

## HEPATİT B VİRUS İNFEKSİYONU VE POLİMERİZE İNSAN SERUM ALBUMİNİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

Fügen Çokça\*

Semih Kandilci\*\*

Hepatit B virusu (HBV), 1960'lı yıllarda hepatit B infeksiyonu etkeni olarak tanımlanmasına karşın, virusun biyolojisi ile ilgili detaylı bilgiler ancak son 10 yıl içerisinde ortaya konulabilmiştir (19). HBV'nun karaciğer hücresi içerisine giriş mekanizması da tartışılan konular arasındadır. Moleküler ve genetik düzeyde yapılan çalışmalar, konuya henüz kesin bir açıklama getirmekten uzaktır. Virusun karaciğer hücresi içerisine, insan serum albumini (HSA) aracılıklı girişi konusundaki görüşler ilgi çekmiştir. Konunun değişik yöntemlerle araştırıldığı çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada akut hepatit B ve kronik hepatit B'li hastalarla, hepatit B'ye karşı immun kişilerin serumlarında, polimerize insan serum albumini (pHSA) ile etkileşim pasif hemaglutinasyon yöntemi ile araştırıldı. Sonuçların, serumdaki HBsAg, HBeAg ve Anti HBs pozitiflikleri ve virusun replikasyonu ile ilişkisi tartışıldı.

### MATERYAL VE METOD

**Çalışma grupları :** 14 B tipi akut hepatit, 13 B tipi kronik hepatit, 11 hepatit B ile karşılaşmış immun olan ve 11 hepatit B aşısı yaptırarak immun olan kişinin serumları ile çalışma grupları oluşturuldu. HBV ile hiç karşılaşmamış 15 sağlıklı erişkinin serumu kontrol grubu olarak kullanıldı.

**Albumin polimerizasyonu :** 20mg kristalize HSA (SIGMA), 1,8ml fosfat tampon (PBS) pH 6,4 içerisinde çözüldü. % 2,5'luk glutaraldehit-ten 0,2 ml ilave edilerek oda ısısında 2 saat bekletildi. Reaksiyona girmeyen glutaraldehiti uzaklaştırmak üzere PBS pH 6,4'e karşı 3 saat süreyle dializ edilerek hazırlandı (8).

\* A.Ü. Tıp Fakültesi Klinik Bakteriyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Uz. Dr.

\*\* A.Ü. Tıp Fakültesi Klinik Bakteriyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Prof. Dr.

Geliş Tarihi : Mart 18, 1994

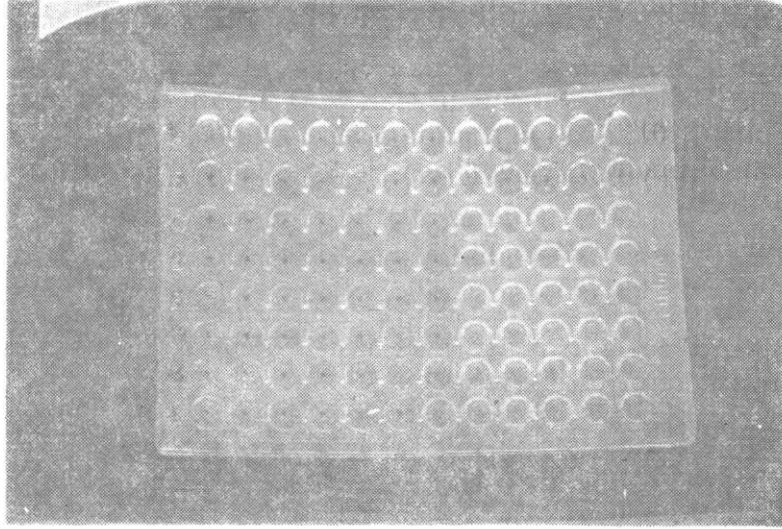
Kabul Tarihi : Ekim 5, 1994

**Duyarlı Eritrositler :** Koyun eritrositleri, PBS pH 7,2 ile 3 kez yıkılarak % 2,5'lük suspansiyonu hazırlandı. Bu suspansiyon eşit miktarlardaki tannik asidin 1/20.000 dilüsyonu ile karıştırılarak 37°C'lık su banyosunda 10 dakika bekletildi. Daha sonra 1500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek ayrılan eritrositler PBS pH 7,2 ile tekrar yıkandı ve PBS pH 6,4'te % 2,5'lük suspansiyonu hazırlandı (3).

