



**BAKTERİYEL AŞI ÜRETİMİNDE POLİ (D, L-LAKTİK-
KO-GLİKOLİK ASİT) (PLGA) BİYOPOLİMERİNİN
ADJUVANT ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

ZEHRA AKINCI

**Yüksek Lisans Tezi
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Hakan KALENDER**

KASIM-2018

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAKTERİYEL AŞI ÜRETİMİNDE POLİ (D, L-LAKTİK-KO-GLİKOLİK ASİT)
(PLGA) BİYOPOLİMERİNİN ADJUVANT ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEHRA AKINCI

142132107

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 16 Ekim 2018

Tezin Savunulduğu Tarih: 16 Kasım 2018

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Hakan KALENDER (F.Ü)

Diğer Jüri Üyeleri:

Doç. Dr. Neval BERRİN ARSERİM (D.Ü)

Dr. Öğr. Üyesi Erdal ÖBEK (F.Ü)

KASIM-2018

ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımın bütün aşamalarında bana destek olan, bilgi ve deneyimi ile sürekli beni destekleyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hakan KALENDER'e, çalışmalarımda bana yardım eden Araştırma Görevlisi M. Ali UYGUT'a, bu tezi MF.16.70 proje numarası ile destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)'ne çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımda bana yardımcı olan İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Anaerop Aşı Üretim Laboratuvarı Şefi Dr. Rüçhan ALP'e teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman yanımda olan, çalışmalarım esnasında manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

ZEHRA AKINCI
ELAĞIĞ-2018

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	V
SUMMARY.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ.....	VIII
KISALTMALAR.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Bağışıklık	1
1.2. Bağışıklığın Sınıflandırılması	2
1.3. Aşının Tarihçesi.....	2
1.4. Aşının Tanımı ve Önemi.....	3
1.5. Aşı Çeşitleri.....	4
1.5.1. Konvansiyonel Aşılar	4
1.5.1.1. Canlı aşılar.....	4
1.5.1.2. Ölü (İnaktif) Aşılar.....	5
1.5.1.3. Toksoid Aşılar.....	5
1.5.2. Biyoteknolojik Aşılar.....	5
1.5.2.1. DNA Aşıları.....	6
1.5.2.2. Rekombinant DNA Aşıları.....	6
1.5.2.3. Sentetik Peptit Aşıları.....	7
1.5.2.4. Antiidiotip Aşılar.....	8
1.6. Adjuvantlar.....	8
1.6.1. Alüminyum Bileşikleri.....	9
1.6.2. Freund Adjuvantı.....	9
1.6.3. Saponinler	10
1.6.4. Emülsiyonlar.....	10
1.6.5. Virozomlar.....	10
1.6.6. Bağışıklık Uyarıcı Kompleksler (ISCOMS).....	10

1.6.7. Sitokinler	11
1.6.8. Kitosan.....	11
1.6.9. Poli (D, L-Laktik-Ko-Glikolik Asit) (PLGA).....	11
1.6.9.1. Polimerik Nanopartikülleri Hazırlama Yöntemleri	16
1.6.9.2. PLGA Kullanılarak Geliştirilen Aşılar	19
1.7. Çalışmanın Amacı.....	20
2. MATERYAL ve METOT.....	21
2.1. Bakteri Suşu ve Standart Toksin	21
2.2. Deney Hayvanları.....	21
2.3. Poli (D, L-Laktik-Ko-Glikolik Asit) (PLGA).	21
2.4. Kimyasallar	21
2.5. Besiyerleri	22
2.5.1. Tarrozi Buyyon.....	22
2.5.2. Ardehali Besiyeri.....	22
2.5.3. Diğer Besiyerleri.....	23
2.6. Lowry Yöntemi ile Protein Miktarının Belirlenmesi İçin Kullanılan Çözeltiler.....	23
2.7. Aşı Üretim Çalışmaları.....	23
2.8. Alüminyum Hidroksit ile Adjuvantlama.....	24
2.9. PLGA Mikrosferlerinin Hazırlanması	26
2.10. Taramalı Elektron Mikroskop ile Mikrosfer Büyüklüğü ve Şeklinin Belirlenmesi	26
2.11. PLGA Mikrosferlerinin İçindeki Antijen Miktarının Belirlenmesi	27
2.12. Bağışıklık Kontrolü.....	29
3. BULGULAR.....	31
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	35
5. ÖNERİLER.....	40
KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ	52

