



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association
ISSN: 1309-4769, e-ISSN 2667-8381, 10(2): 91-105, 2019

AŞI ADJUVANLARI ve İSTENMEYEN ETKİLERİ

Buket GÜL^{1*}, Begüm YURDAKÖK-DİKMEN²

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara
ORCID¹: 0000-0001-6584-8916 ORCID²: 0000-0002-0385-3602

*Sorumlu Yazar: Buket GÜL
E-Posta: buketguldm@gmail.com

Geliş Tarihi: 10.07.2019
Kabul Tarihi: 28.07.2019

ÖZET

Koruyucu hekimlik uygulamaları içerisinde en etkin yöntemlerden biri aşılama'dır. İdeal veteriner aşısından beklenenler; uzun ömürlü ve biyoyararlanımı yüksek olması, bunun yanında yan etki oluşturmamasıdır. Bu amaçla verildikleri antijeninin immünojenitesini arttıran ve güçlendiren maddeler olan aşı adjuvanları kullanılmaktadır. Ancak aşı adjuvanlarının genel olarak bilinen bazı yan etkileri vardır. Bu derlemede aşı adjuvanları hakkında genel bilgi verilmiş olup, veteriner aşılarında kullanılan adjuvanların olası toksik etkilerinden bahsedilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Veteriner, Aşı, Adjuvan, İstenmeyen etki

VACCINE ADJUVANTS and THEIR UNDESIRABLE EFFECTS

ABSTRACT

One of the most effective methods for preventive medicine is vaccination. Ideal veterinary vaccines are expected have long life and high bioavailability, as well as least or none side effects. For these purposes, vaccine adjuvants are used to increase the immunogenicity and enhance their effects. However, the adjuvants used in vaccines have generally known side effects. In this review, general information on vaccine adjuvants and possible toxic effects of adjuvants used in veterinary vaccines are summarized.

Keywords: Veterinary, Vaccine, Adjuvant, Toxic effect

GİRİŞ

Günümüzde gittikçe yaygınlaşan hayvan hastalıkları ve artan uluslararası ticaret, veteriner gözetim sistemlerine olan talebin artmasına yol açarken, ülkelerin bu konuda sunduğu insan faktörü ve finansal kaynaklara bağlı katkılar dünya genelinde sınırlı hale gelmektedir (Stärk ve ark., 2006). Son yıllarda hastalık kaynaklı (veya hastalıklardan kaynaklanan) mali/ekonomik kayıpların artışı önemli bir sorun haline gelmiş ve hastalıklara karşı korunmada daha etkili tedbirlerin alınması gerekliliğini gün yüzüne çıkarmıştır. Bu amaçla, hayvan ve insan sağlığı için hastalıklardan korunmada kullanılan en etkili yöntemlerden biri de aşı uygulamalarıdır. (Kim ve Samal, 2016). Yeni hastalıkların ortaya çıkması, eski enfeksiyonların yeniden görülmeye başlanması ve antibiyotiklere karşı oluşan direncin yayılmaya devam etmesi gibi nedenler, hayvan sağlığı uygulamalarında yeni aşılarla veya mevcut aşıların geliştirilmesine olan ihtiyacı da arttırmaktadır (Loehr ve Babiuk, 2001).

Aşı, koruyucu hekimlik kapsamında bağışıklık sisteminin olası hastalıklara karşı savunma mekanizması oluşturabilmek ve antikor üretebilmek amacıyla hastalığa neden olan ajandan, ürünlerinden veya sentetik üretilen antijenik maddelerinden oluşturulan madde/madde karışımları olarak tanımlanmaktadır. Veteriner aşılarının, çiftlik hayvanları, evcil hayvanlar ve yaban hayvanları da dahil olmak üzere memelileri, kuşları ve balıkları etkileyen 400'den fazla hastalık için mevcut olduğu bilinmektedir (Knight-Jones ve ark., 2014). Günümüzde hayvanlar için uygulanan aşılar farklı gruplarda incelenir. Bunlar, virüsleri ve bakterileri içeren tüm organizma aşıları; toksoid, polisakkarit, protein ve peptidleri içeren alt birim aşıları; DNA aşılarını içeren rekombinant DNA teknolojisi ürünü aşılarıdır (Eratalay ve Öner, 2001).

Aşılarla karşılaşılan en büyük sorunlardan biri bağışıklığın uzun süreli olmamasıdır. Bu nedenle kuvvetli bağışıklık yanıt oluşması ve yaşam boyu koruyucu etkinin devam etmesi amacıyla yapılan aşı çalışmaları önem kazanmaktadır. Bağışıklığın uzun süreli ve etkin olarak sağlanabilmesi için; aşının koruyucu etkinliğinin konak bağışıklık sistemi ya da antijenin özellikleri üzerinden artırılmasını sağlayan adjuvanlar, diğer antijenler ile kontaminasyonunu engellenmesini sağlayan maddeler, farklı ısı, pH koşullarına dayanıklılığını arttıran stabilizatörler ve uygulama yerinden emilmeyi arttıran maddelere yönelik pek çok farklı alanda çalışmalar devam etmektedir. Aşıların immunojenitelerini etkileyen faktörler arasında uygulama dozu ve uygulama yolu, primer ve sekonder bağışıklama zamanı, adjuvan ve antijenin özelliği bulunmaktadır (Eratalay ve Öner, 2001). Bu derlemede aşı adjuvanları ve istenmeyen etkileri hakkında genel bilgi derinelerek sunulmuştur.

ADJUVANLAR

Etimolojik olarak Latince "yardım eden" veya "güçlendiren" anlamına gelen "adjuvare" kelimesinden köken alan adjuvanlar, immunojenik özellikleri düşük olan aşıları geliştirmek için tasarlanmıştır. Adjuvanlar tek başlarına immunojenik maddeler değildir. Aşı içerisine katıldığı durumlarda aşının tek başına kullanılmasına göre daha kuvvetli bağışıklık yanıt oluşturan ve etkisini güçlendiren maddelerdir. Özellikle zayıf immunojenik özellikteki protein, peptid ve DNA aşılarının (doğal bağışıklık tetikleme özellikleri zayıf olan) uygulanmasını takiben, bu maddelere karşı gelişen zayıf aktif kazanılmış bağışıklığı tetikleyerek immunojenitelerini arttırmaları. Adjuvanlar genel olarak etkilerini; bağışıklık sisteminde görevli hücrelerin uyarımını ve etkinliğini arttırarak, Th1/Th2 (yardımcı T hücresi CD8+/CD4+) dengesinin korunmasını ve böylece

beklenen bağışıklığın oluşması için ihtiyaç olan antijen miktarının azalmasını (antijen-aşı dozu) sağlayarak oluşturur (Vogel ve ark., 2000).

Genellikle canlı attenüe aşilar ve tüm-patojen aşiların uygulanması, her ne kadar reaktojenik (uygulama sonrası hastalık oluşması) etkileri nedeniyle tercih edilmese de, bu aşılarda tek dozda yeterli bağışıklık sağlanabileceğinden adjuvan kullanılması; rekombinant aşılara göre daha sınırlıdır. Adjuvanlar immunostimulan, araç ya da taşıyıcı şekilde etkilerini gösterebilir. Böylece sitokin ağı üzerinden immunomodulasyon, antijenin konformasyonel bütünlüğünü koruyarak efektör hücrelere gösteriminin sağlanması, CD8+ sitotoksik T-lenfosit yanıtını indüklemesi, immunojenin immun yanıtı oluşturacak efektör hücrelere antijen sunucu hücrelere (APC) ulaştırılmasının sağlanması ve antijenin kısa-uzun süreli depo olarak sürekli ya da aralıklı salınmasının sağlanması olarak etki gösterebilir (Petrovsky ve Aguila, 2004).

