

## Araştırma

# Hepatit B Virüs (HBV) Yüzey Antijeni (HBsAg) ve Özgül Antikor Kompleksi Modelinde Antikor Yanıt Modülasyonunun Araştırılması<sup>#</sup>

Resul KARAKUŞ, Cemalettin AYBAY

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı, ANKARA

### ÖZET

*Temas sonrası profilaktik uygulamalarda özgül immünglobulin ile antijen verilerek hem nötralizasyon hem de bağışıklama amaçlanır. Kullanılan antikorun izotipi ve antijenin niteliği oluşan antikor yanıtları üzerinde artırıcı veya azaltıcı etkilerde bulunabilmektedir. Bu duruma ikili (dual) immünmodülatör etki denilmektedir ve klinik uygulamalarda bu etkiden yararlanılmaktadır. Rh (-) anneye, Rh (+) fetal eritrositlere karşı gelişebilecek antikor yanıtlarını baskılamak amacıyla anti-D immünglobulinleri verilebilirken, HBV ile temas sonrası antikor yanıtı oluşturabilmek ve olası virüs ve antijenleri nötralize etmek amacıyla hem hepatit B immünglobulini hem de HBsAg içeren aşı eş zamanlı olarak verilir. Antikorların özgül antijenleri ile birlikte verildiklerinde immünmodülatör etkilerini "ad" ve "ay" subtipi hepatit B virüs yüzey antijenleri ile "a" epitopuna özgül anti-HBs IgG2a izotipi antikorların oluşturdukları etki üzerinden incelemek amacıyla BALB/C ırkı farelerde bir deney modeli kurduk. Çalışmamız sonucunda yalnızca antijen ve adjuvan verdiğimiz kontrol grubuna göre özgül immünglobulin ve partiküler nitelikte bir antijene karşı da antikor yanıtında bir artış gözlenebileceğini saptadık. Buna karşın özgül olmayan fare IgG ile antijenin birlikte verilmesinin veya özgül olmayan fare IgG'ye antijenin kimyasal olarak kovalent bağlanarak verilmesinin antikor yanıtı üzerinde yalnız antijen verilmesine göre önemli bir fark oluşturmadığını belirledik. Mevcut sonuçlar antijen ve özgül antikorların birlikte verilmesinin immünmodülatör etkiler açısından geliştirilmeye açık olduğunu ve optimal klinik uygulamaların bu mekanizmalar altındaki moleküler yolların tam olarak aydınlığa kavuşturulması ile mümkün olabileceğini göstermektedir.*

**Anahtar Kelimeler:** İmmünmodülasyon, antikor, HBsAg, ad, ay, immünkompleks.

### SUMMARY

#### Investigation of Antibody Responses in a Model of Hepatitis B Virus (HBV) Surface Antigen (HBsAg) and Specific Antibody Complex

*Both neutralization and immunization are aimed by administering specific immunoglobulin and antigen in post-exposure prophylactic applications. Isotype of the antibody and properties of antigen can act on antibody responses either by enhancing or suppressing effects. This phenomenon, called the dual immune modulatory effect, is being exploited in clinical applications. While administering anti-D immunoglobulins to Rh (-) mothers prone to de-*

*velop anti-Rh antibodies against fetal erythrocytes, in post-exposure HBV prophylaxis hepatitis B immunoglobulin and a vaccine containing HBsAg are administered simultaneously in order to enhance antibody responses and to neutralize possible free virus and antigens. We have constructed a model in BALB/C mice to investigate the immune modulatory effects of antibodies administered with their specific antigen via using "ad" and "ay" HBV surface subtype antigens with an "a" epitope specific anti-HBs IgG2a antibody. Our study revealed that depending on the antibody isotype, an antigen having particulate properties given with adjuvants can enhance the antibody responses in comparison to the control group which was administered only antigen and adjuvant. On the other hand, we determined that non-specific mouse IgG given with the specified antigen or non-specific mouse IgG covalently linked to the antigen had no significant effect on the antibody responses in comparison to the control group. Presented results show that the administration of antigen and specific antibodies together in regard to immune modulatory effects is an open arena for being developed further and that optimal clinical practices could be possible by revealing the molecular pathways underlying these mechanisms.*

**Key Words:** Immune modulation, antibody, HBsAg, ad, ay, immune complex.

# Bu çalışma, Dr. Resul Karakuş'un immünoji doktora tezinden türetilmiştir. Çalışma kısmi olarak "The 1<sup>st</sup> Joint meeting of European National Societies of Immunology under auspices of EFIS-16<sup>th</sup> European Congress of Immunology (Poster: PB-2423), Paris-Fransa, 2006"da sunulmuştur.

## GİRİŞ

Antijen ve özgül antikorunun birlikte verilmesi antikor yanıtlarını değiştirebilmektedir. Antijen ve bu antijene bağlanmış durumdaki özgül antikor immünkompleksi oluşturur. İmmünkompleks verildiği deneysel model uygulamalarında ilgili antijene karşı gelişen antikor yanıtı kullanılan antikor izotipi ve antikor glikolizasyon oranına göre değişebilmektedir. Bu değişiklik antijenin tek başına verildiği durumlara göre artma veya azalma biçiminde olabilmektedir. Bu biçimde indüklenen antikor yanıtlarında antijen niteliği de önem taşımaktadır. Partiküler antijenlerle birlikte örneğin; immünglobulin (Ig)M, IgG veya IgE'nin verilmesi gelişen antikor yanıtları üzerinde artırıcı veya baskılayıcı, dual bir etki oluşturabilmektedir. Bu çerçevede, IgG ile çözünür nitelikte bir protein antijenin verilmesinin görece artmış yanıtlara, adjuvanla birlikte verilen antijenlerin ise görece düşük yanıtlara yol açtığı düşünülmektedir (1-3).

