojen mikroorganizmaların in vitro ortamda eksternal katekolaminlere yanıt olarak yumurtlama aktivitelerinde değişiklik meydana gelebileceği bildirilmiştir (Lyte 2004).

Güncel çalışmalar viseral ağrı (McKernan ve ark. 2010; Wang ve ark. 2010; Clarke ve ark. 2012), otizm spektrum bozuklukları (Adams ve ark. 2011; de Theije ve ark. 2011; Thomas ve ark. 2012), obezite (Turnbaugh ve Gordon 2009; Davey ve ark. 2012; Manco ve ark. 2012), kardiyovasküler hastalıklar (Tang ve ark. 2013), anksiyete/depresyon (Bravo ve ark. 2011; Diaz Heijtz ve ark. 2011; Foster ve McVey 2013) ve multiple skleroz'u (Berer ve ark. 2011; Lee ve ark. 2011) içeren çeşitli durum

ve rahatsızlıkların mikrobiyota-beyin-bağırsak eksenindeki etkileşimden etkilenebileceğini göstermektedir.

Mikrobiyotanın beyin sistemlerinin gelişiminde, stres reaktivitesi ve stresle ilişkili davranışlardaki rolü bazı nörobilim araştırmalarında gösterilmektedir. Bağırsak beyin eksenini, bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklerden etkilenmekte ve sonrasında depresyon ve anksiyete gibi davranışları tetikleyebilmektedir (Luna ve Foster 2015). Mikrobiyota yoluyla bağırsak-beyin eksenini etkileyen faktörler; diyet, probiyotikler, antibiyotikler ve stres olarak sıralanmaktadır (Foster ve McVey 2013).

OSB'li ve nörotipik popülasyonlar arasında mikrobiyom kompozisyonunun farklı olduğunu kabul eden birçok çalışma bulursa da bu çalışmalar gastrointestinal bakteriyel toplulukların farklılıklarına yönelik tutarsız sonuçlar ortaya koymuştur (Ding ve ark. 2017; Kang ve ark. 2014). Bağırsak ile karşılaştırıldığında ağız mikrobiyotası, dental plak ve tükürük örnekleri dışkı örneklerine oranla daha kolay elde edilmelerine karşın üzerinde pek fazla çalışılmamıştır. Ağız mikrobiyotasındaki değişikliklerin sadece periodontal hastalıklarla değil (Sudhakara ve ark. 2018), üst GI yol florası (Tsuda ve ark. 2015), romatoid artrit gibi sistemik hastalıklar (Zhang ve ark. 2015) ve Alzheimer gibi nörolojik durumlarla (Shoemark ve Allen 2015) da ilişkili olabileceği gösterilmiştir.

Hayvan ve insan çalışmaları, ağızdaki bakterilerin bağırsağa taşınabileceğini, bağırsağın mikrobiyal bileşimini değiştirebileceğini ve hatta konakçının immün cevabını bile etkileyebileceğini öne sürmüştür (Olsen ve ark. 2019; Kato ve ark. 2018; Atarashi ve ark. 2017). İnsan Mikrobiyom Projesi'nde, deneklerin neredeyse yarısında (%45) ağız bakterileri ve insan dışkı bakterilerinin örtüşme gösterdiği bildirilmiştir (Segata ve ark. 2012). Ayrıca inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi sistemik hastalıklarda da ağızdaki bakterilerin ektopik transferi bildirilmiştir (Gevers ve ark. 2014).

Ağızda bulunan bakterilerin beyne ulaşması ve nöroimmün aktiviteyi ve enflamasyonu doğrudan etkileyebilmesi için olası birkaç yol tanımlanmıştır; kan damarları aracılığıyla, kan-beyin bariyeri, koku alma yolu, beyin perivasküler alanı, beyindeki ventriküler alanlar (Olsen ve Singhrao 2015). Rutin diş tedavi uygulamaları sırasında bile bakteriyemi gelişebilir ve bu bakterilerin bir kısmı kan beyin bariyerini aşabilir (Olsen 2008). OSB'li bireylerin mikrogialarında değişmiş transkript

ekspresyonu tanımlanmıştır ve bozulmuş mikrogliya işlevinin kan beyin bariyerinin bütünlüğünü etkileyebileceği belirtilmiştir (Fiorentino ve ark. 2016). Yapılan çalışmalarda, OSB'li çocuklarda kan beyin bariyerinin artmış geçirgenliği bildirilirken (Kealy ve ark. 2020), böylelikle beynin bakteriyel metabolitlere maruz kalmasıyla inflamatuvar yanıtın gelişebileceği ve santral sinir sistemi içindeki metabolik aktivitenin değişebileceği de vurgulanmıştır (Srikantha ve ark. 2019).

Farelerin periodontal patojenlere kronik maruz kalması sonucu, kortikal enflamasyonun belirleyici bir faktör olduğu Alzheimer hastalığı ile uyumlu nöropatolojik değişikliklerin geliştiği belirtilmiştir (Ilievski ve ark. 2018). Ağızdaki bakterilerin beyine ulaşarak anti-oksidatif kapasiteyi azaltabileceği ve OSB'li bireylerde mitokondrinin enerji üretim potansiyelinde azalmaya sebep olabileceği bildirilmiştir (Castora 2019). Gram negatif, varsayılan periodontal patojenler, proinflamatuvar aktiviteye sahip lipopolisakkarid (LPS) açısından zengin olup, OSB'li bireylerde kan beyin bariyerinden geçerek LPS sızıntısı ile SSS'de iltihaplanmaya yol açabileceği düşünülmektedir. Hatta, OSB'li bireylerde artan LPS seviyelerinin, proinflamatuvar bir sitokin olan IL-6'nın yüksek seviyeleri ile ilişkili olduğu da bildirilen sonuçlar arasındadır (Beurel ve Jope 2009).

OSB'li bireylerin ağız mikrobiyotasındaki bozulmaların, OSB patogenezi için varsayılan bir mekanizma olan metabolom üzerinde değişikliklere yol açabileceği bildirilmiştir (Mussap ve ark. 2016; Wang ve ark. 2016; Cezar ve Smith 2017). Asetat ve propiyonatta artışların yanı sıra butiratta (bakteri kökenli kısa zincirli yağ asitleri) azalmanın gözlenmesinin OSB gelişiminde rol oynayabileceğine yönelik belirtiler saptanmıştır (Srikantha ve ark. 2019). Ayrıca OSB'li çocuklarda 3- (3 hidroksifenil) -3- hidroksipropiyonik asit, 3-hidroksifenilasetik asit ve 3 hidroksipurik asit seviyelerinde artış gözlemlendiği ve bununla birlikte fenilalanin metabolizmasında potansiyel karışıklıklar olabileceği bildirilmiştir (Li ve Zhou 2016). Bu metabolitler Clostridium türlerinin bolluğu ile ilişkilendirilmiş ve çocuklarda kısıtlı ve tekrarlayıcı davranışlarla bağlantılı olabileceği bildirilirken, OSB'de bağırsak Clostridium'unun yüksek miktarda bolluk göstermesinin patojenik bir rol üstlenebileceği varsayılmaktadır (Zeidán-Chuliá ve Fonseca Moreira 2013).

OSB'li çocuklardaki metabolik değişikliklerin ağız mikrobiyotası bileşiminden kaynaklanıp kaynaklanmadığı henüz belirlenmemiştir. Ancak, 180'i OSB'li olan 346

çocukta ağız mikrobiyom transkripsiyonunu araştıran bir çalışmada, OSB patogenezinde yer alan nörotransmitter glutamatın bir öncüsü olan lizin degradasyonunu içeren yollarda OSB'ye özgü değişikliklerin tanımlandığı bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada, tükürük örnekleri incelendiğinde, insan mikroRNA ekspresyonunda mikrobiyal aktivite ile ilişkili OSB'ye özgü değişiklikleri tanımlarken, bu değişiklikleri hücre büyümesi ve metabolizma yollarıyla da ilişkilendirmiştir (Hicks ve ark. 2018).

OSB'li bireylerin nörotipik bireylere oranla daha fazla ağız-diş problemleri yaşadığını gösteren epidemiyolojik çalışmalar bulunmaktadır (Lai ve ark. 2012). Bunun yanında, ağız hijyen uygulamalarına karşı gösterilen direnç, kısıtlı diyet alışkanlıkları, duyuşal tanımlama aracı olarak nesneleri ağıza götürmek gibi OSB fenotipli davranışların da ağızda mikrobiyal disbiyozu neden olabileceği düşünülmektedir (Olsen ve Hicks 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Haziran 2018-Ekim 2020 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı Ağız Mikrobiyolojisi Laboratuvarı ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Çalışma için T.C. İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 28.06.2018 tarihli, 72 sayılı toplantının 63 sayılı kararı ile etik kurul onayı alınmıştır.

İstanbul Üniversitesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran 3-6 yaş arası, erkek ve OSB tanısı bulunan 9 çocuk ile çalışma grubunun, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'na başvuran 3-6 yaş arası, erkek ve sistemik hastalığı bulunmayan 9 çocuk ile de kontrol grubunun oluşturulması planlanmıştır. Çocukların ebeveynlerine çalışma öncesi çalışmanın yöntemi ve olası potansiyel riskler hakkında bilgi veren 'Gönüllü Olur Formu' imzalatılarak çalışmaya katılıp katılmamaları kendi iradelerine bırakılmış ve istedikleri zaman çalışmadan ayrılacakları belirtilmiştir.

3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kitler

ZymoBIOMICS® DNA Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA), 18 adet

Native Barcoding Kit

FLOMIN 106

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Örneklem Seçimi

Çalışmamızda OSB tanısı bulunan 9 erkek çocuk çalışma grubunu, aynı yaş grubundaki 9 sağlıklı erkek çocuk ise kontrol grubunu oluşturmuştur. Çalışma grubu, DSM-5 kriterlerine göre OSB tanısı konulmuş erkek çocuklardan oluşturulmuştur (Lee ve ark. 2015).

Örnekleme seçiminde katılımcıların olabildiğince benzer özelliklere sahip olabilmeleri açısından karıştırıcı faktörlerin dışlanmasına çalışılmış, çalışma kapsamına dahil edilme ve edilmeme kriterleri belirlenmiştir. Katılımcıların çalışmaya dahil edilebilmelerinde aşağıdaki kriterler belirlenmiştir.

Çalışma grubu için:

- OSB tanısı (DSM-5(+)) konması
- Erkek
- 36-60 ay arasında bulunma
- Sezaryen ile doğmuş olması
- Süt diş dizisine sahip olması
- Tüm aşıları yapılmış olması
- Kronik sistemik hastalık tanısı bulunmaması
- Başka nörolojik hastalık tanısı bulunmaması
- Genetik hastalık tanısı bulunmaması
- GI rahatsızlığı olmaması
- Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu (DEHB) tanısı bulunmaması
- Son 3 ay içerisinde herhangi bir nedenle antibiyotik/antifungal kullanmamış olmak
- Ailenin onayının alınmış olması

Kontrol Grubu için:

- Sağlıklı-Normal gelişim gösteren
- Erkek
- 36-60 ay arasında bulunma
- Sezaryen ile doğmuş olması
- Süt diş dizisine sahip olması
- Tüm aşıları yapılmış olması
- Kronik sistemik hastalık tanısı bulunmaması
- Başka nörolojik hastalık tanısı bulunmaması
- Genetik hastalık tanısı bulunmaması
- GI rahatsızlığı olmaması
- Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu (DEHB) tanısı bulunmaması
- Ailesinde OSB tanısı konulmuş birinci dereceden akrabası olmamalı
- Son 3 ay içerisinde herhangi bir nedenle antibiyotik/antifungal kullanmamış olmak
- Ailenin onayının alınmış olması

3.2.2. İndeks Ölçümleri

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı Bilim Dalı'na başvuran OSB tanısı bulunan 3-6 yaş arası süt diş dizisine sahip 9 çocuk ebeveynleri eşliğinde, rahat bir sandalyeye oturtularak, doğal ışık altında, ayna ve sond

kullanılarak muayene edilmiştir. İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'na başvuran sistemik rahatsızlığı bulunmayan 3-6 yaş arası süt diş dizisine sahip 9 çocuk ise İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Kliniği'nde diş hekimi koltuğunda, refrektör ışığı altında, ayna ve sond kullanılarak muayene edilmiştir. Çalışma kapsamına alınan hastaların indeks ölçümleri bu alanda yeterli kalibrasyona sahip olan tek bir hekim (GU) tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. Çürük İndeksi

Süt dişleri için çürük, çürük nedeniyle çekilmiş ve dolgulu diş verileri Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO,1997) belirlediği çürük indeks kriterlerine uygun olarak değerlendirilmiş ve hesaplanmıştır. Diş minesini ve dentini kapsayan tüm başlangıç lezyonları ve çürük lezyonları indeks verilerine ve hesaplamalarına dahil edilerek, çocukların isim-soyisim, yaş, cinsiyet, iletişim bilgileri ve indeks verileri bu çizelgeleri içeren formlara kaydedilmiştir.

Süt dişleri için çürük, çürük nedeniyle çekilmiş ve dolgulu diş sayısı dmft olarak kodlanmış, her çocuk için dmft ölçümü; çürük,çürük nedeniyle çekilmiş ve dolgulu süt dişleri belirlenerek hasta çizelgesine kaydedilmiştir. İlgili dişlerin sayıları toplanarak bireye ait sayı indeks veri değerleri elde edilmiştir.

3.2.2.2. Plak İndeksi

OSB tanımlı ve kontrol grubu çocukların ağız hijyeni ve plak birikimi Green ve Vermillion Basitleştirilmiş Ağız Hijyen İndeksi (Green ve Vermillion 1964) (G&V OHI-S Plak İndeksi) kullanılarak değerlendirilmiştir. 55 ve 65 numaralı dişlerin bukkal yüzeyleri, 51 ve 71 numaralı dişlerin labial yüzeyleri, 75 ve 85 numaralı dişlerin lingual yüzeyleri gözle ve normal diş hekimliği sondası ile değerlendirilmiştir. Dişler plak indeksi kriterlerine göre incelenmiş (Tablo 3-1) ve elde edilen skorların toplamının diş sayısına bölünmesi ile plak indeks değerleri elde edilmiştir.

Tablo 3-1: Plak indeksi değerlendirme kriterleri

0	Plak veya boya yok
1	Diş yüzeyinin üçte birinden fazla olmayan plak veya boyanmış alan varlığı
2	Diş yüzeyinin üçte birinden fazla, üçte ikisinden az plak varlığı

3.2.2.3. Modifiye Dişeti İndeksi

OSB tanılı ve kontrol grubu çocuklarda diş eti sağlığı ve enflamasyon varlığını değerlendirmek amacıyla non-invaziv bir yöntem olan Modifiye Dişeti İndeksi (Lobene ve ark. 1986) kullanılmıştır. Bakteriyemi gelişme riskini ortadan kaldırmak amacıyla sondalama işleminin kullanılmadığı bu yöntemde, her diş için iki papilla ve iki dişeti kenarı değerlendirilerek elde edilen değerler toplanıp ortalaması alınmıştır. Skorların toplanıp değerlendirilen diş sayısına bölünmesiyle de her hastaya ait Modifiye Dişeti İndeksi değeri elde edilmiştir (Tablo 3-2).

Tablo 3-2: Modifiye dişeti indeksi değerlendirme kriterleri

0	Sağlıklı dişeti, inflamasyon yok
1	Dişetinde bir bölümde hafif enflamasyon, hafif renk değişimi ve hafif ödem var.
2	Dişetinde her bölgede hafif derecede enflamasyon var.
3	Dişetinde orta derecede enflamasyon var, dişeti kırmızı ve ödemli.
4	Dişetinde ileri derecede enflamasyon var, dişetinde belirgin kırmızılık ve ödem var, spontan kanama izlenir.

3.2.3. Çocukluk Otizmi Değerlendirme Ölçeği (ÇODÖ)

Yaygın gelişimsel bozuklukların değerlendirilmesinde tanı, ayrıntılı gelişim öyküsünün elde edilmesi, davranışların doğrudan gözlenmesi ve otizm için geliştirilmiş olan özgül psikometrik ölçümlerin uygulanması ile konulmaktadır. Otizm tanısı iki ana bilgi kaynağından elde edilen bulgulara dayanmaktadır. Bunlardan ilki, bakım veren bakıcı ya da ebeveynlerden alınan, var olan davranışlara ilişkin bilgi ve gelişim öyküsüdür. İkincisi ise, davranışların doğrudan gözlenmesidir (Saemundsen ve ark. 2003).

1971 yılında Schopler ve Reichler tarafından (Schopler ve ark. 1980) geliştirilmiş olan Çocukluk Otizmi Değerlendirme Ölçeği (ÇODÖ), otizm tanısında ve otizmlili çocukların diğer gelişimsel bozukluğu olan çocuklardan ayırt edilmesinde kullanılmaktadır (Schopler ve ark. 2007). Sucuoğlu ve arkadaşları (1996) tarafından Çocukluk Otizmi Derecelendirme Ölçeği'nin çeviri ve yineleme çalışmaları yapılarak ölçeğin Türkçe formu oluşturulmuş ayrıca iç tutarlılık ve madde analizi yöntemleri ile

de bu ölçeğin geçerlilik ve güvenilirliği değerlendirilmiştir (Sucuoğlu ve ark. 1996; İncekaş 2009).

ÇODÖ, temel olarak zihinsel yetersizliği olup otistik olmayan çocuklar ile otistik belirtiler gösteren çocukları birbirinden ayırmayı amaçlayan geliştirilmiş bir davranışsal değerlendirme ölçeğidir. 15 maddeden oluşan bu ölçek, aile ile görüşme ve çocuğun davranışlarının gözlemlenmesi sonucu elde edilen bilgiler temel alınarak doldurulmaktadır. Değerlendiricinin gözlem yapmadan önce bu maddelerin tanımını ve puanlamasını iyi bilmesi gereklidir (İncekaş 2009).

ÇODÖ, öznel klinik yargılardan çok davranışların doğrudan gözlenmesi sonucunda elde edilen nesnel ve ölçülebilir bir değerlendirme sunmaktadır. Ayrıca, okul öncesi dönemden başlayarak tüm yaş grubundaki çocuklara uygulanabilmektedir (Teal ve Wiebe 1986). Ölçeğin doldurulmasıyla çocuğun otizm derecesi belirlenebilmekte olup otizmin şiddetinin hafif-orta ve orta-ağır olarak belirlenmesine olanak sağlanmaktadır (Schopler ve ark. 2007; Hergüner ve Özbaran 2010).

Ölçekte bulunan maddelerin başlıkları şu şekildedir; insanlar ile ilişki, taklit, duygusal tepki, vücut kullanımı, nesne kullanımı, değişikliklere uyum sağlama (tepki?), görsel tepki, dinleme tepkisi, tat, koku ve dokuma tepkileri ve kullanımı, korku veya ürkeklik, sözel iletişim, sözel olmayan iletişim, etkinlik düzeyi, entelektüel yanıtın düzeyi ve uygunluğu ve genel izlenimler. Bu maddelerin her biri 1 ile 4 arasında yarım derecelik puanlama ile derecelendirilmektedir. 1 puan, o maddede ifade edilen davranışların çocuğun yaş grubuna göre normal sınırlarda olduğunu, 4 puan ise yaş gruplarına göre çok fazla anormallik gösterdiğini belirtmektedir. Genel izlenimler başlığındaki on beşinci madde diğer maddelerde değerlendirilen çocuğa yönelik klinisyenin genel bir değerlendirmesini içermektedir. Toplamda 15-29 arası puanlar ‘otizm yok’ olarak değerlendirilirken, 30-36 arası puanlar ‘hafif-orta derecede otizm’, 37 ve üzeri puanlar ‘aşırı(ağır) derecede otizm’ olarak değerlendirilmektedir.

3.2.4. Tükürük Örneklerinin Elde Edilmesi

Dahil olma kriterlerini sağlayıp çalışmaya katılan hastalar, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı Bilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı kliniklerine tükürük örneklerinin alınması için çağırılmıştır.

Katılımcılara tükürük örnekleri alınmadan en az 2 saat önce yeme içme yapmamaları ve oral hijyen uygulamalarından kaçınmaları öğütlenmiştir. Çalışma kapsamında alınan DNA/RNA Shield Collection Tube w/ Swab (Zymoresearch) yüksek oranda emici kit ile sabah saat 10:00'da çocukların dil altından 5-10 saniye kadar bekletilmesiyle tükürük elde edilmiş ve hemen tüpün içine konularak kapağı kapatılmıştır. Tükürük örnekleri alındıktan sonra 5 dakika içerisinde İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Mikrobiyolojisi Bilim Dalı Laboratuvarı'na götürülmüş; -80°C'de DNA ekstraksiyonuna kadar saklanmıştır.

3.2.5. Tükürük Örneklerinin Oral Mikrobiyom Açısından İncelenmesi

Tükürük örneklerinin PCR analizleri ve 16S rRNA gen sekanslama analizleri hizmet alımı yapılan Ardi Medikal Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tükürük örneklerinde 16S rRNA geninin bakteriyel V3-V4 bölgesi amplifiye edilerek Oxford Nanopore Minion platformunda sekanslama işlemi yapılmış, ardından QIIME yazılımı kullanılarak veri analizleri gerçekleştirilmiştir.

ZymoBIOMICS® Hizmet Raporu kapsamında iş akış listesi;

- Örneklerin alınması
- DNA izolasyonu ve örnek kalitesinin değerlendirilmesi
- Örneklerin sekanslaması için kütüphane hazırlanması
- Sekanslama
- Sekans kalite kontrolü
- Biyoinformatik işlemler
- Mutlak bolluk belirlenmesi
- Veriler/ Sonuçlar şeklinde gerçekleşmiştir.

Oxford Nanopore Minion kullanılarak 27S1493 16S primerleriyle sekanslama yapılmış ve Rrna operonlarının 27. Nükleotid 1493 arası çalışılmıştır. Bu kısım 16S bölgesine denk gelmektedir. Sekanslamada ise Native Barcoding Kit ve FLOMIN106 kullanılmıştır.

Çalışmada analiz işlemi QIIME2 versiyon 2019.10 kullanılarak yapılmıştır. Demultiplex, Oxford Nanopore'dan alınan fastq dataları ile single-end demux

kullanılarak yapılmış, sekansın biyolojik olmayan kısımları (primer gibi) okuma işlemlerinden çıkarılmıştır.

Kalite kontrol analizi için Deblur kullanılmış, kalite skorları eklenerek kalite filtrelemesi yapılmıştır. Bu filtreleme için QIIME'in quality-filter q-score özelliği kullanılırken, analizin denoising kısmı için Qiime deblur denoising-16S methodu kullanılmıştır.

Geriye kalan okumalar OTU tablosuna dönüştürülmüş, Vsearch ve uclust analizi kullanılarak oluşturulan OTU tablosundan kapalı referans olarak Silva-132-99-nb databazı kullanılarak taksonomik analiz yapılmış ve FastTree tool kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. İstatistik yazılım R programında, Phloseq Library program paketi kullanılarak değerlendirilmiş, alfa ve beta çeşitliliklerine ilişkin gplot grafikleri hazırlanmıştır.

Alfa ve Beta Çeşitlilik Analizi:

Alfa ve Beta çeşitlilik metriklerinin hesaplanması için Qiime2'nin çeşitlilik analizleri kullanılmıştır (q2 diversity).

Alfa çeşitliliği,

- Shannon'ın çeşitlilik endeksi (topluluk zenginliğinin nicel bir ölçüsü)
- Chao
- Gözlemlenen OTU'lar (topluluk zenginliğinin nitel bir ölçüsü)
- Faith's Filogenetik Çeşitliliği (özellikler arasında filogenetik ilişkileri içeren zenginliği ölçüsü)
- Eşitlik (veya Pielou'nun Eşitliği; topluluk eşitliğinin bir ölçüsü)

Beta çeşitliliği,

- Jaccard mesafesi (topluluk farklılığının nitel bir ölçüsü)
- Bray-Curtis mesafesi (topluluk farklılığının nicel bir ölçüsü)
- Ağırlıksız UniFrac mesafesi (özellikler arasında filogenetik ilişkileri içeren niteliksel bir topluluk farklılığının ölçüsü)
- Ağırlıklı UniFrac mesafesi (özellikler arasında filogenetik ilişkileri içeren topluluk farklılığının nicel bir ölçüsü) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistikse analizler için IBM SPSS V23 programı kullanıldı. Çalışmada elde edilen veriler değerlendirilirken, OSB'li ve kontrol grubuna göre nicel verilerin karşılaştırılmasında bağımsız örnekler t testi kullanıldı. Kategorik olan demografik verilerin incelenmesinde ise Ki-kare testi kullanıldı. OTU oranlarının gruplara göre farklılık gösterip göstermediği oran testi (Fisher's Exact test) ile incelendi. Otular ile DMFT indeksi, Plak indeksi, Gingival indeks, BMI ve ÇODÖ arasındaki ilişki Spearman rho korelasyonu ile değerlendirildi. Anlamlılık en az $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı Ağız Mikrobiyoloji Bilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Haziran 2018-Ekim 2020 tarihleri arasında gerçekleştirilen bu tez çalışmasında aşağıda belirtilen bulgular elde edilmiştir:

4.1. OSB'li ve Kontrol Grubundaki Çocukların Sosyodemografik Özellikleri Açısından Değerlendirilmesi

Bu çalışma, OSB tanısı bulunan 9 erkek çocuk ve kontrol grubunu oluşturan, sistemik rahatsızlığı bulunmayan 9 erkek çocuk olmak üzere toplam 18 çocuk ile gerçekleştirilmiştir. OSB'li ve kontrol grupları; yaş, cinsiyet, doğum şekli, sosyoekonomik düzey açısından benzer özelliklere sahiptir. Her iki grupta bulunan çocukların yaşları 36-60 ay arasında değişmekte olup, ortalama yaş değeri $47,78 \pm 8,54$ aydır ($p>0,05$) (Tablo 4-1).

OSB'li ve kontrol grubundaki çocuklar gruplara göre değerlendirildiğinde, OSB'li grupta yaş ortalaması $44 \pm 6,34$ ay; kontrol grubunda $51,56 \pm 9,08$ ay olarak belirlendi. OSB'li ve kontrol gruplarının yaş dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-1).

Gruplar arasında boy, kilo, vücut kitle indeksi, doğum kilosu, anne yaşı, baba yaşı, anne sütü ile beslenme süresi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$) (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: OSB'li grup ve kontrol grubunun sosyodemografik ve klinik özellikleri

		Toplam	OSB'li grup	Kontrol grubu	P
	n (erkek)	18	9	9	
Yaş (ay)	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	36-60 (47)	36 – 54 (44)	38-60 (56)	0,058
	<i>Ort±Ss</i>	$47,78 \pm 8,54$	$44 \pm 6,34$	$51,56 \pm 9,08$	
Boy (cm)	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	94 – 118 (101,5)	94-111 (100)	95 - 118 (110)	0,166

		<i>Ort±Ss</i>	103,94 ± 7,48	101,44 ± 5,32	106,44 ± 8,75	
Kilo (kg)	<i>Min-Mak (Medyan)</i>		14 - 23 (18,5)	14 - 21 (18)	15 - 23 (19)	0,390
	<i>Ort±Ss</i>		18,22 ± 2,65	17,67 ± 2,61	18,78 ± 2,73	
Vücut kitle indeksi	<i>Min-Mak (Medyan)</i>		12,9 - 24,6 (16,2)	14,5 - 24,6 (16,2)	12,9 - 22 (16,2)	0,642
	<i>Ort±Ss</i>		17,07 ± 3,05	17,42 ± 3,27	16,72 ± 2,97	
Doğum kilosu (gr)	<i>Min-Mak (Medyan)</i>		2400 - 4010 (3125)	2400-3250 (3060)	2500-4010 (3150)	0,334
	<i>Ort±Ss</i>		3097,78 ± 407,09	3002,22 ± 285,52	3193,33 ± 500,1	
Anne yaşı	<i>Min-Mak (Medyan)</i>		22 -41 (34)	25 - 41 (34)	22 - 39 (34)	0,700
	<i>Ort±Ss</i>		33,61 ± 5,27	34,11 ± 4,81	33,11 ± 5,95	
Baba yaşı	<i>Min-Mak (Medyan)</i>		26-48 (36)	30-48 (39)	26-41 (34)	0,261
	<i>Ort±Ss</i>		36,06 ± 5,93	37,67 ± 6,32	34,44 ± 5,36	
Anne sütü ile beslenme süresi (ay)	<i>Min-Mak (Medyan)</i>		1-24 (18)	1-24 (6)	1-24 (23)	0,277
	<i>Ort±Ss</i>		14,47 ± 9,81	11,89 ± 10,34	17,06 ± 9,08	

*Bağımsız örnekler t testi

OSB'li ve kontrol gruplarının anne ve baba eğitim düzeyleri Tablo 4-2'de gösterilmiştir. Anne ve baba eğitim düzeylerine göre gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

OSB'li ve kontrol gruplarındaki çocukların dişlerinin fırçalama sıklıkları Tablo 4-2'de gösterilmiştir. OSB grubundaki çocukların %66,7'sinin dişlerinin hiç fırçalanmadığı, %33,3'ünün ise haftada bir kez dişlerinin fırçalandığı belirtilmiştir. Kontrol grubundaki çocukların %11,2'sinin dişlerinin hiç fırçalanmadığı, %88,8'in ise günde 1 ve günde 2 kez dişlerinin fırçalandığı bildirilmiştir. Gruplar arasında diş fırçalama sıklıklarına göre anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,002$).

Tablo 4-2: OSB’li ve kontrol grubunun anne-baba eğitimi durumu ve diş fırçalama sıklıklarının incelenmesi

	OSB	Kontrol	Toplam	p*
Anne Eğitimi				
İlkokul	3 (33,3)	2 (22,2)	5 (27,8)	
Lisansüstü	0 (0)	2 (22,2)	2 (11,1)	
Lise	3 (33,3)	0 (0)	3 (16,7)	0,209
Ortaokul	1 (11,1)	1 (11,1)	2 (11,1)	
Üniversite	2 (22,2)	4 (44,4)	6 (33,3)	
Baba Eğitimi				
İlkokul	4 (44,4)	1 (11,1)	5 (27,8)	
Lisansüstü	0 (0)	2 (22,2)	2 (11,1)	
Lise	2 (22,2)	2 (22,2)	4 (22,2)	0,326
Ortaokul	1 (11,1)	1 (11,1)	2 (11,1)	
Üniversite	1 (11,1)	3 (33,3)	4 (22,2)	
Yüksekokul	1 (11,1)	0 (0)	1 (5,6)	
Diş fırçalama sıklığı				
Günde 1	0 (0)	4 (44,4)	4 (22,2)	
Günde 2 kere	0 (0)	4 (44,4)	4 (22,2)	0,002
Haftada 1	3 (33,3)	1 (11,2)	4 (22,2)	
Hiç	6 (66,7)	0 (0)	6 (33,3)	

*Kikare testi, n(%)

4.2. OSB’li ve Kontrol Grubundaki Çocukların Klinik Değerleri Açısından Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen tüm çocukların çürük, plak ve modifiye dişeti indeks değerlerinin dağılım ve ortalamaları Tablo 4-3’te görülmektedir.

Çürük indeks verileri incelendiğinde; dmft değerlerinin 0-13 arasında değiştiği ve ortalama dmft değerinin $3,72 \pm 4,28$ olduğu saptanmıştır (Tablo 4-3).

Plak indeks değerlerinin 1-3 arasında değiştiği, ortalama değerinin $1,35 \pm 0,59$ olduğu, modifiye dişeti indeks değerlerinin ise 1-3 arasında değiştiği, ortalama değerinin de $1,62 \pm 0,63$ olduğu belirlenmiştir (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: Çalışmaya dahil edilen tüm çocukların çürük indeksi, plak indeksi ve modifiye dişeti indeks değerleri

Çürük indeksi		
dmft	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	0-13 (2,5)
	<i>Ort±Ss</i>	3,72 ± 4,28
Plak indeksi		
	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	1-3 (1)
	<i>Ort±Ss</i>	1,35 ± 0,59
Modifiye dişeti indeksi		
	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	1-3 (1,45)
	<i>Ort±Ss</i>	1,62 ± 0,63

*Bağımsız örnekler t testi

OSB'li ve kontrol grubundaki çocukların çürük, plak ve modifiye dişeti indeks değerlerine ilişkin dağılım, ortalama ve p değerleri Tablo 4-4'te görülmektedir.

OSB'li çocukların ortalama dmft değeri $4,11 \pm 3,72$, kontrol grubundaki çocukların ortalama dmft değerleri ise $3,33 \pm 4,97$ olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında dmft değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-4).

OSB'li çocukların ortalama plak indeks değeri $1,48 \pm 0,71$ olarak bulunurken kontrol grubundaki çocukların ortalama plak indeks değeri $1,22 \pm 0,44$ olarak bulunmuştur; gruplara göre plak indeksleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4-4).

OSB'li grubun ve kontrol grubunun ortalama modifiye dişeti indeks değerleri sırasıyla $1,86 \pm 0,69$ ve $1,39 \pm 0,48$ olarak belirlenmiş; her iki grubun modifiye dişeti indeks değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-4).

OSB'li çocukların ÇODÖ puanları 40,5-54 arasında değişmekte olup, toplam puan ortalamaları $45,5 \pm 4,28$ olarak bulunmuştur. ÇODÖ'nin derecelendirme skorlamasına göre tüm olgular ağır şiddette otizm belirtileri göstermekteydi.

Tablo 4-4: OSB’li ve kontrol grubundaki çocukların çürük indeksi, plak indeksi, modifiye dişeti indeks değerleri

		OSB’li grup (n=9)	Kontrol grubu (n=9)	<i>p</i>
Çürük indeksi				
dmft	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	0 – 11 (4)	0 – 13 (0)	0,712
	<i>Ort±Ss</i>	4,11 ± 3,72	3,33 ± 4,97	
Plak indeksi				
	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	1 - 3 (1)	1 – 2 (1)	0,373
	<i>Ort±Ss</i>	1,48 ± 0,71	1,22 ± 0,44	
Modifiye Dişeti İndeksi				
	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	1,1- 3 (1,6)	1 – 2,3 (1,3)	0,116
	<i>Ort±Ss</i>	1,86 ± 0,69	1,39 ± 0,48	

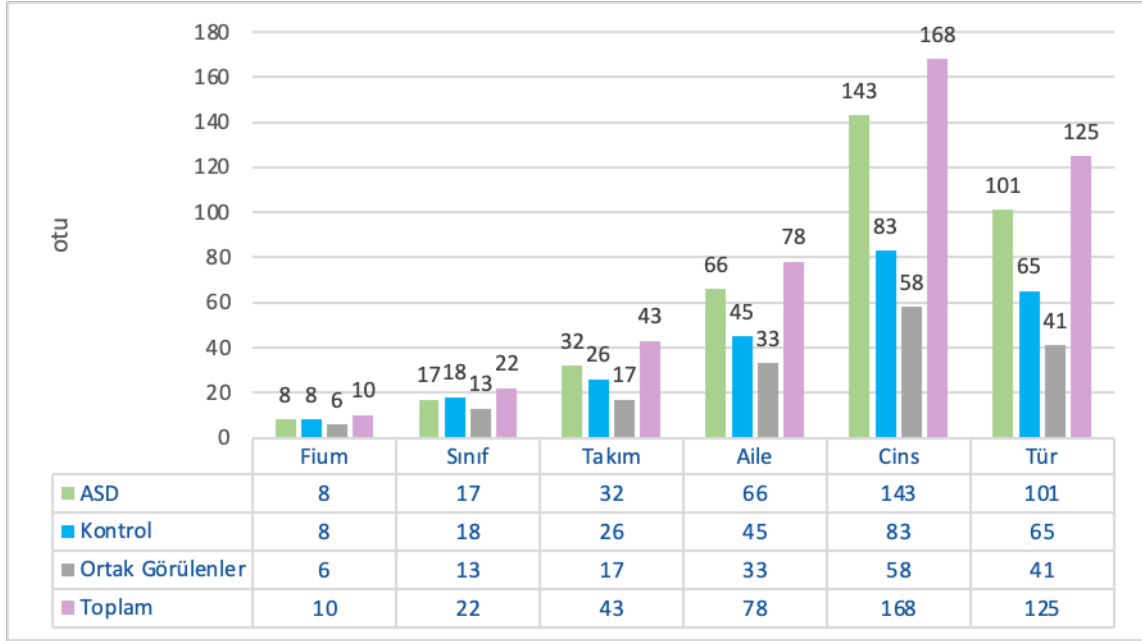
*Bağımsız örnekler t testi

4.3. OSB’li ve Kontrol Grubu Çocukların Ağız Mikrobiyota Kompozisyonunun Değerlendirilmesi

OSB’li çocukların ağız mikrobiyotasının yapı ve bileşimindeki değişiklikleri araştırmak amacıyla 9 OSB’li 9 sağlıklı çocuktan elde edilen toplam 18 adet tükürük örneği metagenomik olarak incelenmiştir. Sekanslama süreçlerinden sonra tüm örneklerde 10 filum, 22 sınıf, 43 takım, 78 aile, 168 cins ve 125 türün temsil ettiği toplamda 432 OTU saptanmıştır (Şekil 4-1).

