

**T.C.  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ  
KESİN RAPORU**

**BEHÇET HASTALARI VE SAĞLIKLI KONTROLLERDE  
AĞIZ EPİTEL HÜCRELERİNİN  
ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİĞİNDE  
BETA DEFENSİNLERİN (HBD-1, HBD-2 VE HBD-3)  
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**Yürütücü: Prof. Dr. Hatice ÖZENCİ**

**Proje No: 06B3330012**

**Başlama Tarihi: 28.02.2007**

**Bitiş Tarihi: 11.01.2010**

**Rapor Tarihi: 22.03.2010**

**Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Ankara-2010**

# Behçet Hastaları ve Sağlıklı Kontrollerde Ağız Epitel Hücrelerinin Antibakteriyel Etkinliğinde Beta Defensinlerin (HBD-1, HBD-2 ve HBD-3) Rolünün Araştırılması

## I. Özet

Behçet hastalığı (BH), tekrarlayıcı oral aftlar, genital ülserler, deri lezyonları ve üveyit ile karakterize, sistemik, inflamatuvar bir hastalıktır. Behçet hastalarında, oral epitel hücrelerinin antibakteriyel etkinliğinde sağlıklı kontrollere kıyasla azalma olduğu tespit edilmiş, ancak bu azalmanın mekanizması açıklanamamıştır.

Beta defensinler, çeşitli mukozalarda eksprese olan ve konağın infeksiyöz patojenlere karşı ilk savunmasında rol alan antimikrobiyal etkili peptidlerdir. Çeşitli oral patolojilerde beta defensin ekspresyonunun azaldığı veya antibakteriyel etkinliğinin değiştiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, Behçet hastalarında oral patojenlere karşı azaldığı gösterilen konak savunmasında, ağızda eksprese olduğu bilinen, insan beta defensinleri (HBD)-1, -2 ve -3'ün ekspresyonunda bir değişiklik olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, HBD-1 geni üzerinde tanımlanmış ve özellikle kistik fibrozis gibi solunum sistemini ilgilendiren hastalıklarda enfeksiyonlara yatkınlıkla ilişkili olabileceği öngörülen polimorfizmlerin Behçet hastaları ile sağlıklı kontroller arasında görülme sıklığında fark gösterip göstermediği de araştırılmıştır. Literatürde Behçet hastalarında bu konuda yapılmış çalışma bulunmamaktadır.

Bu amaçla, aktif ve inaktif Behçet hastaları ile sağlıklı kontrollerden tükürük ve polimorfizm araştırması için kan örnekleri alınmıştır. Tükürükten elde edilen oral epitel hücrelerinden mikroorganizma (*S. pyogenes* ve *P. aeruginosa*) ile uyarım öncesinde ve uyarım sonrası üçüncü saatte bakterisidal etkinin değerlendirilmesi için seri sulandırılmalar yapılarak kanlı agara pasaj yapılmış, ayrıca beta defensin (HBD-1, -2, ve -3) ekspresyonlarının değerlendirilmesi amacıyla RNA ekstrakte edilmiştir. Kantitatif beta defensin ekspresyon analizi, LightCycler cihazı (Roche, Almanya) kullanılarak gerçek zamanlı PZR (real time PCR) analizi ile yapısal gen seti kontrol olarak kullanılarak yapılmıştır. Polimorfizm değerlendirmesi, PZR-enzimle kesim yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kontrol grubunda yer alan bireylerden yapılan hazırlık çalışmalarında, ağız epitel hücrelerinin *P. aeruginosa* ile uyarımında herhangi bir antibakteriyel etkinlik sergilemediği görülmüş, bu nedenle çalışmanın sonraki kısımlarında *P. aeruginosa* ile uyarım

yapılmamıştır. *S. pyogenes* ile yapılan uyarım sonucunda 3. saatte yaklaşık %94'lük bir bakterisidal etki tespit edilmiş, bu nedenle kontrol hasta gruplarının ağız epitel hücrelerinin bakterisidal aktivitesi ve defensin ekspresyonları uyarım öncesinde ve uyarım sonrası üçüncü saatte çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar, hasta gruplarının (aktif ve inaktif Behçet hastaları) ağız epitel hücrelerinin bakterisidal etkisinin daha yüksek olduğunu (%96) göstermiş, ancak kontrol ve hasta grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Uyarım öncesi ve uyarım sonrası üçüncü saatte, kontrol ve hasta gruplarında HBD-1 ekspresyonları gözlenmemiş, değişen derecelerde HBD-2 ve -3 ekspresyonu gözlenmiştir. HBD-2 ve -3 ekspresyonları kontrol ve hasta gruplarında bireysel farklılıklar göstermekle birlikte, ortalamaları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir.

HBD-1 geni polimorfizmleri (HBD-1 geni ekzon 1'de 5' UTR bölgesinde yer alan -52 G/A, -44 G/C, -20 G/A polimorfizmleri ve ekzon 2 3'UTR'de yer alan +5 G/A polimorfizmi) hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırıldığında; -52GA ( $p<0.001$ ) ve -44GG ( $p=0.005$ ) genotiplerinin hasta grubunda kontrollere kıyasla daha sık olduğu görülmüştür. Allel sıklıkları karşılaştırıldığında, -52A ( $p=0.039$ ) ve -44G ( $p<0.001$ ) allellerinin Behçet hastalarında kontrollere kıyasla anlamlı olarak daha sık görüldüğü bulunmuştur. -20G/A ve +5G/A polimorfizmlerinin sıklığı iki grup arasında anlamlı fark göstermemiştir ( $p=0.102$  ve  $p=0.919$ ). Hasta ve kontrol grupları, DEFB1 geni promotor bölgesinde yer alan -52, -44 ve -20 polimorfizmlerinin oluşturduğu haplotipler açısından değerlendirildiğinde, 13 ayrı haplotip tespit edilmiştir. Bu haplotiplerin iki grup arasındaki dağılımı karşılaştırıldığında, GG/GG/GG haplotipinin kontrol grubunda ( $p=0.001$ , OR =9.31), GA/GC/GA haplotipinin ise hasta grubunda ( $p=0.01$ , OR=3.11) daha sık görüldüğü anlaşılmıştır. Diğer haplotipler açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir.

Sonuçlarımız, Behçet hastalarında oral epitel hücrelerinin bakterisidal etkinliğinin kontroller kadar yüksek olduğunu, ancak uyarım sonrası üçüncü saatte tespit edilen bakterisidal etkiden beta defensinlerin ekspresyonunun sorumlu olmadığını göstermektedir. Diğer inflamatuvar proteinler (inflamatuvar sitokinler vb) ve hücreler (nötrofiller) bu etkide rol oynuyor olabilir. Bununla birlikte, HBD-1 ekspresyonu üzerine etkili olduğu bilinen polimorfizmlerin sıklıkları hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırıldığında, genotipik ve haplotipik farklılıklar tespit edilmiştir. Bu farkların HBD-1 ekspresyonu üzerine etkileri ve Behçet hastalığındaki rolleri üzerine daha kapsamlı çalışmaların yapılması uygundur.

# **Investigation of the Role of Beta Defensins (HBD-1, HBD-2 and HBD-3) in the Antibacterial Activity of Oral Epithelial Cells in Behcet's Disease Patients and Healthy Controls**

## **I. Summary**

Behçet's disease (BD) is a chronic, systemic, inflammatory disorder characterized by oral aphthous ulcers, genital ulcers, skin lesions and uveitis. In previous studies, a decrease in the antimicrobial efficiency was observed in the oral epithelial cells of BD patients, but the mechanism underlying this decrease was not understood.

Beta defensins are antimicrobial peptides expressed in various mucosal sites of the host which play an important role in the first defense against infectious pathogens. A decrease in the beta defensin expression and a change in the bactericidal capacity was observed in various oral pathologies. In our study, we tried to investigate the role of HBD-1, -2 and -3 expression as well as the prevalence of functional polymorphisms on the HBD-1 gene in healthy controls and BD patients. During the time of the study there was no other report on the role of beta defensins and HBD-1 polymorphisms in BD patients.