**Duyarlanmış eritrositlerin pHSA ile kaplanması :** pHSA, % 2,5'lük eritrosit suspansiyonu ile karıştırılarak oda ısısında 30 dakika süre ile bekletildi. Eritrositler, 1500 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Reaksiyona girmeyen albumini uzaklaştırmak üzere eritrositler iki kez tavşan serumunun 1/150 dilüsyonu ile yıkandı. Bu yolla albuminle kaplanan eritrositlerin tavşan serum diluëntinde (TSD) 1/50 suspansiyonu hazırlanarak pasif hemaglütinasyonda kullanıldı.

Hasta serumları 56°C'da 30 dakika inaktive edildikten sonra TSD'i içerisinde 1/10 dilüsyonları hazırlandı. Serum dilüsyonları, koyun eritrositleri ile 30 dakika bekletilerek adsorpsiyon sağlandı.

Serum dilüsyonları, pozitif ve negatif kontrollerle birlikte mikropleylerde hazırlandı. Pozitif kontrol olarak, HSA ile kaplanmış eritrosit + anti HSA (SIGMA), negatif kontrol olarak, HSA ile kaplanmış eritrosit + TSD kullanıldı. Sonuçların değerlendirilmesi Şekil I'de izlenmektedir.



Şekil 1 : Serum dilüsyonları ve pHSA ile yapılan pasif hemaglütinasyon test sonuçlarının değerlendirilmesi

## BULGULAR

Kontrol grubundaki 15 kişiden yalnızca 3'ünde pHSA ile hemagglütinasyon testinin 1/80 pozitif saptanması nedeniyle, test serumları değerlendirilirken 1/80'in üzerindeki titreler anlamlı kabul edildi.

Hepsi HBsAg (+) olan akut hepatit grubunda, pozitif reaksiyon veren 6 serumdan dört tanesinde HBeAg (+), 2 tanesinde AntiHBe (+)'ti. Sekiz serumda ise sonuç negatifti. Sonuçlar Tablo I'de gösterilmiştir.

Tablo I : Akut B Hepatitli hastaların serumlarında pHSA hemagglütinasyon titreleri

Vaka	HBsAg	HBeAg	Hemagglütinasyon titreleri
1	(+)	(—)	1/1280
2	(+)	(—)	1/640
3	(+)	(+)	1/640
4	(+)	(+)	(—)
5	(+)	(—)	(—)
6	(+)	(+)	(—)
7	(+)	(+)	1/640
8	(+)	(+)	1/320
9	(+)	(—)	(—)
10	(+)	(+)	(—)
11	(+)	(—)	(—)
12	(+)	(+)	1/320
13	(+)	(+)	(—)
14	(+)	(+)	(—)

Kronik hepatit grubunun sonuçları Tablo II'de gösterilmiştir. Hemagglütinasyon titreleri pozitif olarak değerlendirilen 3 kişide de HBeAg (+) idi. Ancak bu gruptaki pozitiflik oranı bir sonuç çıkartmak için yetersiz bulundu.

Tablo III'de hepatit B'ye karşı immün grupların sonuçları verilmiştir. HBV ile karşılaşarak immün olan grupta tek pozitiflik, aşı ile immün grupta ise her ikisi de plazma kaynaklı aşı ile aşılananlarda olmak üzere iki pozitiflik saptanmıştır.

