

Enfeksiyöz Nekrotik Hepatitis Aşısının Üretiminde Poli (D, L-Laktik-Ko-Glikolik Asit) (PLGA) Biyopolimerinin Adjuvant Etkisinin Araştırılması*

Zehra Akıncı¹, Hakan Kalender²

¹Sanovel İlaç San. ve Tic. A.Ş., İstanbul, Türkiye

²Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Elazığ, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 22.03.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 17.06.2019

Özet: Bu çalışmada, koyunların enfeksiyöz nekrotik hepatitis hastalığına karşı alüminyum hidroksit ve poli (D, L-Laktik-Ko-Glikolik Asit) (PLGA) adjuvantları kullanılarak üretilen aşılarda oluşturduğu bağışıklık düzeyleri karşılaştırıldı. *Clostridium novyi* tip A kültürünün formol ile inaktivasyonundan sonra, alüminyum hidrokside adsorbe edilmiş ve çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi uygulanarak PLGA (laktid/glikolid oranı: (50/50), moleküler ağırlık: 30.000-60.000 dalton) ile enkapsüle edilmiş antijen içeren iki farklı toksoid aşı hazırlandı. Aşıların oluşturduğu bağışıklık düzeyini belirlemek için 5-6 aylık ve ağırlıkları 400-500 gr olan erkek kobaylar kullanıldı. Her biri 10 kobaydan oluşan 3 grup oluşturuldu. Birinci gruptakilere 21 gün arayla çift doz (2 ml+2ml) alüminyum hidroksitli aşı, ikinci gruptakilere PLGA mikrosferli aşı tek doz (2 ml) ve üçüncü gruptakilere PLGA mikrosferli aşı yarım doz (1ml) derialtı yolla verildi. Birinci gruptaki kobaylardan rapel aşılama, ikinci ve üçüncü gruptaki kobaylardan tek doz aşılama sonrası 15, 30 ve 45'inci günlerde kalpten kan örnekleri alınarak havuzlanmış serum örnekleri elde edildi. Kan serumlarındaki antikor düzeyi fare Toksin Nötralizasyon Test (TNT) ile belirlendi. Tek doz mikrosferli aşı ile çift doz alüminyum hidroksitli aşı uygulamalarından sonraki 30'uncu ve 45'inci günlerde aynı düzeyde antikor (8 IU/ml) saptandı. Ancak 15'inci günde çift doz alüminyum hidroksitli aşının antikor düzeyi 4 IU/ml iken, tek doz PLGA mikrosferli aşının antikor düzeyi 2 IU/ml olarak bulundu. Yarım doz PLGA mikrosferli aşı verilen kobaylarda yeterli düzeyde (antikor titresi < 2.5 IU/ml) bağışıklık elde edilemedi. Sonuç olarak, tek dozlu veteriner aşılarda geliştirilmesi amacıyla farklı polimer tipi ve enkapsulasyon yöntemleri kullanılarak daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Adjuvant, alüminyum hidroksit, aşı, *Clostridium novyi*, PLGA

Investigation of Adjuvant Effect of Poly (D, L-Lactic-Co-Glycolic Acid) (PLGA) Biopolymer in the Vaccine Production Against Infectious Necrotic Hepatitis

Abstract: In this study, immunity levels of the vaccines produced by using aluminum hydroxide and Poly (D, L-Lactic-Co-Glycolic Acid) (PLGA) adjuvants against infectious necrotic hepatitis of sheep were compared in guinea pigs. After the culture of *Clostridium novyi* tip A was inactivated by formaldehyde, the two different toxoid vaccines containing antigen adsorbed onto aluminum hydroxide and encapsulated in PLGA (lactide/glycolide ratio: (50/50), molecular weight: 30.000-60.000 dalton) were prepared. Encapsulation of antigen in PLGA particles was performed by double emulsion solvent evaporation method. Male guinea pigs (400-500 g, 5-6 months old) were used to determine the immune response to vaccination. Animals were divided into 3 groups with 10 in each group. The first group received double dose aluminum hydroxide-adsorbed vaccine (2 ml + 2 ml) with 21 days intervals, the second group received a single PLGA microsphere vaccine (2 ml) and the third group received a half dose PLGA microsphere vaccine (1 ml) subcutaneously. At 15th, 30th and 45th days after booster dose in the first group and a single dose in the other groups, blood samples were taken from the heart and pooled serum samples were obtained. Antibody levels in the pooled serum samples were determined by the mouse Toxin Neutralization Test (TNT). The same antibody level (8 IU/ml) was determined at 30th and 45th days after vaccination with double dose aluminum hydroxide-adsorbed vaccine and a single dose PLGA microsphere vaccine. However, on day 15, the antibody level of the double dose aluminum hydroxide-adsorbed vaccine was 4 IU/ml and the antibody level of the single dose PLGA microsphere vaccine was found to be 2 IU/ml. A half dose of PLGA microsphere vaccine did not produce a sufficient immun response (antibody titer < 2.5 IU/ml). In conclusion, more extensive studies should be done to develop single-dose veterinary vaccines by using different polymer types and encapsulation methods.

