

1900'LÜ YILLARA AİT DIŞ TAŞI ÖRNEĞİNDE MOLEKÜLER BAKTERİ ANALİZLERİ İLE BESLENME VE HASTALIK DURUMLARININ İRDELENMESİ

İHüseyin Gündüğüoğlu¹, İHakan Yılmaz², İSerap KeskinTunç³, İSabahattin Erdoğan⁴, İMikail Ercek⁵

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Van

²Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Edebiyat Fakültesi, Arkeoloji, Van

³Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi, Van

⁴Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Edebiyat Fakültesi, Arkeoloji, Van

⁵Ahlat Müze Müdürlüğü, Müze Müdürü, Bitlis

ÖZET

Amaç: Tepeköy Höyük kurtarma kazıları Muş ili ile Varto ilçesi yakınlarında Tepeköy köyünde gerçekleşmiştir. Bu bölgeye ait dört kafatasındaki tarihi diş taşlarından örnek alınmasına rağmen sadece bir bireyde DNA analizi yapılabilmüş ve buna göre bu bireyin maruz kaldığı bakterilere bağlı fizyolojik özellikleri ve hastalıkları konusunda tahminde bulunabilmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmanın gerçekleştiği bireyin 20-35 yaş aralığında öldüğü, 151-162 cm arasında bir boya sahip olduğu, omurlarında hafif derecede kemik osteofitleri bulunduğu gözlenmiştir. Bireyin diş taşı örneği temiz alüminyum folyo üzerine toplandı. Daha sonra steril vidalı tüpe aktarıldı. Numune dekontaminasyonu için UV ışınlaması, dış yüzeyin temizliği ve dekontaminasyonu için ağartıcı işlem kullanıldı (%4 ağartıcı, sodyum hipoklorit, NaClO), steril bir kapta (petri kabı) beş dakikaya kadar havada kurumaya bırakıldı. Numune toz haline getirildikten sonra, steril bir vidalı kapaklı tüpe döküldü. MagPurix

Bacterial DNA Extraction Kit kullanılarak, MagPurix (Zinexts, Taiwan) cihazında izolasyon işlemi yapıldı. Buna göre çalışmak için getirilen dört örnekten sadece birinde DNA elde edildi. 16S r-RNA izolasyonu ve Nanopore Dizi Analizi için Oxford Nanopore Teknolojisi (England) kullanıldı. Daha sonra bioinformatik analiz ile cins düzeyine kadar bakteri analizi yapıldı.

Bulgular: Bakteri şube düzeyinden cins düzeyine kadar sınıflandırılmış ve bu sınıflarda ilk sırayı şu bakteriler almıştır. Şube düzeyinde; Firmicutes %52,74, sınıf düzeyinde; Clostridia %31,55, takım düzeyinde; Clostridiales %31,55, aile düzeyinde; Ruminococcaceae %24,29, tür düzeyinde; Ralstonia %21,48, ilk sırayı almışlardır.

Sonuç: Elde edilen bakteriler aracılığı ile bu bireyin fizyolojik özellikleri ve hastalıkları konusunda bağlantılı kurulmuş olup bu kişinin obez, diabete eğimli ve özellikle beslenme şekli olarak tahılla beslendiği öngörüsünde bulunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Tarihi, diş taşı, moleküler.

C	İLETİŞİM İÇİN: Hüseyin Gündüğüoğlu Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tuşba, Van hguducu@hotmail.com		
ORCID	HG https://orcid.org/0000-0003-1101-9017	ORCID	HY https://orcid.org/0000-0002-2399-5085
ORCID	SE https://orcid.org/0000-0002-1957-0279	ORCID	ME https://orcid.org/0000-0001-9866-9463
✓	GÖNDERİLDİĞİ TARİH: 02 / 12 / 2021 • KABUL TARİHİ: 17 / 01 / 2022		

INVESTIGATION OF NUTRITION AND DISEASE CONDITIONS WITH MOLECULAR BACTERIA ANALYSIS IN A DENTAL CALCULUS SAMPLE FROM 1900S

ABSTRACT

Objective: Tepeköy Höyük salvage excavations were carried out in the village of Tepeköy, near Muş province and Varto district. Although samples were taken from the historical dental calculus in four skulls from this region, only one individual could be analyzed for DNA, and accordingly, the physiological characteristics and diseases related to the bacteria that this individual was exposed to could be predicted.

Material and Method: It was observed that the subject of the study died between the ages of 20-35, had a height between 151-162 cm, and had mild bone osteophytes in his vertebrae. The dental calculus sample of the individual was collected on clean aluminum foil. It was then transferred to a sterile screw tube, UV irradiation was used for the sample decontamination, the bleach process was used for the cleaning and decontamination of the outer surface (4%

bleach, sodium hypochlorite, NaClO), allowed to air dry in a sterile container (petri dish) for up to five minutes, sample powder after reconstitution, it was poured into a sterile screw-cap tube. Isolation was performed on the MagPurix (Zinexts, Taiwan) device using the MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit. Accordingly, DNA was obtained in only one of the four samples brought for study. Oxford Nanopore Technology (England) was used for 16S r-RNA isolation and Nanopore Sequence Analysis. Then, bacterial analysis was done up to the genus level with bioinformatics analysis.

Results: Bacteria were classified from phylum level to genus level and the following bacteria took the first place in these classes. At the phylum level; Firmicutes 52.74%, class level; Clostridia 31.55%, order level; Clostridiales 31.55%, family level; Ruminococcaceae 24.29%, at the genus level; Ralstonia 21.48% took the first place.