Antijen ve özgül antikorunun verilmesi tartışılmalı da olsa klinikte geçerli bir uygulamadır. Bu uygulamalar özellikle aktif ve/veya pasif temas sonrası profilaksi olarak adlandırılan çeşitli durumlarda söz konusudur ve antijen ve antijene özgül antikorun birlikte verilmesinden oluşur. Farklı bölgelerden, ama eş zamanlı verilen antijen veya toksoid ve özgül Ig uygulamalarına örnek olarak; kuduz virüsü, *Clostridium tetani* ve hepatit B virüsü (HBV) ile olası temaslar sonrasında gerçekleştirilen klinik profilaksi uygulamaları verilebilir. Bu tür uygulamalarda amaç, ilgili antijen veya tokso-

id ile aşılama serisinin başlatılması ve özgül Ig ile de dokulara geçtiği varsayılan viral antijen veya toksinin bağlanması dolayısı ile nötralizasyondur. Uygulanan antijen primer bir immün yanıt oluşturmaya yönelik olabileceği gibi, sekonder immün yanıtın indüksiyonu amacıyla da uygulanmaktadır. Mikroorganizma dışı bir alandan ve tersinden bir örnek olarak Rh (-) anneye fetal Rh (+) eritrositlere karşı olası anti-Rh immün yanıtın gelişmesini önlemek amacıyla verilen anti-D Ig'leri gösterilebilir. İmmün yanıt açısından bu tür klinik uygulamaların halihazırdaki literatür bilgileri ile açıklanamayan yönleri söz konusudur. Gerek in vivo gerekse in vitro çeşitli modellerde eş zamanlı olarak verilen antijen ve özgül antikorların her durumda koruyucu bir yanıtı açmadığı bilinmektedir. Bilakis, immünojik regülasyon mekanizmaları gereği temelde antikor yanıtını sağlayacak B-lenfositlerde verilen antijen ve özgül antikorlarla oluşan immünkomplekslerin hızla eliminasyonu veya inhibitör reseptörlerin tetiklenmesi ile immün yanıtızsızlık durumu (aneri) oluşabileceğine dair bilgi mevcuttur (1,4,5).

Bunun öne çıkan örneklerinden birini HBV ile olası temasa karşı geliştirilen profilaksi önerilerinde görmek mümkündür. HBV ile temasa yönelik koruyucu önlemler 25 yıldır uygulanmakta ve bu anlamda da tartışılmaktadır. Bugün artık gerek temas sonrası profilaksi rejimlerinde, gerekse vertikal geçişin önlenmesi amacıyla farklı bölgelerden, ancak eş zamanlı hepatit B (HBIG)'yi ve yüze antijenini içeren çeşitli aşı uygulamaları önerilmektedir. İncelenen literatürde bu öneriyi bi-

limsel bir zemine oturtan çalışmaların yanında, eş zamanlı HBIg ve hepatit aşı uygulamasının tartışmalı yönlerini de ele alan çalışmalar bulunmaktadır. Tek başına aşılanmanın kronik HBV enfeksiyonu gelişimini önlemede yeterli olduğunu, aşıya ek olarak verilen HBIg'in ek bir yarar sağlamadığını ve yalnızca aşı uygulaması ile aşı ile birlikte Ig uygulamasına göre daha yüksek antikor titreri elde edildiğini bildiren raporlar mevcuttur (4,6-10). HBV ile temas sonrası profilaksiye yönelik aşı ve eş zamanlı HBIg uygulamalarının immün yanıt üzerindeki etkisi moleküler etkileşimlerin tam olarak açıklığa kavuşturulması ile netlik kazanacaktır.

Çalışmamızda “ad” ve “ay” antijenleri birlikte verilen antikorların antikor yanıtı üzerindeki etkisini HBsAg “a” epitopuna özgül monoklonal IgG2a izotipinde fare antikoru üzerinden araştırmayı amaçladık.

#### MATERYAL ve METOT

Çalışma öncesi gerekli etik onay T. C. Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığından alınmıştır. BALB/C fareler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesinden temin edilmiş ve çalışma bitimine kadar kendi laboratuvarımızda oluşturduğumuz bakım ünitesinde idame ettirilmiştir. Kullandığımız HBsAg “a” epitopuna özgül IgG2a monoklonal antikoru sentezleyen hibridoma laboratuvarımızda daha önceki çalışmalar sırasında elde edilmişti. Çalışmada öngörülen her bir grup için sekiz adet BALB/C fare ayrıldı. Fare serumu ve özgül olmayan fare IgG ayrıştırılması için de aynı ırk fareler kullanıldı.

Hibridoma besiyerine (RPMI-1640 besiyeri, L-glutamin ve  $\text{NaHCO}_3$ 'ü; PAA Laboratories, Linz, Avusturya) destek amacıyla fetal sığır serumu (FBS, Fetal Bovine Serum, Gold-FBS, PAA Laboratories, Linz, Avusturya) IgG açısından tam depleksiyona uğratarak kullanıldı. FBS, inaktivasyon ( $56^\circ\text{C}$ 'de 30 dakika) sonrasında protein G kolonundan (protein G-agarose, 2 mL, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) geçirilerek alınan çözelti 0.2  $\mu\text{m}$  filtreden geçirildi ve IgG'den arındırılmış FBS (“G-FBS”) olarak kullanılacağı zamana kadar derin dondurucuda muhafaza edildi. Hibridoma hücreleri 250 mL'lik kültür şişelerinde (CellStar<sup>R</sup>, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Almanya) %10 G-FBS besiyeri desteği ile monoklonal antikor (mAb) saflaştırılma aşamasına kadar idame ettirildi.

Aşılanmamış fareden özgül olmayan IgG havuzu oluşturmak amacıyla fareler ketamin: ksilazin kokteyli ile genel anesteziye sokuldu ve intrakardiyak kan alımının ardından servikal dislokasyon uygulandı. Ayrıştırılan serum havuzu fosfatlanmış tampon salin (10 mM PBS pH: 7.4) içinde 1/10 dilüe edilerek protein G kolonundan geçirildi. İlgili kolon daha sonra yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC; HPLC System, 1100 Series, Agilent Technologies, Waldbronn, Almanya; HPLC Software ChemStation, Agilent Technologies 1999-2000) cihazına entegre edildi ve 0.1 M sitrik asit pH: 2.4 ile elüsyonu yapılarak alınan pik 150  $\mu\text{L}$  trizma (Trisma base, Sigma) ile nötralize edildi. Elde edilen özgül olmayan fare IgG havuzunu tuzlardan arındırmak amacıyla Sephadex G-25 Fine filtrasyon jeli doldurulmuş 78 x 300 mm kolona (Phenomenex, Torrance, CA, ABD) 1 mL/dakika sabit akım hızında, çalışma tamponu olarak PBS ile yüklendi. Tuzlardan arındırılmış fare IgG havuz piki ayrıştırıldı ve toplam 2.5 mL özgül olmayan fare IgG havuzu 500  $\mu\text{L}$  kısımlara bölünerek  $-80^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanmış derin dondurucuya kaldırıldı.