Adjuvanların Keşfi

Birçok önemli tıbbi buluş gibi, aşıya bir adjuvan eklemenin bağışıklık arttırıcı etkilerinin keşfedilmesi bir tesadüf eseri gerçekleşmiştir. 1920'lerde Fransız bir veteriner hekim olan Gaston Ramon, aşılama sonrası enjeksiyon bölgesinde apseler gelişen atlara, yine atlardan elde edilen Tetanoz ve Difteri anti serumunun verilmesiyle antikor titrelerinin daha yüksek olduğunu gözlemlemiştir. Nişasta, ekme kırıntıları, tapyoka (manyok bitkisinin kökünden çıkarılan nişasta) ile inaktive edilmiş toksinlerin birlikte kullanılması sonucunda enjeksiyon bölgesinde steril apseler oluşturularak enjeksiyon bölgesinde lokal inflamasyonu indükleyebilen maddelerin de olabileceği hipotezini doğrularak antiserum düzeyini arttırdı. 1930'lu yıllarda ise, günümüzde insanlarda sürekli kullanım için fazla

reaktojenik olduğu düşünülen, yağ, su ve öldürülmüş mikobakterlerin bulunduğu bir su içinde mineral yağ emülsiyonu olan "Freund'un eksik adjuvanı" keşfedildi. Bağışıklığı ve birlikte çalıştığı antijenlere karşı bağışıklık tepkilerini arttıran bu maddelerin keşfi, aşı katkı maddelerinin ve ileri teknoloji ile üretilen diğer adjuvanların geliştirilmesine temel oluşturmuştur (Spickler ve Roth, 2003).

Adjuvanların Genel Olarak Kullanım Amaçları

Adjuvanların kullanım amaçlarından başlıcaları; iyice saflaştırılarak elde edilen rekombinant antijenlerinin immunojenitesini arttırmak, bağışıklık yanıtın uzun süreli ve etkin olmasını sağlamak, mukozal ve humoral immunitiyi uyarmak, kombine aşılarda antijen yarışmasının önlenmesi, bağışıklığı oluşturmak için uygulanması gereken antijenin miktarını azaltarak dünyada ihtiyaç duyulan aşılama için ekonomik getiri sağlamak (antijen-dozlama oranı, miktar ve sıklık), bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda (ya da infant, genç, yaşlı) etkin olmasını sağlamaktır (Singh ve ark., 2002).

Adjuvanların Etki Basamakları

Aşı ve adjuvan ilişkilerine yönelik araştırmaların sınırlı olması nedeniyle adjuvanların etki mekanizmaları tam olarak halen bilinmemektedir. Bilinen etkinlik ve etki yollarının saklanması, karşılaştırılması, ilişkilendirilerek değerlendirilmesini sağlayan, biyoinformatik analiz yapabilen "VAXJO" (<http://www.violinet.org/vaxjo/>) adjuvanlara ilişkin bilgi alınabilecek web tabanlı bir sistemdir. Araştırmacılar kullanımda olan adjuvanlara, bu adjuvanları içeren aşı ve ilgili araştırmalara bu sistem üzerinden erişebilmektedir. Bağışıklık sistemi, vücudun homeostazını korumak ve genel olarak ekzojen saldırılara yanıt vermekten sorumlu karmaşık bir molekül, hücre ve organ ağından oluşur. Doğal

bağışıklık, kazanılmış bağışıklık ile birlikte organizmanın birinci savunma hattı olarak hızlı yanıt verecek şekilde çalışır. Kemik iliğindeki pluripotent kök hücreler, miyeloid ve lenfoid progenitör hücrelere köken verir. Lenfoid progenitörler de sırayla T ve B lenfositlerine ve doğal öldürücü (natural killer-NK) hücrelerine orijin verir. T lenfositlere (TL) dönüşecek olan hücreler, kemik iliğini terk ederek seçicilik ve olgunlaşma sürecinin gerçekleştiği timusa geçer. Buradan ise sadece olgun T lenfositleri timustan çıkar ve dolaşıma girer. B lenfositlerine (BL) farklılaşacak olan hücreler ise kemik iliğinde kalır ve olgunlaşma evresinin sonunda kemik iliğini terk eder, dolaşıma girerek ikincil lenfoid organlara geçer. Humoral yanıt içerisinde antijenin tanınmasında yardımcı T lenfositleri ve antijen spesifik B lenfositleri görev alır. Bu hücreler diferansiye olup olgunlaşarak bellek B ve efektör hücrelerine dönüşür. Efektör hücreler, nispeten kısa ömürlü aktifleştirilmiş hücrelerdir. Efektör B hücreleri plazma hücreleri olarak adlandırılır ve antikor salgılayarak ve T hücrelerini etkinleştirerek, hücre aracılı tepkileri yerine getiren sitotoksik T hücreleri ve yardımcı T hücrelerine dönüştürür. Doğal maruziyet veya aşılama nedeniyle bir antijenle ilk temas sonucu matür naif B lenfositleri; antikor üreten plazmositler ve bellek hücrelerine diferansiye olur. Yanıtın başlaması ile birlikte, antikor oluşumunda üssel bir artış ve takibinde plato adı verilen ve antikor seviyesinde değişikliğin olmadığı bir aşama gelir. Bunu, birincil cevabın son aşaması, dolaşımdaki spesifik antikorların sayısında kademeli bir düşüşün meydana geldiği düşüş aşaması izler. Antijen ile ikinci temasta, yukarıda belirtilen yanıtı sağlayan hücreleri kapsayan klonal hücrelerdeki genişleme ve ilk yanıtta oluşan bellek hücreleri nedeniyle bu antijeni tanıyabilen mevcut bir B lenfosit popülasyonu bulunur. İkincil tepki, cevabı

indüklemek için gereken antijen dozu daha küçük olması, gecikme fazının daha kısa ve üssel fazın daha belirgin olması; antikorların üretiminin daha hızlı olması ve daha yüksek seviyelere ulaşması; plato evresine daha hızlı ve daha uzun sürede ulaşılması ve düşüş evresi daha yavaş ve kalıcı olması gibi nedenlerle birincil tepkiden farklıdır (Eratalay ve Öner, 2001).

Antijen sunan hücreler (antigen presenting cells, APC'ler), patojenleri tanıyarak T hücreleri gibi bazı lenfositlerin “yabancı maddeleri” tanınması için antijenleri işleyerek ve sunarak hücre immün tepkiye aracılık eden heterojen yapıda bir immün hücre grubudur. APCler, antijenik proteini işleyebilen, peptitlere parçalayabilen ve hücre yüzeyinde uygun T hücre reseptörleri ile etkileşime girebilecek sınıf II MHC (Major Histocompatibility Complex, MHC) molekülü ile birlikte sunan hücrelerdir. Antijen sunumu olarak bilinen bu işlem için en yakın lenf nodülünde antijeni, APC içerisine endositozla alınarak MHC ile T lenfositine sunar. Her lenf nodülü, APClerin T hücreleriyle iletişime geçtiği bir toplama noktasıdır. T hücreleri, T hücre reseptörlerini (TCR'ler) kullanarak APC antijen komplekslerini tanıyabilir. Dolayısıyla, makrofajlar, B hücreleri ve dendritik hücreler gibi çeşitli hücreleri kapsayan ve dolaşımda bulunan APC'ler, antijenleri işleyerek T hücrelerine sunar ve T lenfosit aktivasyonunu takiben sitokin salınır. Sitokinler ile T lenfositler, interferon gama, interlökin-2 (IL-2) üreten Th1 ve IL-4, IL-5 ve IL-10 üreten Th2 hücrelerine farklılık göstererek dönüşür. Adjuvanlar bu kompleks sistem üzerinde farklı immünolojik etkinlikteki sitokinleri uyarabilir. Ancak enfeksiyöz hastalıklardan korunmada hücre immünitenin sağlanması, sitokinlerin etkin şekilde uyarılmasına bağlıdır (Yurdakök ve İnce, 2008).

Adjuvan Çeşitleri: Etki Mekanizmaları ve Yan Etkileri

Mineral (Alum ve Kalsiyum) tuzları

Alüminyum bileşiklerinin, aşılarda kullanılan ilk adjuvanlar arasında olduğu bilinmektedir. Alüminyum tuzunun (alüminyum hidroksit $Al(OH)_3$ ve alüminyum fosfatın $Al(PO)_4$) nispeten uzun ömürlü bir bağışıklık, formülasyon kolaylığı ve uzun süreli güvenilirlik ile yüksek titreli IgG'yi tetikleyebildiği bilgisi mevcuttur. Toksoid ile muamele edilen potasyum alum ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) ile yapılan ilk deneyler, toksoide karşı tavşanlarda artan bağışıklık tepkisinin, adjuvan tarafından sağlanan depo etkisinden kaynaklandığını göstermiştir. 1930'lardan beri alüminyum bileşikleri adjuvan olarak yaygın kullanılmaktadır. (Madera ve ark., 2016).