Conclusion: The physiological characteristics and diseases of this individual were linked by the bacteria obtained, and it was predicted that this person was obese, prone to diabetes and especially fed with grains as a diet.

Keywords: Historical, dental calculus, molecular.

GİRİŞ

Muş Tepeköy Höyüğü'nün Tarihçesi

Örnekler Tepeköy Höyük kurtarma kazılarında (Muş/Türkiye'de yer alan Tepeköy köyünde) elde edilmiştir. Tepeköy Höyüğü yaklaşık 5 bin metrekarelik bir alana yayılmış orta ölçekli bir höyüktür (Resim 1). Mezarlık alanı, höyüğün üst yüzeyinde yer almaktadır. Mezarlığın 1900'lerin başından 1946 yılı Varto depremine kadar Tepeköy sakinleri tarafından kullanıldığı düşünülmektedir. İskeletler islami inanışlara göre defnedilmiştir. Bireyler doğu-batı pozisyonunda, yüz güneye dönük ve sağ tarafa doğru yatırılmış basit toprak mezarlardır (Resim 2).^{1,2}

Diş Taşı Çalışılan A3M3 Numaralı Bireyin Antropolojik Analizi

A3M3 numaralı birey sırt üstü yatırılmış, yüz güneye bakar pozisyonunda yerleştirilmiş basit toprak mezar gömüsüdür. Osteolojik incelemelerde bireyin tüm kemikleri iyi korunmuş durumdadır ve neredeyse kemiklerin hepsi tamdır. Özellikle yaş ve cinsiyet tahmininde %98'in üzerinde doğruluk veren kemiklerin hepsi mevcuttur. Antropolojik çalışmalarda insan vücut kemikleri içinde pelvis ve cranium cinsiyet tayininde en sık başvurulan elementlerdir. A3M3 numaralı bireyin cinsiyet

tayininde kullanılan antropolojik kriterler ışığında bireyin kadın olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca cinsiyet tayininde pelvis ve cranium dışında vücudun diğer kemiklerinde gözlenen özellikler ve kemiklerden



Resim 1. Muş Tepeköy Höyük (Yılmaz ve ark., 2020).



Resim 2. Tepeköy Höyük İskelet (Yılmaz ve ark., 2020).

1900'LÜ YILLARA AİT
DİŞ TAŞI ÖRNEĞİNDE
MOLEKÜLER BAKTERİ
ANALİZLERİ İLE
BESLENME VE HASTALIK
DURUMLARININ
İRDELENMESİ



Resim 3. A3M3'e ait kafatası



Resim 4. A3M3'e ait dişler



Resim 5. A3M3'e ait alt çene (mandibula)



Resim 6. A3M3'e ait diş yüzeylerindeki diş taşları

alınan metrik ölçümler bireyin kadın olduğunu teyit etmiştir. Antropolojik çalışmalarda iskeletlerde yaş tayini yapılan kriterler A3M3 bireye uygulandığında, kişinin yetişkin olduğu anlaşılmıştır. Yaş tahmininde kullanılan pelvis'deki pubic symphysis ve auricular yüzey safhaları ile kraniumdaki suturların kapanma safhaları ve üst ve alt çenede üçüncü azının çıkış zamanına göre yapılan yaş tayini sonucunda bireyin 20-35 yaş aralığında öldüğü anlaşılmaktadır.²

Diğer antropolojik analiz ise bireyin boy uzunluğudur. Uzun kemiklerinden alınan ölçülerde bireyin 151,72 cm-162,72 cm arasında bir boya sahip olduğu anlaşılmıştır. A3M3 numaralı bireyin paleopatolojik değerlendirmesinde kemiklere yansımış orta ve ileri derecede makro patolojik oluşumlara rastlanmamıştır. Sadece bireyin omurlarında hafif derecede kemik osteofitleri gözlenmiştir. Özellikle bu osteofitler boyun ve sırt omurlarında daha belirgindir. Ağız ve diş sağlığı açısından bireyin periodontal patolojilerine bakıldığında diş taşı dikkat çekicidir. Ön ve arka diş gruplarında belirgin seviyede diş taşı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra ölüm öncesi diş kaybı dediğimiz antemortem diş kaybı sadece üst çenede küçük azı dışında (P2) görülmüştür. Diğer bir diş rahatsızlığı olan diş çürüğü ise bireyin alt çenesinde 2.büyük azı (M2) ve 3. büyük azı (M3) dişlerinin çiğneme yüzeylerinde pit ve füssür çürükleri olarak gözlenmiştir (Resim 3-6).¹

Diş plağı, memeli dişlerinde oluşan mikrobiyal biyofilmdir. Bir bireyin yaşamı boyunca diş plağı, diş taşı oluşturmak için periyodik, ardışık mineralizasyona uğrar. Diş taşının kalsifiye matrisi, konağın ölümünden sonra harici mikroorganizmaların istilasından korunan DNA ve proteinler gibi biyomolekülleri korur ve böylece tarihi oral mikrobiyom korunur.³ Diş taşı, bakteriyel büyüme için ideal bir üreme ortamıdır.⁴ Oral mikrobiyom, bağırsak mikrobiyomundan sonra en çok karakterize edilen ikinci mikrobiyomdur ve Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria ve Bacteroidetes'e ait 700'den fazla bakteri türüne sahip olduğu bilinmektedir. Bilinen oral türlerin yaklaşık %57'si isimlendirilir, %13'ü isimsiz kalır ancak üretilebilir ve % 30'u hala üretilmemiş olarak kalır.⁵ İnsan oral mikrobiyomunun karakterizasyonu coğrafi bölgelere ve kültüre göre farklılık gösterebilir.⁵ Mevcut patojenlere yapılacak DNA analizleri insan sağlığı ve hastalığının yanı sıra patojen evrimine dair içgörü sağlayabileceği gibi geçmişten gelen gıda çeşitliliği, yaşam tarzı ve alışkanlıkları hakkında bilgi sağlayacaktır.^{6,7} Diş taşı bu nedenlerle, hem modern hem de tarihi örneklerde insan beslenmesi, fizyolojisi ve mikrobiyom aktivitesi hakkında yeni bilgiler sağlama konusunda önemli bir potansiyele sahiptir ve insan-mikrobiyom birlikteliği hakkında evrimsel çalışmalara izin verir.⁸

