



## Kronik Hepatit B'nin Aşı veya Aşı-Antikor Kompleksi ile Yüklü pDC ve mDC'ler ile Tedavi Edilmesi

Treatment of Chronic Hepatitis B with Vaccine or Vaccine-Antibody Complex Loaded pDC and mDC

İbrahim HATİPOĞLU<sup>1</sup>, Duygu ERCAN<sup>1</sup>, Soner AKSU<sup>1</sup>, İbrahim SÖĞÜT<sup>2</sup>, Şakir SEKMEN<sup>1</sup>, Gazi TURGUT<sup>1</sup>, Deniz DURALI<sup>1</sup>, Aynur BAŞALP<sup>1</sup>

<sup>1</sup>TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Kocaeli, Türkiye

<sup>2</sup>Istanbul Bilim Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İstanbul, Türkiye

### ÖZET

**Amaç:** Yapılan bu çalışmada, aşı veya aşı-antikor kompleksi ile yüklenmiş plazmasitoid dentritik hücre (pDC) ve klasik/miyeloid dentritik hücrelerinin (cDC/mDC) birbirlerine olan sinerjik etkilerinden yararlanarak kronik hepatit B tedavisinde alternatif dentritik hücre (DC) aşısı geliştirilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntemler:** HBV transgenik (HBV-tg) farelerin kemik iliği hücreleri, in vitro ortamda, flt-3L varlığında pDC ve mDC'lere farklılaştırılarak aşı veya aşı-antikor kompleksi ile yüklendikten sonra, HBV-tg fareler, iki hafta ara ile iki kez intraperitoneal olarak immünize edildi. ELISA yöntemi ile anti-HBsAg yanıtı, RT-qPCR ile plazmadaki HBV DNA'sındaki azalma incelendi.

**Bulgular:** Sekizinci günde yapılan akım sitometri analizinde hücrelerin %65 oranında mDC ve %35 oranında pDC'ye farklılaştığı tespit edildi. DC aşılama sonucunda HBV-tg farelerde anti-HBsAg yanıt oluşmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. Ayrıca plazmadaki virüs DNA'sında azalma olmadığı belirlendi.

**Sonuç:** Fare kemik iliği hücrelerinden pDC ve mDC elde edilmesine rağmen aşı veya aşı-antikor kompleksinin DC arasındaki sinerjik etkiyi engellediği düşünülmektedir. (*Viral Hepatitis Dergisi* 2013; 19(1): 27-31)

**Anahtar Kelimeler:** Dentritik hücre aşısı, kronik hepatit B, Hepatit B aşısı, aşı-antikor kompleksi

### ABSTRACT

**Objective:** In this study, we aimed to develop new alternative dendritic cell (DC) vaccine by using synergic effect of between vaccine or vaccine-antibody loaded plasmacytoid dendritic cell (pDC) and conventional DC/myeloid DC (cDC/mDC) to treat chronic hepatitis B.

**Materials and Methods:** pDCs and mDCs derived from bone marrow of chronic hepatitis B model (HBV-tg) mice in the presence of flt-3L in in vitro and loaded with vaccine or vaccine-antibody complex and then HBV-tg mice were immunized intraperitoneally two times at two weeks intervals. Anti-HBsAg response was detected by ELISA, decrease of HBV DNA was investigated by RT-qPCR.

**Results:** At day 8, flow cytometry analyses have shown that the frequency of mDCs was about 65% and pDC was about 35%. Anti-HBsAg response was induced in HBV-tg mice but it was not significant statistically and we did not detected decrease of HBV DNA in plasma.