Aluminyum adjuvanların, farelerde $Th2$ bağışıklığı ve insanlarda daha kompleks bir immün yanıtı uyardığı gösterilmiştir. $CD8^+$ T hücrelerinin aktivasyonunu destekler ancak sitotoksik T hücrelerine terminal farklılaşmasını yapmazlar. Aluminyum adjuvanlar antijenin fagositozunu kolaylaştırır ve enjeksiyon bölgesinden difüzyonunu yavaşlatarak inflamatuvar hücrelerin birikmesi için zaman kazandırarak bağışıklık tepkisini artırır, böylece antijenin APC'ler tarafından alınmasının (endositozun) artırılması sağlanır. Yüksek afinite etkileşimleri sayesinde adsorpsiyonun artması, antijenin fiziksel ve kimyasal stabilitesini etkileyebilir. Alüminyum adjuvanları, dendritik hücreleri doğrudan ve dolaylı mekanizmalar yoluyla aktive eder. Alüminyum adjuvanların fagositozu, ardından fagolisozomun bozulması, aktif IL-1 ve IL-18'in salgılanmasıyla sonuçlanan NLRP3-enflamasomları aktive eder. Alüminyum adjuvanları ayrıca, dendritik hücreleri, membran lipid sallarına bağlayarak aktive eder. Alüminyum adjuvanlanmış

aşıların enjeksiyonu, sırayla dendritik hücreleri aktive eden hasarlı hücrelerden ürik asit, DNA ve ATP salınımına neden olur. Alüminyum adjuvanın kullanımı, hücre aracılı immünitenin (IL-4, IL-5 ve B lenfositlerden IgG1, IgE üretimlerinin stimüle edilmesi) zayıf uyarılmasıyla sınırlıdır; interferon gama ($IF-\gamma$) ve IgG2 üretimlerinin artmadığı görülmektedir. Bu durum, diğer immünomodülatör moleküllerin eklenmesiyle geliştirilebilir (Exley ve ark., 2010).

Aşılarda, alüminyum ve adjuvanların, Newcastle hastalığı (Jafari ve ark., 2017) ve Şap hastalığı (FMD) (Cloete ve ark., 2008) dahil olmak üzere ekonomik açıdan önemli viral enfeksiyonlara karşı kullanımı hakkında birkaç araştırma rapor edilmiştir, ancak hücre içi patojenlere karşı etkinlikleri son derece sınırlıdır (Madera ve ark., 2016).

Aluminyum adjuvanı içeren aşılarla örnek olarak; Hepatit A (Havrix, Vaqta, Avaxin), Hepatit B (Engerix-B, Rekombivax-HB), İnsan papilloma virüs (Gardasil), *Streptococcus pneumoniae* (Prevenar), Tetanoz (İnfanrix, Boostrix, Daptacel, Repevax) verilebilir (Leroux-Roels ve ark., 2010).

Alüminyum, çevrede bol miktarda bulunan bir metaldir ve günlük olarak yiyecek ve su ile alınır. Alüminyum, aynı zamanda antasitler ve deodorantlarda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, sadece küçük miktarlarda alüminyum bağırsak bariyeri ve deri yoluyla emilir. Alüminyumun çoğu böbrekler yoluyla atılır. Mesleki maruziyet, böbrek hastalığı ve parenteral beslenmeden kaynaklanan alüminyum toksisitesi, nörolojik hastalık ve kemik hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Alüminyum adjuvanlarının en yaygın görülen yan etkisi lokal inflamasyon reaksiyonunu indüklemesi ve enjeksiyon bölgesinde ağrı, şişlik, kızarıklık ve yerel granülom

oluşturmasıdır. Bulantı, ateş, bağışıklık sisteminin baskılanması, alerji gibi klinik semptomlar yerel inflamasyonun takibinde görülebilir. Aşının kas içi yerine subkutan veya intradermal uygulamalarında görülen bu durum genellikle hafif klinik semptomlarla seyredir. Aslında, alüminyum adjuvanları, molekülleri bağlayarak ve yavaşça serbest bırakarak sistemik advers reaksiyonların prevalansını ve ciddiyetini azaltır, böylece toksisiteyi azaltır. Alüminyum adjuvanlarındaki en yaygın tartışma, uzun süreli beyin inflamasyonu, buna bağlı nörolojik hastalıklar, demans ve çeşitli nörodejeneratif hastalıkları uyarması üzerinedir (Aguilar ve ark., 2007).

Kalsiyum fosfat, ticari olarak temin edilebilen başka bir mineral tuzu yardımcı maddesidir. Aşılarda çeşitli toksoitlere ve viral patojenlere karşı kullanılmıştır. Bazı çalışmalar kalsiyum fosfatın alüminyum ile karşılaştırıldığında daha az lokal doku tahrişine neden olduğunu göstermiştir.

Hücre dışı patojenlere karşı iyi bir adjuvan özellik sergilemelerine karşın, kalsiyum fosfatın hücre içi bakteriyel enfeksiyonlarını hedef alan aşılarda uygulanmaları sınırlıdır (Madera ve ark., 2016).

Tensoaktif bileşikler (Saponinler)

Saponinler yabani ve kültüre edilen bitkilerde, bazı ilkel deniz canlılarında ve bakterilerde bulunan steroid ya da triterpenoid yapıda glikozidlerdir. Saponinler, bir veya daha fazla şeker zincirinin tutturulduğu bir steroidal veya triterpenoid aglikonu içerir. Triterpenoid yapının hidrofobik bir çekirdeğini içeren ve çekirdeğe bağlı karbonhidrat zincirleri olan tensoaktif glikozitler olan saponinler soya fasülyesi, fasülye, bezelye, çay, ıspanak, ayçiçeği, ginseng patlıcan, domates çekirdeği, soğan, kuşkonmaz, tatlı patates, ginseng içerisinde bulunmaktadır.

Memelilerde bağışıklık sistemini uyarması, aşı adjuvanı olarak kullanımlarını arttırmıştır. Saponin bazlı adjuvanlar, hücresel bağışıklık sistemini modüle eder, antikör üretimini artırır ve etkinlikleri için düşük dozlarda kullanılabilir. T bağımlı antijenleri uyarması, CD8+ indüklemesi ve mukozal antijenlere verilen yanıtın güçlendirilmesi gibi kompleks etki yolları bulunur (Yurdakök ve İnce, 2008).

Rekombinant, antijen ile saflaştırılmış ve DNA aşılı gibi yeni nesil aşılarda, doğal bir bağışıklık uyarıcısının bulunmamasından dolayı zayıf immünojeniktir. Bu nedenle, bu aşılarda için yeni adjuvanların araştırılması halen devam etmektedir. Yeni adjuvan gelişiminde saponinler olağanüstü adaylardır. Saponinlerin birçoğunun saflaştırılmış protein antijenleri üzerinde adjuvan etkileri olduğu bulunmuştur. Saponinlerin kimyasal yapıları adjuvan aktiviteleri ile ilişkilidir ve immün tepkilerin doğasını etkiler. Saponin adjuvanlarının, geniş bir sitokin yelpazesinin salgılanmasını uyardığı, saponinlerin doğuştan gelen bağışıklığı tetikleyerek etki edebileceğini öne sürdüğü bildirilmiştir. Bu bitki kaynaklı adjuvanlar, immün sistemin farklı dallarını destekleyebildiğinden, arzu edilen bir immün yanıtı indüklemek için yeni aşılarda tasarımıda kullanılma potansiyeline sahiptir (Song ve Hu, 2009). Saponinler genellikle güvenlidirler ancak verilmiş yoluna, hayvan türlerine ve bazı özel saponinlere göre bu güvenilirlik değişiklik göstermektedir. Bunlara ek olarak saponinlerin intravenöz (IV) enjeksiyonları hemoliz nedeniyle toksisiteye neden olabilir (Yurdakök ve İnce, 2008).

Panama ağacı (*Quillaja Saponaria*): Quil A, *Quillaja Saponaria molina*'dan elde edilen saponinlerin su ile ekstrakte edilebilir fraksiyonunu içerir. Veteriner aşılarında, genellikle saponinlerden Quil A kullanılır. Serbest Quil A enjeksiyonları koyunlarda ve sığırlarda iyi tolere edilir ancak

kedilerde bazı toksisite belirtileri bildirilmiştir. Quil-A'nın, Şap hastalığı (FMD) ve Domuz Üreme ve Solunum Sendromu (PRRS) için aşılara eklenmesinin, adjuvan almayan aşı gruplarına kıyasla immünojenikliğini arttırdığı gösterilmiştir. (Madera ve ark., 2016).