ÖZET

Bu çalışmada, koyunların enfeksiyöz nekrotik hepatitis hastalığına karşı alüminyum hidroksit ve Poli (D, L-Laktik-Ko-Glikolik Asit) (PLGA) adjuvantları kullanılarak üretilen aşılarda kobaylarda oluşturduğu bağışıklık düzeyleri karşılaştırıldı.

C. oedematiens tip A (UK) suşu kullanılarak toksoit üretilti. Alüminyum hidrokside adsorbe edilmiş ve PLGA (laktid/glikolid oranı: (50/50), moleküler ağırlık: 30.000-60.000 dalton) ile enkapsüle edilmiş toksoit aşılarda hazırlandı. PLGA partikülleri içerisine toksoitin enkapsülasyonu çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle yapıldı. Enkapsülasyon işleminde toksoitin yapısının korunması için trehaloz ve $Mg(OH)_2$ kullanıldı. Enkapsülasyon işlemi sonunda protein antijenin yaklaşık % 88 oranında mikrosferler içerisine yüklendiği tespit edildi. Aşıların oluşturduğu bağışıklık düzeyini belirlemek için 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 aşılardan, ikinci ve üçüncü gruptaki kobaylardan tek doz aşılardan sonraki 15., 30. ve 45. günlerde kan örnekleri alınarak havuzlanmış serum örnekleri elde edildi. Kan serumlarındaki antikor düzeyi fare TNT (Toksin Nötralizasyon Test) ile belirlendi. Tek doz mikrosferli aşı ile çift doz alüminyum hidroksitli aşı uygulamalarından sonraki 30. ve 45. günlerde aynı düzeyde antikor (8 IU/ml) saptandı. Ancak 15. 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. Bu çalışmanın sonuçları tek dozlu veteriner aşılarının geliştirilmesinde PLGA biyopolimerinin kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak aşı geliştirme çalışmalarında farklı polimer tipi ve enkapsülasyon yöntemleri kullanılarak daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *C. oedematiens*, Aşı, Adjuvant, PLGA, Alüminyum Hidroksit

SUMMARY

Investigation of Adjuvant Effect of Poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Biopolymer in the Production of Bacterial Vaccine

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.

Toxoid was produced by using *C. oedematiens* type A (UK) strain. Toxoid vaccines adsorbed onto aluminum hydroxide and encapsulated in PLGA (lactide/glycolide ratio: (50/50), molecular weight: 30,000-60,000 dalton) were prepared. Encapsulation of toxoid in PLGA particles was performed by double emulsion solvent evaporation method. Trehalose and $Mg(OH)_2$ were used to protect the toxoid structure in the encapsulation process. At the end of the encapsulation process, the loading capacity of protein antigen into the microspheres was found to be approximately 88%. Male guinea pigs 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 and pooled serum samples were obtained. Antibody levels in the pooled serum samples were determined by the mouse TNT (Toxin Neutralization Test). 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). The results of this study show that PLGA biopolymer can be used in the development of single dose veterinary vaccines. However, more extensive studies should be done by using different polymer types and encapsulation methods in vaccine development studies.