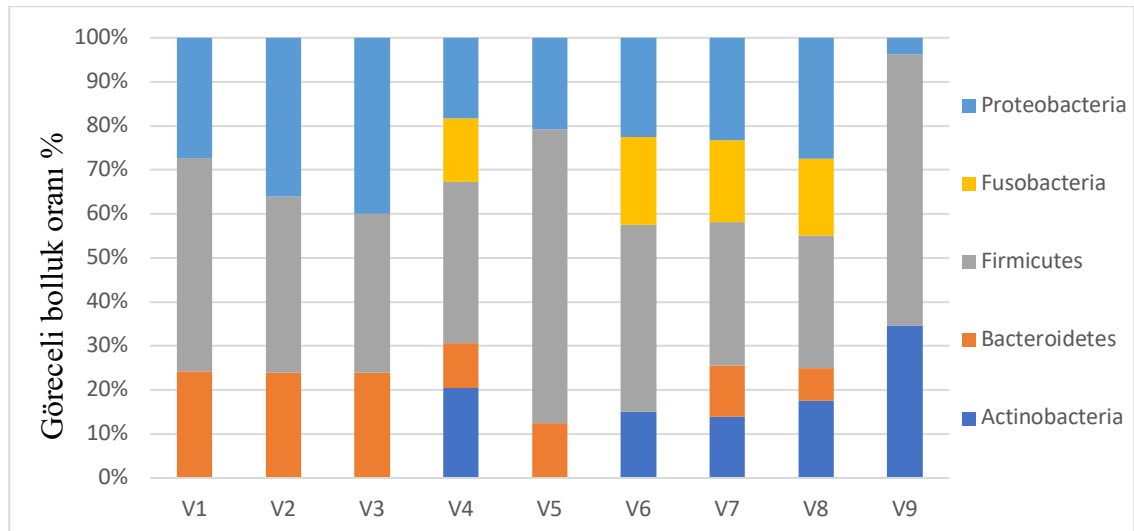
OSB’li grupta 8 filum, 17 sınıf, 32 takım, 66 aile, 143 cins, 101 tür, kontrol grubunda ise 8 filum, 18 sınıf, 26 takım, 45 aile, 83 cins ve 65 tür okumalar sonunda saptanmış olup bunlardan 6 filum, 13 sınıf, 17 takım, 33 aile, 58 cins ve 41 tür her iki grupta ortak olarak görülmüştür (Şekil 4-1).

Sekanslama analizleri sırasında en yüksek okuma miktarının 29 milyon nükleotid, en düşük okuma miktarının ise 4.882.000 nükleotid olduğu belirlenmiştir.

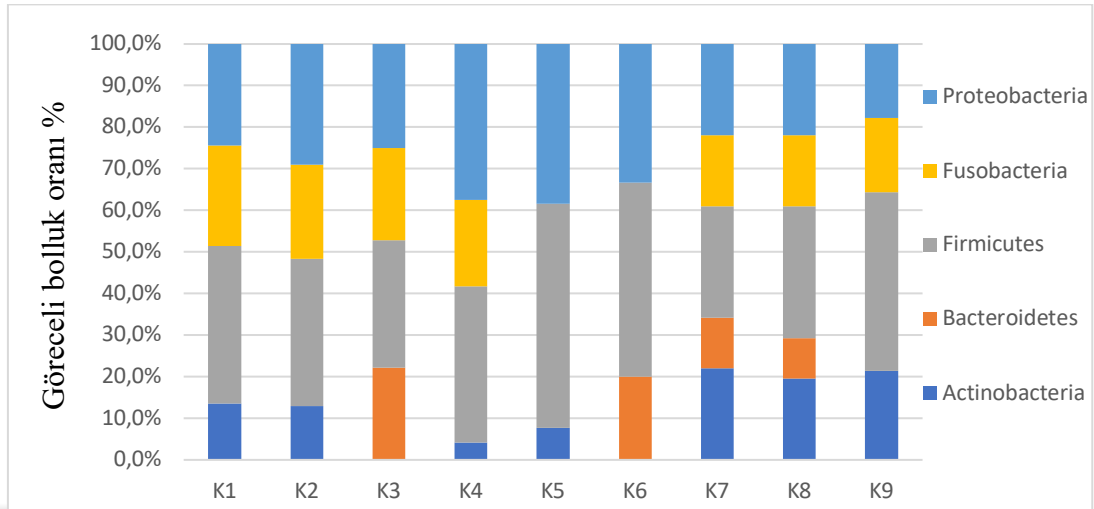


Şekil 4-1: OSB’li ve kontrol gruplarında saptanan taksonların değerleri

OSB’li ve kontrol grubundaki çocuklardan elde edilen her bir tükürük örneğinin mikrobiyal topluluk kompozisyonu ve filum düzeyinde belirlenen 5 baskın taksonun grafikleri Şekil 4-2 ve Şekil 4-3’de gösterilmiştir.



Şekil 4-2: OSB’li çocukların ağız mikrobiyotasında saptanan bakterilerin filum düzeyinde göreceli bolluk dağılımları. Her bir bar bir örneği temsil etmektedir ve her filotip farklı bir renkle gösterilmiştir.



Şekil 4-3: Kontrol grubundaki çocukların ağız mikrobiyotasında saptanan bakterilerin filum düzeyinde göreceli bolluk dağılımları. Her bir bar bir örneği temsil etmektedir ve her filotip farklı bir renkle gösterilmiştir.

4.4. OSB’li ve Kontrol Grubunda Bulunan Çocukların Ağız Mikrobiyotalarının Karşılaştırılması

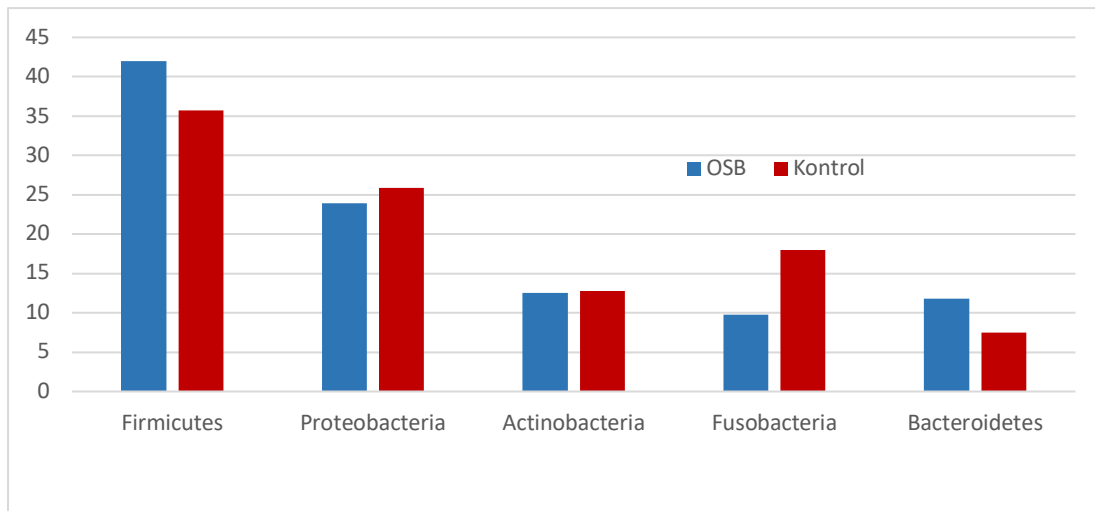
OSB’li ve kontrol grubunun ağız mikrobiyotalarında en yüksek bollukta gözlenen filumlar Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria olarak belirlenmiştir ve Tablo 4-5’te her iki gruptaki filumların göreceli bolluk değerleri gösterilmektedir. OSB’li gruptan saptanan filumlar göreceli bolluklarına göre sırasıyla; Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes ve Fusobacteria şeklindedir. Kontrol grubunda ise filumlar göreceli bolluklarına göre sırasıyla; Firmicutes, Proteobacteria, Fusobacteria, Actinobacteria ve Bacteroidetes şeklindedir.

Tablo 4-5: OSB’li ve kontrol grubunun ağız mikrobiyotasında saptanan filumların göreceli bolluklarına göre sıralaması

Filumlar	OSB (n=305) *	Kontrol (n=266) *	p
Actinobacteria	38 (12,5)	34 (12,8)	0,908
Bacteroidetes	36 (11,8)	20 (7,5)	0,092
Firmicutes	128 (42,0)	95 (35,7)	0,125
Fusobacteria	30 (9,8)	48 (18,0)	0,005
Proteobacteria	73 (23,9)	69 (25,9)	0,581

*n (%), **Oran testi

OSB’li ve kontrol grubu arasında Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes ve Proteobacteria’nın göreceli bolluk oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Her iki grup arasında Fusobacteria’nın göreceli bolluk oranı kontrol grubunda %18 iken OSB’li grupta %9,8 olarak elde edilmiş ve oranlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0,005$). OSB’li ve kontrol gruplarının filum düzeyinde göreceli bolluk oranlarının dağılımları Şekil 4-4’de gösterilmiştir.



Şekil 4-4: OSB’li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotasının filum düzeyinde göreceli bolluk dağılım grafiği

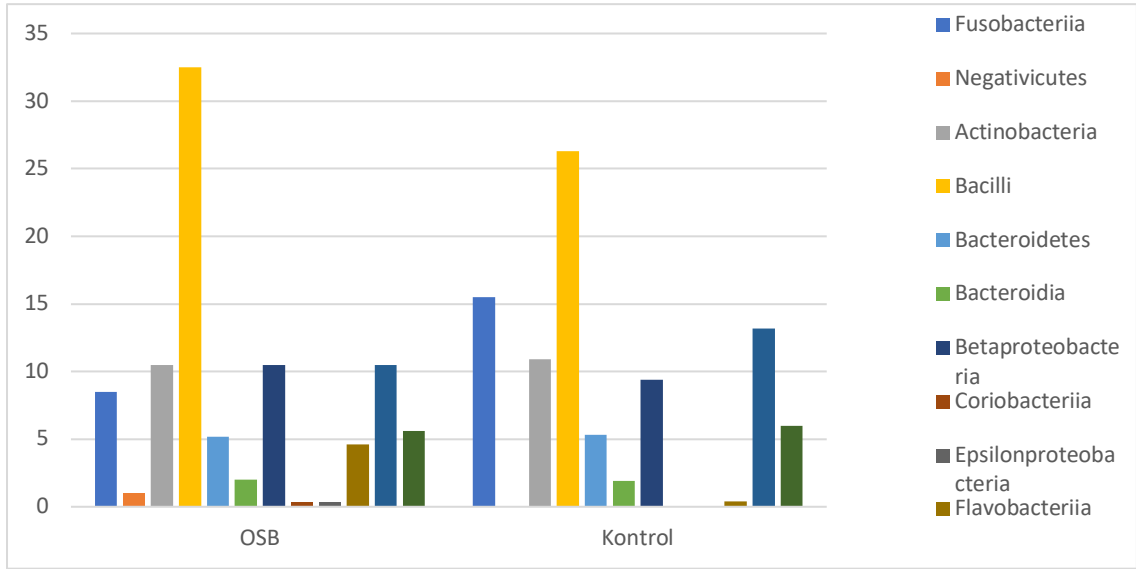
OSB'li ve kontrol grubunun ağız mikrobiyotalarında en yüksek bollukta bulunan sınıfların isimleri ve bu sınıfların her iki gruptaki göreceli bolluk değerleri Tablo 4-6'da gösterilmektedir.

Tablo 4-6: OSB'li ve kontrol grubunun ağız mikrobiyotasında saptanan sınıfların göreceli bolluklarına göre sıralaması

	OSB (n=305) *	Kontrol (n=266) *	P**
Fusobacteriia	26 (8,5)	41 (15,5)	0,013
Negativicutes	3 (1)	0 (0)	0,252
Actinobacteria	32 (10,5)	29 (10,9)	0,893
Bacilli	99 (32,5)	70 (26,3)	0,119
Bacteroidetes	16 (5,2)	14 (5,3)	1,000
Bacteroidia	6 (2)	5 (1,9)	1,000
Betaproteobacteria	32 (10,5)	25 (9,4)	0,678
Coriobacteriia	1 (0,3)	0 (0)	1,000
Epsilonproteobacteria	1 (0,3)	0 (0)	1,000
Flavobacteriia	14 (4,6)	1 (0,4)	0,001
Gammaproteobacteria	32 (10,5)	35 (13,2)	0,362
Negativicutes	17 (5,6)	16 (6)	0,859

*n (%), **Oran testi

OSB'li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotaları sınıf düzeyinde incelendiğinde, Flavobacteriia'nın göreceli bolluk değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0,001$). Flavobacteriia'nın OSB'li gruptaki göreceli bolluk oranı % 4,6 olarak belirlenirken, kontrol grubunda bu oran % 0,4 olarak bulunmuştur. Fusobacteriia'nın OSB'li gruptaki göreceli bolluk oranı %8,5 iken kontrol grubunda %15,5 olarak bulunmuştur ve her iki grup arasında Fusobacteriia'nın göreceli bolluk oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu belirlenmiştir ($p=0,013$). Diğer sınıfların gruplar arasında görülme oranları açısından istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). OSB'li ve kontrol gruplarındaki sınıfların dağılımı Şekil 4-5'de gösterilmiştir.



Şekil 4-5: OSB'li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotasının sınıf düzeyinde göreceli bolluk dağılım grafiği

OSB'li ve kontrol grubunun ağız mikrobiyotalarında en yüksek bollukta bulunan takımların isimleri ve bu takımların her iki gruptaki göreceli bolluk değerleri Tablo 4-7'de gösterilmektedir.

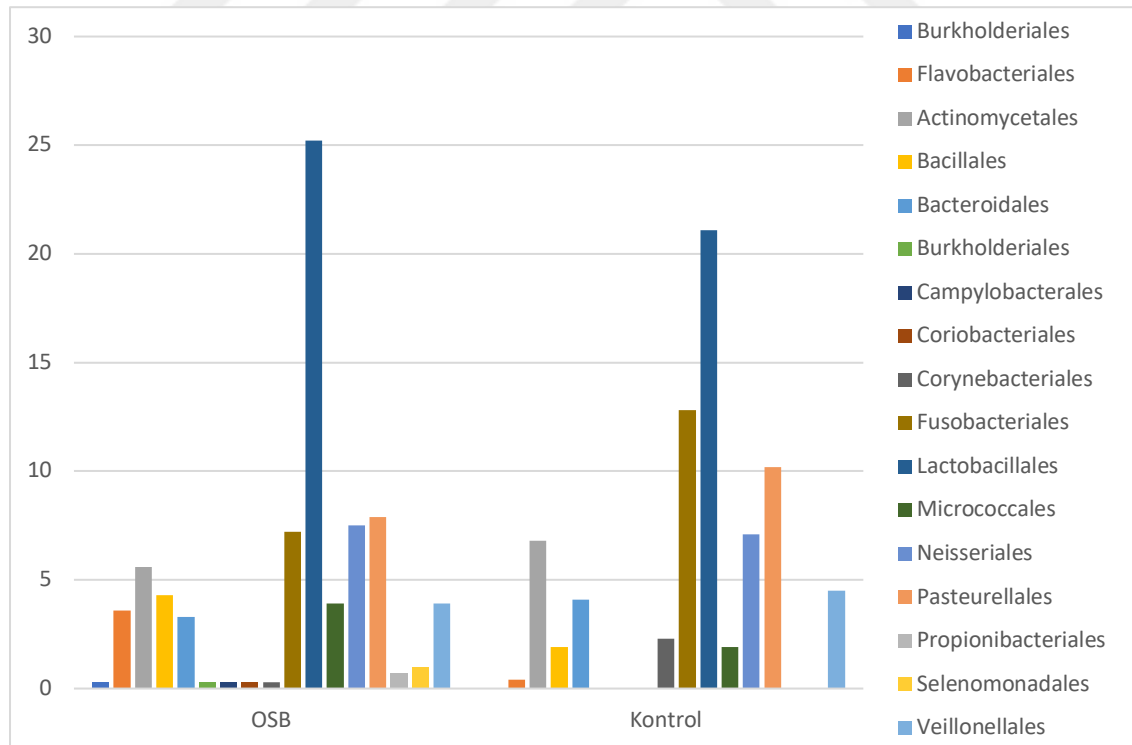
Tablo 4-7: OSB'li ve kontrol grubunun ağız mikrobiyotasında saptanan takımların göreceli bolluklarına göre sıralaması

	OSB (n=305) *	Kontrol (n=266) *	p
Burkholderiales	1 (0,3)	0 (0)	1,000
Flavobacteriales	11 (3,6)	1 (0,4)	0,004
Actinomycetales	17 (5,6)	18 (6,8)	0,602
Bacillales	13 (4,3)	5 (1,9)	0,149
Bacteroidales	10 (3,3)	11 (4,1)	0,659
Burkholderiales	1 (0,3)	0 (0)	1,000
Campylobacterales	1 (0,3)	0 (0)	1,000
Coriobacteriales	1 (0,3)	0 (0)	1,000
Corynebacteriales	1 (0,3)	6 (2,3)	0,054
Fusobacteriales	22 (7,2)	34 (12,8)	0,034
Lactobacillales	77 (25,2)	56 (21,1)	0,750
Micrococcales	12 (3,9)	5 (1,9)	0,217

Neisseriales	23 (7,5)	19 (7,1)	0,874
Pasteurellales	24 (7,9)	27 (10,2)	0,379
Propionibacteriales	2 (0,7)	0 (0)	0,501
Selenomonadales	3 (1)	0 (0)	0,252
Veillonellales	12 (3,9)	12 (4,5)	0,835

*n (%), **Oran testi

OSB'li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotaları takım düzeyinde incelendiğinde, gruplar arasında Flavobacteriales ve Fusobacteriales takımlarının göreceli bolluk oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır (p değerleri sırasıyla 0,004 ve 0,034). Flavobacteriales takımının OSB'li grupta göreceli bolluk oranı %3,6 iken kontrol grubunda %0,4 olarak bulunmuştur. Fusobacteriales takımının OSB'li gruptaki göreceli bolluk oranı %7,2 iken kontrol grubunda %12,8 olarak elde edilmiştir. Gruplar arasında diğer takımların göreceli bolluk oranlarının dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: OSB'li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotasının takım düzeyinde göreceli bolluk dağılım grafiği

OSB'li ve kontrol grubunun ağız mikrobiyotalarında en yüksek bollukta bulunan ailelerin isimleri ve bu ailelerin her iki gruptaki göreceli bolluk değerleri Tablo 4-8'de gösterilmektedir.

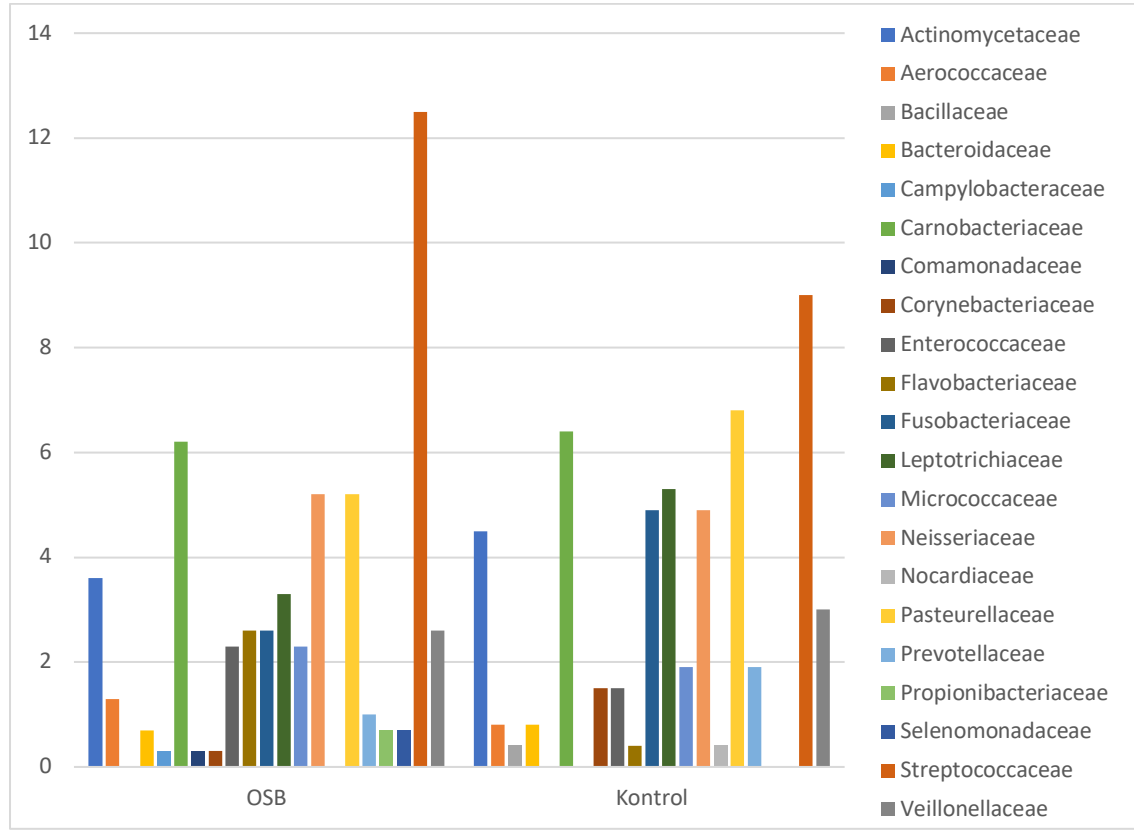
Tablo 4-8: OSB'li ve kontrol grubunun ağız mikrobiyotasında saptanan ailelerin göreceli bolluklarına göre sıralaması

	OSB (n=305) *	Kontrol (n=266) *	p
Actinomycetaceae	11 (3,6)	12 (4,5)	0,671
Aerococcaceae	4 (1,3)	2 (0,8)	0,690
Bacillaceae	0 (0)	1 (0,4)	0,466
Bacteroidaceae	2 (0,7)	2 (0,8)	1,000
Campylobacteraceae	1 (0,3)	0 (0)	1,000
Carnobacteriaceae	19 (6,2)	17 (6,4)	1,000
Comamonadaceae	1 (0,3)	0 (0)	1,000
Corynebacteriaceae	1 (0,3)	4 (1,5)	0,189
Enterococcaceae	7 (2,3)	4 (1,5)	0,555
Flavobacteriaceae	8 (2,6)	1 (0,4)	0,042
Fusobacteriaceae	8 (2,6)	13 (4,9)	0,183
Leptotrichiaceae	10 (3,3)	14 (5,3)	0,297
Micrococcaceae	7 (2,3)	5 (1,9)	0,778
Neisseriaceae	16 (5,2)	13 (4,9)	1,000
Nocardiaceae	0 (0)	1 (0,4)	1,000
Pasteurellaceae	16 (5,2)	18 (6,8)	0,481
Prevotellaceae	3 (1)	5 (1,9)	0,482
Propionibacteriaceae	2 (0,7)	0 (0)	0,501
Selenomonadaceae	2 (0,7)	0 (0)	0,501
Streptococcaceae	38 (12,5)	24 (9)	0,225
Veillonellaceae	8 (2,6)	8 (3)	0,805

*n (%), **Oran testi

OSB'li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotaları aile düzeyinde incelendiğinde, gruplar arasında sadece Flavobacteriaceae ailesinin göreceli bolluk oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmiştir (p=0,042). Flavobacteriaceae ailesinin göreceli bolluk oranı OSB'li grupta %2,6 iken kontrol grubunda %0,4 olarak

elde edilmiştir. Gruplar arasında diğer ailelerin göreceli bolluk oranlarının dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4-7).



Şekil 4-7: OSB’li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotasının aile düzeyinde göreceli bolluk dağılım grafiği

OSB’li ve kontrol grubunun ağız mikrobiyotalarında en yüksek bollukta bulunan cinslerin isimleri ve bu cinslerin her iki gruptaki göreceli bolluk değerleri Tablo 4-9’da gösterilmektedir.

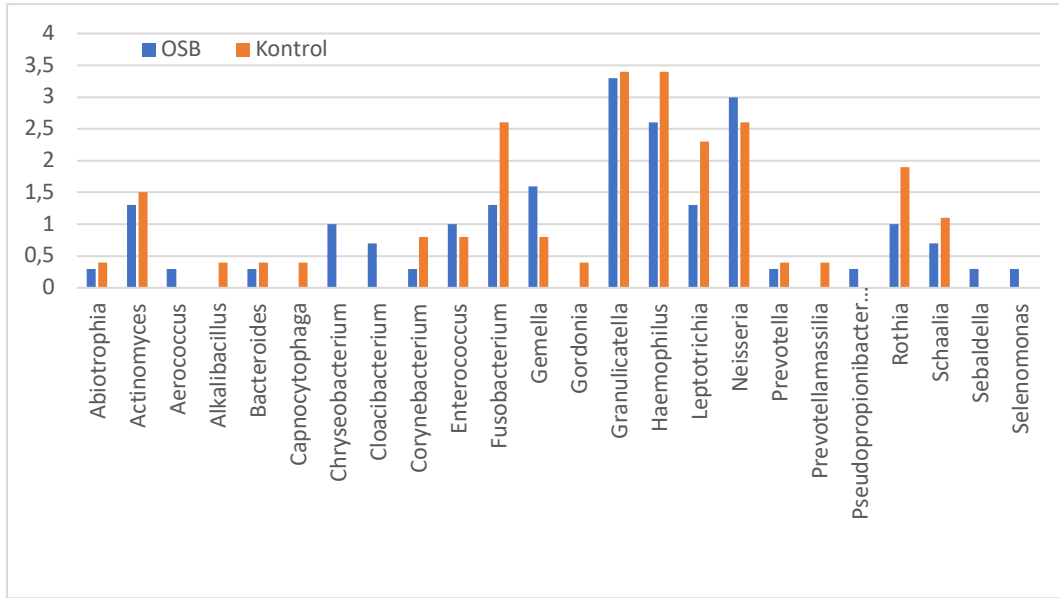
Tablo 4-9: OSB’li ve kontrol grubunun ağız mikrobiyotasında saptanan cinslerin göreceli bolluklarına göre sıralaması

	OSB (n=305) *	Kontrol (n=266) *	p
Abiotrophia	1 (0,3)	1 (0,4)	1,000
Actinomyces	4 (1,3)	4 (1,5)	1,000
Aerococcus	1 (0,3)	0 (0)	1,000
Alkalibacillus	0 (0)	1 (0,4)	1,000

Bacteroides	1 (0,3)	1 (0,4)	1,000
Capnocytophaga	0 (0)	1 (0,4)	1,000
Chryseobacterium	3 (1)	0 (0)	0,520
Cloacibacterium	2 (0,7)	0 (0)	0,501
Corynebacterium	1 (0,3)	2 (0,8)	0,600
Enterococcus	3 (1)	2 (0,8)	1,000
Fusobacterium	4 (1,3)	7 (2,6)	0,362
Gemella	5 (1,6)	2 (0,8)	0,458
Gordonia	0 (0)	1 (0,4)	1,000
Granulicatella	10 (3,3)	9 (3,4)	1,000
Haemophilus	8 (2,6)	9 (3,4)	0,629
Leptotrichia	4 (1,3)	6 (2,3)	0,526
Neisseria	9 (3)	7 (2,6)	1,000
Prevotella	1 (0,3)	1 (0,4)	1,000
Prevotellamassilia	0 (0)	1 (0,4)	1,000
Pseudopropionibacterium	1 (0,3)	0 (0)	1,000
Rothia	3 (1)	5 (1,9)	0,482
Schaalia	2 (0,7)	3 (1,1)	0,668
Sebaldella	1 (0,3)	0 (0)	1,000
Selenomonas	1 (0,3)	0 (0)	1,000
Streptobacillus	1 (0,3)	2 (0,8)	0,600
Streptococcus	29 (9,5)	15 (5,6)	0,115
Trichococcus	1 (0,3)	0 (0)	1,000
Veillonella	4 (1,3)	4 (1,5)	1,000

*n (%), **Oran testi

OSB'li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotaları cins düzeyinde incelendiğinde, gruplar arasında cinslerin göreceli bolluk oranlarının dağılımı açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Frekans ve yüzde dağılımları Tablo 4-9'da ve Şekil 4-8'de sunulmuştur.



Şekil 4-8: OSB'li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotasının cins düzeyinde göreceli bolluk dağılım grafiği

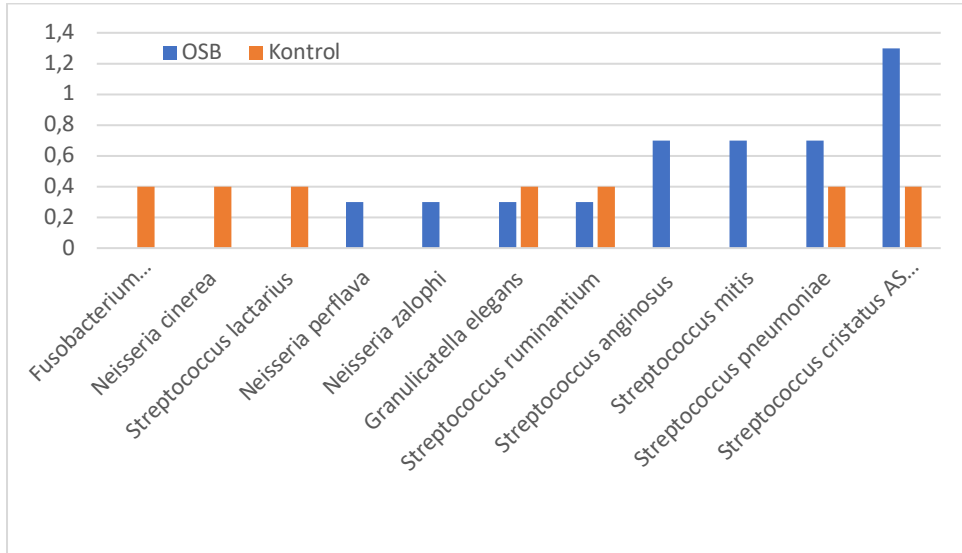
OSB'li ve kontrol grubunun ağız mikrobiyotalarında en yüksek bollukta bulunan türlerin isimleri ve bu türlerin her iki gruptaki göreceli bolluk değerleri Tablo 4-10'da gösterilmektedir.

Tablo 4-10: OSB'li ve kontrol grubunun ağız mikrobiyotasında saptanan türlerin göreceli bolluklarına göre sıralaması

	OSB (n=305) *	Kontrol (n=266) *	p
Fusobacterium periodonticum	0 (0)	1 (0,4)	1,000
Neisseria cinerea	0 (0)	1 (0,4)	1,000
Streptococcus lactarius	0 (0)	1 (0,4)	1,000
Neisseria perflava	1 (0,3)	0 (0)	1,000
Neisseria zalophi	1 (0,3)	0 (0)	1,000
Granulicatella elegans	1 (0,3)	1 (0,4)	1,000
Streptococcus ruminantium	1 (0,3)	1 (0,4)	1,000
Streptococcus anginosus	2 (0,7)	0 (0)	0,501
Streptococcus mitis	2 (0,7)	0 (0)	0,501
Streptococcus pneumoniae	2 (0,7)	1 (0,4)	1,000
Streptococcus cristatus AS 1.389	4 (1,3)	1 (0,4)	0,379

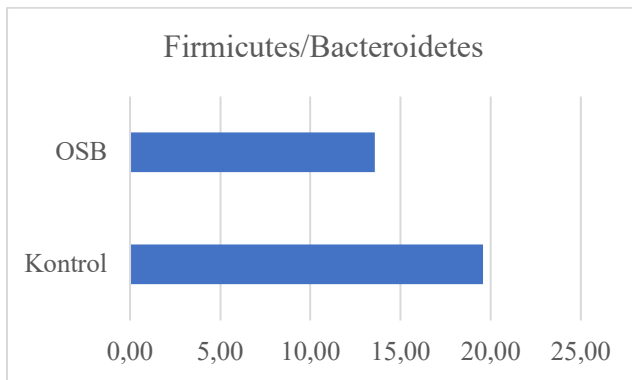
*n (%), **Oran testi

OSB'li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotaları tür düzeyinde incelendiğinde, gruplar arasında türlerin göreceli bolluk oranlarının dağılımı açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Frekans ve yüzde dağılımlarını belirten grafik Şekil 4-9'de gösterilmiştir.



Şekil 4-9: OSB'li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotasının tür düzeyinde göreceli bolluk dağılım grafiği

OSB'li ve kontrol gruplarının Filum düzeyinde Firmicutes/Bacteroidetes oranlarına ilişkin bulgular Şekil 4-10'da gösterilmiştir. OSB'li grubun Firmicutes/Bacteroidetes oranı 13,56 olarak bulunurken, kontrol grubunda bu oran 19,56 olarak bulunmuştur (Şekil 4-10).



Şekil 4-10: OSB'li ve kontrol grubunun fülum düzeyinde Firmicutes/Bacteroidetes oranları

OSB'li ve kontrol grubundaki çocukların ağız mikrobiyotalarında saptanan OTU'lar, örneklerin en az %75'inde en az %1'lik bolluk oranında (her grupta en az 7 örnekte) bulunacak şekilde sıralandı ve çekirdek mikrobiyota profili cins düzeyinde belirlendi (Tablo 4-11). Belirlenen çekirdek oral mikrobiyom şu şekildedir; Streptococcaceae ailesinden isimlendirilemeyen bir cins (OSB'de %100, kontrolde %100), *Streptococcus* (OSB'de %100, kontrolde %100), *Granulicatella* (OSB'de %88,9, kontrolde %100), *Haemophilus* (OSB'de %100, kontrolde %88,9), Pasteurellaceae ailesinden isimlendirilemeyen bir cins (OSB'de %100, kontrolde %88,9), Carnobacteriaceae ailesinden isimlendirilemeyen bir cins (OSB'de %88,9, kontrolde %88,9), *Neisseria* (OSB'de %66,7, kontrolde %77,8), Neisseriaceae ailesinden isimlendirilemeyen bir cins (OSB'de %66,7, kontrolde %77,8).

Tablo 4-11: OSB'li ve kontrol grubundaki çocukların ağız mikrobiyotasını çekirdek profili

OTU	OSB'li Grup (gözlenen örnek sayısı)	Kontrol Grubu (gözlenen örnek sayısı)
Streptococcaceae ailesinden isimlendirilemeyen bir cins	%100 (9/9)	%100 (9/9)
<i>Streptococcus</i>	%100 (9/9)	%100 (9/9)
<i>Granulicatella</i>	%88,9 (8/9)	%100 (9/9)
<i>Haemophilus</i>	%100 (9/9)	%88,9 (8/9)
Pasteurellaceae ailesinden isimlendirilemeyen bir cins	%100 (9/9)	%88,9 (8/9)
Carnobacteriaceae ailesinden isimlendirilemeyen bir cins	%88,9 (8/9)	%88,9 (8/9)
<i>Neisseria</i>	%66,7 (6/9)	%77,8 (7/9)

Neisseriaceae ailesinden isimlendirilemeyen bir cins	%66,7 (6/9)	%77,8 (7/9)
---	-------------	-------------

Göreceli miktarı >%1 olan OTU'ların OSB'li ve kontrol gruplarına göre dağılımları Tablo 4-12'de gösterilmiştir. Gruplar arasında *Granulicatella elegans*, *Streptococcus anginosus* SK52 = DSM 2563, *Streptococcus cristatus* AS 1.389, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* subsp. *dentisani*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Neisseria zalophi* cinsleri anlamlı farklılık göstererek OSB'li grupta daha yüksek oranda bulunmuştur.