Yerel inflamatuvar reaksiyonlar da serbest Quil A ile ortaya çıkar, ancak kolesterol içeren lipozomlar ile birleştirildiğinde adjuvan aktivite kaybı olmadan bastırılır (Spickler ve Roth, 2003).

Ginseng (*Panax ginseng*): Saponinler, Ginseng bitkisinin köklerinden elde edilir. Ginsengin insan ve hayvanlarda immünomodülatör etkisi olduğu bilinmektedir. Ginsengin yapraklarından ve kökünden elde edilen saponinler Protopanaksadiol saponinler (Rg3, Rd, Rc, Rb1 ve Rb2) ve Protopanaksatriol saponinler (Rg1, Re ve Rg2) olarak ikiye ayrılır (Sun ve ark., 2007).

Bunlardan Rb1 tavuklarda Newcastle canlı aşısında kullanıldığında yüksek antikor üretimi ve lenfosit proliferasyonuna sebep olmuştur (Zhai ve ark., 2011). Bununla birlikte süt sığırlarında *S. aureus*'a karşı immünizasyon için kullanıldığında güçlü bir adjuvan etkiye sahiptir (Hu ve ark., 2003). Farelerde Salmonella'nın oral immünizasyonundan önce ginseng ile ön muamele edildiğinde, Salmonella'ya karşı salgılanan IgA'nın yanı sıra daha yüksek miktarda serum IgG1 ve IgG2 değerleri elde edilmektedir. Ginseng ekstresi veya saflaştırılmış bileşenleri, uygulama yöntemlerine veya mikrop türlerine bakılmaksızın mikrobiyal istilaya karşı geliştirilmiş humoral tepkiler ortaya çıkarmıştır. Bu da ginsengin aşılarda bir yardımcı madde olarak kritik rol oynadığını göstermektedir (Kang ve Min, 2012). ISCOM (İmmune-stimulating complexes, Immün uyarıcı kompleksler):

ISCOM'lar kolesterol, Quillaia kabuğundan saponinler (QS-X triterpen glikozit ailesinin çeşitli

üyeleri) ve antijenlerin tutulabildiği ya da birleştirilebileceği kafes benzeri (40 nm) yapıları oluşturan fosfolipidlerden oluşan tescilli bir lipozom şeklidir. ISCOM mevcut adjuvanlara göre immünolojik avantajlar sunmaktadır. Piyasadaki adjuvanların aksine ISCOM, hem humoral (Th2 indüksiyonu) hem de hücrel immun yanıtı (Th1 indüksiyonu) ve potansiyel hücrel tepkileri (sitotoksik T lenfositleri gibi) indüklediği hindi, kedi, köpek, koyun, domuz, fok, inek ve at gibi çeşitli hayvan modellerinde gösterilmiştir. Hücre aracılı bir immün yanıt, hücre içi patojenlere ve kronik enfeksiyonlara karşı etkili aşılama için çok önemlidir. Kullanılan teknoloji, uzun süreli bağışıklık tepkileri, antijen dozunun azalmasını sağlayarak verimliliğin artmasına neden olur. Tipik olarak, doz, aşının üretim maliyetini önemli ölçüde azaltacak olan 10 ila 100 arasında bir faktörle azaltılabilir. Sığır herpes virüsü tip 1, Rinderpest, kedi lösemi virusu (FeLV), köpek distemper aşılı bu şekilde geliştirilmiştir.

ISCOM'lar hem CD4+ hem de CD8+ T hücre yanıtlarını etkili bir şekilde uyarabilir. Bu nedenle, ISCOM'lar birçok Avrupa ülkesinde influenza virüsüne karşı atlar için lisanslı aşılarda kullanılmıştır. Bu kompleksler ayrıca At Herpes Virüs Tip 2'ye (EHV-2) karşı bir alt birim aşıda kullanılmıştır (Sjölander ve ark., 2001).

ISCOMATRIX: ISCOM kapsamında, farklı lipidler kullanılarak üretilen saponin tabanlı Iscomatrix®; herhangi bir tür hedef antijeni tutabilen, hedef antijenleri e iletebilen ve birden fazla türdeki hem B hücresi hem de T hücresi tepkilerini artırabilen çok yönlü bir yardımcı sistem olarak geliştirilmiştir. Uygulama dozunun düşürülmesini sağlaması ve yüksek/hızlı bağışıklık sisteminin uyarılması için kullanılan bir sistemdir (Yurdakök ve İnce, 2008).

Mikroorganizma tabanlı adjuvanlar

Tarihsel olarak, tüm ısı ile öldürülmüş bakteri preparatları bazen ham adjuvanlar olarak kullanılmıştır. Modern aşılarda kullanmak için bu tür bakteri preparatları rafine edilmiş ve sıklıkla detoksifiye edilmiştir (Siwicki ve ark., 1998). Bakteri veya mantarlardan türetilmiş partiküller, immünitesi azaltılan antijenlerle verildiğinde mukozal membranlardan alımını kolaylaştırmakta, bağışıklık tepkisi üzerinde ilave bir etki oluşturmaktadır. Bakteri yüzey lipidlerinden Gram negatiflerdeki lipopolisakaridler (LPS), bunun türevi olan monofosforil lipid A (MPL), toksinleri bakteri spesifik DNA sekansları, kommensal mikroorganizmalar (probiyotikler) özellikle patojen aracılı bağışıklık sistemini uyararak aşının etkinliğini arttırmaktadır. Diğer adjuvanlar arasında mukozal hücrelere bağlanan, bağırsak geçirgenliğini artırarak sadece mukozal enfeksiyonlar ile savaşmak için IgA antikorları uyaran enterotoksinler yer alır. Bunlarla birlikte bakteriyel DNA parçaları da adjuvan olarak kullanılabilir. Özellikle metillenmemiş CpG sekansı, immün sistemi antijen varlığında B hücreleri, plazmasitoid dendritik hücreler üzerinden uyarmaktadır. Yine mikroorganizma tabanlı adjuvanlar arasında Gram negatif bakterilerden türetilen bakteriyel hayaletler (bacterial ghosts-BG), birçok doğal immünoestimülantör agonist içerirler ve doğal ve adaptif immünitede yer alan çok çeşitli hücre tiplerinin güçlü aktivatörleridir. Adjuvan olarak etkinliğinin yanı sıra, çeşitli immün ve immün olmayan hücre tipleriyle proinflatuar sitokin üretimini indüklemeye yeteneklerini gösterirler. Bu proinflatuar sitokinler, T ve B lenfositlerinin lenf düğümlerine, konjuge antijenleri ile karşılaşma şansını en üst düzeye çıkararak ve ardından potansiyel bağışıklık tepkilerinin ortaya çıkmasını arttıran genel alımını tetikler (Christensen, 2016).

Muramil dipeptid (MDP): Muramil dipeptid (MDP) de denilen N-asetil muramil-L-alanil-D-izoglutamin bakteri hücre duvarının yüksek oranda korunmuş yapısı içinde bir fragmandır. MDP, karbonhidrat modifikasyonları nedeniyle bakterilerin peptidoglikanlarına katıldığı çeşitli formlarda ortaya çıkabilir, çekirdek molekül uzun zamandan beri, bir immün tepkisini aktif hale getirmek için bilinen en küçük peptidoglikan fragmanı olarak tanınır. Tek başına artan NF- κ B aktivasyonuna ve ardından proinflatuar sitokinlerin üretimine yol açar, lipozomlarla ya da gliserol ile birlikte kullanıldığında ise hücresel bağışıklığı uyarır (Agulair ve ark., 2007). Hidrofilik türevleri (örneğin, treonyl-MDP, murametid, murabutid, nor-MDP ve N-asetilglukosaminil-MDP) esas olarak Th2 tepkilerini indükler. Lipofilik türevler (örneğin, MTP-PE [muramil tripeptid fosfatidil etanolamin]) Th1 reaksiyonlarını indüklemeye eğilimindedir. Threonyl-MDP ayrıca deneysel kedi lösemi virusu (FeLV) aşılarda kullanılmıştır. Mikobakterilerde bulunan Muramil dipeptid (MDP) immüno-modülantör etkili aktif bir peptidoglikan bileşenidir. MDP'nin ateş, artrit, üveit gibi önemli olumsuz etkileri vardır (Spickler ve Roth, 2003).