Hibridoma kültür süpernatantları havuzlanarak santrifüjlendi (450 x g, 10 dakika) ve doymuş amonyum sülfat (Merck, Almanya) ile 1:1 oranında karıştırılarak çöktürme başlatıldı. Gece boyu  $+4^\circ\text{C}$ 'de devam ettirilen reaksiyon 5000 x g ve  $+6^\circ\text{C}$ 'de 40 dakika santrifüjlenerek sonlandırıldı ve oluşan çöktürmeler PBS ile süspanse edilerek havuzlandı. Elde edilen anti-HBs IgG2a örneği PBS'ye karşı gece boyu diyaliz (Spectra/PorR, 12-14 kDa, Spectrum Medical, La, CA, ABD) edildi ve oluşan çözelti 2.5:1 oranında PBS ile dilüe edilerek protein G kolonuna yüklendi. Protein G kolonu HPLC'ye entegre edilerek bağlı antikor eldesi için 0.1 M sitrik asit, pH: 2.4 uygulanarak fraksiyonlar toplandı. Nötralizasyonu takiben tuzlardan arındırılan çözelti 0.2  $\mu\text{m}$  çaplı filtreden geçirilerek protein içerikleri (HPLC ile) tayin edildi. Protein içeriği tayininde standart olarak sığır serum albumini [Bovine Serum Albumin (BSA)] kullanılmış, protein içeriği bilinmeyen çözeltilerin protein konsantrasyonları standartlara göre oluşturulan regresyon eğrisi baz alınarak hesaplanmıştır.

Aşı materyalinin hazırlanması için insan plazma kökenli ve sodyum azid içeren “ad” (saflaştırılmış; Biondesign, cat R36100, Lot 1H23903, 5 mg/mL, Biondesign International, Saco, Maine) ve “ay” (saflaştırılmış; Biondesign, cat R36200, Lot

8H23903, 5 mg/mL, Biodesign International, Saco, Maine) antijenlerinin 200 µL'de 5 mg/mL'lik vial-fabrikasyon konsantrasyonları PBS eklenerek 1 mg/mL'lik konsantrasyonlara getirildi. Antijenlerin PBS içinde homojenleşmesi sağlandıktan sonra her bir deney grubu için 150 µL (= 150 µg) "ad" + 150 µL (= 150 µg) "ay" ayrıştırıldı. Grup 1 yalnızca antijen içeren grup olduğu için final antijen konsantrasyonu total 300 µg/mL olacak şekilde PBS ile 1 mL'ye tamamlandı. Hesaplanan protein konsantrasyonları gereği ve aşılama yapmadan önce antijenik epitopların tümünün maskeleyenmesini önlemek amacıyla grup 2, grup 3 ve grup 4 için eklenecek toplam antikor miktarları final 1 mL'lik hacimde toplam antijen konsantrasyonunun 1/10'u olacak biçimde, grup 2 için 27 µL (= 29.7 µg) IgG2a, grup 3 ve grup 4'ün her biri için 21.4 µL (= 29.9 µg) özgül olmayan fare IgG eklendi. Grup 4 için öngörülen kimyasal kovalent bağlanmanın gerçekleşmesi amacıyla 100 µL glutaraldehid (%2.5'lik) eklendi. Grup 4 için hazırlanan aşılama materyali "ad" ve "ay" antijenleri + özgül olmayan fare IgG + glutaraldehid çözeltisi olarak iki saat, oda ısısında ve ışıktan korunarak, karıştırıcıda (BIOSAN, Türkiye) inkübe edildi. Bu inkübasyonun ardından "quenching" reaksiyonu için final molaritesi 0.1 M olacak biçimde 1 M etanolaminden (Sigma, E-9508) 78.6 µL eklenerek, aynı koşullarda bir saat daha inkübe edildi. Tüm gruplarda toplam hacim PBS ile 1 mL'ye tamamlandı (grup 1 için 700 µL, grup 2 için 673 µL, grup 3 için 678.6 µL ve grup 4 için 500 µL).

Grup 2 ve grup 4 için kullanılacak materyalin aşılama öncesi kimyasal olarak etkinliğinin devam ettiği ELISA yöntemine dayalı bir deney ile gösterildi. Özetle, yüksek bağlama kapasiteli steril mikropipler (Corning Incorporated, Corning, Almanya) 0.05 M karbonat-bikarbonat tamponu (CBB, pH: 9.6) içerisinde anti-fare IgG (konak keçi; Sigma-3014) ile 100 µL/çukur olacak biçimde +4°C'de gece boyu inkübe edilerek kaplandı. %1 BSA-PBS ile 3 saat, oda ısısında bloke edildi. Blok sonrası üç kez PBS-T (PBS-Tween20 tamponu) ile otomatik yıkayıcıda (Columbus Plus, Tecan, Tecan Avusturya GmbH, Grödig, Avusturya) yıkanan plaklara toplam antijen içeriği PBS içinde 1 µg/mL olacak şekilde düzenlenmiş aşı materyali ile başlanarak, örneklerin 1/10 dilüsyonları 100 µL/çukur biçiminde dağıtıldı. Oda ısısında 1 saat inkübasyonun ardından üç kez PBS-T ile yıkanan plaklara %100 FBS'de hazırlanmış fare IgG 50 µL/çukur ola-

cak şekilde dağıtılarak oda ısısında bir saat inkübe edildi. Daha sonra 50 ng/mL konsantrasyonda ve laboratuvarımızda daha önceden hazırlanmış olan biotinlenmiş-anti-HBs IgG2a'dan 50 µL/çukur olarak dağıtıldı ve tekrar oda ısısında bir saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda plak üç kez PBS-T ile yıkanarak 100 µL/çukur olacak biçimde Streptavidin-HRP ("Horse Radish Peroxidase-conjugated Streptavidin", Roche Diagnostics, Almanya) dağıtıldı ve oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası üç kez yıkanan plağa 100 µL/çukur TMB-Substrat (3,3',5,5'-Tetra-Metil-Benzidin) eklenerek, oda ısısında ışıktan korunmuş olarak 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 100 µL/çukur 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dağıtılarak reaksiyon durduruldu ve ELISA okuyucusu (Sunrise Remote/Touch Screen, Tecan Austria GmbH, Grödig, Avusturya) ile 450 ve 450/620 nm'de okutuldu. Aşılama için hazır olan her dört grubun materyali, aşılamanın yapılacağı güne kadar derin dondurucuya kaldırıldı.