Bu çalışmada aynı mezarlık alanından çıkarılan dört farklı kafatasından alınan diş taşı örneklerine ait yapılan dizi analiz tekniği ile bakteriyel çeşitliliğin araştırılması ve buna göre beslenme ve kişi hakkında fizyolojik özellikler araştırılmaya ve yorumlanmaya çalışılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Örneklerin DNA İzolasyonu İçin Ön Hazırlık Safhası

Dört farklı kişiye ait diş taşı örnekleri aynı yöntem kullanılarak çalışıldı. Örnekler diştten çıkarılırken diştin parçalarını yakalamak için numune (izole diş, kafatası veya çene) temiz alüminyum folyo üzerine toplandı. Analizin en kalın veya en belirgin kenarı tanımlanarak diş taşı çıkarılınca kadar diş minesine doğrudan bitişik olan kenara basınç uygulamak için bir diş taşı temizleme aracı olan kretuarlar ve Gracy küretler kullanıldı. Diş yüzeyinin çizilmesi veya zarar görmesi riski nedeniyle, büyük metal aletlerin kullanımından kaçınıldı. Genellikle, bu işlem sırasında diş taşı parçalanabilir. Diş taşı diştten çıkarıldıktan sonra, alüminyum folyo üzerindeki numune toplanarak küçük, etiketli, steril vida kapaklı plastik tüp içine yerleştirildi. Taşıma sırasında plastik veya cam tüpler içindeki hareket kırılğan örnekleri parçalayabilir ve tüp kullanılması gerekiyorsa, örneklerin kolayca ezilebileceği düşünülerek plastik olanlar önerilir. Her numune torbası veya tüpü, numune içeriği, numune bilgileri ve tarih ile dikkatlice etiketlendi. Numune dekontaminasyonu için UV ışınlaması kullanıldı (her yüzeyde> 15 dakika); örnek, bu işlem sırasında ideal olarak %4 ağartıcı (sodyum hipoklorit, NaClO) ve uv ışınlaması ile önceden muamele edilmiş steril (presel) cımbızlarla manipüle edildi. Analiz örneğinin uv ışınlamasının ardından, diş yüzeyin temizliği için dekontaminasyon için ağartıcı işlemi kullanıldı. Numune, beş dakika boyunca moleküler dereceli ağartıcı (%4 seyreltilmiş) içeren steril bir kaba (petri kabı) daldırıldı ve daha sonra ağartıcı izlerini gidermek için ayrı bir steril moleküler dereceli etanol kabına (%90) daldırılarak üç dakika kadar durulandı. Numune, doğrudan toz haline getirme ve ekstraksiyon işlemine geçmeden önce, sterilize edilmiş bir yüzeyde veya steril bir kapta (petri kabı) beş dakikaya kadar havada kurumaya bırakıldı. Eski malzemeyi toz haline getirmenin birden fazla yolu vardır, basit yöntem olarak “çekiçle parçalama” yöntemi kullanıldı. Dekontamine edilmiş numune temiz, steril plastik bir torbanın (3 cm 4 cm veya daha küçük) alt köşesine yerleştirildi ve bir toz haline getirici çekiçle hafifçe ve tekrar tekrar vuruldu. Numune toz haline getirildikten sonra, torbanın karşı köşesi steril makasla kesildi ve numune ekstraksiyon için temiz, steril bir vidalı kapaklı tüpe döküldü.⁹

DNA İzolasyonu

MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit, 48 preps/kit (Zinexts, Taiwan) ile yapılmıştır. Diş taşı örneği üzerine 300 µl kit içerisinde bulunan BL2 buffer ve 100 µl lizozim enzimi eklenerek 37°C de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında elimizde bulunan örnekler tam otomatik MagPurix (Zinexts, Taiwan) cihazında izolasyon işlemi yapıldı. Buna göre çalışmak için getirilen dört örnekten sadece birinde DNA elde edildi.

16S r-RNA İzolasyonu

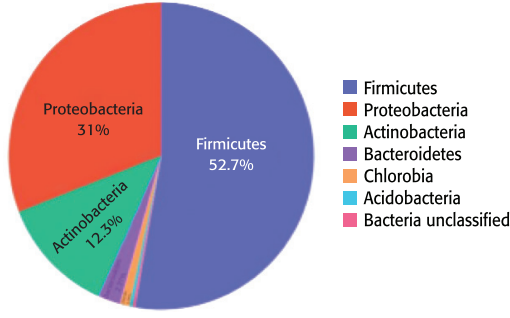
16S rRNA hedefli metagenomik analiz için daha önce tanımlanmış iş akışları kullanıldı (10). Amplikon kütüphanelerinin oluşturulması için kullanılacak primer çifti 16S rRNA geninin V1-V9 bölgesini kapsayan yaklaşık 1400 bp'lik bir bölgeyi hedeflemektedir.^(11,12) Hedef spesifik primer çiftlerinin 5' ucuna, oluşturulan kütüphanenin Oxford Nanopore Teknoloji Nanopore barkod DNA dizileri eklendi. 16S rRNA'ya özgü hedef spesifik primer-konnektör sekansları ileri primer için TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC - AGRGTTTGATYHTGGCTCAG -3' ve geri primer için 5'- ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC - TACCTTGTTAYGACTT -3' şeklindedir. İlk PCR Proof Reading DNA Polymerase 2x Reaction Mix ve her bir primerden 200 nm kullanılarak uygulandı. PCR cihazında şu ısıl döngü programı izlendi: 95°C'de 3 dakika; 25 döngü 95°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye ve 72°C'de 90 saniye; 72°C'de 5 dakika. PCR ürünü agaroz jelde yürütülerek boyutu (~1450 bp) doğrulandı ve PCR Product Purification Kit kullanılarak saflaştırıldı.