**Conclusion:** Even though pDC and mDC were derived from bone marrows, vaccine or vaccine-antibody complex may protect synergic effect between DCs. (*Viral Hepatitis Journal* 2013; 19(1): 27-31)

**Key words:** Dendritic cell vaccine, chronic hepatitis B; hepatitis B vaccine, vaccine-antibody complex

### Giriş

Dünya genelinde yaygın bir sağlık problemi olan Hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonu, akut, fulminant ve kronik hepatite yol açmakla birlikte ayrıca karaciğer sirozu ve

karaciğer kanserine de neden olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre dünyada 2 milyar kişi HBV ile enfekte ve 350 milyon kişi kronik HBV hastasıdır. HBV enfeksiyonu ve onunla bağlantılı hastalıklardan dünyada yılda yaklaşık 600.000 kişi ölmektedir (1,2). Virüse karşı

oluşan zayıf antiviral immün yanıt HBV enfeksiyonun kronikleşmesindeki en büyük etkidir (3).

Günümüzde kronik HBV tedavisinde, tip-I interferonlar ve nükleotit/nükleozid analogları kullanılmaktadır. Tedavinin başarı yüzdesinin düşük ve pahalı olması nedeniyle kronik HBV tedavisinde yeni yöntemlere ihtiyaç vardır (4-6). Dentritik hücre (DC) aşıları alternatif güncel yaklaşımlardan birisidir. DC'ler, makrofajlar ve B lenfositlerle birlikte profesyonel antijen sunucu hücrelerdir (7). DC'ler diğer antijen sunucu hücrelere göre 10-100 kat daha fazla naif ve hafıza T hücrelerini uyarma yeteneğine sahiptir (8). B hücrelerini uyarma ve salgıladığı antikor alt tipinin farklılaşmasını etkileme özelliği de bulunmaktadır (9). Doğuştan immün sistemin hücrelerinden olan DC'ler birçok dokuda (dalak, deri, kan, karaciğer, akciğer, böbrek, beyin, testis vb.) ve dokular arası alanda bulunur. DC genel olarak köken aldıkları hücre kaynağına ve yüzey antijenlerine göre plazmasitoid dentrik hücre (pDC) ve klasik/miyeloid (cDC/mDC) cDC olmak üzere ikiye ayrılır. pDC'ler (CD11c<sup>int</sup>CD11b<sup>-</sup>B220<sup>+</sup>) hücre yüzey reseptörlerini taşırlar. pDC'ler virüs tip-I interferonları üretirler (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  ve IFN- $\omega$ ). IFN- $\alpha$ 'yı diğer hücrelere göre 100-1000 kat arasında daha fazla üretme özelliğine sahiptirler ve virüse özgül T hücre yanıtının oluşmasında etkili olan cDC'yi aktive ederler. cDC hücreler (CD11c<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>) yüzey reseptörlerini taşırlar. cDC'ler hemen hemen tüm Toll benzeri reseptör (TLR)'leri sentezlerler, T hücre cevabında T hücrelerine antijen sunma özelliği etkilidir ve pDC'lere göre çapraz sunum özelliği daha fazladır (10,11).

Kronik HBV hastalarında doğal ve kazanılmış immün yanıtın düzenlenmesinde rol oynayan antijen sunucu hücrelerden DC'lerin antijen sunumunda problem olduğu belirtilmiştir (12). İleri düzey fibrozis ve siroz olan kronik HBV hastalarının kanında DC sayısında sağlıklı bireylere göre düşüş olduğu tespit edilmiştir. Dolaşımdaki DC sayısı HBV genotipinden, HBeAg varlığından ve bulaşma yolundan etkilenebilir. mDC/cDC'lerin kronik HBV hastalarında eş uyarınlarının sentezi azalmış veya hiç üretilmemektedir. Fakat B7-H1 inhibitörünün sentezi ise artmaktadır (13-16). 2009 yılında Yuan ve ark. yaptıkları çalışmada HBsAg'nin pDC'lerin IFN- $\alpha$  sentezini TLR-9'ü inhibe ederek engellediği belirtilmiştir (17). Kronik HBV hastalarından elde edilen MDCC (monositten türetilmiş dentritik hücre)'lerin T yardımcı hücreleri (Th) uyarma etkisinde değişiklik olmadığı tespit edilmiştir (18).

