



**T.C.**

**EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**

**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI**

**ANABİLİM DALI**

**Prof. Dr. SAVAŞ KANSOY**

**HEPATİT B AŞI YANITSIZLIĞINDA İNTERFERON GAMA VE İNTERFERON**

**GAMA RESEPTÖR 1 GEN POLİMORFİZMLERİ**

**Uz. Dr. DİLEK YILMAZ ÇİFTDOĞAN**

**ÇOCUK ENFEKSİYON HASTALIKLARI**

**YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

**TEZ YÖNETİCİSİ**

**Prof. Dr. FADIL VARDAR**

**İZMİR, 2011**

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| İÇİNDEKİLER.....                                                                             | I   |
| ŞEKİL DİZİNİ.....                                                                            | III |
| TABLO DİZİNİ.....                                                                            | IV  |
| KISALTMA DİZİNİ.....                                                                         | V   |
| ÖNSÖZ.....                                                                                   | VI  |
| GİRİŞ VE AMAÇ.....                                                                           | 1   |
| GENEL BİLGİLER.....                                                                          | 3   |
| 1. Hepatit B virusu (HBV)                                                                    |     |
| 1.1. Genel bilgiler.....                                                                     | 3   |
| 1.2. HBV mutantları.....                                                                     | 6   |
| 1.3. Dünyada ve Türkiye’de HBV epidemiyolojisi.....                                          | 7   |
| 1.4. Korunma.....                                                                            | 9   |
| 2. Hepatit B Aşıları.....                                                                    | 9   |
| 2.1. Hepatit B aşısı sınıflaması.....                                                        | 9   |
| 2.2. Hepatit B aşısı takvimi.....                                                            | 11  |
| 2.3. Ulusal Hepatit B aşısı takvimi.....                                                     | 12  |
| 2.4. Uygulama, doz ve etkinlik.....                                                          | 12  |
| 2.5. Hepatit B aşılması sonrası tarama.....                                                  | 15  |
| 2.6. Hepatit B aşısına immün yanıt.....                                                      | 15  |
| 2.7. Hepatit B aşısına yanıtızlık.....                                                       | 17  |
| 3. İnterferon Gamma, İnterferon Gamma Genleri .....<br>ve İnterferon Gamma Reseptörü Genleri | 18  |
| GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                                         | 21  |
| 1. Olguların seçimi.....                                                                     | 21  |

|                                           |           |
|-------------------------------------------|-----------|
| 2. DNA izolasyonu ve Genotip Analizi..... | 22        |
| 3. İstatistiksel Analiz.....              | 25        |
| <b>BULGULAR.....</b>                      | <b>26</b> |
| <b>TARTIŞMA.....</b>                      | <b>29</b> |
| <b>SONUÇLAR .....</b>                     | <b>36</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                    | <b>37</b> |
| <b>TÜRKÇE ÖZET.....</b>                   | <b>44</b> |
| <b>İNGİLİZCE ÖZET.....</b>                | <b>45</b> |

## ŞEKİL DİZİNİ

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.</b> HBV'nun genomik yapısı                                          | 4  |
| <b>Şekil 2.</b> Kronik HBV enfeksiyonunun coğrafik dağılımı                     | 8  |
| <b>Şekil 3.</b> IFNG (+874 T/A) polimorfizmi için jel elektroforez örnekleri    | 24 |
| <b>Şekil 4.</b> IFNGR1 (CA)n polimorfizmi için genetik analizör sonuç örnekleri | 24 |

## TABLO DİZİNİ

|                 |                                                                                                               |    |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> | Türkiye’de bulunan HBV aşıları                                                                                | 13 |
| <b>Tablo 2.</b> | IFNG geninin allelik varyantları ve fenotipik özellikleri.                                                    | 19 |
| <b>Tablo 3.</b> | Hepatit B aşısına yanıtızsız ve yanıtılı grubun IFNG (+874 T/A) polimorfizmi için genotip ve allel sıklıkları | 27 |
| <b>Tablo 4.</b> | Hepatit B aşısına yanıtızsız ve yanıtılı olgularda IFNGR1 geni (CA)n allellerinin sıklık dağılımı             | 28 |
| <b>Tablo 5.</b> | Hepatit B aşısına yanıtızsız ve yanıtılı olgularda IFNGR1 genindeki homozigot (CA)n allel sıklık dağılımı.    | 28 |

## KISALTMALAR

|                 |                                                                                       |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Anti-HBs</b> | : Hepatit B virusu yüzey antijenine gelişen antikor<br>(Hepatitis B surface antibody) |
| <b>DNA</b>      | : Deoksiribonükleik asit                                                              |
| <b>HBsAg</b>    | : Hepatit B virusu yüzey antijeni<br>(Hepatitis B surface antigen)                    |
| <b>HBV</b>      | : Hepatit B virusu                                                                    |
| <b>HLA</b>      | : İnsan lökosit antijeni (Human leukocyte antigen)                                    |
| <b>IFN</b>      | : İnterferon                                                                          |
| <b>IFNG</b>     | : İnterferon gamma                                                                    |
| <b>IFNGR</b>    | : İnterferon gamma reseptör                                                           |
| <b>IL</b>       | : İnterlökin                                                                          |
| <b>MHC</b>      | : Major histokompatibilite kompleksi<br>(Major histocompatibility complex)            |
| <b>NK</b>       | : Doğal öldürücü (Natural killer)                                                     |
| <b>NKT</b>      | : Doğal öldürücü T hücreler (Natural killer T cells)                                  |
| <b>PBMC</b>     | : Periferik kan mononükleer hücre<br>(Peripheral blood mononuclear cell)              |
| <b>Th</b>       | : Yardımcı T hücresi (T helper cells)                                                 |
| <b>TGF</b>      | : Dönüştürücü büyüme faktörü (Transforming growth factor)                             |
| <b>TLR</b>      | : Toll benzeri reseptör (Toll-like receptors)                                         |
| <b>TNF</b>      | : Tümör nekrozis faktör (Tumor necrosis factor)                                       |

## ÖNSÖZ

Yan dal eğitimim süresince yetişmemi sağlayan, yan dal eğitimi yanında genel pediatri konusunda da bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tezimin yürütülmesinde yardım ve desteğini gördüğüm, üzerimde büyük emeği olan öğretmenim Sayın Prof. Dr. Fadıl Vardar'a,

Bilimsel ve klinik çalışmalarımız sırasında deneyimleri ile her zaman yol gösteren Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Savaş Kansoy'a,

Tezimin yürütülmesinde büyük desteğini gördüğüm Sayın Prof. Dr. Ferda Özkınay, Sayın Doç. Dr. Hüseyin Onay ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına,

Yandal eğitimim süresince birlikte çalıştığım değerli arkadaşlarım Uz. Dr. Nuri Bayram, Uz. Dr. Başak Yıldız, Uz. Dr. Semra Şen ve Uz. Dr. Zümrüt Bal'a,

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği eğitim kadrosunda görevli olan tüm öğretim üyelerine, uzman ve asistan arkadaşlarıma ve diğer klinik çalışanlarına,

Hala tek ışığım babam Halil Yılmaz'a, en büyük desteğim anneme, Cüneyt'e ve varlıkları en büyük güç kaynağım olan kızım Ela ve oğlum Yağız'a

Teşekkür ederim.

Uz. Dr. Dilek Yılmaz Çiftdoğan

## **GİRİŞ ve AMAÇ**

Global bir halk sağlığı sorunu olan hepatit B virus (HBV) enfeksiyonu akut ve kronik karaciğer hastalığının en sık nedenidir. Genellikle erken çocukluk döneminde geçirilen HBV enfeksiyonları genellikle kronik HBV taşıyıcılığı ile sonuçlansa da, karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinoma gibi ciddi sekellere de neden olabilir. Günümüzde dünya genelinde yaygın olarak kullanılan hepatit B aşıları rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen ve ikinci kuşak hepatit B aşıları olarak adlandırılan aşılardır.

HBV aşılamaında karşılaşılan en önemli sorun aşı yanıtısızlığıdır. Hepatit B aşısına yanıtısızlığın önemli nedenleri arasında immün yetmezlik ya da kronik böbrek yetmezliği gibi altta yatan hastalıklar, aşılanan kişinin yaşıının 40 ve üzerinde olması, erkek cinsiyet, obezite, sigara içme gibi kişisel faktörler yer almaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, sağlıklı bireylerde hepatit B aşı yanıtısızlığında genetik faktörlerin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Hepatit B aşısına yanıt ve yanıtısızlık ile ilgili olarak başta HLA (insan lökosit antijen) genleri ile yapılmış çalışmalar olmak üzere, birçok immünogenetik çalışma yapılmış ancak Hepatit B aşısına yanıtısızlığın moleküler ve hücresel düzeydeki temeli tam olarak aydınlatılamamıştır.

Yapılmış çalışmalarda hepatit B aşı yanıtısızlığı ile bazı HLA antijenleri ve haplotiplerinin ekspresyonu, T hücrelerine antijen sunumundaki kusurlar, T hücre gelişim kusurları, B hücre repertuvarındaki kusurlar, antijen spesifik sitotoksik T hücreleri tarafından HBsAg spesifik B hücrelerinin destrüksiyonu, immünolojik tolerans, hepatit B aşısına yetersiz Th1 veya Th2 sitokin üretimi, sitokin ve sitokin reseptörlerinin gen polimorfizmleri arasındaki olası ilişkiler araştırılmıştır.

Bu çalışmada, hepatit B aşısına gerçek yanıtısız çocuklarda, interferon gamma (IFNG) geni, 1. intronundaki (+874 T/A) polimorfizmi ve IFNG reseptör 1 genindeki

intronik bölge (CA)n tekrar sayısı polimorfizminin aşı yanıtıslığı ile ilişkili olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu polimorfizmlerin aşı yanıtıslığı ile olan ilişkilerinin tanımlanması hepatit B aşı yanıtıslığı immünopatogenezinin aydınlatılmasında büyük rol oynayacaktır.

## **GENEL BİLGİLER**

### **1. Hepatit B Virus**

#### **1.1. Genel Özellikleri**

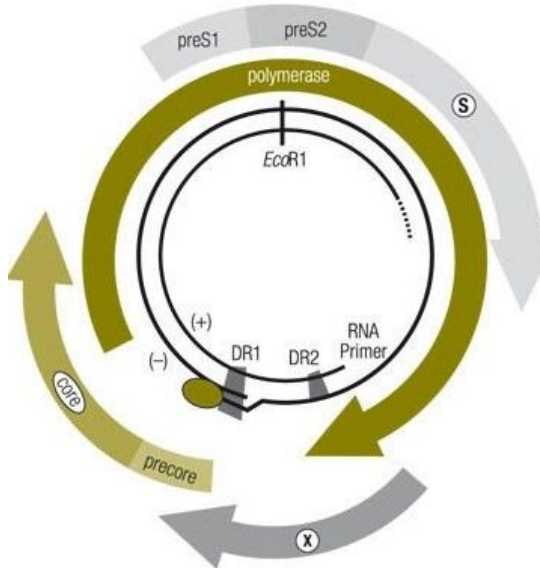
Hepatit B virusu, hepadnaviridae ailesinin orthohepadnavirus cinsinde yer alan hepatotropik zarflı ve kısmen çift sarmallı bir DNA virusudur. Sadece 3200 nukleotidden oluşan genomik yapısı nedeniyle bilinen tüm hayvan DNA virusleri içinde en küçük olanıdır. Bu genom ikozahedral bir kapsid içerisinde bulunur ve bu kapsid dışında 3 farklı yüzey antijenini taşıyan lipid yapılı zarf yer alır. HBV'nun kısmen saflaştırılmış preparasyonları elektron mikroskopunda incelendiğinde büyüklük yapı ve miktar gibi değişik özellikler bakımından birbirine benzemeyen üç tip partiküle rastlanır (1, 5).

- 1- Yaklaşık 42 nm. (42-47 nm. ) çapında, enfektif özellikte, tam bir viryon yapısında, küresel şekilli "Dane partikülleri",
- 2- Yaklaşık 22 nm. (16-25 nm. ) çapında içinde nükleik asit bulunmayan nonenfektif, küresel partiküller,
- 3- Özellikle replikasyonun söz konusu olduğu kişilerin serumunda bulunan, 22 nm. çapında 50-500 nm. uzunluğunda nükleik asit içermeyen, nonenfektif, tübüler partiküller.

HBV'u zarflı bir virus olmasına rağmen eter, düşük pH, ısı, dondurma ve çözmeye oldukça dirençlidir, bu özellikleri ile kişiden kişiye geçişteki etkinlik ve dezenfektan direnci sağlanır. Hepadnaviridae ailesinin üyeleri içinde insanlarda enfeksiyon oluşturan tek virustur (1, 5).

HBV, bir DNA virüsü olmasına karşın “revers transkriptaz” enzimi kodlar ve bu enzim sayesinde RNA aracısı üzerinden replike olur. Enfekte hücre çekirdeğinde 4 minikromozom şeklinde bulunur. Kovalent bağlı çembersel DNA adı verilen, replikasyon ve transkripsiyon sırasında aracı molekül özelliği taşıyan bir DNA zinciri üzerinden meydana gelen, karmaşık bir replikasyon stratejisine sahiptir (1, 5).

HBV’nda genetik bilginin tamamı uzun sarmal üzerinde kodlanmış olup sarmal S, C, X ve P kısaltmaları ile gösterilen dört değişik protein kodlayan nükleik asit dizisi (open reading frame:ORF)’ne sahiptir. ORF’lerin transkripsiyonu promoter (prom=başlatıcı) ve enhancer (enh = güçlendirici) denilen düzenleyici dizinler tarafından kontrol edilmektedir. HBV genomunda fonksiyonel olarak tanımlanmış en az 4 promoter (pre-S1 prom, S prom, X prom ve pre-C prom ) ve 2 enhancer (Enh 1 ve Enh 2) bölgesi bulunmaktadır. HBV-DNA’daki genler, arka arkaya dizilmiş ve birbirinden tamamen ayrı bölgelerde bulunmazlar, aksine bazı bölgelerde içiçe girmiş durumdadırlar. Bu özellik nedeni ile HBV, bilinen en küçük genomik yapıya sahip olmakla birlikte, kendini kodlama kapasitesi en fazla olan virüsdür (1-3, 5). HBV’nun genomik yapısı Şekil 1’de gösterilmiştir.