In order to serve the aim of our study, we obtained saliva samples to investigate the bactericidal activity and beta defensin expressions, as well as blood samples to investigate the prevalence of HBD-1 functional polymorphisms and haplotypes in BD patients and healthy controls. Oral epithelial cells were harvested from the saliva samples and were induced by *S. pyogenes* and *P. aeruginosa*. In the initial studies of the control group, no bactericidal activity was observed for the cells induced with *P. aeruginosa*, thus for the rest of the study *P. aeruginosa* was not used for induction. On the other hand, about a 94% bactericidal activity was observed on the 3<sup>rd</sup> hour of induction with *S. pyogenes*. For the rest of the study bactericidal activity was evaluated in the 3<sup>rd</sup> hour samples, and also total RNA was extracted from the initial and induced samples. Quantitative beta defensin expression analysis was performed by using the LightCycler instrument (Roche, Germany). Polymorphisms were investigated by using the PCR-restriction endonuclease analysis.

Our results show that, the oral epithelial cells of BD patients were capable of expressing as much bactericidal activity as control patients, even higher (96% versus 94%).

The difference between the groups in terms of bactericidal activity was not found to be statistically significant.

In none of the patients and controls, HBD-1 expression was observed in the initial and 3<sup>rd</sup> hour samples. HBD-2 and HBD-3 expressions showed a high degree of variability in and between the groups, but the difference observed at different time intervals, nor the difference between the Behçet's disease patients and healthy controls were statistically significant.

When the prevalence of functional polymorphisms located on the HBD-1 gene were investigated, -52GA ( $p < 0.001$ ) and -44GG ( $p = 0.005$ ) genotypes were found to be more prevalent among the BD patients. When the allele frequencies were compared, -52A ( $p = 0.039$ ) and -44G ( $p < 0.001$ ) alleles were found to be more prevalent in the BD patients. For the -20G/A SNP, no significant difference was found between the groups. Haplotype analysis revealed that GG/GG/GG haplotype was significantly more prevalent among the controls ( $p = 0.001$ , OR = 9.31), while GA/GC/GA haplotype was significantly more prevalent in the BD patients ( $p = 0.01$ , OR = 3.11). For the rest of the haplotypes determined, no statistically significant association was found between the groups.

Our results indicate that oral epithelial cells of BD patients display a high degree of bactericidal activity comparable and even higher than the healthy controls. This bactericidal activity seen at the 3<sup>rd</sup> hour, does not seem to be related to the expression of beta defensins. Other inflammatory proteins (such as cytokines) or cells (such as neutrophils) may be responsible for this bactericidal activity. On the other hand, statistically significant differences were observed in the frequency of functional polymorphisms and haplotypes of the patient and control groups which need further investigation.

## II. Amaç ve Kapsam

Behçet hastalığı (BH), tekrarlayıcı oral aftlar, genital ülserler, deri lezyonları ve üveyit ile karakterize sistemik inflamatuvar bir hastalıktır. Prevalansı Türkiye başta olmak üzere, Orta Doğu ve Japonya'da yüksektir. Hastalığın etiyojisi bilinmemesine rağmen, immünolojik bozukluklar üzerinde durulmakta, gelişiminden genetik, çevresel, virolojik, bakteriyel ve immünolojik faktörler sorumlu tutulmaktadır. Önceki çalışmamızda, BH'de oral epitel hücrelerinin (EH) antibakteriyel etkinliğinde anlamlı bir düşüklük tespit edilmiştir.

Beta defensinler, küçük, katyonik, antibakteriyel peptitler olup, özellikle mukozal yüzeylerde infeksiyon ajanlarına karşı ilk konak savunmasında önemli rol oynarlar. İnsanlarda tanımlanan beta defensinlerden HBD-1, -2 ve -3'ün ağızda (tükürükte veya oral keratinositlerde) eksprese olduğu gösterilmiş, oral *Candida* enfeksiyonlarında ve periodontolojik hastalığı olanlarda beta defensinlerin ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir.

Bu projenin amacı, Behçet hastalarının oral EH tarafından ortaya konan antibakteriyel etkinin sağlıklı kontrollerle karşılaştırılması, iki gruptaki bakterisidal aktivitede HBD-1 -2 ve -3 ekspresyonunun rolünün olup olmadığının belirlenmesi ve Behçet hastaları ile sağlıklı kontrollerde, HBD-1 geninde tanımlanan polimorfizmlerin sıklığının karşılaştırılmasıdır.

### III. Materyal ve Yöntem

#### a. Hasta ve Kontrol Grupları:

Oral epitel hücrelerinin antibakteriyel etkinliğinin değerlendirilmesi için, Behçet hastalığı tanısı ile Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Bilim Dalı tarafından izlenmekte olan toplam 30 hasta ile kendisi ve ailesinde Behçet hastalığı veya immünolojik hastalıklar bulunmayan, sigara içmeyen ve son bir hafta içerisinde antibiyotik kullanmamış olan 11 sağlıklı kontrol çalışılmıştır. Behçet hastalarının 15'i aktif (aftöz ülser, genital ülser, eritema nodozum benzeri erüpsiyonlar, perifolliküli olan hastalar), 15'i inaktif Behçet (Behçet hastalığı tanısı ile takipleri yapılmakta olan, ancak başvuru anında aftöz ülser, genital ülser, eritema nodozum benzeri erüpsiyonlar, perifolliküli olmayan hastalar) hastaları arasından seçilmiştir.

Beta defensin ekspresyonlarının karşılaştırılması için, 5 sağlıklı kontrol ile 6 aktif ve 6 inaktif Behçet hastasından alınan tükürük örnekleri çalışılmıştır.

HBD-1 geni polimorfizmlerinin değerlendirilmesi için 119 Behçet hastası ile 103 sağlıklı kontrol çalışmaya alınmıştır.

#### b. Oral Epitel Hücrelerin Elde Edilmesi:

Çalışmaya dahil edilen sağlıklı kontroller ve Behçet hastalarının yaklaşık 10 ml. uyarılmamış tükürük örnekleri, 10 ml %1 Penisilin-Streptomisin içeren Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) içeren 50 ml'lik steril polipropilen santrifüj tüpüne alınmıştır. Buz içerisinde tutularak Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İmmünoloji Laboratuvarına getirilen örnekler, 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, süpernatant atılmış ve çökelti 10 ml antibiyotiksiz HBSS ile toplam 3 kere yıkanmıştır. Elde edilen tükürük epitel hücre çökeltisi %10 FCS ve %90 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) içeren besiyerinde sulandırılmıştır. Hücre süspansiyonu %4'lük Tripan mavisi ile boyanıp Thoma lamında sayıldıktan sonra mililitrede  $1 \times 10^5$  epitel hücresi olacak şekilde besiyeri ile süspanse edilmiştir.

### **c. Bakterilerin elde edilmesi:**

Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü Kültür Koleksiyonundan alınan *Streptococcus pyogenes* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşları, koyun kanlı agara ekilip 37°C'de bir gecelik inkübasyona bırakıldıktan sonra, kanlı agardan steril öze ile toplanan koloniler steril 15 ml'lik santrifüj tüpü içindeki steril fosfat tampon solüsyonuna (PBS) toplanarak sulandırılmış ve PBS ile 3 kez 3000 rpm'de 10'ar dakika santrifüj edilerek yıkanmıştır. Son santrifüj işleminden sonra süpernatant dökülüp, çökeltinin üzerine 10 ml %10 FCS içeren RPMI ilave edilerek bakteri süspansiyonu %4'lük Tripan mavisi ile boyanıp Thoma lamında sayılarak mililitrede  $1 \times 10^5$  bakteri olacak şekilde sulandırılmıştır.

### **d. Hücrelerin mikroorganizma ile uyarılması:**

Ağız epitel hücrelerinin (AEH) *S. pyogenes* ve *P. aeruginosa*'ya karşı göstermiş olduğu bakterisidal etki, 1/1 efektör hücre/hedef (E/H) hücre oranında bakılmıştır (1, 2). AEH, 24 kuyucuklu plaklara 500 µl'lik üçer kuyucuk olacak şekilde dağıtılmış, üzerlerine 1/1 oranında (500 µl)  $10^5$ /ml mikroorganizma içeren bakteri süspansiyonundan ilave edilmiştir. AEH hazırlanan üçer kontrol kuyucuğuna mikroorganizma yerine besiyeri ilave edilmiştir. Plaklar 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilmiş, 1, 2, 3, 4, 6 ve 24 saatlik inkübasyonların ardından her bir kuyucuktaki süpernatant alınarak seri sulandırımı yapılmış ve her sulandırmadan iki adet kanlı agara sayım ekimi yapılmıştır. Bakterisidal aktivite, kontrol örnekleri ile yapılan hazırlık çalışmalarında 3. saatte gözlemlendiğinden, daha sonraki çalışmalarda ekimler sadece uyarımdan önce (0. saat) ve uyarım sonrası 3. saatte yapılmıştır.