Tablo 4-12: Göreceli miktarı >%1 olan OTU'ların OSB'li ve kontrol gruplarına göre dağılımları

Filum/Sınıf	Takım/Aile	Tür/Cins	OSB		Kontrol		p
			Ort	Ss	Ort	Ss	
Firmicutes			73,68	15,74	80,30	12,91	0,18
Firmicutes/ Bacilli			72,04	15,30	78,67	13,81	0,18
	Lactobacillales		69,13	15,04	77,82	13,92	0,12
	Lactobacillales/Aerococcaceae		0,84	0,90	0,42	0,56	0,14
		Aerococcus sp.	0,18	0,38	0,05	0,05	0,18
		Abiotrophia sp	0,66	0,81	0,37	0,53	0,20
	Lactobacillales/Carnobacteriaceae		8,56	4,84	7,85	5,05	0,39
		Granulicatella sp.	8,41	3,53	7,86	5,16	0,40
		Granulicatella elegans	0,55	0,38	0,12	0,34	0,01
		Trichococcus sp.	0,31	0,43	0,17	0,11	0,19
	Lactobacillales/Enterococcaceae		1,44	1,13	0,79	0,47	0,08
		Enterococcus sp.	1,44	1,49	0,69	0,38	0,10
	Lactobacillales/Streptococcaceae		59,04	14,44	67,77	15,24	0,12
		Streptococcus sp.	57,02	14,29	65,71	15,40	0,12
		Streptococcus anginosus SK52 = DSM 2563	0,61	0,41	0,13	0,30	0,01
		Streptococcus cristatus AS 1.389	0,96	0,82	0,25	0,41	0,02
		Streptococcus	0,03	0,09	0,25	0,74	0,21

			lactarius					
			Streptococcus mitis	0,77	0,71	0,14	0,23	0,02
			Streptococcus oralis					
			subsp. dentisani	3,77	1,69	1,58	2,83	0,04
			Streptococcus					
			pneumoniae	0,54	0,54	0,12	0,34	0,04
			Streptococcus					
			ruminantium	0,45	0,51	0,16	0,35	0,10
		Bacillales		2,92	2,02	0,86	0,43	0,01
			Gemella sp.	2,49	2,72	0,77	0,47	0,06
		Bacillales/Bacillaceae	Alkalibacillus sp.	0,03	0,09	0,17	0,51	0,23
Firmicutes				1,50	1,27	1,39	1,79	0,44
Negativicutes		Veillonellales		1,31	1,24	1,39	1,79	0,46
		Veillonellales/		1,36	1,34	1,39	1,81	0,48
		Veillonellaceae	Veillonella sp.	1,28	1,22	1,35	1,77	0,46
		Selenomonadales		0,19	0,47	0,00	0,00	0,14
		Selenomonadales/Seleno		0,17	0,48	0,00	0,00	0,17
		monadaceae	Selenomonas	0,17	0,47	0,00	0,00	0,17
Actinobacteria				3,79	3,53	3,64	3,81	0,47
Actinobacteria/Actinoba	Corynebacteriales			0,14	0,26	0,59	0,95	0,10
cteria	Corynebacteriales/Coryn			0,12	0,23	0,59	0,96	0,09
	ebacteriaceae	Corynebacterium sp.		0,30	0,54	0,69	0,92	0,16
	Actinomycetales			1,93	1,74	2,67	2,73	0,25
	Actinomycetales/Nocard	Gordonia sp.		0,01	0,03	0,95	2,81	0,17
	iaceae							
	Actinomycetales/Propion	Pseudopropionibacter		0,22	0,39	0,03	0,07	0,11
	ibacteriaceae	ium sp.						
	Actinomycetales/Actino			1,95	1,76	2,65	2,80	0,27
	mycetaceae	Schaalia sp.		0,74	0,91	0,93	0,83	0,33
		Actinomyces sp.		1,00	1,11	1,71	2,25	0,21
	Propionibacteriales			0,24	0,41	0,03	0,07	0,10
	Propionibacteriales/Propi			0,22	0,40	0,04	0,07	0,11
	onibacteriaceae							
	Micrococcales			1,09	1,17	0,15	0,26	0,03
	Micrococcales/Micrococ			0,85	0,93	0,06	0,12	0,02
	caceae	Rothia sp.		0,89	1,07	0,88	0,62	0,49

Actinobacteria	Coriobacteriales		0,25	0,53	0,21	0,34	0,42
Coriobacteriia							
Bacteroidetes/Flavobacte			4,52	8,74	0,07	0,09	0,09
riia	Flavobacteriales		4,52	8,74	0,08	0,09	0,09
	Flavobacteriales/Flavob		4,71	9,13	0,08	0,09	0,09
	acteriaceae	Capnocytophaga sp.	0,13	0,16	1,47	4,26	0,19
		Chryseobacterium sp.	3,53	7,26	0,01	0,03	0,10
		Cloacibacterium sp.	0,65	1,33	0,00	0,00	0,10
Bacteroidetes/Bacteroides			5,45	8,41	2,52	4,83	0,20
tes	Bacteroidales		0,93	0,80	2,55	4,76	0,17
	Bacteroidales/Bacteroida		0,33	0,44	0,25	0,64	0,39
	ceae	Bacteroides sp.	0,32	0,43	0,36	0,67	0,45
	Bacteroidales		0,58	0,68	2,28	4,18	0,13
	Prevotellaceae	Prevotellamassilia sp.	0,13	0,26	1,40	3,37	0,15
Bacteroidetes			0,93	0,80	2,55	4,76	0,17
Bacteroidia	Bacteroidales/Prevotella	Prevotella sp.	0,29	0,45	0,61	0,80	0,17
	ceae						
Proteobacteria			11,57	9,01	7,65	3,06	0,13
Proteobacteria/Betaprote			5,94	6,95	2,90	2,76	0,14
obacteria	Burkholderiales		0,49	0,65	0,34	0,38	0,29
	Burkholderiales		0,32	0,54	0,10	0,31	0,17
	Comamonadaceae						
	Neisseriales		5,45	6,67	2,56	2,79	0,14
	Neisseriales /Neisseriace		5,49	6,63	2,58	2,81	0,14
	ae	Neisseria sp.	5,34	6,48	2,47	2,82	0,14
		Neisseria cinerea	0,11	0,19	0,15	0,40	0,42
		Neisseria perflava	0,33	0,66	0,00	0,00	0,10
		Neisseria zalophi	0,27	0,37	0,00	0,00	0,04
Proteobacteria/Gammapr			5,48	3,09	4,46	2,67	0,24
oteobacteria	Pasteurellales		5,33	3,02	4,65	2,32	0,31
	Pasteurellales/Pasteurella		5,49	3,13	4,69	2,36	0,28
	ceae						
Proteobacteria/Epsilonproteobacteria	Campylobacteriales/Cam		0,55	1,51	0,00	0,00	0,17
	pylobacteraceae						
Proteobacteria/Gammapr	Pasteurellales/Pasteurella	Haemophilus sp.	4,90	2,90	4,25	2,38	0,31
oteobacteria	ceae						

Fusobacteria		5,39	7,28	5,62	6,35	0,47
Fusobacteria/Fusobacteri		5,39	7,28	5,62	6,35	0,47
ia	Fusobacteriales	5,39	7,28	5,62	6,35	0,47
	Fusobacteriales/Leptotric	4,34	6,23	3,14	3,32	0,32
	hiaceae					
	Leptotrichia sp.	3,85	5,60	2,66	2,90	0,30
	Sebaldella sp.	0,19	0,47	0,01	0,03	0,16
	Streptobacillus sp.	0,25	0,53	0,35	0,60	0,35
	Fusobacteriales/Fusobact	1,10	1,14	2,53	3,21	0,12
	eriaceae					
	Fusobacterium sp.	1,09	1,12	2,46	3,16	0,12
	Fusobacterium					
	periodonticum	0,02	0,06	0,27	0,82	0,19

4.5. OSB'li ve Kontrol Grubundaki Çocukların Ağız Mikrobiyotalarının Alfa ve Beta Çeşitlilik Tahminlerinin Karşılaştırılması

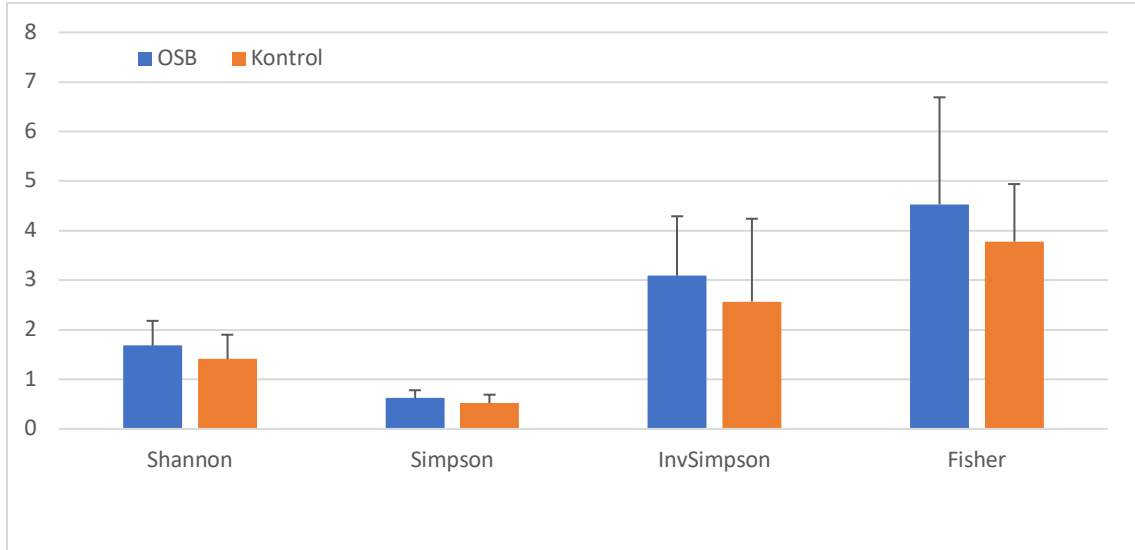
OSB'li ve kontrol grupları arasında ağız mikrobiyotasının alfa çeşitlilik tahminlerini ifade eden Shannon, Simpson, InvSimpson ve Fisher indeks değerleri Tablo 4-13'de, dağılım grafikleri de Şekil 4-11'de gösterilmiştir.

Tablo 4-13: OSB'li ve kontrol gruplarının alfa çeşitlilik değerlerinin karşılaştırılması

		Toplam	OSB'li grup	Kontrol grubu	P
		(n=18)	(n=9)	(n=9)	
Shannon	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	0,58 - 2,29 (1,53)	1,06 - 2,27 (1,57)	0,58 - 2,29 (1,52)	0,274
	<i>Ort±Ss</i>	1,54 ± 0,5	1,68 ± 0,5	1,41 ± 0,49	
Simpson	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	0,21 - 0,86 (0,56)	0,39 - 0,79 (0,69)	0,21 - 0,86 (0,53)	0,228
	<i>Ort±Ss</i>	0,57 ± 0,17	0,62 ± 0,16	0,52 ± 0,17	
InvSimpson	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	1,26 - 6,91 (2,26)	1,63 - 4,87 (3,21)	1,26 - 6,91 (2,14)	0,461
	<i>Ort±Ss</i>	2,83 ± 1,44	3,09 ± 1,2	2,57 ± 1,67	
Fisher	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	1,86 - 8,45 (3,66)	1,86 - 8,45 (4,1)	2,26 - 6,08 (3,38)	0,375
	<i>Ort±Ss</i>	4,15 ± 1,72	4,53 ± 2,16	3,78 ± 1,16	

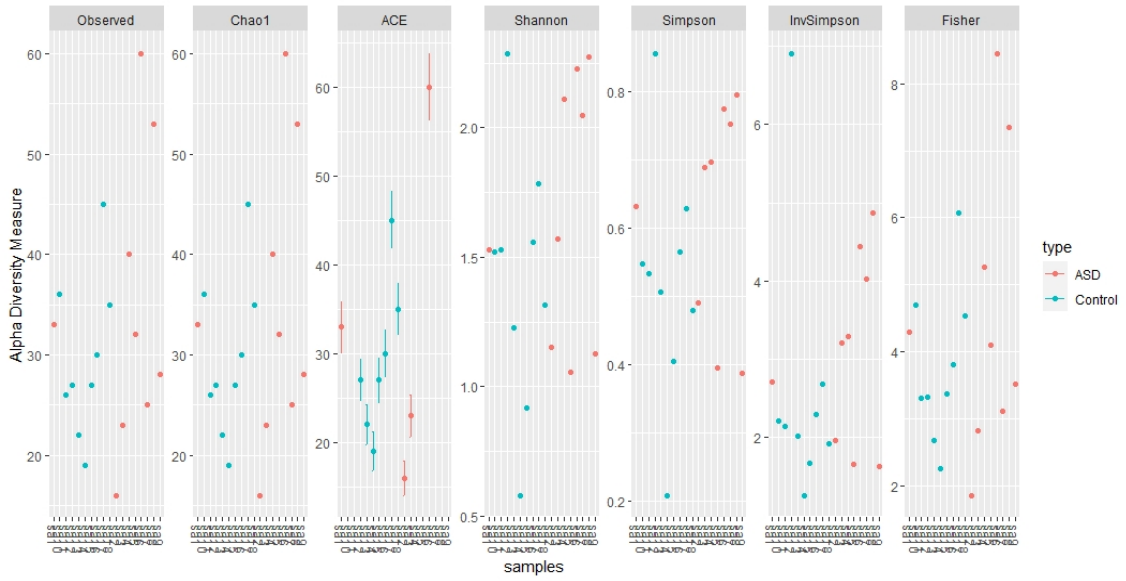
*Bağımsız örnekler t testi

OSB’li ve kontrol grupları arasında alfa çeşitlilik değerlerinden Shannon, Simpson, InvSimpson ve Fisher indekslerinin ortalama değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p=0,274$, $p=0,228$, $p=0,461$, $p=0,375$).

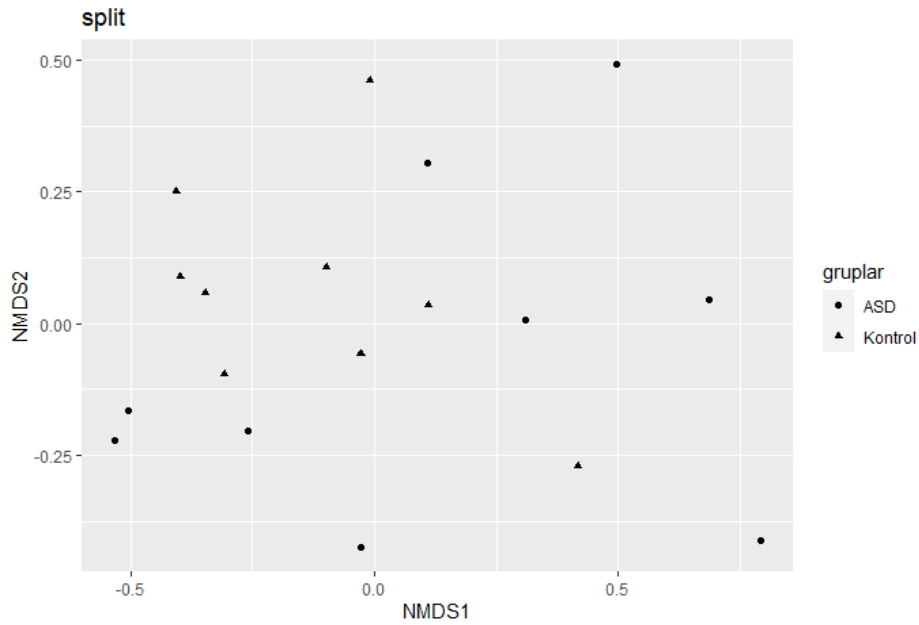


Şekil 4-11: OSB’li ve kontrol gruplarının alfa çeşitlilik indeks değerlerinin dağılımları

OSB’li ve kontrol grubundaki çocukların tükürük mikrobiyotalarının alfa çeşitlilik tahminlerinin grafikleri Şekil 4-12’de, beta çeşitlilik değerlerinin genel dağılımı (plot ordination) grafiği Şekil 4-13’ de gösterilmiştir.



Şekil 4-12: OSB'li ve kontrol grubunun alfa çeşitlilik değerlerinin grafiği



Şekil 4-13: Tüm örneklerdeki beta çeşitlilik indeks değerlerinin dağılımını gösteren plotordination grafiği

4.6. OSB'li ve Kontrol Grubundaki Çocukların Ağız Mikrobiyotalarındaki OTU'ların Klinik Verilerle İlişkinin Değerlendirilmesi

OSB'li çocukların ağız mikrobiyotasında saptanan OTU'lar ile dmft, plak indeksi, dişeti indeksi, vücut kitle indeksi ve ÇODÖ puanları arasındaki korelasyon ilişkisini

gösteren değerler Tablo 4-14'de gösterilmektedir. OSB'li grupta Firmicutes filumu, Bacilli sınıfı ve Lactobacillales takımı ile vücut kitle indeksi arasında pozitif yönlü güçlü bir ilişki vardır (r değerleri sırasıyla 0,695, 0,695 ve 0,678). Gingival indeks ile sadece Granulicatella cinsi arasında negatif yönlü orta düzey bir ilişki vardır ($r=-0,675$; $p=0,046$). Diğer otular ile klinik özellikler arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Tablo 4-14: OSB'li grupta OTU'lar ve klinik değişkenler arasındaki korelasyon ilişkisi

OTU	dmft indeksi		Plak indeksi		Gingival indeks		BMI		ÇODÖ	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Filum düzeyinde										
Firmicutes	-0,218	0,572	-0,275	0,473	-0,513	0,158	0,695	0,038	-0,276	0,472
Fusobacteria	0,168	0,666	0,275	0,473	0,239	0,535	-0,594	0,092	-0,310	0,417
Proteobacteria	0,227	0,557	0,138	0,724	0,291	0,448	-0,628	0,070	-0,092	0,814
Sınıf düzeyinde										
Bacilli	-0,218	0,572	-0,275	0,473	-0,513	0,158	0,695	0,038	0,536	0,137
Bacteroidetes	0,370	0,327	0,330	0,385	0,402	0,284	0,025	0,949	-0,117	0,764
Betaproteobacteria	0,008	0,983	0,083	0,833	0,316	0,407	-0,611	0,081	0,310	0,417
Fusobacteriia	0,168	0,666	0,275	0,473	0,239	0,535	-0,594	0,092	-0,310	0,417
Gammaproteobacteria	0,168	0,666	-0,138	0,724	0,009	0,983	-0,226	0,559	-0,536	0,137
Takım düzeyinde										
Fusobacteriales	0,168	0,666	0,275	0,473	0,239	0,535	-0,594	0,092	-0,310	0,417
Lactobacillales	-0,286	0,456	-0,275	0,473	-0,445	0,231	0,678	0,045	0,477	0,194
Bacillales	0,076	0,847	0,000	1,000	-0,085	0,827	0,234	0,544	-0,042	0,915
Neisseriales	-0,252	0,548	-0,013	0,976	0,209	0,620	-0,571	0,139	-0,444	0,232
Pasteurellales	0,193	0,618	-0,138	0,724	-0,017	0,965	-0,126	0,748	-0,033	0,932
Aile düzeyinde										
Carnobacteriaceae	0,133	0,754	-0,300	0,470	-0,577	0,134	0,383	0,349	0,586	0,097
Neisseriaceae	-0,252	0,548	-0,013	0,976	0,209	0,620	-0,571	0,139	-0,444	0,232
Streptococcaceae	-0,294	0,442	-0,248	0,520	-0,402	0,284	0,661	0,053	-0,276	0,472
Pasteurellaceae	0,193	0,618	-0,138	0,724	-0,017	0,965	-0,126	0,748	-0,319	0,402
Cins düzeyinde										
Streptococcus	-0,294	0,442	-0,165	0,671	-0,291	0,448	0,577	0,104	-0,201	0,604
Granulicatella	-0,193	0,618	-0,495	0,175	-0,675	0,046	0,569	0,110	-0,544	0,130
Neisseria	-0,252	0,548	-0,013	0,976	0,209	0,620	-0,571	0,139	-0,402	0,284
Haemophilus	0,235	0,542	-0,110	0,778	0,009	0,983	-0,176	0,651	0,209	0,589

Tür düzeyinde

Streptococcus oralis subsp. Dentisani	0,202	0,603	0,468	0,204	0,479	0,192	-0,159	0,683	-0,050	0,898
---------------------------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	-------	--------	-------

r: Spearman rho korelasyon katsayısı

Kontrol grubundaki çocukların ağız mikrobiyotasında saptanan OTU'lar ile dmft, plak indeksi, dişeti indeksi ve vücut kitle indeks değerleri arasındaki korelasyon ilişkisini gösteren değerler Tablo 4-15'de gösterilmektedir. Kontrol grubunda OTU'lar ile klinik veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0,005$).

Tablo 4-15: Kontrol grubunda OTU'lar ve klinik değişkenler arasındaki korelasyon ilişkisi

OTU	Dmft indeksi		Plak indeksi		Gingival indeks		BMI	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Filum düzeyinde								
Firmicutes	-0,128	0,743	-0,207	0,593	-0,210	0,588	0,317	0,406
Fusobacteria	0,091	0,815	0,207	0,593	0,341	0,369	-0,317	0,406
Proteobacteria	-0,201	0,604	-0,104	0,791	0,149	0,703	0,017	0,966
Sınıf düzeyinde								
Bacilli	-0,128	0,743	-0,207	0,593	-0,210	0,588	0,317	0,406
Bacteroidetes	0,453	0,307	0,612	0,144	0,225	0,628	0,071	0,879
Betaproteobacteria	-0,037	0,926	0,104	0,791	0,437	0,239	-0,017	0,966
Fusobacteriia	0,091	0,815	0,207	0,593	0,341	0,369	-0,317	0,406
Gammaproteobacteria	-0,583	0,129	-0,504	0,203	-0,013	0,976	-0,333	0,420
Takım düzeyinde								
Fusobacteriales	0,091	0,815	0,207	0,593	0,341	0,369	-0,317	0,406
Lactobacillales	-0,073	0,852	-0,207	0,593	-0,262	0,495	0,267	0,488
Neisseriales	-0,128	0,743	0,000	1,000	0,297	0,437	0,083	0,831
Pasteurellales	-0,292	0,446	-0,311	0,416	-0,236	0,541	-0,067	0,865
Bacillales	0,091	0,815	0,311	0,416	0,376	0,319	0,033	0,932
Aile düzeyinde								
Neisseriaceae	-0,128	0,743	0,000	1,000	0,297	0,437	0,083	0,831
Pasteurellaceae	-0,292	0,446	-0,311	0,416	-0,236	0,541	-0,067	0,865
Carnobacteriaceae	-0,573	0,138	-0,082	0,846	0,332	0,422	0,381	0,352

Streptococcaceae	-0,073	0,852	-0,207	0,593	-0,393	0,295	0,183	0,637
Cins düzeyinde								
Haemophilus	-0,292	0,446	-0,311	0,416	-0,236	0,541	-0,067	0,865
Neisseria	-0,073	0,852	0,000	1,000	0,297	0,437	0,067	0,865
Streptococcus	-0,018	0,963	-0,207	0,593	-0,210	0,588	0,283	0,460
Granulicatella	-0,164	0,699	0,412	0,310	0,524	0,183	0,524	0,183
Tür düzeyinde								
Streptococcus oralis subsp. dentisani	-0,355	0,389	-0,504	0,203	-0,491	0,217	-0,571	0,139



5. TARTIŞMA

5.1. Gereç ve Yöntemin Değerlendirilmesi

Bu çalışma, vaka-kontrol çalışması şeklinde tasarlanmıştır. Vaka kontrol çalışmalarında, belirli özellikleri bulunan hastalıklı bireyler (vaka grubu) aynı özellikleri bulunan hasta olmayan bireylerle (kontrol grubu) karşılaştırılmakta ve incelenen özelliklerin vaka veya kontrol grubundaki sıklığı ve dağılımı incelenmektedir. Bu çalışma tasarımı ile hastalığın riskini hangi faktörlerin etkilediği değerlendirilmekte ve sonuçtan yola çıkarak hastalığın nedeni üzerinde etkili olabilecek faktörlerin araştırılması amaçlanmaktadır (Dawson ve Trapp 2004; Beaglehole ve ark. 1993; Cao ve ark. 2016). Ayrıca vaka kontrol çalışmalarının, örneklem boyutunun artırılmasıyla çalışma gücünün de artırılabilmesi, daha düşük maliyet gerektirmesi ve çalışmanın kısa sürede tamamlanabilmesi gibi avantajları bulunmaktadır (Benson ve Hartz 2000).

Vaka kontrol çalışmalarında yaş ve cinsiyet gibi faktörlerin eşleşmesi yaygın olarak kullanılmaktadır (Rothman ve ark. 2008). Böylelikle, çalışmanın uygunluğunun sağlanmasında analizde eşleşmesi istenilen faktörlerin (örn, yaş ve cinsiyet) belirli koşullar altında (örneğin, vaka ile aynı gün hastaneye kabul edilen bir bireyin kontrol olarak seçilmesi) olması ile hassasiyetin artırılarak çalışılması verimliliğinin artırılması daha da kolaylaştırılabilir. Aynı şekilde benzer sayıda vaka ve kontrol grubu oluşturularak da verimlilik artışı sağlanabilmektedir (Pearce 2016). Bu tez çalışmasında karıştırıcı faktörlerin azaltılması ve çalışma hassasiyetinin sağlanabilmesi amacıyla, vaka ve kontrol grubundaki bireylerin aynı cinsiyet ve yaş grubunda olmaları şartı konulmuştur. Bu kapsamda bütün katılımcılar erkek ve 36-60 ay grubunda olacak şekilde çalışma tasarlanmıştır.

Çalışma grubunun oluşturulmasında, belirlenen bir zaman aralığında herhangi bir sağlık kurumuna başvuran ve hastalık tanısı konmuş bireyler veya tanımlanmış genel bir toplumdaki tüm hasta bireyler değerlendirilebilmektedir. Birinci yöntem daha ucuz bir vaka seçim yolu olarak bildirilmiş ve çalışmalarda daha yaygın olarak kullanılmıştır (Lui 2004). Bu tez çalışmasında vaka grubu, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı kliniğine başvuran, OSB tanısı konmuş çocuklardan seçilmiştir.

Kontrol grubunu oluşturan bireylerin, aynı hastaneye başka nedenlerle başvuran bireyler arasından, vaka grubundaki bireylerin akrabaları, arkadaşları gibi sosyal çevresi arasından veya genel toplumdan seçilebileceği bildirilmiştir. Sosyoekonomik seviyenin eşitlenebilmesi amacıyla kontrol grubunun aynı hastaneden veya hasta grubunun sosyal çevresinden seçilmesinin uygun olacağı belirtilmiştir (Lui 2004). Bu tez çalışmasında kontrol grubu, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı kliniğine başvuran ve sistemik bir rahatsızlığı bulunmayan çocuklardan oluşturulmuştur.

Dünya Sağlık Örgütü indeks sistemi (WHO, 1987) diş çürüğünün epidemiyolojik değerlendirilmesine yönelik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu sistemde süt ve sürekli dişler dmft, dfs, DMFT, DMFS veri indekslerine göre değerlendirilmektedir. Bu çalışmada, OSB tanılı ve kontrol grubu çocukların ağız diş sağlığı WHO kriterleri göz önüne alınarak incelenmiş ve süt dişleri dmft indekslerine göre değerlendirilerek kaydedilmiştir.

Ağız hijyeninin incelenmesine yönelik çalışmalarda farklı indeks sistemlerinin kullanıldığı görülmektedir. Greene ve Vermillion tarafından geliştirilen Basitleştirilmiş Ağız Hijyen İndeksi (1964) (G&V OHI-S plak indeksi), bireysel ağız hijyenini niceliksel olarak değerlendiren bir yöntemdir. Süt dişlenme dönemi için, 55 ve 65 numaralı dişlerin bukkal, 51 ve 71 numaralı dişlerin labial, 75 ve 85 numaralı dişlerin lingual yüzeylerinin göz ve normal diş hekimliği sondası kullanılarak değerlendirildiği bu yöntem, ağız diş sağlığının incelenmesine yönelik toplum epidemiyoloji çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. OHI-S plak indeksinin, Geleneksel Ağız Hijyen İndeksi (OHI)'ne kıyasla daha kısa sürede eşit hassasiyet sağlaması aynı zamanda basit ve hassas bir yöntem olarak da değerlendirilmesi, özellikle çocuk ve engelli bireyler gibi hassas popülasyonlar ile yürütülen çalışmalarda tercih edilmesini sağlamıştır (Welbury ve ark. 2003; Rao ve ark. 2005; Shabani ve ark. 2015; Folayan ve ark. 2017; Mashima ve ark. 2017; Rajonson ve ark. 2017).

Modifiye Dişeti İndeksi, dişeti sağlığının ve enflamasyonun değerlendirilmesinde invaziv olmayan ve etkili bir yöntem olarak görülmektedir. Bu yöntemde, periodontal sondalama işlemi uygulanmamakta ve her bir diş için iki papilla ve iki dişeti kenarının değerlendirilmesiyle elde edilen değerler toplanmakta ve ortalaması alınmaktadır (Lobene ve ark. 1986).

Bu tez çalışmasında, OSB'li ve kontrol grubu çocukların ağız hijyeninin değerlendirilmesinde Basitleştirilmiş Ağız Hijyen İndeksi (OHI-S); dişeti sağlığının ve enflamasyon varlığının değerlendirilmesinde non-invaziv bir yöntem olması ve çok fazla kooperasyon gerektirmemesi nedeniyle Modifiye Dişeti İndeksi tercih edilmiştir.

Doğum sırasında anneden bebeğe mikroorganizma geçisi olduğu ve bu nedenle de doğum şeklinin (vajinal ve sezaryen), bebeğin maruz kaldığı mikroorganizmaların türü açısından belirleyici olduğu bildirilmiştir (Dominguez-Bello ve ark. 2010). Yine doğum şeklinin ayrıca sonrasında bebeğin yaşamında oral mikrobiyomunun çeşitliliğini etkilemekte olduğu, vajinal doğumlu çocukların doğumdan 3 ay sonra sezaryen ile doğan çocuklara göre ağız mikrobiyotasında daha fazla takson barındırdıkları bulunmuştur (Lif ve ark. 2011). Bu tez çalışmasında ağız mikrobiyotasını etkileyebilecek karıştırıcı faktörlerin azaltılması amacıyla bütün katılımcılar sezaryen ile doğan çocuklar arasından seçilmiştir.

Antibiyotik kullanımı ile bağırsak mikrobiyomunda değişikliklerin gözlemlendiği ve genellikle daha az çeşitliliğe sebep olduğu bildirilmiştir (Clemente ve ark. 2012; Modi ve ark. 2014). Çocuklarda erken antibiyotik uygulamalarının bir sonucu olarak bağırsak mikrobiyomunda uzun vadeli değişiklikler saptandığı bildirilmiş, alerji ve obezite gibi sistemik hastalıkların gelişiminde olası etkileri olduğu öne sürülmüştür (Reynolds ve ark. 2017; Ajslev ve ark. 2011). Tükürük mikrobiyomunun antibiyotiklere maruz kaldığında fekal mikrobiyal topluluklara oranla daha az etkilendiği ve daha dirençli olduğu bildirilmiştir (Zaura ve ark. 2015). Bu tez çalışmasında, antibiyotik kullanımı ile ağız mikrobiyotasında oluşabilecek olası değişiklikleri elimine edebilmek amacıyla 3 ay antibiyotik kullanmamış çocuklardan tükürük örneklerinin alınması tercih edilmiştir.

Dişlerin sürmesi çocuğun ağızında önemli bir ekolojik olay yaşatmakta olup mikrobiyal kolonizasyon için yeni yüzeyler sağlamaktadır (Sampaio-Maia ve Monteiro-Silva 2014). Çocuklarda ağız mikrobiyomu yaşla birlikte daha karmaşık hale gelirken (Crielaard ve ark. 2011) süt dişlenme döneminden kalıcı dişlenmeye geçiş ile birlikte ağız mikrobiyota habitatı önemli ölçüde değişmektedir (Xu ve ark. 2015). Bu nedenle de bu tez çalışmasında çalışma ve kontrol grubu süt diş dizisine sahip çocuklar arasından seçilmiştir.

Ağızda bulunan mikrobiyal toplulukların bir temsilcisi olarak tükürük, ağız mikrobiyotasının epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesinde ve sistemik hastalıklarla

ilişkisinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Ling ve ark. 2013; Simón-Soro ve ark. 2013). Tükürük ile direkt temas halindeki çeşitli oral yüzeylerden dökülen bakterilerden oluşan tükürük mikrobiyotasının 1ml'sinin 100 milyondan fazla bakteri içerebildiği bildirilmektedir (Curtis ve ark. 2011). Özellikle dilin dorsal ve yan yüzeyleri, boğaz ve tonsillalar ile benzer özelliklere sahip olan tükürük mikrobiyotasının, bilinen periodontal patojenlerden birçoğunun supra ve subgingival diş yüzeylerindeki benzer DNA yüzdesine sahip olduğu belirtilmiştir (Kulekci ve ark. 2008; Segata ve ark. 2012).

Bağırsak mikrobiyotası ile karşılaştırıldığında ağız boşluğu, hem yumuşak (mukoza) hem de sert (dişler) dokuların varlığı nedeniyle anatomik olarak benzersiz ve karmaşık bir yaşam alanı sunmaktadır. Tükürük mikrobiyotası doğrudan yutulan ve solunan maddelere maruz kalırken, dil dorsumu dinamik bakteri florası için yumuşak doku ortamı sağlamakta ve tükürükte yıkanan supragingival plak ise bakteri florasının geçici rezervuarı için sert doku ortamı sağlamaktadır. Bu üç ağız bölgesindeki spesifik mikro ortamlar, bakterilerin kolonileşmesinde ortam tercihlerine yol açabilmektedir (Nasidze ve ark. 2009; Segata ve ark. 2012).

Ağız içi örnekleri, özellikle de tükürük örneklerini, toplamak dışkı ve bağırsak mukozası biyopsilerine göre daha kolaydır. Bu nedenle OSB'li bireyler gibi örnek toplamanın zor olabildiği hasta gruplarında, ağız içinden örnek almanın klinik tanı ve araştırmalar açısından faydalı olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanında tükürük, invaziv olmaması, hızlı ve emniyetli toplanabilmesi, depolanabilmesi, kolay taşınabilir olması ve ucuz olması gibi avantajları sayesinde ağız sağlığı ve hastalığı ile ilgili biyolojik belirteçlerin araştırıldığı çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Giannobile ve ark. 2011; Belstrøm ve ark. 2016). OSB'li çocukların ağız mikrobiyotasındaki değişikliklerin saptanmasında ve ağız mikrobiyotası ve OSB arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılmasında tükürüğün doğru bir ajan olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanında diş fırçasından elde edilen örneklerde biyopsi örneklerine göre daha fazla miktarda çeşitlilik saptandığı bildirilirken, ağız boşluğundan örnek toplamak için hangi yöntemin ve tekniğin uygun olduğu hala belirsizdir (Dong ve ark. 2018).

Bu tez çalışmasında, OSB'li ve kontrol grubunda ağız mikrobiyotasının temsilcisi olarak uygulama kolaylığı ve çocukların ağız mikrobiyomunu başarıyla yansıtabilmesi açısından tükürük örnekleri toplanmıştır.

Tükürük örneklerinin toplanmasında farklı yöntemlerin uygulandığı çalışmalar bulunmaktadır. Qiao ve ark. OSB'li ve sağlıklı çocukların ağız mikrobiyotalarındaki farklılıkları araştırdıkları çalışmasında, katılımcıların 1.5 ml steril Eppendorf tüplerine (Axygen, CA, ABD) tükürmesini sağlayarak yaklaşık 1 ml uyarılmamış tükürük elde edildiği bildirilmiştir. Yine bu çalışmada, katılımcılara 2 saat önce yeme-içme ve ağız hijyen uygulamaları yapmamaları talimatı verildiği de belirtilmiştir (Qiao ve ark. 2018).