Keywords: *C. oedematiens*, Vaccine, Adjuvant, PLGA, Aluminum Hydroxide

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Mikroorganizmaların saldırısından korunma ve yanıt.....	1
Şekil 1.2. Rekombinant hepatit B aşısının üretimi.....	7
Şekil 1.3. PLGA biyopolimerinin hidrolizi.....	13
Şekil 1.4. PLGA polimerinin biyobozunumunu etkileyen faktörler.....	14
Şekil 1.5. PLGA ile kaplanmış antijenlerin yardımcı ve sitotoksik T lenfositlerine sunulumu.....	16
Şekil 1.6. Nanopartiküllerin tekli emülsiyon w/o çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanması.....	17
Şekil 1.7. Nanopartiküllerin ikili emülsiyon w/o/w çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanması.....	18
Şekil 1.8. Nanopartikül ile antijenin etkileşimi.....	18
Şekil 2.1. Aşı üretim şeması.....	25
Şekil 2.2. Kurutulmuş PLGA mikrosferlerin görünümü.....	26
Şekil 2.3. PLGA mikrosferlerin taramalı elektron mikroskop ile analizi.....	27
Şekil 2.4. Lowry metodunun uygulanışı.....	28
Şekil 2.5. PLGA mikrosferleri içerisindeki protein miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafiği.....	28
Şekil 2.6. Kobaylara deri altı yolla aşının uygulanışı	30
Şekil 2.7. Toksin+serum karışımlarının farelere kas içi yolla enjeksiyonu	30
Şekil 3.1. Gram boyama ile <i>C. oedematiens</i> bakterilerinin ışık mikroskobunda görünümü.....	31
Şekil 3.2. PLGA mikrosferlerinin SEM görüntüsü.....	32
Şekil 3.3. PLGA mikrosferli ve alüminyum hidroksitli aşılar ile aşılama sonrası oluşan antikor titreleri.....	34

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1.1. Bazı önemli adjuvantların etki tarzları.....	9
Tablo 1.2. Mikrokapsüllemede kullanılan polimerler.....	12
Tablo 1.3. PLGA kullanılarak hazırlanan aşıların bazı avantajları ve dezavantajları.....	13
Tablo 3.1. Alüminyum hidroksit adjuvantlı ve PLGA mikrosferli aşıların deney hayvanlarındaki bağışıklık sonuçları.....	33

KISALTMALAR

AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
AS03	: Adjuvant System 03
ASH	: Antijen Sunan Hücre
BCG	: Bacille Calmette Guerin
BSA	: Bovine Serum Albumin
CD	: Cluster of Differentiation
<i>C. oedematiens</i>	: <i>Clostridium oedematiens</i>
FDA	: Food and Drug Administration
GM-CSF	: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
gr	: Gram
IgG	: ImmunoglobulinG
ISCOMS	: Immune Stimulating Complexes
IU	: International Unit
L	: Litre
LPS	: Lipopolysaccharide
mg	: Miligram
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MLD	: Minimal Lethal Dose
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
MW	: Molecular Weight
nm	: Nanometre
o	: Oil
PGA	: Poliglikolik Asit
PLA	: Polilaktik Asit
PLGA	: Poli (D, L-Laktik-Ko-Glikolik Asit)
PPLO	: Pleuropneumonia-Like Organisms
rpm	: Revolutions per minute
Th	: T helper

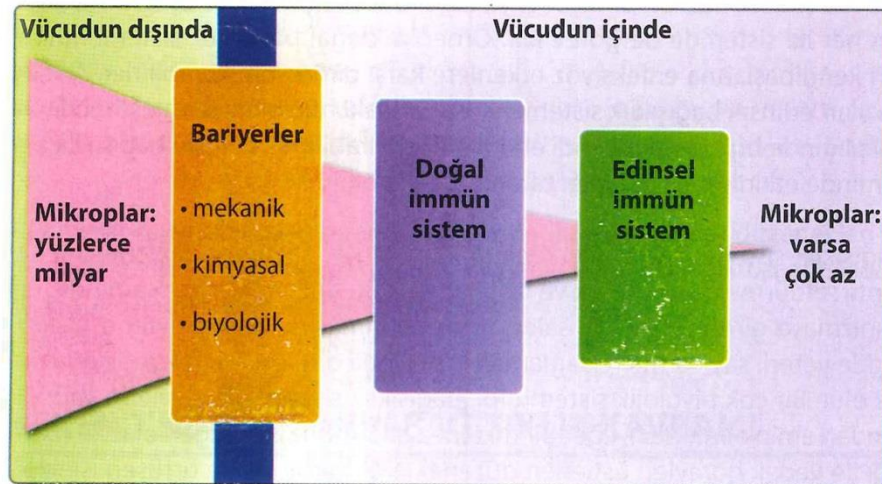
TNT : Toxin Neutralization Test
UV : Ultraviolet
w : Water
WHO : World Health Organization