Daha önce yaptığımız çalışmalarda mDC'ler 125  $\mu$ l HBV aşısı ile yüklendiklerinde HBV-tg farelerde humoral yanıtın oluştuğu fakat T hücre yanıtının oluşmadığı belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada aşı veya aşı-antikor kompleksi ile yüklenmiş her iki DC alt tipinin sinerjik etkileşimlerinden yararlanarak, kronik HBV tedavisinde kullanılmak üzere alternatif DC aşı geliştirilmesi planlanmıştır. Ayrıca aşı-antikor kompleksi kullanarak Fc reseptör aracılığı ile fagositoz sayesinde aşının hücre içine alınımını hızlandırılması da hedeflenmiştir. Bu amaçla, HBV transgenik (HBV-tg) farelerin kemik iliği hücreleri in vitro

ortamda pDC ve mDC'lere farklılaştırılarak aynı in vitro ortamda aşı veya aşı-antikor kompleksi ile yüklenerek HBV-tg farelere immünize edildi.

## Gereç ve Yöntem

### Deney Fareleri

Deneylerde kullanılan HBV-tg fareler GMBE-Hayvan Genetiği ve Üreme Biyolojisi Laboratuvarında üretilmiş ve önceden tanımlanmıştır (19). Bu fareler model olarak HBV kronik taşıyıcı özelliklerini göstermektedir. HBV-tg fareler, (C57BL/6JXBALB/c) CB6F1 hibrid fare embriyolarına tüm HBV genomunu içeren pT-HB1.3 plazmidinden kesilerek çıkarılmış HindIII-SacI fragmentinin mikroenjeksiyon yoluyla aktarılması sonucunda edilmiştir. Transgenik farelerde HBV DNA'sı fare genomuna stabil olarak entegre olup, serumda viral DNA tespit edilmiştir. Bu bulgu transgenik farelerde virüs replikasyonu olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmada Guide for the Care and Use of Laboratory Animals ([www.nap.edu/catalog/5140.html](http://www.nap.edu/catalog/5140.html)) prensipleri doğrultusunda gerçekleştirilmiş olup hayvan hakları korunmuş ve çalışmalarda hayvan haklarına uygun bir şekilde davranılmıştır. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalar için TÜBİTAK MAM GMBE Hayvan Etik kurulundan Etik Kurul belgesi alınmıştır.

### Kemik İliği Hücrelerinin pDC ve mDC'ye Farklılaştırılması

DC'lerin elde edilmesinde Yamano ve ark. (20) uyguladığı protokol takip edildi. Kısaca, 6-8 haftalık HBV-tg farelere servikal dislokasyonla ötenazi uygulandıktan sonra her iki femur çıkartılıp kas dokudan temizlendikten sonra 2-5 dk %70 alkolde inkübe edilerek dezenfeksiyon sağlandı. Femurlarda bulunan kemik iliği hücreleri PBS kullanılarak elde edildi. Daha sonra 1250 $\times$ rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra 0,168M amonyum klorid çözeltisi ile oda sıcaklığında 1 dk inkübe edilerek kırmızı kan hücreleri ortamdaki uzaklaştırıldı. Kemik iliği hücreleri 1250 $\times$ rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra 200 ng/ml flt-3L (Invitrogen, ABD), %10 FBS, 1mM/L sodyum pürivat, 2,5 mM/L HEPES (pH 7,4), MEM vitamin, 55 mol/L 2-ME, 1000 U/ml penisilin, 1000  $\mu$ g/ml streptomisin, 0,3 mg/ml L-glutamin, essential ve non-essential amino asitleri içeren RPMI1640 ile %5 CO<sub>2</sub> ortamında 37<sup>o</sup> C' de inkübe edildi.