Beta defensin ekspresyonunun belirlenmesi ve defensinlerin ekstraksiyonu için uyarımın 1, 2, 3, 4, 6 ve 24. saatlerinde kontrol grubuna ait hastadan sağlıklı epitel hücreleri ve süpernatant alınıp bunlardan RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Bakterisidal aktivitenin en fazla olduğu 3. saatin belirlenmesinden sonra, hasta örneklerinden RNA ekstraksiyonu uyarımdan önce (0. saat) ve uyarım sonrası 3. saatte yapılmıştır.



#### **e. Oral epitel hücrelerinden RNA ekstraksiyonu:**

Uyarımdan önce ve her bir mikroorganizma ile uyarımdan sonra 3. saatte Behçet hastaları ve sağlıklı kontrollere ait oral epitel hücrelerinin bulunduğu kuyucuklardan yaklaşık 200 µl toplanarak, hazır ticari kit (High pure RNA isolation kit, Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak, üreticinin önerileri doğrultusunda RT-PCR için RNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA örnekleri çalışılmaya kadar -80 C°'de saklanmıştır.

#### **f. Kantitatif RT-PZR için komplementer DNA (c-DNA) eldesi:**

Hazır ticari kit (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak üreticinin önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

#### **g. Kantitatif RT-PZR:**

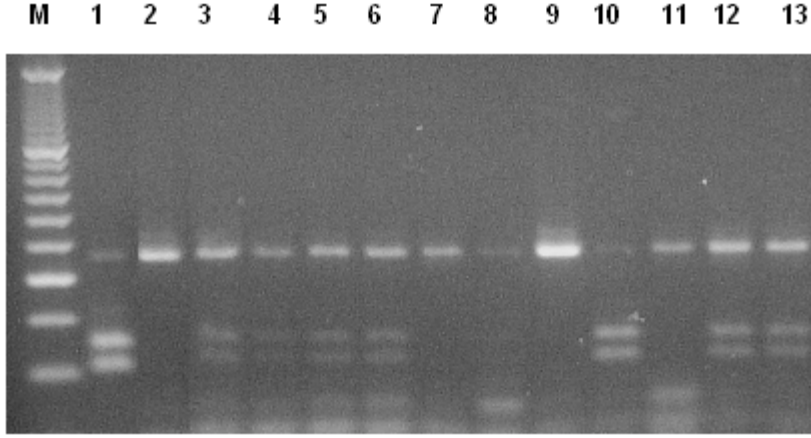
Kantitatif RT-PZR analizi, gerçek zamanlı (real time, RT-) PZR analizi ile, tablo-1'de belirtilen primer ve prob setleri kullanılarak Light Cycler 1.5 (Roche Diagnostics, Almanya) cihazında gerçekleştirilmiştir. HBD3 için literatürde belirtilen primerler kullanılmış, diğer primer ve probalar yeni dizayn edilmiştir (3) Bunun için yaklaşık 5 µl cDNA örneği, LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> HYBProbe (Roche Diagnostics, Almanya) kiti içeriğinde bulunan 4µl "master mix" ve 0,5 µM her bir primer ve 0,3 µM her bir probdan içerecek şekilde 20 µl toplam hacim içerisinde şablon olarak kullanılmıştır. Referans gen olan glukoz-6 fosfat dehidrogenaz (G6PDH) gen ekspresyonu ölçümlerinde standart olarak LightCycler h-G6PDH Housekeeping Gene Set (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılmıştır. Karışımlar kapiller tüplere yüklendikten sonra LightCycler 1.5 cihazında (Roche Diagnostics, Almanya) 95 C°'de 10 dakika ilk denatürasyonu takiben 50 döngü boyunca 95 C°'de 15 sn denatürasyon, 54 C°'de 15 sn yapışma ve 72 C°'de 15 sn uzama uygulanmıştır. Her döngü sonunda 57 C°'de sürekli "melting curve" analizi yapılmıştır. Program sonunda tek sikluluk 40 C°'de 30 sn soğutma işlemi uygulanmıştır. Her çalışmanın sonunda erime eğrisi analizi (melting curve analysis) uygulanarak spesifik transkriptlerin amplifikasyonu gözlenmiş ve HBD transkript miktarları, housekeeping gen standartlarına göre ölçülen G6PDH gen transkriptleri ölçüt alınarak normalize edilmiştir (hedef kopya sayısı/G6PDH kopya sayısı).

**Tablo 1:** Kantitatif RT-PZR’de kullanılan primer ve problar

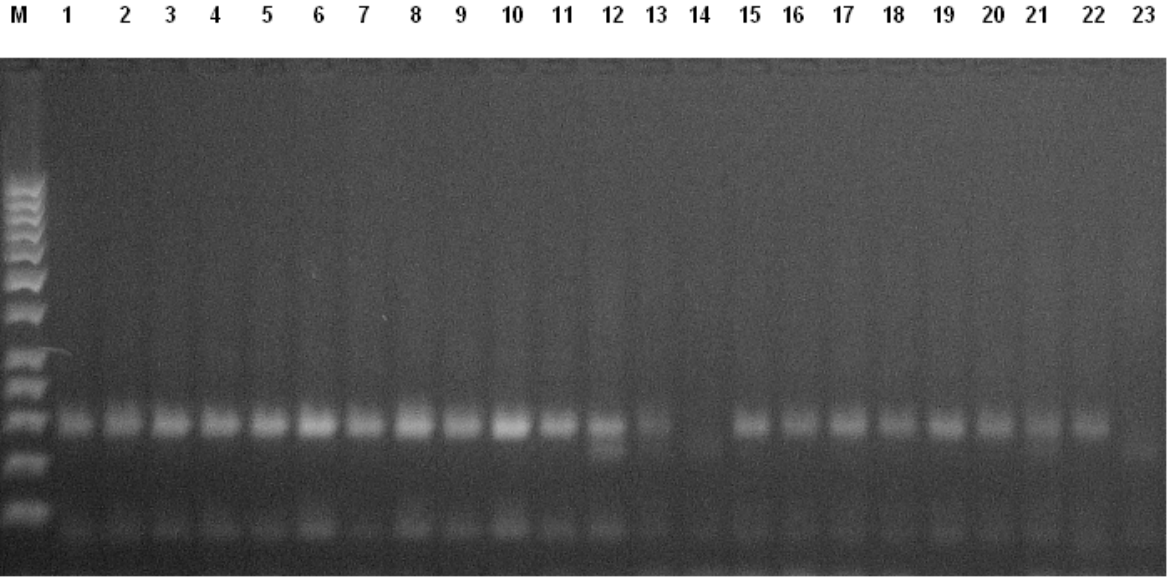
Gen	Primer/Prob	Dizi (5’-3’)
<b>HBD1</b>	DEFB1F	AAC TTC CTA CCT TCT GCT GTT T
	DEFB1R	TTC AAA AGC AAT TTT CCT TTA TTA A
	DEFB1FL	ATC TTA CCA AAA TTC AAG GCA CCT GT-FL
	DEFB1LC	640-ACA GAG GGA AGG CCA AGT GCT G p
<b>HBD2</b>	DEFB4_F	CCT CTT CTC GTT CCT CTT CAT ATT
	DEFB4_R	GCA TCA GCC ACA GCA GCT
	DEFB4_FL	GGT ATA AAC AAA TTG TCA CCT GTG GTC-FL
	DEFB4_LC	640-CCC TGG AAC AAA ATG CTG CAA AA p
<b>HBD3</b>	DEFB103A F	TGT TTG CTT TGC TCT TCC TG
	DEFB103A R	CTT TCT TCG GCA GCA TTT TC
	DEFB103A FL	AGC TGA GCA CAG CAC ACC G-FL
	DEFB103A LC	640-CCG CCT CTG ACT CTG CAA TAA TAT TTC T p