Aşılama işlemi için 850 µL "complete Freund's" (Sigma, F-5881) adjuvanı ile 850 µL ilgili grubun aşı materyali birlikte homojenleştirildi ve akabinde gruplardaki her bir fare için 200 µL volümde olacak biçimde 26 Gauge uçlu enjektörlerle (Hayat Tıbbi Aletler, İstanbul, Türkiye) intraperitoneal olarak verildi. Sekonder aşılama "Complete Freund's" adjuvanı yerine "Incomplete Freund's" (Sigma, F-5506) adjuvanı kullanılmak üzere primer aşılama 14 gün sonra benzer şekilde yapıldı.

Primer aşılamanın 14. ve 28. (sekonder aşılamanın 14.) günlerinde anestezi yapılarak gruplardaki her bir fareden kuyruk kanları alınarak mikrosantrifüj ile serumları ayrıştırıldı ve derin dondurucuya kaldırıldı. Primer ve sekonder anti-HBs yanıtlarını değerlendirmek amacıyla ELISA mikropipleri 100 µL/çukur olacak şekilde "ad-ay" antijenlerinin PBS'deki total 1 µg/mL'lik konsantrasyonunda (her bir antijen için 0.5 µg/mL olacak şekilde) +4°C'de bir gecelik inkübasyon ile kaplandı. Akabinde 3x PBS-T ile yıkanan plaklara 200 µL %1 BSA-PBS/kuyucuk şeklinde dağıtılarak oda ısısında 3 saat inkübe edildikten sonra ELISA çalışmalarında kullanıldı. Bir dilüsyon plağında her bir fare serumu ısı ile inaktive edilmiş insan serumu içinde 1/100 ve 1/1000 dilüsyonlarda hazırlandı ve oda ısısında bir saat inkübe edildi. Bu işlemin ardından daha önce kaplanıp, bloke edilmiş ELISA mikropiplerine 3x PBS-T ile yıkama sonrası dilüsyon plağından aktarımlar yapıldı ve oda ısı-

sında bir saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası plak 3x PBS-T ile yıkanarak %1 BSA-PBS'de 1/20.000 dilüsyonda ve %10 insan serumu içerecek şekilde hazırlanan HRP işaretli anti-fare IgG (H + L) konjugat (BioRad<sup>R</sup> Laboratories, Hercules, CA, ABD) 100 µL/çukur olacak biçimde dağıtıldı ve bir saat süreyle oda ısısında inkübe edildi. Akabinde PBS-T ile 3x yıkanan plağa 100 µL/çukur TMB-substrat eklenerek, reaksiyon 15. dakikada 100 µL/çukur 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile durduruldu ve ELISA okuyucuda 450 ve 450/620 nm'de okutuldu.

Ölçümleri tamamlanmış tüm fareler Ketamine-Xylazine kokteyli ile genel anesteziye sokularak servikal dislokasyona tabi tutuldu. Regresyon analizleri için MicroStat, gruplar arası ve grup içi karşılaştırmalar için uygulanan Mann-Whitney U test ve Wilcoxon için "SPSS ver. 10.0 for Windows" (SPSS Inc., Chicago, IL) paket programları kullanıldı.

### BULGULAR

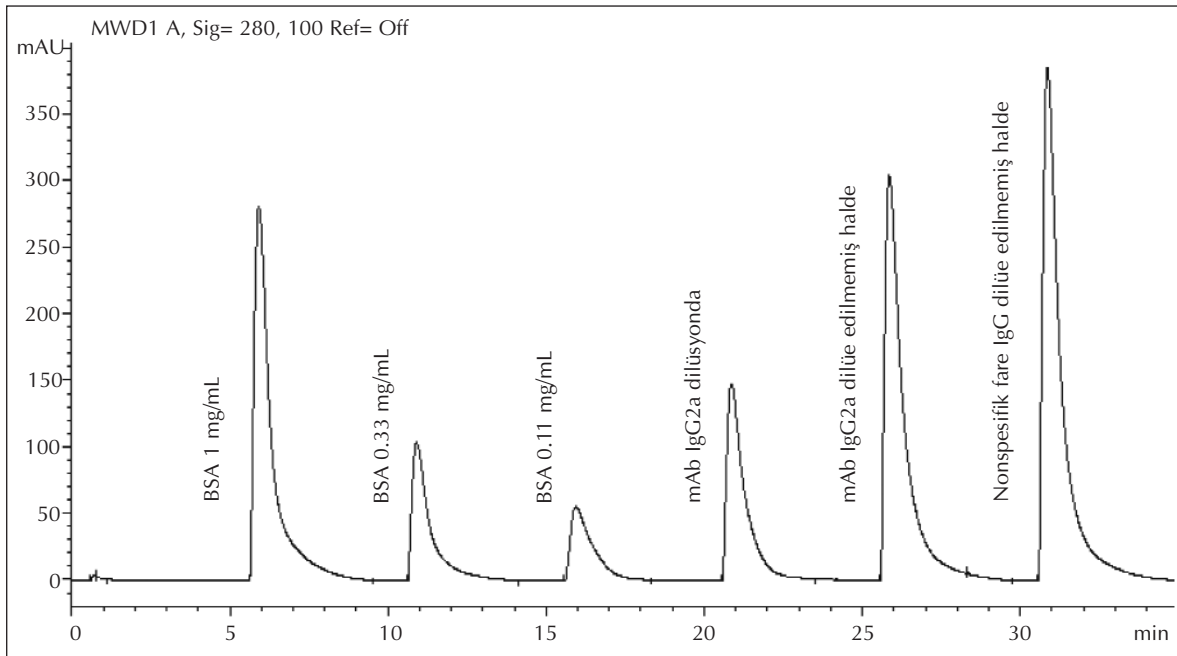
Konsantrasyonu bilinmeyen, ancak kromatogram çıktısından zamana bağlı pik alan ölçümleri belirlenen IgG2a ve özgül olmayan fare IgG için regresyon formülüne dayanarak MicroStat ile protein konsantrasyonları hesaplaması yapıldı. Bu hesaplamalara göre protein konsantrasyonları monoklonal IgG2a antikoruna için 1100 µg/mL ve özgül

olmayan fare IgG için 1400 µg/mL olarak belirlendi (Şekil 1).