Her 3 günde bir besi yerinin 2/3'ü değiştirildi ve 8. günde hücreler pipetlenerek süspanse edildi ve hafif tutunan hücreler petriden toplandı. Hücreler iki kez PBS ile yıkandıktan sonra 24 kuyucuklu plak kuyularına 1.2 $\times$ 10<sup>6</sup>/kuyu konsantrasyonda ekildi. Dokuzuncu gün kuyulara 125  $\mu$ l aşı (5  $\mu$ g HBsAg) veya aşı-antikor kompleksi eklenerek 5 saat süre ile DC'lerin yüklenmesi sağlandı. Yüklenmemiş DC'ler ve 5  $\mu$ g anti-HBsAg ile yüklü DC'ler kontrol grubu olarak kullanıldı. Ayrıca besiyerine hücrelerin uyarılması için 2  $\mu$ g/ml CpG1826, 100 ng/ml LPS eklenerek hücreler %5 CO<sub>2</sub>, 37<sup>o</sup>C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler süspanse hale getirildi ve iki kez PBS ile yıkandıktan sonra HBV-tg fareler (n=4) 100  $\mu$ l PBS içerisinde 5 $\times$ 10<sup>5</sup> DC karışımı ile

intraperitoneal olarak iki hafta ara ile iki kez immünize edildi.

#### Akım Sitometri Analizi

Hücreler 8. günde PBS ile yıkandıktan sonra, pDC ve mDC oranının tespit için anti-CD11c PE, anti-B220 PerCP, anti-CD11b FITC antikorları ve izotipleri ile işaretlendi. İşaretleme sonrası hücreler 20 dk, +4 °C' de inkübe edildi, PBS ile yıkandı ve FACScan cihazında analiz edildi.

#### Aşı-Antikor Kompleksi Oluşumu

Aşı- Antikor (Aşı-MAb) kompleksi oluşturmak için ticari olarak satılan ve 20 µg / 0,5 ml HBsAg içeren ticari GenHevac (Pasteur, Fransa) aşısı ile anti-HBsAg (IgG2b) monoklonal antikor 2:1 oranında bir araya getirildi ve oda sıcaklığında gece boyunca PBS içerisinde inkübe edildi.

#### Plazma Eldesi

Fare kuyruklarından alınan 15 µl kan, 15 µl sodyum sitrat'lı tüplere konularak 3000xg'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant alınarak -20°C'de saklandı.

#### Plazmada Antikor Yanıtın Tespiti

ELISA plaka kuyuları 40 ng HBsAg ile kaplanarak +4°C'de bir gece inkübe edildi. Inkübasyon sonunda kuyular yıkama solüsyonu (%0,05 tween 20 içeren PBS) ile 3 kez yıkandı. Bir sonraki aşamada kuyucuklar BSA ya da süt tozu ile bloklanmak üzere 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Bloklama sonrasında kuyulara 5 µl HBV-tg plazması eklendi, 37°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve her kuyuya 1:1000 oranında seyreltilmiş 100µl alkalın fosfataz işaretli polivalent antikor eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında plaka 4-5 kez yıkanarak her kuyuya 100µl pNPP (nitro fenil fosfat) ilave edildi ve ELISA okuyucuda 405 nm'de 60 dk. absorpsiyon değeri ölçüldü.

#### Plazmada HBV DNA Tespiti

Immünizasyonlar sonucu HBV-tg fare serumlarındaki HBV DNA'sındaki değişim gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPZR) yöntemiyle belirlendi. Farelere servikal dislokasyon ile ötanazi uygulandıktan sonra, kalp ventriküllerinden fare kanı toplanarak eşit miktarda sodyum sitrat içeren tüplere konuldu. Kandan DNA izolasyonu, ticari Purelink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, ABD) ve önerilen protokol kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen DNA örnekleri -20°C'de muhafaza edildi. RT-qPZR reaksiyonu için kullanılan primer1 (MD013) 5'-TTAGGGTTAAATGTATACCC-3' ve primer 2 (E3): 5'-CATCTTCTTGGTTCTTCTG-3' baz dizisine sahip olup beklenen PZR ürün uzunluğu 415 bazdır. Aranılan büyüklükte (415 baz) DNA fragmenti çoğaltımı sağlanan örnekler pozitif olarak değerlendirilirken çoğalma gözlenmeyen örnekler ise negatif olarak belirlendi. PZR için Tablo 1'de belirtilen program uygulandı.