Key words: Adjuvant, aluminum hydroxide, vaccine, *Clostridium novyi*, PLGA

* Bu çalışma birinci yazarın yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

Yazışma adresi / Correspondance: Hakan Kalender, Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Elazığ
E-mail: hkalender@firat.edu.tr, hkalender061@gmail.com

Giriş

Aşılar, insan ve hayvanları enfeksiyonlara karşı koruyan biyolojik maddelerdir [34]. İlk aşı 1796 yılında Edward Jenner tarafından çiçek hastalığına karşı uygulanmıştır [29]. Aşılama, enfeksiyon hastalıklardan korunmak için maliyeti en düşük ve etkili yöntemlerden biri olarak kabul edilir [8, 25]. Bir aşı tipik olarak hastalık etkenlerinin ölü ya da hastalık yapma gücü zayıflatılmış formları, mikroorganizmaların toksinleri veya yüzey proteinlerini içermektedir [34]. Konvansiyonel yöntemlerle hazırlanan canlı (atenue), ölü (inaktif) ve toksoid aşılar halen başarılı bir şekilde uygulanmaktadır [5]. Son yıllarda moleküler biyoloji ve immünolojideki gelişmelere paralel olarak DNA aşıları, rekombinant DNA aşıları ve rekombinant subunit aşılar gibi biyoteknolojik aşılar geliştirilmiştir [8]. Canlı aşılar hem hücrel hem de humoral immün yanıtı uyatarak daha güçlü bağışıklık oluştururlar. Ancak bağışıklık sistemi zayıf canlılarda aşı içerisindeki mikroorganizmanın hastalığa yol açması ve apatojen suşun yeniden patojen özellik kazanması dezavantaj oluşturmaktadır [10]. Ölü aşıların hastalığa yol açma riski yoktur fakat canlı aşılar göre daha kısa süreli bir yanıt oluştururlar. Özellikle hücrel bağışıklık daha zayıf şekillenir [26]. Uzun süreli ve yeterli bir bağışıklığın elde edilebilmesi için ölü aşıların adjuvantlarla birlikte verilmesi ve rapel dozların uygulanması gerekir [25].

Adjuvantlar aşı antijenlerinin immunojenik özelliğini artıran maddelerdir [39]. İlk adjuvant 1920 yılında keşfedilmiştir. Daha sonraki yıllarda adjuvant etkisi gösteren birçok madde keşfedilmesine rağmen toksik etkilerinden dolayı aşı ile kullanımını kabul görmemiştir. Alüminyum tuzları, MF59, ASO3, ASO4 ve virozomlar insan aşılarında kullanılan lisanslı adjuvantlardır [26]. Adjuvantlar depo etkisi göstererek antijenlerin yavaş salınımını sağlarlar ve bağışıklığın şekillenmesinde görev alan antijen sunan hücreler, B ve T lenfositlerinin nonspesifik aktivasyonuna yol açarlar [13]. Adjuvantlarla birlikte alınan antijenlerin çoğu dendritik hücreler tarafından lenf nodüllerine taşınır. Dendritik hücreler, makrofajlar ve B lenfositleri gibi antijen sunan hücreler antijeni işler ve büyük doku uyumu kompleks molekülleri içerisinde T hücrelerine sunarlar [39]. Alüminyum tuzları, adjuvant olarak hem insan hem de hayvan aşılarında uzun zaman

dan beri yaygın olarak kullanılmaktadır. Genellikle Th2 hücrelerinin uyarılmalarını sağladıklarından humoral bağışıklığın şekillenmesinde etkindirler [26]. Bu adjuvantlar güvenlidir, ancak nadir de olsa alerjik reaksiyonlar ve granulomların oluşumuna yol açabilirler [39].

Nanopartiküller yaklaşık 40 yıl önce aşıların ve kanser tedavisinde kullanılan ilaçların taşınması amacıyla geliştirilmiştir. Doğal veya sentetik polimerlerle hazırlanan nanopartiküllerin boyutları 10-1000 nm arasında değişmektedir [24]. Polimerler aşı antijenini korur ve depo görevi yaparak antijenin kontrollü salınımını sağlarlar. Polimerik partiküllerin tek doz aşıların ve mukozal aşıların geliştirilmesinde etkili olduğu bildirilmiştir [29]. Klasik adjuvantlarla karşılaştırıldığında toksik olmamaları, biyouyumlu ve biyobozunur olmaları önemli bir avantaj sağlamaktadır. Polimerler hem hücrel hem de humoral bağışıklık yanıtı uyarırlar [35]. PLGA doku mühendisliğinde ve aşıların kontrollü salınımı için en fazla kullanılan ve FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanan bir polimerdir [20]. Son yıllarda insan [16, 17, 21, 28, 32, 33, 36, 43] ve hayvan [37, 38, 40] aşılarının geliştirilmesinde PLGA biyopolimerinin etkinliği üzerinde birçok çalışma yapılmıştır.

Ülkemizde koyun yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplara neden olan enfeksiyöz nekrotik hepatitis hastalığı akut, toksemik ve karaciğer nekrozları ile karakterize, öldürücü bakteriyel bir hastalıktır. Hastalık bazen sığırlarda da görülür. Hastalığın etkeni *Clostridium novyi* tip B'dir. Hastalığın oluşumunda bakterinin ürettiği özellikle alfa toksin önemli bir rol oynamaktadır [3]. Hastalıktan korunmada ülkemizde özel sektör tarafından üretilen veya ithal edilen toksoid aşılar kullanılmaktadır. Ancak yeterli bağışıklık elde etmek için 21 gün arayla aşının ikinci dozunun verilmesi gerekir. Tek doz aşı hayvanları korumamaktadır [22]. Literatür bilgisine göre, insan toksoid aşılarının geliştirilmesinde PLGA kullanılmış olmakla birlikte, bir hayvan aşısı olan enfeksiyöz nekrotik hepatitis toksoid aşısının geliştirilmesinde PLGA'nın etkisi daha önce araştırılmamıştır. Bu çalışmada, enfeksiyöz nekrotik hepatitis hastalığına karşı klasik yöntemlerle üretilen alüminyum hidroksitli aşının çift dozu ile PLGA kullanılarak üretilen aşının tek dozunun etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Bu çalışma için Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'nın 05.10.2016 tarih, 2016/17 sayı ve 160 nolu kararı ile etik kurul onayı alındı.

Bakteri Suşu ve Standart Toksin: Aşı üretiminde kullanılan *C. novyi* tip A (UK) suşu ve Toksin Nötralizasyon Testinde (TNT) kullanılan *C. novyi* tip A alfa (α) standart toksin (L+/20, Dilüsyon Oranı: 1/6) Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden satın alındı.