Çalışmamızda iki farklı biçimde oluşturulan immünkomplekslerin kimyasal olarak etkin oldukları aşılama öncesi gösterilmiş, aşılama işlemine daha sonra geçilmiştir. Kurgulanan ELISA düzeneği ile in vitro ortamda oluşturduğumuz antijen + özgül IgG2a (grup 2) ve glutaraldehid ile kimyasal olarak bağlanmış antijen + özgül olmayan IgG'nin (grup 4) hem antijen epitoplara hem de antikor Fc kısımları açısından aktif olduğunu, grup 3'te öngörüldüğü üzere immünkompleks oluşmadığı gösterildi. Grup 2, grup 3 ve grup 4 için aşı materyallerinin 1 µg/mL konsantrasyonlarına karşılık elde edilen optik dansiteler (450 nm) sırası ile 2.161, 0.190 ve 0.723 olarak saptanmıştır.

Deney gruplarında yer alan farelerin 14. günde primer immün yanıt için kanları alındıktan ve sekonder immün yanıt için aşılama tekrarlandıktan sonraki 24 saat içinde grup 2'de yer alan bir fare nedeni saptanamayan bir biçimde eksitus oldu. İlgili farenin primer immün yanıt serumu çalışmalara dahil edilmiş, grup 2 sekonder yanıt açısından yedi fare üzerinden hesaplamalara alınmıştır.

Primer aşılama sonrası 14. günde kanları alınan ve aynı gün sekonder aşılama tabi tutulan deney hayvanlarından 28. günde alınan kanlarla aşılama



**Şekil 1.** Protein içeriği bilinmeyen antikor çözeltilerinin protein içeriklerinin standart olarak BSA'nın kullanımı ile tayini.

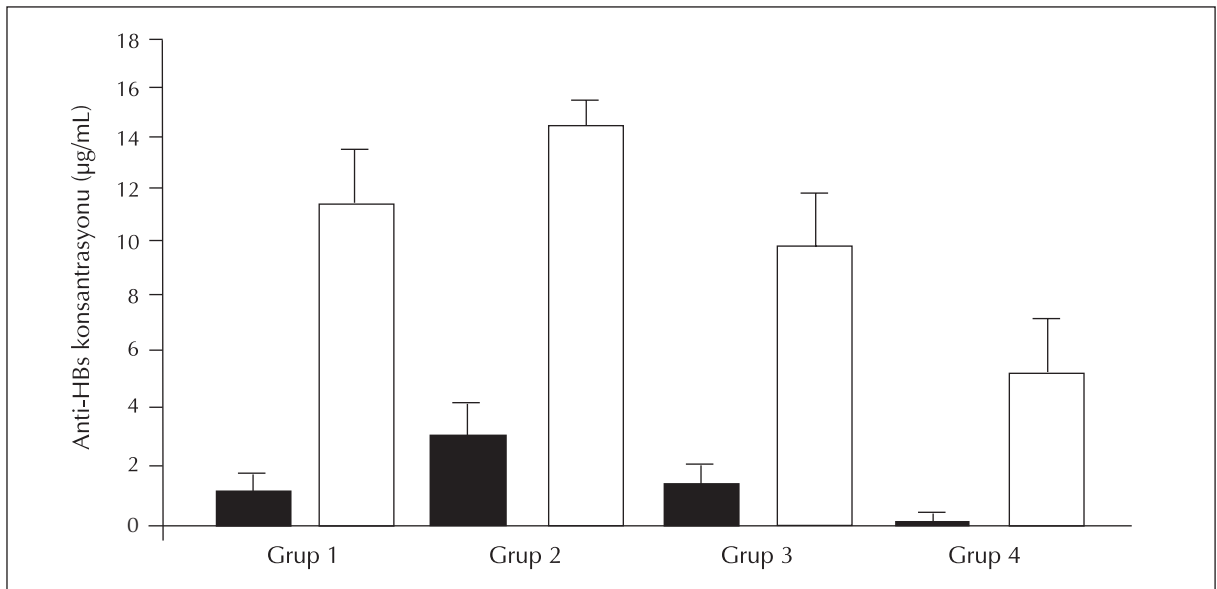
serisi tamamlanmış ve ayrıştırılan serumlar eşit deney koşulları gereği derin dondurucuya kaldırılmıştır. Anti-HBs yanıtını değerlendirmek amacıyla laboratuvarımızda oluşturulan ELISA sistemi, materyal ve metot bölümünde tanımlanan biçimde kullanılmıştır. Çalışma gününde derin dondurucudaki tüm serumlar çözünerek grupların antikor yanıtları eş zamanlı olarak değerlendirilmiştir. Gerek primer gerekse sekonder antikor yanıtları değerlendirildiğinde en yüksek antikor düzeylerinin grup 2'de olduğu saptanmıştır (Şekil 2). Primer immün yanıtta oluşan grup anti-HBs antikor ortalamaları grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4 için sırasıyla 1.06, 3.27, 1.28 ve 0.06 µg/mL, sekonder yanıtta saptanan düzeyler ise yine gruplar için sırası ile 11.48, 14.67, 9.31 ve 5.5 µg/mL olarak saptandı. Karşılaştırma istatistiksel olarak yapıldığında grup 2'de gözlenen antikor düzeylerinin diğer gruplara göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu saptandı ( $p < 0.05$ ).

Oluşturduğumuz ELISA sistemi ile primer immün yanıtın grup 4'te yalnızca bir faredede saptanabilir düzeyde olduğu gözlemlendi. Primer antikor yanıtı açısından karşılaştırılan grup 1 ve grup 3 istatistiksel olarak anlamlı bir fark sergilemedi ( $p > 0.05$ ). Primer ve sekonder antikor yanıt düzeyleri dört grupta da kendi içlerinde karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde bir artış ("boost") olduğu saptandı ( $p < 0.05$ ). Ancak, primer yanıt antikor düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenen grup 2 düzeyinin, sekonder yanıt-

larda yine en yüksek düzeyi oluşturduğu, ama bu farkın grup 1 ve grup 3'e göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ( $p > 0.05$ ).