**Şekil 1.** HBV’nun genomik yapısı (6).

HBV'nun uzun sarmaldaki S geni yüzey proteinlerini (HbsAg), C geni kor proteini (HBcAg) ve enfektivite proteinini (HBeAg), X geni X proteinini ve P geni de DNA polimerazı kodlamaktadır. Ancak başlangıç kodonları farklı olduğu için S geni üzerinde pre-S1, pre-S2 ve S olmak üzer üç, C geni üzerinde ise pre-C ve C olmak üzere iki bölge bulunmakta; dolayısıyla farklı başlangıç kodonlarından sentezlenen proteinler de farklı olmaktadır. Bu nedenle 4 adet ORF'e sahip olmasına rağmen HBV tarafından yedi değişik polipeptid üretilmektedir (1-3, 5).

**Zarf (yüzey) proteinleri ve HBsAg:** HBV zarf proteinleri, her biri birer tane protein ve glikoprotein yapısında yapı taşı içeren küçük, orta ve büyük yüzey antijenleri olarak adlandırılan proteinlerdir. Bunlardan küçük olanı SHBs Ag olarak gösterilir, p24 ve gp27 alt birimlerinden oluşur. Orta büyüklükte olanı MHBs Ag olarak gösterilir, p33 ve gp36 alt birimleri vardır. En büyük olanı LHBs Ag olarak gösterilir, p39 ve gp42 alt birimlerinden oluşmuştur. Bu yüzey antijenleri enfekte olan hücrelerden enfektif virionlarla birlikte ancak onlardan yaklaşık olarak 100 kat daha fazla salınan non-enfektif filamentöz ve sferik yüzey antijeni partiküllerinin de yapısını oluştururlar. enfekte kişi plazmalarında mililitrede birkaç yüz mikrogram düzeyinde bulunan bu filamentöz ve sferik partiküller, enfekte kişinin serumunda bulunan kendilerine karşı gelişmiş antikorlar ile birleşerek immün kompleks reaksiyonları oluşturabilmektedirler (1-7).

**B. Kor (nükleokapsid) proteinleri; HBcAg ve HBeAg:** C geninde okuma işlevi iki farklı kodondan başlayabildiği için C ve pre-C olmak üzere iki farklı bölgeye ayrılır ve HBcAg ile HBeAg proteinlerini sentezleyebilir. HBcAg sadece karaciğerde bulunmasına karşın dolaşımda bulunan HBeAg albumin, immünglobulin ve  $\alpha$ -antitripsinle bağlanır, yapısındaki HBcAg ile ilgili yapılar maskelenir ve anti-HBe ile reaksiyon verir. HBcAg dolaşımda sadece Dane partikülleri içinde bulunur. HBV kor proteini üzerinde fazlaca immünderminant epitop vardır ve bu sebeple kronik hepatit B'de immün cevap için ana hedeftir (2, 3, 6, 7).

**C. P proteini:** HBV genomunun yaklaşık %75'ini oluşturan P geni tarafından kodlanır. P proteini revers transkriptaz, endonükleaz ile DNA ve RNA bağımlı polimeraz aktivitesine sahiptir (2, 3, 6, 7).

**X Proteini:** X geni, HBV genomunda yer alan en küçük gen bölgesidir. Viral siklus ve HBV patobiyolojisinde bu proteinin fonksiyonu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (2, 3, 6, 7).

## 1.2. HBV Mutantları

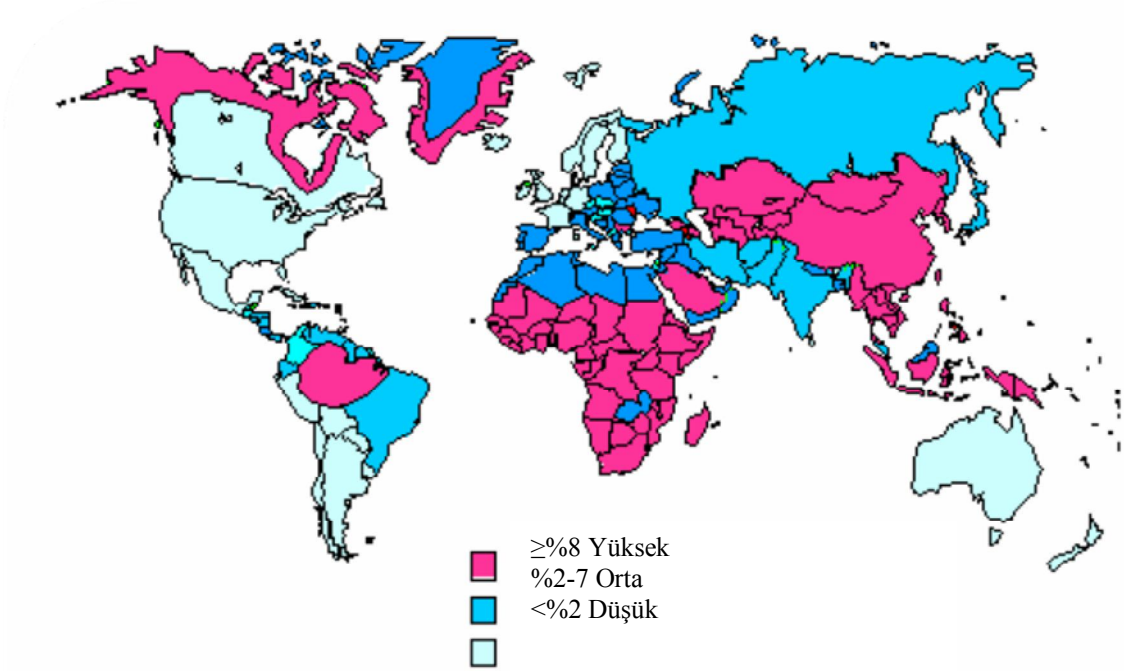
HBV'u oldukça hızlı replikasyon yeteneğine sahiptir. Revers transkriptaz enziminin düzeltici fonksiyonu olmaması, yüksek virion üretimi ile bir araya geldiğinde replikasyonda yüksek düzeyde hata oluşmasına neden olmaktadır. Mutasyon olduğu durumlarda enfekte kişilerde genetik olarak birbirine yakın ancak birbirinden farklı olan ve farklı özellikler taşıyan varyantların bir kombinasyonu oluşmaktadır. Konaktaki virustan daha avantajlı bir özellik oluşur ise mutant virus baskın hale gelmektedir (4, 5, 6).

Değişik HBV suşlarında yapılan çalışmaların sonucunda, mutasyonların genom üzerinde herhangi bir yerde (S, pre C/C, X, P, promoter ve enhancer) olabileceğini gösterilmiştir. Pre C/C genlerindeki mutasyonlar sonucunda bu bölgelerde kodlanan antijen farklılaşmakta ve bu durum, kronik HBV enfeksiyonlarının patogenezi etkilemektedir. Kılıf proteinlerine ait mutasyonlar ise ya HBsAg'nin rutin tarama testleri ile saptanmamasına veya varolan anti HBs'lere rağmen bireylerin yeniden HBV ile enfekte olması gibi ciddi sonuçlara yol açmaktadır. Günümüzde uygulanan birçok Hepatit B aşısı HBs antijenini taşımakta, proteinin 99-170. pozisyonlarında yerleşen majör hidrofobik bölgeye karşı oluşan immün yanıt bağıışıklığı sağlamaktadır. Yüzey antijeninin 144. ve 145. pozisyonlarında meydana gelen mutasyonlar aşı başarısızlığı ile ilişkilendirilmektedir (4, 5).

### 1.3.Dünyada ve Türkiyede HBV Epidemiyolojisi

Enfeksiyonun dağılımı çeşitli coğrafi bölgelerde çok değişkenlik gösterir. HBV göstergeleri ve taşıyıcıların prevalansı dikkate alınarak dünya; düşük, orta ve yüksek endemisite bölgelerine ayrılmıştır (Şekil 2) (3, 5, 8, 9, 11).

- 1. Düşük endemisite bölgeleri:** Kuzey Amerika, Avustralya, Batı ve Kuzey Avrupa ülkeleri gibi gelişmiş ülkelerdir. Prevalans %1'in altındadır. Enfeksiyon çoğunlukla adolesan ve yetişkinlerde görülür, olguların 2/3'ü 15-29 yaş grubundadır. Cinsel temas en önemli bulaşma nedenidir. Genel popülasyonda Hepatit B insidansı düşük iken homoseksüeller, çok partnerli heteroseksüeller ve IV uyuşturucu bağımlıları gibi risk gruplarında ve bazı etnik gruplarda enfeksiyon endemiktir (3, 5, 8, 9).
- 2. Orta endemisite bölgeleri:** Türkiye, Ortadoğu ülkeleri, Rusya, Japonya, Doğu Avrupa ülkeleri, Akdeniz ve Karadenize kıyısı olan ülkelerdir. HBsAg taşıyıcılık oranı %2- 7 arasında olan yerlerdir. Erişkinlerin %20- 60'ına anti- HBs pozitifliği bulunmaktadır. Enfeksiyon çoğunlukla çocukluk ,ergenlik veya genç erişkinlik dönemlerinde alınmaktadır. Perkutan, cinsel, horizontal ve daha az oranda perinatal bulaşın görüldüğü yerlerdir (3, 5, 8, 9).
- 3. Yüksek endemisite bölgeleri:** Tayland, Hong Kong, bazı Afrika ülkeleri, Alaska ve Güneydoğu Asyada bazı ülkeler olarak sayılabilir. HBsAg taşıyıcılık oranı % 7' nin üzerinde olan ülkelerdir. Bu bölgelerde yaşayan insanların yarısından fazlası, yaşamlarının ikinci dekadında anti-HBs pozitifliği edinirler. Erişkinler arasında cinsel temas en önemli bulaş iken, taşıyıcılığın en önemli sebebi ise perinatal bulaştır (3, 5, 8, 9).



**Şekil 2.** Kronik HBV Enfeksiyonunun Coğrafik Dağılımı (10).

Ülkemiz genel taramalarda ortaya konan % 3.9-12.5 arasındaki HBsAg seroprevalansı değerleri ile orta derecede endemik bir ülke konumundadır (12, 13). Ülkemizde çocukluk çağında HBV sıklığını araştıran çalışmalar gözden geçirildiğinde HBV enfeksiyonu sıklığı zaman içerisinde bölgesel farklılıklar dikkati çekmektedir. İstanbul'da 1990 yılında 320 viral hepatitli çocuğun içinde olguların %24'ünden HBV sorumlu bulunmuştur (14). İzmir'de 21 559 kişiden oluşan geniş bir çalışma grubunda 0-15 yaş arası çocukların %1.2'sinin HBsAg pozitif ve bütünde %5.5'inin HBV ile temaslı olduğu ortaya konmuştur, aynı çalışmada HBV enfeksiyonu oranının %52.61 ile 56-60 yaş arasında zirve yaptığı dikkat çekmektedir (15). Eskişehir 7-18 yaş arası %0.48'lik HBsAg ve %3.73'lük anti HBc pozitifliği ile ülkemizde çocukluk çağında HBV enfeksiyonu sıklığının en düşük olduğu bölge gibi gözükmemektedir (16). Çocukluk çağını kapsayan diğer çalışmalarda doğuya doğru ilerlendikçe HBsAg ve anti HBc pozitiflik oranlarının arttığı ve ilk 6-15 yaş içerisinde sırasıyla %3.09-9.8 ve %19.3-20.4'e ulaştığı görülür (17,18). Çukurova ve yöresinde 1996-1997 yılları arasında yapılan bir çalışmada, çocukluk çağında akut hepatitlerin %35.8'inin HBV'e bağlı

olduğunu gösterilmiş ve 0-15 yaş arası sağlıklı çocuklarda HBsAg pozitifliğinin %8'e ulaştığı belirtilmiştir (19).

#### **1.4. Korunma**

HBV bulaşmasını önlemenin en etkili yolu, hastalığa duyarlı durumdaki kişilerin maruz kalmadan önce hepatit B aşısı ile bağışıklanmasıdır. Buna uygun olarak da rutin çocukluk çağı bağışıklama takviminin bir parçası olarak bütün bebeklere hepatit B aşısı yapılması, daha önce aşılanmamış olan bütün çocuklara da ilk fırsatta hepatit B aşısı uygulanması önerilmektedir (5, 9).

Temas sonrası HBV immünoprofilaksi için iki tip ürün bulunmaktadır. Hepatit B İmmun Globulin (HBIG) kısa dönem koruma sağlar (3-6 ay ) ve sadece temas sonrası özel durumlarda kullanımı uygundur. Hepatit B aşısı temas öncesi ve temas sonrası korumada kullanılır ve uzun dönem koruma sağlar. Temas sonrası immünoprofilaksiste hem hepatit B aşısı ve HBIG, ve hem de tek başına hepatit B aşısı, HBV ile temas sonrası enfeksiyonu etkili olarak önlemektedir (5, 9).

## **2. Hepatit B Aşısı**

### **2.1. Hepatit B Aşı Sınıflaması**

İlk hepatit B aşıları 1970'li yılların başında Krugman ve arkadaşları tarafından yapılan plazma kaynaklı aşılardı. Bu aşılar HbsAg taşıyıcılarının plazmalarından hazırlanmıştır. Hepatit B aşısı 150'den fazla dünya ülkesinin ulusal aşı takvimi içerisinde yer almaktadır. Günümüzde dünya genelinde yaygın olarak kullanılan hepatit B aşıları rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen ve ikinci kuşak hepatit B aşıları olarak adlandırılan aşılardır.