#### İstatistiksel Analiz

Deney sonuçları, Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) istatistik programında tek yönlü ANOVA testlerinden Tukey kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildiği değerler p< 0,05.

## Bulgular

#### pDC ve mDC'lerin Farklılaşmasının Tespiti

Yapılan bu çalışmada HBV-tg fare kemik iliği hücrelerini

pDC ve mDC'lere farklılaştırarak aşı veya aşı-antikor kompleksi ile yüklendiğinde HBV-tg farelerde oluşan terapötik etkinin belirlenmesi planlandı. HBV-tg fare kemik iliği hücrelerini iki farklı DC alt tipine farklılaştırma çalışmalarının 8. gününde hücreler süspansiyon haline getirilerek uygun CD11b, CD11c ve B220 reseptörlerine ait antikorlar ve izotipleri ile işaretlenerek farklılaşma oranları belirlendi. Yapılan çalışmada canlı hücrelerin yaklaşık olarak %65'nin mDC'ye ve %35'inin ise pDC'ye farklılaştığı tespit edildi (Şekil 1).

#### pDC ve mDC Immünizasyonları Sonucu Oluşan Humoral Yanıt

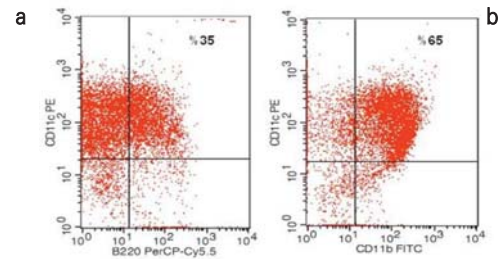
HBV-tg farelerde terapötik etki oluşturma için pDC ve mDC'ler 125 µl aşı, aşı-antikor kompleksi ile yüklendi veya kontrol grubu olarak antikor ile yüklü veya yüksüz 5x10<sup>5</sup> DC karışımı HBV-tg (n=4) farelere intraperitoneal olarak immünize edildi. İkinci immünizasyondan bir hafta sonra farelerin plazmalarında oluşan Anti-HBsAg ile incelendi. Elde edilen sonuçlarda farelerde Anti-HBsAg yanıtın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında arttığı fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi (Şekil 2).

#### DC Immünizasyonları Sonucu Plazmada Virüs DNA'sındaki Değişim

HBV-tg farelerin serumlarında HBV DNA'sı bulunduğu daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada HBV-tg farelerde terapötik bir etki oluştuğunda plazmadaki virüs DNA'sında azalma olması beklenmektedir. Terapötik etkinin tespiti için ikinci immünizasyondan iki hafta sonra plazmadan izole edilen total DNA'da virüse ait DNA miktarı RT-qPZR reaksiyonu ile belirlendi. Elde ettiğimiz sonuçlarda, tüm grupların plazmalarındaki virüs DNA miktarlarında bir farklılık tespit edilemedi (Şekil 3).

Tablo 1. PZR termal protokolü

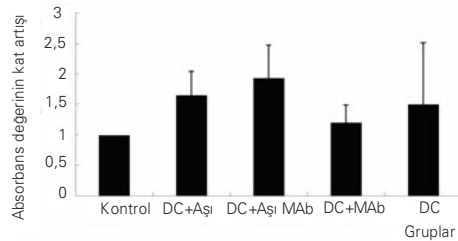
Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	94°C	5 dk	1
Denatürasyon	94°C	20 sn	40
Bağlanma	55°C	1 dk	
Uzama	72°C	1 dk	
Son Uzama	72°C	10 dk	1
Sonlandırma	4°C	∞	--