### TARTIŞMA

Antijen-antikor özgül bağlanması ile oluşan immünkompleksler çeşitli hücrelerde bulunan antikorun Fc kısmını bağlayan reseptörler (FcR) veya immünkompleksin kompleman proteinlerinin de dahil olduğu durumda çeşitli kompleman reseptörleri (CR) tarafından bağlanarak muhtelif efektor fonksiyonların yerine getirilmesi sağlar. İmmünkompleksler B-lenfosit yüzeyinde reseptör düzeyinde girdikleri ilişkinin ardından çeşitli hücre içi sinyalizasyon yollarını uyarırlar. İlgili uyurum, B-lenfosit (antikor) yanıtları açısından artırıcı veya azaltıcı (baskılayıcı) etkide bulunabilir. Bu biçimde oluşan "dual etki" antikorun olduğu kadar bağlanan antijenin de niteliğine atfedilmektedir. İmmünkomplekslerin olası antikor yanıtlarını baskılama yolları ile ilgili olarak antijende immün dominant epitopların kapatıldığı (epitope masking) ve antikor yanıtının geliş(e)mediği öne sürülen bir görüştür. Bir diğer görüş, özgün bir yönü bulunan ve B-lenfosit üzerinde ekspres edilen FcR'üne dayandırılmaktadır. B-lenfositler üzerindeki tek FcR'ü olan Fc-gama-RIIB'ye inhibitör etkisinden dolayı özel bir önem atfedilmekte ve bu reseptöre bağlanan immünkomplekslerin B-lenfosit antikor yanıtlarını baskılayabileceği öne sürülmektedir. B-lenfosit dışında genelde fa-



**Şekil 2.** Primer (siyah sütunlar) ve sekonder (beyaz sütunlar) anti-HBs yanıt düzeylerinin (µg/mL) gruplarına göre dağılım. Hata çubukları ilgili aşılama ve grubun ortalama standart hatasını göstermektedir.

gositik hücrelerde eksprese edilen ve antikor FcR'lerin kısımları için farklı afinite sergileyen FcR'lerin inhibitör fonksiyonlarının yanı sıra inflamatuvar yanıtları ve dolayısıyla immün yanıtları artırabileceği de bilinmektedir (1,2,11-14).

IgG alt sınıflarına dayalı bir çalışmada, aynı antijene özgül IgG2a ve IgG2b izotipindeki mAb'ların immün yanıtları hem baskılayabileceği, hem de artırabileceği gösterilmiştir. Koyun eritrositlerine özgül IgM ve IgG ile yapılan başka bir çalışmada, IgM'nin uyarıcı etkisine karşın IgG'nin baskılayıcı etkisinin yalnızca primer antikor yanıtları ile sınırlı kalmadığı, benzer bir etkiyi de immün hafıza hücrelerinde sergiledikleri gösterilmiştir. Koyun eritrositleri gibi büyük partiküler antijenlere karşı özgüllük gösteren IgG1, IgG2a ve IgG3'ün oluşturduğu baskılayıcı etki verilen antikor miktarı ile orantılı olarak artabilirken, aynı özgüllüğe sahip başka bir IgG2a mAb'u etki gösteremeyebilmektedir. Bu çalışmalardan, sorunun çok boyutlu ve henüz bilinmeyen yönlerinin olduğu anlaşılmaktadır (1,2,15-17).

Bizim çalışmamızın temel unsurlarını partiküler nitelikteki HBsAg "ad" ve "ay" subtip antijenleri ve HBsAg "a" epitopuna özgül monoklonal IgG2a oluşturmuştur ve bu moleküler kompleksin "ad" ve "ay" antijenlerine karşı antikor yanıtlarını ne ölçüde modüle ettiği araştırılmıştır. Bu fare modeli immünkomplekslerin in vitro oluşturulması ve in vivo antikor yanıtları gözlemine dayanmaktadır. Bu model insanda uygulanan temas sonrası profilaksi modelinin temsili değil, kısmen benzeştirilmesidir. İnsanda olası HBV teması sonrası uygulanan HBIg ve aşı profilaksisinde in vitro immünkompleks oluşturulması söz konusu değildir. Ancak, genellikle saf, havuzlanmış Ig havuzu niteliği taşıyan HBIg'in verildiği dokuda retansiyona uğramayıp dağılması ve eş zamanlı, ama farklı bölgeden verilen ve genelde alüminyum hidroksit üzerine adsorbe edilmiş hepatit B yüzey antijeninden oluşan aşının da verildiği dokuda retansiyona uğrayıp, inflamatuvar dolayısıyla immün yanıtları artırması hedeflenmektedir. HBIg'in arı niteliği ve IgG'nin birçok dokuya çok kolay geçebildiği göz önüne alındığında, eş zamanlı verilen bu iki molekülün in vivo kompleks yapabileceği düşünülebilir.

Çalışmamızda grup 2'de oluşan primer antikor yanıtının yalnız antijen verilen grup 1'e göre üç katın üzerinde gerçekleştiği gözlenmiştir. Grup 2 için saptanan bu yükseklik sekonder antikor ya-