Lipopolisakaritler: Lipopolisakaritler (LPS, endotoksin), gram negatif bakterilerin dış zarının ana bileşeni olup, Th1-tip yanıtları ve sitotoksik T lenfositlerin uyarılmasını sağlar. Bu uyarım diğer adjuvanlardan daha yüksek olmasına karşın, yüksek toksik etkiye sahiptir. LPS, kimyasal modifikasyonlarla adjuvan özelliklerini koruyacak şekilde daha az toksik etki oluşturan türevlerine dönüştürülebilir. Yüksek pH'da hidrolize olan monofosforil lipid A (MPL) daha az toksik olan LPS bileşiklerindedir ve hücresel immün yanıtı uyarır. Bu polisakarit, kedilerde ve farelerde sitokin salınımını uyaraabilen adjuvan olmasının yanı sıra en

sık yan etkisi yerel olarak görülen ağrıdır (Yurdakök ve İnce, 2008).

Emülsiyonlar

Birbiri içinde çözünmeyen iki sıvının karışımı olarak tanımlanan emülsiyonda, dağılan fazdaki sıvı, diğer fazın (dağımlan faz) içerisinde dispersiyon durumdadır. Aşı formülasyonlarında, bu fazlar su (antijenik ortam) ve yağdır. Sürfaktanın hidrofilik-lipofilik denge (HLB) değerine bağlı olarak farklı emülsiyonlar elde edilebilir. Emülsiyon bazlı adjuvanlar aşı geliştirmede yaygın olarak kullanılır. En yaygın kullanılan emülsiyonların arasında yağ tabanlı emülsiyon adjuvanları gelir. Buna örnek olarak Freud adjuvanı verilebilir. Emülsiyonlar deneysel immünoloji, kanser tedavisi ve hayvan/insan aşılarında uzun süredir kullanıma sahiptir (Spickler ve Roth 2003).

Yağ emülsiyonu adjuvanları, bir yüzey aktif madde ile stabilize edilmiş yağ ve sulu faz karışımı içerir. Yağ içinde su (W/O, water/octanol) emülsiyonları güçlü ve uzun süreli bir bağışıklık etkisi sağlar. Mineral yağlara dayanan emülsiyonların çok verimli oldukları bilinmektedir, ancak bazen reaktif antijenlerle lokal reaksiyonlara neden olabilmektedir. Mineral olmayan yağlar ise iyi tolere edilirler, ancak immünojeniteleri zayıftır. (Aucouturier ve ark., 2001) W/O emülsiyonları enjeksiyon yerinde depo oluşturarak yavaş antijenin salınmasına neden olur; böylece etkili antijen dozunu veya gereken doz sayısını azaltmak için kullanılabilir. W/O emülsiyonlarının aksine, Su içinde yağ (O/W) emülsiyon bazlı adjuvanlar, enjeksiyon bölgesinde bir antijen deposu oluşturmaz. Bunun yerine; yağ damlacıkları kemokin kaynaklı immün hücre alımını, makrofaj ve dendritik hücrelerin (DC'ler) farklılaşmasını kolaylaştırır. O/W emülsiyonları iyi tolere edilir ve belirtildiği üzere kısa süreli immün

tepkiyi indükler. Bunlara örnek olarak hegzadekan, susam yağı, yer fıstığı yağı verilebilir (Madera ve ark., 2016).

Freund adjuvanı: Freund adjuvanı (complete) mineral yağlardan W/O emülsiyonu, surfaktan ve ısıyla öldürülmüş tüberküloz ya da bu organizmaların parçalarını taşıyan adjuvandır. 1950'li yıllardan beri aşılarında kullanılmaktadır. Tamamlanmamış (incomplete) Freund's adjuvanı ise mycobacteria ve mineral yağ (pristan) içermemekte; ve tamamlanmış (complete) adjuvanın oluşturduğu ülser, inflamasyon, granülom, artirit gibi istenmeyen etkileri göstermemektedir. Veteriner hekimlikte influenza aşılarında kullanılır. İnflamasyon ve artrit özellikle pristan mineral yağının doğal toleransı aşacak şekilde bağışıklığı uyarması ve ısı şok proteinleri üzerinden olur (Yurdakök ve İnce, 2008). Bunlara ek olarak bu emülsiyonların viskozite nedeniyle enjekte edilmesi zordur. Bu olumsuz özelliğinden dolayı pek tercih edilmese de bazı ruminant, tavuk ve balık aşılarında bulunurlar (Spickler ve Roth, 2003).

MF59 O/W (Skualen): MF59, O/W emülsiyonu, squalen bazlı ürün olarak 1997'den beri kullanılmaktadır. Skualen bitkilerde ve insan da dahil olmak üzere pek çok türün karaciğerinde doğal olarak bulunan bir maddedir. Steroid hormon biyosentez yolağında ara madde olan skualen, kolesterolün doğrudan sentetik prekürsörüdür. Dolayısıyla skualen biyolojik olarak yıkılabilen ve uyumlu olan bir yağdır. Özellikle köpek balığı karaciğerinin % 85'i skualendir ve MF59'un üretiminde kullanılan skualen de buradan üretilmektedir. İlk olarak influenza aşılarında kullanılmış, etkinliği ve özellikle yaşlı/çocuklarda etkililiği nedeniyle adjuvan olarak kullanımı artmıştır. İnflanzaya karşı hızlı şekilde CD4+ T-hücre yanıtını, güçlü ve uzun süreli hafıza T ve B hücre yanıtı oluşturduğu ve immun yanıtı güçlendirdiği gösterilmiştir. MF59, birlikte

uyulandığı antijenin APC'lere alınması, taşınması ve işlenmesi aşamalarını hızlandırmakta, yerel lenf bezlerine APC kompleksinin alınması ve yüksek sitokin oluşumuna neden olur (Podda ve ark., 2006). Klinik araştırmalarda özellikle neonat ve infantlarda istenmeyen etki oluşturmaması, aşının bu yönüyle kullanımını teşvik etmektedir. Körfez Savaşı sırasında kullanım sonrası, bazı bireylerde nörolojik bozukluklar görülse de Dünya Sağlık Örgütü'nün raporunda da belirtildiği üzere, bu etkilerin adjuvandan kaynaklandığını gösteren bir kanıt rastlanmamıştır (Phillips ve ark., 2009).

AS03: AS03 alfa tokoferol, skualen ve O/W içerisinde polisorbitat 80 içeren emülsiyon şeklinde bir adjuvandır. Yapılan araştırmalarda uygulanmasını takiben antijene özgü antikorların yüksek seviyelerde görülmesi, özellikle kullanılan antijen miktarını önemli ölçüde azaltması gibi yönleriyle öne çıkmaktadır. AS03'ün doğal bağışıklık sistemini lokal olarak etkinleştirdiği, enjeksiyon alanına nötrofil çektiği, antijenin taşınması ve lenf bezlerine içerdiği alfa tokoferol ile sunumunu arttırdığı gösterilmiştir (Morel ve ark., 2011). Klinik ve klinik olmayan araştırmalarda AS03 adjuvanlı kuş gribi (H5N1) aşısının (pandemik H1N1/2009 de dahil olmak üzere); aşı antijenine daha üstün yanıt verdiği, güvenli ve etkin olduğu gösterilmiştir (Leroux-Roels ve ark., 2010).

Sitokinler

Sitokinler, Toll-like reseptörler (TLR) agonist aracılı immün yanıtların anahtar oyuncularıdır. Bağışıklık sistemini uyarması nedeniyle pek çok sitokin adjuvan olarak kullanılabilir. Bu küçük proteinler, hücrel ve humoral immün tepkilerin hücre sinyalleşmesinde, indüklemesinde ve yönlendirmesinde önemli rol oynarlar ve antikor oluşumunu teşvik etmektedir. Sitokinlerin

rekombinant homologlarının göreceli olarak kısa yarı ömürlü olmaları aşı adjuvanı olarak kullanımlarını sınırlamakla birlikte, günümüzde lipozom uygulamaları ve DNA aşılılarıyla sitokin ifade vektörlerinin birlikte uygulanması gibi yöntemlerle bu sorun ortadan kalkmaktadır. İnterferon (IFN-alfa, IFN-gamma), interlökin (IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, GM-CSF ve Flt-3 ligandları) gibi çeşitli sitokinlerin adjuvan olarak kullanımını takiben immün yanıtı arttırdığı gösterilmiştir. Ancak toksisite (özellikle hepatotoksisite ve CYP bağımlı ilaç etkileşimleri) ve immunojeniteleri nedeniyle kullanımları sınırlıdır (Tovey ve Lallemand, 2010).