Kullanılan bütün hepatit B aşıları, hepatit B yüzey antijeni içerirler. Plazma, mantar veya memeli hücrelerden elde edilen üç farklı sınıf hepatit B aşısı bulunmaktadır (20):

1. Birinci kuşak hepatit aşıları: Plazma kökenli bu aşılar 1982 yılından bu yana klinik kullanımdadır. HBsAg taşıyıcılarının plazmalarında bulunan 22 nm çapındaki subviral partiküllerin saflaştırılıp yoğunlaştırılması ile elde edilen bu aşılar diğer sınıf aşılarla göre daha düşük üretim maliyetine sahip olan bu aşıların etkinliği ve güvenirliliği yüksektir (20, 21).
2. İkinci kuşak hepatit aşıları: Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen ve HBV'nin major yüzey antijenini içeren bu aşılar, ilk kez 1980'lerin ortalarında kullanılmaya başlanılmıştır. Bu aşılar mantar hücresinde (*Saccharomyces cerevisiae*) HBV S geninin klonlanması yoluyla elde edilir. Elde edilen HBsAg saflaştırılarak, ortalama 20 nm çapında küresel parçacıklara dönüştürülür. Bu teknoloji ile üretilen aşılar HBV genomunun pre-S bölge antijenlerini içermezler ve ml'de 10-40 µg HBsAg proteini içerirler. Farklı tipte aşılar arasında rekombinant HBsAg protein konsantrasyonu değişiklik gösterse de, bağışıklık sistemi normal olan bebek, çocuk, adolesan veya genç erişkinlerde önerilen dozlarda verildiklerinde serokonversiyon oranları eşdeğerdir (20, 21).
3. Üçüncü kuşak hepatit aşıları: Memeli hücrelerinden elde edilen rekombinant HBV aşılarından birincisi S antijeninin yanı sıra pre-S2 bölge antijenlerini içerirken, diğeri hem pre-S1 ve hem de pre-S2 bölge antijenlerini içerir. Pre-S bölge antijenlerini içeren aşılar daha immünojeniktirler (20, 21).

Rekombinant aşılar da alüminyum hidroksite absorbe olmuş şekilde, mililitrede 10-40 mikrogram HBsAg proteini vardır ve bazılarında koruyucu olarak tiomersol bulunmaktadır (3). HBV aşılarının hepsi hepatit B zarf proteini içermektedir. HBsAg üç zarf proteininden oluşmuştur (20-23).

- 1.HBsAg proteinleri 226 aminoasitten meydana gelmiş bir majör polipeptit p24 ve gp27 şeklinde small HBs (SHBs) içerir.
- 2.Orta çaplı protein (middle-sized) (MHBs) C ucunda p24 bölgesinin 226 aminoasidi ve N ucunda ek 55 aminoasit kalıntısına sahiptir.
- 3.Geniş HBs proteini (LHBs) S ve pre-S2 domainlerine ek olarak 119 aminoasitli pre-S1 domaini içerir.

Hepatit B virüsü yüzey zarfıta bu üç protein yer alır. Hepatit B virüsü zarf proteinin serolojik olarak belirlenmiş adw, adr, ayw ve ayr olmak üzere dört major subtipi ve subtiplerin kodladığı en az 7 genotip vardır. Bir determinanta karşı oluşan antikorlar tüm subtiplere karşı koruyucudur. Ancak aktif veya pasif immünizasyonu takiben, zarf proteinlerinde bazı mutantların varlığı tanımlanmıştır (24). Anti-HBs antikorların oluşması HBV enfeksiyonuna karşı uzun süreli koruma için esastır. Akut HBV enfeksiyonunda vireminin kaybolmasını takiben serumda anti-HBs gelişir. Bu durum SHBs'e karşı humoral bağışık yanıtı gösterir. Pre S1 ve S2 antijenleri ve antikorları akut enfeksiyondan sonra görülür ve kaybolur. Pre-S antijenleri HBs üretimi için gereklidir. Bu nedenle pre-S antijenleri içeren 3. kuşak HBV aşıları geliştirilmiştir (25).

## **2.2. Hepatit B Aşı Takvimi**

Hepatit B aşısı, miadında ve >2000 gram olan tüm yenidoğan bebeklere, doğumdan hemen sonra ya da bebek hastaneden çıkmadan önce yapılmalıdır. HBsAg negatif anne bebeklerinde hepatit B aşı takvimi 3 veya 4 doz olarak, 6 ile 18 ay arasında tamamlanmalıdır. İlk doz aşı tüm yenidoğan bebeklere, doğumdan hemen sonra ya da bebek hastaneden çıkmadan önce yapılmalıdır İkinci doz aşı birinciden en az bir ay sonra yapılmalıdır. Üçüncü doz aşı bebek en az 6 aylıkken yapılmalıdır.Bebek ve çocuklarda primer immünizasyon genellikle 0, 1-2, 6-18 ayda yapılan 3 doz aşı ile uygulanır. Ancak, bazı aşılarda 4 dozluk (0, 1, 2 ve 12 ay) aşı takvimine göre uygulaması da onaylanmıştır. Büyük çocuk ve adölesanların aşılamaında da genellikle 3 doz aşı (0, 1, 6'ıncı aylar ya da 0, 2 ve 4'üncü aylar) önerilmektedir (26).

Bağıışıklık durumu normal olan çocuklar ve erişkinler için rapel dozu uygulaması önerilmemektedir. Ancak, hemodiyaliz hastaları ve immun yetmezlikli hastalarda yıllık anti-HBs düzeyi 10 mIU/L'nin altında düştüğü zaman rapel doz önerilir (9).

### **2.3. Ulusal Hepatit B Aşı Takvimi**

Ülkemizde ulusal hepatit B aşılması ilk kez Ağustos 1998'de, sıfır yaş grubunda genişletilmiş bağışıklama programına dahil edilmiştir. T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından ithal edilen maya türevi bir aşı olan, Güney Kore'de üretilen aşı (Euvax-B, LG Chemical Ltd.) 0-1-6. ay şemasıyla 10 µg dozunda kullanılmaya başlanmıştır (27). Uygulama ile ilgili olarak 1998 yılında yayımlanan ilk genelgede aşının uygulanması için üç farklı seçenek sunulmuş ve ülkemizde gebelerde HBsAg taraması yapılmadığından, bebeklere ne kadar erken ulaşırsa aşının o kadar etkin olacağı vurgulanmıştır. Yine bu genelgede risk grupları belirtilmiş, bu kişilerin Bütçe Uygulama Talimatı gereğince reçete yazılarak aşılanacağı, aşı bedellerinin kurumlarca karşılanacağı belirtilmiştir.

“Bağıışıklama Danışma Kurulu” önerileri doğrultusunda Aralık 2007'de yayınlanan ‘Genişletilmiş Bağıışıklama Programı Daimi Genelgesi’ ile resmen yürürlüğe giren ve halen uygulanmakta olan 2008 Sağlık Bakanlığı Aşı Takvimi'ne göre hepatit B aşısı; 0, 1. ve 6. aylarda uygulanmakta olup, doğumda aşılanamayan bebeklere ilk karşılaşmada birinci doz, birinci dozdan en az 1 ay sonra 2. doz ve 2. dozdan 5 ay sonra 3. doz hepatit B aşısı uygulanmaktadır (28).

### **2.4. Uygulama, Doz ve Etkinlik**

**Uygulama:** Aşı intramüsküler olarak erişkin ve çocuklarda deltoid kasa, yenidoğan ve bebeklerde uyluğun anterolateraline uygulanır. Kalçadan veya intradermal uygulamaya bağışık yanıtı azaltmakta ve hiçbir yaşta önerilmemektedir (26).

**Doz:** Ülkemizde bulunan HBV aşılarının preparat, içerdikleri zarf antijenleri ve dozajları Tablo 1'de gösterilmiştir. Aşılar primer aşılama şeması 0, 1, 6. ay ( ya da 0,

1, 6-12. ay) takvimine göre uygulanan toplam 3 dozda uygulanır. HBV aşısı çocuklarda çocuk dozu olarak (0.5ml ve üretici firmaya göre 5 ya da 10 µg/0,5 mL) uygulanır (Tablo 1)

**Tablo 1.** Türkiye’de bulunan HBV aşıları.

| Ticari ismi  | Zarf antijeni    | Doz                                                                                                      |
|--------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Engerix-B    | SHBs HBsAg       | 10µg/0,5 mL pediatrik flakon ve enjektör <sup>a</sup><br>20µg/1 mL adult flakon ve enjektör <sup>b</sup> |
| Hepavax-Gene | SHBs HBsAg       | 10µg/0,5 mL flakon <sup>c</sup><br>20µg/1 mL flakon <sup>d</sup>                                         |
| Euvax B      | SHBs HBsAg       | 10µg/0,5 mL flakon <sup>c</sup><br>20µg/1 mL flakon <sup>d</sup>                                         |
| H-B-Vax PRO  | SHBs HBsAg       | 5µg/0,5 mL flakon <sup>e</sup><br>10µg/1 mL flakon <sup>f</sup><br>40µg/1 mL flakon <sup>g</sup>         |
| GenHevac-B   | SHBs, MHBs+pre-S | 20µg/ 0,5 mL enjektör <sup>h</sup>                                                                       |

<sup>a</sup> Yenidoğan, bebekler ve 19 yaşına kadar olanlar için önerilmektedir.

<sup>b</sup> 20 yaş ve üzerindeki erişkinler için önerilmektedir.

<sup>c</sup> Yenidoğan, bebekler ve 10 yaşına kadar olan çocuklar için önerilmektedir.

<sup>d</sup> 10 yaş üzeri çocuklar ve erişkinler için önerilmektedir.

<sup>e</sup> Yenidoğan, bebekler ve 15 yaşına kadar olan çocuklar için önerilmektedir.

<sup>f</sup> 15 yaş üzeri çocuklar ve erişkinler için önerilmektedir.

<sup>g</sup> Erişkin diyaliz hastaları için önerilmektedir.

<sup>h</sup> Aşılanacak kişinin yaşından bağımsız olarak 20µg yapılması önerilmektedir.

**Etkinlik:** Hepatit B aşıları HBV enfeksiyonunu önleme ve enfeksiyona hassas çocuk ve erişkinlerde klinik HBV enfeksiyonunun oluşmasını önlemede %90-95 etkilidirler. Zamana bağlı olarak koruyucu anti-HBs antikör titrelerinde azalma ya da saptanamayan anti-HBs düzeylerine rağmen uzun koruma süresi, etkenle karşılaşma durumunda anamnestik yanıtı ortaya çıkarma kapasitesine sahip hafıza hücrelerine bağlıdır. Erişkin ve çocuklardaki uzun dönem çalışmalar bağışıklama ile oluşan immünolojik hafızanın 15 yıl veya daha uzun süre ile sürdürüldüğü, anti-HBs konsantrasyonları zamanla çok düşük veya ölçülemez düzeye gelse bile rapel doz aşılama ile anti-HBs titrelerinde artış ya da doğal enfeksiyona hızlı immünolojik yanıt sonucu anti-HBc serokonversiyonu ile birlikte anti-HBs titrelerinde spontan artış meydana geldiği saptanmıştır (26, 29, 30).

HBV aşısına bağlı olarak gelişen koruyucu immün yanıt, anti-HBs antikör titresinin 10mIU/L'nin üzerinde olması ile tanımlanır. Hepatit B enfeksiyonuna duyarlı çocuk ve erişkinlerde klinik HBV enfeksiyonunun oluşmasını önlemede aşı %90-95 etkilidirler (20, 21, 23, 26). Bu oranlar 4.dekadda %86, 6.dekadda %47'ye düşer (31).

Aşı yanıtı, prematürel ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerde, obezlerde, sigara içenlerde, erkeklerde daha düşüktür. Siroz, kronik böbrek hastaları, kronik diyaliz hastalarında, organ transplantasyonu yapılanlar, çöliak hastalığı olan çocuklar ve bağışıklık sisteminde bozukluğu olan çocuklarda belirgin olarak düşüktür (20, 21, 30). Hepatit B aşılması yapılmış çocuk ve bireylerin, zamanla antiHBs düzeyleri düşük ya da koruyucu düzeyin altında bile olsa immünolojik hafızanın en az 15 yıl devam ettiği ve aşının akut ya da kronik HBV enfeksiyonuna karşı koruyucu olduğu belirtilmektedir (20, 32).

Hepatit B aşılması sonrasında yeterli titrede anti-HBs yanıtı gelişmesine rağmen, hepatit B ile enfekte olmuş infantlarda HBV S geni mutasyonları tanımlanmıştır. En yaygın mutasyon HBsAg'yi kodlayan genin "a" determinantında 145'inci kodonda glisin yerine arjinin (G145R) geçmesi ile oluşur. Bu mutasyon HBsAg'nin, anti-HBs'ye bağlanmasını azaltır. Bu nedenle anti-HBs varlığına rağmen, mutant HBsAg'li,

enfeksiyona neden olan hepatit B virüsüne 'escape' 'aşıdan kaçan' virüsler denir (33, 34).

## **2.5. Hepatit B Aşılması Sonrası Tarama**

Aşılama sonrasında, günümüzde kullanılan aşılarla aşı yanıtı (anti-HBs pozitifliği) %95'in üzerinde olduğundan, anti-HBs oluşup oluşmadığını saptamak için rutin testler gerekli değildir. Ancak aşağıdaki özel gruplarda, hepatit B'ye karşı yineleyen temas riski nedeni ile, 3. aşı dozundan 1 ya da 2 ay sonra anti-HBs titreleri araştırılmalıdır (20, 21, 28):

- Hemodiyaliz hastaları
- HIV enfeksiyonu olanlar
- Kesici yaralanmalar için mesleki riski olanlar
- HBV ile karşılaşma riski olan immün yetmezliği olan hastalar
- HBsAg pozitif hastalarla düzenli cinsel teması olan kişiler
- HBsAg pozitif anne bebekleri (Bağışıklama sonrası 9 ile 18. aylarda, HBsAg ve anti-HBs için araştırılmalı)

## **2.6. Hepatit B Aşısına İmmün Yanıt**

Rekombinant HBV aşılamasını takiben, inoküle edilen HbsAg'lerinin B hücresi Ig'e bağlanması ile birinci sinyal oluşur. Ancak bu birinci sinyal nispeten zayıftır. Birinci sinyal ile B hücre yüzeyinde MHC molekülü (Histokompatibilite Kompleksi) (Ayrıca HLA olarak da adlandırılır; İnsan lökosit antijeni) ve ko-stimülatör B7 molekülü belirir. Reseptör aracılığıyla endositoza uğrayan antijen peptidlere ayrılır. Antijen ve MHC-klas II kompleksi beraberce B hücre yüzeyine çıkar ve CD4+ T hücrelerine sunulur. Bu nedenle HLA kompleksi, T hücre bağımlı antijen yanıtında oldukça önemli role sahiptir (35-37).