Tablo II : Kronik B Hepatitli hastaların serumlarında pHSA hemaglutinasyon titreleri

Vaka	HBsAg	HbeAg	Hemaglutinasyon	
			Karaciğer biyopsisi	titresi
1	(+)	(+)	Kr. pers. hep	(—)
2	(+)	(—)	Kr. pers. hep	(—)
3	(+)	(+)	Kr. aktif hep.	(—)
4	(+)	(+)	Kr. aktif hep.	(—)
5	(+)	(+)	Kr. aktif hep.	(—)
6	(+)	(—)	Kr. aktif hep.	(—)
7	(+)	(+)	Kr. aktif hep.	1/1280
8	(+)	(+)	Kr. aktif hep.	1/160
9	(+)	(+)	Kr. aktif hep.	(—)
10	(+)	(+)	Kr. aktif hep.	1/160
11	(+)	(+)	Kr. aktif hep.	(—)
12	(+)	(+)	Kr. aktif hep.	(—)
13	(+)	(+)	Kr. aktif hep.	(—)

Kr. pers. hep : Kronik persistan hepatit

Kr. aktif hep : Kronik aktif hepatit

Tablo III : Hepatit B'ye Karşı İmmun Grupların Sonuçları

	Olgu Sayısı	Pasif Hemagl. (+)
		Saptanan Olgular
HBV ile karşılaşarak immün	11	1/11
Aşı ile immün	11	2/11

### TARTIŞMA

1970'li yıllarda glutaraldehitle polimerize edilen albuminin, HBV partiküllerine spesifik olarak bağlandığı gösterildi. Aynı polimerin hepatositlere de bağlanabildiğinin saptanması üzerine, HBV'nun karaciğer hücresi içerisine insan serum albumini aracılıklı girişi hipotezi gündeme geldi. Lenkei ve arkadaşları 1974'te anti albumin antikorlarını tarif ettiler (9). Bunu izleyen yıllarda farklı yöntemler kullanılarak konu ile ilgili araştırmalar yapılmıştır (4,15,21).

HBsAg'i, HBV DNA'sındaki S-ORF (open reading frame) adı verilen genetik bölgenin ürünüdür. S-ORF üzerinde 3 değişik bölge tanımlanır. Bunlar S, Pre S1 ve Pre S2 olarak adlandırılır (1,7). Elektro-

foretik analizler bu 3 genetik bölge tarafından sentezlenen 3 yüzey antijen proteini (S protein, M protein, L protein) bulunduğunu göstermiştir (20). Taşıyıcı kişilerin serumlarından pürifiye edilen HBsAg partikülleri, pHSA ile etkileşim açısından incelendiğinde, M proteini ve L proteini yapısında bulunan ve 55 amino asitten oluşan Pre S2 bölgesinin, pHSA'ı bağlama özelliğinde olduğu ortaya konmuştur (6, 11). Sonuçta HBsAg'nin albumin bağlanması için bir reseptör bölgesi içerebileceği görüşü ağırlık kazanmıştır (5,10).

Çalışmalar, pasif hemaglutinasyonla elde edilen pozitif sonuçların iki nedeni olabileceğini belirtmiştir.

1) Hasta serumlarında mevcut anti albumin antikoru ile etkileşim

2) HBsAg partiküllerin yapısında bulunduğu belirtilen pHSA reseptörleri ile etkileşim

Çalışmamızda pozitif sonuçların esas olarak HBsAg (+) olan akut ve kronik gruplarda saptanması, immun gruplarda anlamlı bir pozitiflik gösterilememesi, sonuçların pHSA reseptöründen ileri gelebileceğini düşündürmüştür. Çeşitli kaynaklarda anti albumin antikoru'nun yalnızca B tipi hepatitte değil, karaciğeri ilgilendiren diğer hastalıklarla da ilişkili olabileceği belirtilmiştir (16). Çalışmamızda kontrol grubu olarak kullanılan serumlarda 1/80 titrede üç pozitiflik bulunması, bu antikora bağlı oluşabilecek reaktivitenin düşük olduğunu düşündürdü.