Tablo 1. 16S rRNA geni tam-okuma için kullanılan primerler.

Oligo name	ONT Universal Tag	Sequence 5' to 3'	Amplicon
16S-27F	TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC	AGRGTTTGATYHTGGCTCAG	16S
16S-1492R	ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC	TACCTTGTTAYGACTT	16S

Nanopore Dizi Analizi

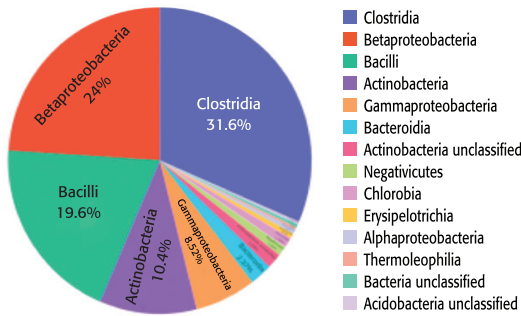
Amplikon kütüphanesi hazırlanması için Ligasyon dizileme kiti 1D (SQK-LSK108; Oxford Nanopore Technologies) kullanılmış ve amplikon kütüphanesi MinIONTM (Oxford Nanopore Technologies) cihazına yüklenmiştir. Cihaza 1–1.5 µg DNA içeriğine sahip 45 µl barkodlanmış DNA karışımı ve pozitif kontrol olarak 5 µl lamda faj DNA'sı yüklenmiştir. DNA uç tamiri ve dA eklenmesi için NEBNext End Repair/dA-tailing Module (New England Biolabs) kiti kullanılmıştır. Saflaştırma için Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter) kiti kullanılmıştır.



Şekil 1. A3M3 numaralı dış taşının Şube düzeyindeki analizi

Tablo 2. A3M3 numaralı dış taşının şube düzeyindeki analizi sonucu elde edilen bakteriler

Sıra No	Mikroorganizma	rRNA Miktarı	Bulunma Oranı (%)
1	Firmicutes	356	52,74
2	Proteobacteria	209	30,96
3	Actinobacteria	83	12,29
4	Bacteroidetes	16	2,37
5	Chlorobia	7	1,03
6	Acidobacteria	2	0,29
7	Bacteria unclassified	2	0,29



Şekil 2. A3M3 numaralı dış taşının sınıf düzeyindeki analizi

Tablo 3. A3M3 numaralı dış taşının sınıf düzeyindeki analizinden elde edilen bakteriler

Sıra No	Mikroorganizma	rRNA Miktarı	Bulunma Oranı (%)
1	Clostridia	213	31,55
2	Betaproteobacteria	162	24
3	Bacilli	132	19,55
4	Actinobacteria	70	10,37
5	Gammaproteobacteria	44	6,518
6	Bacteroidia	16	2,37
7	Actinobacteria unclassified	11	1,62
8	Negativicutes	7	1,03
9	Chlorobia	7	1,03
10	Erysipelotrichia	4	0,59
11	Alphaproteobacteria	3	0,44
12	Thermoleophilla	2	0,29
13	Bacteria unclassified	2	0,29
14	Acidobacteria unclassified	2	0,29

Adaptör ligasyonu aşaması için toplam 0.2 pmol uçlar hazırlanmış DNA 50 µl Blunt/TA ligase master mix (New England Biolabs) karışımının içerisine eklenmiş ve 20 µl adaptör karışımı eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. DNA kütüphanesinin elde edilmesi için son saflaştırma işlemi Adapter Bead Binding buffer (provided in the SQK-LSK108 kit) ve 0.5X Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter) kitleri kullanılarak tamamlanmıştır.

Dizileme karışımı (14 µl DNA kütüphanesi), Loading beads (25,5 µl) ve Running Buffer karışımı (35,5 µl) ile karıştırılır. Kullanılacak R9.4 akış hücresi priming yapılarak yüklemeye hazır hale getirilmiş ve hazırlanan dizileme karışımı akış hücresinin örnek yükleme kısmına aktarılmıştır.

MinION™ kontrol yazılımı, MinKNOW™ versiyon 0.46.1.9 (R9.4) kullanılarak 48 saatlik (R9.4) bir dizileme protokolü gerçekleştirilmiştir. Okuma verileri, 1.2.2 rev 1.5 iş akışı ve Metrichor™ agent (versiyon 0.16.37960) yazılımı tarafından baz alınarak elde edilmiştir.

Dizileme bittikten sonra, fast5 formatında elde edilen sonuçlar guppy v3.1.5 yazılımı kullanılarak fastq formatına çevrilmiştir (base-calling ve de-multiplexing). Barkod ve adaptör sekansları Porechop v0.2.3 yazılımı kullanılarak temizlenmiş, ayrıca dizilerin her iki ucundan 45 baz silinerek evrensel primer ve etiketler de silinmiştir. Dizilerin temizlenmesinin ardından 1350-1550 bp uzunluğundaki okumalar filtrelenmiş ve geriye kalan okumalar analizden çıkarılmıştır.