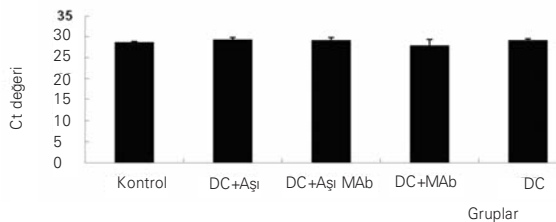
Şekil 1. Kemik iliği hücrelerinin fit-3L kullanılarak mDC ve pDC'ye farklılaşmasının tespiti için yapılan akım sitometri analizinin sonuçları a) farklılaşan hücrelerde pDC hücre oranı, b) farklılaşan hücrelerde mDC hücre oranı

## Tartışma

DC aşıları ile kronik HBV hastalığının tedavisine yönelik yapılan çalışmalarda, 2010 yılında Yan ve ark. 380 kronik HBV hastasının periferik kanından elde ettikleri mononükleer hücreleri GM-CSF ve IL-4 ile muamele ederek otolog DC'ler elde etmişlerdir. Daha sonra yine in vitro ortamda Hepatit B kor antijene (HBcAg) ait 18-27 amino asit (aa) ve HBVpre-S 244-53 aa arası epitopik bölge ile 12 saat inkübe ettikten sonra DC'leri hastalara geri verdiklerinde, hastaların kanlarında HBsAg ve HBV DNA miktarlarında azalma tespit edilmiştir (21). 2007 yılında Wang ve ark. yaptıkları çalışmada ise flt-3L kodlayan plazmid DNA farelere immünize edilmiş ve 10 gün sonra fare kemik iliğinden pDC ve cDC'ler izole edilmiştir. Daha sonra CpG ile aktive edilmiş pDC ile mDC 1:1 oranında bir araya getirilip uygun peptitle yüklenip farelere immünize edildiğinde, farelerde etkin sitotoksik T hücre yanıtı tespit edilmiştir (22). 2008 yılında yapılan çalışmada ise 12 kronik hepatit B hastasının periferik kanından pDC'ler ve MDDC izole edilmiştir. CpG ile aktive edilmiş pDC'ler ve MDDC'ler birlikte kültüre edildiklerinde HBcAg ile yüklenmiş MDDC'lerin eş uyaran sentezinin arttığı ve HBV'ye özgü CD8+ T hücre yanıtının arttığı tespit edilmiştir (23). Ayrıca, HBsAg-Anti-HBsAg kompleksi ile immünize edilen farelerde sadece HBsAg veya Anti-HBsAg ile immünize fareler göre daha etkili bir Anti-HBsAg yanıtın ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Bu sonucun nedeni olarak,



**Şekil 2.** pDC ve mDC karışımı Aşı, Aşı-MAb, Mab ile yüklü veya yüksüz olarak, ikinci immünizasyondan bir hafta sonra HBV-tg fare plazmasında oluşan anti-HBsAg yanıtı, Kontrol: DC immünizasyonu yapılmayan grup, DC+Aşı: Aşı ile yüklenmiş DC karışımı, DC+Aşı-MAb: Aşı-MAb kompleksi ile yüklenmiş DC karışımı, DC+MAB: Antikor ile yüklenmiş DC karışımı, DC: Yüksüz DC karışımı



**Şekil 3.** İkinci immünizasyondan iki hafta sonra fare plazmasındaki HBV DNA'sı değişiminin tespiti için yapılan RT-qPCR sonucu. Kontrol: DC immünizasyonu yapılmayan grup, DC+Aşı: Aşı ile yüklenmiş DC karışımı, DC+Aşı-Mab: Aşı-Mab kompleksi ile yüklenmiş DC karışımı, DC+MAB: Antikor ile yüklenmiş DC karışımı, DC: Yüksüz DC karışımı

kompleksinin yapısında bulunan antikorun Fc kısmının antijen sunucu hücrelerin yüzeyinde bulunan Fc reseptörlerine bağlanması ve bu bağlanma ile kompleksin antijen sunucu hücreler tarafından hücre içine alınmasının artırdığı düşünülmektedir (24).