Hicks ve ark. OSB'li (n=180), nonotistik gelişim geriliği gösteren (n=60) ve normal gelişim gösteren (n=106) çocukların tükürük mikrobiyomlarını incelediği çalışmasında, en son yeme-içmeden en az 15 dk geçmiş olacak şekilde ve ağzın su ile çalkalanmasının ardından, bir emici swab ile sublingual ve parotis bölgelerinden tükürük elde edildiğini bildirmiştir (Hicks ve ark.2018).

Benzer şekilde Hicks ve ark. OSB'li, non-otistik gelişim geriliği gösteren ve normal gelişim gösteren çocukların ağız mikrobiyom analizlerini, hem dil tabanı hem de diş etleri ve bukkal mukoza arasında (parotis kanalına yakın) iki taraflı olarak, mümkün olduğunca dişlerle temastan kaçınmaya özen gösterilerek, yüksek oranda emici swabın 5-10 saniye boyunca emdirilmesiyle elde edilen tükürük üzerinde gerçekleştirdiklerini belirtmiştir (Hicks ve ark. 2020).

Bu tez çalışmasında, ağız mikrobiyotasını etkileyebilecek potansiyel çevresel faktörleri elimine edebilmek amacıyla tüm katılımcılara tükürük örnekleri alınmadan en az 2 saat önce yeme içme yapmamaları ve oral hijyen uygulamalarından kaçınmaları talimatı verilmiş olup tüm örnekler aynı zaman aralığında alınmıştır. Ayrıca yeni alınmış örneklerin bir aya kadar oda sıcaklığında depolanabilmesi ve stabilize olabilmesi gibi avantajlarından dolayı tükürük toplama kitleri tercih edilmiştir. Çalışma kapsamında, üretici firmanın talimatları doğrultusunda, yüksek oranda emici kitin çocukların dil altında 5-10 saniye kadar bekletilmesi yoluyla uyarılmamış tükürük örnekleri elde edilmiştir.

5.2. Bulguların Değerlendirilmesi

5.2.1. OSB'li ve Kontrol Grubunun Klinik Özelliklerin Değerlendirilmesi

OSB'li çocukların ağız diş sağlığı durumlarını değerlendiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Agbor ve ark. 2019; Jaber 2011; Desai ve ark. 2001; Morales-Chávez 2017; Du ve ark. 2015; Kuter ve Guler 2019). Yemek seçmeleri ve motor koordinasyonlarında görülebilen eksikliklerden ötürü diş fırçalama gibi ağız bakım işlemlerinin doğru biçimde yapılamaması nedeniyle OSB'li çocuklar çürük açısından yüksek riskli grupta değerlendirilmektedir (Smith ve ark. 2005). 2011 yılında yapılan bir çalışmada, OSB'li çocukların ve kontrol grubunun ortalama dmft değerinin sırasıyla $0,8 \pm 0,2$ ve $0,30 \pm 0,3$ olarak bulunduğu ve iki grup arasında dmft değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandığı ($p < 0,05$) bildirilmiştir (Jaber 2011).

Agbor ve ark. yaptıkları bir çalışmada, 3-14 yaş arasında bulunan 96 OSB tanılı çocuğun ağız diş sağlığı durumlarını incelemiş ve bu çocukların %66,13'ünde çürük bulunduğunu ve ortalama dmft/DMFT toplam skorunun 2,76 olarak saptandığını bildirmişlerdir (Agbor ve ark. 2019). Benzer şekilde, Morales-Chávez de OSB'li çocuklarda, süt dişlerdeki çürük sıklığının kalıcı dişlerdeki çürük sıklığından daha yüksek olduğunu bildirmiş ayrıca genel olarak bu çocukların kötü ağız hijyenine sahip olduklarını vurgulamıştır (Morales-Chávez 2017).

Sağlıklı popülasyonla benzer ya da daha az sayıda çürük prevelansı görüldüğünü bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Du ve ark. 2015; Kuter ve Guler 2019). Du ve ark. OSB'li olan ve olmayan okul öncesi çocukların ağız sağlığı durumlarını karşılaştırmış, OSB'li çocukların ortalama plak, dişeti ve dmfs değerini sırasıyla 0,45, 0,37, 3,73 olarak, kontrol grubunun ise ortalama plak, dişeti ve dmfs değerini sırasıyla 0,60, 0,51 ve 5,41 olarak saptandığını bildirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda OSB'li okul öncesi çocukların OSB'li olmayan yaşlılarına göre daha az diş çürüğü insidansına sahip olmakla birlikte daha iyi bir diş eti sağlığı sergilediklerini bildirmiştir (Du ve ark. 2015). Yine Kuter ve Guler çalışmalarında OSB'li gruptaki DMFT/dmft indeks skorlarının ve çürük prevelans değerlerinin OSB'li olmayan kontrol grubundan daha düşük olarak saptandığını bildirmiştir (Kuter ve Guler 2019).

Bu çalışmada, ortalama dft indeksi, plak indeksi ve modifiye dişeti indeks değerleri OSB'li grupta sırasıyla $4,11 \pm 3,72$, $1,48 \pm 0,71$ ve $1,86 \pm 0,69$ olarak; kontrol

grubunda ise $3,33 \pm 4,97$, $1,22 \pm 0,44$ ve $1,39 \pm 0,48$ olarak belirlenmiş ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Önol ve ark. OSB tanılı çocuklarda günde 2 kez diş fırçalama sıklığını %14,3 olarak bildirmiştir (Önol ve Kırzioğlu 2018). El motor becerilerinin yetersizliği nedeniyle OSB'li çocukların dişlerini fırçalamada zorlandıkları ebeveyn ve bakıcılar tarafından belirtilmiştir (Ferrando-Lucas ve ark. 2002). Bu çocukların iletişim kurmadaki yeteneklerinin sınırlı olması, kısa süreli konsantrasyonları ve bilgiyi anlamada güçlük yaşamaları ağız hijyeni konusunda eğitilmelerini ve ağız hijyenlerinin sürekliliğini zorlaştırmaktadır (Doichinova ve ark. 2019). Bununla birlikte, OSB'li çocukların günde iki kez diş fırçalama oranlarını %54,2 olarak bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Mansoor ve ark. 2018).

Ülkemizdeki OSB'li çocuklarda çürük görülme sıklığını değerlendiren bir çalışmada ise, düzenli olarak her gün diş fırçalanma oranı %22,6 olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada OSB'li çocukların daimî dişlerinde çürük görülme sıklığı OSB'li olmayan grup ile karşılaştırıldığında daha düşük olarak bulunduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar bu bulguları, OSB'li çocukların dişlerinin aileleri tarafından fırçalanmasına ve sınırlı şeker tüketilmesine bağlamıştır (Namal ve ark. 2007).

Bu çalışmada OSB bulunan çocukların %66,7 'sinin dişlerinin hiç fırçalanmadığı, %33,3'ünün sadece haftada bir kez dişlerinin fırçalandığı aileleri tarafından bildirilmiştir. Kontrol grubundaki çocukların ise, %44,4'ünün dişlerinin günde iki kez, %44,4'ünün günde 1 kez, %11,2'sinin de haftada bir kez dişlerinin fırçalandığı aileleri tarafından bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında, OSB bulunan ve bulunmayan kontrol grupları arasında ortalama dft, plak indeksi ve modifiye diş eti indeks değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p=0,712$, $p=0,373$ ve $p=0,116$; $p>0,05$). Ancak, OSB'li grubun dft, plak ve modifiye dişeti indeks değerlerinin kontrol grubundaki çocuklardan yüksek olduğu belirlenmiştir. İstatistik olarak anlamlı olmayan bu farklılıkların OSB bulunan çocukların diş fırçalama alışkanlıklarında yetersizlik ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir.

5.2.2. OSB'li ve Kontrol Grubunun Ağız Mikrobiyotalarının Değerlendirilmesi

İnsan vücudundaki mikrobiyal topluluklar oldukça karmaşık bir ekosistem sunmakta olup, ağız boşluğunun ve özellikle de yemek borusunun farklı bölgelerindeki

mikrobiyal bileşimin herhangi bir benzerliğe sahip olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır (Dong ve ark. 2018). Mikrobiyal çeşitliliğin dengesi, mukozanın bariyer görevi görmesinde ve hastalıklara yol açan patojenlerin istilasındaki bağışıklık tepkisinde önemli bir role sahiptir (Frank ve ark. 2011; Tlaskalova-Hogenova ve ark. 2011; Segata ve ark. 2012).

Günde yaklaşık 10^{11} bakteri hücresinin ağızdan mideye geçtiği düşünülmekte olup ağız, farenks, yemek borusu ve bağırsak bölümlerinin mikrobiyal kompozisyonunun örtüştüğü bildirilmektedir (Segata ve ark. 2012; Norder Grusell ve ark. 2013; Gall ve ark. 2015). Ağız boşluğunda ve yemek borusunda 29 filuma ait yüzlerce cinsten oluşan çok çeşitli bakteriyel flora bulunmaktadır. Bu iki bölgede en bol miktarda bulunan filumlar Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria ve TM7 olarak bildirilmiştir (Dong ve ark. 2018). Ağız boşluğunda en çok bolluk gösteren cinsler; *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Gemella*, *Rothia*, *Granulicatella*, *Fusobacterium*, *Actinomyces* ve *Veillonella*'dır (Chen ve Jiang 2014). Ağız boşluğunda tükürük, bukkal mukoza, keratinize diş eti, damak, bademcikler, boğaz ve dil yumuşak dokuları, subgingival ve supragingival diş plağı incelendiğinde çoğu bölgeye *Streptococcus*'ların hâkim olduğu bildirilirken bukkal mukoza da *Haemophilus*'un, supragingival plakta *Actinomyces*'in, subgingival plakta *Prevotella*'nın bolluğunun yüksek bulunduğu belirtilmiştir (Ahn ve ark. 2011).

Orofarenks bölgesinin tıpkı bağırsak gibi OSB'li bireylerde önemli bir patolojik bölge olduğu düşünülmektedir. OSB tanılı çocuklarda motor (konuşma) ve duyuşal (tad) fonksiyon bozuklukları saptandığı bildirilmiştir (Cermak ve ark. 2010; Tierney ve ark. 2015). Bunlara ek olarak, orofarenks GI yola tek giriş görevi görmekte ve konak-çevre etkileşiminde önemli olan bir bölgeyi temsil etmektedir. Orofarenks bölgesinin beş kraniyal sinir (V, VII, IX, X, and XII) tarafından duyuşal ve motor innervasyonu, orafarenks ve SSS arasında önemli bir bağlantı kurulmasını ve bağırsak beyin ekseninde olası bir yol bulunmasını sağlamaktadır (Bercik ve ark. 2011).

Bu kapsamda özellikle GI rahatsızlığı bulunan OSB tanılı çocukların mikrobiyomlarında belirli profil farklılıklarının oluşması beklenirken bu değişikliklerin birçoğunun belirli otistik özelliklerle de ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu ilişkiye örnek olarak da *Micrococcus luteus* seviyesinin hem GI rahatsızlığı bulunan OSB'li çocuklarda hem de adaptif/uyumsal iletişim kurma puanı ikiden fazla olan OSB'li

çocuklarda azalmış olması gösterilmektedir. Benzer şekilde *Riemerella anatipestifer* ve *Actinobacteria* seviyelerinin, sırasıyla sınırlı/tekrarlayıcı davranış ve sosyal duygulanım ile korelasyon gösterdiği ve GI rahatsızlığı olan çocuklarda değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Hicks ve ark. 2018).

OSB'li bireylerde bağırsak mikrobiyotası üzerine yapılan çalışmalarda *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* ve *Actinobacteria* gibi filotiplerin göreceli bolluklarında değişiklikler bulunduğu bildirilmiştir (Kang ve ark. 2013; Hsiao ve ark. 2013). Bu çalışmalarla tutarlı olarak Qiao ve ark. da OSB'li çocukların hem tükürük hem de dental plak örneklerinde *Proteobacteria* filumunu daha yüksek oranda bulunduğunu, tükürükte *Actinobacteria* ve dental plakta *Bacteroidetes* filumlarının daha düşük oranda bulunduğunu bildirmiştir (Qiao ve ark. 2018).

Bu tez çalışmasında da OSB'li ve kontrol gruplarının tükürük mikrobiyotalarında filum ve sınıf düzeyinde bakteri bollukları incelendiğinde belirli farklılıklar saptanmıştır. Filum düzeyinde *Fusobacteria*'nın bolluk oranı OSB grubunda kontrol grubuna oranla daha az gözlenmiştir ($p=0,005$). Sınıf düzeyinde ise *Fusobacteriia*'nın bolluk oranı OSB grubunda daha az bulunmuş olup *Flavobacteriia*'nın bolluk oranı ise kontrol grubunda daha az ($p=0,001$) olarak belirlenmiştir.

Fusobacteria anaerobik gram-negatif bakterilerden olup, insan vücudunda ciddi tutulum gösteren hastalıklarda çok nadir etken bakteri olarak gösterilmiş (Afra ve ark. 2013), kolorektal kanser ile birçok kez ilişkilendirildikten sonra akademik tartışmaların merkezi haline gelmiştir (Kelly ve ark. 2018).

Flavobacteriia, *Bacteroidetes* filumuna ait gram negatif, çubuk şeklinde hareketli bir bakteri sınıfıdır. Aerobik ve fakültatif anaerobik üyeleri kitin ve selülozun da dahil olduğu karmaşık, yüksek moleküler ağırlıklı organik molekülleri parçalama yeteneğine sahiptir. *Flavobacteriia* sınıfının üyeleri yüksek moleküler ağırlıklı parçacıkların bulunduğu deniz ortamlarında yaygın olarak gözlenmektedir (Reyes 2018).

OSB'nin genellikle beslenme, genetik ve çevresel faktörlerden köken aldığı ifade edilmektedir. Özellikle de gluten ve kazeinin eskik sindirimi, sızıntılı bağırsak sendromu ve mide asidinin düşük salgılanması OSB ile ilişkilendirilmiş durumlardır. OSB'de gluten intoleransını düzenleyebilmek için diyet alışkanlıklarında, *Flavobacterium*'un da dahil olduğu cinsler tarafından üretilen ve gluteni tamamen parçalayabilen glutenazların alımı gibi stratejilere başvurulmaktadır (Razafindralambo ve Razafindralambo 2019).

Qiao ve ark. OSB tanılı ve sağlıklı çocuklarda hem tükürük hem dental plakta bulunan mikrobiyal toplulukların yapı ve bileşimindeki değişimlerini araştırmak amacıyla elde ettikleri 111 örneği Illumina MiSeq teknolojisi ile sekanslama sonrası analiz etmişlerdir. Çalışmada %97 benzerlik düzeyinde 12 filum, 132 cins ve 308 türün temsil edildiği 405 OTU saptandığını bildirilmiştir. Baskın taksonların daha önce OSB olmayan popülasyonlar üzerinde yapılan çalışmalarda verilerle benzerlik taşıdığı çalışmalarında, bireyler arası yüksek değişkenliğe rağmen tüm gruplarda saptanan baskın filumların Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes ve Fusobacteria olduğu bildirilmiştir (Qiao ve ark. 2018).

Hicks ve ark. da benzer şekilde, OSB'li (n=180), non-otistik gelişim geriliği gösteren (n=60) ve normal gelişim gösteren (n=106) çocukların tükürük mikrobiyomlarını incelemiş, tüm gruplarda saptanan baskın filumların Firmicutes (okumaların %58'i), Proteobacteria (%16), Bacteroidetes (%11), V3 (%6), Actinobacteria (%4) ve Fusobacteria (%3) olarak sıralandığını bildirmişlerdir. Bunun yanında bu üç farklı grup arasında Planctomycetes, Cyanobacteria ve Calditrichaeota filumların göreceli bollukları arasında anlamlı bir farklılık saptandığını ve bu farklılıkların çoğunlukla OSB ve normal gelişim gösteren grup arasında olduğunu bildirmişlerdir. Yalnızca Planctomycetes'in OSB ile normal gelişim gösteren grup arasında ve OSB ile gelişim geriliği gösteren grup arasında anlamlı farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Hicks ve ark. 2018).

Bizim çalışmamızda da tüm gruplarda saptanan baskın filumlar daha önce yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir. OSB'li grupta baskın filumlar göreceli bolluk oranlarına göre; *Firmicutes* (%42), *Proteobacteria*(%23,9), *Actinobacteria* (%12,5), *Bacteroidetes*(%11,8) ve *Fusobacteria* (%9,8) şeklinde sıralanırken, kontrol grubunda *Firmicutes*(%35,7), *Proteobacteria* (25,9), *Fusobacteria* (%18), *Actinobacteria* (%12,8) ve *Bacteroidetes* (%7,5) şeklinde sıralanmaktadır.

OSB'li çocukların bağırsak mikrobiyotalarında kardeşlerine oranla *Prevotella*'nın bolluk oranında dramatik bir azalmanın gözlemlendiği bildirilmiştir (Finegold ve ark. 2010). Benzer şekilde Parkinson hastalarından ve tedavi edilmemiş Multiple Skleroz hastalarından alınan dışkı örneklerinde de *Prevotella*'nın düşük bollukta bulunduğu bildirilirken bu bakterinin SSS bozuklukları ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Scheperjans ve ark. 2015; Jangi ve ark. 2016). *Prevotella*, bağırsak ve

ağız boşluğu da dahil olmak üzere insan vücudunda birçok habitatta bulunan ortak bir mikroorganizmadır ve hem bağışıklık sistemi ile etkileşimde bulunmakta hem de sakkarit spektrumunun parçalanmasında anahtar rol oynamaktadır (Huttenhower ve ark. 2012; Wu ve ark.2011). Bunun yanında, OSB'li çocukların sakkarit metabolizmasında eksiklikler ve bozulmuş karbonhidrat sindirimine yönelik bulgular sunan çalışmalar da bulunmaktadır (Williams ve ark. 2011; Horvath ve ark.).

Qiao ve ark., OTU düzeyinde inceleme yapıldığında OSB ve kontrol grubu arasında bazı cinslerin bolluk açısından önemli farklılıklar gösterdiğini bildirmişlerdir. Ortalama göreceliği bolluğu %1'den büyük olan OTU'lar arasında OSB ile *Streptococcus* (dental plakta) ve *Haemophilus* (tükürükte) cinslerinin artan bolluk oranları ilişkilendirilirken, *Prevotella* (dental plakta), *Selenomonas* (dental plakta), *Actinomyces* (tükürükte), *Porphyromonas* (tükürükte) ve *Fusobacterium* (dental plakta ve tükürükte)'un azalan bolluk oranları ilişkilendirilmiş ve karakteristik disbiyotik biz imzayı oluşturduğu bildirilmiştir. Yine bu çalışmada, *Rothia* cinsi OSB'li çocuklarda kontrol grubuna oranla dental plak örneklerinde önemli ölçüde daha yüksek bir bolluk oranı gösterirken, tükürük örneklerinde daha düşük bir bolluk oranı gösterdiği bildirilmiştir. Bu sonuçla birlikte, *Rothia* cinsinin OSB'li çocuklarda habitata özgü roller oyanayabileceği görüşü bildirilmiştir. Çalışma sonucunda OSB'li hastaların oral mikrobiyota kompozisyonu ve taksonomisinde değişiklikler saptandığı belirtilmiştir (Qiao ve ark. 2018). Ayrıca OSB ile bağırsak mikrobiyotası değişiklikleri arasında güçlü korelasyon ilişkisi bulunduğunu bildiren daha önceki çalışmalarla da tutarlı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Hsiao ve ark. 2013; Finegold ve ark. 2010; Son ve ark. 2015; Williams ve ark. 2012; Adams ve ark. 2011; Kang ve ark. 2013; Qiao ve ark. 2018).

Kong ve ark. yaptıkları çalışmada, ağız mikrobiyotasında belirlenen cinslerin göreceli bolluk miktarları incelendiğinde, OSB ve kontrol gruplarının en bol miktarda bulunan 10 cinsten 9'unu paylaştığını gözlemlemiştir; *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Rothia*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Veillonella* ve *Neisseriaceae* ailesinden bilinmeyen bir cins. (Kong ve ark. 2019)

Hicks ve ark. yaptıkları çalışmalarında, gelişim grupları arasında toplam 12 taksonun farklılık gösterdiğini bildirirken, GI rahatsızlığı olan ve olmayan OSB'li hasta grupları arasında da ayırt edici 28 taksonun tanımlandığını bildirmiştir. OSB li grubu normal gelişim gösteren gruptan ayıran altı mikrobiyal takson belirlenmiştir. OSB'li

çocuklarda iki takson (*Limnohabitans* sp. 63ED37-2, Planctomycetales) yüksek bulunurken, dört taksonun (*Ramlibacter tataouinensis* TTB310, *Mucilaginibacter* sp. PAMC 26640, *Bacteroides vulgatus*, *Gemmata* sp. SH-PL17) daha az gözleendiği belirtilmiştir. OSB'li grubu gelişim geriliği gösteren gruptan %76,5 doğruluk ile ayıran üç takson saptanmıştır. OSB'li çocuklarda iki taksonun (*Brucella*, *Enterococcus faecalis* OG1RF) yükseldiği gözlenirken, bir taksonun (*Flavobacterium* sp. PK15) azaldığı gözlenmiştir.

Bizim çalışmamızda OSB'li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotalarında göreceli bolluğu >%1 olan OTU'ların dağılımı incelendiğinde, *Granulicatella elegans* (p=0,01), *Streptococcus anginosus* SK52 = DSM 2563 (p=0,01), *Streptococcus cristatus* AS 1.389 (p=0,02), *Streptococcus mitis* (p=0,02), *Streptococcus oralis subsp. dentisani* (p=0,04), *Streptococcus pneumoniae* (p=0,04), Micrococcaceae ailesinden isimlendirilemeyen bir cins (p=0,02), *Neisseria zalophi* (p=0,04), Micrococcales (takım) (p=0,03) ve Bacillales (takım) (p=0,01) OSB'li grupta anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (p<0,05).

Bu tez çalışmasında, daha önceki çalışmalarda OSB'li çocukların bağırsak mikrobiyotalarında saptanan *Clostridium*, *Sutterella* ve *Desulfovibrio* gibi patojen bakteriler (Kang ve ark. 2013; Finegold ve ark. 2010; Finegold ve ark. 2011; Parracho ve ark. 2005) gruplar arasında farklılık göstermemiştir.

Qiao ve ark. kontrol grubu ve OSB'li grubun ağız mikrobiyotasındaki OTU'lar ile otizm şiddetinin belirlenmesinde kullanılan ABC skorları arasında bir ilişki bulunduğunu bildirmişlerdir. Özellikle *Haemophilus* sp. ve *Rothia aeria* gibi OSB'li örneklerde daha yüksek miktarda gözlenen filotiplerin, hem tükürük hem de dental plak örneklerinde ABC skoru ile pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (Qiao ve ark. 2018).

Bu tez çalışmasında, OSB şiddetini ifade eden ÇODÖ puanları ile OTU'lar arasında yapılan anlamlı bir korelasyon ilişkisi saptanmamıştır (p>0,05).

Çalışmamızın bulguları ile benzer olarak Qiao ve ark. tükürük örneklerinde hiçbir filotip ile DMFT/S arasında yüksek bir korelasyon gözlenmediğini bildirmiştir. Bunun yanında, dental plak örneklerinde saptanan *Streptococcus*, *Actinomyces* ve *Capnocytophaga*'nın da dahil olduğu altı filotipin DMFT/S ile pozitif korelasyon ilişkisi gösterdiği bildirilmiştir (Qiao ve ark. 2018). Bu sonuçlar doğrultusunda, diş

çürüklerinin tükürük mikrobiyotasından çok dental plak mikrobiyotası ile ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir. OSB'li bireylerde gözlenen bakteriyel modellerin bu hastalıkta mikroorganizmaların olası bir role sahip olabileceği düşüncesini ortaya çıkarırken, nedensel olarak da bir ilişki kurulamadığı bildirilmiştir. OSB hastalarının ağız diş hijyeni uygulamalarına karşı isteksizliğinin oral disbiyozis için bir mekanizma oluşmasında etkili olabileceği vurgulanmıştır (Olsen ve Hicks 2019).

Bu tez çalışmasında OSB'li grupta gingival indeks ile sadece *Granulicatella* cinsi arasında negatif yönlü orta düzey bir ilişki saptanmıştır ($r=-0,675$; $p=0,046$).

Granulicatella cinsi ağız boşluğu, ürogenital ve bağırsak yolundaki normal mikrobiyotanın bir üyesi olup, periodontitis, çürük ve endodontik enfeksiyonlarda rol oynayabileceği bildirilmiştir. *Granulicatella adiacens* türünün ağız boşluğunun normal florasında ve kronik periodontitis durumlarında bulunabildiği ayrıca bu bakterinin derin periodontal ceplerde de saptandığı bildirilmiştir (Achmad ve ark. 2020).

OSB'li çocukların gastrointestinal florasını inceleyen bir çalışmada, otizmlili çocuklarda asetat, proprionat ve valeratın da dahil olduğu kısa zincirli yağ asitlerinin seviyesinin kontrol grubuna göre daha düşük gözlemlendiği ayrıca otizmlili çocuklarda daha yüksek düzeylerde *Lactobacillus* türlerinin saptandığı bildirilmiştir (Adams ve ark. 2011).

Bu tez çalışmasında, otizmlili çocuklarda OTU'lar ile klinik veriler değerlendirildiğinde Lactobacillales'in (takım) vücut kitle indeksi ile pozitif kolerasyon ilişkisi gösterdiği saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen çocukların GI rahatsızlıklarının bulunmaması ile GI bozuklukların mikrobiyota üzerine olası etkileri dışlanmaya çalışılmıştır. OSB'li çocuklar karbohidrat ağırlıklı beslenme alışkanlıklarının vücut kitle indeksinde artış olarak yansıdığını ve bunun sonucunda da ağızda Lactobacillale takımındaki bakterilerin yüksek bulunduğunu düşünmekteyiz. Lactobacillales takımı laktik asit bakterilerinin içerdiği *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium* ve *Streptococcus* gibi cinsleri içermektedir. Gram pozitif ve spor oluşturmayan Laktobasiller çubuk ya da kokkobasil şeklinde bulunur. Karbonhidratlar, aminoasitler, peptitler, yağ asidi esterleri ve vitaminlerin dahil olduğu kompleks beslenme gereksinimleri vardır. Genellikle karbonhidrat substratlarının zengin bir şekilde elde edilebildiği ortamlarda bulunmaktadır. Bunun yanında, artan

Lactobacillus seviyesi düşük pH (pH 4.5-5.0) ile ilişkili bulunmuştur (Kianoush ve ark. 2014).

OSB'li grupta Lactobacillales takımının yanısıra Firmicutes filumu, Bacilli sınıfı ile vücut kitle indeksi arasında da pozitif yönlü güçlü bir ilişki (r değerleri sırasıyla 0,695, 0,695 ve 0,678) saptanmıştır. Ağız boşluğunda Firmicutes'in bolluğu polisakkaritlerin hidrolizinin başlamasını göstermektedir (Anderson ve ark. 2018).

Mervish ve ark. 7-15 yaş arasındaki kızların tükürük mikrobiyotasını incelediği çalışmada, kilosu daha fazla olan kızlarda Lactobacillales takımının daha fazla gözlendiğini bildirmiştir. Ağız mikrobiyotasındaki değişikliklerin, bakterilerin aracılık ettiği enfalomatuar süreçlere bağlı olarak obezite ile ilişkili olabileceği öne sürülmektedir. Özellikle ağızda bulunan spesifik bakteri suşlarının obezite ve periodontal hastalıklar ile ilişkilendirildiği belirtilmiştir. Çocuklarda ağız mikrobiyomu hakkında bilinenlerin oldukça az olduğu göz önüne alındığında, ağız sağlığı ve hastalıklarının çocukların büyüme ve gelişimine özellikle de obezite üzerine olan etkilerinin anlaşılabilmesinin oldukça önemli olduğu vurgulanmıştır. Çalışma sonucunda, ağız mikrobiyotasının hastalık durumu ile değişim mekanizmalarının anlaşılmasında özellikle cins düzeyindeki taksonomik sınıflandırmanın önemi ön planı çıkarılmış ve tükürük örnekleri kullanılarak ağız mikrobiyotasındaki bu değişikliklerin saptanabileceği belirtilmiştir (Mervish ve ark. 2019)

Obez çocukların bağırsak mikrobiyotasında daha yüksek konsantrasyon seviyelerinde Lactobacillus türlerinin gözlendiği bildirilirken, bu çocuklarda Firmicutes/Bacteroidetes oranının da yüksek bulunduğu bildirilmiştir (Bervoets ve ark. 2013). Bağırsak mikrobiyotasında belirlenen filum düzeyindeki Firmicutes/Bacteroidetes oranı ile vücut kitle indeksi arasındaki ilişkili çelişkili bulunmaktadır (Harley ve Karp 2012; Osterberg 2015).

Kong ve ark. yaptıkları çalışmada, daha önceki çalışmalarla tutarlı olarak (Williams ve ark. 2011; Tomova ve ark. 2015), OSB hastalarının bağırsak mikrobiyotasında enfalomatuar bağırsak hastalığı gibi durumlarla ilişkilendirilen Firmicutes/ Bacteroidetes oranının (Frank ve ark. 2007; Turnbaugh 2009) önemli ölçüde yüksek bulunduğunu bildirmiştir (Kong ve ark. 2019). Hicks ve ark. OSB'li çocukların ağız mikrobiyotalarında normal gelişim gösteren çocuklara oranla sayısal olarak daha düşük Bacteroidetes oranı gözlendiğini belirtirken OSB'li çocuklarda

Firmicutes/Bacteroides oranında herhangi bir değişiklik olmadığını bildirmiştir (Hicks ve ark. 2018).

Bu tez çalışmasında önceki çalışmalardan farklı olarak, filum düzeyinde Firmicutes/Bacteroidetes oranı OSB'li grupta 13,56 olarak bulunurken, kontrol grubunda 19,56 olarak daha yüksek bulunmuştur.

Hicks ve ark. OSB'li, gelişim geriliği gösteren ve normal gelişim gösteren üç grup arasında enerji metabolizmasının ve lizin bozunma yollarının mikrobiyal transkripsiyonunda önemli farklılıklar saptandığını bildirmiştir. Çalışma sonunda elde edilen veriler doğrultusunda, OSB'deki GI mikrobiyal bozulmalarının muhtemelen orofarinkse kadar uzanabileceğine işaret edilmiştir. Bakterilerin orofarinksten alt GI yola tek yönlü geçisi göz önüne alındığında, birçok çalışmada da bildirilmiş olan OSB'de dışkı disbiyozisinin bir kısmı için oral disbiyozisin birincil olarak hizmet edebileceği görüşü savunulmaktadır (Krajmalnik-Brown ve ark. 2015; Li ve ark. 2017; Vuong ve ark. 2017). Bu üç gelişim grupları arasındaki oral taksonomik profil farklılıklarının, OSB tanılı çocukları, normal gelişim gösteren ve gelişimsel gecikme bulunan yaşıtlarından ayıracağı görüşünden yola çıkarak geliştirdikleri analizle diferansiyel grup projeksiyonu için en kritik 20 taksonu belirlemişlerdir. Bu 20 taksondan 14 tanesinin OSB örneklerinde göreceli olarak azalma gösterdiği bildirilirken, 3 tanesinin de OSB örneklerinde diğer gruplara göre artış gösterdiği bildirilmiştir (Hicks ve ark. 2018).

Kong ve ark. yaptıkları çalışmada, OSB'li bireyler ve nörotipik-birinci derece aile üyelerinden elde ettikleri ağız ve bağırsak mikrobiyotasını incelemişler, OSB-mikrobiyom imzanın varlığını (biyobelirteç) ve bu imzanın herhangi bir tanısal değeri olup olmadığını değerlendirmiş ve klinik komorbid durumlarla ilişkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, OSB hastaları ile nörotipik kontroller arasında bağırsak ve tükürük mikrobiyotasının farklı özellikler gösterdiği bildirilmiştir. Ek olarak bu çalışmada, alerji, karın ağrısı ve anormal beslenme alışkanlıklarının da dahil olduğu klinik belirtiler ile ilişkili olabilecek mikrobiyal değişiklikler de incelenmiştir. Ağız ve bağırsak mikrobiyomunun sistemik hastalıklarda oynadığı rollerin ortaya çıkması ile birlikte, OSB ve komorbid durumların tanı ve tedavisinde geliştirilebilecek mikrobiyal belirteçlere rehberlik etmesinde bu çalışmanın ön kanıtlar sağlayabileceği savunulmaktadır (Kong ve ark. 2019).

Bağırsak ve dışkı biyopsilerinde bağırsak mikrobiyotasını değerlendiren birkaç çalışma, OSB'li ve sağlıklı kontroller arasında çeşitlilik ve zenginlik açısından önemli bir değişiklik olmadığını bildirirse de (Hsiao ve ark. 2013; Son ve ark. 2015; Williams ve ark. 2011), Kang ve ark. OSB'li çocuklarda nörotipik kontrol grubuna oranla bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliğinde önemli ölçüde bir azalma gözlendiğini bildirmiştir (Kang ve ark. 2013). Qiao ve ark. da zenginlik ve çeşitlilik açısından yaptıkları değerlendirmede, tükürük örneklerinde OSB'li ve kontrol grubu arasında bir farklılık bulunmadığını ancak dental plak örneklerinde OSB'li çocuklarda kontrol grubuna oranla küçük ama istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlendiğini bildirmiştir (Qiao ve ark. 2018).

Hick ve ark. OSB'li, gelişim geriliği gösteren ve normal gelişim gösteren çocukların tükürük mikrobiyomlarında gruplar arasında alfa çeşitlilik değerleri açısından anlamlı farklılık olmadığını bildirirken, beta çeşitlilik indeksi açısından gruplar arasında önemli farklılıklar saptandığını ve en çok örnek çeşitliliğinin normal gelişim gösteren grupta belirlendiği bildirilmiştir (Hicks ve ark. 2018)

Bakteri çeşitliliğindeki azalmanın mikrobiyal bütünlüğü bozabileceği ve patojenik mikropların alımı gibi çevresel stres faktörlerine karşı direnç sağlamada başarısızlığa sebep olacağı düşünülmektedir (Stecher ve ark. 2007).

Kong ve ark. OSB'li bireylerin tükürük mikrobiyotasında kontrol grubuna oranla alfa çeşitlilik ve beta çeşitlilik indeks verileri açısından anlamlı bir farklılık saptanmadığını bildirmiştir. Bunun yanında, OSB'li bireylerin oral mikrobiyotasında kontrol grubuna oranla TM7 bakterilerinin daha düşük göreceli bolluk eğilimi gösterdiği belirtilmiştir. Daha önceki çalışmalarda açıklanmayan (Qiao ve ark. 2018; Hicks ve ark. 2018), OSB ve kontrol grupları arasında göreceli bolluk miktarında önemli farklılık saptanan belirlenememiş bir oral Bacilli cinsinin gözlendiği de bildirilmiştir. Bu gözlem ile uyumlu olarak, kontrollere oranla OSB'li bireylerin bağırsaklarında Bacilli sınıfındaki (Firmicutes filum) bakteri miktarının anlamlı olarak daha yüksek gözlendiği ve bu bulguların Adams ve ark.'nın bulgularıyla uyum gösterdiği belirtilmiştir (Kong ve ark. 2019).

Bu tez çalışmasında, OSB'li ve kontrol grubundaki çocukların tükürük mikrobiyotalarının alfa çeşitlilik indeksleri açısından değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Gruplar arasındaki beta çeşitlilik garifiğine bakıldığında,

OSB'li çocukların indeks değerlerinin daha dağınık ve geniş alana yerleştiği kontrol grubundaki çocukların ise daha dar bir alanda kümелendiği görülmektedir. Bu veriler doğrultusunda OSB'li çocukların tükürük mikrobiyotalarında daha fazla çeşitlilik olduğunu ve gruplar arasında topluluk farklılıkları olduğunu söylenebilir (Şekil 4-13).

Bunun yanında, OSB'li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotaları sınıf düzeyinde incelendiğinde, Bacilli sınıfının göreceli bolluk oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır, ancak OSB'li grupta (%32,5) kontrol grubuna (%26,3) oranla matematiksel olarak daha yüksek oranda bulunmuştur.