CD4+ T hücrelerince üretilen sitokinler B hücrelerinin immünglobulin sekrete eden plazma hücrelerine diferansiyonunu indükler ve böylelikle koruyucu anti-HBs ilk üretimi başlanmış olur. Antijene ikincil yanıt olan uzun süreli yanıt ya da hafıza yanıtı B hücreleri sorumludur. Antijenin Th hücrelerine sunulmasıyla Th hücreleri aktive olur, yüzeyinde CD40L belirir. Yardımcı T hücreleri (Th) sitokin üretim profiline göre fonksiyonel olarak 2 gruba ayrılır. Th1 hücreleri ürettikleri INF- $\gamma$ , IL-2 ve TGF- $\beta$  gibi sitokinlerle hücre aracılıklı immün yanıtı sorumludur. Th2 ise ürettikleri IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 gibi sitokinlerle antikor üretiminde esastır (35-37).

İkinci yeterlilik sinyali CD40-CD40L kenetlenmesi ile sağlanır. CD40-CD40L kenetlenmesi, hücrenin siklusu girişini sağlar, germinal merkezdeki hücrelerin apoptozunu önler ve immünglobulin isotip yapımını başlatır. CD40 bellek hücrelerinin gelişimi için de gereklidir. B hücre yüzeyinde sitokinler için reseptörler belirtmeye başlar. Olayın bir ileri aşamaya geçme sinyalini sitokin-sitokin reseptörü etkileşimi sağlamaktadır. HBs antijeni ile ilk kez tanışan T lenfositleri B lenfositlerinin plazma hücresine dönüşüp IgM yapmasını sağlar iken antijene özgü bellek hücreleri immün sistem repertuarında saklanır. HBs antijeni ile ikinci kez karşılaşan immün sistem ikinci immün yanıt kapsamında 2-3 gün gibi kısa sürede yüksek miktarda IgG yaparak konağı enfeksiyondan korur (Şekil 1) (36-38). Hepatit B aşılama sırasında ikinci doz aşılama sonrasında gelişen ikinci immün yanıt, ilk aşılama gelişen immün yanıt ile yakından ilişkilidir (39). Bu nedenle bellek yanıtın gelişiminde, ilk aşılama immünolojik yanıtın gelişmesi, sonrasında gelişecek amnestik yanıtın gelişimi için temeldir (39, 40).

Ancak, Hepatit B aşılması sonrasında gelişen immün belleğin özgül mekanizması halen tam olarak aydınlatılamamış olup, bellek B hücreleri, bellek T hücreleri ve antijen-antikor kompleksi arasındaki karmaşık ilişki tam olarak tanımlanmamıştır (39).

## 2.7. Hepatit B Aşısına Yanıtsızlık

Hepatit B aşısına yanıtsızlığın önemli nedenleri arasında immün yetmezlik ya da kronik böbrek yetmezliği gibi altta yatan hastalıklar yer alır. Örneğin, diyaliz hastalarında, standart doz aşılama sonrasında olguların sadece %50-60'ında aşı yanıtı görülürken, tekrar aşılama sonrasında bu oran ancak %10 arttırılabilmektedir (41). Ayrıca, aşılanan kişinin yaşının 40 ve üzerinde olması, erkek cinsiyet, obezite, sigara içme gibi kişisel faktörler de aşı yanıtsızlığında önemlidir (42). Aşı yanıtsızlığının önemli bir diğer nedeni ise intragluteal enjeksiyon ya da aşının uygunsuz saklanması gibi aşı uygulamasındaki teknik hatalardır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, sağlıklı bireylerde hepatit B aşısı yanıtsızlığında genetik faktörlerin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Hepatit B aşısına yanıt ve yanıtsızlık ile ilgili olarak başta MHC genleri ile yapılmış çalışmalar olmak üzere, birçok immünogenetik çalışma yapılmış ancak Hepatit B aşısına yanıtsızlığın moleküler ve hücresel düzeydeki temeli tam olarak aydınlatılamamıştır.

Yapılmış çalışmalarda Hepatit B aşısı yanıtsızlığı ile ilişkilendirilmiş immünogenetik temelli sonuçlar:

- Bazı HLA antijenleri ve haplotiplerinin ekspresyonu nedeniyle T hücrelerine antijen sunumundaki kusurlar ( HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DR3, HLA-DQB1, DQA1) (43-45),
- HBsAg-spesifik T hücre gelişim kusuru (46, 47),
- B hücre repertuarındaki kusurlar (48),
- Antijen spesifik sitotoksik T hücreleri tarafından HBsAg spesifik B hücrelerinin destrüksiyonu (49),
- İmmünolojik tolerans ( 50),
- Hepatit B aşısına yetersiz Th1 sitokin üretimi ve sitokin gen polimorfizmleri (IL-2, INF- $\gamma$  yetersiz üretimi) (51-53),
- Hepatit B aşısına yetersiz Th2 sitokin üretimi ve sitokin gen polimorfizmleri (IL-4, IL-10, IL-13 yetersiz üretimi) (51-53),
- Sitokin reseptörlerinin gen polimorfizmleri ( IL-4RA ) (54),

- T hücrelerinde azalmış CD40 ekspresyonu (53),
- Doğal ve edinilmiş immünitinin önemli bir komponenti olan ve direk olarak patojene özgü immün yanıtta önemli rol oynayan Toll like reseptör (TLR) gen polimorfizmleri (54),
- Naturel killer (NK) ve NKT hücrelerinin azalmış aktiviteleri , CD56 oranı, NKT hücrelerinde azalmış CD69 ve CD25 yüzey antijen ekspresyonu, NK hücrelerinde azalmış CD69 yüzey antijen ekspresyonu (55).

### **3. İnterferon Gamma, İnterferon Gamma Genleri ve İnterferon Gamma Reseptörü Genleri**

İnaktif virüslara maruz kalındığında, solubl maddelerin tespit edilmesi ile bunların replikasyonu durdurduğu ilk kez 1957 yılında gözlenmiş ve bunlara interferon (IFN) adı verilmiştir. İmmünomodülatör ve antiproliferatif etkileri yanında interferonların hedef hücrede metabolik aktivite ve spesifik gen ekspresyonunu düzenleme özelliği de vardır (56-58).

Moleküler ve biyolojik yapılarının birbirinden farklı olduğu bir çok interferon tipi tanımlanmıştır. Bunlar aminoasit sırasına göre sınıflandırılmıştır. Tip I'de IFN- $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta) ve  $\omega$  (omega) yer alır. Bu gruptaki IFN'ların antiviral etkinlikleri fazladır. Tip II'de ise hemen tamamı farklı olan IFN- $\gamma$  (gamma) yer alır ki immün interferon olarak da adlandırılır (56, 57). Interferon-gamma (IFNG), viral ve hücre içi bakterilere karşı ve de tümör kontrolünde kritik bir sitokindir. Anormal IFNG ekspresyonu çeşitli otoimmün ve otoinflamatuvar hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir. IFNG'nın immün sistem üzerinde oldukça önemli etkileri vardır. Viral replikasyonu direk olarak inhibe eder ve daha da önemlisi güçlü bir immünstimülatör ve immünmodülatördür. IFNG doğal immün yanıtta NK ve NKT hücrelerince üretilir. Ayrıca antijen spesifik immün yanıtta, CD4 ve CD8 sitotoksik T lenfositlerden üretilir (58).

IFNG geni 12. kromozomun uzun kolu (12q24.1) üzerinde yer alır. Tekrar DNA elementlerinden oluşan IFNG geni 4 ekzondan oluşur (59). IFNG geninin birinci intronu CA mikrosatellit tekrarı ile 6 kadar allel içerir ve bu tekrar bölgeleri oldukça polimorfiktir. On iki CA tekrarı içeren allel 2, in vitro ortamda yüksek IFN üretimi ile ilişkilendirilmiştir (60). IFNG geninin allelik varyantları ve fenotipik özellikleri Tablo 2'de özetlenmiştir.

**Tablo 2.** IFNG geninin allelik varyantları ve fenotipik özellikleri.

| No    | Fenotip                                    | Mutasyon                   |
|-------|--------------------------------------------|----------------------------|
| .0001 | TSC2 Renal anjiyolipoma, düzenleyici       | IFNG, NT1349, 12 CA Tekrar |
| .0002 | Mycobacterium tuberculosis, koruyucu       | IFNG, +874A-T              |
| .0003 | Akut İmmün Yetmezlik Sendromu, hızlı seyir | IFNG, -179G-T              |
| .0004 | Hepatit C virus enfeksiyonu, tedavi yanıtı | IFNG, -764C-G              |

## IFNG Geninin Allelic Varyantları

### 1. TSC2 Geni ve IFNG, NT1349, 12 CA Tekrar

IFNG, böbrek tümörlerinde tümör regresyonunda önemli bir mediatörüdür. TSC2 geninde mutasyonu olan tuberoz sklerozlu olgularda böbrek hastalığının şiddeti üzerinde önemli etkileri gösterilmiştir (61). IFNG geninin 1349 pozisyonunda homozigot taşıyıcılığın, aplastik anemi için bir risk oluşturduğu gösterilmiştir (62).

### 2. IFNG, +874A-T

IFNG geninin birinci intronundaki bu mikrosatellit polimorfizm, ciddi otoimmün ve kronik inflamatuvar olaylar ile ilişkilendirilmiştir (63). Bu tek nükleotid polimorfizminin (+874A-T), +874T alleli yüksek IFNG ekspresyonu, +874A alleli ise düşük IFNG ekspresyonu ile ilişkili bulunmuştur (64).

### **3. IFNG, -179G-T**

IFNG geninin promotor bölgesinde, -179. Pozisyonda G/T değişimini içeren tek nükleotid polimorfizmi edinisel immün yetmezlik sendromunun ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. Bu hasta grubunda, -179T alleli olanlarda hastalığı hızlı ilerlediği ve CD4+T hücre sayısının belirgin düşük olduğu (<200 hücre/ µL) gösterilmiştir (65).

### **4. IFNG, -764C-G**

IFNG geninin proksimal promotor bölgesinde, -764. pozisyonda C/G değişimini içeren tek nükleotid polimorfizmidir. Bu polimorfizm, Hepatit C virusu ile enfekte kişilerde viral klirens ve tedaviye yanıtta oldukça önemli bir belirleyicidir (66)

IFNG reseptörü, IFNG reseptörü 1 ve 2 olmak üzere, heterodimer yapıdadır. IFNG reseptörü 1 (IFNGR1) ligand bağlayan bölümüdür. IFNG reseptörü geni 6. kromozomun uzun kolunda yer alır (6q23-q24) (67). Günümüze kadar IFNG reseptörü geninde toplam 13 mutasyon bildirilmiştir. Bu mutasyonlardan IFNGR1 395C-A; IFNGR1, 4-BP INS, 107TTAC; IFNGR1, IVS3DS, G-A, +1; IFNGR1, 12-BP DEL, NT295; IFNGR1, CYS77TYR; IFNGR1, VAL61GLN; IFNGR1, 3-BP DEL, 652GAA ya da 653AAG; IFNGR1, 818 DEL ve IFNGR1, 1-BP DEL, 794T ile atipik mikobakteriyel enfeksiyonlara yatkınlık ve yaygın enfeksiyon arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (68, 69). IFNGR1, 1-BP DEL, ILE87THR ve IFNGR1, 4-BP DEL, NT818 mutasyonları ile BCG aşısından sonra yaygın tüberküloz enfeksiyonları gösterilmiştir (70).

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 1. Olguların Seçimi

Bu çalışmada ulusal aşı takvimine göre standart 3 doz HBV aşısı uygulanmış 623'ü kız ve 656'sı erkek olmak üzere toplam 1279 çocuk değerlendirildi. Yerel Etik Kurul onayı ve ailelerden aydınlatılmış yazılı onam formu alındıktan sonra; çocuklardan 5-6 cc kan örneği alınmış ve mikro Elisa immunoassays (EIA) yöntemiyle (Dia Sorin-İtalya) HBsAg ve antiHBs titreleri değerlendirildi. AntiHBs titresi  $<10$  mIU/mL olanlar aşıya yanıtız olarak tanımlanırken, AntiHBs titresi  $\geq 10$  mIU/mL olanlar aşıya yanıtılı olarak kabul edildi. AntiHBs titresi  $>10$  mIU/mL olan çocuklara HBV aşısı rapel dozu uygulandı. Aşıya yanıtız olduğu belirlenen çocukların antiHBs titreleri, rapel dozdan ortalama  $5,2 \pm 2,1$  ay sonra tekrar değerlendirildi. Rapel doz sonrası hala AntiHBs titresi  $<10$  mIU/mL olan çocuklardan randomize olarak seçilen 100'ü çalışmamızın aşıya yanıtız grubunu, AntiHBs titresi  $>10$  mIU/mL olan çocuklardan randomize olarak seçilen 100'ü ise aşıya yanıtılı olan grubu oluşturdu.

Ortalama yaşları  $9,2 \pm 1,6$  yıl olan hepatit B aşısına yanıtılı çocukların %45'i erkek ( $n=45$ ), %55'i kızdı ( $n=55$ ). Aşıya yanıtız çocukların yaş ortalaması ise  $9,4 \pm 1,4$  yıldır ve bu grubun %52'si erkek ( $n=52$ ) ve %48'i kızdı ( $n=48$ ). Kronik hastalık öyküsü olanlar, bağışıklığı baskılanmış çocuklar ile HbsAg değeri pozitif olan çocuklar çalışmaya alınmadı.