#### **h. HBD-1 Geni Polimorfizmlerinin (-52 G/A, -44 G/C, -20 G/A, +5 G/A) Değerlendirilmesi:**

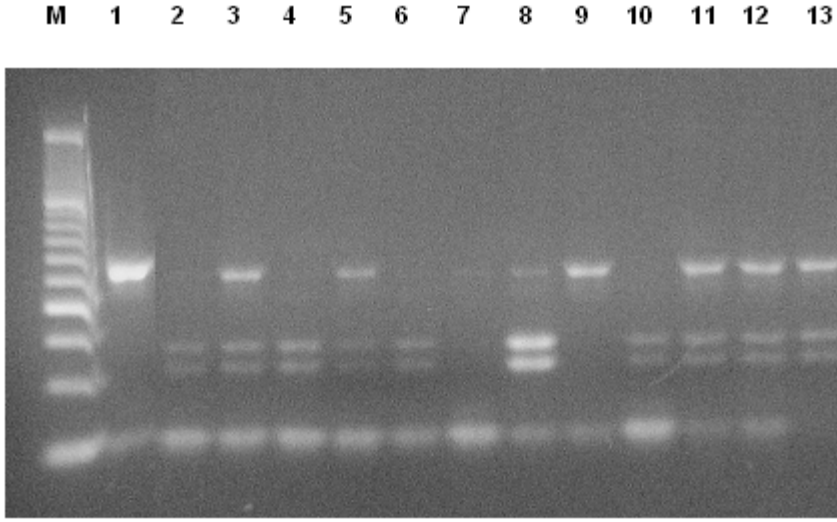
Hasta ve kontrol gruplarından 1 ml. EDTA içeren tüplere alınan periferik kan örneklerinden hazır ticari kit (GF-1 blood DNA Extraction Kit, Vivantis, Malezya) kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılmış ve çalışılincaya kadar -20 C°’de saklanmıştır. İzole edilen DNA örneklerinden Ekzon-1 için F: 5’ CTT GAC TGT GGC ACC TCC CTT CAG 3’, R: 5’ CAG CCC TGG GGA TGG GAA ACT C 3’; ekzon-2 için F: 5’ GCA GCT ACA AGC CAT GAG TCT G 3’ ve R: 5’ TGG CCC AAA GGA GGT ATA CTT C 3’ primerleri kullanılarak PZR ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Bunun için, toplam hacim ekzon 1 için 100 µl, ekzon 2 için 50 µl olacak şekilde 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM dNTP, 40 pmol primer ver 1 U Taq polimeraz içeren PZR karışımları hazırlanmış ve bu karışımlar termal döngü cihazında 94 C°’de 5 dk ilk denatürasyonu takiben 35 siklus olacak şekilde 94 C°’de 30 sn denatürasyon, 62 C°’de 30 sn yapışma ve 72 C°’de 1 dk uzama işlemlerine tabi tutulmuştur. Döngülerin sonunda 72 C°’de 7 dk son uzama gerçekleştirilmiş ve elektroforezle görüntülenene kadar örnekler 4+ C°’de muhafaza edilmiştir. Elde edilen örnekler %2’lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra ethidyum bromid ile boayarak UV altında görüntülenmiştir. Daha sonra, ekzon-1 PZR ürünleri sırasıyla *NlaIV* (*Bmi I*, Vivantis, Malezya), *HgaI* (*Cs I*, Fermentas, Litvanya) ve *ScrFI* (*BmrFI*, Vivantis, Malezya) enzimleri ile; ekzon-2 PZR ürünleri ise *DdeI* (*BstDE I*, Vivantis, Malezya) enzimleri ile kesilmiştir. Elde edilen kesim ürünleri %2.5’lik NuSieve agaroz jel (Vivantis, Malezya) elektroforezine tabi tutulduktan sonra etidyum bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiş ve -52 G/A, -44 G/C, -20 G/A, +5 G/A polimorfizmleri belirlenmiştir (Resim 1-4) (4).



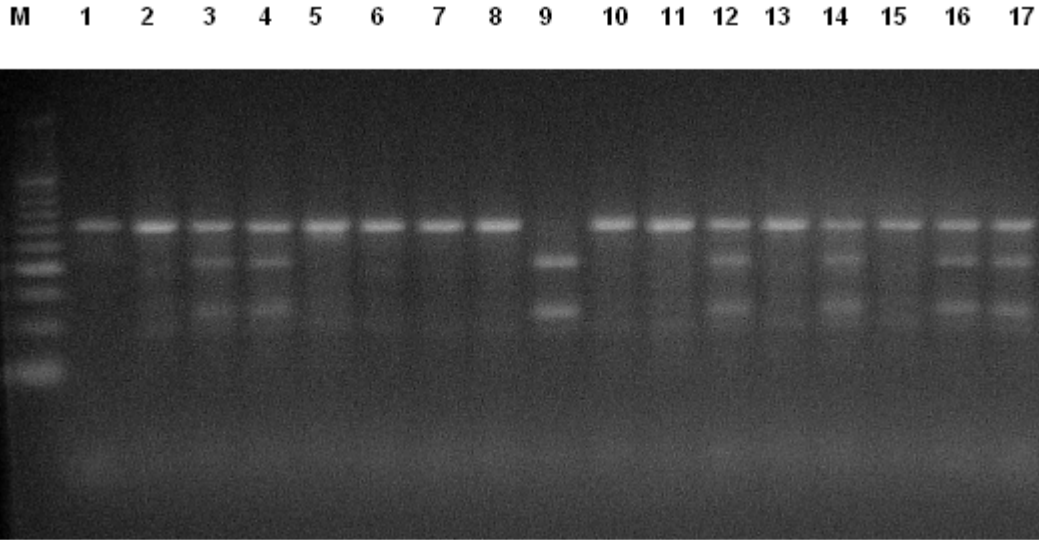
**Resim 1:** Ekzon 1 PZR ürünlerinin *NlaIV* (Vivantis, Malezya) kesim örnekleri. M: 50 bp moleküler büyüklük belirteci, 1-13 kesilen amplikonlar. 2, 7, 9, 11: -52GG genotipli örnekler. 1, 3-6,8, 10, 12, 13: -52GA heterozigot örnekler.



**Resim 2:** Ekzon 1 PZR ürünlerinin *HgaI* (Fermentas, Litvanya) kesim örnekleri. M: 50 bp moleküler büyüklük belirteci, 1-23 kesilen amplikonlar. 1-11,13,15-22: -44GG genotipli örnekler. 12: -44GC heterozigot örnek. 15, 22: -44CC homozigot örnek.



**Resim 3:** Ekzon 1 PZR ürünlerinin *ScrFI* (Vivantis, Malezya) kesim örnekleri. M: 50 bp moleküler büyüklük belirteci, 1-13 kesilen ampliconlar. 1, 7, 9: -20GG genotipli örnekler. 2-6, 11-13: -20GA heterozigot örnekler. 10: -20AA homozigot örnek.



**Resim 4:** Ekzon 2 PZR ürünlerinin *DdeI* (Vivantis, Malezya) kesim örnekleri. M: 50 bp moleküler büyüklük belirteci, 1-17 kesilen ampliconlar. 1, 2, 5-8, 10, 11, 13, 15: +5GG genotipli örnekler. 3, 4, 12, 14, 16, 17: +5GA heterozigot örnekler. 9: +5AA homozigot örnek.

## **i. İstatistiksel Analiz:**

Çalışmaların istatistiksel değerlendirmesi SPSS (Versiyon 11.5) programında gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesi parametrik bir test istatistiği olan “Kruskal Wallis” ile, AEH'nin *S. pyogenes* 'e karşı bakterisidal etkileri arasındaki fark Wilcoxon testi ile araştırılmıştır. Deęerlendirmelerin sonucunda p değeri 0,05'den küçük bulunan değişkenler anlamlı olarak kabul edilmiştir (5).