ntıları için de geçerliliğini korumuştur. Grup 1 "ad" ve/veya "ay" ile daha önce temas etmemiş farenin immünizasyonunu göstermektedir ve söz konusu olan mekanizma birçok aşılama olduğu gibi antijenik yapıların periferik dokularda retansiyona uğraması ve adjuvana bağlı gelişen inflamatuvar yanıtlara paralel gelişen antikor yanıtıdır. "ad" ve "ay" antijenleri ve ortak "a" epitopuna özgül IgG2a birleşmesine dayalı olarak oluşturulan grup 2 için olası mekanizma grup 1'de adjuvanla oluşan inflamatuvar yanıtın ek olarak fagositik hücrelerdeki FcγR'ler üzerinden daha da artırılmış olabileceği ile açıklanabilir (12). İmmünkomplekslerin inflamatuvar yanıtları artırabilmesinin bir mekanizması da, kompleman sistem komponentlerini aktive edebilmesinden ve kompleman reseptörleri üzerinden fagositik hücrelerde ko-stimülatuvar molekül ekspresyonunu artırabilmesinden kaynaklıdır. Grup 1'e göre grup 2'de daha yüksek oranda saptadığımız oluşan antikorların izotip çeşitliliğinin (verileri bu makalede sunulmamıştır, ilgili renkli resimler istek üzerine yazışma adresinden temin edilebilir) altında da aynı mekanizmanın yattığı düşünülmektedir. Adjuvan madde etkisi dışında inflamatuvar yanıtları artırabilecek başka bir komponent barındırmayan grup 1 ("ad" ve "ay" antijenleri) ve grup 3 ("ad" ve "ay" antijenleri ve özgül olmayan IgG)'te oluşan antikor yanıtlarının birbirine benzer ve grup 2 ("ad" ve "ay" antijenleri ve özgül mAb IgG-2a)'ye kıyasla daha düşük olmaları, antikor yanıtlarını artıran faktörün aşılama öncesi oluşturulmuş immünkomplekslerden kaynaklandığını destekler niteliktedir.

Antikor yanıt indüksiyonu için kompleman reseptörleri (CR)'nin mutlak gerekliliği yoktur. CR<sup>-/-</sup> farelerde bizim de çalışmamızda kullandığımız IgG-2a izotipi antikor ile özgül çözünür nitelikte antijenin verilmesi antikor yanıtını indükleyebilmektedir. CR<sup>-/-</sup> farelerde T-bağımlı antijenlere karşı da yanıt gelişebilmektedir. İlgili izotip verilerinden yola çıkarak, bizim deney modelimizde grup 2'de oluşan antikor yanıt yüksekliğinin mutlak anlamda kompleman aktivasyonu gerektirmediği, ancak FcγR'leri üzerinden gerçekleşen artışın temel önemde olduğu söylenebilir. Ig'lerin antikor yanıtlarını "dual" olarak düzenleyebilmeleri genellikle antijenin karakteri ile birlikte tartışılmaktadır. Büyük partiküler veya Freund's adjuvanı içinde verilen antijenlerle özgül antikorların verilmesi immün yanıtlar üzerinde baskılayıcı, buna karşın çözünür proteinlerle birlikte özgül antikorları-

nın verilmesinin artırıcı bir etki yaptığı bildirilmektedir. Partiküler antijenlere karşı antikor aracılı baskı(n)manın bir avantaj ve tedaviye dönüştürüldüğü klinik durum Rh (-) annenin Rh (+) bebek gebeliğinde aldığı profilaksidir. Bu anlamda, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin getirdiği bir katkı kullanılan antijenin mutlak anlamda çözünür bir karakter taşımasının gerekmediği, partiküler antijenlerle ve Freund's adjuvanı eşliğinde de benzer mekanizmaların devreye giriyor olabileceğini göstermesinden kaynaklıdır (12-14,18-21).

Ig'lerin bağlamadıkları antijenlere karşı antikor yanıtlarını baskılamadıkları verisini deney düzeneğimizdeki grup 3 ve grup 4'ün yalnızca antijen verilen grupla (grup 1) kıyaslanabilir bir antikor yanıtı oluşturması ( $p > 0.05$ ) ile dolaylı olarak teyit ettik (18). Grup 3'teki olası mekanizma yalnızca "ad" ve "ay" antijenlerinin verildiği grup 1 ile benzer olarak öngörülmüştür; çünkü, grup 3'te bileşenlerin kimyasal aktivitelerinin test edilmesi sırasında da gözlemlendiği üzere, bir immün kompleks oluşumu söz konusu değildir. Grup 3'te ilgili antijen ve adjuvan özgül olmayan bir IgG havuzu ile birlikte verilmiştir. Dolayısıyla grup 3'te immün kompleks oluşmayacaktır ve olası antikor yanıtları yalnız antijenlerin verildiği gruptaki ile benzeşmek durumunda olacaktır. Elde ettiğimiz sonuçlar bu teorik argümanı doğrular niteliktedir. Grup 4, kimyasal olarak oluşturulmuş bir antijen-antikor kompleksini temsil etmektedir. İlgili immün komplekslerin özgül olması gerektiği, aksi takdirde antikor yanıtlarında bir artışa yol açmadığı grup 2 ile grup 4'ün oluşturdukları antikor yanıtları kıyaslanarak öngörülebilmektedir. Ortaya çıkan antikor yanıtları göz önüne alındığında grup 4'te kimyasal olarak oluşturulan immün komplekslerin, oluşan primer ve sekonder anti-HBs antikor yanıtları üzerinde, grup 1 ve grup 3 ile kıyaslandığında anlamlı bir fark oluşturmadığı gözlemlenmiştir (ilgili grup karşılaştırmaları için  $p > 0.05$ ). Bu veri de, oluşan immün komplekslerin antikor yanıtlarını artırmalarının özgül bir birleşmeyle bir araya gelen antijen-antikor kompleksi ile mümkün olabileceğinin dolaylı bir göstergesidir (18).

Temas sonrası profilakside muhtemelen immüno- lojik hafıza indüksiyonu açısından asıl unsurun aşısı olduğu ve yalnızca aşısı ile geçişin etkin olarak önlenemediği belirtilse de, klinik olarak var olan riskin göze alınmaması nedeni ile mevcut öneri-

lerde standart temas sonrası profilaksi önerisi olarak hem antijen hem de HBIg önerilmektedir. HBIg'in perinatal geçişin önlenmesi için en geç 72 saat içinde verilmesi önerilmektedir (4, 22). Vertikal bulaş sıklığını HBeAg negatif, HBsAg pozitif annelerin çocuklarında inceleyen ve HBIg'in doğum sonrası 24. saatte, HBV aşısının üçüncü-beşinci günlerde verildiği bir çalışmada, uzun dönem izlemde yalnızca aşısı verilenlerde ek bir riskin oluşmadığı gözlemlenmiştir (23). İlgili çalışmada, yalnız aşılama yapılmasının veya aşısı (antijen) ile birlikte HBIg verilmesinin yedi aylık izlemde bulaş açısından bir fark oluşturmadığı saptanmıştır. Buna paralel olarak, antijen ve HBIg verilenlerde kısa dönemde (ikinci ay) koruyucu düzeyde antikor geliştirenlerin oranının yalnızca aşısı verilenlere göre daha yüksek olduğu, ancak bu farkın uzun dönemde (yedinci ay) ortadan kalktığı bildirilmektedir (23). Oluşturduğumuz kısmi modelde bu verilere yakın bir sonuç elde ettik. Primer antikor yanıtlarının yalnızca "ad" ve "ay" antijeni verdiğimiz grup 1'de, aşısı ve özgül mAb verdiğimiz grup 2'ye göre daha düşük olduğunu, ancak bu farkın sekonder antikor yanıtları göz önüne alındığında ortadan kalktığını saptadık.