Temizlenmiş okumalar mothur v.1.39.5 platformu kullanılarak özelleştirilmiş iş akışı ile analize tabi tutulmuştur. Sekanslar kimerik yapılardan arındırılmış, hizalanmış, benzerlik matrisi ile aralarındaki mesafeler ölçülerek %99'dan daha fazla benzerlik gösteren okumalar kümelenerek Operasyonel Taksonomik Birimler (OTU) oluşturulmuştur. Oluşturulan OTU'lar RDP 16S rRNA veri tabanına göre karşılaştırılarak taksonomik anotasyonları gerçekleştirilmiş ve aynı cins olarak tespit edilen OTU'lar ilişkilendirilerek istatistiksel sonuçlar elde edilmiştir. OTU'ların eşleştiği organizmalara, bunların kantitatif değerlerine ve örneklerle ait metadata verilerine göre grafikler Minitab ve R programları kullanılarak çeşitli istatistiksel analizler ile oluşturulmuştur.

BULGULAR

Bioinformatik Analizler

Bakteri sınıflandırması; şube (phylum), sınıf (class), takım (order), aile (family), cins (genus), tür (species)

olarak yapılmaktadır. DNA analizinde bakteri sınıflandırmasında cins düzeyine kadar analiz yapılmış olup tür düzeyinde analiz yapılamamıştır.

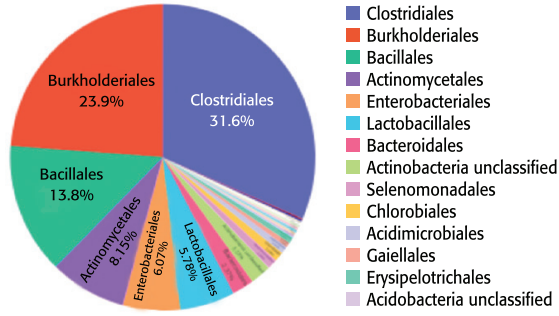
Bakteri şube düzeyinden cins düzeyine doğru ilk olarak şube düzeyindeki sınıflandırmada (Şekil 1, Tablo 2) ilk üç sırayı; Firmicutes %52,74, Proteobacteria %30,96, Actinobacteria %12,29, sınıf düzeyindeki sınıflandırmada (Şekil 2, Tablo 3) ilk beş sırayı; Clostridia %31,55, Betaproteobacteria, %24, Bacilli, %19,55, Actinobacteria, %10,37, Gammaproteobacteria %6,51, takım düzeyindeki sınıflandırmada ilk dört sırayı Clostridiales %31,55, Burkholderiales %23,85, Bacillales %13,77, Actinomycetales %8,14, aile düzeyindeki sınıflandırmada (Şekil 3, Tablo 4) ilk üç sırayı; Ruminococcaceae %24,29, Burkholderiaceae %22,51, Actinomycetales unclassified %6,37, tür düzeyindeki sınıflandırmada (Şekil 4, Tablo 5) ilk beş sırayı; Ralstonia %21,48, Clostridium III %12,29, Ruminococcaceae unclassified %9,62, Actinomycetales unclassified %6,37, Bacillales unclassified %5,33 olarak bulunmuştur.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Eski mineralleşmiş veya fosilleşmiş biyofilmlerin incelenmesi, bakteriyel virülans faktörleri, konak savunma proteinleri ve bugün karşı karşıya kalınan uygarlık hastalıklarının gelişimi hakkında fikir verebilir.¹³

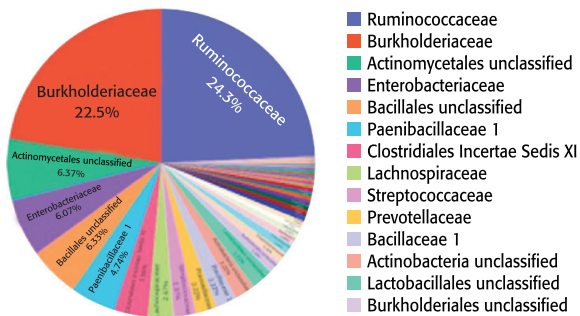
Diş taşı, geçmişte yutulan maddelerle ilgili bilgileri yeniden hayata geçirmek için artık yaygın olarak kullanılmaktadır. Toplanan veriler erken Paleolitik'te özellikle değerlidir. Bununla ilgili olarak birkaç kurtarma yöntemi kullanılır ve her biri farklı sonuçlar verir. Diş taşlarından elde edilen biyomoleküler belirteçler ve genetik materyaller, tanımlanabilir diyet, tıbbi ürünler ve insan mikrobiyal toplulukları hakkında yeni veriler sağlamaktadır. Eski diş taşlarının incelenmesi, gerçekçi parametreler içinde geçmiş yaşamlar hakkında bilgi elde etmek için büyük bir potansiyele sahiptir.¹⁴

Yapılan bir çalışmada; 16S rRNA dizileri (n = 509.067) kullanılarak, eski arkeolojik döneme diş analizinde toplam 2.699 mikrobiyal patojen belirlenmiş. Bunlardan biri arkeal ve dokuzu bakteri olmak üzere şube alt sınıfında tespit edilmiştir. Bunlar; Firmicutes (%49,5±10,6), Actinobacteria (%12,0±6,1), Proteobacteria (%11,5±8,6), Bacteroidetes (%6,6±3,6), TM7 (%4,6±4,0), Synergistetes (%3,3±2,6), Chloroflexi (%2,7±1,5), Fusobacteria (%2,1±1,8), Spirochaetes (%0,6±0,3), ve Euryarchaeota (%0,4±0,6) olarak bulunmuştur.¹⁵ Çalışmamızda şube düzeyinde