Çocuklara ve ailelerine çalışma anlatılarak, çalışmaya katılmayı kabul edenlerden bilgilendirilmiş gönüllü olur formu ve genetik çalışmalar için olur formu onayı yazılı olarak alındıktan sonra çocuklardan 2 ml. etilendiamin tetra-asetat (EDTA)'lı tüpe kan örneği alındı.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurul'undan onay almıştır. Çalışma, Ege Üniversitesi Rektörlük Bilimsel Araştırma Projeleri ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.

## 2. DNA izolasyonu ve Genotip Analizi

### *Periferik Kandan DNA izolasyonu ve DNA Miktarının Belirlenmesi*

Alınan kan örneklerinden Invisorb spin blood kit (İNVİTEK) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA örnekleri -20 °C'de saklandı. Agaroz jel elektroforezi ile PCR ürünlerinin analizi ardından, DNA miktarı spektrofotometrik yöntemle belirlendi. Spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda optik dansitenin okunması ile DNA miktarı, 260 ve 280 nm dalga boyundaki okumalarda ise DNA'nın saflığını belirlendi. Bu oranın  $\geq 1,8$  olması DNA saflığının göstergesi kabul edildi. Bu bulgulardan yararlanarak DNA örneklerinin saflığı kontrol edildi ve miktarları belirlendi.

### *Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve enzim kesimi*

Genotipleme için yapılan polimeraz zincir reaksiyonundaki sekans özgül primer dizileri:

#### IFNG +874 T/A polimorfizmi için primer dizileri:

Antisens: TCAACAAAGCTGATACTCCA

sens +874T: TTCTTACAACACAAAATCAAATCT

sens +874A: TTCTTACAACACAAAATCAAATCA

#### IFNGR1 (CA)<sub>n</sub> polimorfizmi için primer dizileri:

5'-TTGTACTCATGCTTTGATG-3'

5'-TTAGTGTTTGTCTGGCTC-3'

### *IFNG +874 Polimorfizmi Çalışması*

Her hasta için normal ve mutant diziye belirleyebilmek için yukarıda belirtilen primerler kullanılarak 2 tüpte PCR uygulandı. Ayrıca PCR işleminin her tüpte gerçekleştiğini görebilmek için de kontrol PCR yapıldı.

### *IFNGR1 CA<sub>n</sub> Polimorfizmi Çalışması*

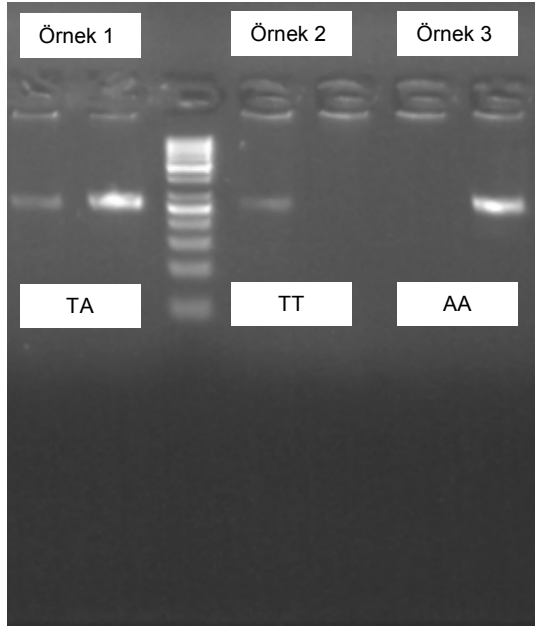
IFNGR1 CA<sub>n</sub> polimorfizmini araştırmak için istenilen DNA bölgesi yukarıda belirtilen primerler ile çoğaltılmıştır. Reverse primer FAM boyası ile işaretlenmiştir. Elde edilen PCR ürünleri genetik analizörde incelenmiştir.

### *Amplifikasyonun Kontrolü*

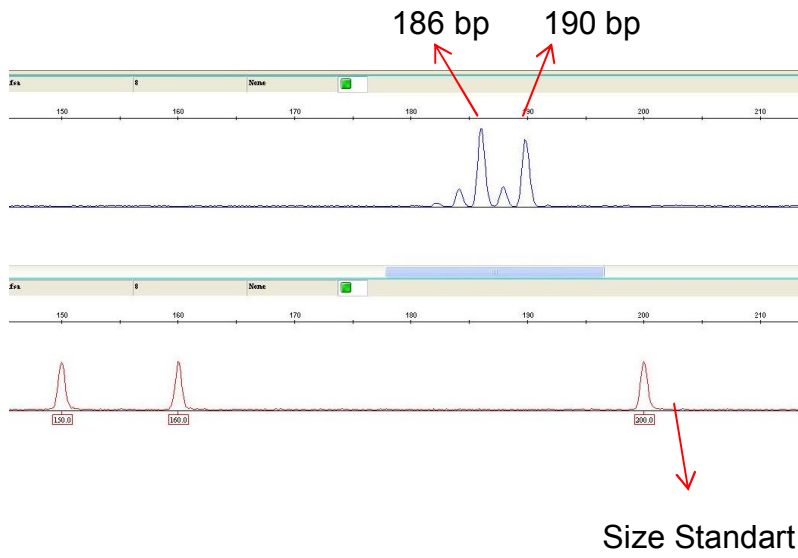
PCR işlemi sonrası PCR ürünlerini kontrol etmek amacıyla 5 µl (100ng) PCR ürünü 5 µl yükleme tamponu ile karıştırılıp agoroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez işlemi için agorozdan 2 gr tartılarak 100ml 0.5XTBE tamponundan manyetik karıştırıcıda balık kullanılarak karıştırıldı. Bu karışım mikrodalga fırında eritildi. Manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak 60°C'ye kadar soğutuldu ve üzerine 10µg/ml konsantrasyonunda etidyum bromür solüsyonundan 7µl ilave edildi. Bu agoroz solüsyonu önceden hazırlanmış elektroforez tankının taraklar yerleştirilmiş kamerasına döküldü ve sertleşinceye kadar beklendi. Üzerine 0.5XTBE tamponu eklendikten sonra taraklar çıkarıldı. 2µl PCR ürünü, 1µL 1X6 yükleme solüsyonu ve 3µl su ile karıştırılarak jele yüklendi. Kontrol olarak DNA marker (50bp) veya daha önce amplifiye edilen kontrol DNA'ları kullanıldı. Kontaminasyonu ekarte etmek amacıyla her PCR grubunda negatif ve pozitif PCR kontrolü yapıldı. Elektroforez EC105 cihazında, güç kaynağı 100Mv-80Ma koşullarına ayarlanarak 3 cm yürütüldükten sonra jel görüntüleme sisteminde sonuçlar incelendi. Şekil 3'de IFNG +874 T/A polimorfizmi için jel elektroforez örnekleri gösterilmiştir.

### *Sonuçların Genetik Analizörde İncelenmesi*

Amplifikasyon kontrolü sonrasında ürünler ABI 3100 cihazında (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) genotiplendirme işlemine tabi tutuldular. Şekil 4'de IFNGR1 (CA)<sub>n</sub> polimorfizmi için genetik analizör sonuç örnekleri gösterilmiştir.



**Şekil 3.** IFNG (+874 T/A) polimorfizmi için jel elektroforez örnekleri.



**Şekil 4.** IFNGR1 (CA)n polimorfizmi için genetik analizör sonuç örnekleri.

### **3. İstatistiksel Analiz**

Hepatit B aşısına yanıtı ve yanıtı grubun genotip ve alel sıklıklarının karşılaştırılması SPSS versiyon 13.0 istatistik programında  $\chi^2$  analizi ile hesaplanmış, gereklilik halinde Fisher's exact test kullanılmıştır. Anlamlılık derecesi  $p<0,05$  olarak alınmıştır.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan hepatit B aşısına yanıtı ve yanıtı grup arasında yaş ortalamaları bakımından anlamlı fark yoktu ( sırasıyla;  $9,2 \pm 1,6$  yıl,  $9,4 \pm 1,4$  yıl,  $p=0,6$ ). Hepatit B aşısına yanıtı grubun %45'i erkek ( $n=45$ ), %55'i kızdı ( $n=55$ ) iken, aşıya yanıtı grubun %52'si erkek ( $n=52$ ) ve %48'i kızdı ( $n=48$ ). Her iki grubun cinsiyet dağılımı benzerdi ( $p=0,8$ ).

Hepatit B aşısına yanıtı ve yanıtı grup arasında IFNG (+874 T/A) polimorfizmi için genotip sıklıkları bakımından anlamlı fark vardı ( $p=0,003$ ). Hepatit B aşısına yanıtı ve yanıtı grubun IFNG (+874 T/A) polimorfizmi için ayrı ayrı genotip sıklıkları incelendiğinde, aşıya yanıtı grupta TT genotipi %35 olguda ( $n=35$ ), aşıya yanıtı grupta ise %14 olguda ( $n=14$ ) belirlendi. Her iki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p=0,003$ ). IFNG (+874 T/A) polimorfizmi için her iki grup arasında TA genotip sıklığı karşılaştırıldığında, hepatit B aşısına yanıtı grupta %53 ( $n=53$ ) olguda, yanıtı grupta ise %69 ( $n=69$ ) olguda bu genotip saptandı. Ancak her iki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,14$ ). IFNG (+874 T/A) polimorfizmi için AA genotipi hepatit B aşısına yanıtı gruptaki olguların %12'sinde ( $n=12$ ), yanıtı gruptaki olguların ise %17'sinde ( $n=17$ ) belirlenirken, bu fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0,35$ ) (Tablo 3).

IFNG (+874 T/A) polimorfizmi için T allel sıklıkları incelendiğinde, hepatit B aşısına yanıtı grupta %61,5 ( $n=123$ ), yanıtı grupta ise %48,5 ( $n=97$ ) olarak belirlendi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,08$ ). A allel sıklığı ise hepatit B aşısına yanıtı grupta %38,5 ( $n=77$ ) iken, aşıya yanıtı grupta %51,5 ( $n=103$ ) idi. Ancak bu fark da istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,06$ ) (Tablo 3).

**Tablo 3.** Hepatit B aşısına yanıtızsız ve yanıtlı grubun IFNG (+874 T/A) polimorfizmi için genotip ve allel sıklıkları.

| <i>IFNG +874 T/A</i> | <i>Hepatit B aşısına<br/>yanıtızsız grup<br/>n=100 (%)</i> | <i>Hepatit B aşısına<br/>yanıtlı grup<br/>n=100 (%)</i> | <i>p</i>     |
|----------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Genotip</b>       |                                                            |                                                         |              |
| TT                   | 35 (35)                                                    | 14 (14)                                                 | <b>0,003</b> |
| TA                   | 53 (53)                                                    | 69 (69)                                                 | 0,14         |
| AA                   | 12 (12)                                                    | 17 (17)                                                 | 0,35         |
| <b>Allel</b>         |                                                            |                                                         |              |
| T                    | 123 (61,5)                                                 | 97 (48,5)                                               | 0,08         |
| A                    | 77 (38,5)                                                  | 103 (51,5)                                              | 0,06         |

IFNGR1 geni intronik (CA)<sub>n</sub> mikrosatellit polimorfizmi için hepatit B aşısına yanıtızsız ve yanıtlı olgularda 12 farklı tekrar saptandı. Hepatit B aşısına yanıtızsız ve yanıtlı olgularda IFNGR1 geni (CA)<sub>n</sub> allellerinin sıklık dağılımı Tablo 4’de gösterilmiştir. Allel 168 ve 172 hepatit B aşısına yanıtızsız grupta saptanmadı. Hepatit B aşısına yanıtızsız grupta allel 170 ve 182’nin sıklığı, yanıtlı gruba göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla; p=0,002, p=0,001). Hepatit B aşısına yanıtlı grupta ise allel 178, 180, 186 ve 188’nin sıklığı, yanıtızsız gruba göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla; p=0,01, p=0,001, p=0,03 ve p=0,01).

Hepatit B aşısına yanıtlı grup (%6) ile kıyaslandığında, yanıtızsız grupta (%26) kombine allellerde artmış homozigosite frekansı saptandı (p=0,001) (Tablo 5). Hepatit B aşısına yanıtızsız grupta, allel 170 homozigotluğu en sık saptanan genotip olarak belirlenirken (%12), ikinci sırada allel 182 homozigotluğu gelmekte idi (%7). Hepatit B aşısına yanıtızsız grupta allel 170 homozigotluğu %12 iken, yanıtızsız grupta %1 olarak belirlendi ki, bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi (p=0,003). Diğer

homozigot (CA)n allel sıklık dağılımları bakımından her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (tüm sıklık karşılaştırmalarında  $p>0,05$ ).

**Tablo 4.** Hepatit B aşısına yanıtızsız ve yanıtılı olgularda IFNGR1 geni (CA)n allellerinin sıklık dağılımı.

| <i>Allel</i> | <i>Hepatit B aşısına yanıtızsız grup (%)</i> | <i>Hepatit B aşısına yanıtılı grup (%)</i> | <i>P değeri</i> |
|--------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------|
| 168          | 0                                            | 2                                          | 0,14*           |
| 170          | 32,5                                         | 17                                         | <b>0,002</b>    |
| 172          | 0                                            | 1                                          | 0,4*            |
| 178          | 0,5                                          | 5                                          | <b>0,01*</b>    |
| 180          | 1                                            | 9                                          | <b>0,001*</b>   |
| 182          | 25                                           | 11                                         | <b>0,001</b>    |
| 184          | 5,5                                          | 10                                         | 0,09            |
| 186          | 8                                            | 15                                         | <b>0,03</b>     |
| 188          | 5,5                                          | 16                                         | <b>0,01</b>     |
| 190          | 14                                           | 8                                          | 0,07            |
| 192          | 6                                            | 5                                          | 0,6             |
| 194          | 2                                            | 1                                          | 0,6*            |

\* *p değeri Fisher's exact testi ile belirlenmiştir.*

**Tablo 5.** Hepatit B aşısına yanıtızsız ve yanıtılı olgularda IFNGR1 genindeki homozigot (CA)n allel sıklık dağılımı.

| <i>Genotip</i> | <i>Hasta (%)</i> | <i>Kontrol (%)</i> | <i>p değeri</i> |
|----------------|------------------|--------------------|-----------------|
| 170-170        | 12               | 1                  | <b>0,003*</b>   |
| 180-180        | 1                | 1                  | 1,0*            |
| 182-182        | 7                | 2                  | 0,17*           |
| 184-184        | 1                | 2                  | 1,0*            |
| 190-190        | 4                | 0                  | 0,06*           |
| 192-192        | 1                | 0                  | 1*              |
| Toplam         | <b>26</b>        | <b>6</b>           | <b>0,001</b>    |

\* *p değeri Fisher's exact testi ile belirlenmiştir.*

## TARTIŞMA

Önemli bir halk sağlığı olan HBV enfeksiyonu akut ve kronik karaciğer hastalığının en sık nedenidir. Genellikle erken çocukluk döneminde geçirilen HBV enfeksiyonları genellikle kronik HBV taşıyıcılığı ile sonuçlansa da, karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinoma gibi ciddi sekellere de neden olabilir. Aşılama ile korunma HBV enfeksiyonunda ve sekellerin önlenmesinde temeldir (1-3). Dünya Sağlık Örgütü tarafından 1997 yılında dünya genelinde rutin aşılama önerilmiştir. Hepatit B aşısı 150'den fazla dünya ülkesinin ulusal aşı takvimi içerisinde yer almaktadır.