Bağırsak mikrobiyomuna yönelik önceki çalışmalarda, inflamatuvar bağırsak hastalığına sahip bireylerde görülen Bacilli sınıfına ait fakültatif anaerobik kommensal bakterilerde önemli artışlar gözlenmesi, Bacilli ile bağırsak iltihabı arasında potansiyel bir bağlantı olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır (Winter ve ark. 2013). Bağırsağın ağız bakterileri tarafından kolonize olması, bağırsakta mikrobiyal disbiyozu tetikleyebilen ve sistemik enflamasyona yol açabilen patojenik oral bakterilerin (örneğin; kronik periodontitiste *Porphyromonas gingivalis*) bağırsağa ektopik transferi yoluyla meydana gelebileceği varsayımı ileri sürülmüştür (Olsen ve Hicks 2019; Hajishengallis ve ark. 2012; Darveau ve ark. 2012).

OSB hastalarının ağız ve bağırsak ortamında bulunan Bacilli türlerinin eşzamanlı olarak yukarı yönlü regülasyonunun herhangi bir ortak nedensel çevresel faktörü (örn; diyet) temsil edip etmediği veya ağızda Bacilli türlerinin aşırı çoğalmasının bağırsakta da Bacilli türlerinin aşırı çoğalmasına neden olup olmayacağı bilinmemektedir. Bu soruların yanıtları, bağırsak ve ağız mikrobiyomları arasındaki etkileşimlerin aydınlatılmasına yardımcı olacağı ve OSB patolojisindeki potansiyel rolü hakkında bilgi vereceği düşünülmektedir (Kong ve ark. 2019).

Kong ve ark. (2019), bazı bağırsak ve oral taksonların, distal bir ayrılma gösterse de birlikte oluştuğuna ilişkin kanıtlar sunduğunu öne sürmüştür. Buna örnek olarak da, bağırsakta bulunan Firmicutes ve tükürükte bulunan *Chloroflexi*'nin OSB popülasyonunda güçlü bir korelasyon sergilemesini göstermiştir. Tanı açısından değerlendirildiğinde, OSB'li hastalarda oral *Chloroflexi*'nin bağırsak Firmicutes durumu için bir okuma işlevi görüp görmediğinin saptanması gerektiğini, böylelikle ağız mikrobiyomunun dışkı örneklerinin kolay elde edilemediği durumlarda bağırsak disbiyozisinin değerlendirilmesinde uygun bir araç olarak kullanılabileceğini ileri

sürmüştür. Bunun yanında cins düzeyinde değerlendirme yapıldığında daha anlamlı oral- bağırsak birlikte oluşum kümeleri gözlemlendiği de bildirilmiştir (Kang ve ark. 2019). Oral mikrobiyomun, bağırsaktaki Bifidobacteria, Escherichia ve Clostridiales cinslerinin düzeylerinin tahmin edilmesinde yardımcı olabileceği, bu bakterilerin oral cinslerle pozitif korelasyon gösterdiği ve yine bu bakterilerin muhtemelen GI ve/veya OSB patofizyolojisi ile bağlantılı olabileceği bildirilmiştir (Ding ve ark. 2017; Luna ve ark. 2016; Gargari ve ark. 2018).

Zeka geriliği bulunan ve bulunmayan OSB hastalarında bağırsak mikrobiyomunun farklı psikiyatrik alt tiplerle ilişkili olabileceğini ileri süren çalışmalar bulunmaktadır (Plaza-Diaz ve ark. 2019). Genel olarak OSB hastalarının daha sağlıklı ve kısıtlı beslenme alışkanlıklarına sahip olma eğiliminde oldukları (Kang ve ark. 2019), OSB'li çocukların %70'inin beslenme ile ilgili zorluklar yaşadığı (Malhi ve ark. 2017) ve besin değeri düşük yiyecekleri daha çok tercih ettikleri bildirilmiştir (Ahearn ve ark. 2001). Kötü beslenme alışkanlıklarının düzeyi ile bağırsak mikrobiyomu belirteçlerinin korelasyon ilişkisi göz önüne alındığında, sağlıklı beslenme alışkanlıklarının bağırsak disbiyozunu tetikleyebileceği düşünülmektedir (Liu ve ark. 2016).

OSB'li bireylerde OSB'li olmayanlara oranla alerji görülme sıklığının önemli ölçüde daha yüksek olduğu saptanmış ve OSB'li bireylerde bağırsak Proteobacteria'sının aşırı çoğalması daha yüksek oranda izlenirken alerji durumu ile de pozitif korelasyon ilişkisi gözlenmiştir (Kang ve ark. 2019). Proteobacteria'nın aşırı çoğalması inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi otoimmün bozukluklarla ilişkilendirilirken (Rizatti ve ark. 2017) Proteobacteria'daki bu aşırı çoğalma sağlıklı bir floranın işareti olan Bacteroidetes eğiliminin tam tersini ifade etmektedir.

Hicks ve ark. yaptıkları çalışmada, üç farklı gelişim grubunda toplamda 753 takson belirlendiğini ve bu taksonlardan 41 tanesinin tüm örneklerde bulunduğunu bildirmiştir. Tüm katılımcılar arasında en yüksek transkripsiyonel aktivitede bulunan, tüm örneklerde en az % 0.5 göreceli bolluğa sahip ve örneklerin en az % 70'inde bulunan 10 oral takson ile bir çekirdek oral mikrobiyom oluşturulmuştur. Bu çalışmada belirlenen çekirdek oral mikrobiyom şu şekildedir; *Streptococcus* , *Streptococcus pneumoniae*, *Gemella sp. oral taxon 928*, *Streptococcus mitis*, *Neisseria*, *S. mitis B6*,

Proteobacteria, *Pasteurellaceae*, *Flavobacteriaceae*, ve *Streptococcus sp. oral taxon 064*.

Bu tez çalışmasında ise, OSB'li ve kontrol grubundaki çocukların ağız mikrobiyotalarında saptanan OTU'lar, örneklerin en az %75'inde en az %1'lik bolluk oranında (her grupta en az 7 örnekte) bulunacak şekilde sıralanarak çekirdek mikrobiyota oluşturulmuştur. Belirlenen çekirdek oral mikrobiyom şu şekildedir; Streptococcaceae ailesinden isimlendirilemeyen bir cins, *Streptococcus*, *Granulicatella*, *Haemophilus*, Pasteurellaceae ailesinden isimlendirilemeyen bir cins, Carnobacteriaceae ailesinden isimlendirilemeyen bir cins, *Neisseria*, Neisseriaceae ailesinden isimlendirilemeyen bir cins.

OSB'li çocuklarda GI mikrobiyomun bozulduğuna yönelik artan veriler doğrultusunda bu tez çalışmasında, OSB ile ilişkili ağızda bulunan mikrobiyal taksonlar belirlenmeye ve OSB'li ve sağlıklı kontrol grubu arasındaki tükürük mikrobiyotası farklılıkları saptanmaya çalışılmıştır. Ancak örneklem sayısının az olması, OSB ve ağız mikrobiyotası arasındaki olası değişikliklerin ve ilişkilerinin anlaşılmasını ve sosyodemografik verilerin sonuçlar üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesini sınırlandırmıştır. Çalışmaya dahil edilen bireyler tek bir merkeze başvuran hastalar arasından belirli sayıda seçilirken, çok merkezli ve örneklem sayısı yüksek çalışmaların daha kapsamlı ve aydınlatıcı olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızın bir diğer noktası, ağız mikrobiyomunu yansıtabilmesi amacıyla sadece tükürükten örnek alınmasıdır. Çalışmamızda çocukların ağız mikrobiyomunu etkileyebilecek değişiklikler ve faktörler olabildiğince dışlanmaya çalışılsa da kontrol edilemeyen faktörlerin sonuçları etkilemiş olabileceği de düşünülmektedir.

Birçok sistemik hastalıkta ağız florasında değişikliklerin saptanmasıyla birlikte ağız mikrobiyotasının çeşitliliğini ve hastalık gibi durumlardan nasıl etkilendiğini anlamak oldukça önemli hale gelmektedir. Metagenomik analizlerdeki gelişmeler ve yeni nesil sekanslama teknolojileri, daha hızlı veriler sağlamakta ve bir bölgedeki yerleşik mikroorganizmalar hakkında kapsamlı bilgi sunmaktadır. Ağız mikrobiyotası üzerinde yapılan metagenomik çalışmalardan elde edilen veriler doğrultusunda, ağız mikrobiyotası ile ilişkili hastalıkların erken tanısında kullanılabilecek mikrobiyom bazlı biyobelirteçler geliştirilebilecektir. OSB tanısına yönelik belirlenmiş biyobelirteçler veya teşhis ölçümleri bulunmamaktadır ve tanı tanımlayıcı kriterlerin yerine getirilmesi

ile konulmaktadır. OSB’li çocuklarda ağız mikrobiyotasının taksonomik ve fonksiyonel profillenmesi ve sağlıklı kontrollerden farklılıklarının belirlenmesi ile OSB’de ağız mikrobiyotasının rolü daha iyi anlaşılabilecektir. OSB fenotiplerinin ağız ve bağırsak mikrobiyotası üzerindeki olası etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için hem insan hem de hayvanlar üzerinde daha fazla paralel çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

OSB ve ağız mikrobiyotası arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma sayısı oldukça az olup bu çalışmalardaki sonuçlar OSB ve ağız mikrobiyotası arasındaki olası ilişkiye yönelik farklı bulgular sunmaktadır. Bu konudaki literatür sayısının az olması ve OSB’li bireylerin ağız mikrobiyotasındaki farklılıklara yönelik biyobelirteçler ve hedef bakteriler üzerinde fikir birliği olmaması da bu alanın araştırılmasını gerekli kılmaktadır. OSB’de GI mikrobiyotadaki bozulmaların orofarinkse uzanabileceği ve OSB durumunun değerlendirilmesinde ağız mikrobiyota profillenmesinin potansiyel bir ajan olabileceği düşünülmektedir.

SONUÇLAR

OSB tanısı bulunan yaşları 36-60 ay arasında bulunan 9 erkek çocuk ve sağlıklı kontrol grubundan elde edilen tükürük örneklerinin 16S rRNA gen sekanslama analizi ile değerlendirildiği bu tez çalışmasında aşağıda belirtilen bulgular elde edilmiştir:

- OSB'li ve kontrol grupları arasında dft, plak ve modifiye dişeti indeks değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).
- OSB'li grupta 8 filum, 17 sınıf, 32 takım, 66 aile, 143 cins, 101 tür, kontrol grubunda ise 8 filum, 18 sınıf, 26 takım, 45 aile, 83 cins ve 65 tür okumalar sonunda saptanmış olup bunlardan 6 filum, 13 sınıf, 17 takım, 33 aile, 58 cins ve 41 tür her iki grupta ortak olarak görülmüştür.
- OSB'li gruptan saptanan filumlar göreceli bolluklarına göre sırasıyla; *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* ve *Fusobacteria* şeklinde iken kontrol grubunda ise sırasıyla; *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria* ve *Bacteroidetes* şeklindedir. Her iki grup arasında *Fusobacteria*'nın göreceli bolluk oranı kontrol grubunda %18 iken OSB'li grupta %9,8 olarak elde edilmiş ve oranlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0,005$).
- OSB'li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotaları sınıf düzeyinde incelendiğinde, *Flavobacteriia*'nın göreceli bolluk değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0,001$). *Flavobacteriia*'nın OSB'li gruptaki göreceli bolluk oranı % 4,6 olarak belirlenirken, kontrol grubunda bu oran % 0,4 olarak bulunmuştur. *Fusobacteriia*'nın OSB'li gruptaki göreceli bolluk oranı %5,2 iken kontrol grubunda %10,2 olarak bulunmuştur ve her iki grup arasında *Fusobacteriia*'nın göreceli bolluk oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu belirlenmiştir.
- OSB'li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotaları takım düzeyinde incelendiğinde, gruplar arasında *Flavobacteriales* ve *Fusobacteriales* takımlarının göreceli bolluk oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır (p değerleri sırasıyla 0,004 ve 0,034). *Flavobacteriales* takımının OSB'li grupta göreceli bolluk oranı %3,6 iken kontrol grubunda %0,4 olarak

bulunmuştur. *Fusobacteriales* takımının OSB'li gruptaki göreceli bolluk oranı %7,2 iken kontrol grubunda %12,8 olarak elde edilmiştir.

- OSB'li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotaları aile düzeyinde incelendiğinde, gruplar arasında sadece *Flavobacteriaceae* ailesinin göreceli bolluk oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ($p=0,042$).
- OSB'li ve kontrol gruplarının ağız mikrobiyotaları cins ve tür düzeyinde incelendiğinde, gruplar arasında cinslerin göreceli bolluk oranlarının dağılımı açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).
- OSB'li grubun Firmicutes/Bacteroidetes oranı 13,56 olarak bulunurken, kontrol grubunda bu oran 19,56 olarak bulunmuştur.
- Gruplar arasında *Granulicatella elegans*, *Streptococcus anginosus* SK52 = DSM 2563, *Streptococcus cristatus* AS 1.389, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* subsp. *dentisani*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Neisseria zophii* cinsleri anlamlı farklılık göstererek OSB'li grupta daha yüksek oranda bulunmuştur.
- OSB'li ve kontrol grupları arasında alfa çeşitlilik değerlerinden Shannon, Simpson, InvSimpson ve Fisher indekslerinin ortalama değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.
- OSB'li grupta Firmicutes filumu, Bacilli sınıfı ve Lactobacillales takımı ile vücut kitle indeksi arasında pozitif yönlü güçlü bir ilişki bulunmuştur (r değerleri sırasıyla 0,695, 0,695 ve 0,678). Gingival indeks ile sadece *Granulicatella* cinsi arasında negatif yönlü orta düzey bir ilişki saptanmıştır ($r=-0,675$; $p=0,046$).
- Sonuç olarak, bu tez çalışmasında elde edilen veriler OSB'li çocukların ağız mikrobiyotası sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında bazı taksonların farklı seviyelerde artan ve azalan eğilimde olduğu gözlenmiştir. OSB'li çocuklarda ağız mikrobiyotasının sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında değişiklik gösterip göstermediği ve bu değişikliklerin olası sonuçlarının etkilerine yönelik geniş kapsamlı gelecek araştırmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

- Aas, J. A., Griffen, A. L., Dardis, S. R., Lee, A. M., Olsen, I., Dewhirst, F. E., Leys, E. J., & Paster, B. J. (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *Journal of clinical microbiology*, 46(4), 1407–1417.
- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of clinical microbiology*, 43(11), 5721–5732.
- Achmad, H., Oktawati, S., Adam, A. M., Pasiga, B., Sjahril, R., Azizah, A., ... & Neormansyah, I. (2020). Granulicatella Adiacens Bacteria Isolation from Perodontitcal Patients with Polymerase Chain Reaction Techniques. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(4), 394-400.
- Adams, J. B., Johansen, L. J., Powell, L. D., Quig, D., & Rubin, R. A. (2011). Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC gastroenterology*, 11, 22.
- Adams, J. B., Johansen, L. J., Powell, L. D., Quig, D., & Rubin, R. A. (2011). Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC gastroenterology*, 11, 22.
- Agbor, A. M., Sugim, C. F. M., Tedong, L., & Naidoo, S. (2019). Oral Health Status in Children with Autism Spectrum Disorder Presenting in Yaoundé, Cameroon. *Scholarly Journal of Otolaryngology* 2019; Volume 1 - Issue 5:102-106.
- Ahearn, W. H., Castine, T., Nault, K., & Green, G. (2001). An assessment of food acceptance in children with autism or pervasive developmental disorder-not otherwise specified. *Journal of autism and developmental disorders*, 31(5), 505–511.
- Ahn, J., Yang, L., Paster, B. J., Ganly, I., Morris, L., Pei, Z., & Hayes, R. B. (2011). Oral microbiome profiles: 16S rRNA pyrosequencing and microarray assay comparison. *PloS one*, 6(7), e22788.

- Ajslev, T. A., Andersen, C. S., Gamborg, M., Sørensen, T. I., & Jess, T. (2011). Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics. *International journal of obesity (2005)*, 35(4), 522–529.
- American Psychiatric Association [APA] (2013) Diagnostic and Statistical manual of mental disorders (DSM-5), 5th edn. American Psychiatric Association, Arlington
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®)*. American Psychiatric Pub.
- Amir, R. E., Van den Veyver, I. B., Wan, M., Tran, C. Q., Francke, U., & Zoghbi, H. Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature genetics*, 23(2), 185–188.
- Anderson, A. C., Rothballer, M., Altenburger, M. J., Woelber, J. P., Karygianni, L., Lagkouvardos, I., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A. (2018). In-vivo shift of the microbiota in oral biofilm in response to frequent sucrose consumption. *Scientific reports*, 8(1), 14202.
- Antshel, K. M., Zhang-James, Y., Wagner, K. E., Ledesma, A., & Faraone, S. V. (2016). An update on the comorbidity of ADHD and ASD: a focus on clinical management. *Expert review of neurotherapeutics*, 16(3), 279–293.
- Argos M. (2015). Arsenic Exposure and Epigenetic Alterations: Recent Findings Based on the Illumina 450K DNA Methylation Array. *Current environmental health reports*, 2(2), 137–144.
- Asikainen, S., & Chen, C. (1999). Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology 2000*, 20, 65–81.
- Atanasova, K. R., & Yilmaz, O. (2014). Looking in the *Porphyromonas gingivalis* cabinet of curiosities: the microbium, the host and cancer association. *Molecular oral microbiology*, 29(2), 55–66.
- Atarashi, K., Suda, W., Luo, C., Kawaguchi, T., Motoo, I., Narushima, S., Kiguchi, Y., Yasuma, K., Watanabe, E., Tanoue, T., Thaiss, C. A., Sato, M., Toyooka, K., Said, H. S., Yamagami, H., Rice, S. A., Gevers, D., Johnson, R. C., Segre, J. A., Chen, K., ... Honda, K. (2017). Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives T_H1 cell induction and inflammation. *Science (New York, N.Y.)*, 358(6361), 359–365.

Augustyn M. Autism spectrum disorder: Terminology, epidemiology, and pathogenesis - UpToDate. Published 2018. Accessed December 15, 2018.

Auyeung, B., Lombardo, M. V., & Baron-Cohen, S. (2013). Prenatal and postnatal hormone effects on the human brain and cognition. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 465(5), 557–571.

Bardsley, M. Z., Kowal, K., Levy, C., Gosek, A., Ayari, N., Tartaglia, N., Lahlou, N., Winder, B., Grimes, S., & Ross, J. L. (2013). 47,XXX syndrome: clinical phenotype and timing of ascertainment. *The Journal of pediatrics*, 163(4), 1085–1094.

Barnes, V. M., Teles, R., Trivedi, H. M., Devizio, W., Xu, T., Mitchell, M. W., Milburn, M. V., & Guo, L. (2009). Acceleration of purine degradation by periodontal diseases. *Journal of dental research*, 88(9), 851–855.

Bauman, M. L., & Kemper, T. L. (2005). Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 23(2-3), 183–187.

Baxter, A. J., Brugha, T. S., Erskine, H. E., Scheurer, R. W., Vos, T., & Scott, J. G. (2015). The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. *Psychological medicine*, 45(3), 601–613.

Beaglehole R, Bonita R & Kjellstrom T. (1993). Measuring health and disease. *Basic Epidemiology*, 13-20.

Becker K. G. (2007). Autism, asthma, inflammation, and the hygiene hypothesis. *Medical hypotheses*, 69(4), 731–740.

Belstrøm D, Holmstrup P, Bardow A, Kokaras A, Fiehn NE, Paster BJ (2016). Comparative analysis of bacterial profiles in unstimulated and stimulated saliva samples. *Journal of Oral Microbiology*, 8(1): 301-12.

Benítez-Páez, A., Belda-Ferre, P., Simón-Soro, A., & Mira, A. (2014). Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms. *BMC genomics*, 15, 311.

Benson, K., & Hartz, A. J. (2000). A comparison of observational studies and randomized, controlled trials. *The New England journal of medicine*, 342(25), 1878–1886.

- Bercum, F. M., Rodgers, K. M., Benison, A. M., Smith, Z. Z., Taylor, J., Kornreich, E., Grabenstatter, H. L., Dudek, F. E., & Barth, D. S. (2015). Maternal Stress Combined with Terbutaline Leads to Comorbid Autistic-Like Behavior and Epilepsy in a Rat Model. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(48), 15894–15902.
- Berer, K., Mues, M., Koutrolas, M., Rasbi, Z. A., Boziki, M., Johner, C., Wekerle, H., & Krishnamoorthy, G. (2011). Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature*, 479(7374), 538–541.
- Berkowitz, R. J., & Jones, P. (1985). Mouth-to-mouth transmission of the bacterium *Streptococcus mutans* between mother and child. *Archives of oral biology*, 30(4), 377–379.
- Bervoets, L., Van Hoorenbeeck, K., Kortleven, I., Van Noten, C., Hens, N., Vael, C., Goossens, H., Desager, K. N., & Vankerckhoven, V. (2013). Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. *Gut pathogens*, 5(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-10>
- Beurel, E., & Jope, R. S. (2009). Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain. *Journal of neuroinflammation*, 6, 9.
- Bourgeron T. (2015). From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nature reviews. Neuroscience*, 16(9), 551–563.
- Boyle, C. A., Boulet, S., Schieve, L. A., Cohen, R. A., Blumberg, S. J., Yeargin-Allsopp, M., Visser, S., & Kogan, M. D. (2011). Trends in the prevalence of developmental disabilities in US children, 1997-2008. *Pediatrics*, 127(6), 1034–1042.
- Bölte, S., Girdler, S., & Marschik, P. B. (2019). The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 76(7), 1275–1297.
- Bölte, S., Mahdi, S., de Vries, P. J., Granlund, M., Robison, J. E., Shulman, C., Swedo, S., Tonge, B., Wong, V., Zwaigenbaum, L., Segerer, W., & Selb, M. (2019). The Gestalt of functioning in autism spectrum disorder: Results of the international conference to develop final consensus International Classification of Functioning, Disability and Health core sets. *Autism : the international journal of research and practice*, 23(2), 449–467.

- Brandt, L. J., Aroniadis, O. C., Mellow, M., Kanatzar, A., Kelly, C., Park, T., Stollman, N., Rohlke, F., & Surawicz, C. (2012). Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection. *The American journal of gastroenterology*, *107*(7), 1079–1087.
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., Bienenstock, J., & Cryan, J. F. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(38), 16050–16055.
- Broek, J. A., Guest, P. C., Rahmoune, H., & Bahn, S. (2014). Proteomic analysis of post mortem brain tissue from autism patients: evidence for opposite changes in prefrontal cortex and cerebellum in synaptic connectivity-related proteins. *Molecular autism*, *5*, 41.
- Brugha, T. S., Spiers, N., Bankart, J., Cooper, S. A., McManus, S., Scott, F. J., Smith, J., & Tyrer, F. (2016). Epidemiology of autism in adults across age groups and ability levels. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*, *209*(6), 498–503.
- Buffington, S. A., Di Prisco, G. V., Auchtung, T. A., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., & Costa-Mattioli, M. (2016). Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell*, *165*(7), 1762–1775.
- Buiting, K., Saitoh, S., Gross, S., Dittrich, B., Schwartz, S., Nicholls, R. D., & Horsthemke, B. (1995). Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nature genetics*, *9*(4), 395–400.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, *13*(7), 581–583.
- Cao A M, Cox MR, Eslick GD (2016). Study design in evidence-based surgery: What is the role of case-control studies? *World Journal of Methodology*, *6*(1): 101.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A.,

McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335–336.

Castora F. J. (2019). Mitochondrial function and abnormalities implicated in the pathogenesis of ASD. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 92, 83–108.

Catani, M., Dell'Acqua, F., Budisavljevic, S., Howells, H., Thiebaut de Schotten, M., Froudast-Walsh, S., D'Anna, L., Thompson, A., Sandrone, S., Bullmore, E. T., Suckling, J., Baron-Cohen, S., Lombardo, M. V., Wheelwright, S. J., Chakrabarti, B., Lai, M. C., Ruigrok, A. N., Leemans, A., Ecker, C., Consortium, M. A., ... Murphy, D. G. (2016). Frontal networks in adults with autism spectrum disorder. *Brain : a journal of neurology*, 139(Pt 2), 616–630.

Cermak, S. A., Curtin, C., & Bandini, L. G. (2010). Food selectivity and sensory sensitivity in children with autism spectrum disorders. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(2), 238–246.

Cezar GG, Smith AM, inventors; Wisconsin Alumni Research Foundation, Stemina Biomarker Discovery Inc., assignee. Metabolic biomarkers of autism. USA patent application US 15/371, 692. 2017.

Chaidez, V., Hansen, R. L., & Hertz-Picciotto, I. (2014). Gastrointestinal problems in children with autism, developmental delays or typical development. *Journal of autism and developmental disorders*, 44(5), 1117–1127.

Chen, H., & Jiang, W. (2014). Application of high-throughput sequencing in understanding human oral microbiome related with health and disease. *Frontiers in microbiology*, 5, 508.

Cheslack-Postava, K., Liu, K., & Bearman, P. S. (2011). Closely spaced pregnancies are associated with increased odds of autism in California sibling births. *Pediatrics*, 127(2), 246–253.

Cheslack-Postava, K., Suominen, A., Jokiranta, E., Lehti, V., McKeague, I. W., Sourander, A., & Brown, A. S. (2014). Increased risk of autism spectrum disorders at short and long interpregnancy intervals in Finland. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 53(10), 1074–81.e4.

Chow, M. L., Pramparo, T., Winn, M. E., Barnes, C. C., Li, H. R., Weiss, L., Fan, J. B., Murray, S., April, C., Belinson, H., Fu, X. D., Wynshaw-Boris, A., Schork, N.

J., & Courchesne, E. (2012). Age-dependent brain gene expression and copy number anomalies in autism suggest distinct pathological processes at young versus mature ages. *PLoS genetics*, 8(3), e1002592.

Christensen, D. L., Baio, J., Van Naarden Braun, K., Bilder, D., Charles, J., Constantino, J. N., Daniels, J., Durkin, M. S., Fitzgerald, R. T., Kurzius-Spencer, M., Lee, L. C., Pettygrove, S., Robinson, C., Schulz, E., Wells, C., Wingate, M. S., Zahorodny, W., Yeargin-Allsopp, M., & Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2016). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, D.C. : 2002)*, 65(3), 1–23.

Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R. D., Shanahan, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2013). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Molecular psychiatry*, 18(6), 666–673.

Clarridge J. E., 3rd (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 840–862.

Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148(6), 1258–1270.

Colvert, E., Tick, B., McEwen, F., Stewart, C., Curran, S. R., Woodhouse, E., Gillan, N., Hallett, V., Lietz, S., Garnett, T., Ronald, A., Plomin, R., Rijdsdijk, F., Happé, F., & Bolton, P. (2015). Heritability of Autism Spectrum Disorder in a UK Population-Based Twin Sample. *JAMA psychiatry*, 72(5), 415–423.

Coo, H., Ouellette-Kuntz, H., Lam, Y. M., Brownell, M., Flavin, M. P., & Roos, L. L. (2015). The association between the interpregnancy interval and autism spectrum disorder in a Canadian cohort. *Canadian journal of public health = Revue canadienne de sante publique*, 106(2), e36–e42.

Cornejo, O. E., Lefébure, T., Bitar, P. D., Lang, P., Richards, V. P., Eilertson, K., Do, T., Beighton, D., Zeng, L., Ahn, S. J., Burne, R. A., Siepel, A., Bustamante, C. D., & Stanhope, M. J. (2013). Evolutionary and population genomics of the cavity causing bacteria *Streptococcus mutans*. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 881–893.

- Courchesne, E., Mouton, P. R., Calhoun, M. E., Semendeferi, K., Ahrens-Barbeau, C., Hallet, M. J., Barnes, C. C., & Pierce, K. (2011). Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA*, 306(18), 2001–2010.
- Crielaard, W., Zaura, E., Schuller, A. A., Huse, S. M., Montijn, R. C., & Keijser, B. J. (2011). Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. *BMC medical genomics*, 4, 22.
- Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Lee, S. H., Ripke, S., Neale, B. M., Faraone, S. V., Purcell, S. M., Perlis, R. H., Mowry, B. J., Thapar, A., Goddard, M. E., Witte, J. S., Absher, D., Agartz, I., Akil, H., Amin, F., Andreassen, O. A., Anjorin, A., Anney, R., Anttila, V., Arking, D. E., ... International Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium (IIBDGC) (2013). Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nature genetics*, 45(9), 984–994.
- Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature reviews. Neuroscience*, 13(10), 701–712.
- Cryan, J. F., & O'Mahony, S. M. (2011). The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 23(3), 187–192.
- Curtis MA, Zenobia C, Darveau RP. The relationship of the oral microbiotia to periodontal health and disease. *Cell Host&Microbe*, 2011;10:302-6.
- Darveau, R. P., Hajishengallis, G., & Curtis, M. A. (2012). Porphyromonas gingivalis as a potential community activist for disease. *Journal of dental research*, 91(9), 816–820.
- Das, P. K., Ganguly, S. B., & Mandal, B. (2018). Mitigating polymerase chain reaction/amplicon contamination in a high-risk high-burden mycobacterial reference laboratory in a resource-limited setting. *International journal of mycobacteriology*, 7(4), 332–337.
- Davey, K. J., O'Mahony, S. M., Schellekens, H., O'Sullivan, O., Bienenstock, J., Cotter, P. D., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2012). Gender-dependent consequences of chronic olanzapine in the rat: effects on body weight, inflammatory, metabolic and microbiota parameters. *Psychopharmacology*, 221(1), 155–169.

Dawson B. & Trapp RG. (2004). Basic & clinical biostatistics. In Basic & clinical biostatistics. New York, USA. Lange Medical Books (pp. 438-438).

De Angelis, M., Piccolo, M., Vannini, L., Siragusa, S., De Giacomo, A., Serrazzanetti, D. I., Cristofori, F., Guerzoni, M. E., Gobetti, M., & Francavilla, R. (2013). Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *PloS one*, 8(10), e76993.

de la Torre-Ubieta, L., Won, H., Stein, J. L., & Geschwind, D. H. (2016). Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. *Nature medicine*, 22(4), 345–361.

de Theije, C. G., Wopereis, H., Ramadan, M., van Eijndthoven, T., Lambert, J., Knol, J., Garssen, J., Kraneveld, A. D., & Oozeer, R. (2014). Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain, behavior, and immunity*, 37, 197–206.

de Theije, C. G., Wu, J., da Silva, S. L., Kamphuis, P. J., Garssen, J., Korte, S. M., & Kraneveld, A. D. (2011). Pathways underlying the gut-to-brain connection in autism spectrum disorders as future targets for disease management. *European journal of pharmacology*, 668 Suppl 1, S70–S80.

Demily, C., Poisson, A., Peyroux, E., Gatellier, V., Nicolas, A., Rigard, C., Schluth-Bolard, C., Sanlaville, D., & Rossi, M. (2017). Autism spectrum disorder associated with 49,XYYYYY: case report and review of the literature. *BMC medical genetics*, 18(1), 9.

Demmer, R. T., Jacobs, D. R., Jr, Singh, R., Zuk, A., Rosenbaum, M., Papapanou, P. N., & Desvarieux, M. (2015). Periodontal Bacteria and Prediabetes Prevalence in ORIGINS: The Oral Infections, Glucose Intolerance, and Insulin Resistance Study. *Journal of dental research*, 94(9 Suppl), 201S–11S.

Desai, M., Messer, L. B., & Calache, H. (2001). A study of the dental treatment needs of children with disabilities in Melbourne, Australia. *Australian dental journal*, 46(1), 41–50.

Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2010 Principal Investigators, & Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2014). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States,

2010. *Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries* (Washington, D.C. : 2002), 63(2), 1–21.

Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C., Yu, W. H., Lakshmanan, A., & Wade, W. G. (2010). The human oral microbiome. *Journal of bacteriology*, 192(19), 5002–5017.

Di Martino, A., Yan, C. G., Li, Q., Denio, E., Castellanos, F. X., Alaerts, K., Anderson, J. S., Assaf, M., Bookheimer, S. Y., Dapretto, M., Deen, B., Delmonte, S., Dinstein, I., Ertl-Wagner, B., Fair, D. A., Gallagher, L., Kennedy, D. P., Keown, C. L., Keysers, C., Lainhart, J. E., ... Milham, M. P. (2014). The autism brain imaging data exchange: towards a large-scale evaluation of the intrinsic brain architecture in autism. *Molecular psychiatry*, 19(6), 659–667.

Diaz Heijtz, R., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M. L., Forssberg, H., & Pettersson, S. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), 3047–3052.

Diaz, P. I., Zilm, P. S., & Rogers, A. H. (2002). *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 2), 467–472.

DiCicco-Bloom, E., Lord, C., Zwaigenbaum, L., Courchesne, E., Dager, S. R., Schmitz, C., Schultz, R. T., Crawley, J., & Young, L. J. (2006). The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(26), 6897–6906.

Ding, H. T., Taur, Y., & Walkup, J. T. (2017). Gut Microbiota and Autism: Key Concepts and Findings. *Journal of autism and developmental disorders*, 47(2), 480–489.

Ding, H. T., Taur, Y., & Walkup, J. T. (2017). Gut Microbiota and Autism: Key Concepts and Findings. *Journal of autism and developmental disorders*, 47(2), 480–489.

Ding, T., & Schloss, P. D. (2014). Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature*, 509(7500), 357–360.

Docktor, M. J., Paster, B. J., Abramowicz, S., Ingram, J., Wang, Y. E., Correll, M., Jiang, H., Cotton, S. L., Kokaras, A. S., & Bousvaros, A. (2012). Alterations in

diversity of the oral microbiome in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 18(5), 935–942.

Dodds, L., Fell, D. B., Shea, S., Armson, B. A., Allen, A. C., & Bryson, S. (2011). The role of prenatal, obstetric and neonatal factors in the development of autism. *Journal of autism and developmental disorders*, 41(7), 891–902.

Doichinova, L., Gateva, N., & Hristov, K. (2019). Oral hygiene education of special needs children. Part 1: children with autism spectrum disorder. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 748-755.

Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 11971–11975.

Dong, L., Yin, J., Zhao, J., Ma, S. R., Wang, H. R., Wang, M., Chen, W., & Wei, W. Q. (2018). Microbial Similarity and Preference for Specific Sites in Healthy Oral Cavity and Esophagus. *Frontiers in microbiology*, 9, 1603.

Du, R. Y., Yiu, C. K., King, N. M., Wong, V. C., & McGrath, C. P. (2015). Oral health among preschool children with autism spectrum disorders: A case-control study. *Autism : the international journal of research and practice*, 19(6), 746–751.

Duran-Pinedo, A. E., Chen, T., Teles, R., Starr, J. R., Wang, X., Krishnan, K., & Frias-Lopez, J. (2014). Community-wide transcriptome of the oral microbiome in subjects with and without periodontitis. *The ISME journal*, 8(8), 1659–1672.

Durkin, M. S., DuBois, L. A., & Maenner, M. J. (2015). Inter-Pregnancy Intervals and the Risk of Autism Spectrum Disorder: Results of a Population-Based Study. *Journal of autism and developmental disorders*, 45(7), 2056–2066.

Dyches, T. T., Wilder, L. K., Sudweeks, R. R., Obiakor, F. E., & Algozzine, B. (2004). Multicultural issues in autism. *Journal of autism and developmental disorders*, 34(2), 211–222.

Edmiston, E., Ashwood, P., & Van de Water, J. (2017). Autoimmunity, Autoantibodies, and Autism Spectrum Disorder. *Biological psychiatry*, 81(5), 383–390.

Ellerbeck, K., Smith, C., & Courtemanche, A. (2015). Care of children with autism spectrum disorder. *Primary care*, 42(1), 85–98.