Magrin ve arkadaşları tarafından, HBsAg'inin yapısında bulunan pHSA reseptörlerinin viral replikasyon döneminde çok daha büyük miktarda bulunduğunu bildirilmiştir (12). Diğer bazı çalışmalar da bu görüşü destekler niteliktedir (13,14,17). Çalışmamızda viral replikasyonu belirlemek üzere esas alınan HBeAg (+)'liği ile elde edilen pozitif sonuçlar arasında net bir ilişki gösterilememiştir. Aşı ile bağışıklanan kişilerde elde edilen az sayıdaki pozitif sonucun da anti albumin antikoru'ndan ileri gelebileceği düşünüldü.

Genel olarak değerlendirildiğinde pozitiflik oranı tüm gruplarda düşük bulunmuştur. Anti albumin antikoru veya albumin reseptör aktivitesi, hastalığın kronikleşmesi ile ilişkili bulunmamıştır. Daha hassas yöntemlerle yapılacak çalışmalarla duyarlılığı artırmak mümkündür.

Bugün aksi net olarak gösterilememiş olmakla birlikte, polimerize albumin hipotezi ile ilgili pek çok soru işareti vardır (2,17,18,19,22). Glutaraldehit ile polimerize HSA'nın vücuttaki normal prosedürlerle üretilmesine dair bir bilgi yoktur. Albumin molekülünün yaşlanma ile bu özelliği kazanabileceği veya pHSA'ye çok benzer bir molekülün bulunabileceği ön görüşleri vardır. In vitro çalışmalarla gösterilen HBV - pHSA - hepatosit etkileşiminin biyolojik bir önemi olup olmadığı da henüz bilinmemektedir. HBV enfeksiyonuna duyarlı hücre kültür sistemlerinin geliştirilmesiyle, tüm bu soruların cevabı açıklık kazanabilecektir (22). Çalışmamızdaki gruplarda anlamlı pozitif sonuç elde edilememiş olmasına karşın, benzeri araştırmalarla ilerideki gelişmelerle birlikte değerlendirildiğinde anlamlı olabileceği fikrini vurgular niteliktedir.

### ÖZET

Hepatit B virusunun (HBV), hepatositler içerisine ne yolla girdiği günümüzde hala net olarak anlaşılamamıştır. HBsAg'inin, polimerize edilmiş insan serum albuminini bağlayabildiğinin gösterilmesi, konuya dikkatleri çekti. Ancak bu bağlanmanın, hastalığın patogenezinde bir rolü olup olmadığı bilinmemektedir. Çalışmamızda akut ve kronik B hepatitli hastalarla, hepatit B'ye karşı bağışık kişilerin serumlarında, hepatit B markırları (HBsAg, HBeAg, AntiHBs) ile insan serum albuminini arasındaki ilişkiyi, pasif hemaglutinasyonla ortaya koymayı amaçladık. Elde edilen pozitif sonuçların daha çok HBsAg (+) olan akut ve kronik hasta gruplarında saptanması, bu reaktivitenin anti albumin antikorlarından çok, HBsAg ile bağlanmasından ileri gelebileceğini düşündürdü. Hastalarda HBeAg pozitifliği ile, pozitif test sonuçları arasında herhangi bir ilişki saptanamadı.

Anahtar Kelimeler : Human serum albumini (HSA), Polimerizasyon, Hepatit B virus.

### SUMMARY

**The relationship between hepatitis B virus infection and polymerized human serum albumin**

The way by which hepatitis B virus (HBV) enters hepatocytes has not yet clearly established. The experiments showing that HBsAg has a binding site for polymerized human serum albumin (pHSA) gained attention. However there is doubt about weather this binding

has got any biological role in the pathogenesis of the disease. In this study we aimed to evaluate the relationship between p<sub>HSA</sub> and hepatitis B viral markers; namely HBsAg, HBeAg, AntiHBs in acute and chronic hepatitis B and hepatitis B immune groups by passive hemagglutination. The positive results were obtained from the sera of the patients with acute and chronic hepatitis B whose HBsAg (+) so we suggested that these reactivities may be related to p<sub>HSA</sub> binding sites of HBsAg rather than anti albumin antibodies. However we couldn't find any correlation between positive test results and HBeAg positivity.

Key Words : Polymerized human serum albumin, Hepatitis B virus.