Ülkemizde ulusal hepatit B aşılması ilk kez Ağustos 1998'de, sıfır yaş grubunda genişletilmiş bağışıklama programına dahil edilmiştir. Sağlık Bakanlığı tarafından 1998 yılında yayımlanan ilk genelgede aşının uygulanması için üç farklı seçenek sunulmuş ve ülkemizde gebelerde HBsAg taraması yapılmadığından, bebeklere ne kadar erken ulaşırsa aşının o kadar etkin olacağı vurgulanmıştır (27). Bağışıklama Danışma Kurulu önerileri doğrultusunda Aralık 2007'de yayınlanan 'Genişletilmiş Bağışıklama Programı Daimi Genelgesi' ile resmen yürürlüğe giren ve halen uygulanmakta olan 2008 Sağlık Bakanlığı Aşı Takvimi'ne göre hepatit B aşısı; 0, 1. ve 6. aylarda uygulanmakta olup, doğumda aşılanamayan bebeklere ilk karşılaşmada birinci doz, birinci dozdan en az 1 ay sonra 2. doz ve 2. dozdan 5 ay sonra 3. doz hepatit B aşısı uygulanmaktadır (28). Günümüzde dünya genelinde yaygın olarak kullanılan hepatit B aşıları rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen ve ikinci kuşak hepatit B aşıları olarak adlandırılan aşılardır.

HBV aşılamaında karşılaşılan en önemli sorun aşının yeterli bağışıklık sağlamamasıdır. Hepatit B aşıları çocuk ve erişkinlerde klinik HBV enfeksiyonunun oluşmasını önlemede %90-95 etkiliyken, %5-10 oranında aşı yanıtıslığı görölmektedir. Hepatit B aşına yanıtıslığın önemli nedenleri arasında immün yetmezlik ya da kronik böbrek yetmezliği gibi altta yatan hastalıklar, aşılanan kişinin yaşının 40 ve üzerinde olması, prematüre doğum, düşük doğum kilosu, erkek cinsiyet, obezite, sigara içme gibi kişisel faktörler yer almaktadır (20, 21, 30).

Çalışmaya alınan olguların hiçbirinde immün yetmezlik ya da kronik böbrek yetmezliği başta olmak üzere kronik hastalık öyküsü yoktu. Hepatit B aşısına yanıtı ve yanıtı grup arasında cinsiyet dağılımı bakımından fark yoktu. Yine yaş dağılımı bakımından her iki grup arasında fark saptanmadı.

Günümüzde hepatit B aşısı yanıtı ve yanıtı immünogenetik faktörlerin önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu nedenle, son yıllarda hepatit B aşısı yanıtı ve yanıtı ile ilgili yapılan çalışmaların çoğunda hepatit B aşısı yanıtı ve yanıtı immünogenetik temelleri araştırılmaktadır.

İmmünogenetik temelli bu çalışmaların başında, aşısı immün yanıtında antijen işleme ve sunumu görevleri ile önemli role sahip olan HLA ile yapılmış çalışmalar gelmektedir. Bu çalışmalarda HLA-DRB1 ile hepatit B aşısına gelişen yanıt arasında anlamlı ilişki olduğu gösterilmiştir (43, 71-73). HLA-DRB1\*13 allelinin hepatit B aşısı sonrasında gelişen yanıtta olumlu etkisinin olduğu gösterilmiştir (72). HLA-DRB1\*7 alleli saptanan bireylerde ise hepatit B aşısı sonrasında gelişen antikor yanıtının daha düşük olduğu ve aşısı yanıtı oranlarının anlamlı olarak yüksek olduğu bildirilmiştir (43). Bir diğer çalışmada ise, HLA-DRB1\*0301 için homozigot bireylerde hepatit B aşısı yanıtı belirgin olarak yüksek olduğu bildirilmiştir (73). Ayrıca, aşısı yanıtı ile HLA-DRB1\*14 sıklığı arasındaki ilişkide gösterilmiştir (72). HLA-DRB1 dışındaki HLA-C, HLA-DR3, HLA-DQB1, HLA-DQA1 gibi bazı HLA antijenleri ve haplotiplerinin ekspresyonu nedeniyle T hücrelerine antijen sunumundaki kusurlara bağlı aşısı yanıtı gelişimini destekleyen çalışmalar da vardır (43-45).

Hepatit B aşısı yanıtı ve yanıtı immünogenetik nedenlerinin incelendiği diğer çalışmalarda, aşısı yanıtı ve yanıtı HBsAg spesifik T hücre gelişim kusurlarının önemli rol oynadığı gösterilmiştir (46, 47). Shokrgozar ve ark.'nın (48) yaptıkları çalışmada ise, B hücre repertuarındaki kusurlar ile aşısı yanıtı arasındaki ilişki olduğu belirtilmiştir. Hepatit B aşılması sonrasında, antijen spesifik sitotoksik T hücreleri tarafından HBsAg spesifik B hücrelerinin destrüksiyonunun aşısı yanıtı ve yanıtı önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir (49). Hepatit B aşısına gelişen immün yanıtta temel olan T hücrelerindeki azalmış CD40 ekspresyonu ile NK ve NKT hücrelerinin azalmış

aktiviteleri, CD56 oranı, NKT hücrelerinde azalmış CD69 ve CD25 yüzey antijen ekspresyonu, NK hücrelerinde azalmış CD69 yüzey antijen ekspresyonu da aşı yanıtı ile ilişkilendirilmiştir (53, 55). Doğal ve edinilmiş immünitenin önemli bir komponenti olan ve aşılamaya sonrası özgül immün yanıtta önemli rol oynayan TLR'lerinin gen polimorfizmleri de hepatit B aşı yanıtı ile ilişkili bulunmuştur (54).

Hepatit B aşılması sonrasında gelişen koruyucu anti-HBs antikorlarının gelişimi Th hücrelerine bağlıdır. Aşılamaya sonrasında Th hücreleri aktive olur, sitokin üretim profiline göre fonksiyonel olarak 2 gruba ayrılır. Yardımcı T hücreleri (Th) Th1 hücreleri ürettikleri IFN- $\gamma$ , IL-2 ve TGF- $\beta$  gibi sitokinlerle hücre aracılıklı immün yanıtta sorumludur. Th2 ise ürettikleri IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 gibi sitokinlerle antikor üretiminde esastır (35-37). Son yıllarda hepatit B aşı yanıtının hücresel temeline ışık tutmaya yönelik yapılmış çalışmalarda, Th1 ve Th2 hücreleri tarafından üretilen sitokinlerin yanıt üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Yapılmış bazı çalışmalarda ise, Th2 tarafından üretilen sitokin düzeyleri hepatit B aşısına gelişen yanıt ile ilişkilendirilmiştir (51-53). Hepatit B aşısına yanıtı 28 ve aşıya yanıtı 25 bebeğin değerlendirildiği bir çalışmada, olgulardan elde edilen periferik kan mononükleer hücreler (PBMC) rekombinant HBsAg ve mitojen ile uyarılmış ve sonrasında ELISA yöntemi ile IL-4 ve IL-10 düzeyi belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, Th2 hücreleri tarafından üretilen IL-4 ve IL-10 düzeyi aşıya yanıtı grupta, yanıtı gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuş ve aşı yanıtı ile bu sitokinlerin yetersiz üretiminin ilişkili olduğu belirtilmiştir (51). Yine, bu sonuçları destekler nitelikte IL-4 düzeyinin aşılama sonrasında anti-HBs antikor titrelerindeki artış ile ilişkili olduğu, tekrar dozlar ile IL-4 düzeylerinde belirgin artış olduğu gösterilmiştir (74). Yapılmış bir diğer çalışmada ise hepatit B aşısına yanıtı grupta, Th2 tarafından üretilen sitokinlerden IL-10 düzeyi aşıya yanıtı gruba göre anlamlı olarak düşük saptanırken, her iki grup arasında IL-4 düzeyleri bakımından anlamlı fark saptanmamıştır (75). Hepatit B aşısına yanıtı ve yanıtı İran'lı erişkinlerde yapılmış bir çalışmada, IL-10 düzeyleri aşıya yanıtı grupta yanıtı gruba göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (52).

Hepatit B aşı yanıtında, Th1 sitokin profili oldukça önemlidir. Hepatit B aşı yanıtınsızlığının immünolojik temelini aydınlatmaya yönelik yapılmış birçok çalışmada hepatit B aşı yanıtınsızlığından Th1 tarafından üretilen sitokinlerdeki yetersizlikler sorumlu tutulmuştur (47, 51-53). Chedid ve ark.'nın (47) yaptıkları çalışmada, hepatit B aşı yanıtınsızlığı IL-2 düzeyindeki düşüklük ile ilişkilendirilmiştir. Yapılmış bir diğer çalışmada ise hepatit B aşısına yanıt ile IL-2 düzeyi arasındaki anlamlı ilişki gösterilmiştir (76). Velu ve ark.'nın (75) çalışmasında, hepatit B aşısına yanıtınsız grupta, Th1 tarafından üretilen sitokinlerden IL-2 ve TNF-alfa düzeyleri aşıya yanıtlı grup ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Yine bu çalışmada anti-HBs antikor düzeyi > 100 mIU/mL olarak saptanan hepatit B aşısına yüksek düzeyde yanıtlı grupta IL-12 düzeyi belirgin olarak yüksek saptanmış ve bu sonuçlar ile hepatit B aşısına karşı gelişen anti-HBs antikor düzeyinin Th1 sitokin yanıtı ile yakından ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Sitokin üretimi ve fonksiyonları üzerinde etkili olan sitokin genlerindeki polimorfizmlerin, hepatit B aşı yanıtı üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Bu ilişkinin irdelendiği Chen ve ark.'nın (54) çalışmasında IL-4 ve IL-13 gen polimorfizmleri hepatit B aşısı sonrası gelişen immün yanıt ile ilişkili bulunmuştur. Yine bu çalışmada IL-1 $\beta$  genindeki tek nükleotid polimorfizminde (rs1143633 ve rs1143627) belirlenen A/G haplotip sıklığı, hepatit B aşısına yanıtınsız olgularda belirgin olarak yüksek bulunmuştur. Hepatit B aşı yanıtınsızlığı ile IL-1 $\beta$  +3953 (C/T) gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi inceleyen bir erişkin çalışmasında, bu polimorfizmin minör allelik varyantının hepatit B aşılması sonrasında T hücre proliferasyonundaki ve anti-HBs titrelerindeki artış ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (77). Çocuklarda yapılmış bir çalışmada hepatit B aşısına yanıtı ve yanıtınsız olguların TNF (-308), TGF- $\beta$  (+869, +915), IL-10 (-1082, -819, -592) ve IL-6 (-174) gen polimorfizmleri incelenmiş ve her iki grup arasında bu polimorfizmlerin genotipik sıklıkları bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmamıştır (78).

Th1 yanıtının önemli bir sitokini olan IFNG, viral ve hücre içi bakterilere karşı ve tümör kontrolünde oldukça önemlidir. Anormal IFNG ekspresyonu çeşitli otoimmün ve

otoinflamatuar hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir. Viral replikasyonu direk olarak inhibe eder ve daha da önemlisi güçlü bir immünstimülatör ve immünmodülatördür. IFNG doğal immün yanıtta NK ve NKT hücrelerince üretilir. Antijen spesifik immün yanıtta ise, CD4 ve CD8 sitotoksik T lenfositlerden üretilir (58). IFNG, hepatit B aşısına karşı gelişen yanıtta da önemli role sahiptir (53). Jafarzadeh ve ark.'nın (51) yaptığı çalışmada hepatit B aşı yanıtı sızlığı saptanan bebeklerde, in vitro olarak hepatit B aşısına karşı PBMC'de yetersiz IFNG üretimi belirlenmiş ve yetersiz IFNG üretimi hepatit B aşı yanıtı sızlığı ile ilişkili bulunmuştur. Hepatit B aşısına yanıtı sız (anti-HBs düzeyi < 10 mIU/mL), düşük yanıtı (anti-HBs düzeyi 10-100 mIU/mL) ve yüksek yanıtı (anti-HBs düzeyi >1000 mIU/mL) 3 grubun IFNG düzeylerinin karşılaştırıldığı çalışmada, aşıya yüksek yanıtı grupta IFNG düzeyleri yüksek saptanırken, aşıya yanıtı sız grupta belirgin olarak düşük düzeylerde bulunmuştur (75). Çalışmamızın kısıtlayıcı faktörü, hepatit B aşısına yanıtı ve yanıtı sız olgulardaki IFNG düzeylerinin belirlenmemesidir.