## IV. Analiz ve Bulgular

### a. Hasta ve Kontrol Gruplarının Ağız Epitel Hücrelerinin Antibakteriyel Etkinliklerinin Karşılaştırılması

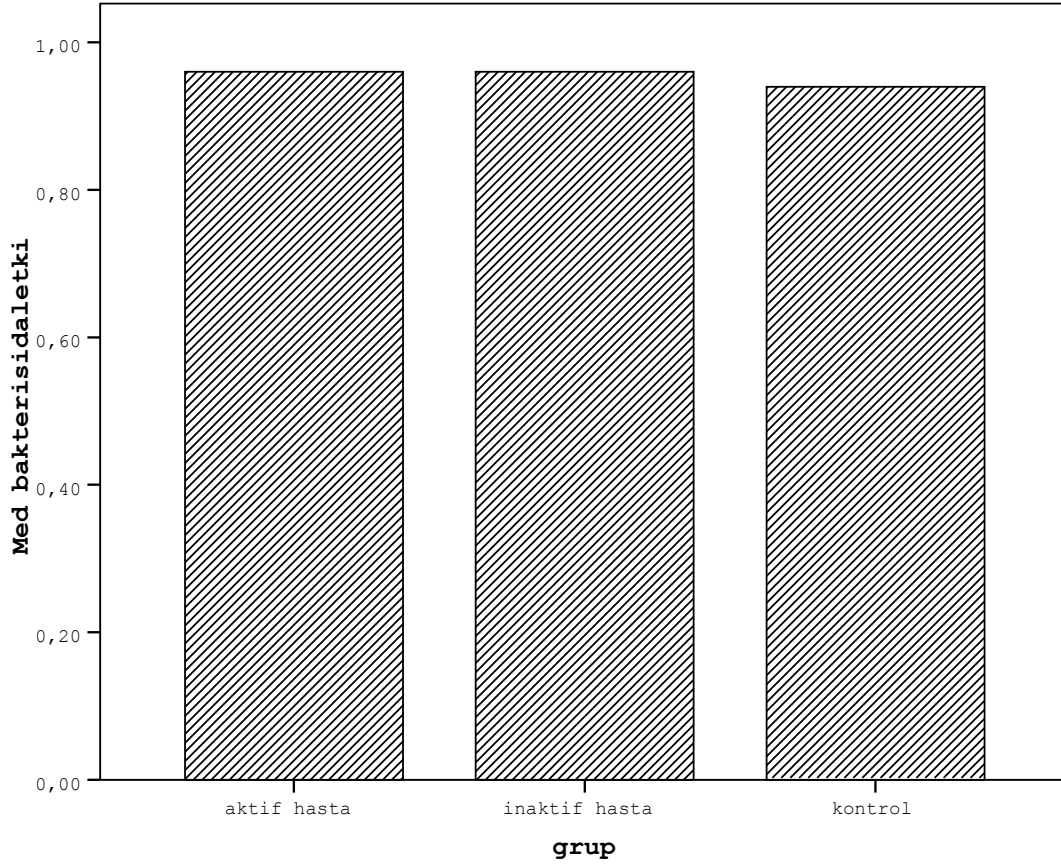
Onbir kontrolün kullanıldığı hazırlık çalışmalarında *S. pyogenes* ile uyarımdan sonraki üçüncü saatte antibakteriyel etkinin ortaya çıktığı, daha sonra bu etkinin kaybolduğu, 24. saat örneklerinde ise mikroorganizmaların yeniden çoğlaması sonucunda yoğun üreme ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bu nedenle, hasta ve kontrol gruplarının oral epitel hücrelerinin ortaya koyduğu antibakteriyel etkinin ve bu etkide beta-defensin ekspresyonlarının rolü olup olmadığının değerlendirilmesinde üçüncü saat örneklerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

*P. aeruginosa* ile yapılan uyarımlarda ağız epitel hücrelerinin herhangi bir antibakteriyel etki ortaya koyamadığı gözlemlendiğinden, *P. aeruginosa* ile uyarım çalışmasına devam edilmemiştir.

Behçet hastaları ve sağlıklı kontrollerin AEH'i 1/1 E/H oranında karşılaştırıldığında 3. saatteki *S. pyogenes*'e karşı bakterisidal etki açısından bütün gruplarda %94-96 düzeyinde bakterisidal etki gözlemlenmekle birlikte, hasta grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ) (Tablo 2, Şekil 1).

**Tablo 2:** Hasta ve kontrol gruplarında gözlenen bakterisidal etki değerleri

Grup	Mean $\pm$ Std. Sapma	Median (Minimum- Maximum)	p değeri
Aktif hasta	92 $\pm$ 7	96 (78-100)	0,659
İnaktif hasta	81 $\pm$ 28	96 (0-100)	
Kontrol	78,55 $\pm$ 29,5	94 (13-100)	



Şekil 1. Hasta ve kontrol gruplarında 3. saattre gözlenen bakterisidal etki

### **b. Hasta ve Kontrol Gruplarının Ağız Epitel Hücrelerinin Defensin Ekspresyonlarının Karşılaştırılması**

Beş sağlıklı kontrol ile altı aktif ve altı inaktif Behçet hastasının oral epitel hücrelerinden uyarım öncesi ve uyarımdan sonraki üçüncü saatte ekstrakte edilen total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirilmiş ve cDNA örnekleri, RT-PZR'de şablon olarak kullanılmıştır. HBD-1, HBD-2 ve HBD-3 gen transkriptlerinin kopya sayıları, "housekeeping" gen olan G6PDH gen transkript sayıları ile normalize edildikten sonra gruplar birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Normalizasyon sonucunda elde edilen değerler tablo-2'de görülmektedir. Uyarım öncesi ve uyarımın üçüncü saatinde hiçbir örnekte HBD1 ekspresyonu gözlenmemiştir. HBD-1, -2 ve -3 ekspresyonları açısından uyarım öncesi ve sonrası değerlerin anlamlı fark göstermediği anlaşılmıştır (p değerleri sırasıyla 1.000, 0.348, 0.264). Uyarım öncesi ve uyarım sonrası 3. saatte tespit edilen HBD2 ve HBD3 ekspresyonlarının ortalamaları kontrol ve hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemiştir (p=0.348).

**Tablo 3:** Kontrol ve hasta gruplarında uyarım öncesinde ve uyarımın üçüncü saatinde elde edilen normalize edilmiş transkript değerleri

Örnek No	Uyarım Öncesi			Üçüncü Saat		
	HBD1	HBD2	HBD3	HBD1	HBD2	HBD3
Kontrol 1	0	0	0	0	0	0
Kontrol 2	0	0	0	0	0	0
Kontrol 3	0	0	0	0	0	0
Kontrol 4	0	0.07	0.01	0	0.03	0
Kontrol 5	0	0.02	0.02	0	0	0
İ.Behçet 1	0	0	0	0	0	0
İ.Behçet 2	0	0.002	0	0	0	0
İ.Behçet 3	0	0	0	0	0	0
İ.Behçet 4	0	0	0	0	0	0
İ.Behçet 5	0	0	0	0	0	0
İ.Behçet 6	0	0	0	0	0	0
A.Behçet 1	0	0	0	0	0	0
A.Behçet 2	0	0	0	0	0	0
A.Behçet 3	0	0.01	0	0	0	0
A.Behçet 4	0	0	0	0	0	0
A.Behçet 5	0	0.3	0.09	0	0.12	0.01
A.Behçet 6	0	0.06	0.01	0	0.14	0.01

### c. Hasta ve Kontrol Gruplarında HBD-1 Geni Polimorfizmleri Sıklığının Karşılaştırılması

HBD-1 geni ekzon 1'de 5' ucunda bulunan -52 G-A, -44 G-C ve -20 G-A polimorfizmleri ile, ekzon 2'de 3' ucunda yer alan +5 G-A polimorfizmlerinin kontrol ve hasta gruplarındaki genotip ve allel sıklıkları sırasıyla tablo-3 ve tablo-4'de görülmektedir. Hasta grubunda -52GA ( $p<0.001$ ) ve -44GG ( $p=0.005$ ) genotipleri kontrollere kıyasla daha sık görülmüştür. Allel sıklıkları karşılaştırıldığında, -52A ( $p=0.039$ ) ve -44G ( $p<0.001$ ) allellerinin Behçet hastalarında kontrollere kıyasla anlamlı olarak daha sık görüldüğü bulunmuştur. -20G/A ve +5 GA polimorfizmlerinin sıklığı iki grup arasında anlamlı fark göstermemiştir ( $p=0.102$  ve  $p=0.919$ ).