Deney Hayvanları: Üretilen aşının bağıışıklık gücünü ölçmede kullanılan 5-6 aylık, 400-500 gr ağırlığındaki 30 adet erkek kobay (Guinea pig) ile toksin titresinin belirlenmesi, detoksifikasyon kontrolü ve TNT testinde kullanılan 4 haftalık 18-20 gr ağırlığındaki erkek fareler (Balb/c) Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edildi. Kobaylardan deneme öncesi kan örnekleri alındı ve TNT testi ile kan serumlarında antikor olmadığı belirlendi.

Poli (D, L-Laktik-Ko-Glikolik Asit) (PLGA): Antijenin kapsüllenmesinde PLGA (Sigma, lactide/glycolide: (50/50), MW: 30.000-60.000) biyopolimeri kullanıldı.

Aşı Üretim Çalışmaları: Liyofilize *C. novyi* tip A suşu 1 ml Tarrozi buyyon sıvısı ile sulandırıldı. Bu sulandırmadan 0.5'er ml alınarak daha önce kaynatılıp soğutulmuş iki adet Tarrozi buyyon tüplerine ekim yapıldı ve 37°C'de 24 saat anaerobik ortamda inkubasyona bırakıldı. Tarrozi buyyon kültüründen Gram boyama yapıldı ve besiyerlerine ekimler yapılarak süşun saf olup olmadığı kontrolü edildi. *C. novyi* dışında herhangi bir mikroorganizma üremedi. Saflık kontrolünden sonra Tarrozi buyyon kültürleri, içerisinde bir litre Ardehali besiyeri bulunan şişeye aktarıldı. Bu besiyeri anaerobik gaz paketi içeren anaerobik jar içerisinde kondu ve 37°C'de 72 saat anaerobik ortamda inkubasyona bırakıldı. Fareler (Balb/c) kullanılarak Ardehali besiyerinde üreyen *C. novyi* kültürünün alfa toksin titresini belirlendi ve minimal letal doz (MLD₅₀/ml) değerleri saptandı. İnaktivasyon için kültüre %0.6 oranında formol katıldı ve 10 gün 37°C'de bekletildi. İnaktivasyon işlemi takiben kültürden numune alınarak canlılık ve detoksifikasyon kontrolü yapıldı. Canlılık kontrolü için kıymalı buyyon, Tarrozi

buyyon, nutrient buyyon (LAB068, LAB M) ve nutrient agara (LAB008, LAB M) ekim yapıldı ve besiyerleri 37°C'de 1 hafta inkubasyona bırakıldı. Kültürün detoksifikasyon kontrolü farelerde yapıldı. Daha sonra 1 litrelik kültürün yarısı alüminyum hidroksit ile adjuvantlama için ayrıldı. Diğer yarısı ise PLGA mikrosferlerinin hazırlanması için ayrı bir şişeye aktarıldı.

Alüminyum Hidroksit ile Adjuvantlama: Herhangi bir bakteri ve aktif toksin içermediği belirlenen anakültür ve toksoid karışımına alüminyum hidroksit %20 oranında ve %80'lik fenol solüsyonu %0.32 oranında katıldı. Oda ısısında bekletilen ana kültür ve toksoid karışımı 2 gün süre ile çalkalayıcı (Mipro) ile 50 rpm'de karıştırılarak adjuvanta adsorbe edildi. Sterilite kontrolü için; aerobik bakteriler yönünden kanlı agara, anaerobik bakteriler yönünden kıymalı buyyona, mikoplazmalar yönünden PPLO agara (Difco) ve mantarlar yönünden sabouraud dextrose agara (Difco) ekim yapıldı. Zararsızlık kontrolü için 2 adet kobaya derialtı yolla 0.5 ml aşı verilerek aşılandı ve yan etkiler yönünden gözlem altına alındı. Aşı +4°C'de buzdolabında saklandı [6].

PLGA Mikrosferlerinin Hazırlanması: PLGA mikrosferleri çift emülsiyon çözücü buharlaştırma metoduna göre hazırlandı [17]. Kısaca, 2 ml toksoid içerisine %1.5 oranında trehaloz ve %2 oranında Mg(OH)₂ katıldı. Bunun üzerine metilen klorid içerisinde hazırlanmış %5'lik PLGA solüsyonundan 25 ml ilave edilerek süspanse edildi. Daha sonra 50 W ve 10 saniye süre uygulanarak ultrasonik homojenizatörde (Bandelin) homojenize edildi. Bu emülsiyona %1'lik polivinil alkolden (PVA) 100 ml eklendi ve homojenizatör (Heidolph Silent CrusherS) ile yüksek hızda (30.000 rpm) 10 saniye süreyle karıştırıldı. Bu emülsiyon 125 ml %0.3'lük PVA içerisine boşaltıldı ve 1 saat karıştırıldı. Daha sonra santrifüj işlemi uygulanarak mikrosferler toplandı ve distile su ile yıkandı. Mikrosferler vakumlu desikatörde kurutuldu ve +4 °C'de buzdolabında saklandı. Bir aşı dozu (2 ml) toksoid miktarı (1/4000 MLD₅₀/ml) kullanıldığında yaklaşık 1 gr kurutulmuş mikrosfer elde edildi. Tüm hayvanları aşılayacak miktarda mikrosferler hazırlandı.

Taramalı Elektron Mikroskop ile Mikrosferlerin İncelenmesi: Mikrosferlerin büyüklüğü ve şekli Fırat Üniversitesi Merkez

Laboratuvarı'nda bulunan Zeiss EVO MA10 marka taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelendi.