#### KAYNAKLAR

1. Alberti A Pontisso P Milanesi G : Methods for the study of Pre S proteins of hepatitis B virus and their antibodies *La Ricerca Clin Lab* 18 : 241-256, 1988.
2. Alexander GJM : Immunology of hepatitis B virus infection *Br Med Bull* 46 (2) : 354-367, 1990.
3. Boyden SV : The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera *J Exp Med* 93 : 107-120, 1951.
4. Bozic M Jovicic NM Tosic L et al : The relation between anti albumin antibodies and HBeAg/antiHBe status as a marker of HBV replication *Hepatogastroenterol* 35 : 62-64, 1988.
5. Hansson BG Purcell RH : Sites that bind polymerized albumin on hepatitis B surface antigen particles *Infect Immun* 26 (1) : 125-130, 1979.
6. Krone B Lenz A Heermann KH et al : Interaction between hepatitis B surface proteins and monomeric human serum albumin *Hepatology* 11 (6) : 1050-1056, 1990.
7. Leenders WPJ Glansbeek HL Bruin WCC Yap S : Binding of the major and large HBsAg to human hepatocytes and liver plasma membranes. Putative external and internal receptors for infection and secretions of hepatitis B virus *Hepatology* 12 (1) : 141-147, 1990.
8. Lemieux S Avrameas S Bussard AE : Local hemolysis plaque assay using a new method of coupling antigens on sheep erythrocytes by glutaraldehyde *Immunochem* 11 : 261-269, 1974.

9. Lenkei R Ghetie V : Methods for detection of anti albumin auto antibodies in hepatic diseases *J Immunol Methods* 16 : 23-30, 1977.
10. Machida A Kishimoto S Ohnuma H et al : A hepatitis B surface antigen polypeptide (p31) with the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins *Gastroenterology* 85 : 268-274, 1983.
11. Machida A Kishimoto S Ohnuma H et al : A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the Pre S region of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid bears the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins *Gastroenterology* 86 : 910-918, 1984.
12. Magrin S Craxi A Vinci M : Assessment of HBV replicative status by receptors for polymerized human albumin *Hepatogastroenterol* 33 : 6-8, 1986.
13. Mora I Porres JC Bartolome FJ : Receptors for polymerized human serum albumin and other hepatitis B virus markers during acute hepatitis B *Hepatogastroenterol* 33 : 250-254, 1986.
14. Akamoto H Imai M Usuda S et al : Hemagglutination assay of polypeptide coded by the Pre S region of hepatitis B virus DNA with monoclonal antibody *J Immunol* 134 (2) : 1212-1216, 1985.
15. Onica D Calugaru A Margineanu I et al : Immunochemical characterization of anti albuminantibodies in liver diseases *Clin Immunol Immunopathol* 26 : 223-231, 1983.
16. Onica D Lenkei R Ghetie V : Immunogenicity of glutaraldehyde treated homologous albumin in rabbits *Immunochem* 15 : 687-693, 1978.
17. Pontisso P Alberti A Bortolotti F : Virus associated receptors for polymerized human serum albumin in acute and in chronic hepatitis B virus *Gastroenterology* 84 : 220-226, 1983.
18. Pontisso P Ruvoletto MG Gerlich WH et al : Identification of an attachment site for human liver plasma membranes on hepatitis B virus *Virology* 173 : 522-530, 1989.
19. Pugh JC Bassendine MF : Molecular biology of hepadnavirus replication *Br Med Bull* 46 : 2, 329-353, 1990.
20. Quiroga JA Mora I Carreno V et al : Inhibition of albumin binding to hepatitis B virions by monoclonal antibody to the Pre S2 domain of the viral envelope *Digestion* 38 : 212-220, 1987.
21. Sansonno DE Tomaso P Papanica MA et al : An enzyme linked immunosorbent assay for the detection of autoantibodies to albumin *J Immunol Methods* 90 : 131-136, 1986.
22. Wright TL Ganem D : The polyalbumin hypothesis *Gastroenterology* 96 : 250-254, 1989.