Şekil 3. A3M3 numaralı diş taşının takım düzeyindeki analizi

Sıra No	Mikroorganizma	rRNA Miktarı	Bulunma Oranı (%)
1	Clostridiales	213	31,55
2	Burkholderiales	161	23,85
3	Bacillales	93	13,77
4	Actinomycetales	55	8,14
5	Enterobacteriales	41	6,07
6	Lactobacillales	39	5,77
7	Bacteroidales	16	2,37
8	Actinobacteria unclassified	11	1,62
9	Selenomonadales	7	1,03
10	Chlorobiales	7	1,03
11	Acidimicrobiales	5	0,74
12	Gaiellales	4	0,59
13	Erysipelotrichales	4	0,59
14	Actinobacteria unclassified	4	0,59
15	Acidobacteria unclassified	2	0,29
16	Rhizobiales	2	0,29
17	Solirubrobacterales	2	0,29
18	Thermoleophilales	2	0,29
19	Bacteria unclassified	2	0,29
20	Gammaproteobacteria unclassified	2	0,29
21	Xanthomonadales	1	0,14
22	Betaproteobacteria unclassified	1	0,14
23	Rhodospirillales	1	0,14



Şekil 4. A3M3 numaralı diş taşının Aile düzeyindeki analizi

1900'LÜ YILLARA AİT
DİŞ TAŞI ÖRNEĞİNDE
MÖLEKÜLER BAKTERİ
ANALİZLERİ İLE
BESLENME VE HASTALIK
DURUMLARININ
İRDELENMESİ

Tablo 5. A3M3 numaralı diş taşının aile düzeyindeki analizinden elde edilen bakteriler			
Sıra No	Mikroorganizma	rRNA Miktarı	Bulunma Oranı (%)
1	Ruminococcaceae	164	24,29
2	Burkholderiaceae	152	22,51
3	Actinomycetales unclassified	43	6,37
4	Enterobacteriaceae	41	6,07
5	Bacillales unclassified	36	5,33
6	Paenibacillaceae 1	32	4,74
7	Clostridiales Incertae Sedis XI	24	3,55
8	Lachnospiraceae	18	2,66
9	Streptococcaceae	16	2,37
10	Bacillaceae 1	15	2,22
11	Prevotellaceae	15	2,22
12	Lactobacillales unclassified	15	2,22
13	Actinobacteria unclassified	11	1,62
14	Burkholderiales unclassified	9	1,33
15	Propionibacteriaceae	8	1,18
16	Chlorobiaceae	7	1,03
17	Bacillaceae 2	6	0,88
18	Veillonellaceae	5	0,74
19	Staphylococcaceae	4	0,59
20	Lamellaceae	4	0,59
21	Actinobacteria unclassified	4	0,59
22	Gaiellaceae	4	0,59
23	Leuconostocaceae	4	0,59
24	Erysipelotrichaceae	4	0,59
25	Clostridiales unclassified	3	0,44
26	Actinomycetaceae	3	0,44
27	Enterococcaceae	3	0,44
28	Peptococcaceae 1	3	0,44
29	Bradyrhizobiaceae	2	0,29
30	Acidobacteria unclassified	2	0,29
31	Acidaminococcaceae	2	0,29
32	Bacteria unclassified	2	0,29
33	Conexibacteraceae	2	0,29
34	Thermoleophilaceae	2	0,29
35	Gammaproteobacteria unclassified	2	0,29
36	Betaproteobacteria unclassified	1	0,14
37	Sinobacteraceae	1	0,14
38	Acidimicrobinae Incertae sedis	1	0,14
39	Pseudonocardaceae	1	0,14
40	Bacteroidales unclassified	1	0,14
41	Aerococcaceae	1	0,14
42	Clostridiales Incertae Sedis XIII	1	0,14
43	Rhodospirillaceae	1	0,14

diş taşından izole ettiğimiz bakteri gruplarında bu çalışmaya benzer sonuçlar elde edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre Firmicutes %52,74 Proteobacteria %30,96 Actinobacteria %12,29 Bacteroidetes %2,37 Chlorobi %1,03 Acidobacteria %0,29 ve sınıflandırılmamış bakteri %0,29 olarak bulundu. Bunun yanında insan bağırsağındaki mikrobiyal farklılığı araştıran bir çalışmada izole edilen ve öne çıkan mikroorganizmalar; yine ön sıralarda Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria'dır.¹⁶ Bu bakterilerden Firmicutes ve Bacteroidetes her memeli konakçıdaki tüm 16S rRNA dizilerinin >%98'ini oluşturarak baskın suş olarak karşımıza çıkmaktadır.¹⁶