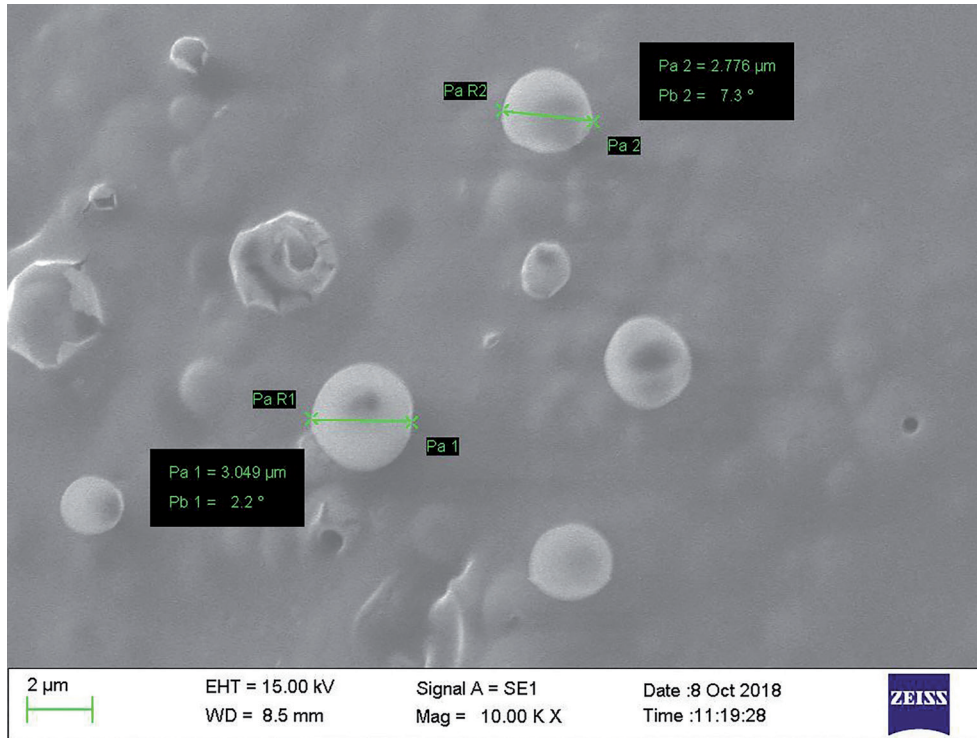
PLGA Mikrosferlerinin İçindeki Antijen Miktarının Belirlenmesi: PLGA mikrosferlerinin içindeki yüklü protein miktarı Lowry metodu ile belirlendi [30].

Bağışıklık Kontrolü: Hayvanları bağışıklamak için, kurutulmuş mikrosferler (15 gr) 30 ml PBS ile sulandırıldı. Alüminyum hidroksit adjuvantlı ve PLGA mikrosferli aşının bağışıklık testleri için her biri 10 kobaydan (5-6 aylık, 400-500 gr) oluşan 3 grup oluşturuldu. Birinci gruptaki kobaylara 21 gün ara ile 2 ml alüminyum hidroksit adjuvantlı aşı deri altı yolla çift doz verildi. İkinci gruptaki kobaylara PLGA mikrosferli aşından 2 ml, üçüncü gruptaki kobaylara PLGA mikrosferli aşından 1 ml deri altı yolla tek doz enjekte edildi. Birinci gruptaki hayvanlardan ikinci aşılama, ikinci ve üçüncü gruptaki hayvanlardan tek doz aşılama 15, 30 ve 45 gün sonra kalpten kan alınarak serumlar elde edildi. Her gruptaki hayvanların serumları havuzlanarak bir tüpte toplandı. Kobay kan serumlarında en az 2.5 IU/ml düzeyinde antitoksinin varlığı farelerde Toksin Nötralizasyon Test (TNT) ile belirlendi [6, 22].

Bulgular

Tarrozi buyyonda üreyen ana tohum suşu kültüründen yapılan Gram boyamada Gram pozitif, çomak şeklinde bazıları sporlu *C. novyi* bakterileri görüldü. Safılık kontrolünde suşun saf olduğu belirlendi. Toksin üretim ortamı olarak kullanılan Ardehali besiyerinde üreyen kültürdeki *C. novyi* alfa toksin titresinin 1/4000 MLD₅₀/ml olduğu tespit edildi. Aşı kültürünün inaktivasyonundan sonra yapılan canlılık testinde herhangi bir mikroorganizma üremesi ve detoksifikasyon kontrolünde farelerde ölüm gözlemlenmedi. Deneysel olarak üretilen aşının aerobik ve anaerobik bakteriler, mikoplazmalar ve mantarlar yönünden yapılan sterilite testinde herhangi bir üreme saptanmadı. Kobaylarda yapılan zararsızlık testi sonucunda, hayvanlarda herhangi bir olumsuz reaksiyon gözlemlenmedi.