Yapılan bu çalışmada DC alt tiplerinden pDC ve mDC'lerin aynı ortamda aşı, aşı-antikor kompleksi, antikor ile yüklü veya yüksüz olarak HBV-tg farelerdeki terapötik etkisi incelendi. Daha önce yaptığımız çalışmada mDC'lerin 125 µl HBV aşısı ile yüklendiğinde HBV-tg farelerde humoral yanıt oluşturduğunu ancak hücre immün yanıt üzerine etkili olmadığı belirlendi. Ayrıca Akbar ve ark (25), HBV aşısı ile aşılanan ancak koruyucu anti-HBsAg yanıt oluşturmayan sağlıklı bireylerin periferik kanlarından izole ettikleri DC'leri HBV aşısı ile yükledikten sonra tekrar aynı bireye geri verdiklerinde, anti-HBsAg yanıt oluşturduğunu gösterdiler. Bizim tarafımızdan yapılan bu çalışmada aşı veya aşı-antikor kompleksi ile yüklenen mDC ve pDC komplekslerinin, HBV-tg farelerde Anti-HBsAg yanıtı oluşturmalarına rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ve plazmada HBV DNA'sında herhangi bir azalma tespit edilmedi.

Yapılan bu DC aşı çalışmasında etkin immün yanıt oluşmamasının nedenlerinden birinin Flach ve ark. (26) yaptıkları çalışmada belirttikleri üzere alüminyum adjuvanların DC membranlarında kırılmaları yol açmasının olabileceği düşünülmektedir. HBV aşısında kullanılan alüminyum adjuvan DC'lerin hücre membranlarında kırılmaları neden olarak pDC ve mDC'ler arasındaki sinerjik etkileşimi engellemiş olabilir. DC aşı çalışmalarında optimum bir protokolün olmaması diğer neden olabilir. DC aşılarında kullanılan immünizasyon yöntemi, immünizasyon sayısı, immünize edilen DC sayısı, adjuvan ve yükleme yönteminin elde edilen immün yanıtı etkileyebileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak bu proje kapsamında yapılan çalışmada, pDC ve mDC aynı ortamda ticari aşı, aşı-antikor kompleksi, antikor ile yüklü veya yüksüz olarak HBV-tg farelere immünize edildiğinde terapötik etki gözlenemedi. Ancak yapılan bu çalışmanın ülkemizde yapılmaya başlanan DC hücre aşı geliştirme çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

### Dipnot

Bu çalışma TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek programı tarafından desteklenen 110S497 no'lu proje kapsamında yapılmıştır.

### Kaynaklar

1. [http://www.who.int/immunization/topics /WHO\\_ position\\_ paper\\_HepB.pdf](http://www.who.int/immunization/topics /WHO_ position_ paper_HepB.pdf)
2. Tobenson M, Thomas DL. Occult Hepatitis B. Lancet Infect Dis. 2002; 2: 479-86.
3. Stoop JN, Van der Molen RG, Baan CC, Van der Laan LJ, Kuipers EJ, Kusters JG, et al. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. Hepatology. 2005; 41: 771-8.
4. Pol S, Driss F, Carnot F, Michel ML, Nalpas B, Berthelot P, Brechot C. Specific vaccine therapy in chronic hepatitis B infection. Lancet. 1994; 344: 342.