Hasta ve kontrol grupları, DEFB1 geni promoter bölgesinde yer alan -52, -44 ve -20 polimorfizmlerinin oluşturduğu haplotipler açısından değerlendirildiğinde, 13 ayrı haplotip tespit edilmiştir. Bu haplotiplerin iki grup arasındaki dağılımı karşılaştırıldığında, GG/GG/GG haplotipinin kontrol grubunda ( $p=0.001$ , OR =9.31), GA/GC/GA haplotipinin ise



hasta grubunda ( $p=0.01$ ,  $OR=3.11$ ) daha sık görüldüğü anlaşılmıştır. Diğer haplotipler açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (Tablo 6).

**Tablo 4:** Kontrol ve hasta gruplarında HBD-1 geni 5'UTR -52, -44, -20 ve 3'UTR +5 polimorfizmlerinin dağılımı

Polimorfizm	Genotip	Kontrol (n=103)		Hasta (n=119)	
		n	%	n	%
5' UTR -52	G/G	43	41,7	25	21
	G/A	58	56,3	94	79
	A/A	2	1,9	0	0
5'UTR -44	G/G	93	90,3	87	73,1
	G/C	9	8,7	26	21,8
	C/C	1	0,9	6	5,0
5'UTR -20	G/G	38	36,9	28	23,5
	G/A	56	54,4	87	73,1
	A/A	9	8,7	4	3,4
3'UTR +5	G/G	78	75,7	87	73,1
	G/A	25	24,3	27	22,7
	A/A	0	0	5	4,2

**Tablo 5:** Kontrol ve hasta gruplarında 5'UTR -52, -44, -20 ve 3'UTR +5 polimorfizmlerinin allel dağılımları

Polimorfizm	Enzim	Allel	Kontrol (n=206)		Hasta (n=238)	
			n	%	n	%
5'UTR -52	Nla IV	G	144	69,9	144	60,5
		A	62	30,1	94	39,5
5'UTR -44	Hga I	G	195	94,7	200	84
		C	11	5,3	38	16
5'UTR -20	Scr F1	G	132	64,1	143	60,1
		A	74	35,9	95	39,9
3'UTR +5	Dde I	G	181	87,9	201	84,5
		A	25	12,1	37	15,5

**Tablo 6:** Kontrol ve hasta gruplarında 5'UTR polimorfizmlerinin oluşturduğu haplotiplerin dağılımı (1: Allel 1 için homozigot, 2: Allel 1 ve 2 için heterozigot, 3: Allel 2 için homozigot olanları ifade etmektedir).

5' UTR Haplotip (-55/-44/-20)	p değeri	Kontrol (n=103)		Hasta (n=119)	
		n	%	n	%
GA/GG/GA	0.651	30	29,1	38	31,9
<b>GG/GG/GG</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>20</b>	<b>19,4</b>	<b>3</b>	<b>2,5</b>
GG/GG/GA	0.636	18	17,5	18	15,1
GA/GG/GG	0.213	15	14,6	25	21
<b>GA/GC/GA</b>	<b>0.010</b>	<b>7</b>	<b>6,8</b>	<b>22</b>	<b>18,4</b>
GG/GG/AA	0.990	5	4,9	1	0,8
GA/GG/AA	0.665	3	2,9	2	1,7
GA/GC/GG	0.214	2	1,9	0	0
GA/CC/GA	0.126	1	0,9	6	5
AA/GG/GG	0.464	1	0,9	0	0
AA/GG/AA	0.464	1	0,9	0	0
GG/GC/GA	0.251	0	0	3	2,5
GA/GC/AA	1.00	0	0	1	0,8

## V. Sonuç ve Öneriler

Behçet hastalığı, ilk olarak 1937 yılında Türk Dermatolog Hulusi Behçet tarafından tanımlanmış olan tekrarlayıcı oral aftlar, genital ülserler, deri lezyonları ve üveyit ile karakterize sistemik inflamatuvar bir hastalıktır (6, 7). Prevalansı Türkiye başta olmak üzere, Orta Doğu ve Japonya'da yüksektir. Hastalığın etiyolojisi bilinmemesine rağmen, immünolojik bozukluklar üzerinde durulmakta, gelişiminden genetik, çevresel, virolojik, bakteriyel ve immünolojik faktörler sorumlu tutulmaktadır (7, 8). Ek olarak, BH serumlarında TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin seviyeleri artmış olarak tespit edilmiştir ve bu proinflamatuvar sitokinler doku hasarından sorumlu tutulmuştur (6, 9). Proinflamatuvar sitokinlerin artmış ekspresyonu BH'nin önemli bir özelliğidir (10). BH etyolojisinin viral, bakteriyel, genetik ve immünolojik bozukluklara dayandığı tahmin edilmektedir (7, 11). BH ile ilişkili olan tekrarlayıcı aftöz stomatitte streptokokkal antijenlere karşı aşırı duyarlılık vardır. BH nötrofillerinin streptokokkal antijen ile uyarıma sitokin yanıtı (IL-1, IL-6, IL-8) doza bağlı olarak artmaktadır. Streptokokkal antijene immünolojik aşırı duyarlılık bu hastaların bazı semptomlarını tetiklemektedir (12). Önceki çalışmamızda, BH'de oral epitel hücrelerinin (EH) *Streptococcus pyogenes* ile uyarımı yapılmış ve sağlıklı kontroller ile kıyaslanarak EH bakterisidal etkisine bakılmıştır ve BH'nin EH antibakteriyel etkinliğinde anlamlı bir düşüklük tespit edilmiştir (2).

Bu çalışmamızda ise, bakterisidal etki mekanizmalarının düzgün işlediğini öngördüğümüz kontrol grubunda yapılan hazırlık deneylerinde, *S. pyogenes*'e karşı anlamlı bakterisidal etkinin (%94) üçüncü saatte ortaya çıktığı gözlenmiş, bu nedenle çalışmanın devamında bakterisidal etki ve defensin ekspresyon değerlendirmeleri uyarım öncesi ve uyarım sonrası üçüncü saat ile sınırlandırılmıştır. Kontrol grubuyla yapılan hazırlık çalışmalarında *P. aeruginosa*'ya karşı bakterisidal etki gözlenmemiş, bu nedenle çalışmanın devamında bu bakteri ile uyarım yapılmamıştır. Behçet hastalarının oral epitel hücrelerinin bakterisidal etkisi, sağlıklı kontrollere göre daha yüksek (%96) bulunmuş olmakla birlikte, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0.659$ ). Bu farktan, önceki çalışmanın aksine, bu çalışmada değerlendirmenin 3. saatte yapılmasından kaynaklanıyor olabilir; erken dönemde bakterisidal aktivite cevabı özellikle sağlıklı bireylerde daha yüksek olmakla birlikte, ilerleyen saatlerde bu fark kapanıyor olabilir.

Antimikrobiyal peptidler, doğal bağışıklık sisteminin bir elemanı olup, bitkiler, böcekler ve hayvanlarda konak savunmasının ilk basamağında yer alırlar ve birçok bakteri,

mantar ve virüse karşı öldürücü etki gösterirler (13). Bu antimikrobiyal peptitler arasında yer alan defensinler, küçük, katyonik moleküller olup, taşıdıkları altı sistein rezidüsü arasında oluşan disülfid bağlarının yerleşimine göre alfa- ( $\alpha$ -) ve beta ( $\beta$ -) ailelerine ayrılırlar. İnsan  $\alpha$ -defensinleri 1-4, nötrofillerin azurofilik granüllerinin ana komponenti iken, 5 ve 6, intestinal Paneth hücrelerinin salgı granüllerinde bulunur. İnsan  $\beta$ -defensinleri 1-4 (HBD-1-4) ise sıklıkla epitelyal hücrelerde eksprese olmaktadır. Defensinler, çeşitli bakteri, mantar ve zarflı virüslere karşı değişen oranlarda antimikrobiyal aktivite gösterir (14). Defensinler, bu etkilerini, hedef hücrelerin membranlarında porlar oluşturarak ortaya koyarlar. Sonuçta, hedef hücreler parçalanır (15).  $\beta$ -defensinler ayrıca, farklı yollardan bağışıklık sistemini uyararak da etkili olurlar. Örneğin, HBD-2, olgunlaşmamış dendritik hücreler ve hafıza T hücreleri için kemokin reseptörü-6 (CCR6) aracılığıyla kemotaktik etki gösterir. Ayrıca HBD-2, Toll Like Receptor (TLR)-4 aracılığıyla da olgunlaşmamış dendritik hücrelerin aktivasyonunu uyarır (14).