IL-12: İnterlökin-12 (IL-12), hücrel bağışıklık tepkilerini başlatma ve düzenlemede merkezi bir işlevi olan önemli bir düzenleyici sitokindir. Bu sitokin, dört alfa sarmalının bir demetine katlanan büyük bir sitokin grubuna aittir. Makrofajlar, monositler, dendritik hücreler ve B lenfositleri, bakteri ürünlerine ve parazitlere yanıt olarak IL-12 üretir. Daha sonra, IL-12, hem NK hücreleri hem de yardımcı T hücrelerinden IFN-gamma ve TNF-alfa üretimini uyarır. Ayrıca Th0'dan Th1 üretimini sağlar ve serumda artan IgG ve mukozal IgA'ye neden olur. IL-12, hücre aracılı immüniteyi ve Th1 hücrel yanıtı teşvik etmek için bir aşı adjuvanı olarak büyük bir potansiyele sahiptir. IL-12 ile immünizasyon sadece uzun süreli ve stabil bir Th1 yanıtı teşvik etmekle kalmaz, diğer adjuvanlarla birlikte verildiğinde birincil Th1 yanıtını da artırır. Ancak sistemik uygulamanın çeşitli toksik etkileri bulunmaktadır. Klinik araştırmalarda böbrek kanserine ve ölüme neden olduğu; ancak doz ve uygulama sıklığının azaltılması durumunda bu etkilerin azaldığı gösterilmiştir. Burun içinden verildiğinde, IL-12 daha az sistemik IFN-gamma üretimine neden olmakta ve daha az patolojik doku değişikliği meydana getirmektedir, ancak bununla

birlikte immunitiyi sağlayacak şekilde CD3 + T hücre aktivasyonunun ve Th1 ile ilişkili immünooglobülinlerin arttığı gösterilmiştir (Stevceva ve ark., 2006). Kedilerde lösemi virus (FeLV) DNA aşısında etkili bir adjuvan olarak kullanılmaktadır (Spickler ve Roth, 2003).

IL-15: IL-15, etkinlik bakımından IL-2'ye benzemektedir ve aynı reseptörleri kullanmaktadır. T hücrelerinin proliferasyonunu, apoptozdan korunma, sitotoksik T lenfositleri hafızasını artırma, bağırsak epitel hücrelerinde proliferasyon, T lenfositlerin kemotaksisi, B hücre proliferasyonu ve mukozada IgA-üreten hücreye değişimini uyarma üzerinden etki gösterir. Sistemik ya da mukozal uygulamayı takiben daha kuvvetli hücrel ve humoral yanıtlar alındığı gösterilmiştir. Özellikle DNA aşılarında (Herpes Simpleks Virus-2) kullanımına ilişkin araştırmalar bulunmaktadır (Stevceva ve ark., 2006).

IL-2: Kuduz, *Haemaphysalis pleuropneumonia* ve Herpes viruslara karşı bağışıklığı artırdığı bilinmektedir. Bazı sitokinler için optimal bir doz bulunabilir, daha küçük dozlarda etkisiz ve daha büyük dozlarda toksik ve hatta immünoşüpresifdir (Eratalay ve Öner, 2001). Yüksek dozlarda IL-2, otoimmün hastalıklara neden olabilir (Hughes, 1998).

Polisakkaritler

Arpa, buğday, yulaf gibi bitkilerde bulunan polisakkaritlerden β -glukanların; bağışıklık stimülanı, antienflamatuvar, antimikrobiyal, etkileri olduğu bilinmektedir. Ayrıca oral β -glukan uygulamasının monoklonal antikorların etkisini artırdığı bildirilmektedir. β -glukanların suda çözünmeyen ve zor çözünen türevlerinin damar içi (iv) ve kas içi (im) uygulamalarda granüloma oluşumu, mikroembolizasyon, ağrı ve inflamasyon oluşumuna neden oldukları belirtilmiştir (Şöhretoğlu ve Uz, 2015).

Nükleik asitler

CpG dinükleotidi içeren DNA molekülünün doğrudan B hücrelerini ve dendritik hücreleri uyarır, böylece inflamasyon öncesinde sitokinlerin üretimini ve antijen sunan hücrelerin olgunlaşmasını / aktivasyonunu teşvik eder. Antijene spesifik immün yanıtları 5-500 kat artırır (Klinman, 2006). Nükleik asit aşıları (genetik aşılar), konak hücreye istenilen antijeni kodlayan genetik materyalin doğrudan ulaştırılması ve bağışıklığın oluşturulması temeline dayanır. Diğer adjuvanlara göre, güvenliklerinin iyi olması, bağışıklığın spesifik olarak antijene sağlanabilmesi, hem B hem de T hücre yanıtlarını uyarması, göreceli olarak ucuz maliyet ve üretim gibi avantajları bulunmaktadır. Ancak stabiliteilerinin düşük olması ve klinik olarak uygulama yollarının sınırlı olması gibi dezavantajları; günümüzde fiziksel yöntemlerle (elektroporasyon, sonoporasyon ve magnetofeksiyon gibi) çeşitli biyomateryallerin üretimi sayesinde aşılmakta ve kullanım alanları DNA ve RNA aşılarında giderek artmaktadır (ppolimer bazlı, peptid bazlı) (van den Boom ve ark., 2012).

Partikül antijen taşıma sistemleri

Lipozomlar: Lipozomlar, hücre zarlarına benzeyen kolesterol ve fosfolipid vezikülleridir. Bu adjuvanlar, lümen veya membran içindeki antijenlere etki ederler. Humoral bağışıkta görev alırlar ve bazı durumlarda aktivitelerini arttırmak için immunmodülatörler ile beraber kullanılırlar (Spickler ve Roth, 2003).

Virozomlar: Virozomlar yeniden yapılandırılmış influenza virüs membranlarının (HA membran proteinleri ve nörominidaz içeren) fosfatidilkolin ile takviye edilmiş özel bir proteolipozom sınıfıdır. Virozomlar, aşı antijenlerini doğrudan bir konak hücreye vermek için kullanılabilen, çoğalmayan bir

nevi “yapay virüsler”dir. Virozom yukarıda belirtildiği üzere, temel olarak bir virüsün zarf glikoproteinleriyle kaplı bir lipozomdur. İlgili patojene ilişkin antijenler, virozomun lümeni içerisinde yakalanır veya kimyasal olarak yüzey kısmına çapraz bağlanır. Üzerindeki zarf proteinleri nedeniyle bir virozom, konak hücrelerine bağlanabilir ve enfekte ederek antijeni doğrudan MHC sınıf I antijen işleme yoluna iletebilir. Alternatif olarak, virozom APC üzerinden fagosite edilebilir. İnfluenza aşısı, influenza virüsünün HA proteinini lipozom olarak içeren virozomlu bir aşıdır (Gluck ve ark., 2005).

Virüs-benzeri partiküller: Virüs-benzeri partiküller (Virus Like Particules VLPs); partiküllere birleştirilen bir veya birden fazla viral kapsid ya da kapsid proteinlerini içeren yapılardır. VLP’ler APC tarafından alınabilir ve bunlardan üretilen peptidler, hücre yüzeyindeki MHC-1 molekülleri üzerinde sunularak, partikül oluşturulan proteinin kendisine (Hepatit B yüzey antijeni) ya da partikül oluşturulan protein ile füzyon olarak üretilen ilave peptid sekanlarına karşı CD8+ T hücre yanıtı verebilir (Antonis ve ark., 2006).

Polimerik mikroküreler: Polimerik mikroküreler, biyolojik olarak parçalanabilir olması, düşük toksisitesi, yavaş salınımı ve APC’leri hedef almaları nedeniyle sentetik peptitler dahil aşı antijenlerinin güvenli ve etkili bir şekilde tek dozda verilmesi için en çok çalışılan yardımcı maddeler arasındadır. Mikroküre yapıları içerisinde bir çok aşı antijeninin kapsüllendiği, poli (laktik/glikolik) asit (PLGA) mikroküreleri en yaygın kullanılanıdır. PLGA polimerlerinin mikropartikülleri in vivo olarak laktik ve glikolik asitler üretmek üzere bozunduklarından, kapsüllenmiş immünojenler yavaş

ve sürekli salınmaktadır; böylece çoklu immünizasyon gereksinimini ortadan kaldırmakta ve uzun süreli olarak antijen sunan hücreler de dahil olmak üzere lenfositlerin tekrar tekrar uyarılması sağlanır. Antikor üretimine ek olarak, PLGA mikropartiküllerinin fagositozu indüklediği ve alüminyum bazlı adjuvanların aksine hücrel immün yanıtı indüklemektedir. Ancak şu ana kadar hCG peptid antijenlerini içine alan PLGA mikrokürelerinin, güvenli (yağlı olmayan) sulu çözeltilerde uygulanmasında güçlü bağışıklık tepkisi oluşturması sınırlı kalmaktadır. Bunu aşmak amacıyla yardımcı adjuvanlar, normuramil dipeptid içeren yağda su bazlı yağ emülsiyonu ve mannit monooleat, yeterince yüksek antikor tepkisini arttırmak için eşzamanlı olarak (bir karışım olarak veya ayrı olarak) peptid içeren PLGA mikroküreleri ile uygulanmaktadır (Gupta ve ark., 1998).