Bağırsak bakterilerinin yaklaşık %90'ı 2 şubeden birini ihtiva eder. Bunlar Bacteroidetes ve Firmicutes'dir. Firmicutes, Bacteroidetes'ten daha fazla saptanır ve enerji üretirler. Yüksek yağlı diyet uygulanan kemirgenler gibi, obez insanlar da nispeten daha fazla Firmicutes'e sahiptir.¹⁷ Nispeten yüksek Firmicutes/Bacteroidetes oranları sadece karbonhidrat metabolizmasını etkilemekle kalmaz, aynı zamanda kısa zincirli yağ asitlerinin üretimini de değiştirir. Bunun sonucunda özellikle asetat üretimi artmakta ve bütirat üretimi azalmaktadır. Yakın zamanda yapılan bir araştırmaya göre, kandaki asetatin yüksek seviyelerinin insülin direncine neden olduğu ve midede grelin (iştah uyarıcı hormon) üretimini artırdığı bulunmuştur. Bağırsaktaki düşük bütirat seviyeleri, insülin direncini uyandıran düşük seviyeli inflamasyonu teşvik eder.¹⁷ Bu nedenle bu iki mikroorganizma özellikle diabetes ve obeziteden sorumlu tutulmuşlardır. Diş taşı örneği alınan kişinin obezite ve diabetes sorunları ile karşı karşıya kaldığını söyleyebiliriz. Bireyin omurlarında hafif derecede kemik osteofitleri gözlenmiştir. Özellikle bu osteofitler boyun ve sırt omurlarında daha belirgindir. Subkondral osteofitlerin gelişimine neden olan pek çok etyolojik faktör bulunmaktadır, ancak asıl faktör obezitedir. Çalışmalar diz, ayak bileği, ayak ve vertebral osteofit gelişimi ile obezite arasında oldukça güçlü bir ilişki olduğu gösterilmiştir.¹⁸

Yaptığımız çalışmada sınıf düzeyinde izole ettiğimiz diş taşında ilk üç baskın mikroorganizma olarak Clostridia, Betaproteobacteria, Bacilli saptandı. Yapılan bir çalışmaya göre Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi ve Proteobacteria pirinç-yonca ve pirinç-buğday ekilen topraklarda en sık görülen mikroorganizmalar grubunu oluşturuyordu.¹⁹ Bu çalışmada araştırmacılar pirinç yetiştirme mevsimi boyunca toprakta bir bakteri bileşimi buldular; buna göre şube sınıflandırmasında Proteobacteria en yüksek miktarda bulunan mikroorganizmayı, Firmicutes ise en

bol bulunan beşinci mikroorganizmayı temsil ediyordu. Sonuçta bu mikroorganizmalar, tarım topraklarında yaygın olarak görülen sakinlerdendir. Bunlar selüloolitik enzimleri kullanarak bitki kalıntılarını ayrıştırırlar, pirinç tarım toprakları genellikle oldukça bol olan Bacilli ve Clostridia sınıflarını içerirken, Firmicutes miktarının düşük olduğu görülmektedir.¹⁹ Bizim özellikle Sınıf düzeyinde elde ettiğimiz bu bakteri çeşitliliği tarihsel olarak dış taşıyı elde ettiğimiz kişinin özellikle pirinç ve buğday ağırlıklı tarımsal ürünlerle beslendiğini ortaya koymaktadır. Bunlar kişide obeziteye ve diyabete yol açan çok önemli kanıtlardandır.

Normal gebelik sırasında, artan insülin direnci, materno-fetal besin transferini artırmak ve gelişmekte olan fetüsün özellikle glikoz gereksinimleri ile ilgili beslenme ihtiyaçlarını karşılamak için bir adaptasyon görevi görür. Bununla birlikte, dünya çapındaki her altı gebelikten yaklaşık biri, annenin metabolizmasının normoglisemiyi sürdürmedeki yetersizliğinden etkilenmektedir; insülin direnci ve yetersiz insülin sekresyonunun kombinasyonu, gestasyonel diabetes mellitus (GDM) ile sonuçlanmaktadır. Aile düzeyinde elde ettiğimiz iki bakteri Ruminococcaceae, Burkholderiaceae özellikle yapılan bazı metagenomik çalışmada, Ruminococcaceae, Parabacteroides distasonis ve Prevotella gibi bağırsak mikrobiyotasının gestasyonel diyabetli kadınlarda zengin olduğu görülmüştür.²⁰ Bu da çalışmadaki bireyin diyabetli olduğunu gösteren başka bir kanıt olarak gösterilebilir.

Ralstonia cinsi şu anda 16 tür ve üç alt tür içerir. Bunlar, R. solanacearum, R. pseudosolanacearum, R. paucula ve R. syzygii gibi bitki patojenlerini içerir. Sağlıklı bireylerde, Ralstonia spp. az görülür. Kistik fibroz,

Ralstonia spp. ile klinik olarak anlamlı enfeksiyon için en yaygın konakçı risk faktörüdür.²¹ Bizimde cins düzeyinde en sık bulduğumuz mikroorganizma Ralstonia olup o anda örnek alınan kişinin yaşadığı yerde bu mikroorganizmanın alt türü (R. solanacearum) tarafından etkilenen [temel mahsuller (patates), meyve mahsulleri (muz, domates), yağlı tohumlar (ayçiçeği, yer fıstığı), baharat mahsulleri, yem, çiçekler, orman ağaçları (demir ağacı ve okaliptüs)] çeşitli bitki kaynaklarının olabileceğinden söz edilebilir.²² Bunun yanında Burkholderia cenocepacia, özellikle çevrede yaygın olarak bulunan ve birçok durumda Kistik Fibroz (KF) hastalarından izole edilmiş bir mikroorganizmadır, bizimde aile düzeyinde elde ettiğimiz Burkholderia'nın KF ile ilişkili olabileceğini söyleyebilir böylece hem Ralstonia hem de Burkholderia'nın bu kişide kistik fibroza neden olabileceğini bununda hastada diabet yapabileceğinden bahsedebiliriz.^{23,24}

Elde ettiğimiz dış taşı analizinde ilk önce DNA izolasyonu gerçekleştirilirse bunun arkasından yapılacak olan moleküler dizileme yöntemleri ile dış taşı içerisinde mikroorganizma saptanabilir. Böylece tarih öncesi yaşamını sürdüren kişilerin o tarihlerde yaşam şekilleri, beslenme çeşitliliği ve kişinin fizyolojik özellikleri hakkında bilgiler elde edilebilir muhtemel hastalıkları hakkında yorum yapılabilir. Belki yapılan moleküler mikrobiyolojik analizlerin toplumların tarih sayfalarından silindiği dönemlerde onları etkileyip yok olmalarını sağlayan doğal afetler ve savaşların yanında salgın hastalıklar konusunda fikir elde etmemizi ve bunları kanıtları ile sunabilmemizi sağlayabilir.