5. Yalcin K, Acar M, Degertekin H. Specific hepatitis B vaccine therapy in inactive HBsAg carriers: a randomized controlled trial. *Infection*. 2003; 31: 221-5.
6. Safadi R, Israeli E, Papo O, Shibolet O, Melhem A, Bloch A, et al. Treatment of chronic hepatitis B virus infection via oral immune regulation toward hepatitis B virus proteins. *Am J Gastroenterol*. 2003; 98: 2505-15.
7. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998; 392: 245-52.
8. Ardavin C, Martínez del Hoyo G, Martín P, Anjuère F, Arias CF, Marín AR, et al. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol*. 2001; 22: 691-700.
9. Wykes M, Pombo A, Jenkins C, MacPherson GG. Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J Immunol*. 1998; 16: 1313-9.
10. Mouries J, Moron G, Schlecht G, Escriou N, Dadaglio G, Leclerc C. Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cell in vivo after TLR activation. *Blood*. 2008; 112: 3713-22.
11. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 621-67.
12. van der Molen RG, Sprengers D, Binda RS, de Jong EC, Niesters HG, Kusters JG, et al. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2004; 40: 938-46.
13. Tavakoli S, Mederacke I, Herzog-Hauff S, Glebe D, Grün S, Strand D, et al. Peripheral blood Dendritic cells are phenotypically and functionally intact in chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Clin Exp Immunol*. 2008; 151: 61-70.
14. Kunitani H, Shimizu Y, Murata H, Higuchi K, Watanabe A. Phenotypic analysis of circulating and intrahepatic dendritic cell subsets in patients with chronic liver diseases. *J Hepatol*. 2002; 36: 734-41.
15. Chen L, Zhang Z, Chen W, Zhang Z, Li Y, Shi M, et al. B7-H1 up-regulation on myeloid dendritic cells significantly suppresses T cell immune function patients with chronic hepatitis B. *J Immunol*. 2007; 178: 6634-41.
16. Woltman AM, Boonstra A, Janssen HLA. Dendritic cells in chronic viral hepatitis B and C: victims or guardians? *Gut*. 2010; 59: 155-25.
17. Xu Y, Hu Y, Shi B, Zhang X, Wang J, Zhang Z. et al. HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol Immunol*. 2009; 46: 2640-46.
18. Tavakoli S, Scwerin W, Rohwer A, Hoffmann S, Weyer S, Weth R. et al. Phenotype and function of monocyte derived dendritic cells in chronic hepatitis B virus infection. *J General Virology*. 2004; 85: 2829-36.
19. Bagis H, Arat S, Mercan HO, Aktoprakligil D, Caner M, Turanlı ET. et al. "Stable transmission and expression of the hepatitis B virus total genome in hybrid transgenic mice until F10 generation. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 2006; 305: 420-27.
20. Yamano T, Watanabe S, Hasegawa H, Suzuki T, Abe R, Tahara H, Nitta T, Ishimaru N, Sprent J, Kishimoto H. Ex vivo-expanded DCs induce donor-specific central and peripheral tolerance and prolong the acceptance of donor skin grafts. *Blood*. 2011; 117: 2640-8.
21. Luo J, Li J, Chen RL, Nie L, Huang J, Liu ZW. et al. Autologous dendritic cell vaccine for chronic hepatitis B carriers: a pilot, open label, clinical trial in human volunteers. *Vaccine*. 2010; 28: 2497-504.
22. Lou Y, Liu C, Kim GJ, Liu YJ, Hwu P, Wang G. Plasmacytoid dendritic cells synergize with myeloid dendritic cells in the induction of antigen-specific antitumor immune response. *J Immunol*. 2007; 178: 1534-41.
23. Chen W, Zhang Z, Sh M, Chen L, Fu J, Sh F. et al. Activated plasmacytoid dendritic cells act synergistically with hepatitis B core antigen-pulsed monocyte-derived dendritic cells in the induction of hepatitis B virus-specific CD8 T-cell response. *Clin Immunol*. 2008; 129: 295-303.
24. Wen YM, Qu D, Zhou SH. Antigen-antibody complex as therapeutic vaccine for viral hepatitis B. *Intern Rev Immunol*. 1999; 18: 251-58.
25. Fazle Akbar SM, Furukawa S, Yoshida O, Hiasa Y, Horiike N, Onji M. Induction of anti-HBs in HB vaccine nonresponders in vivo by hepatitis B surface antigen-pulsed blood dendritic cells. *J Hepatol*. 2007; 47: 60-6.
26. Flach TL, Ng G, Hari A, Desrosiers MD, Zhang P, Ward SM. Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat Med*. 2011; 17: 479-87.