Nano partiküller (Nano-beads): Aşı uygulamaları için nanoparçacıklar (NP)’ın kullanımı nanoaşılama olarak adlandırılmaktadır. Bu NP’lerin üretimi için biyoparçalanabilir polimerlerin kullanılması ise güvenli ve göreceli olarak güvenilir kabul edilmektedir. Fizikokimyasal özelliklerinden dolayı istenilen antijen salma profiline ve immünolojik yanıtlarına uyum sağlayabilmektedir. Partikül büyüklüğü antijene göre adapte edilmek üzere polimer konsantrasyonu ve sentez metodunda modifikasyonlarla değiştirilebilmektedir. Aşı uygulamalarında en yaygın kullanılan biyoparçalanabilir sentetik polimerler arasında PLGA, polilaktik asit (PLA) ve polikaprolakton (PCL) yer almaktadır. Biyoaktif molekül NP içerisine ankapsüle edilerek saklanabilir ve biyodegradasyon ile yavaşça salınabilir. Bir diğer yöntemde istenilen molekül elektrostatik ya da hidrofobik etkileşim ile NP yüzeyine tutturulabilir. NP’ler lenf nodlarında aşı

akümülyasyonunu takiben hücreyel ve humoral immun yolaklar üzerinden aşı etkinliğini arttırmaktadır (Gutjahr ve ark., 2016).

Toll benzeri reseptörler (Toll-like reseptörler): Bağışıklık sistemi, Toll benzeri reseptörler (Toll like receptor-TLR'ler), Nod benzeri reseptörler (NLR'ler) ve RIG-I benzeri reseptörler (RLR'ler) dahil olmak üzere patojen tanıyan reseptörler (PRR'ler) vasıtasıyla patojene bağlı moleküler desenleri (PAMP'ler) tanımaktadır. İnaktive veya zayıflatılmış virüs, bakteri veya toksin içerenler de dahil olmak üzere birinci nesil aşılarda, bu reseptörleri bağlayabilen molekülere sahip olarak doğal adjuvan aktivitesi içerebilir. Aşı antijeni olarak kullanılabilen bakteri hücre duvarları, bakteri DNA ve viral RNA, farklı TLR'leri tutabildiğinden ve TLR ifade eden i aktive edebileceğinden, TLR ligandları (TLRL'ler), yıllardır aşılarda kullanılmaktadır. Farklı TRLler (TRL2, 3, 4, 5, 7/8, 9, 11 gibi) farklı antijen uyarımı ile (bakteriyel DNA, lipopeptid, lipoprotein, flajellin, bakteriyel toksinler gibi) ile farklı immun uyarıma (Th1, NK aktivasyonu, antikor oluşumu) neden olabilmektedir (Duthie ve ark., 2011). TLR'lerin aktivasyonu, T hücresi farklılaşmasında yer alan belirli sitokinlerin ekspresyonunu indükleyerek antijene spesifik immünitinin indüklenmesine katkıda bulunurlar.

Bununla birlikte, yüksek toksisite, septik şok ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonları da bu adjuvan ile ilişkilendirilmiştir (Madera ve ark., 2016). Tüm bunlara ek olarak güçlü antikor yanıtlarının, Toll benzeri reseptörler'den bağımsız mekanizmalarla da elde edilebileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, C tipi lektin, Nod benzeri gibi Toll benzeri olmayan reseptör'lerin adjuvan tasarımında hedef olarak kullanılmaları konusunda daha derinlemesine araştırmalar yapılması gerekmektedir. Bu tip Toll benzeri olmayan reseptörlerin yeni ortaya çıkan

enfeksiyonlara ve küresel pandemilere karşı en iyi etkinliğe sahip ve güvenli bağışıklık yanıtlar oluşturabileceği ileri sürülmektedir (Kwissa ve ark., 2007).

ADJUVANLARA BAĞLI İSTENMEYEN ETKİLER

Adjuvanlar (Yardımcı maddeler), 60 yıldan fazla bir süredir pratik aşılamada bağışıklık tepkisini arttırmak için kullanılmıştır. Adjuvanların kimyasal yapısı, etki şekilleri ve yan etkilerinin profili oldukça değişkendir (Gupta ve ark., 1993).

Bağışıklık tepkileri istilacı mikroorganizmaları imha ettiğinde, doku hasarına neden olabilmekte ve bazı hastalıkların klinik belirtilerini ortaya çıkarabilmektedir. Bu olumsuz etkiler spesifik adjuvan ve antijen etkileşimleri ile etkilenir.

Yan etkiler lokal veya sistemik olarak sınıflandırılabilir. Önemli lokal reaksiyonlar ağrı, lokal inflamasyon, şişkinlik, enjeksiyon bölgesi nekrozu, lenfadenopati, granülom, ülser ve steril apsedir. Sistemik reaksiyonlar mide bulantısı, ateş, artrit, üveit, eozinofili, alerji, anafilaksi ve organa özgü toksisite ve immünotoksisiteyi içerir (Ruiz ve ark., 2017).

Adjuvan olarak önerilen ve bir sitokin olan IL-2'nin aşırı dozları, otoimmün hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir. Köpeklerde otoimmün antikorlar köpek distemper, kuduz ve parvovirüs aşılı ile aşılamayı takiben meydana gelen otoimmün hemolitik anemi arasında zamansal bir ilişki olduğu belirtilmiştir. Kedilerde, kuduz aşılı en sık yerel neoplastik olgularla bağlantılıdır. Örneğin bazı alım içeren aşılarda da koyunlarda büyük granülomlara neden olabilir. Granülomlar özellikle depo adjuvanları ile bağlantılıdır ve bu durumu çözmek

için haftalar veya aylar gerekebilir. Bundan kaynaklı olarak da karkasta verim kayıpları görülebilir.

Hayvanlarda aşı uygulamaları genellikle zorunlu olsa da bazı aşılarda piyasaya sürülmeden önce gerekli testlerden geçirilmeleri ve satışına başlandıktan sonra veteriner hekimlerin bu preparatlar ile ilgili rapor yazması bu bilgilerin açığa kavuşması için ve aşı güncellemeleri için önemlidir (Spickler ve Roth, 2003).

SONUÇ

Yeni nesil adjuvanlar, farklı etki mekanizmalarına ve farklı potansiyel olumsuz etkilere sahip çok çeşitli kimyasal bileşik çeşitlerini temsil eder. Araştırmalarda amaç daha az olumsuz etkisi olan daha etkili yardımcı maddeleri bulmak olmuştur. Yeni adjuvanlara ilişkin klinik deneyler halen devam etmektedir. Bir aşı için optimum adjuvan, hayvan türü, patojen, aşı antijeni, bağışıklık kazandırma yolu ve gerekli bağışıklık türüne bağlıdır.

Hücre dışı bakterilere karşı aşılarda için iyi adjuvanlar, hücre içi patojenler için mutlaka iyi adjuvanlar olmayacaktır. Mukozal adjuvanlar, spesifik özellikler gerektirebilir. Çoğu zaman, adjuvanların türlere de uyarlanması gerekebilir. Kediler inflamasyona karşı özellikle duyarlı ve aşımın neden olduğu sarkomlara duyarlı görünmektedir. Bu türlerde, kimyasal etkisi daha düşük olan adjuvanlara daha fazla öncelik verilmesi önemli olabilir. Bu düşünceler göz önüne alındığında, hayvan türlerine, cinslerine ve patojenlere göre uyarlanmış adjuvanları tasarlamak ve seçmek mümkündür.