Beta defensinlerin ekspresyonu sürekli veya uyarılabilir olabilir. Uyarıcılar arasında çeşitli sitokinler (özellikle IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$ ) ve bakteriyel lipopolisakkaritler bulunmaktadır. HBD-1 sürekli eksprese olmaktadır ve uyarımla ekspresyonu etkilenmez. Buna karşılık HBD-2 ve -3 ekspresyonu, sitokinler ve bakteriyel komponentler tarafından uyarılmaktadır. Bu durum, farklı defensinlerin ekspresyonu ve indüksiyonunda farklı sinyal iletim yollarının kullanıldığını göstermektedir. HBD-2 ve -3'ü indükleyen IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B ve Mitojenle aktive olan protein (MAP) kinaz yollarını kullanarak etki göstermektedir. IFN- $\gamma$ , JAK-STAT yolunu kullanmaktadır, ayrıca HBD-3'ün 5' genomik dizisinde de STAT bağlanma bölgesi tespit edilmiştir (3).

Oral kavitede  $\beta$ -defensin ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir (15-18). Oral keratinositlerin  $\beta$ -defensin eksprese ettiği bilinmektedir. HBD-1 sürekli bir salgılanma gösterirken, HBD-2, ve -3 ekspresyonu çeşitli mikrobiyal komponentler ve sitokinlerle uyarılabilmektedir (3). Oral kavitenin inflamatuvar olaylarında HBD-1, -2 ve -3 ekspresyonunun (11), periodontal hastalıklarda ise özellikle HBD-3 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (17). Tanida ve ark. (19) tükürükte azalmış antibakteriyel proteinlerin *Candida* çoğalmasını indüklediğini göstermiştir. Çalışmamızda kontrol ve hasta gruplarının uyarım öncesi ve uyarımın üçüncü saatinde yapılan değerlendirmelerinde, HBD-1, -2 ve -3 ekspresyonları açısından uyarım öncesi ve sonrası değerlerin anlamlı fark göstermediği; ayrıca hasta ve kontrol grupları arasında da anlamlı fark bulunmadığı gözlenmiştir ( $p>0.05$ ).

Kişiler arasında  $\beta$ -defensin ekspresyonunda farklılıklar olabileceği bilinmektedir (16, 17).  $\beta$ -defensinlerin immünmodülatör ve inflamatuvar etkilerinin de olması nedeniyle, diğer inflamatuvar sitokinlerle defensinlerin ilişkileri de araştırılmaktadır. Joly ve ark. (3), insan oral keratinositlerinde HBD-1, -2 ve -3 ekspresyonunun pro-inflamatuvar faktörler tarafından farklı şekillerde etkilendiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bazal defensin ekspresyonunun bireyler arasında farklılıklar gösterdiğini, HBD-1 ekspresyon düzeylerinin diğer defensinlere kıyasla daha yüksek olduğunu, ancak HBD-2 ve -3'ün uyarı karşısında HBD-1'e kıyasla çok daha yüksek düzeylerde eksprese olmaya başladığını, farklı defensinlerin sitokin uyarımına farklı yanıtlar verdiğini ve defensin regülasyonunda birçok sitokinin rol aldığını tespit etmiştir (3).

Bizim çalışmamızda da, gerek kontrol grubunda gerekse hasta gruplarında beta defensin ekspresyonlarının kişiler arası farklılık gösterdiği görülmüştür. Üçüncü saatte ortaya çıkan bakterisidal etkide, defensin ekspresyonunun rolü olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda, katılımcılardan elde edilen tükürük örneklerinden nötrofiller ayrılmamıştır. Bu nedenle, tükürük örnekleri içerisinde yer alan ve doğal savunma mekanizmalarının önemli araçları olan nötrofiller ve diğer salgısal faktörler (sitokinler vb) üçüncü saatte gözlenen bakterisidal etkide önemli rol oynuyor olabilir.

Kişiler arasında gözlenen defensin ekspresyonundaki farklılığı açıklayabilecek mekanizmalar arasında indükleyicilere değişken cevap, sitokinlerce down-regülasyon, proteazlarca parçalanma ve genetik polimorfizmler yer almaktadır (3). Özellikle DEFB1 geninin promotör bölgesinde yer alan polimorfizmler (-44 başta olmak üzere) HBD-1 ekspresyonunu arttırıcı veya azaltıcı yönde etki göstermektedir (20, 21). Bizim çalışmamızda da, -52 GA ve -44GG genotipleri ile, -52A ve -44G allelleri hasta grubunda kontrole kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Haplotipler açısından değerlendirildiğinde ise; belirtilen polimorfik bölgelerde hiçbir mutasyonu taşımayanlar kontrol grubunda anlamlı olarak daha yüksek iken; her üç polimorfizmi de heterozigot olarak taşıyanların hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Behçet hastalarında HBD ekspresyonlarını ve HBD1 geni polimorfizmlerinin rolünü araştıran başka yayın bulunmadığından, elde edilen sonuçların Behçet hastalığındaki rolünü açıklayacak daha ileri araştırmalarla desteklenmesine ihtiyaç vardır. Defensinlerin etki mekanizmaları antibiyotiklerden farklı olduğundan ve antibiyotiklere dirençli olduğu bilinen birçok bakteriye karşı etkili olduklarından, defensinler ileriki yıllarda, enfeksiyon hastalıklarında alternatif bir tedavi yaklaşımı sağlayabilirler.

## VI. Kaynaklar

1. Özenci, H., Çelik, H.İ., Tekeli, F.A., Aksoy A.M. (2001). Comparison of Growth Inhibition Effect of CaCo2 Human epithelial cells and polymorphonuclear neutrophils on various Candida species. Turkish Journal of Infection. 15: 527-532
2. Dolapci, I., Albayrak, N., Boyvat, A., Ozenci, H. (2003). Antibacterial capacity of oral (epithelial) cells from healthy donors and patients with Behçet's disease. Archives of Dermatological Research. 295: 124-126.
3. Joly S, Organ CC, Johnson GK, McCray Jr. PB, Guthmiller JM. Correlation between  $\beta$ -defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. Mol Immunol 2005; 1073- 1084.
4. Dörk T, Stuhrmann M. Polymorphisms of the human  $\beta$ -defensin-1 gene. Molecular and Cellular Probes 1998; 12: 171-173.
5. Conower WJ. Practical nonparametric statistics, pp:229-239. 1980, 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley and Sons, New York.
6. Sakane T, Suzuki N, Nagafuchi H. Etiopathology of Behçet's disease: Immunological aspects. Yonsei Medical Journal. 38 (4): 350-358, 1997.
7. Sakane T, Takeno M, Suzuki N, Inaba G. Behçet's Disease. NEJM 1999; 341: 1284-1291.
8. Kaneko F, Oyama N, Nishibu A. Streptococcal infection in the pathogenesis of Behçet's disease and clinical effects of minocycline on the disease symptoms. Yonsei Medical Journal. 38 (4): 444-454, 1997.
9. Carletto A, Pacor ML, Biasi D, Caramaschi P, Zeminian S, Bellavite P, Bambara LM. Changes of neutrophil migration without modification of in vitro metabolism and adhesion in Behcet's disease. J Rheumatol. 1997 Jul; 24: 1332-6.
10. Gül A. Behcet's disease as an autoinflammatory disorder. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2005 Feb; 4: 81-3.
11. Sohn S. etiopathology of Behçet's disease; HSV infection and animal model. Yonsei Medical Journal. 38 (4): 359-364, 1997.
12. Mizuki N, Inoko H, Ohno S. Molecular genetics (HLA) of Behçet's disease. Yonsei Medical Journal. 38 (4): 333-349, 1997.
13. Niyonsaba F, Ogawa H, Nagaoka I. Human  $\beta$ -defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumor necrosis factor- $\alpha$  treated human neutrophils. Immunology 2004; 111: 273-281.