- Elsabbagh, M., Divan, G., Koh, Y. J., Kim, Y. S., Kauchali, S., Marcín, C., Montiel-Nava, C., Patel, V., Paula, C. S., Wang, C., Yasamy, M. T., & Fombonne, E. (2012). Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research*, 5(3), 160–179.
- Emanuele, E., Orsi, P., Boso, M., Broglia, D., Brondino, N., Barale, F., di Nemi, S. U., & Politi, P. (2010). Low-grade endotoxemia in patients with severe autism. *Neuroscience letters*, 471(3), 162–165.
- Estes, M. L., & McAllister, A. K. (2015). Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. *Nature reviews. Neuroscience*, 16(8), 469–486.
- Farmer, A. D., Randall, H. A., & Aziz, Q. (2014). It's a gut feeling: how the gut microbiota affects the state of mind. *The Journal of physiology*, 592(14), 2981–2988.
- Farrell, J. J., Zhang, L., Zhou, H., Chia, D., Elashoff, D., Akin, D., Paster, B. J., Joshipura, K., & Wong, D. T. (2012). Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. *Gut*, 61(4), 582–588.
- Farrokhi, V., Nemati, R., Nichols, F. C., Yao, X., Anstadt, E., Fujiwara, M., Grady, J., Wakefield, D., Castro, W., Donaldson, J., & Clark, R. B. (2013). Bacterial lipodipeptide, Lipid 654, is a microbiome-associated biomarker for multiple sclerosis. *Clinical & translational immunology*, 2(11), e8.
- Ferrando-Lucas, M. T., Martos-Pérez, J., Llorente-Comí, M., Freire-Prudencio, S., Ayuda-Pascual, R., Martínez Díez-Jorge, C., & González-Navarro, A. (2002). Espectro autista. Estudio epidemiológico y análisis de posibles subgrupos [The autistic spectrum. An epidemiological study and analysis of possible subgroups]. *Revista de neurologia*, 34 Suppl 1, S49–S53.
- Finegold, S. M. (2011). *Desulfovibrio* species are potentially important in regressive autism. *Medical hypotheses*, 77(2), 270–274.
- Finegold, S. M., Dowd, S. E., Gontcharova, V., Liu, C., Henley, K. E., Wolcott, R. D., Youn, E., Summanen, P. H., Granpeesheh, D., Dixon, D., Liu, M., Molitoris, D. R., & Green, J. A., 3rd (2010). Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*, 16(4), 444–453.

Finegold, S. M., Molitoris, D., Song, Y., Liu, C., Vaisanen, M. L., Bolte, E., McTeague, M., Sandler, R., Wexler, H., Marlowe, E. M., Collins, M. D., Lawson, P. A., Summanen, P., Baysallar, M., Tomzynski, T. J., Read, E., Johnson, E., Rolfe, R., Nasir, P., Shah, H., ... Kaul, A. (2002). Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 35(Suppl 1), S6–S16.

Fiorentino, M., Sapone, A., Senger, S., Camhi, S. S., Kadzielski, S. M., Buie, T. M., Kelly, D. L., Cascella, N., & Fasano, A. (2016). Blood-brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum disorders. *Molecular autism*, 7, 49.

Folayan MO, Kolawole KA, Oziegbe EO, Oyedele TA, Agbaje HO, Onjejaka NK, Oshomoji VO. (2017). Association between family structure and oral health of children with mixed dentition in suburban Nigeria. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 35(2), 134.

Fombonne E, Quirke S, Hagen A. 2011. Epidemiology of pervasive developmental disorders. In: Amaral DG, Dawson G, Geschwind DH, editors. *Autism spectrum disorders*. New York (NY): Oxford University Press. p 90–111.

Foster, J. A., & McVey Neufeld, K. A. (2013). Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in neurosciences*, 36(5), 305–312.

Fraga D, Meulia T, Fenster S (2008). Realtime PCR. *Current protocols essential laboratory techniques*, 10-13.

Frank, D. N., St Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., & Pace, N. R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(34), 13780–13785.

Frank, D. N., Zhu, W., Sartor, R. B., and Li, E. (2011). Investigating the biological and clinical significance of human dysbioses. *Trends Microbiol.* 19, 427–434.

Franzosa, E. A., Morgan, X. C., Segata, N., Waldron, L., Reyes, J., Earl, A. M., Giannoukos, G., Boylan, M. R., Ciulla, D., Gevers, D., Izard, J., Garrett, W. S., Chan, A. T., & Huttenhower, C. (2014). Relating the metatranscriptome and

metagenome of the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), E2329–E2338.

Freitag C. M. (2007). The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Molecular psychiatry*, 12(1), 2–22.

Frye, R. E., Rose, S., Slattery, J., & MacFabe, D. F. (2015). Gastrointestinal dysfunction in autism spectrum disorder: the role of the mitochondria and the enteric microbiome. *Microbial ecology in health and disease*, 26, 27458.

Fuentes J, Bakare M, Munir K. Autism Spectrum Disorder. In: IACAPAP Textbook of Child and Adolescent Mental Health; 2014:1-35.

Fuentes, J., Bakare, M., Munir, K., Aguayo, P., Gaddour, N., Öner, Ö., & Mercadante, M. (2014). Autism spectrum disorder. *IACAPAP e-textbook of child and adolescent mental health*. Geneva: International Association for Child and Adolescent Psychiatry and Allied Professions, 2, 1-35.

Gargari, G., Taverniti, V., Gardana, C., Cremon, C., Canducci, F., Pagano, I., Barbaro, M. R., Bellacosa, L., Castellazzi, A. M., Valsecchi, C., Tagliacarne, S. C., Bellini, M., Bertani, L., Gambaccini, D., Marchi, S., Cicala, M., Germanà, B., Dal Pont, E., Vecchi, M., Ogliari, C., ... Guglielmetti, S. (2018). Fecal Clostridiales distribution and short-chain fatty acids reflect bowel habits in irritable bowel syndrome. *Environmental microbiology*, 20(9), 3201–3213.

Gaugler, T., Klei, L., Sanders, S. J., Bodea, C. A., Goldberg, A. P., Lee, A. B., Mahajan, M., Manaa, D., Pawitan, Y., Reichert, J., Ripke, S., Sandin, S., Sklar, P., Svantesson, O., Reichenberg, A., Hultman, C. M., Devlin, B., Roeder, K., & Buxbaum, J. D. (2014). Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nature genetics*, 46(8), 881–885.

Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L. A., Vázquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B., Schwager, E., Knights, D., Song, S. J., Yassour, M., Morgan, X. C., Kostic, A. D., Luo, C., González, A., McDonald, D., Haberman, Y., Walters, T., Baker, S., Rosh, J., Stephens, M., ... Xavier, R. J. (2014). The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell host & microbe*, 15(3), 382–392.

- Giannobile WV, McDevitt JT, Niedbala RS, Malamud D (2011). Translational and clinical applications of salivary diagnostics. *Advances in Dental Research*; 23:375-80.
- Gibson, F.C.; Genco, C.A. The Genus *Porphyromonas*. In *The Prokaryotes*; Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2006; pp. 428–454.
- Gilbert, J. A., & Hughes, M. (2011). Gene expression profiling: metatranscriptomics. In *High-Throughput next Generation Sequencing* (pp. 195-205). Humana Press, Totowa, NJ.
- Gilbert, J. A., Blaser, M. J., Caporaso, J. G., Jansson, J. K., Lynch, S. V., & Knight, R. (2018). Current understanding of the human microbiome. *Nature medicine*, 24(4), 392–400.
- Gilbert, J. A., Krajmalnik-Brown, R., Porazinska, D. L., Weiss, S. J., & Knight, R. (2013). Toward effective probiotics for autism and other neurodevelopmental disorders. *Cell*, 155(7), 1446–1448.
- Gillings, M. R., Paulsen, I. T., & Tetu, S. G. (2015). Ecology and Evolution of the Human Microbiota: Fire, Farming and Antibiotics. *Genes*, 6(3), 841–857.
- Goldmann, J. M., Wong, W. S., Pinelli, M., Farrah, T., Bodian, D., Stittrich, A. B., Glusman, G., Vissers, L. E., Hoischen, A., Roach, J. C., Vockley, J. G., Veltman, J. A., Solomon, B. D., Gilissen, C., & Niederhuber, J. E. (2016). Parent-of-origin-specific signatures of de novo mutations. *Nature genetics*, 48(8), 935–939.
- Gondalia, S. V., Palombo, E. A., Knowles, S. R., Cox, S. B., Meyer, D., & Austin, D. W. (2012). Molecular characterisation of gastrointestinal microbiota of children with autism (with and without gastrointestinal dysfunction) and their neurotypical siblings. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research*, 5(6), 419–427.
- Gonzalez, A., Hyde, E., Sangwan, N., Gilbert, J. A., Viirre, E., & Knight, R. (2016). Migraines Are Correlated with Higher Levels of Nitrate-, Nitrite-, and Nitric Oxide-Reducing Oral Microbes in the American Gut Project Cohort. *mSystems*, 1(5), e00105-16.
- Goodman, R., & Richards, H. (1995). Child and adolescent psychiatric presentations of second-generation Afro-Caribbeans in Britain. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*, 167(3), 362–369.

Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J. T., Spector, T. D., Clark, A. G., & Ley, R. E. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, 159(4), 789–799.

Grant, M. M., Creese, A. J., Barr, G., Ling, M. R., Scott, A. E., Matthews, J. B., Griffiths, H. R., Cooper, H. J., & Chapple, I. L. (2010). Proteomic analysis of a noninvasive human model of acute inflammation and its resolution: the twenty-one day gingivitis model. *Journal of proteome research*, 9(9), 4732–4744.

Greene JC. and Vermillion JR. (1964). The simplified oral hygiene index. The Journal of the American Dental Association, 68(1), 7-13.

Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature reviews. Microbiology*, 9(4), 244–253.

Grice, E. A., Kong, H. H., Conlan, S., Deming, C. B., Davis, J., Young, A. C., NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard, G. G., Blakesley, R. W., Murray, P. R., Green, E. D., Turner, M. L., & Segre, J. A. (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5931), 1190–1192.

Grønberg, T. K., Schendel, D. E., & Parner, E. T. (2013). Recurrence of autism spectrum disorders in full- and half-siblings and trends over time: a population-based cohort study. *JAMA pediatrics*, 167(10), 947–953.

Guinane, C. M., & Cotter, P. D. (2013). Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 6(4), 295–308.

Guinchat, V., Thorsen, P., Laurent, C., Cans, C., Bodeau, N., Cohen, D. (2012). Pre-, peri- and neonatal risk factors for autism. *Acta Obstet. Gynecol. Scand*, 91, 287–300.

Gunnes, N., Surén, P., Bresnahan, M., Hornig, M., Lie, K. K., Lipkin, W. I., Magnus, P., Nilsen, R. M., Reichborn-Kjennerud, T., Schjølberg, S., Susser, E. S., Øyen, A. S., & Stoltenberg, C. (2013). Interpregnancy interval and risk of autistic disorder. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 24(6), 906–912.

Gupta, S., Ellis, S. E., Ashar, F. N., Moes, A., Bader, J. S., Zhan, J., West, A. B., & Arking, D. E. (2014). Transcriptome analysis reveals dysregulation of innate

immune response genes and neuronal activity-dependent genes in autism. *Nature communications*, 5, 5748.

Ha, S., Sohn, I. J., Kim, N., Sim, H. J., & Cheon, K. A. (2015). Characteristics of Brains in Autism Spectrum Disorder: Structure, Function and Connectivity across the Lifespan. *Experimental neurobiology*, 24(4), 273–284.

Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature reviews. Microbiology*, 10(10), 717–725.

Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., Miller, J., Fedele, A., Collins, J., Smith, K., Lotspeich, L., Croen, L. A., Ozonoff, S., Lajonchere, C., Grether, J. K., & Risch, N. (2011). Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Archives of general psychiatry*, 68(11), 1095–1102.

Happé, F., & Frith, U. (2006). The weak coherence account: detail-focused cognitive style in autism spectrum disorders. *Journal of autism and developmental disorders*, 36(1), 5–25.

Happé, F., & Frith, U. (2014). Annual research review: Towards a developmental neuroscience of atypical social cognition. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*, 55(6), 553–557.

Harley, I. T., & Karp, C. L. (2012). Obesity and the gut microbiome: Striving for causality. *Molecular metabolism*, 1(1-2), 21–31.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2012.07.002>

Hergüner S, Özbaran B (2010) Çocukluk Otizmini Derecelendirme Ölçeği. Çocuk ve Ergen Psikiyatrisinde Ölçütler ve Ölçekler: Yaygın Gelişimsel Bozukluklar Yıkıcı Davranım Bozuklukları s. 37-40.

Herrington, J. D., Miller, J. S., Pandey, J., & Schultz, R. T. (2016). Anxiety and social deficits have distinct relationships with amygdala function in autism spectrum disorder. *Social cognitive and affective neuroscience*, 11(6), 907–914.

Hertz-Picciotto, I., & Delwiche, L. (2009). The rise in autism and the role of age at diagnosis. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 20(1), 84–90.

Hicks, S. D., Ignacio, C., Gentile, K., & Middleton, F. A. (2016). Salivary miRNA profiles identify children with autism spectrum disorder, correlate with adaptive

behavior, and implicate ASD candidate genes involved in neurodevelopment. *BMC pediatrics*, 16, 52.

Hicks, S. D., Uhlig, R., Afshari, P., Williams, J., Chroneos, M., Tierney-Aves, C., Wagner, K., & Middleton, F. A. (2018). Oral microbiome activity in children with autism spectrum disorder. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research*, 11(9), 1286–1299.

Hoirisch-Clapauch, S., & Nardi, A. E. (2019). Autism spectrum disorders: let's talk about glucose?. *Translational psychiatry*, 9(1), 51.

Holgerson, P. L., Vestman, N. R., Claesson, R., Ohman, C., Domellöf, M., Tanner, A. C., Hernell, O., & Johansson, I. (2013). Oral microbial profile discriminates breast-fed from formula-fed infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 56(2), 127–136.

Horvath, K., & Perman, J. A. (2002). Autism and gastrointestinal symptoms. *Current gastroenterology reports*, 4(3), 251–258.

Horvath, K., Papadimitriou, J. C., Rabsztyrn, A., Drachenberg, C., & Tildon, J. T. (1999). Gastrointestinal abnormalities in children with autistic disorder. *The Journal of pediatrics*, 135(5), 559-563.

Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., McCue, T., Codelli, J. A., Chow, J., Reisman, S. E., Petrosino, J. F., Patterson, P. H., & Mazmanian, S. K. (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, 155(7), 1451–1463.

Hugenholtz, P., & Pace, N. R. (1996). Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends in biotechnology*, 14(6), 190–197.

Hughes, D. T., & Sperandio, V. (2008). Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nature reviews. Microbiology*, 6(2), 111–120.

Hultman, C. M., Sandin, S., Levine, S. Z., Lichtenstein, P., & Reichenberg, A. (2011). Advancing paternal age and risk of autism: new evidence from a population-based study and a meta-analysis of epidemiological studies. *Molecular psychiatry*, 16(12), 1203–1212.

Human Microbiome Project Consortium (2012a). A framework for human microbiome research. *Nature*, 486(7402), 215–221.

Human Microbiome Project Consortium (2012b). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214.

Human Oral Microbiome Database (HOMD). 2016. Available online at: <http://www.homd.org/> (accessed April 2016).

Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., ... & Giglio, M. G. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *nature*, 486(7402), 207.

Idring, S., Magnusson, C., Lundberg, M., Ek, M., Rai, D., Svensson, A. C., Dalman, C., Karlsson, H., & Lee, B. K. (2014). Parental age and the risk of autism spectrum disorders: findings from a Swedish population-based cohort. *International journal of epidemiology*, 43(1), 107–115.

Idring, S., Rai, D., Dal, H., Dalman, C., Sturm, H., Zander, E., Lee, B. K., Serlachius, E., & Magnusson, C. (2012). Autism spectrum disorders in the Stockholm Youth Cohort: design, prevalence and validity. *PloS one*, 7(7), e41280.

Ilievski, V., Zuchowska, P. K., Green, S. J., Toth, P. T., Ragozzino, M. E., Le, K., Aljewari, H. W., O'Brien-Simpson, N. M., Reynolds, E. C., & Watanabe, K. (2018). Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice. *PloS one*, 13(10), e0204941.

Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium (2014). The Integrative Human Microbiome Project: dynamic analysis of microbiome-host omics profiles during periods of human health and disease. *Cell host & microbe*, 16(3), 276–289.

Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium (2019). The Integrative Human Microbiome Project. *Nature*, 569(7758), 641–648.

İncekaş S, Çocukluk Otizmini Derecelendirme Ölçeği Geçerlik ve Güvenirlik Çalışması, Uzmanlık Tezi, 2009

Jaber M. A. (2011). Dental caries experience, oral health status and treatment needs of dental patients with autism. *Journal of applied oral science : revista FOB*, 19(3), 212–217.

James W. H. (2008). Further evidence that some male-based neurodevelopmental disorders are associated with high intrauterine testosterone concentrations. *Developmental medicine and child neurology*, 50(1), 15–18.

- Jangi, S., Gandhi, R., Cox, L. M., Li, N., Von Glehn, F., Yan, R., ... & Cook, S. (2016). Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nature communications*, 7(1), 1-11.
- Jensen, C. M., Steinhausen, H. C., & Lauritsen, M. B. (2014). Time trends over 16 years in incidence-rates of autism spectrum disorders across the lifespan based on nationwide Danish register data. *Journal of autism and developmental disorders*, 44(8), 1808–1818.
- Jiang, H., Ling, Z., Zhang, Y., Mao, H., Ma, Z., Yin, Y., Wang, W., Tang, W., Tan, Z., Shi, J., Li, L., & Ruan, B. (2015). Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain, behavior, and immunity*, 48, 186–194.
- Johansson, I., Witkowska, E., Kaveh, B., Lif Holgersson, P., & Tanner, A. C. (2016). The Microbiome in Populations with a Low and High Prevalence of Caries. *Journal of dental research*, 95(1), 80–86.
- Johnson, C. P., Myers, S. M., & American Academy of Pediatrics Council on Children With Disabilities (2007). Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics*, 120(5), 1183–1215.
- Jónsson, H., Sulem, P., Kehr, B., Kristmundsdottir, S., Zink, F., Hjartarson, E., Hardarson, M. T., Hjorleifsson, K. E., Eggertsson, H. P., Gudjonsson, S. A., Ward, L. D., Arnadottir, G. A., Helgason, E. A., Helgason, H., Gylfason, A., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Rafnar, T., Frigge, M., Stacey, S. N., ... Stefansson, K. (2017). Parental influence on human germline de novo mutations in 1,548 trios from Iceland. *Nature*, 549(7673), 519–522.
- Joubert, B. R., Felix, J. F., Yousefi, P., Bakulski, K. M., Just, A. C., Breton, C., Reese, S. E., Markunas, C. A., Richmond, R. C., Xu, C. J., Küpers, L. K., Oh, S. S., Hoyo, C., Gruziova, O., Söderhäll, C., Salas, L. A., Baiz, N., Zhang, H., Lepeule, J., Ruiz, C., ... London, S. J. (2016). DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. *American journal of human genetics*, 98(4), 680–696.
- Kang, D. W., Adams, J. B., Gregory, A. C., Borody, T., Chittick, L., Fasano, A., Khoruts, A., Geis, E., Maldonado, J., McDonough-Means, S., Pollard, E. L., Roux, S., Sadowsky, M. J., Lipson, K. S., Sullivan, M. B., Caporaso, J. G., & Krajmalnik-

- Brown, R. (2017). Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome*, 5(1), 10.
- Kang, D. W., Park, J. G., Ilhan, Z. E., Wallstrom, G., Labaer, J., Adams, J. B., & Krajmalnik-Brown, R. (2013). Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PloS one*, 8(7), e68322.
- Kang, V., Wagner, G. C., & Ming, X. (2014). Gastrointestinal dysfunction in children with autism spectrum disorders. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research*, 7(4), 501–506.
- Karimi, P., Kamali, E., Mousavi, S. M., & Karahmadi, M. (2017). Environmental factors influencing the risk of autism. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 22, 27.
- Kato, T., Yamazaki, K., Nakajima, M., Date, Y., Kikuchi, J., Hase, K., Ohno, H., & Yamazaki, K. (2018). Oral Administration of *Porphyromonas gingivalis* Alters the Gut Microbiome and Serum Metabolome. *mSphere*, 3(5), e00460-18.
- Kazor, C. E., Mitchell, P. M., Lee, A. M., Stokes, L. N., Loesche, W. J., Dewhirst, F. E., & Paster, B. J. (2003). Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *Journal of clinical microbiology*, 41(2), 558–563.
- Kealy, J., Greene, C., & Campbell, M. (2020). Blood-brain barrier regulation in psychiatric disorders. *Neuroscience letters*, 726, 133664.
- Keen, D. V., Reid, F. D., & Arnone, D. (2010). Autism, ethnicity and maternal immigration. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*, 196(4), 274–281.
- Kelly, J. R., Minuto, C., Cryan, J. F., Clarke, G., & Dinan, T. G. (2017). Cross Talk: The Microbiota and Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers in neuroscience*, 11, 490.
- Kianoush, N., Nguyen, K. A., Browne, G. V., Simonian, M., & Hunter, N. (2014). pH gradient and distribution of streptococci, lactobacilli, prevotellae, and fusobacteria in carious dentine. *Clinical oral investigations*, 18(2), 659–669.
- Kilian, M., Chapple, I. L., Hannig, M., Marsh, P. D., Meuric, V., Pedersen, A. M., Tonetti, M. S., Wade, W. G., & Zaura, E. (2016). The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *British dental journal*, 221(10), 657–666.

- Kim, Y. S., Leventhal, B. L., Koh, Y. J., Fombonne, E., Laska, E., Lim, E. C., Cheon, K. A., Kim, S. J., Kim, Y. K., Lee, H., Song, D. H., & Grinker, R. R. (2011). Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. *The American journal of psychiatry*, *168*(9), 904–912.
- King, M., & Bearman, P. (2009). Diagnostic change and the increased prevalence of autism. *International journal of epidemiology*, *38*(5), 1224–1234.
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L. T., & Ley, R. E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108* Suppl 1(Suppl 1), 4578–4585.
- Kohane, I. S., McMurry, A., Weber, G., MacFadden, D., Rappaport, L., Kunkel, L., Bickel, J., Wattanasin, N., Spence, S., Murphy, S., & Churchill, S. (2012). The comorbidity burden of children and young adults with autism spectrum disorders. *PloS one*, *7*(4), e33224.
- Kong, X., Liu, J., Cetinbas, M., Sadreyev, R., Koh, M., Huang, H., Adeseye, A., He, P., Zhu, J., Russell, H., Hobbie, C., Liu, K., & Onderdonk, A. B. (2019). New and Preliminary Evidence on Altered Oral and Gut Microbiota in Individuals with Autism Spectrum Disorder (ASD): Implications for ASD Diagnosis and Subtyping Based on Microbial Biomarkers. *Nutrients*, *11*(9), 2128.
- Kosidou, K., Dalman, C., Widman, L., Arver, S., Lee, B. K., Magnusson, C., & Gardner, R. M. (2017). Maternal Polycystic Ovary Syndrome and Risk for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in the Offspring. *Biological psychiatry*, *82*(9), 651–659.
- Kostic, A. D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J. N., Gallini, C. A., Michaud, M., Clancy, T. E., Chung, D. C., Lochhead, P., Hold, G. L., El-Omar, E. M., Brenner, D., Fuchs, C. S., Meyerson, M., & Garrett, W. S. (2013). *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell host & microbe*, *14*(2), 207–215.
- Könönen, E., Asikainen, S., & Jousimies-Somer, H. (1992). The early colonization of gram-negative anaerobic bacteria in edentulous infants. *Oral microbiology and immunology*, *7*(1), 28–31.
- Könönen, E., Asikainen, S., Saarela, M., Karjalainen, J., & Jousimies-Somer, H. (1994). The oral gram-negative anaerobic microflora in young children: longitudinal

changes from edentulous to dentate mouth. *Oral microbiology and immunology*, 9(3), 136–141.

Krajmalnik-Brown, R., Lozupone, C., Kang, D. W., & Adams, J. B. (2015). Gut bacteria in children with autism spectrum disorders: challenges and promise of studying how a complex community influences a complex disease. *Microbial ecology in health and disease*, 26, 26914.

Krajmalnik-Brown, R., Lozupone, C., Kang, D. W., & Adams, J. B. (2015). Gut bacteria in children with autism spectrum disorders: challenges and promise of studying how a complex community influences a complex disease. *Microbial ecology in health and disease*, 26, 26914.

Krishnan, K., Chen, T., & Paster, B. J. (2017). A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral diseases*, 23(3), 276–286.

Kulekci G, Leblebicioglu B, Keskin F, Ciftci S, Badur S. (2008). Salivary detection of periodontopathic bacteria in periodontally healthy children. *Anaerobe*, 14(1), 49-54.

Kumar, H., & Sharma, B. (2016). Minocycline ameliorates prenatal valproic acid induced autistic behaviour, biochemistry and blood brain barrier impairments in rats. *Brain research*, 1630, 83–97.

Kuter, B., & Guler, N. (2019). Caries experience, oral disorders, oral hygiene practices and socio-demographic characteristics of autistic children. *European journal of paediatric dentistry*, 20(3), 237–241.

Külekcî, G. (2013). Ağız Sağlığının Yeni Tanımı: Ağız Mikrobiyomu. *Ankem Dergi*, 27(3), 167-172.

Ladd-Acosta, C., Hansen, K. D., Briem, E., Fallin, M. D., Kaufmann, W. E., & Feinberg, A. P. (2014). Common DNA methylation alterations in multiple brain regions in autism. *Molecular psychiatry*, 19(8), 862–871.

Ladd-Acosta, C., Shu, C., Lee, B. K., Gidaya, N., Singer, A., Schieve, L. A., Schendel, D. E., Jones, N., Daniels, J. L., Windham, G. C., Newschaffer, C. J., Croen, L. A., Feinberg, A. P., & Daniele Fallin, M. (2016). Presence of an epigenetic signature of prenatal cigarette smoke exposure in childhood. *Environmental research*, 144(Pt A), 139–148.

- Lai, B., Milano, M., Roberts, M. W., & Hooper, S. R. (2012). Unmet dental needs and barriers to dental care among children with autism spectrum disorders. *Journal of autism and developmental disorders*, 42(7), 1294–1303.
- Landa, R., & Garrett-Mayer, E. (2006). Development in infants with autism spectrum disorders: a prospective study. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*, 47(6), 629–638.
- Lax, S., Smith, D. P., Hampton-Marcell, J., Owens, S. M., Handley, K. M., Scott, N. M., Gibbons, S. M., Larsen, P., Shogan, B. D., Weiss, S., Metcalf, J. L., Ursell, L. K., Vázquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Hasan, N. A., Gibson, M. K., Colwell, R., Dantas, G., Knight, R., & Gilbert, J. A. (2014). Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science (New York, N.Y.)*, 345(6200), 1048–1052.
- Lederberg, J., McCray, A. T. (2001). ‘Ome sweet ‘omics - a genealogical treasury of words. *Scientist*, 15(7), 8.
- Lee, P. F., Thomas, R. E., & Lee, P. A. (2015). Approach to autism spectrum disorder: Using the new DSM-V diagnostic criteria and the CanMEDS-FM framework. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, 61(5), 421–424.
- Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y., & Mazmanian, S. K. (2011). Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1(Suppl 1), 4615–4622.
- Leishman SJ, Do HL, Ford PJ. Cardiovascular disease and the role of oral bacteria. *J Oral Microbiol*. 2010;2:10.3402/jom.v2i0.5781. Published 2010 Dec 21.
- Li, Q., & Zhou, J. M. (2016). The microbiota-gut-brain axis and its potential therapeutic role in autism spectrum disorder. *Neuroscience*, 324, 131–139.
- Li, Q., Han, Y., Dy, A., & Hagerman, R. J. (2017). The Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11, 120.
- Lif Holgersson, P., Harnevik, L., Hernell, O., Tanner, A. C., & Johansson, I. (2011). Mode of birth delivery affects oral microbiota in infants. *Journal of dental research*, 90(10), 1183–1188.

- Ling, Z., Liu, X., Wang, Y., Li, L., & Xiang, C. (2013). Pyrosequencing analysis of the salivary microbiota of healthy Chinese children and adults. *Microbial ecology*, 65(2), 487–495.
- Liu, J., Zhang, M., Kong, X. (2016). Gut Microbiome and Autism: Recent Advances and Future Perspectives. *N. Am.J. Med. Sci.*,9, 1–12.
- Liu, Y., Li, X., Aryee, M. J., Ekström, T. J., Padyukov, L., Klareskog, L., Vandiver, A., Moore, A. Z., Tanaka, T., Ferrucci, L., Fallin, M. D., & Feinberg, A. P. (2014). GeMes, clusters of DNA methylation under genetic control, can inform genetic and epigenetic analysis of disease. *American journal of human genetics*, 94(4), 485–495.
- Lobene RR, Weatherford T, Ross NM, Lamm RA, Menaker L. (1986). A modified gingival index for use in clinical trials. *Clinical preventive dentistry*, 8(1), 3-6.
- Locey, K. J., & Lennon, J. T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(21), 5970–5975.
- Loomes, R., Hull, L., & Mandy, W. (2017). What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 56(6), 466–474.
- Lord, C and A Bailey, Autism spectrum disorders, in Child and Adolescent Psychiatry, 4th edn, M Rutter and E Taylor, Editors. 2002, Blackwell Publishing: Oxford. P. 636-663.
- Lord, C., Brugha, T. S., Charman, T., Cusack, J., Dumas, G., Frazier, T., Jones, E., Jones, R. M., Pickles, A., State, M. W., Taylor, J. L., & Veenstra-VanderWeele, J. (2020). Autism spectrum disorder. *Nature reviews. Disease primers*, 6(1), 5.
- Lord, C., Risi, S., DiLavore, P. S., Shulman, C., Thurm, A., & Pickles, A. (2006). Autism from 2 to 9 years of age. *Archives of general psychiatry*, 63(6), 694–701.
- Lorenz T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (63), e3998.
- Lui KJ. (2004). Statistical estimation of epidemiological risk. New Jersey, USA: John Wiley & Sons.

Luna, R. A., & Foster, J. A. (2015). Gut brain axis: diet microbiota interactions and implications for modulation of anxiety and depression. *Current opinion in biotechnology*, 32, 35–41.

Luna, R. A., Oezguen, N., Balderas, M., Venkatachalam, A., Runge, J. K., Versalovic, J., Veenstra-VanderWeele, J., Anderson, G. M., Savidge, T., & Williams, K. C. (2016). Distinct Microbiome-Neuroimmune Signatures Correlate With Functional Abdominal Pain in Children With Autism Spectrum Disorder. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 3(2), 218–230.

Lyall, K., Croen, L., Daniels, J., Fallin, M. D., Ladd-Acosta, C., Lee, B. K., Park, B. Y., Snyder, N. W., Schendel, D., Volk, H., Windham, G. C., & Newschaffer, C. (2017). The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annual review of public health*, 38, 81–102.

Lyte M. (2004). Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century. *Trends in microbiology*, 12(1), 14–20.

Lyte M. (2013). Microbial endocrinology in the microbiome-gut-brain axis: how bacterial production and utilization of neurochemicals influence behavior. *PLoS pathogens*, 9(11), e1003726.

Lyte, M. & Freestone, P.E. (2010). *Microbial Endocrinology: Interkingdom Signaling In Health Disease*. New York, New York, USA: Springer Publishers.

Mager, D. L., Ximenez-Fyvie, L. A., Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (2003). Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *Journal of clinical periodontology*, 30(7), 644–654.

Magnusson, C., Rai, D., Goodman, A., Lundberg, M., Idring, S., Svensson, A., Koupil, I., Serlachius, E., & Dalman, C. (2012). Migration and autism spectrum disorder: population-based study. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*, 201, 109–115.

Malhi, P., Venkatesh, L., Bharti, B., & Singhi, P. (2017). Feeding Problems and Nutrient Intake in Children with and without Autism: A Comparative Study. *Indian journal of pediatrics*, 84(4), 283–288.

Manco M. (2012). Gut microbiota and developmental programming of the brain: from evidence in behavioral endophenotypes to novel perspective in obesity. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 109.

- Mansoor, D., Al, M. H., Khamis, A. H., & Kowash, M. (2018). Oral health challenges facing Dubai children with Autism Spectrum Disorder at home and in accessing oral health care. *European journal of paediatric dentistry*, 19(2), 127-133.
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3, 31.
- Mark Welch, J. L., Rossetti, B. J., Rieken, C. W., Dewhirst, F. E., & Borisy, G. G. (2016). Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(6), E791–E800.
- Marler, S., Ferguson, B. J., Lee, E. B., Peters, B., Williams, K. C., McDonnell, E., Macklin, E. A., Levitt, P., Margolis, K. G., Beversdorf, D. Q., & Veenstra-VanderWeele, J. (2017). Association of Rigid-Compulsive Behavior with Functional Constipation in Autism Spectrum Disorder. *Journal of autism and developmental disorders*, 47(6), 1673–1681.
- Marsh, P. D., & Devine, D. A. (2011). How is the development of dental biofilms influenced by the host?. *Journal of clinical periodontology*, 38 Suppl 11, 28–35.
- Marsh, P. D., Do, T., Beighton, D., & Devine, D. A. (2016). Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontology 2000*, 70(1), 80–92.
- Mashima I, Theodorea CF, Thaweboon B, Thaweboon S, Scannapieco FA, Nakazawa F. (2017). Exploring the salivary microbiome of children stratified by the oral hygiene index. *PloS one*, 12(9), e0185274.
- Matson, V., Fessler, J., Bao, R., Chongsawat, T., Zha, Y., Alegre, M. L., Luke, J. J., & Gajewski, T. F. (2018). The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6371), 104–108.
- Mattila, M. L., Kielinen, M., Linna, S. L., Jussila, K., Ebeling, H., Bloigu, R., Joseph, R. M., & Moilanen, I. (2011). Autism spectrum disorders according to DSM-IV-TR and comparison with DSM-5 draft criteria: an epidemiological study. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 50(6), 583–592.e11.
- Mayer, E. A., Padua, D., & Tillisch, K. (2014). Altered brain-gut axis in autism: comorbidity or causative mechanisms?. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 36(10), 933–939.

Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D., & Weaver, C. T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489(7415), 231–241.

Mazina, V., Gerdts, J., Trinh, S., Ankenman, K., Ward, T., Dennis, M. Y., Girirajan, S., Eichler, E. E., & Bernier, R. (2015). Epigenetics of autism-related impairment: copy number variation and maternal infection. *Journal of developmental and behavioral pediatrics : JDBP*, 36(2), 61–67.

McDonald, D., Hornig, M., Lozupone, C., Debelius, J., Gilbert, J. A., & Knight, R. (2015). Towards large-cohort comparative studies to define the factors influencing the gut microbial community structure of ASD patients. *Microbial ecology in health and disease*, 26, 26555.

McElhanon, B. O., McCracken, C., Karpen, S., & Sharp, W. G. (2014). Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a meta-analysis. *Pediatrics*, 133(5), 872–883.

McKernan, D. P., Fitzgerald, P., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2010). The probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 displays visceral antinociceptive effects in the rat. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 22(9), 1029–e268.

McManus S, Bebbington P, Jenkins R, Brugha T. Mental health and wellbeing in England: Adult Psychiatric Morbidity Survey 2014. A survey carried out for NHS Digital by NatCen Social Research and the Department of Health Sciences, University of Leicester. 2016.

Mervish, N. A., Hu, J., Hagan, L. A., Arora, M., Frau, C., Choi, J., Attaie, A., Ahmed, M., Teitelbaum, S. L., & Wolff, M. S. (2019). Associations of the Oral Microbiota with Obesity and Menarche in Inner City Girls. *Journal of childhood obesity*, 4(1), 2.

Meyer, U., Feldon, J., & Dammann, O. (2011). Schizophrenia and autism: both shared and disorder-specific pathogenesis via perinatal inflammation?. *Pediatric research*, 69(5 Pt 2), 26R–33R.

Miller D. T. (2010). Genetic testing for autism: recent advances and clinical implications. *Expert review of molecular diagnostics*, 10(7), 837–840.