***Yazarlar herhangi bir çıkar ilişkisi içinde bulunmadıklarını bildirmiştir.**



KAYNAKLAR

1. Yılmaz H, Gültekin T, Goksal N, Erdoğan S. Oral Patoloji, Dış Çürüğü: Muş Tepeköy Höyük, Ed. [Salih Çeçen, Ömer Kahya, Şafak Bozgun ve Koray Toptaş, Current Debates on Social Sciences Human Studies 3, Ankara: Bilgin Kültür Sanat Yayınları 2019: 97-106.
2. Yılmaz H, Ercek M, Erdoğan S, et al. "Tepeköy Höyük İskeletlerinin Antropolojik Analizi", 41. Uluslararası Kazı, Araştırma ve Arkeometri Sempozyumu, 35. Arkeometri Sonuçları Toplantısı, Ankara 2020; 391-405.
3. Brealey JC, Leitão HG, van der Valk T, et al. dental calculus as a tool to study the evolution of the mammalian oral microbiome. Mol Biol Evol 2020; 37: 3003-3022.
4. Aliye A, Niklaus PL. Dental calculus: the calcified biofilm and its role in disease development. Periodontol 2000 2018; 76: 109-115.
5. Santiago-Rodriguez TM, Fornaciari A, Fornaciari G, et al. Commensal and pathogenic members of the dental calculus microbiome of Badia Pozzeveri individuals from the 11th to 19th Centuries. Genes [Basel] 2019; 10: 299.
6. Neukamm J, Pfrengle S, Molak M, et al. 2000-year-old pathogen genomes reconstructed from metagenomic analysis of Egyptian mummified individuals. BMC Biol 2020; 18: 108.
7. Sawafuji R, Saso A, Suda W, Hattori M, Ueda S. Ancient DNA analysis of food remains in human dental calculus from the Edo period, Japan. PLoS One 2020; 15: e0226654.
8. Velsko IM, Overmyer KA, Speller C, et al. The dental calculus metabolome in modern and historic samples. Metabolomics 2017; 13: 134.
9. Weyrich LS, Dobney K, Cooper A. Ancient DNA analysis of dental calculus. J Hum Evol 2015; 79: 119-124.
10. Cuscó A, Catozzi C, Viñes J, Sanchez A, Francino O. Microbiota profiling with long amplicons using Nanopore sequencing: full-length 16S rRNA gene and the 16S-ITS-23S of the rrn operon. F1000Res 2018; 7: 1755.
11. Zeng YH, Koblížek M, Li YX, et al. Long PCR-RFLP of 16S-ITS-23S rRNA genes: a high-resolution molecular tool for bacterial genotyping. J Appl Microbiol 2013; 114: 433-447.

12. Klindworth A, Priesse E, Schweer T, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: e1
13. Akcalı A, Lang NP. Dental calculus: the calcified biofilm and its role in disease development. *Periodontol* 2000 2018; 76: 109-115.
14. Hardy K, Buckley S, Copeland L. Pleistocene dental calculus: recovering information on paleolithic food items, medicines, paleoenvironment and microbes. *Evol Anthropol* 2018; 27: 234-246.
15. Warinner C, Rodrigues JF, Vyas R, et al. Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity. *Nat Genet* 2014; 46: 336-344.
16. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006; 124: 837-848.
17. Komaroff AL. The microbiome and risk for obesity and diabetes. *JAMA* 2017; 317: 355-356.
18. Hogan E, Apaydin N, Shaffer K, Tubbs RS, Loukas M. Osteofitler. *TOTBİD Derg* 2011; 10: 69-78.
19. Pittol M, Scully E, Miller D, et al. Bacterial community of the rice floodwater Using cultivation-independent approaches. *Int J Microbiol* 2018; 2018: 6280484.
20. Hasain Z, Mokhtar NM, Kamaruddin NA, et al. Gut microbiota and gestational diabetes mellitus: a review of host-gut microbiota interactions and their therapeutic potential. *Front Cell Infect Microbiol* 2020; 10: 188.
21. Prior AR, Gunaratnam C, Humphreys H. *Ralstonia* species - do these bacteria matter in cystic fibrosis? *Paediatr Respir Rev* 2017; 23: 78-83.
22. Paudel S, Dobhal S, Alvarez AM, Arif M. Taxonomy and phylogenetic research on *ralstonia solanacearum* species complex: a complex pathogen with extraordinary economic consequences. *Pathogens* 2020; 9: 886.
23. Chu AHY, Godfrey KM. Gestational diabetes mellitus and developmental programming. *Ann Nutr Metab* 2021; 19: 1-12.
24. Olatunbosun ST. Chronic incretin-based therapy in cystic fibrosis-related diabetes: A tale of 3 patients treated with sitagliptin for over 5 years. *J Cyst Fibros* 2021; 2: S1569-1993