Tekrar DNA elementlerinden oluşan IFNG geninin birinci intronu CA mikrosatellit tekrarı ile 6 kadar polimorfizm içerir ve bu tekrar bölgeleri oldukça polimorfiktir (60). olan tuberoz sklerozlu olgularda böbrek hastalığının şiddeti üzerinde önemli etkileri gösterilmiştir (61). Yapılmış çalışmalar ile IFNG genindeki bu polimorfizmler ile çeşitli enfeksiyöz ve otoimmün hastalıklar arasındaki ilişkiler gösterilmiştir. IFNG geninin 1349 pozisyonunda homozigot taşıyıcılığın, aplastik anemi için bir risk oluşturduğu (62), IFNG geninin promotor bölgesinde, -179. Pozisyonunda G/T değişimini içeren tek nükleotid polimorfizmi edinisel immün yetmezlik sendromunun ilerlemesi ile ilişkili olduğu (65), IFNG geninin promotor bölgesinde, -764. pozisyonunda C/G değişimini içeren tek nükleotid polimorfizminin.Hepatit C virusu enfeksiyonunda tedaviye yanıtta oldukça önemli bir belirleyici olduğu gösterilmiştir (66). IFNG geninin birinci intronundaki (+874A/T) tek nükleotid polimorfizminin *M. tuberculosis* enfeksiyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. On bir çalışmanın değerlendirildiği bir meta-analizde, IFNG +874T allelinin *M. tuberculosis* enfeksiyonuna karşı koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir (64).

Çalışmamızda, hepatit B aşısına yanıtızsız ve yanıtı grubun IFNG (+874 T/A) polimorfizmi için genotip sıklıkları incelendiğinde, aşıya yanıtızsız grupta TT genotipi 35 olguda (%35), aşıya yanıtı grubta ise 14 olguda (%14) belirlendi. Her iki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı. IFNG (+874 T/A) polimorfizmi için her iki grup arasında TA ve AA genotip sıkları bakımından anlamlı fark bulunmadı. IFNG (+874 T/A) polimorfizmi için T ve A allel sıklıkları bakımından da her iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı. Sonuç olarak, IFNG (+874 T/A) polimorfizmi için TT genotipinin, hepatit B aşısı yanıtızsızlığı ile ilişkili olabileceği düşünöldü.

Hepatit B aşısı yanıtızsızlığında, IFNG gen polimorfizminin yerini ve önemini belirlemeye yönelik çocukluk çağında yapılmış bir çalışmada hepatit B aşısına yanıtı (Üç doz standart aşılama sonrası anti-HBs düzeyi 11– 100 mUI/ml olan) ve yüksek yanıtı (anti-HBs düzeyi 11–1000 mUI/ml olan) olgular arasında IFNG (+874 T/A) gen polimorfizminin genotipik ve allelik dağılımları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (78). Hepatit B aşılması sonrasında zirve anti-HBs düzeyi ile CD58 (rs1414275, rs1016140), IFNG (rs2069727), MAPK8 (rs3827680, rs10857565), IL10RA (rs2508450, rs2229113) ve CD44 (rs353644, rs7937602) tek nükleotid mutasyonları arasındaki ilişki irdelenmiş ve IFNG, MAPK8 ile IL10RA gen polimorfizmleri ile aşılama sonrasında gelişen anti-HBs düzeyleri arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (79).

IFNGR-1 geni tarafında kodlanan, IFNGR1 IFNG'nın antiviral etkisi, T hücre aktivasyonu, B hücre matürasyonu ve MHC sınıf 2 ekspresyonundaki düzenleyici etkileri için kritik role sahiptir (80). Yapılmış çalışmalarda, IFNGR 1 genindeki mutasyonlar ile atipik mikobakteriyel enfeksiyonlara yatkınlık ve yaygın enfeksiyon arasında anlamlı ilişki olduğu belirtilmiştir (68, 69). IFNGR1 genindeki bazı mutasyonları ile BCG aşısından sonra yaygın tüberküloz enfeksiyonlarının geliştiği de gösterilmiştir (70). Yapılmış bir çalışmada kronik hepatit B enfeksiyonu olan, hepatit B enfeksiyonu immünolojik yanıt ile sonuçlanan ve kontrol grubunda IFNGR1 geninde 7 tek nüleotid polimorfizm (-611A/G, -56C/T, 40G/A, 95C/T, 130A/G, 20685A/G, 21227T/C) sıklıkları incelenmiş ve IFNGR1 genindeki -56C/T

polimorfizmi ile hepatit B enfeksiyonun klinik bulguları arasında anlamlı ilişki olduğu gösterilmiştir (81).

Çalışmamızda, IFNGR1'in IFNG'nin biyoaktivitesi üzerindeki önemli etkileri göz önüne alındığında, IFNGR1'i kodlayan gendeki polimorfizmin hepatit B aşısı yanıtında önemli rol oynayabileceği düşünüldü. IFNGR1 geni intronik (CA)<sub>n</sub> mikrosatellit polimorfizmi için hepatit B aşısına yanıtı olmayan ve yanıt veren olgularda 12 (CA)<sub>n</sub> belirlendi. Hepatit B aşısına yanıtı olmayan grupta allelik belirteç 170 ve 182'nin sıklığı yanıt veren gruba göre anlamlı olarak yüksekti. Hepatit B aşısına yanıt veren grupta ise allelik belirteç 178, 180, 186 ve 188'nin sıklığı, yanıtı olmayan gruba göre anlamlı olarak yüksekti. Hepatit B aşısına yanıtı olmayan grupta kombine allellerde artmış homozigosite frekansı saptandı. Hepatit B aşısına yanıtı olmayan grupta, allel 170 homozigotluğu en sık saptanan genotip olarak belirlenirken, ikinci sırada allel 182 homozigotluğu gelmekte idi. Bu sonuçlar ışığında, IFNGR1 geni intronik (CA)<sub>n</sub> mikrosatellit polimorfizmi için allelik belirteç 170 ve 182'nin ve allel 170 homozigotluğunun hepatit B aşısı yanıtı ile, allelik belirteç 178, 180, 186 ve 188 sıklığının ise hepatit B aşısı yanıtı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

## SONUÇLAR

1. Hepatit B aşısına yanıtıız olgularıa TT genotip sıklığı, aşıya yanıtılı gruba göre anlamlılı olarak yüksek bulundu. Ancak, IFNG (+874 T/A) polimorfizmi için her iki grup arasında TA ve AA genotip sıkları ile T ve A allel sıklıkları bakımından anlamlılı fark bulunmadı.
2. IFNG (+874 T/A) polimorfizmi için TT genotipinin, hepatit B aşı yanıtıızlığı ile ilişkili olabileceğı düşünöldü.
3. IFNGR1 geni intronik (CA)n mikrosatellit polimorfizmi için hepatit B aşısına yanıtıız ve yanıtılı olgularıa 12 (CA)n belirlendi. Hepatit B aşısına yanıtıız grupta allelik belirteç 170 ve 182'nin sıklığı yanıtılı gruba göre anlamlılı olarak yüksekti. Hepatit B aşısına yanıtılı grupta ise allelik belirteç 178, 180, 186 ve 188'nin sıklığı, yanıtıız gruba göre anlamlılı olarak yüksek bulundu.
4. Hepatit B aşısına yanıtıız grupta IFNGR1 geni intronik (CA)n mikrosatellit polimorfizmi için allel 170 homozigotluğı en sık saptanan genotip olarak belirlendi.
5. IFNGR1 geni intronik (CA)n mikrosatellit polimorfizmi için allelik belirteç 170 ve 182'nin ve allel 170 homozigotluğunun hepatit B aşı yanıtıızlığı ile, allelik belirteç 178, 180, 186 ve 188 sıklığının ise hepatit B aşı yanıtı ile ilişkili olabileceğı düşünöldü.

## KAYNAKLAR

1. Ganem D: Hepadnaviridae and their replication. Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Eds). Fields Virology. 3 rd ed. Lippincott, Raven Pres, 1996, 2703-2737.
2. Robinson WS: Hepadnaviridae and their replication. Fields BN, Knipe DM (Eds). Fundamental Virology. 2 nd ed. New York, rave Pres Ltd, 1991:989-1021.
3. Lee WM: Hepatitis B virus infection. N Engl J Med1997; 337: 1733-1745.
4. Ustaelebi Œ, Ergünay K. Hepatit B virusunun moleküler virolojisi. Ed: Tabak F, Balık İ, Tekeli E. Viral Hepatit 2007. 1. baskı. İstanbul: Ohan Matbaası, 2007: 96-107.
5. Bower WA, Finelli L, Goldstein ST. Hepadnaviridae: Hepatitis B and Hepatitis D Viruses . In: Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases, 2nd ed, Long, SS, Pickering, LK, Prober, CG (Eds), Churchill Livingstone, New York. 2008: 1086-1097.
6. Clements JC, Coghlan B, Creati M, Locarnini S, Tedder RS, Torresi J. Global control of hepatitis B virus: does treatment-induced antigenic change affect immunization? Bulletin of the World Health Organization 2010;88:6.
7. Bilgi A, Özacar T. Hepatit B Virusu. In: Topu AW, Söyletir G, Doganay M (Eds.). İnfeksiyon Hastalıkları Ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002: 1350-1370.
8. Kılıturgay K, Badur S (eds). Viral Hepatit 2001, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, Deniz Ofset, Ankara, 2001.
9. American Academy of Pediatrics. Hepatitis B. İn: Pickering LK, Baker CJ, Long SS, McMillan JA, eds. Red Book: 2006 Report of the Committee on Infectious Diseases. 27th ed. Elk grove Village, IL: American Academy of Pediatrics, 2006: 335-355
10. Blumberg BS. Sex – related aspects of Hepatitis B infection and it's consequences. World Scientific Series in 20th Century Biology 1990; 4: 523-527.
11. Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. Int J Med Sci 2005; 2(1) ;50-57.
12. Taşyaran MA. HBV infeksiyonu epidemiyolojisi. Tekeli E., Balık İ (Ed). Viral Hepatit 2003, Ankara, Karakter AŞ. 2003: 121-128.
13. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. J Hepatol 2003; 39: 64-69.
14. Sıdal M, Oğuz F, Okan F, Elioğlu N, Oraltay P. Akut Viral Hepatitli olguların analizi. Klimik Derg 1990; 3: 87-88

15. Tansuğ Ş, Düzgünsıvacı E, Ünal Z, Güvel H. Hepatit B virüs enfeksiyonunun seroepidemiolojik araştırılması. *Viral Hepatit Derg* 1999; 2: 96-109.
16. Uçar B, Akgün Y, Akgün N ve ark. Eskişehir ilinde yaşayan okul çağı çocuklarında hepatit B seroepidemiolojisi. *Viral Hepatit Derg* 1997; 1: 60-65.
17. Akbulut A, Kılıç SS, Felek S, Kalkan A, Papila Ç. Elazığ ili ve yöresinde hepatit B prevalansının araştırılması. *Viral Hepatit Derg* 1995; 1: 29-33.
18. Emiroğlu HH, Kesecik M, Oğuz S. Şırnak'taki asker ve sivillerde asemptomatik hepatit B virüsü taşıyıcılığı seroprevalansı. *Viral Hepatit Derg* 2000; 1: 18-20
19. Şahin KM, Yarkın F, Kocabaş E ve ark. Akut hepatit ön tanılı çocuklarla sağlıklı çocuklarda HAV, HBV ve HCV markırlarının araştırılması. *Viral Hepatit Derg* 1998; 2: 104-108.
20. Teo EK, Lok A, Esteban R. Hepatitis B virus vaccination. Version 16.2 <http://www.uptodate.com> (accessed May 31, 2008).
21. Yu SA, Cheung RC, Keeffe EB. Hepatitis B vaccines. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 283-300.
22. Harrison TJ, Dusheiko GM, Zuckerman AJ. Hepatitis viruses. In Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JE (EDS): *Principles and Practice of Clinical Virology*, fourth ed, John Wiley and Sons Ltd. ,west Sussex, England. 2000: 187-233.
23. Koziel M, Siddiqui A: Hepatitis B virus and hepatitis Delta Virus. In: *Principles and Practices of Infectious Disease*. Eds. Mandell. 2005; 2: 1864-1890.
24. Shouval D: Hepatitis B vaccine. *J Hepatol* 2003;39: 70-76.
25. Milich DR, McLachlan A, Chisari FU, Kent SBH. Immune response to the pre-S1 region of the HBsAg:pre-S1 spesific T cell responce can bypass nonresponsiveness to the pre-S2 and S regions of HBsAg. *J Immunol* 1986; 137: 315-322.
26. American Academy of Pediatrics. Hepatitis B. In Pickering LK, Baker CJ, Long SS, McMillian JA, eds. *Red Book: 2006 Report of the Committee on Infectious Diseases*. 27th ed.Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 2006: 335.
27. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Hepatit B aşısı uygulaması hakkında genelge. (4.6.1998/6856)
28. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Genişletilmiş Bağışıklama Programı Daimi Genelgesi (7.12 2007).
29. Wiström J, Ahlm C, Lundberg S, Settergren B, Tärnvik A. Booster vaccination with recombinant hepatitis B vaccine four years after priming with one single dose. *Vaccine* 1999; 17: 2162-2165.