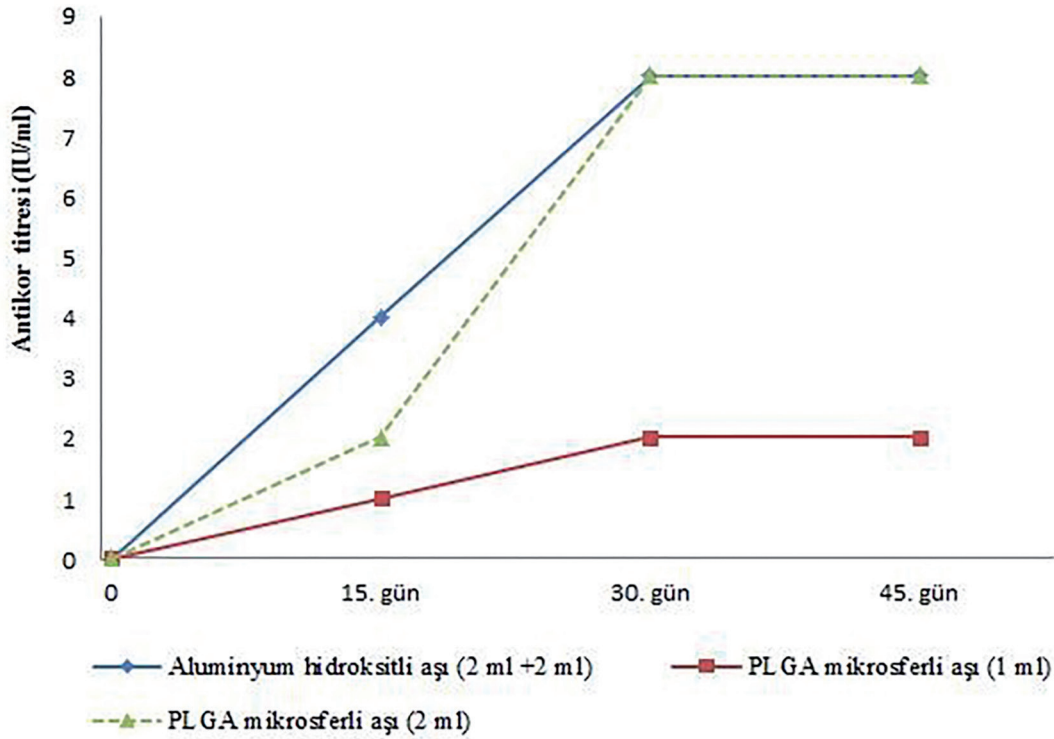
PLGA biyopolimeri ile kapsülleme işlemi sonrasında antijenin %88 oranında mikrosferler içerisine yüklendiği saptandı. Taramalı elektron mikroskop analizinde mikrosferlerin çoğunun düzgün yuvarlak şekilli olduğu görüldü. Bazı alanlarda kırık ve delik mikrosferler tespit edildi. Mikrosfer çaplarının ölçümü sonucunda çoğunun 1-5 µm çapında olduğu belirlendi (Şekil 1).



Şekil 1. PLGA mikrosferlerinin SEM görüntüsü.

Alüminyum hidroksit adjuvantı katılmış aşı ile çift doz (2 ml+2 ml) aşılanmış kobayların kan serumlarında antikor düzeyi 15'inci günde 4 IU/ml, 30'uncu ve 45'inci günlerde 8 IU/ml olarak belirlendi. Bununla birlikte PLGA mikrosferli aşı ile tek doz (2 ml) aşılanmış kobayların kan serumlarında antitoksin düzeyi 15'inci günde 2 IU/ml, 30'uncu ve 45'inci günlerde 8 IU/ml, PLGA mikrosferli aşı ile yarım doz (1 ml) aşılanmış kobayların kan serumlarında antikor düzeyi 15'inci günde 1 IU/ml,

30'uncu günde ve 45'inci günde 2 IU/ml olarak tespit edildi. Alüminyum hidroksit adjuvantlı aşı ile ikinci aşılamadan ve PLGA mikrosferli aşının tek doz uygulanmasından sonra hayvanlardaki bağışıklık düzeyi, uluslararası standartlara göre minimum olması gereken düzeyin (2.5 IU/ml) üzerinde bulundu. Bununla birlikte 1 ml PLGA mikrosferli aşı verilen hayvanlarda yeterli bağışıklık düzeyi sağlanamadı (Şekil 2).



Şekil 2. PLGA mikrosferli ve alüminyum hidroksitli aşılar ile aşılama sonrası oluşan antikor titreleri.

Tartışma ve Sonuç

İnsan ve hayvan aşılarının geliştirilmesinde nanoteknolojinin kullanımı son yıllarda önem kazanmıştır [23]. PLG ve PLGA gibi sentetik polimerler mükemmel biyobozunur ve biyouyumlu polimerlerdir. Bu nedenle nanopartikül hazırlamada yaygın olarak kullanılmaktadırlar [1, 31]. Sentetik polimerlere ilave olarak aljinat ve kitosan gibi polisakkarit yapıdaki doğal polimerler de nanopartiküllü aşıların hazırlanmasında kullanılmıştır [12, 17, 27].

Bu çalışmada, laboratuvarında küçük ölçekte enfeksiyöz nekrotik hepatitıs hastalığı aşısı üretilmiş

ve adjuvant olarak alüminyum hidroksit ve PLGA biyopolimeri kullanılmıştır. Kobayları aşılamadan sonraki 15'inci günde alüminyum hidroksit adjuvantlı çift doz aşının antikor titresi 15'inci günde 4 IU/ml iken, tek doz verilen PLGA mikrosferli aşının antikor titresi 2 IU/ml olarak belirlenmiştir. Ancak 30'uncu ve 45'inci günlerde çift doz alüminyum hidroksit adjuvantlı aşı ile tek doz PLGA mikrosferli aşının antikor titresi aynı seviyede (8 IU/ml) bulunmuştur. PLGA mikrosferli aşı yarım doz (1 ml) verildiğinde uluslararası kabul edilen titrenin (2.5 IU/ml) altında bir titre elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, PLGA mikrosferli enfek-