14. Proud D, Sanders SP, Wiehler S. Human rhinovirus infection induces airway epithelial cell production of human  $\beta$ -defensin 2 both in vitro and in vivo. *J Immunol* 2004; 172: 4637-4645.
15. Supp DM, Karpinski AC, Boyce ST. Expression of human  $\beta$ -defensins HBD-1, HBD-2 and HBD-3 in cultured keratinocytes and skin substitutes. *Burns* 2004; 30: 643- 648.
16. Dunsche A, Acil Y, Dommisch H, Siebert R, Schroder JM, Jepsen S. The novel human beta defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci* 2002; 110: 121-124.
17. Bissell J, Joly S, Johnson GK, Organ CC, Dawson D, McCray Jr PB, Guthmiller JM. Expression of beta defensins in gingival health and periodontal disease. *J. Oral Pathol Med* 2004; 33: 278-285.
18. Saitoh M, ağabeyko Y, Shimabukuro S, Kusano K, Nishimura M, Arakawa T, Nakashima K, Takuma T, Kaku T, Igarashi S. Correlated expression of human beta defensin-1, -2 and -3 mRNAs in gingival tissues of young children. *Arch Oral Biol* 2004; 49: 799-803.
19. Tanida T, Okamoto T, Okamoto A, Wang H, Hamada T, Ueta E, Osaki T. Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 586-594.
20. Petros J. Transcriptional effect of DEFB1 gene 5' untranslated region polymorphisms. *Cancer Res* 2007; 67: 5997.
21. Milanese M, Segat L, Crovella S. Transcriptional effect of DEFB1 gene 5' untranslated region polymorphisms. *Cancer Res* 2007; 67:5997.

## VII. Ekler

### a) Mali Bilanço ve Açıklamaları

Proje kapsamında alımı yapılan malzemeler tablo-6'da görülmektedir. Malzemelerin ihaleleri bölümler halinde yapılmış, son ihale 01.11.2007 tarihinde tamamlanmış, malzeme teslimleri ise, ihaleyi alan firmalar (Dateks, Diagen, Sacem, İnterlab, Tenay) tarafından 16.11.2007 tarihinde tamamlanmıştır. İstenen malzemeler, yukarıda bahsi geçen deneylerin yapımında kullanılmıştır.

Tablo 6: Proje kapsamında alımı yapılan malzemeler

SIRA NO	MALZEMENİN CİNSİ	MİKTARI	BİRİM	TAHMİNİ BEDEL
1	Doku kültür plağı	500 adet	24 kuyucuklu	1400
2	Santrifüj tüpü	500 adet	15 ml'lik	150
3	Santrifüj tüpü	500 adet	50 ml'lik	200
4	Serolojik pipet	500 adet	1 ml'lik	100
5	Serolojik pipet	500 adet	2 ml'lik	110
6	Serolojik pipet	500 adet	5 ml'lik	170
7	Serolojik pipet	500 adet	10 ml'lik	180
8	Serolojik pipet	200 adet	25 ml'lik	210
9	Enjektör filtre	200 adet	0.2 µm	500
10	Naylon membran	100 adet	20 µm por çaplı	310
11	Pipet ucu	1000 adet	5ml'lik	150
12	HBSS	20 adet	500 ml'lik	300
13	Penisilin-streptomisin	2 adet	100 ml'lik	40
14	L-glutamin	1 adet	100 ml'lik	20
15	Fetal calf serum	5 adet	100 ml'lik	200
16	RPMI 1640	10 adet	500 ml'lik	200
17	Standart idrar özesi	1000 adet	10 µl'lik	75
18	Petri kutusu	5000 adet	9 cm çaplı	900
19	Eppendorf tüp	15000 adet	1.5 ml'lik	1000
20	Sarı pipet ucu	25000 adet	200 µl	500
21	Sarı pipet ucu	10000 adet	200 µl-filtreli	500
22	Mavi pipet ucu	20000 adet	1000 µl	600
23	Blood agar base	10 adet	500 gr	1000
24	EMB	10 adet	500 gr	1000
25	BHI agar	10 adet	500 gr	1500
26	PBS tablet	2 adet	100'lük	500
27	DMSO	1 adet	5x10ml'lik	250
28	Enjektör	200 adet	20 ml.	70
29	Kriyotüp	1000 adet		450
30	Vidalı kapaklı mikrosantrifüj tüpü	5000 adet	~2 ml'lik	1500
31	Sodyum fosfat	1 adet	5 kg	400
32	Tip I, low EEO tip agaroz	1 adet	250 g	450
33	Kare petri kutusu	2000 adet	8 x 8 cm	2000
34	Asetik asit	1 adet	1lt	50
35	Siğir serum albümini	1 adet	100 gr	400



36	Trizol reagent	5 adet	200 ml.	4750
37	Kloroform	1 adet	5 lt	200
38	İzopropil alkol	2 adet	500 ml	100
39	Absolü etanol	1 adet	5 lt	150
40	Moleküler çalışma için distile su	2 adet	100 ml	75
41	Glikojen	2 adet	100 µl (20µg/ µl içeren)	2000
42	RT-PZR için Primerler	181 bç	3 çift	1800
43	Kantitatif RT-PZR için primer-prob set	141 bç	3 çift	2000
44	Polimorfizm için primerler	180 bç	2 çift	600
45	dNTP set	5 adet	1 ml.	700
46	Taq DNA polimeraz	10 adet	500U	1025
47	İğne	600 adet	26 no (gauge)	75
48	Agaroz	3 adet	500 gr	1500
49	Nu Sieve Agaroz	1 adet	500 gr	2250
50	Ethidium bromide	1 adet	25 mg	80
51	RNA ekstraksiyon kiti	12 kutu	50 örneklilik	6000
52	cDNA sentez kiti	20 kutu	30 örneklilik	12500
53	NlaIV veya izoşizomeri	2500 U		2000
54	Hgal veya izoşizomeri	2500 U		4000
55	ScrFI veya izoşizomeri	2500 U		500
56	Ddel veya izoşizomeri	2500 U		750
57	Enzim saklama kutusu	2 adet		300
58	Marker	2 adet	pBR332 DNA/HaeIII kesim	500
59	Marker	2 adet	φX174 DNA/HaeIII kesim	500
60	PCR tüpü	5000 adet	0,2 ml	400
61	Kandan DNA ekstraksiyon kiti	300 örneklilik		1500
62	Plastik spor	5 adet	0,2 tüp için	75
63	Plastik spor	5 adet	1,5 tüp için	60
64	Plastik DNA saklama kutusu	20 adet	81 veya 100 örneklilik	300
65	Pipet kutusu	5 adet	200 µl	40
66	Pipet kutusu	5 adet	1000 µl	40
67	Tek kullanımlık maske	1000 adet		100
68	Tek kullanımlık eldiven	20 kutu	Pudralı	175
69	Tek kullanımlık eldiven	20 kutu	Pudrasız	200
70	Light cyclers kapiller	3 kutu	8 x 96'lık	3750
	Light cyclers FastStart DNA			9000
71	Master <sup>PLUS</sup> HybProbe	4 kutu	480'lik	
	Light cyclers h-G6PDH Housekeeping			2000
72	gene set	3 set		
73	RNase AWAY Reagent	1 adet	250 ml	850
74	Yüzey dezenfektanı	5 adet	1 lt'lik	225
75	Plastik kapaklı tüp	100 adet	10 ml'lik	45
76	Enjektör	100 adet	10ml.lik	35
77	EDTA disodyum tuzu	1 adet	500 gr	130
			<b>TOPLAM</b>	<b>80665</b>

## **b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar**

Bu proje kapsamında makine ve teçhizat alımı yapılmamıştır. LightCycler 1.5 cihazı, LightCycler kitlerini temin etmek üzere ihaleyi alan firma (Tenay Elektrik Medikal Ltd. Şti.) tarafından proje süresince kullanılmak üzere Anabilim Dalımız Moleküler Mikrobiyoloji Tanı ve Araştırma Laboratuvarı'na kurulmuştur. Firma tarafından projenin kapatılmasını takiben geri alınacaktır.

## **c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar**

Kesim III'de sunulmuştur.

## **d) Sunumlar:**

1. Karahan ZC, Biriken Salın D, Boyvat A, Dolapçı I, Aksu E, Ozenci H. Functional Polymorphisms and Haplotypes of Human Beta Defensin 1 (DEFB1) Gene in Behçet's Disease Patients. 14th International Congress on Behçet's Disease. 8-10 Temmuz 2010. Londra, İngiltere.

## **e) Yayınlar ve Tezler**

-