30. Kocabaş E. Hepatit B aşılıarı. Çocuk Enf Derg 2008; 2: 7-16.
31. Poland GA. Hepatitis B immunization in health care workers. Dealing with vaccine nonresponce. Am J Prev Med 1998; 15: 73-77.
32. Zuckerman JN. Protective efficacy, immunotherapeutic potential, and safety of hepatitis B vaccines. J Med Virol 2006; 78: 169-177.
33. Ghany MG, Ayola B, Villamil FG, Gish RG, Rojter S, Vierling JM. Hepatitis B virus S mutants in liver transplant recipients who were reinfected despite hepatitis B immune globulin prophylaxis. Hepatology 1998; 27: 213-222.
34. Carman WF, Trautwein C, van Deursen FJ, Colman K, Dornan E, et al. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. Hepatology 1996; 24: 489-493.
35. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. Immunol Today 1997; 18: 263-266.
36. Camcioğlu Y. Aşılamanın immünolojisi. Çocuk Enf Derg 2008; 2 (Özel Sayı 1): 25-30.
37. Vora KA, Tumas-Brundage K, Manser T. Contrasting the in situ behavior of a memory B cell clone during primary and secondary immune responses. J Immunol 1999;163: 4315-4327.
38. Jafarzadeh A, Shokri F. The antibody response to HBs antigen is regulated by coordinated Th1 and Th2 cytokine production in healthy neonates.Clin Exp Immunol. 2003; 131(3): 451-456.
39. Banatvala J, Van Damme P, Oehen S. Lifelong protection against hepatitis B: the role of vaccine immunogenicity in immune memory. Vaccine 2000;19: 877-885.
40. European Consensus Group on Hepatitis B Immunity. Are booster immunisations needed for lifelong hepatitis B immunity? Lancet 2000; 355: 561-565.
41. Peces, R, de la Torre, M, Alcázar, R, Urrea, JM. Prospective analysis of the factors influencing the antibody response to hepatitis B vaccine in hemodialysis patients. Am J Kidney Dis 1997; 29: 239-242.
42. Katkov WN, Dienstag JL. Hepatitis vaccines. Gastroenterol Clin North Am 1995;1:147-159.
43. Wang C, Tang J, Song W, Lobashevsky E, Wilson CM, Kaslow RA. HLA and cytokine gene polymorphisms are independently associated with responses to hepatitis B vaccination. Hepatology. 2004; 39(4): 978-88.
44. Desombere I, Willems A, Leroux-Roels G Response to hepatitis B vaccine: multiple HLA genes are involved. Tissue Antigens. 1998; 51(6): 593-604.

45. Deulofeut H, Iglesias A, Mikael N, Bing DH, Awdeh Z, Yunis J, Marcus-Bagley D, Kruskall MS, Alper CA, Yunis EJ. Cellular recognition and HLA restriction of a midsequence HBsAg peptide in hepatitis B vaccinated individuals. *Mol Immunol.* 1993; 30(10): 941-948.
46. Avanzini MA, Belloni C, Soncini R, Ciardelli L, de Silvestri A, Pistorio A, Tinelli C, Maccario R, Rondini G. Increment of recombinant hepatitis B surface antigen-specific T-cell precursors after revaccination of slow responder children. *Vaccine.* 2001;19(20-22): 2819-2824.
47. Chedid MG, Deulofeut H, Yunis DE, Lara-Marquez ML, Salazar M, Deulofeut R, Awdeh Z, Alper CA, Yunis EJ. Defect in Th1-like cells of nonresponders to hepatitis B vaccine. *Hum Immunol.* 1997; 58(1): 42-51.
48. Shokrgozar MA, Shokri F. Enumeration of hepatitis B surface antigen-specific B lymphocytes in responder and non-responder normal individuals vaccinated with recombinant hepatitis B surface antigen. *Immunology.* 2001;104(1): 75-79.
49. Barnaba V, Franco A, Alberti A, Benvenuto R, Balsano F. Selective killing of hepatitis B envelope antigen-specific B cells by class I-restricted, exogenous antigen-specific T lymphocytes. *Nature.* 1990; 345: 258-260.
50. del Canho R, Grosheide PM, Voogd-Schotanus M, Huisman WM, Heijntink RA, Schalm SW. Immunogenicity of two different dosages (10 and 5 micrograms) of recombinant DNA hepatitis B vaccine in healthy neonates. *Vaccine.* 1994; 12(14): 1323-1326.
51. Jafarzadeh A, Shokri F. The antibody response to HBs antigen is regulated by coordinated Th1 and Th2 cytokine production in healthy neonates. *Clin Exp Immunol.* 2003;131(3): 451-456.
52. Kardar GA, Jeddi-Tehrani M, Shokri F. Diminished Th1 and Th2 cytokine production in healthy adult nonresponders to recombinant hepatitis B vaccine. *Scand J Immunol.* 2002 ; 55(3): 311-314.
53. Goncalves L, Albarran B, Salmen S, Borges L, Fields H, et al. The nonresponse to hepatitis B vaccination is associated with impaired lymphocyte activation. *Virology.* 2004; 326(1): 20-28.
54. Chen J, Liang Z, Lu F, Fang X, Liu S, Zeng Y, et al. Toll-like receptors and cytokines/cytokine receptors polymorphisms associate with non-response to hepatitis B vaccine. *Vaccine.* 2010 Nov 25. [Epub ahead of print]
55. Albarran B, Goncalves L, Salmen S, Borges L, Fields H, Soyano A, Montes H, Berrueta L. Profiles of NK, NKT cell activation and cytokine production following vaccination against hepatitis B. *APMIS.* 2005; 113(7-8): 526-535.
56. Oppenheim JJ, Ruscetti FW. Cytokines. In: Parslaw TG, Stites OP, Terr AI, Imboden JB(Eds.). *Lange Medical Immunology.* 10th Ed., New York: Lange Medical Books/ McGraw Hill; 2001: 148-167.

57. Elgert KD. Immunology: Understanding the Immune System. New York: Wiley Liss/ A John Wiley& Sons Inc Publishing Company; 1996: 199-217.
58. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immun* 2007; 96: 41-101.
59. Gray PW, Goeddel DV. Structure of the human immune interferon gene. *Nature* 1982; 298(5877): 859-863.
60. Pravica V., Asderakis A., Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchiso IV. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Europ J Immunogenet* 1999;6: 1-3.
61. Dabora SL, Roberts P, Nieto A, Perez R, Jozwiak S, Franz D, Bissler J, Thiele EA, Sims K, Kwiatkowski DJ. Association between a high-expressing interferon-gamma allele and a lower frequency of kidney angiomyolipomas in TSC2 patients. *Am J Hum Genet* 2002; 71(4): 750-758.
62. Dufour C, Capasso M, Svahn J, Marrone A, Haupt R, Bacigalupo A, et al. Homozygosis for (12) CA repeats in the first intron of the human IFN-gamma gene is significantly associated with the risk of aplastic anaemia in Caucasian population. *Br J Haematol* 2004; 126(5): 682-685.
63. Bream JH, Carrington M, O'Toole S, Dean M, Gerrard B, Shin HD, et al. Polymorphisms of the human IFNG gene noncoding regions. *Immunogenetics*. 2000; 51(1): 50-58.
64. Pacheco AG, Cardoso CC, Moraes MO. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Hum Genet* 2008; 123(5): 477-484.
65. An P, Vlahov D, Margolick JB, Phair J, O'Brien TR, Lautenberger J, et al. A tumor necrosis factor-alpha-inducible promoter variant of interferon-gamma accelerates CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *J Infect Dis*. 2003;188(2): 228-231.
66. Huang Y, Yang H, Borg BB, Su X, Rhodes SL, Yang K, et al. A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon-alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104(3): 985-990.
67. Branca AA, Baglioni C. Evidence that types I and II interferons have different receptors. *Nature*. 1981; 294(5843): 768-770.
68. Jouanguy E, Dupuis S, Pallier A, Döffinger R, Fondanèche MC, Fieschi C, et al. In a novel form of IFN-gamma receptor 1 deficiency, cell surface receptors fail to bind IFN-gamma. *J Clin Invest* 2000; 105(10): 1429-1436.
69. Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Lammas D, Dorman SE, Fondanèche MC, Dupuis S, et al. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with

- dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat Genet* 1999; 21(4): 370-378.
70. Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Altare F, Fondaneche MC, Tuerlinckx D, Blanche S, et al. Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette-Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *J Clin Invest* 1997; 100: 2658-2664.
  71. De Silvestri A, Pasi A, Martinetti M, Belloni C, Tinelli C, Rondini G, et al. Family study of non-responsiveness to hepatitis B vaccine confirms the importance of HLA class III C4A locus. *Genes Immun* 2001; 2(7): 367-372.
  72. Höhler T, Meyer CU, Notghi A, Stradmann-Bellinghausen B, Schneider PM, Starke R, et al. The influence of major histocompatibility complex class II genes and T-cell beta repertoire on response to immunization with HBsAg. *Hum Immunol* 1998; 59(4) :212-218.
  73. Alper C, Kruskall M, Marcus-Bagley D, Craven DE, Katz AJ, Brink SJ, et al. Genetic prediction of nonresponse to hepatitis B vaccine. *N Engl J Med* 1989; 321: 708–712.
  74. Hu ZY, He P, Zhang R, Fang X, Zhu FC, Qiu SH, et al. Cellular immune responses of recombinant hepatitis B (rHB) vaccine and HBsAG derived from *Hansenula polymorpha* cells]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2008; 29(7): 706-711.(Abstract)
  75. Velu V, Saravanan S, Nandakumar S, Shankar EM, Vengatesan A, Jadhav SS, et al. Relationship between T-lymphocyte cytokine levels and sero-response to hepatitis B vaccines. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(22): 3534-3540.
  76. Vingerhoets J, Vanham G, Kestens L, Penne G, Leroux-Roels G, Gigase P. Deficient T-cell responses in non-responders to hepatitis B vaccination: absence of TH1 cytokine production. *Immunol Lett* 1994 ;39(2):163-168.
  77. Yucesoy B, Sleijffers A, Kashon M, Garssen J, de Gruijl FR, Boland GJ, et al. IL-1beta gene polymorphisms influence hepatitis B vaccination. *Vaccine*. 2002; 20(25-26): 3193-3196.
  78. Macedo LC, Isolani AP, Visentainer JE, Moliterno RA. Association of cytokine genetic polymorphisms with the humoral immune response to recombinant vaccine against HBV in infants. *J Med Virol*. 2010; 82(6): 929-933.
  79. Hennig BJ, Fielding K, Broxholme J, Diatta M, Mendy M, Moore C, et al. Host genetic factors and vaccine-induced immunity to hepatitis B virus infection. *PLoS One* 2008; 3(3): e1898.
  80. Billiau A. Interferon-gamma in autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7(1): 25-34.

81. Zhou J, Chen DQ, Poon VK, Zeng Y, Ng F, Lu L, et al. A regulatory polymorphism in interferon-gamma receptor 1 promoter is associated with the susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *Immunogenetics*. 2009; 61(6): 423-430.

## TÜRKÇE ÖZET

### Hepatit B Aşı Yanıtsızlığında İnterferon Gama ve İnterferon Gama Reseptör 1 Gen Polimorfizmleri

#### ÖZET

**Giriş ve Amaç:** Patojenin tanınması, antijen işlenmesi ve sunumu, lenfositlerin maturasyonunda görevli genlerdeki varyasyonlar, hepatit B aşısına karşı gelişen koruyucu yanıt üzerinde etkili olabilir. Bu çalışmada, interferon gamma (IFNG) +874 ve IFNGR1 (CA)n tekrar polimorfizmlerinin hepatit B aşısına yanıtsız çocuklarda araştırılması ve bu gen polimorfizmlerinin aşı yanıtı üzerinde etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Yaş ortalaması  $9,2\pm1,6$  yıl olan, toplam 200 çocuk (109 erkek, 92 kız) çalışmaya alındı. Standart doz hepatit B aşılması uygulanan ve sonrasında bakılan anti-HBs antikor düzeyi  $<10$  mIU/mL olan 100 çocuk aşıya yanıtsız gruba alındı. Standart doz aşılama sonrasında anti-HBs antikor düzeyi  $>10$  mIU/mL olan 100 çocuk ise aşıya yanıtı gruba dahil edildi. Bu polimorfizmlerin sıklığı amplifikasyon refrakter mutasyon sistem-polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleriyle araştırıldı.

**Bulgular:** IFNG (+874 T/A) polimorfizmi için TT genotip sıklığı aşıya yanıtsız grupta anlamlı olarak yüksekti ( $p=0,003$ ). IFNGR1 geni intronik (CA)n mikrosatellit polimorfizmi allel 170 ve 182'nin sıklığı hepatit gruba göre anlamlı olarak yüksek saptandı (Tümünde;  $p<0.05$ ).

**Sonuç:** IFNG (+874 T/A) genindeki TT genotipi ile IFNGR1 geni intronik (CA)n mikrosatellit polimorfizmindeki allel 170 ve 182, hepatit B aşı yanıtsızlığı ile ilişkili olabilir.

**Anahtar kelimeler:** Sitokinler, gen, hepatit B, aşı, yanıtsız.

## İNGİLİZCE ÖZET

### Interferon Gamma and Interferon Gamma-1 Gene Polymorphisms in Non-responders to Hepatitis B Vaccination

#### ABSTRACT

**Objective and Aim:** The variations of genes involved in processes such as pathogen recognition, antigen processing and presentation, and maturation of lymphocytes may affect the develop of protective immune response to the hepatitis B vaccine. The aim of the study were to investigate the +874 T/A polymorpism in the first intron of interferon gamma (IFNG) gene and intronic (CA)<sub>n</sub> polymorphic microsatellite marker of the interferon gamma receptor 1 (IFNGR1) gene in children with non-responders to hepatitis B vaccination, and to determine whether vaccine response is influenced by these gene polymorphisms.

**Material and Method:** A total of 200 children (109 males and 92 females) between 9,2±1,6 years of age were included in this study. One hundred healthy children who had anti-HBs antibody <10 mIU/mL levels after vaccinated against hepatitis B according to a standardized schedule were included in this study as non-responder group. One hundred healthy children who had anti-HBs antibody >10 mIU/mL levels after vaccinated against hepatitis B were included as responder group. These polymorphisms were genotyped by using amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction (ARMS-PCR).

**Results:** The frequency of TT genotype of IFNG (+874 T/A) gene polymorphism was higher in non-responders (p=0,003). The frequencies of allele 170 and 182 for (CA)<sub>n</sub> alleles for the intronic (CA)<sub>n</sub> microsatellite of IFNGR1 gene were significantly higher in non-responders (All of them, p<0,05).

**Conclusion:** The TT genotype of IFNG (+874 T/A) gene, allele 170 and 182 for (CA)<sub>n</sub> alleles for the intronic (CA)<sub>n</sub> microsatellite of IFNGR1 gene may be associated with non-responders to hepatitis B vaccination.

**Keywords:** Cytokines, gene, hepatitis B, vaccine, non-responder.