- Moayyedi, P., Quigley, E. M., Lacy, B. E., Lembo, A. J., Saito, Y. A., Schiller, L. R., Soffer, E. E., Spiegel, B. M., & Ford, A. C. (2014). The effect of fiber supplementation on irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *The American journal of gastroenterology*, 109(9), 1367–1374.
- Modabbernia, A., Velthorst, E., & Reichenberg, A. (2017). Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Molecular autism*, 8, 13.
- Modi, S. R., Collins, J. J., & Relman, D. A. (2014). Antibiotics and the gut microbiota. *The Journal of clinical investigation*, 124(10), 4212–4218.
- Montiel-Castro, A. J., González-Cervantes, R. M., Bravo-Ruiseco, G., & Pacheco-López, G. (2013). The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality. *Frontiers in integrative neuroscience*, 7, 70.
- Morales-Chávez M. C. (2017). Oral Health Assessment of a Group of Children with Autism Disorder. *The Journal of clinical pediatric dentistry*, 41(2), 147–149.
- Motavallı MN. Otizm Spektrum Bozuklukları. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2013.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51 Pt 1, 263–273.
- Mussap, M., Noto, A., & Fanos, V. (2016). Metabolomics of autism spectrum disorders: early insights regarding mammalian-microbial cometabolites. *Expert review of molecular diagnostics*, 16(8), 869–881.
- Namal, N., Vehit, H. E., & Koksall, S. (2007). Do autistic children have higher levels of caries? A cross-sectional study in Turkish children. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 25(2), 97.
- Nasidze, I., Li, J., Quinque, D., Tang, K., & Stoneking, M. (2009). Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome research*, 19(4), 636–643.
- National Epidemiologic Database for the Study of Autism in Canada (NEDSAC). Estimated prevalence of autism spectrum disorders among children 2–14 years of age in three Canadian regions (2003–2010) [Inter- net]. Kingston (ON): NEDSAC; 2012 [cited 2014 March 1]. Available from: http://www.nedsac.ca/sites/webpublish.queensu.ca.nedwww/files/files/Table_Prevalence_2003to2010.pdf

- Niehus, R., & Lord, C. (2006). Early medical history of children with autism spectrum disorders. *Journal of developmental and behavioral pediatrics : JDBP*, 27(2 Suppl), S120–S127.
- Norder Grusell, E., Dahlen, G., Ruth, M., Ny, L., Quiding-Jarbrink, M., Bergquist, H., et al. (2013). Bacterial flora of the human oral cavity, and the upper and lower esophagus. *Dis. Esophagus* 26, 84–90.
- O'Hearn, K., Asato, M., Ordaz, S., & Luna, B. (2008). Neurodevelopment and executive function in autism. *Development and psychopathology*, 20(4), 1103–1132.
- O'Mahony, S. M., Clarke, G., Borre, Y. E., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behavioural brain research*, 277, 32–48.
- Olsen I. (2008). Update on bacteraemia related to dental procedures. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*, 39(2), 173–178.
- Olsen, I., & Hicks, S. D. (2019). Oral microbiota and autism spectrum disorder (ASD). *Journal of oral microbiology*, 12(1), 1702806.
- Olsen, I., & Singhrao, S. K. (2015). Can oral infection be a risk factor for Alzheimer's disease?. *Journal of oral microbiology*, 7, 29143.
- Olsen, I., & Yamazaki, K. (2019). Can oral bacteria affect the microbiome of the gut?. *Journal of oral microbiology*, 11(1), 1586422.
- Onol, S., & Kırzioğlu, Z. (2018). Evaluation of oral health status and influential factors in children with autism. *Nigerian journal of clinical practice*, 21(4), 429–435.
- Osterberg, K. L., Boutagy, N. E., McMillan, R. P., Stevens, J. R., Frisard, M. I., Kavanaugh, J. W., Davy, B. M., Davy, K. P., & Hulver, M. W. (2015). Probiotic supplementation attenuates increases in body mass and fat mass during high-fat diet in healthy young adults. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 23(12), 2364–2370.
- Ozonoff, S., Young, G. S., Carter, A., Messinger, D., Yirmiya, N., Zwaigenbaum, L., Bryson, S., Carver, L. J., Constantino, J. N., Dobkins, K., Hutman, T., Iverson, J. M., Landa, R., Rogers, S. J., Sigman, M., & Stone, W. L. (2011). Recurrence risk for autism spectrum disorders: a Baby Siblings Research Consortium study. *Pediatrics*, 128(3), e488–e495.

- Parracho, H. M., Bingham, M. O., Gibson, G. R., & McCartney, A. L. (2005). Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *Journal of medical microbiology*, 54(Pt 10), 987–991.
- Paster, B. J., Boches, S. K., Galvin, J. L., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., Sahasrabudhe, A., & Dewhirst, F. E. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of bacteriology*, 183(12), 3770–3783.
- Paster, B. J., Olsen, I., Aas, J. A., & Dewhirst, F. E. (2006). The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology* 2000, 42, 80–87.
- Pearce, N. (2016). Analysis of matched case-control studies. *bmj*, 352, i969.
- Pedersen A M (ed). *Oral infections and general health: from molecule to chairside*. Vol.1. Springer International Publishing, 2016.
- Pereira, P., Aho, V., Paulin, L., Pekkonen, E., Auvinen, P., & Scheperjans, F. (2017). Oral and nasal microbiota in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 38, 61–67.
- Pieretti, M., Zhang, F. P., Fu, Y. H., Warren, S. T., Oostra, B. A., Caskey, C. T., & Nelson, D. L. (1991). Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell*, 66(4), 817–822.
- Pinto, D., Delaby, E., Merico, D., Barbosa, M., Merikangas, A., Klei, L., Thiruvahindrapuram, B., Xu, X., Ziman, R., Wang, Z., Vorstman, J. A., Thompson, A., Regan, R., Pilorge, M., Pellecchia, G., Pagnamenta, A. T., Oliveira, B., Marshall, C. R., Magalhaes, T. R., Lowe, J. K., ... Scherer, S. W. (2014). Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *American journal of human genetics*, 94(5), 677–694.
- Plaza-Díaz, J., Gómez-Fernández, A., Chueca, N., Torre-Aguilar, M. J., Gil, Á., Perez-Navero, J. L., Flores-Rojas, K., Martín-Borreguero, P., Solis-Urra, P., Ruiz-Ojeda, F. J., Garcia, F., & Gil-Campos, M. (2019). Autism Spectrum Disorder (ASD) with and without Mental Regression is Associated with Changes in the Fecal Microbiota. *Nutrients*, 11(2), 337.
- Prantera, C., Lochs, H., Grimaldi, M., Danese, S., Scribano, M. L., Gionchetti, P., & Retic Study Group (Rifaximin-Eir Treatment in Crohn's Disease) (2012). Rifaximin-

extended intestinal release induces remission in patients with moderately active Crohn's disease. *Gastroenterology*, 142(3), 473–481.e4.

Preza, D., Olsen, I., Aas, J. A., Willumsen, T., Grinde, B., & Paster, B. J. (2008). Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *Journal of clinical microbiology*, 46(6), 2015–2021.

Qiao, Y., Wu, M., Feng, Y., Zhou, Z., Chen, L., & Chen, F. (2018). Alterations of oral microbiota distinguish children with autism spectrum disorders from healthy controls. *Scientific reports*, 8(1), 1597.

Quinlan, C. A., McVeigh, K. H., Driver, C. R., Govind, P., & Karpati, A. (2015). Parental Age and Autism Spectrum Disorders Among New York City Children 0-36 Months of Age. *Maternal and child health journal*, 19(8), 1783–1790.

Rajendhran, J., & Gunasekaran, P. (2011). Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiological research*, 166(2), 99–110.

Rajonson N, Meless D, Ba B, Faye M, Diby JS, N'zore S, et al. (2017). High prevalence of dental caries among HIV-infected children in West Africa compared to uninfected siblings. *Journal of public health dentistry*, 77(3), 234-243.

Rao D, Amitha H, Munshi AK. (2005). Oral hygiene status of disabled children and adolescents attending special schools of South Canara, India. *Hong Kong Dent J*, 2(2), 107-12.

Reber S. O. (2012). Stress and animal models of inflammatory bowel disease--an update on the role of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology*, 37(1), 1–19.

Reddy K. S. (2005). Cytogenetic abnormalities and fragile-X syndrome in Autism Spectrum Disorder. *BMC medical genetics*, 6, 3.

Reigstad, C. S., Salmonson, C. E., Rainey, J. F., 3rd, Szurszewski, J. H., Linden, D. R., Sonnenburg, J. L., Farrugia, G., & Kashyap, P. C. (2015). Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(4), 1395–1403.

Reyes, B. T. (2018). *Genomic Features and Adaptations of Coral Reef-Associated Flavobacteriia* (Doctoral dissertation, San Diego State University).

- Reynolds, L. A., & Finlay, B. B. (2017). Early life factors that affect allergy development. *Nature reviews. Immunology*, 17(8), 518–528.
- Rhee, S. H., Pothoulakis, C., & Mayer, E. A. (2009). Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 6(5), 306–314.
- Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Cheng, J., Duncan, A. E., Kau, A. L., Griffin, N. W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C. F., Funai, K., Hayashi, D. K., Lyle, B. J., Martini, M. C., Ursell, L. K., Clemente, J. C., Van Treuren, W., ... Gordon, J. I. (2013). Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6150), 1241214.
- Risch, N., Hoffmann, T. J., Anderson, M., Croen, L. A., Grether, J. K., & Windham, G. C. (2014). Familial recurrence of autism spectrum disorder: evaluating genetic and environmental contributions. *The American journal of psychiatry*, 171(11), 1206–1213.
- Risi, S., Lord, C., Gotham, K., Corsello, C., Chrysler, C., Szatmari, P., Cook, E. H., Jr, Leventhal, B. L., & Pickles, A. (2006). Combining information from multiple sources in the diagnosis of autism spectrum disorders. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 45(9), 1094–1103.
- Rizzatti, G., Lopetuso, L. R., Gibiino, G., Binda, C., & Gasbarrini, A. (2017). Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *BioMed research international*, 2017, 9351507.
- Rosenfeld C. S. (2015). Microbiome Disturbances and Autism Spectrum Disorders. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 43(10), 1557–1571.
- Ross, J. L., Roeltgen, D. P., Kushner, H., Zinn, A. R., Reiss, A., Bardsley, M. Z., McCauley, E., & Tartaglia, N. (2012). Behavioral and social phenotypes in boys with 47,XYY syndrome or 47,XXY Klinefelter syndrome. *Pediatrics*, 129(4), 769–778.
- Rothman KJ, Greenland S, Lash TL, eds Design strategies to improve study accuracy. *Modern epidemiology*. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

Razafindralambo, H., & Razafindralambo, A. (2019). Gluten intolerance as potential target for managing autism spectrum disorders: Towards innovative dietary approaches. *Novel Techniques in Nutrition and Food Science*.

Rutter M. (2005). Incidence of autism spectrum disorders: changes over time and their meaning. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 94(1), 2–15.

Sadock, B and V Sadock, Autism Spectrum Disorders, in Kaplan & Sadock's Concise Textbook of Child and Adolescent Psychiatry 2008, Wolters Kluwer/Lippincott William & Wilkins: Philadelphia, PA. P. 65-74.

Saemundsen, E., Magnússon, P., Smári, J., & Sigurdardóttir, S. (2003). Autism Diagnostic Interview-Revised and the Childhood Autism Rating Scale: convergence and discrepancy in diagnosing autism. *Journal of autism and developmental disorders*, 33(3), 319–328.

Sahin, M., & Sur, M. (2015). Genes, circuits, and precision therapies for autism and related neurodevelopmental disorders. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6263), 10.1126/science.aab3897 aab3897.

Sampaio-Maia, B., & Monteiro-Silva, F. (2014). Acquisition and maturation of oral microbiome throughout childhood: An update. *Dental research journal*, 11(3), 291–301.

Sandin, S., Hultman, C. M., Klevzon, A., Gross, R., MacCabe, J. H., & Reichenberg, A. (2012). Advancing maternal age is associated with increasing risk for autism: a review and meta-analysis. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 51(5), 477–486.e1.

Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Hultman, C., Larsson, H., & Reichenberg, A. (2017). The Heritability of Autism Spectrum Disorder. *JAMA*, 318(12), 1182–1184.

Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M., & Reichenberg, A. (2014). The familial risk of autism. *JAMA*, 311(17), 1770–1777.

Sandin, S., Schendel, D., Magnusson, P., Hultman, C., Surén, P., Susser, E., Grønborg, T., Gissler, M., Gunnes, N., Gross, R., Henning, M., Bresnahan, M., Sourander, A., Hornig, M., Carter, K., Francis, R., Parner, E., Leonard, H., Rosanoff, M., Stoltenberg, C., ... Reichenberg, A. (2016). Autism risk associated with parental age and with increasing difference in age between the parents. *Molecular psychiatry*, 21(5), 693–700.

- Sandler, R. H., Finegold, S. M., Bolte, E. R., Buchanan, C. P., Maxwell, A. P., Väisänen, M. L., Nelson, M. N., & Wexler, H. M. (2000). Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *Journal of child neurology*, 15(7), 429–435.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.
- Santos, J., Saperas, E., Nogueiras, C., Mourelle, M., Antolín, M., Cadahia, A., & Malagelada, J. R. (1998). Release of mast cell mediators into the jejunum by cold pain stress in humans. *Gastroenterology*, 114(4), 640–648.
- Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P. A., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., ... & Kinnunen, E. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement Disorders*, 30(3), 350-358.
- Schmidt, R. J., Hansen, R. L., Hartiala, J., Allayee, H., Schmidt, L. C., Tancredi, D. J., Tassone, F., & Hertz-Picciotto, I. (2011). Prenatal vitamins, one-carbon metabolism gene variants, and risk for autism. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 22(4), 476–485.
- Schopler E, Reichler RJ, DeVellis RF ve ark. (1980) Toward objective classification of child hood autism: Child hood Autism Rating Scale (CARS). J Autism Dev Disord 10:91-103.
- Schopler E, Reichler RJ, Roehen Renner B (2007) The Child hood Autism Rating Scale (CARS), 11. Baskı, Western Psychological Services.
- Segata, N., Haake, S. K., Mannon, P., Lemon, K. P., Waldron, L., Gevers, D., Huttenhower, C., & Izard, J. (2012). Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome biology*, 13(6), R42.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology*, 12(6), R60.
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*, 164(3), 337–340.

Shabani, LF, Begzati A, Dragidella F, Hoxha VH, Cakolli VH, Bruçi B. (2015). The Correlation between DMFT and OHI-S Index among 10-15 Years Old Children in Kosova. of, 5, 2002-2005.

Shelton, J. F., Tancredi, D. J., & Hertz-Picciotto, I. (2010). Independent and dependent contributions of advanced maternal and paternal ages to autism risk. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research*, 3(1), 30–39.

Shira Davenport E. (2010). Preterm low birthweight and the role of oral bacteria. *Journal of oral microbiology*, 2, 10.3402/jom.v2i0.5779.

Shoemark, D. K., & Allen, S. J. (2015). The microbiome and disease: reviewing the links between the oral microbiome, aging, and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 43(3), 725–738.

Shulha, H. P., Cheung, I., Whittle, C., Wang, J., Virgil, D., Lin, C. L., Guo, Y., Lessard, A., Akbarian, S., & Weng, Z. (2012). Epigenetic signatures of autism: trimethylated H3K4 landscapes in prefrontal neurons. *Archives of general psychiatry*, 69(3), 314–324.

Simón-Soro, A., Tomás, I., Cabrera-Rubio, R., Catalan, M. D., Nyvad, B., & Mira, A. (2013). Microbial geography of the oral cavity. *Journal of dental research*, 92(7), 616–621.

Singhrao, S. K., Harding, A., Simmons, T., Robinson, S., Kesavalu, L., & Crean, S. (2014). Oral inflammation, tooth loss, risk factors, and association with progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 42(3), 723–737.

Siniscalco, D., Schultz, S., Brigida, A. L., & Antonucci, N. (2018). Inflammation and Neuro-Immune Dysregulations in Autism Spectrum Disorders. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 11(2), 56.

Smith, A. M., Roux, S., Naidoo, N. T., & Venter, D. J. (2005). Food choice of tactile defensive children. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 21(1), 14–19.

Snijders, A. M., Langley, S. A., Kim, Y. M., Brislawn, C. J., Noecker, C., Zink, E. M., Fansler, S. J., Casey, C. P., Miller, D. R., Huang, Y., Karpen, G. H., Celniker, S. E., Brown, J. B., Borenstein, E., Jansson, J. K., Metz, T. O., & Mao, J. H. (2016).

Influence of early life exposure, host genetics and diet on the mouse gut microbiome and metabolome. *Nature microbiology*, 2, 16221.

Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*, 38, 135–187.

Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L., Jr (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*, 25(2), 134–144.

Solbiati, J., & Frias-Lopez, J. (2018). Metatranscriptome of the Oral Microbiome in Health and Disease. *Journal of dental research*, 97(5), 492–500.

Son, J. S., Zheng, L. J., Rowehl, L. M., Tian, X., Zhang, Y., Zhu, W., Litcher-Kelly, L., Gadow, K. D., Gathungu, G., Robertson, C. E., Ir, D., Frank, D. N., & Li, E. (2015). Comparison of Fecal Microbiota in Children with Autism Spectrum Disorders and Neurotypical Siblings in the Simons Simplex Collection. *PloS one*, 10(10), e0137725.

Song, Y., Liu, C., & Finegold, S. M. (2004). Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Applied and environmental microbiology*, 70(11), 6459–6465.

Srikantha, P., & Mohajeri, M. H. (2019). The Possible Role of the Microbiota-Gut-Brain-Axis in Autism Spectrum Disorder. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2115.

Stecher, B., Robbiani, R., Walker, A. W., Westendorf, A. M., Barthel, M., Kremer, M., Chaffron, S., Macpherson, A. J., Buer, J., Parkhill, J., Dougan, G., von Mering, C., & Hardt, W. D. (2007). Salmonella enterica serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS biology*, 5(10), 2177–2189.

Sucuoğlu, B., Öktem, F., & Gökler, B. (1996). Otistik çocukların değerlendirilmesinde kullanılan ölçeklere ilişkin bir çalışma. *Psikiyatri Psikoloji Psikofarmakoloji Dergisi*, 4(2), 116-121.

Sudhakara, P., Gupta, A., Bhardwaj, A., & Wilson, A. (2018). Oral Dysbiotic Communities and Their Implications in Systemic Diseases. *Dentistry journal*, 6(2), 10.

Szatmari, P., Chawarska, K., Dawson, G., Georgiades, S., Landa, R., Lord, C., Messinger, D. S., Thurm, A., & Halladay, A. (2016). Prospective Longitudinal

Studies of Infant Siblings of Children With Autism: Lessons Learned and Future Directions. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 55(3), 179–187.

Sztainberg, Y., & Zoghbi, H. Y. (2016). Lessons learned from studying syndromic autism spectrum disorders. *Nature neuroscience*, 19(11), 1408–1417.

Tamanai-Shacoori, Z., Smida, I., Bousarghin, L., Loreal, O., Meuric, V., Fong, S. B., Bonnaure-Mallet, M., & Jolivet-Gougeon, A. (2017). Roseburia spp.: a marker of health?. *Future microbiology*, 12, 157–170.

Tang, W. H., Wang, Z., Levison, B. S., Koeth, R. A., Britt, E. B., Fu, X., Wu, Y., & Hazen, S. L. (2013). Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *The New England journal of medicine*, 368(17), 1575–1584.

Tartaglia, N. R., Wilson, R., Miller, J. S., Rafalko, J., Cordeiro, L., Davis, S., Hessel, D., & Ross, J. (2017). Autism Spectrum Disorder in Males with Sex Chromosome Aneuploidy: XXY/Klinefelter Syndrome, XYY, and XXYY. *Journal of developmental and behavioral pediatrics : JDBP*, 38(3), 197–207.

Teal, M. B., & Wiebe, M. J. (1986). A validity analysis of selected instruments used to assess autism. *Journal of autism and developmental disorders*, 16(4), 485–494.

Thomas, R. H., Meeking, M. M., Mephram, J. R., Tichenoff, L., Possmayer, F., Liu, S., & MacFabe, D. F. (2012). The enteric bacterial metabolite propionic acid alters brain and plasma phospholipid molecular species: further development of a rodent model of autism spectrum disorders. *Journal of neuroinflammation*, 9, 153.

Tick, B., Bolton, P., Happé, F., Rutter, M., & Rijdsdijk, F. (2016). Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*, 57(5), 585–595.

Tierney, C., Mayes, S., Lohs, S. R., Black, A., Gisin, E., & Veglia, M. (2015). How Valid Is the Checklist for Autism Spectrum Disorder When a Child Has Apraxia of Speech?. *Journal of developmental and behavioral pediatrics : JDBP*, 36(8), 569–574.

Tillisch, K., Labus, J., Kilpatrick, L., Jiang, Z., Stains, J., Ebrat, B., Guyonnet, D., Legrain-Raspaud, S., Trotin, B., Naliboff, B., & Mayer, E. A. (2013). Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology*, 144(7), 1394–1401.e14014.

- Traskalova-Hogenova, H., Stepankova, R., Kozakova, H., Hudcovic, T., Vannucci, L., Tuckova, L., et al. (2011). The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell. Mol. Immunol.* 8, 110–120.
- Tomova, A., Husarova, V., Lakatosova, S., Bakos, J., Vlkova, B., Babinska, K., & Ostatnikova, D. (2015). Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *Physiology & behavior*, 138, 179–187.
- Tsuda, A., Suda, W., Morita, H., Takanashi, K., Takagi, A., Koga, Y., & Hattori, M. (2015). Influence of Proton-Pump Inhibitors on the Luminal Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Clinical and translational gastroenterology*, 6(6), e89.
- Tsuda, A., Suda, W., Morita, H., Takanashi, K., Takagi, A., Koga, Y., & Hattori, M. (2015). Influence of Proton-Pump Inhibitors on the Luminal Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Clinical and translational gastroenterology*, 6(6), e89.
- Turnbaugh, P. J., & Gordon, J. I. (2009). The core gut microbiome, energy balance and obesity. *The Journal of physiology*, 587(Pt 17), 4153–4158.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228), 480–484.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, 449(7164), 804–810.
- Turnbaugh, P. J., Quince, C., Faith, J. J., McHardy, A. C., Yatsunenko, T., Niazi, F., Affourtit, J., Egholm, M., Henrissat, B., Knight, R., & Gordon, J. I. (2010). Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(16), 7503–7508.
- Urbano, M., Okwara, L., Manser, P., Hartmann, K., Herndon, A., & Deutsch, S. I. (2014). A trial of D-cycloserine to treat stereotypies in older adolescents and young adults with autism spectrum disorder. *Clinical neuropharmacology*, 37(3), 69–72.
- van 't Hof, W., Veerman, E. C., Nieuw Amerongen, A. V., & Ligtenberg, A. J. (2014). Antimicrobial defense systems in saliva. *Monographs in oral science*, 24, 40–51.

Vartoukian, S. R., Adamowska, A., Lawlor, M., Moazzez, R., Dewhirst, F. E., & Wade, W. G. (2016). In Vitro Cultivation of 'Unculturable' Oral Bacteria, Facilitated by Community Culture and Media Supplementation with Siderophores. *PloS one*, 11(1), e0146926.

Voineagu, I., Wang, X., Johnston, P., Lowe, J. K., Tian, Y., Horvath, S., Mill, J., Cantor, R. M., Blencowe, B. J., & Geschwind, D. H. (2011). Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature*, 474(7351), 380–384.

Voineagu, I., Wang, X., Johnston, P., Lowe, J. K., Tian, Y., Horvath, S., Mill, J., Cantor, R. M., Blencowe, B. J., & Geschwind, D. H. (2011). Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature*, 474(7351), 380–384.

Voineagu, I., Wang, X., Johnston, P., Lowe, J. K., Tian, Y., Horvath, S., Mill, J., Cantor, R. M., Blencowe, B. J., & Geschwind, D. H. (2011). Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature*, 474(7351), 380–384.

Volk, H. E., Kerin, T., Lurmann, F., Hertz-Picciotto, I., McConnell, R., & Campbell, D. B. (2014). Autism spectrum disorder: interaction of air pollution with the MET receptor tyrosine kinase gene. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 25(1), 44–47.

Volkmar FR, Paul R, Klin A, Cohen DJ. (2005) Handbook of autism and pervasive developmental disorders, diagnosis, development, neurobiology, and behavior: John Wiley & Sons

Vuong, H. E., & Hsiao, E. Y. (2017). Emerging Roles for the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorder. *Biological psychiatry*, 81(5), 411–423.

Wakefield A. J. (2002). The gut-brain axis in childhood developmental disorders. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 34 Suppl 1, S14–S17.

Wang, B., Mao, Y. K., Diorio, C., Wang, L., Huizinga, J. D., Bienenstock, J., & Kunze, W. (2010). Lactobacillus reuteri ingestion and IK(Ca) channel blockade have similar effects on rat colon motility and myenteric

neurones. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 22(1), 98–e33.

Wang, H., Liang, S., Wang, M., Gao, J., Sun, C., Wang, J., Xia, W., Wu, S., Sumner, S. J., Zhang, F., Sun, C., & Wu, L. (2016). Potential serum biomarkers from a metabolomics study of autism. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*, 41(1), 27–37.

Wang, L., Christophersen, C. T., Sorich, M. J., Gerber, J. P., Anglely, M. T., & Conlon, M. A. (2013). Increased abundance of *Sutterella* spp. and *Ruminococcus torques* in feces of children with autism spectrum disorder. *Molecular autism*, 4(1), 42.

Wang, M., Zhou, J., He, F., Cai, C., Wang, H., Wang, Y., Lin, Y., Rong, H., Cheng, G., Xu, R., & Zhou, W. (2019). Alteration of gut microbiota-associated epitopes in children with autism spectrum disorders. *Brain, behavior, and immunity*, 75, 192–199.

Wang, Y., & Kasper, L. H. (2014). The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain, behavior, and immunity*, 38, 1–12.

Welbury RR, Thomason JM, Fitzgerald JL, Steen IN, Marshall NJ, Foster HE. (2003). Increased prevalence of dental caries and poor oral hygiene in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology*, 42(12), 1445-1451

Weng, M., & Walker, W. A. (2013). The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *Journal of developmental origins of health and disease*, 4(3), 203–214.

Wigle, D. T., Arbuckle, T. E., Walker, M., Wade, M. G., Liu, S., & Krewski, D. (2007). Environmental hazards: evidence for effects on child health. *Journal of toxicology and environmental health, part B*, 10(1-2), 3-39.

Williams, B. L., Hornig, M., Buie, T., Bauman, M. L., Cho Paik, M., Wick, I., Bennett, A., Jabado, O., Hirschberg, D. L., & Lipkin, W. I. (2011). Impaired carbohydrate digestion and transport and mucosal dysbiosis in the intestines of children with autism and gastrointestinal disturbances. *PloS one*, 6(9), e24585.

Williams, B. L., Hornig, M., Parekh, T., & Lipkin, W. I. (2012). Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of *Sutterella* species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. *mBio*, 3(1), e00261-11.

Willing, B. P., Russell, S. L., & Finlay, B. B. (2011). Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nature reviews. Microbiology*, 9(4), 233–243.

Willsey, A. J., Sanders, S. J., Li, M., Dong, S., Tebbenkamp, A. T., Muhle, R. A., Reilly, S. K., Lin, L., Fertuzinhos, S., Miller, J. A., Murtha, M. T., Bichsel, C., Niu, W., Cotney, J., Ercan-Sencicek, A. G., Gockley, J., Gupta, A. R., Han, W., He, X., Hoffman, E. J., ... State, M. W. (2013). Coexpression networks implicate human midfetal deep cortical projection neurons in the pathogenesis of autism. *Cell*, 155(5), 997–1007.

Winter, S. E., Lopez, C. A., & Bäumlér, A. J. (2013). The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. *EMBO reports*, 14(4), 319–327.

Woese CR (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221– 271.

World Health Organization. Oral Health Surveys: Basic Methods (1997). Geneva: World Health Organization.

Wright, C. J., Burns, L. H., Jack, A. A., Back, C. R., Dutton, L. C., Nobbs, A. H., Lamont, R. J., & Jenkinson, H. F. (2013). Microbial interactions in building of communities. *Molecular oral microbiology*, 28(2), 83–101.

Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., ... & Sinha, R. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334(6052), 105–108.

Wu, M., Wu, Y., Yu, L., Liu, J., Zhang, M., Kong, X., & Wu, B. L. (2017). A Survey of Epidemiological Studies and Risk Factors of ASD, with a Focus on China. *North American Journal of Medicine and Science*, 10(3).

Xu, X., He, J., Xue, J., Wang, Y., Li, K., Zhang, K., Guo, Q., Liu, X., Zhou, Y., Cheng, L., Li, M., Li, Y., Li, Y., Shi, W., & Zhou, X. (2015). Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environmental microbiology*, 17(3), 699–710.

Yang, D. Y., Beam, D., Pelphrey, K. A., Abdullahi, S., & Jou, R. J. (2016). Cortical morphological markers in children with autism: a structural magnetic resonance imaging study of thickness, area, volume, and gyrification. *Molecular autism*, 7, 11.

- Yang, H., Stephens, R. L., & Taché, Y. (1992). TRH analogue microinjected into specific medullary nuclei stimulates gastric serotonin secretion in rats. *The American journal of physiology*, 262(2 Pt 1), G216–G222.
- Yano, J. M., Yu, K., Donaldson, G. P., Shastri, G. G., Ann, P., Ma, L., Nagler, C. R., Ismagilov, R. F., Mazmanian, S. K., & Hsiao, E. Y. (2015). Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*, 161(2), 264–276.
- Yirmiya, N., Pilowsky, T., Nemanov, L., Arbelle, S., Feinsilver, T., Fried, I., & Ebstein, R. P. (2001). Evidence for an association with the serotonin transporter promoter region polymorphism and autism. *American journal of medical genetics*, 105(4), 381–386.
- Yoo H. (2015). Genetics of Autism Spectrum Disorder: Current Status and Possible Clinical Applications. *Experimental neurobiology*, 24(4), 257–272.
- Yost, S., Duran-Pinedo, A. E., Teles, R., Krishnan, K., & Frias-Lopez, J. (2015). Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. *Genome medicine*, 7(1), 27.
- Youngster, I., Sauk, J., Pindar, C., Wilson, R. G., Kaplan, J. L., Smith, M. B., Alm, E. J., Gevers, D., Russell, G. H., & Hohmann, E. L. (2014). Fecal microbiota transplant for relapsing *Clostridium difficile* infection using a frozen inoculum from unrelated donors: a randomized, open-label, controlled pilot study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 58(11), 1515–1522.
- Zarco, M. F., Vess, T. J., & Ginsburg, G. S. (2012). The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral diseases*, 18(2), 109–120.
- Zaura, E., Brandt, B. W., de Mattos, M. J. T., Buijs, M. J., Caspers, M. P., Rashid, M. U., ... & Coates, A. R. (2015). Same exposure but two radically different responses to antibiotics: resilience of the salivary microbiome versus long-term microbial shifts in feces. *MBio*, 6(6).
- Zaura, E., Keijser, B. J., Huse, S. M., & Crielaard, W. (2009). Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC microbiology*, 9, 259.
- Zeidán-Chuliá, F., & Fonseca Moreira, J. C. (2013). *Clostridium* Bacteria and its Impact in Autism Research: Thinking “Outside The Box” of Neuroscience. *Commun Disord Deaf Stud Hearing Aids* 1: 101.

- Zerbo, O., Yoshida, C., Gunderson, E. P., Dorward, K., & Croen, L. A. (2015). Interpregnancy Interval and Risk of Autism Spectrum Disorders. *Pediatrics*, 136(4), 651–657.
- Zhang, X., Zhang, D., Jia, H., Feng, Q., Wang, D., Liang, D., Wu, X., Li, J., Tang, L., Li, Y., Lan, Z., Chen, B., Li, Y., Zhong, H., Xie, H., Jie, Z., Chen, W., Tang, S., Xu, X., Wang, X., ... Wang, J. (2015). The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nature medicine*, 21(8), 895–905.
- Zheng, P., Zeng, B., Zhou, C., Liu, M., Fang, Z., Xu, X., Zeng, L., Chen, J., Fan, S., Du, X., Zhang, X., Yang, D., Yang, Y., Meng, H., Li, W., Melgiri, N. D., Licinio, J., Wei, H., & Xie, P. (2016). Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. *Molecular psychiatry*, 21(6), 786–796.
- Zwaigenbaum, L., Bryson, S. E., Brian, J., Smith, I. M., Roberts, W., Szatmari, P., Roncadin, C., Garon, N., & Vaillancourt, T. (2016). Stability of diagnostic assessment for autism spectrum disorder between 18 and 36 months in a high-risk cohort. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research*, 9(7), 790–800.