siyöz nekrotik hepatitis aşısının tek dozunun yeterli bir bağışıklık oluşturduğunu göstermektedir. Daha önce PLGA mikrosferli enfeksiyöz nekrotik hepatitis aşısı ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmadığından tespit edilen antikor titrelerini karşılaştırmak mümkün olmamıştır. Bununla birlikte bu çalışmaya benzer bir şekilde tek doz PLGA mikrosferli insan tetanoz [17], difteri [43] ve hepatit B [16] aşılarında da yeterli bir bağışıklık düzeyi elde edilmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, kapsülleme esnasında bir miktar antijeninin kaybına rağmen 30'uncu günden sonra tek doz PLGA mikrosferli ve çift doz alüminyum hidroksitli aşının aynı düzeyde bağışıklık seviyesine ulaştığını göstermektedir. 15'inci günde PLGA mikrosferli aşının antikor titresinin düşük olması mikrosferler içerisinde ilk günlerde antijenin yavaş salınımından kaynaklanabilir. Polimerik partikül büyüklüğü, polimerin molekül ağırlığı ve hidrofobitesi gibi faktörler antijen salınım süresini etkilemektedir. Düşük hidrofobite ve daha küçük partikül büyüklüğüne sahip mikrosferden daha hızlı antijen salınımı gerçekleşir. Hidrofobitesi yüksek ve daha büyük partiküllü mikrosferden antijen salınımı çok yavaştır [18]. PLGA polimerinin bozunma yarı ömrünün polimerin monomer kompozisyonuyla ilişkili olduğu, glikolid/laktid oranı 50/50 olduğunda bozunma yarı ömrünün minimum düzeyde gerçekleştiği bildirilmiştir [9]. Bununla birlikte laktid/glikolid oranı 75/25 olarak arttığında PLGA'nın bozunma oranının laktid/glikolid oranı 50/50 olan PLGA'dan daha hızlı olduğu saptanmıştır [15]. Diğer bir çalışmada ise, en yavaş hepatit B antijeni salınımı, laktid/glikolid oranı 50/50 olan PLGA polimeri kullanıldığında elde edilmiştir [36]. Partikül büyüklüğü 10 µm'den küçük mikrosferler hemen antijen sunan hücreler (dendritik hücreler ve makrofajlar) tarafından alınır ve adjuvant etkisi hemen başlar. Bundan daha büyük mikrosferler enjeksiyon yerinde kalır, yavaş yavaş antijen salınımı gerçekleşir [19]. Thomas ve ark. [41] tarafından yapılan bir çalışmada, 5µm çapındaki hepatit B antijeni yüklü mikrosferlerin 12 µm çapındakilerden daha güçlü bir immun yanıt oluşturduğu saptanmıştır. Eldridge ve ark. [11] tarafından yapılan çalışmada ise, stafilokok enteroksin B toksoidi yüklü 10 µm'den küçük PLGA mikrosferlerinin daha güçlü immune yanıt oluşturduğu belirlenmiştir. Gutierrez ve ark. [14], 200, 500 ve 1000 nm büyüklüğündeki BSA yüklü

PLGA partiküllerinin farelerde oluşturduğu antikor miktarlarını karşılaştırmışlar, küçük partiküllerden başlangıçta antijen salınımının daha yavaş olduğu fakat 1000 nm büyüklüğündeki partiküllerin daha yüksek IgG oluşumuna yol açtığını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise, antijenin kapsüllenmesinde laktid/glikolid oranı 50:50 ve molekül ağırlığı 30.000-60.000 dalton olan PLGA biyopolimeri kullanılmış ve mikrosferlerin çoğunun çapı 5 µm'den küçük bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları laktid/glikolid oranı 50:50 olan PLGA polimerin *C. novyi* toksoidinin enkapsülasyonu için kullanılabileceğini göstermektedir.

Koyunların enfeksiyöz nekrotik hepatitis hastalığı etkeni olan *C. novyi* tip B ekstraselüler toksinler (alfa, beta, zeta ve eta) üretir. Bu toksinler letal, ödematöz ve sitotoksik aktiviteye sahiptir. Bu bakterinin sebep olduğu hastalıktan korunmada toksoid aşılardan yararlanılmaktadır. Alfa toksini etkili toksin olup bu toksini içeren aşılardan koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir [3, 7]. Bu çalışmada saptanan antikor titreleri, aynı suş kullanılarak Baş ve Alp [6] tarafından hazırlanan monovalan ve kombine aşılardan elde edilen alfa antitoksin (antikor) değerinden (>10) biraz düşük bulunmuştur. Bu farklılık aşı hazırlama tekniğinin farklılığından kaynaklanabilir. Baş ve Alp [6], aşığı hazırlarken ultrafiltrasyon yöntemiyle konsantrasyon gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar ultrafiltrasyon cihazı ile 10.000-30.000 dalton büyüklüğündeki molekülleri filtre etmek suretiyle kültürü 3 kat konsantre ederek, kültürün hacmini düşürmüşlerdir. Fakat bizim çalışmamızda konsantrasyon işlemi uygulanmamıştır. Konsantre edilmiş aşı içerisindeki antijen miktarının fazla olması daha yüksek oranda antikor oluşumuna neden olabilir. Nitekim Amitoo ve ark. [2], *C. novyi* tip B toksoid aşısının kobaylara verdikleri aşı miktarını azalttıklarında antikor titresinin düştüğünü belirlemişlerdir.

Aşı bağışıklık çalışmalarında elde edilen antikor titreleri hayvan türlerine göre değişebilmektedir. *C. novyi* aşısının bağışıklık çalışmaları tavşanlarda yapıldığında elde edilen titreler, kobaylarda elde edilen titrelelere göre 3-10 kat daha düşük bulunmuştur [42]. Baş ve Alp [6], alüminyum hidroksitli *C. novyi* aşısının bağışıklık testini hem kobaylarda hem de koyunlarda yapmışlar, kobaylarda 10 IU/ml'nin üzerinde ve koyunlarda 2.5-5 IU/ml

titre elde etmişlerdir. Kılıç ve Kılınc [22], alüminyum hidroksit adjuvantlı enfeksiyöz nekrotik hepatitis aşısı uygulanan koyunlarda aşının oluşturduğu bağışıklık düzeyini araştırmışlar, çift doz aşının 2. ayda antikor titresini 16 IU/ml düzeyinde tespit etmişlerdir. Her iki çalışmada da havuzlanmış serum örnekleri kullanılmıştır.