TEŞEKÜRLER

Makale Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi intörn bitirme ödevinin bir kısmını kapsamaktadır. Değerlendirme ve katkılarından dolayı Doğukan KAYA'ya teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Aguilar, J. C., Rodriguez, E. G. (2007). Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*, 25(19), 3752-3762.
- Antonis, A. F., Brusckhe, C. J., Rueda, P., Maranga, L., Casal, J. I., Vela, C., & Langeveld, J. P. (2006). A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Vaccine*, 24(26), 5481-5490.
- Aucouturier, J., Dupuis, L., & Ganne, V. (2001). Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*, 19(17-19), 2666-2672.
- Christensen D. (2016). Vaccine adjuvants: Why and how. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 12(10), 2709-2711.
- Cloete, M., Dungu, B., Van Staden, L. I., Ismail-Cassim, N., & Vosloo, W. (2008). Evaluation of different adjuvants for foot-and-mouth disease vaccine containing all the SAT serotypes. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 75(1), 17-31.
- Duthie, M. S., Windish, H. P., Fox, C. B., & Reed, S. G. (2011). Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunological reviews*, 239(1), 178-196.
- Eralalay, A., Öner, F. (2001). Aşılarda ve Aşı Adjuvanları. *FABAD J. Pharm. Sci*, 25, 21-33.
- Exley, C., Siesjö, P., ve Eriksson, H. (2010). The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work?. *Trends in immunology*, 31(3), 103-109.
- Gluck, R., Burri, K. G., & Metcalfe, I. (2005). Adjuvant and antigen delivery properties of virosomes. *Current drug delivery*, 2(4), 395-400.
- Gupta, R.K., Chang, A.C., & Siber, G.R. (1998). Biodegradable polymer microspheres as vaccine adjuvants and delivery systems. *Developments in biological standardization*, 92:63-78.
- Gupta, R. K., Relyveld, E. H., Lindblad, E. B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S., & Gupta, C. K. (1993). Adjuvants—a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine*, 11(3), 293-306.
- Gutjahr, A., Phelip, C., Coolen, A. L., Monge, C., Boisgard, A. S., Paul, S., & Verrier, B. (2016). Biodegradable Polymeric Nanoparticles-Based Vaccine Adjuvants for Lymph Nodes Targeting. *Vaccines*, 4(4), 34.
- Hu, S., Concha, C., Lin, F., & Waller, K. P. (2003). Adjuvant effect of ginseng extracts on the immune responses to immunisation against *Staphylococcus aureus* in dairy cattle. *Veterinary immunology and immunopathology*, 91(1), 29-37.
- Hughes, H. P. (1998). Cytokine adjuvants: lessons from the past guidelines for the future?. *Veterinary immunology and immunopathology*, 63(1-2), 131-138.
- Jafari, M., Moghaddam Pour, M., Taghizadeh, M., Masoudi, S., & Bayat, Z. (2017). Comparative assessment of humoral immune responses of aluminum hydroxide and oil-emulsion adjuvants in Influenza (H9N2) and Newcastle inactive vaccines to chickens. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(1), 84-89.

- Kang, S., Min, H. (2012). Ginseng, the 'immunity boost': the effects of Panax ginseng on immune system. *Journal of ginseng research*, 36(4), 354.
- Kim, S. H., Samal, S. (2016). Newcastle disease virus as a vaccine vector for development of human and veterinary vaccines. *Viruses*, 8(7), 183.
- Klinman, D. M. (2006). Adjuvant activity of CpG oligodeoxynucleotides. *International reviews of immunology*, 25(3-4), 135-154.
- Knight-Jones, T. J. D., Edmond, K., Gubbins, S., & Paton, D. J. (2014). Veterinary and human vaccine evaluation methods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1784), 20132839.
- Kwissa, M. (2007). Adjuvan bilimi. *Expert Review of Vaccines*, 1(3), 160-173.
- Leroux-Roels, G. (2010). Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*, 28, C25-C36.
- Leroux-Roels, I., Roman, F., Forgius, S., Maes, C., De Boever, F., Dramé, M., & Leroux-Roels, G. (2010). Priming with AS03A-adjuvanted H5N1 influenza vaccine improves the kinetics, magnitude and durability of the immune response after a heterologous booster vaccination: an open non-randomised extension of a double-blind randomised primary study. *Vaccine*, 28(3), 849-857.
- Loehr, B. I., Babiuk, L. A. (2001). Immunization of livestock with DNA vaccines: current studies and future prospects. *Vaccine*, 19(17-19), 2474-2479.
- Madera, R., Gong, W., Wang, L., Burakova, Y., Llellish, K., Galliher-Beckley, A., & Bai, J. (2016). Pigs immunized with a novel E2 subunit vaccine are protected from subgenotype heterologous classical swine fever virus challenge. *BMC veterinary research*, 12(1), 197.
- Morel, S., Didierlaurent, A., Bourguignon, P., Delhay, S., Baras, B., Jacob, V., & Kielland, A. (2011). Adjuvant System AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine*, 29(13), 2461-2473.
- Petrovsky, N., Aguilar, J.C. (2004). Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunology and cell biology*, 82(5), 488-496.
- Phillips, C. J., Matyas, G. R., Hansen, C. J., Alving, C. R., Smith, T. C., & Ryan, M. A. (2009). Antibodies to squalene in US Navy Persian Gulf War veterans with chronic multisymptom illness. *Vaccine*, 27(29), 3921-3926.
- Podda, A., Del Giudice, G., & O'Hagan, D. T. MF59: a safe and potent adjuvant for human use. In *Immunopotentiators in modern vaccines*; 2nd ed. USA. Academic press publications; 2006. pp. 149-159).
- Ruiz, J.T., Luján, L., Blank, M., & Shoenfeld, Y. (2017). Adjuvants-and vaccines-induced autoimmunity: animal models. *Immunologic research*, 65(1), 55-65.
- Singh, M., O'hagan, D.T. (2002). Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharmaceutical research*, 19(6), 715-728.
- Siwicki, A. K., Krzyzanowski, J., Bartoszcze, M., Mizak, Z., Paluch, S., Szmigielski, S., & Pulverer, G. (1998). Adjuvant properties of killed *Propionibacterium avidum* KP-40 in vaccination of dogs against canine parvovirus. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 105(5), 186-190.
- Sjölander, A., Drane, D., Maraskovsky, E., Scheerlinck, J. P., Suhrbier, A., Tennent, J., & Pearse, M. (2001). Immune responses to ISCOM® formulations in animal and primate models. *Vaccine*, 19(17-19), 2661-2665.
- Song, X., Hu, S. (2009). Adjuvant activities of saponins from traditional Chinese medicinal herbs. *Vaccine*, 27(36), 4883-4890.
- Spickler, A. R., Roth, J. A. (2003). Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. *Journal of veterinary internal medicine*, 17(3), 273-281.
- Stärk, K. D., Regula, G., Hernandez, J., Knopf, L., Fuchs, K., Morris, R. S., & Davies, P. (2006). Concepts for risk-based surveillance in the field of veterinary medicine and veterinary public health: review of current approaches. *BMC health services research*, 6(1), 20.
- Sun, J., Hu, S., & Song, X. (2007). Adjuvant effects of protopanaxadiol and protopanaxatriol saponins from ginseng roots on the immune responses to ovalbumin in mice. *Vaccine*, 25(6), 1114-1120.
- Stevceva, L., Moniuszko, M., & Ferrari, M. G. (2006). Utilizing IL-12, IL-15 and IL-7 as Mucosal Vaccine Adjuvants. *Letters in drug design & discovery*, 3(8), 586-592.
- Şöhretoğlu, D., Uz, A. K. (2015) β -Glukanlar ve İmmün Sistem. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*. 35(2), 103-115.
- Tovey, M.G., Lalleman, C. (2010). Adjuvant activity of cytokines. *Methods in molecular biology*. 626:287-309.
- Van den Boom, J.G., Barchet, W., & Hartmann, G. (2012). Nucleic acid adjuvants: toward an educated vaccine. *Advances in Immunology*. 114: 1-32.
- Vogel, F. R. (2000). Improving vaccine performance with adjuvants. *Clinical Infectious Diseases*, 30 (Supplement 3), S266-S270.
- Yurdakök, K., İnce, T. (2008). Aşı adjuvanları. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 51(4), 225.
- Zhai, L., Li, Y., Wang, W., Wang, Y., & Hu, S. (2011). Effect of oral administration of ginseng stem-and-leaf saponins (GSLs) on the immune responses to Newcastle disease vaccine in chickens. *Vaccine*, 29(31), 5007-5014.