Bizim çalışmamız, mevcut klinik uygulamalara paralel yalnızca aşısı (antijen) veya aşısı + özgül Ig verilmesinin antikor yanıt oluşum hızı veya sıklığı gibi immünmodülasyonda birtakım farklılıklar sergilediğini göstermektedir. Çalışmamızda mevcut uygulamaları destekler nitelikte, aşısı ile birlikte antikor uygulamasının uygun primer ve sekonder yanıt uyandırdığı gösterilmiştir. Antijen (aşısı) ve antikor (HBIg) uygulamasının yalnızca antijen verilen gruba göre primer antikor yanıtında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek primer yanıtı yol açtığı, ancak sekonder antikor yanıtlarındaki farkın anlamlı olmadığı gösterilmiştir. Muhtemelen şu an göğüslenemeyen klinik risk ancak bu farklılıkların moleküler düzeyde açıklanması ile daha kolay karşılanabilir olacaktır. Çalışmamızın öne çıkardığı araştırılmaya değer bir konu da, antijen eşliğinde verilen özgül antikorun miktarı artırıldığında nasıl bir immün yanıt oluşacağıdır.

#### KAYNAKLAR

1. Heyman B. Regulation of antibody responses via antibodies, complement, and Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 709-37.
2. Heyman B. Feedback regulation by IgG antibodies. *Immunol Lett* 2003; 88: 157-61.





3. Mimura Y, Sondermann P, Ghirlando R, et al. Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in Fc gamma RIIb binding. *J Biol Chem* 2001; 276: 45539-47.
4. Mast EE, Margolis HS, Fiore AE, et al. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) part I: Immunization of infants, children, and adolescents. *MMWR Recomm Rep* 2005; 54: 1-31.
5. Chilcott J, Lloyd Jones M, Wight J, et al. A review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of routine anti-D prophylaxis for pregnant women who are rhesus-negative. *Health Technol Assess* 2003; 7: iii-62.
6. Mittal SK. Hepatitis B vaccination: Myths and controversies. *Indian J Pediatr* 2003; 70: 499-502.
7. Freitas da Motta MS, Mussi-Pinhata MM, Jorge SM, Tachibana Yoshida CF, Sandoval de Souza CB. Immunogenicity of hepatitis B vaccine in preterm and full term infants vaccinated within the first week of life. *Vaccine* 2002; 20: 1557-62.
8. Lolekha S, Warachit B, Hirunyachote A, Bowonkiritakachorn P, West DJ, Poerschke G. Protective efficacy of hepatitis B vaccine without HBIG in infants of HBeAg-positive carrier mothers in Thailand. *Vaccine* 2002; 20: 3739-43.
9. Palmovic D, Crnjakovic-Palmovic J. Prevention of hepatitis B virus (HBV) infection in health-care workers after accidental exposure: A comparison of two prophylactic schedules. *Infection* 1993; 21: 42-5.
10. Iwarson S. Post-exposure prophylaxis for hepatitis B: active or passive? *Lancet* 1989; 2: 146-8.
11. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 275-90.
12. Heyman B. Complement and Fc-receptors in regulation of the antibody response. *Immunol Lett* 1996; 54: 195-9.
13. Wernersson S, Karlsson MC, Dahlström J, Mattsson R, Verbeek JS, Heyman B. IgG-mediated enhancement of antibody responses is low in Fc receptor gamma chain-deficient mice and increased in Fc gamma RII-deficient mice. *J Immunol* 1999; 163: 618-22.
14. Wiersma EJ, Coulie PG, Heyman B. Dual immunoregulatory effects of monoclonal IgG-antibodies: Suppression and enhancement of the antibody response. *Scand J Immunol* 1989; 29: 439-48.
15. Murgita RA, Vas SI. Specific antibody-mediated effect on the immune response. Suppression and augmentation of the primary immune response in mice by different classes of antibodies. *Immunology* 1972; 22: 319-31.
16. Heyman B, Wigzell H. Specific IgM enhances and IgG inhibits the induction of immunological memory in mice. *Scand J Immunol* 1985; 21: 255-66.
17. Heyman B, Wigzell H. Immunoregulation by monoclonal sheep erythrocyte-specific IgG antibodies: Suppression is correlated to level of antigen binding and not to isotype. *J Immunol* 1984; 132: 1136-43.
18. Heyman B. The immune complex: Possible ways of regulating the antibody response. *Immunol Today* 1990; 11: 310-3.
19. Diaz de Stahl T, Dahlstrom J, Carroll MC, Heyman B. A role for complement in feedback enhancement of antibody responses by IgG3. *J Exp Med* 2003; 197: 1183-90.
20. Applequist SE, Dahlström J, Jiang N, Molina H, Heyman B. Antibody production in mice deficient for complement receptors 1 and 2 can be induced by IgG/Ag and IgE/Ag, but not IgM/Ag complexes. *J Immunol* 2000; 165: 2398-403.
21. Heyman B, Pilstrom L, Shulman MJ. Complement activation is required for IgM-mediated enhancement of the antibody response. *J Exp Med* 1988; 167: 1999-2004.
22. Mast EE, Weinbaum CM, Fiore AE, et al. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part II: Immunization of adults. *MMWR Recomm Rep* 2006; 55: 1-33.
23. Yang YJ, Liu CC, Chen TJ, et al. Role of hepatitis B immunoglobulin in infants born to hepatitis B e antigen-negative carrier mothers in Taiwan. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 584-8.

#### YAZIŞMA ADRESİ

Dr. Resul KARAKUŞ

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

İmmünoloji Anabilim Dalı

ANKARA

e-mail: rkarakus@gazi.edu.tr