Önceki çalışmalar PLGA ile kapsülleme işleminde ilave edilen trehalozun toksoid içindeki antijenin stabilitesini artırdığını göstermektedir. PLGA'nın hidrolizi sonucu laktik ve glikolik asit açığa çıktığından mikrosferler içinde pH 3'ün altına düşer. Asidik pH'yı nötralize etmek için $Mg(OH)_2$ katılır. Trehaloz kapsülleme esnasında organik çözücülerden antijenik proteini korur. Trehaloz sulu ortamda kayda değer çözünürlüğe sahiptir. Trehalozlu ortamda antijen salınımı daha hızlıdır [16]. Protein stabilizatörü olarak sığır serum albümin (BSA), manntitol ve sükröz kullanılmasına rağmen antijenin yapısının korunması ve daha iyi salınım için sadece trehalozun etkili olduğu, kapsülleme işleminde trehaloz konsantrasyonu % 0.5'den %2'ye artırıldığında, antijen salınımının da %80-90 oranına ulaştığı, trehalozsuz mikrosferlerdeki yüklü protein miktarının %30-40 oranında olduğu bildirilmiştir [17]. Bununla birlikte, Quintilio ve ark. [32] tarafından yapılan bir çalışmada, protein stabilizatörü içermeyen PLGA mikrosferleriyle kapsüllenmiş tetanoz ve difteri aşuları uygulanan fare ve kobaylarda yeterli düzeyde bağışıklık elde edilmiştir. Yapılan bu çalışmada, mikrosferlerin hazırlanmasında antijen kaybını önlemek için toksoid içerisine %1.5 oranında trehaloz ve %2 oranında $Mg(OH)_2$ katılmıştır. Mikrosferler hazırlanırken eklenen toksoid içerisindeki proteinin yaklaşık %88'i mikrosferler içerisine yüklenmiştir. Protein miktarında yaklaşık % 12 oranında bir kayıp görülmesine rağmen çift doz alüminyum hidroksitli aşıyla aynı seviyede bağışıklık elde edilmiştir. Jaganathan ve ark. [17], trehaloz ilave ederek tetanoz antijenini PLGA ve kitosan ile kapsüllediklerinde mikrosferler içine protein yüklenme oranının %90'a çıktığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte yapılan bir çalışmada [43] daha düşük protein yüklenme oranı saptanmıştır. Protein yüklenme oranlarındaki bu farklılıklar, kullanılan polimerin tipi, antijenin özelliği ve mikrosfer hazırlama yöntemlerinin farklı olmasından kaynaklanabilir.

Sonuç olarak, PLGA mikrosferli enfeksiyöz nekrotik hepatitis aşısının tek dozunun alüminyum hidroksitli aşının çift dozu ile aynı düzeyde bağışıklık oluşturduğu ortaya konmuştur. Veteriner alanda daha ekonomik olması için maliyeti düşük polimerler üretilmelidir. Farklı biyopolimerlerin veteriner aşılarının üretiminde kullanılabilirliği araştırılmalıdır. Polimer kullanılarak üretilen aşuların bağışıklık düzeyleri, mikrosferleri hazırlamada kullanılan yöntem, polimerin tipi, solventlerin çeşidi, protein stabilizatörleri gibi birçok faktörden etkilendiği için daha kapsamlı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışmayı MF.16.70 proje numarası ile destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)'ne çok teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Akagi T, Baba M, Akashi M. (2012). Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine. *Adv Polym Sci.* 247, 31-64.
2. Amitoto K, Sasaki O, Isogai M, et al. (1998). The protective effect of *Clostridium novyi* type B alpha-toxoid against challenge with spores in guinea pigs. *J Vet Med Sci.* 60, 681-685.
3. Arda M, Minbay A, Leloğlu N, ve ark. (1997). Özel Mikrobiyoloji, Medisan Yayın Serisi No:13, Medisan Yayınevi, Ankara.
4. Ardehali M, Darakhshan H, Moosawi M. (1986). Mass production and standardization of *Clostridium oedematiens* vaccine against black disease (infectious necrotic hepatitis) of sheep. *Dev Biol Stand.* 64, 137-140.
5. Arnon R, Yedidia TB. (2003). Old and new vaccine approaches. *Int Immunopharmacol.* 3, 1195-1204.
6. Baş T, Alp R. (2005). Clostridial aşuların kombine hazırlanması. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg.* 36, 35-45.
7. Blood DC, Radostits OM. (1989). *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*, 7 th., London.
8. Büyüktanır Ö. (2010). Günümüzde biyoteknolojik bakteriyel aşular. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg.* 5, 97-105.
9. Cleland JL. (1995). Design and production of single-immunization vaccines using polylactide polyglycolide microsphere systems. in: Powell M. F., Newman M. J. (Eds.) *Vaccine design: The subunit and adjuvant approach.* Plenum Press, New York.
10. Clem AS. (2011). *Fundamentals of vaccine immunology.* J Glob Infect Dis. 3, 73-78.
11. Eldridge JH, Staas, JK, Meulbroek JA, et al. (1991). Biodegradable and biocompatible poly(dl-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal en-

- terotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. *Infect Immun.* 59, 2978–2986.
12. Feng G, Jiang Q, Xia M, et al. (2013). Enhanced immune response and protective effects of nano-chitosan-based DNA vaccine encoding T cell epitopes of Esat-6 and FL against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS One.* 8, 4.
 13. Gupta A, Chaphalkar SR. (2015). Vaccine adjuvants: the current necessity of life. *Shiraz E-Med J.* 16, 1-11.
 14. Gutierrez I, Hernandez RM, Igartua M, et al. (2002). Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA loaded nanospheres. *Vaccine.* 21, 67-77.
 15. Isobe M, Yamazaki Y, Oida SI, et al. (1996). Bone morphogenetic protein encapsulated with a biodegradable and biocompatible polymer. *J Biomed Mater Res.* 32, 433–438.
 16. Jaganathan KS, Singh P, Prabhakaran D, et al. (2004). Development of a single-dose stabilized poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres-based vaccine against hepatitis B. *J Pharm Pharmacol.* 56, 1243-1250.
 17. Jaganathan KS, Rao YUB, Singh P, et al. (2005). Development of a single dose tetanus toxoid formulation based on polymeric microspheres: a comparative study of poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) versus chitosan microspheres. *Int J Pharm.* 294, 23–32.
 18. Johansen P, Linda M, Tamber H, et al. (2000). Immunogenicity of single-dose diphtheria vaccines based on PLA/PLGA microspheres in guinea pigs. *Vaccine.* 18, 209-215.
 19. Johansen P, Martinez-Gomez JM, Gander B. (2007). Development of synthetic biodegradable microparticulate vaccines: a roller coaster story. *Exp Rev Vac.* 6, 471-474.
 20. Kerimoğlu O, Alarçin, E. (2002). Poly(lactic-co-glycolic acid) based drug delivery devices for tissue engineering and regenerative medicine. *ANKEM Derg.* 26, 86-98.
 21. Khademi F, Sahebkar A, Fasihi-Ramand M, et al. (2018). Induction of strong immune response against a multicomponent antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in BALB/c mice using PLGA and DOTAP adjuvant. *APMIS.* 126, 509–514.
 22. Kılıç A, Kılıç Ü. (2005). Enfeksiyöz nekrozan hepatit aşısı uygulanan koyunlarda aşının oluşturduğu bağışıklık düzeyinin araştırılması. *FÜ Sağ Bil Derg.* 19, 145-149.
 23. Kim MG, Park JY, Shon Y, et al. (2014). Nanotechnology and vaccine development. *Asian J Pharm Sci.* 9, 227-235.
 24. Kumar M. (2000). Nano ve microparticles as controlled drug delivery devices. *J Pharm Sci.* 3, 234-258.
 25. Lee NH, Lee JA, Park SY, et al. (2012). A review of vaccine development and research for industry animals in Korea. *Clin Exp Vaccine Res.* 1, 18-34.
 26. Lee S, Nguyen MT. (2015). Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Network.* 15, 51-57.
 27. Li P, Luo Z, Liu P, et al. (2013). Bioreducible alginate-poly(ethylenimine) nanogels as an antigen-delivery system robustly enhance vaccine-elicited humoral and cellular immune responses. *J Control Release.* 168, 271–279.
 28. Li P, Asokanathan C, Liu F, et al. (2016). PLGA nano/micro particles encapsulated with pertussis toxoid (PTd) enhances Th1/Th17 immune response in a murine model. *Int J Pharm.* 513, 183-190.
 29. Lin CY, Lin SJ, Yang YC, et al. (2015). Biodegradable polymeric microsphere-based vaccines and their applications in infectious diseases. *Hum Vaccin Immunother.* 11, 650-656.
 30. Lowry OH, Rosbrough NJ, Farr AL, et al. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-275.
 31. Peek LJ, Middaugh CR, Berkland C. (2008). Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 60, 915–928.
 32. Quintilio W, Takata CS, Sant'Anna OA, et al. (2009). Evaluation of a diphtheria and tetanus PLGA microencapsulated vaccine formulation without stabilizers. *Curr Drug Deliv.* 6, 297-304.
 33. Rosas JE, Pedraz JL, Hernandez RM, et al. (2002). Remarkably high antibody levels and protection against *P. falciparum* malaria in Aotus monkeys after a single immunisation of SPf66 encapsulated in PLGA microspheres. *Vaccine.* 20, 1707-1710.
 34. Sanghi DK, Tiwle R. (2014). A detail comprehensive review on vaccines. *Int J Res Dev Pharm L Sci.* 3, 887-895.
 35. Shakya AK, Nandakumar KS. (2013). Applications of polymeric adjuvants in studying autoimmune responses and vaccination against infectious diseases. *J R Soc Interface.* 10, 1-6.
 36. Shi L, Caulfield MJ, Chern RT, et al. (2002). Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-shot hepatitis B vaccine formulated with PLGA microspheres. *J Pharmaceut Sci.* 91, 1019-1035.
 37. Singh SM, Alkie TN, Nagy E, et al. (2016). Delivery of an inactivated avian influenza virus vaccine adjuvanted with poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) encapsulated CpG ODN induces protective immune responses in chickens. *Vaccine.* 34, 4807-4813.
 38. Souza CD, Bannantine JP, Brown WC, et al. (2017). Nano particle vector comprised of poly lactic-co-glycolic acid and monophosphoryl lipid A and recombinant *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* peptides stimulate a pro-immune profile in bovine macrophages. *J Appl Microbiol.* 123, 54–65.
 39. Spickler AR, Roth JA, (2003). Adjuvants in veterinary vaccines: Modes of action and adverse effects. *J Vet Intern Med.* 17, 273–281.
 40. Taha-Abdelaziz K, Hodgins DC, Alkie TN, et al. (2018). Oral administration of PLGA-encapsulated CpG ODN and *Campylobacter jejuni* lysate reduces cecal colonization by *Campylobacter jejuni* in chickens. *Vaccine.* 36, 388-394.
 41. Thomas C, Gupta V, Ahsan F. (2010). Particle size influences the immune response produced by hepatitis B vaccine formulated in inhalable particles. *Pharm Res.* 27, 905-919.
 42. Webster A, Frank CL. (1985). Comparison immune response stimulated in sheep, rabbits and guinea pigs by the administration of multicomponent clostridial vaccines. *Australian Vet J.* 62, 112-114.
 43. Woo HS, Kim SR, Yoon M, et al. (2018). Combined poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing diphtheria toxoid for a single-shot immunization. *AAPS Pharm Sci Tech.* 19, 1160-1167.