HAM VERİLER

Tablo1: Göreceli miktarı >%1 olan OTU'lar

OTU	OSB		Kontrol		t-test
	Ortalama	S.Sapma	Ortalama	S.Sapma	
Abiotrophia Firmicutes Bacilli Lactobacillales Aerococcaceae Abiotrophia	0,66	0,81	0,37	0,53	0,20
Actinobacteria Actinobacteria	3,79	3,53	3,64	3,81	0,47
Actinomyces Actinobacteria Actinobacteria Actinomycetales Actinomycetaceae Actinomycetes	1,00	1,11	1,71	2,25	0,21
Actinomycetaceae Actinobacteria Actinobacteria Actinomycetales Actinomycetaceae	1,95	1,76	2,65	2,80	0,27
Actinomycetales Actinobacteria Actinobacteria Actinomycetales	1,93	1,74	2,67	2,73	0,25
Aerococcaceae Firmicutes Bacilli Lactobacillales Aerococcaceae	0,84	0,90	0,42	0,56	0,14
Aerococcus Firmicutes Bacilli Lactobacillales Aerococcaceae Aerococcus	0,18	0,38	0,05	0,05	0,18
Alkalibacillus Firmicutes Bacilli Bacillales Bacillaceae Alkalibacillus	0,03	0,09	0,17	0,51	0,23
Bacillales Firmicutes Bacilli Bacillales	2,92	2,02	0,86	0,43	0,01
Bacilli Firmicutes Bacilli	72,04	15,30	78,67	13,81	0,18
Bacteroidaceae Bacteroidetes Bacteroidetes Bacteroidales Bacteroidaceae	0,33	0,44	0,25	0,64	0,39
Bacteroidales Bacteroidetes Bacteroidetes Bacteroidales	0,93	0,80	2,55	4,76	0,17
Bacteroides Bacteroidetes Bacteroidetes Bacteroidales Bacteroidaceae Bacteroides	0,32	0,43	0,36	0,67	0,45
Bacteroidetes Bacteroidetes Bacteroidetes	5,45	8,41	2,52	4,83	0,20
Bacteroidia Bacteroidetes Bacteroidia	0,93	0,80	2,55	4,76	0,17
Betaproteobacteria Proteobacteria Betaproteobacteria	5,94	6,95	2,90	2,76	0,14
Burkholderiales Proteobacteria Betaproteobacteria Burkholderiales	0,49	0,65	0,34	0,38	0,29
Campylobacteraceae Proteobacteria Epsilonproteobacteria Campylobacteriales Campylobacteraceae	0,55	1,51	0,00	0,00	0,17
Capnocytophaga Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnocytophaga	0,13	0,16	1,47	4,26	0,19
Carnobacteriaceae Firmicutes Bacilli Lactobacillales Carnobacteriaceae	8,56	4,84	7,85	5,05	0,39
Chryseobacterium Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Chryseobacterium	3,53	7,26	0,01	0,03	0,10
Cloacibacterium Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Cloacibacterium	0,65	1,33	0,00	0,00	0,10
Comamonadaceae Proteobacteria Betaproteobacteria Burkholderiales Comamonadaceae	0,32	0,54	0,10	0,31	0,17
Coriobacteriales Actinobacteria Coriobacteriia Coriobacteriales	0,25	0,53	0,21	0,34	0,42
Corynebacteriaceae Actinobacteria Actinobacteria Corynebacteriales Corynebacteriaceae	0,12	0,23	0,59	0,96	0,09
Corynebacteriales Actinobacteria Actinobacteria Corynebacteriales	0,14	0,26	0,59	0,95	0,10
Corynebacterium Actinobacteria Actinobacteria Corynebacteriales Corynebacteriaceae Corynebacterium	0,30	0,54	0,69	0,92	0,16
Enterococcaceae Firmicutes Bacilli Lactobacillales Enterococcaceae	1,44	1,13	0,79	0,47	0,08
Enterococcus Firmicutes Bacilli Lactobacillales Enterococcaceae Enterococcus	1,44	1,49	0,69	0,38	0,10
Firmicutes Firmicutes	73,68	15,74	80,30	12,91	0,18
Flavobacteriaceae Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae	4,71	9,13	0,08	0,09	0,09
Flavobacteriales Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales	4,52	8,74	0,08	0,09	0,09
Flavobacteriia Bacteroidetes Flavobacteriia	4,52	8,74	0,07	0,09	0,09
Fusobacteria Fusobacteria	5,39	7,28	5,62	6,35	0,47
Fusobacteriaceae Fusobacteria Fusobacteriia Fusobacteriales Fusobacteriaceae	1,10	1,14	2,53	3,21	0,12
Fusobacteriales Fusobacteria Fusobacteriia Fusobacteriales	5,39	7,28	5,62	6,35	0,47
Fusobacteriia Fusobacteria Fusobacteriia	5,39	7,28	5,62	6,35	0,47
Fusobacterium Fusobacteria Fusobacteriia Fusobacteriales Fusobacteriaceae Fusobacterium	1,09	1,12	2,46	3,16	0,12
Fusobacterium periodonticum Fusobacteria Fusobacteriia Fusobacteriales Fusobacteriaceae Fusobacterium Fusobacterium periodonticum	0,02	0,06	0,27	0,82	0,19
Gammaproteobacteria Proteobacteria Gammaproteobacteria	5,48	3,09	4,46	2,67	0,24
Gemella Firmicutes Bacilli Bacillales Gemella	2,49	2,72	0,77	0,47	0,06
Gordonia Actinobacteria Actinobacteria Actinomycetales Nocardiaceae Gordonia	0,01	0,03	0,95	2,81	0,17
Granulicatella Firmicutes Bacilli Lactobacillales Carnobacteriaceae Granulicatella	8,41	3,53	7,86	5,16	0,40
Granulicatella elegans Firmicutes Bacilli Lactobacillales Carnobacteriaceae Granulicatella Granulicatella elegans	0,55	0,38	0,12	0,34	0,01
Haemophilus Proteobacteria Gammaproteobacteria Pasteurellales Pasteurellaceae Haemophilus	4,90	2,90	4,25	2,38	0,31
Lactobacillales Firmicutes Bacilli Lactobacillales	69,13	15,04	77,82	13,92	0,12
Leptotrichia Fusobacteria Fusobacteriia Fusobacteriales Leptotrichiaceae Leptotrichia	3,85	5,60	2,66	2,90	0,30
Leptotrichiaceae Fusobacteria Fusobacteriia Fusobacteriales Leptotrichiaceae	4,34	6,23	3,14	3,32	0,32
Micrococcaceae Actinobacteria Actinobacteria Micrococcales Micrococcaceae	0,85	0,93	0,06	0,12	0,02
Micrococcales Actinobacteria Actinobacteria Micrococcales	1,09	1,17	0,15	0,26	0,03
Negativicutes Firmicutes Negativicutes	1,50	1,27	1,39	1,79	0,44
Neisseria Proteobacteria Betaproteobacteria Neisseriales Neisseriaceae Neisseria	5,34	6,48	2,47	2,82	0,14
Neisseria cinerea Proteobacteria Betaproteobacteria Neisseriales Neisseriaceae Neisseria Neisseria cinerea	0,11	0,19	0,15	0,40	0,42
Neisseria perflava Proteobacteria Betaproteobacteria Neisseriales Neisseriaceae Neisseria Neisseria perflava	0,33	0,66	0,00	0,00	0,10
Neisseria zophophila Proteobacteria Betaproteobacteria Neisseriales Neisseriaceae Neisseria Neisseria zophophila	0,27	0,37	0,00	0,00	0,04
Neisseriaceae Proteobacteria Betaproteobacteria Neisseriales Neisseriaceae	5,49	6,63	2,58	2,81	0,14
Neisseriales Proteobacteria Betaproteobacteria Neisseriales	5,45	6,67	2,56	2,79	0,14
Pasteurellaceae Proteobacteria Gammaproteobacteria Pasteurellales Pasteurellaceae	5,49	3,13	4,69	2,36	0,28
Pasteurellales Proteobacteria Gammaproteobacteria Pasteurellales	5,33	3,02	4,65	2,32	0,31
Prevotella Bacteroidetes Bacteroidia Bacteroidales Prevotellaceae Prevotella	0,29	0,45	0,61	0,80	0,17
Prevotellaceae Bacteroidetes Bacteroidetes Bacteroidales Prevotellaceae	0,58	0,68	2,28	4,18	0,13
Prevotellamassilia Bacteroidetes Bacteroidetes Bacteroidales Prevotellaceae Prevotellamassilia	0,13	0,26	1,40	3,37	0,15
Propionibacteriaceae Actinobacteria Actinobacteria Propionibacteriales Propionibacteriaceae	0,22	0,40	0,04	0,07	0,11
Propionibacteriales Actinobacteria Actinobacteria Propionibacteriales	0,24	0,41	0,03	0,07	0,10
Proteobacteria Proteobacteria	11,57	9,01	7,65	3,06	0,13
Pseudopropionibacterium Actinobacteria Actinobacteria Actinomycetales Propionibacteriaceae Pseudopropionibacterium	0,22	0,39	0,03	0,07	0,11
Rothia Actinobacteria Actinobacteria Micrococcales Micrococcaceae Rothia	0,89	1,07	0,88	0,62	0,49
Schaalia Actinobacteria Actinobacteria Actinomycetales Actinomycetaceae Schaalia	0,74	0,91	0,93	0,83	0,33
Sebadella Fusobacteria Fusobacteriia Fusobacteriales Leptotrichiaceae Sebadella	0,19	0,47	0,01	0,03	0,16
Selenomonadaceae Firmicutes Negativicutes Selenomonadales Selenomonadaceae	0,17	0,48	0,00	0,00	0,17
Selenomonadales Firmicutes Negativicutes Selenomonadales	0,19	0,47	0,00	0,00	0,14
Selenomonas Firmicutes Negativicutes Selenomonadales Selenomonadaceae Selenomonas	0,17	0,47	0,00	0,00	0,17
Streptobacillus Fusobacteria Fusobacteriia Fusobacteriales Leptotrichiaceae Streptobacillus	0,25	0,53	0,35	0,60	0,35
Streptococcaceae Firmicutes Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae	59,04	14,44	67,77	15,24	0,12
Streptococcus Firmicutes Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Streptococcus	57,02	14,29	65,71	15,40	0,12
Streptococcus anginosus SK52 = DSM 2563 Firmicutes Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Streptococcus Streptococcus anginosus SK52 = DSM	0,61	0,41	0,13	0,30	0,01
Streptococcus cristatus AS 1.389 Firmicutes Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Streptococcus Streptococcus cristatus AS 1.389	0,96	0,82	0,25	0,41	0,02
Streptococcus lactarius Firmicutes Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Streptococcus Streptococcus lactarius	0,03	0,09	0,25	0,74	0,21
Streptococcus mitis Firmicutes Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Streptococcus Streptococcus mitis	0,77	0,71	0,14	0,23	0,02
Streptococcus oralis subsp. dentisani Firmicutes Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Streptococcus Streptococcus oralis subsp. dentisani	3,77	1,69	1,58	2,83	0,04
Streptococcus pneumoniae Firmicutes Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Streptococcus Streptococcus pneumoniae	0,54	0,54	0,12	0,34	0,04
Streptococcus ruminantium Firmicutes Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Streptococcus Streptococcus ruminantium	0,45	0,51	0,16	0,35	0,10
Trichococcus Firmicutes Bacilli Lactobacillales Carnobacteriaceae Trichococcus	0,31	0,43	0,17	0,11	0,19
Veillonella Firmicutes Negativicutes Veillonellales Veillonellaceae Veillonella	1,28	1,22	1,35	1,77	0,46
Veillonellaceae Firmicutes Negativicutes Veillonellales Veillonellaceae	1,36	1,34	1,39	1,81	0,48
Veillonellales Firmicutes Negativicutes Veillonellales	1,31	1,24	1,39	1,79	0,46

Tablo 2: Alfa çeşitlilik değerleri

```
> estimate_richness(physeq1, split = TRUE, measures = NULL)
```

	observed	Chao1	se.chao1	ACE	se.ACE	Shannon	Simpson	InvSimpson	Fisher
sa1	33	33	0	33	2.860388	1.5282293	0.6310341	2.710278	4.289314
sa2	16	16	0	16	1.936492	1.1519246	0.4905846	1.963034	1.856025
sa3	23	23	0	23	2.395648	1.5724411	0.6888469	3.213852	2.813060
sa4	40	40	0	NaN	NaN	2.1101764	0.6964514	3.294366	5.262216
sa5	32	32	0	NaN	NaN	1.0555970	0.3947799	1.652291	4.102542
sa6	60	60	0	60	3.766077	2.2256953	0.7745142	4.434868	8.452536
sa7	25	25	0	NaN	NaN	2.0485903	0.7514839	4.023884	3.103477
sa8	53	53	0	NaN	NaN	2.2734411	0.7944629	4.865301	7.346939
sa9	28	28	0	NaN	NaN	1.1265320	0.3865519	1.630130	3.521324
sa10	36	36	0	NaN	NaN	1.5202038	0.5478237	2.211527	4.691454
sa11	26	26	0	NaN	NaN	1.5272062	0.5322772	2.138019	3.309475
sa12	27	27	0	27	2.372684	2.2863387	0.8552166	6.906868	3.318355
sa13	22	22	0	22	2.256304	1.2258596	0.5051419	2.020781	2.669613
sa14	19	19	0	19	2.152110	0.5812573	0.2080289	1.262672	2.259263
sa15	27	27	0	27	2.509242	0.9169948	0.4035194	1.676500	3.378194
sa16	30	30	0	30	2.639444	1.5582298	0.5653137	2.300509	3.804624
sa17	45	45	0	45	3.211092	1.7850520	0.6273626	2.683574	6.077982
sa18	35	35	0	35	2.956832	1.3135750	0.4782971	1.916800	4.532997

FORMLAR

HASTA DEĞERLENDİRME FORMLARI

ÇÜRÜK AKTİVİTE TESTİ (ÇAT) İSTEK FORMU 0-5 yaş Çürük Risk Değerlendirme

İ Ü Diş Hekimliği Fakültesi Mikrobiyoloji BD, 34093, Çapa, İstanbul. Tel:02124142595

Tarih:.....

Çocuğun adı soyadı:..... Cinsiyeti: Erkek ☐ Kız ☐

Doğum tarihi:.....

Anne/bakıcının adı soyadı Telefon numarası:.....

ÇAT Paketi Diş durumu/Çürük Kayıt Formu

		55	54	53	52	51	61	62	63	64	65
o											
m											
b											
d											
l											
o											
m											
b											
d											
l											
		85	84	83	82	81	71	72	73	74	75

sağlam	A
Çürük/beyaz lezyon	B/B*
dolgu & çürük	C
dolgu, çürüksüz	D
çürüğe bağlı çekim	E
diğer sebeplerle çekim	-
fissür örtücü	-
Kuron, köprü ayağı	G
sürmemiş	-
diğer	-

dmft: Çürük _____ Çekilmiş _____ Dolgu _____ = _____
dmfs: Çürük _____ Çekilmiş _____ Dolgu _____ = _____

G & V OHI-S Plak İndeksi

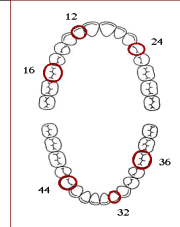
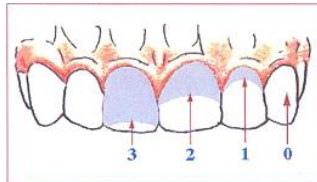
55	51	65	75	71	85	Toplam	Sayı	İndeks
buk	lab	buk	ling	lab	ling			

Loe&Silness Gingival İndeks

55	51	65	75	71	85	Toplam	Sayı	İndeks

Skor	Kriterler
0	Plak veya boya yok
1	Diş yüzeyinin üçte birinden fazla olmayan plak, veya boyanmış alan varlığı
2	Diş yüzeyinin üçte birinden fazla, üçte ikisinden az plak varlığı
3	Diş yüzeyinin üçte ikisinden fazla plak varlığı

Skor	Kriterler
0	İnflamasyon yok
1	Hafif inflamasyon; hafif renk değişimi, hafif ödem, sondalamada kanama yok
2	Orta düzeyde inflamasyon; kızarıklık, sondalamada kanama
3	Şiddetli inflamasyon; belirgin kızarıklık ve ödem; kendiliğinden kanama



KONTROL GRUBU VERİ FORMU

Dahil olma kriterleri:

- Erkek ☐
- Aşılanma ☐
- Süt dişlenme dönemi ☐
- GI komorbidite olmaması ☐
- Sezaryen doğum ☐
- Kronik hastalık olmaması ☐
- Nörolojik hastalık olmaması ☐
- Genetik hastalık olmaması ☐
- DEHB tanısı yok ☐
- Son 3 ay içerisinde antibiyotik/antifungal kullanılmamalı ☐
- İlaç kullanmamalı ☐
- OSB'li kardeşi yok ☐

ÇALIŞMA GRUBU VERİ FORMU

Dahil olma kriterleri:

- Erkek ☐
- Aşılanma ☐
- Süt dişlenme dönemi ☐
- GI komorbidite olmaması ☐
- Sezaryen doğum ☐
- Kronik hastalık olmaması ☐
- Nörolojik hastalık olmaması ☐
- Genetik hastalık olmaması ☐
- DEHB tanısı yok ☐
- Son 3 ay içerisinde antibiyotik/antifungal kullanılmamalı ☐
- İlaç kullanmamalı ☐

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ ÇOCUK RUH SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI
OTİZM BİRİMİ

ÇOCUKLUK OTİZMİ PUANLAMA ÖLÇEĞİ

Yönergeler: ölçeğin her bir maddesi ile ilişkili davranışları puanlayın. 15 puan ekleyin ve sondaki ölçeği kullanın.

1. İnsanlarla İlişki	
2. Taklit	
3. Duygusal Tepki	
4. Vücut Kullanımı	
5. Nesne Kullanımı	
6. Değişikliklere Uyum Sağlama	
7. Görsel Tepki	
8. Dinleme Tepkisi	
9. Tad, Koku Ve Dokunma Tepkileri Ve Kullanımı	
10. Korku Veya Ürkeklik	
11. Sözel İletişim	
12. Sözel Olmayan İletişim	
13. Etkinlik Düzeyi	
14. Entellektüel Yanıtın Düzeyi Ve Uygunluğu	
15. Genel İzlenimler	
<u>TOPLAM</u>	

15-29 Otizm yok
30-36 Hafif-Orta Derecede Otistik
37-60 Aşırı Derecede Otistik

1. İNSANLARLA İLİŞKİ

1 İnsanlarla ilişkisinde güçlük veya anormallik kanıtı yok. Çocuğun davranışları yaşına uygun. Yapacağı şeyler anlatıldığında biraz utanma, mızımlık veya sıkıntı gözlenebilir, fakat atipik derecede değildir.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal ilişkiler. Çocuk yetişkinin gözüne bakmaktan kaçınabilir, ilişkiye zorlandığında yetişkinden kaçınabilir veya mızımlık yapabilir, aşırı utangaç olabilir, tipik olarak yetişkine yanıt vermeyebilir veya aynı yaştaki çocuklardan biraz daha fazla olarak anne babaya yapışkanlık gösterebilir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal ilişkiler. Çocuk çoğu zaman soğuk (uzak)(yetişkinin farkında değilmiş gibi gözüktür) tur. Çoğu zaman çocuğun dikkatini çekmek için ısrarcı ve zorlu çabalar gerekir. Az derecede ilişki çocukla yapılabilir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Aşırı derecede anormal ilişkiler. Çocuk belirgin derecede uzak ve soğuktur veya yetişkinin yaptıkları şeylerin farkında değildir. Hemen hemen hiç yetişkine yanıt vermez veya ilişki başlatmaz. Çok ısrarcı çabalarla bile çocuğun dikkati hiçbir şekilde çekilemez.

GÖZLEMLER;

2. TAKLİT

1 Uygun taklit. Çocuk beceri düzeyine uygun olan sesleri, kelimeleri ve hareketleri taklit edebilir.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal taklit. Çoğu zaman çocuk alkış veya tek cümlelik basit davranışları taklit edebilir; nadiren zorlama veya özendirme sonrası veya gecikmeli olarak taklit eder.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal taklit. Çocuk yalnızca yetişkinin büyük ısrarı ve yardımı olduğu zamanlarda taklit eder; sıklıkla yalnızca bir gecikme sonrası taklit eder.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Aşırı derecede anormal taklit. Yetişkinin özendirme, zorlama ve yardımı olsa bile, ses, kelime veya hareketleri nadiren veya hiç taklit etmezler.

GÖZLEMLER;

3. DUYGUSAL TEPKİ

1 Yaş ve duruma uygun duygusal tepkiler. Çocuk, yüz ifadesi, duruş ve tarzında bir değişikliğin görüldüğü, uygun tip ve derecede duygusal tepki gösterir.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal duygusal tepkiler. Çocuk nadiren biraz uygunsuz tip ve derecede duygusal tepkiler gösterir. Tepkiler bazen çevresindeki nesne veya olaylarla ilişkisizdir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal duygusal tepkiler. Çocuk belirgin şekilde uygunsuz tip ve/veya derecede duygusal tepki gösterirler. Tepkiler oldukça kaçınan veya aşırı ve durumla ilişkisiz olabilir; grimas, gülme olabilir veya belirgin duygusal tepki oluşturan nesne veya olaylar olmasa bile katı olabilir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Aşırı derecede anormal duygusal tepkiler. Tepkiler nadiren duruma uygundur. Çocuk belirli duygu duruma geldiğinde, duygu durumunu değiştirmek çok zordur. Ters olarak hiçbir değişiklik olmadığı zaman çok farklı duygulanımlar gösterebilir.

GÖZLEMLER;

4. VÜCUT KULLANIMI

1 Yaşa uygun vücut kullanımı, çocuk aynı yaştaki normal çocuklarla aynı kolaylık, çeviklik ve koordinasyonla hareket eder.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal vücut kullanımı, bazı minör tuhafliklar olabilir, örneğin sakarlık, tekrarlayıcı davranışlar, zayıf koordinasyon veya nadiren daha olağandışı davranışların gözlenmesi.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal vücut kullanımı. Bu yaş çocuğu için açıkça tuhaf veya olağandışı davranışlar şunlar olabilir: garip parmak hareketleri, acayip parmak veya vücut postürü, vücudu dikleştirme veya toplama, kendine yönelik saldırganlık, sallanma, kendi etrafında dönme, parmak oynatma veya parmak uçlarında yürüme.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Orta derecede anormal vücut kullanımı, yukarıda sayılan davranışları yoğun veya sık göstermesi. Bu davranışlar engellemeye çalışma veya diğer etkinliklere çocuğu katılmasına rağmen devam edebilir.

GÖZLEMLER;

5. NESNE KULLANIMI

1 Oyuncak ve diğer nesnelerle ilgilenme ve uygun kullanma, beceri düzeylerine uygun oyuncak ve diğer nesnelere uygun ilgi gösterme ve bu oyuncakları uygun tarzda kullanma.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Oyuncak ve diğer nesnelere ilgi ve kullanmada hafif derece uygunsuzluk, çocuk bir oyuncakça atipik ilgi gösterebilir veya uygunsuz çocuksu tarzda oynayabilir (örneğin, oyuncakçı etrafa çarpma veya emme)

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Oyuncak ve diğer nesnelere ilgi ve kullanmada orta derece uygunsuzluk, çocuk oyuncak ve diğer nesnelere az ilgi gösterebilir veya bazı tuhaf şekilde bir oyuncak veya nesne kullanarak zaman geçirir. Oyuncakın önemsiz bir parçasına odaklanabilir, ısıklı saçan nesnelere hayranlık duyabilir, nesnenin bir kısmın tekrarlayıcı bir tarzda hareket ettirebilir, veya bir obje ile sürekli oynayabilir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Oyuncak ve diğer nesnelere ilgi ve kullanmada aşırı derece uygunsuzluk, çocuk yukarıda bahsedilen davranışları yoğunluk ve sıklık olarak daha fazla gösterir. Çocuğu bu uygunsuz etkinliklerden ayırmak güçtür.

GÖZLEMLER;

6. DEĞİŞİKLİKLERE UYUM SAĞLAMA

1 Değişikliklere yaşına uygun tepki- günlük sıradanlıktan değişiklik gösterdiği zaman, çocuk büyük bir sıkıntı göstermeksizin, bu değişiklikleri kabul eder.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Değişikliklere uyumda hafif derecede anormallik-yetişkin görevleri değiştirmeye çalıştığında, çocuk aynı aktivitesine devam edebilir veya aynı materyali kullanabilir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Değişikliklere uyumda orta derecede anormallik-çocuk rutinden olan değişikliklere aktif olarak direnç gösterir veya eski etkinliğine devam etmeye çalışır. Ve onu bu etkinlikten uzaklaştırmak güçtür. Rutini değiştirildiği zaman kızgın veya mutsuz olabilir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Değişikliklere uyumda aşırı derecede anormallik-çocuk değişikliklere aşırı tepki gösterir. Değişiklik için zorlandığında, aşırı kızgın veya bozulmuş işbirlikçi olur ve öfke nöbetleri gösterir.

GÖZLEMLER;

7. GÖRSEL TEPKİ

1 yaşına uygun görsel tepki-çocuğun görsel davranışı normaldir ve yaşına uygundur. görme, yeni bir nesneyi araştırma şekli olarak diğer duyularla birlikte kullanılır.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal görsel tepki- çocuk nesnelere bakmayı çok daha nadiren hatırlar. Çocuk arkadaşlarından çok aynalara veya ışıklara bakmakla daha ilgili olabilir. Nadiren boşluğa bakıp durabilir veya insanların gözüne bakmaktan da kaçınabilir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal görsel tepki-yaptığı şeye büyük olasılıkla bakmaktadır. Boşluğa bakıp durabilmektedir, insanların gözlerine bakmaktan kaçınmaktadır, nesnelere olağandışı açıdan bakmaktadır veya neneleri tutmak için gözlerini çok yaklaştırmaktadır.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Aşırı derecede anormal görsel tepki-çocuk belirgin derecede insanlara ve belirli nesnelere bakmaktan kaçınır ve yukarıda sayılan diğer görsel tuhafılıkların ileri şekilleri gözlenebilir.

GÖZLEMLER;

8. DİNLEME TEPKİSİ

1 Yaşına uygun dinleme tepkisi-çocuğun dinleme davranışı normaldir ve yaşına uygundur. dinleme diğer duyularla birlikte kullanılır.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal dinleme tepkisi-tepkide kısmi eksiklikler olabilir veya belli seslere hafif aşırı tepkiler olabilir. Seslere tepkiler gecikmiş olabilir ve çocuğun dikkatini çekmek için sesleri tekrarlamak gerekebilir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal dinleme tepkisi-çocuğun seslere tepkisi çeşitlidir; sıklıkla ilk bir kaç kez duyduğu seslere karşı umursamazdır; her gün duyduğu sesleri işittiğinde irkilebilir veya kulaklarını kapayabilir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 İleri derecede anormal dinleme tepkisi-çocuk seslere karşı, sesin tipine bakmaksızın, aşırı tepki gösterir ve/veya hiç tepki göstermez.

GÖZLEMLER;

9. TAD, KOKU VE DOKUNMA TEPKİLERİ VE KULLANIMI

1 Tat, koku ve dokunmayı normal kullanma ve normal tepki-çocuk yeni nesneleri yaşına uygun bir tarzda araştırır, genellikle hissederek ve bakarak. Uygun olduğunda tat ve koku kullanılabilir. Az bir ağrıya reaksiyon olduğunda çocuk rahatsızlığını ifade eder fakat aşırı tepki göstermez.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Tat, koku ve dokunmayı hafif derecede anormal kullanma ve tepki-çocuk nesneleri ağzına götürmekte ısrarcı olabilir; yenmeyen nesneleri koklayabilir veya tadabilir; hafif bir acıya normal çocuğun gösterdiği huzursuzluğu göstermeyebilir veya aşırı gösterebilir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Tat, koku ve dokunmayı orta derecede anormal kullanma ve tepki-çocuk nesne ve insanlara dokunma, koklama veya tatma ile orta derecede meşgul olur. Acıya ya çok tepki veya çok çok az tepki gösterir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Tat, koku ve dokunmayı ileri derecede anormal kullanma ve tepki- çocuk nesne ve insanlara dokunma, koklama veya tatma ile aşırı derecede meşgul olur. Acıya ya aşırı tepki veya hiç tepki göstermez.

GÖZLEMLER;

10. KORKU VEYA ÜRKEKLİK

1 Normal korku veya ürkeklik-çocuğun davranışı hem durum hem de yaşıyla uygundur.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal korku veya ürkeklik-aynı yaştaki bir çocuğun benzer ortamda gösterdiği tepkiyle karşılaştırıldığında, çocuk çok az korku ve ürkekliği sık gösterir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal korku veya ürkeklik- aynı yaştaki bir çocuğun benzer ortamda gösterdiği tepkiyle karşılaştırıldığında, çocuk oldukça çok az veya çok fazla korku ve ürkekliği sık gösterir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Aşırı derecede anormal korku veya ürkeklik- aynı yaştaki bir çocuğun benzer ortamda gösterdiği tepkiyle karşılaştırıldığında, çocuk oldukça çok az veya çok fazla korku ve ürkekliği sık gösterir.

GÖZLEMLER;

11. SÖZEL İLETİŞİM

1 Yaş ve duruma uygun normal sözel iletişim

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal sözel iletişim-konuşma bütünüyle geridir. Konuşmanın çoğu anlamlıdır; bazen ekolali veya zamiri ters kullanma olabilir. Nadiren bazı tuhaf kelimeler veya jargon kullanabilir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal sözel iletişim-konuşma olmayabilir. Var olduğunda, sözel iletişimde bazı anlamlı konuşma içinde jargon, ekolali veya zaminin ters kullanımı gibi tuhaf konuşması olabilir. Anlamlı konuşmadaki tuhafliklar aşırı soru sorma veya özel bir konu ile aşırı uğraşmayı da içerir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 İleri derecede anormal sözel iletişim-anlamlı konuşması olmaz. Çocuk bebeksi sesler, tuhaf veya hayvansı sesler, konuşmayı andıran karmaşık sesler çıkarabilir, veya bazı anlaşılabilir kelimelerin veya cümleciklerin ısrarlı bizar kullanımı olabilir.

GÖZLEMLER;

12. SÖZEL OLMAYAN İLETİŞİM

1 Yaş ve duruma uygun normal sözel olmayan iletişim

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal sözel olmayan iletişim kullanma-sözel olmayan iletişimin immatur kullanımı çocuğun istediği şeye işaret eden jestlerde yalnızca belirsizlik olabilir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal sözel olmayan iletişim kullanma-çocuk gereksinim veya arzularını nonverbal olarak belirtememektedir, ve diğerlerinin sözel olmayan iletişimlerini anlayamamaktadır.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 İleri derecede anormal sözel olmayan iletişim kullanma-çocuk yalnızca açık anlamı olmayan bizar veya tuhaf jestler kullanır veya başkalarının jestlerinin veya yüz ifadeleri ile ilişkili anlamların farkında değilmiş gibi gözükür.

GÖZLEMLER;

13. ETKİNLİK DÜZEYİ

1 Yaşam ve şartlara uygun normal etkinlik düzeyi-çocuk benzer durumdaki aynı yaş normal çocuğa göre çok veya az etkin değildir.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal etkinlik düzeyi-çocuk hafif derecede hareketli veya biraz tembel olabilir ve çoğu zaman yavaş hareket eder. Çocuğun etkinlik düzeyi onun performansının hafif derecede etkiler.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal etkinlik düzeyi-çocuk çok aktif ve kısıtlanması güç olabilir. Sınırsız bir enerjiye sahip olabilir ve gece kolayca uyumaya gitmeyebilir. Ters olarak çocuk oldukça uyuşuk olabilir ve onu hareket ettirmek için sürekli çaba gerekir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 İleri derecede anormal etkinlik düzeyi-çocuk aşırı aktivite ya da aşırı inaktivite gösterir ve bir uçtan diğer uca kaymalar gösterebilir.

GÖZLEMLER;

14. ENTELLEKTÜEL YANITIN DÜZEYİ VE UYGUNLUĞU

1 Normal ve pek çok alanda uygun tutarlılık gösteren zeka: Çocuk aynı yaştaki tipik çocuklar kadar zekidir ve olağandışı zihinsel becerileri ya da problemleri yoktur.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal zihinsel işlevsellik: Çocuk aynı yaştaki tipik bir çocuk kadar zeki değildir, yaklaşık tüm alanlarda beceriler aynı düzeyde gerilik gösterir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal zihinsel işlevsellik: Çocuk genel olarak aynı yaştaki tipik bir çocuk kadar zeki değildir, ancak bir yada daha fazla alanda normale yakın işlevsellik gösterebilir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Ağır derecede anormal zihinsel işlevsellik: çocuk aynı yaştaki tipik bir çocuk kadar zeki değilken, zihinsel gelişimim bir ya da daha fazla alanında normal bir çocuktan bile daha iyi işlev gösterebilir.

GÖZLEMLER;

15. GENEL İZLENİMLER

1 Otizm yok: Çocuk otizme ait belirtilerin hiçbirini göstermez.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif otizm: çocuk yalnızca az sayıda yada yalnızca hafif derecede otizm belirtileri gösterir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede otizm: çocuk belirli sayıda yada orta derecede otizm belirtileri gösterir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Ağır otizm: Çocuk otizm belirtilerinden çoğunu ya da ağır derecede otizm gösterir.

GÖZLEMLER;

GÖNÜLLÜ OLUR FORMU METNİNDE BULUNMASI GEREKENLER

“Bu gereklilikleri yerine getirirken, araştırmanın amacı ve yöntemine göre gönüllü olur formunun gerektiğinde hastaların yanı sıra çocuklar, kısıtlılar ve bilinci kapalı bireyler gibi onam yeteneği olmayan ya da kısıtlı olanlar, hasta yakınları, ve sağlıklı kişiler için ayrı ayrı ve dili tıbbi kelimelerden arındırılarak, katılımcıların anlayabileceği şekilde hazırlanmasına özen gösterilmelidir”

I-Araştırmayla İlgili Bilgi Verilmesi ;(bu bölüm hastanın anlayabileceği bir dille tıbbi terimlerden kaçınarak yazılmalıdır)

- Adı: Süt Dişlenme Dönemindeki Çocukların Ağız Mikrobiyotasının Otizm Spektrum Bozuklukları İle İlişkisinin Değerlendirilmesi
- Amacı : Bu çalışmada, otizm spektrum bozukluğu bulunan çocuklarda ve sağlıklı çocuklarda ağız mikrobiyomunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. 3-6 yaş arası süt dişlenme döneminde otizm spektrum bozukluğu bulunan ve sağlıklı kontrol grubu çocuklardan elde edilen dental plak örnekleri analiz edilerek ağızdaki bakteri çeşitliliği ve ilişkisi incelenecektir.
- Neler uygulanacağı : Bu çalışmaya katılmayı kabul etmeniz durumunda çocuğunuzun ayrıntılı bir ağız içi muayenesi yapılarak, dişlerde çürük varlığı ve miktarı, mevcut restorasyonlar, dişeti sağlığı gibi özellikler açısından değerlendirilecektir. Çocuğunuzun dişleri üzerinde bulunan plak incelenecektir. Bu çalışmaya sizin ve çocuğunuzun katılıp katılmaması tamamen sizin kendi iradeniz ile vereceğiniz karara bağlıdır.
- Nasıl uygulanacağı: Çalışma esnasında steril standart muayene takımları kullanılarak çocuğunuzun ağız içi muayeneleri yapılacaktır.
- Hangi yöntem/lerle gerçekleştirileceği: Bu çalışmada kullanılan klinik muayene yöntemleri rutin diş hekimliği muayene yöntemleri ile aynıdır. Dental plak örnekleri sterilizasyon koşulları göz önünde bulundurularak alınacaktır. Bu nedenle çalışmanın herhangi bir riskinin söz konusu olmayacağı düşünülmektedir. Herhangi bir fiziksel yaralanma oluşmaması için gereken her türlü özen ve hassasiyet gösterilecektir.
- Çıkabilecek istenmeyen etkilerini ve risklerini: Çalışmanın herhangi bir riskinin söz konusu olmayacağı düşünülmektedir.
- Ortaya çıkan istenmeyen etki ve risklerin tedavi edilebilirliğini : Ayrıntılı ağız içi muayene sonrası ağız hijyeninin iyileştirilmesine ve koruyucu tedavilere yönelik bilgilendirmeler yapılacak, tedavi gereksinimi varsa bununla ilgili bilgi verilecek ve gerekli yönlendirmeler yapılacaktır.
- Bilime ve tıbbı katkıları: Bu araştırmanın sonucunda OSB’li çocukların ağız mikrobiyomlarında görülebilecek olası farklılıkların belirlenmesi ve bu farklılıklara yönelik geliştirilebilecek ve mikrobiyomu olumlu etkileyebilecek yeni ürünlerin tasarlanmasına yönelik belirleyicilerin saptanması hedeflenmektedir. Ayrıca kültürden bağımsız metagenomik analizler ile kültüre edilemeyen bakterilerin tanımlanabilmesi sayesinde, çocuklarda oral mikrobiyomun daha kapsamlı incelenmesi amaçlanmaktadır.

- Süresi: Bu çalışmaya katılmaya karar verirseniz muayene ve anamnez işlemi yaklaşık olarak 10 dakika, dental plak örneği alınması yaklaşık 15 dakika sürecektir.
- Yaklaşık katılımcı sayısı (Çok merkezli ise kurum ve toplam katılımcı sayısını): Araştırmaya katılacak gönüllü sayısı **18** dir. Araştırmamız İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü olmak üzere iki kurumda gerçekleştirilecektir.

II-Gönüllünün Haklarıyla İlgili Bilgi Verilmesi

- İstedığınız takdirde başlangıçta çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. İstedığınız takdirde araştırmacıya haber vererek çalışma kapsamı dışında kalabileceği gibi araştırmacı tarafından gerek görüldüğünde araştırma dışı da bırakılabilirsiniz. Çalışma kapsamı dışında kalmanız İ.Ü.Diş Hekimliği Fakültesi'nin tedavi hizmetlerinden yararlanmanızı etkilemeyecektir.
- Katılımcı, araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmeyecektir. Ayrıca katılımcıya da bir ödeme yapılmayacaktır.
- Katılımcılardan alınacak numuneler (serum vs.) yalnızca adı geçen çalışmada kullanılacaktır.
[Süt Dişlenme Dönemindeki Çocukların Ağız Mikrobiyotasının Otizm Spektrum Bozuklukları İle İlişisinin Değerlendirilmesi] araştırması kapsamında alınan biyolojik örneklerimin (kan, idrar vb.)
☐Sadece yukarıda bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.
- Size ve çocuğunuza ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

Katılımcının/Hastanın Beyanı

(Bu bölüm hazırlanan gönüllü olur formunun sonuna eklenmelidir)

Sayın Prof.Dr. Gamze Aren tarafından İ.Ü. Diş Hekimliği Fak. Pedodonti A.D.'da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence

verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte Prof.Dr. Gamze Aren'i, 0212 414 20 20/30250 'den arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.



ETİK KURUL KARARI



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**



Sayı :306

28.06.2018

Konu : Prof.Dr.Gamze Aren

**Sayın Prof.Dr.Gamze Aren
Pedodonti Anabilim Dalı**

İlgi: İÜ Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı 'nın 20/06/2018 gün ve 212424 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz 2018/63 dosya nolu "Süt Dişlenme Dönemindeki Çocukların Ağız Mikrobiyotasının Otizm Spektrum Bozuklukları İle İlişisinin Değerlendirilmesi " başlıklı çalışma kurulumuzun 28/06/2018 tarih ve 72 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Gereğini Bilgilerinize rica ederim.

**Prof.Dr. Faruk Haznedaroğlu
İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Klinik
Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı**

Eki: İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

SÜT DİŞLENME DÖNEMİNDEKİ ÇOCUKLARIN AĞIZ MİKROBİYOTASININ OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUKLARI İLE İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

% 11	% 6	% 4	% 7
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 4
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Eastern Mediterranean University Öğrenci Ödevi	% 1
4	burkonturizm.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	TUTAR, Esen, KÖKSALAN, Elif and AKYOL, İsmail. "Gıdalarda Bulunan Mikrobiyal Patojenlerin Karakterizasyonunda ", Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, 2015. Yayın	<% 1
7	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gülsevim	Soyadı	Usta
Doğ.Yeri	Giresun	Doğ.Tar.	21.12.1992
Email	gulsevimusta@gmail.com	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi- Pedodonti AD	-
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2015
Lisans	İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2015
Lise	Hamdi Bozbağ Anadolu Lisesi	2010

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Diş Hekimi (Dokt. Öğr.)	İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı	2016-Halen
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce					Yöktil : 86,25

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	80,7	83,5	74,8
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office (Word, Excel, Powerpoint)	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):