1. GİRİŞ

1.1. Bağışıklık

Bağışıklık, vücuda giren veya verilen yabancı maddelere (mikroorganizma, toksin, toksoid, protein, polisakkarit vs.) karşı vücudun savunma sistemleri ile karşı koyması, kendini koruması ve zararlı maddeyi yok etmesi olarak tanımlanabilir (Arda vd., 1994). Canlıların savunma mekanizması “kendinden olmayan” organizma ve molekülleri kendi vücuduna ait “kendinden” olan ile ayırt edebilme yeteneğine sahiptir. Organizma kendinden olmayan yabancı maddeleri yok etmek için savunma sistemi hücrelerini kullanmaktadır (Doan vd., 2017). Vücutta bağışık yanıtın ortaya çıkmasına neden olan organizma ve moleküllere antijen adı verilir. Mikroorganizmalar (bakteri, virüs, mantar ve parazit) ve bazı moleküller (protein, polisakkarit gibi) antijenik özelliğe sahiptir (Diker, 1998). Vücudun mikroorganizmalara karşı savunma sisteminin ilk basamağı, vücudu koruyan mekanik, kimyasal ve biyolojik bariyerlerle sağlanır (Şekil 1.1). Bu bariyerler aşılsa önce doğal ve daha sonra edinsel bağışıklık sistemi olmak üzere savunma sisteminin ikinci ve üçüncü basamakları etkin hale gelir (Doan vd., 2017).



Şekil 1.1. Mikroorganizmaların saldırısından korunma ve yanıt (Doan vd., 2017).

1.2. Başışıklığın Sınıflandırılması

Başışıklık, doğal ve edinsel (kazanılmış) başışıklık olmak üzere iki şekilde ortaya çıkmaktadır. Doğal başışıklık, canlılarda doğal olarak bulunan ve canlıları hastalıklardan koruyan, organizmanın yapısal ve genetik özelliğinden kaynaklanan bir başışıklık çeşididir (Bilgehan, 1996; Doan vd., 2017). Doğal başışıklık özgül değildir ve canlıya zarar verebilecek tüm mikroorganizmalara karşı canlıları doğal olarak korumaktadır. Doğal başışıklık olayı enfeksiyon ajanlarına karşı mekanik engeller (deri ve müköz zarlar vs.), bazı hücreler (doğal öldürücü hücreler), bazı proteinler (kompleman ve interferon), fagositoz ve yangı gibi diğer olayları içeren savunma mekanizmalarını kapsar (Levinson, 2008). Edinsel başışıklık, bir etkenle temastan sonra şekillenen, kısaca sonradan kazanılan özgül başışıklıktır. Edinsel başışıklığın şekillenmesinde makrofajlar, B ve T lenfositleri birlikte çalışırlar. Bu hücreler kendi aralarında olan ilişkilerini ya doğrudan doğruya ya da sitokinler vasıtasıyla sağlarlar. Edinsel başışıklık aktif ve pasif başışıklık olmak üzere ikiye ayrılır. Aktif başışıklık hastalığı atlatarak veya aşılarla elde edilir. Pasif başışıklıkta bir bireye ait antikorlar, plasenta, kolostrum ve yumurta ile yavrulara aktarılır. Pasif başışıklığın diğer bir şekli ise bir hayvandan (veya insandan) elde edilen antikor içeren başışık serumların başka bir hayvana(veya insana) verilmesiyle elde edilir (Arda, 1994; Gülcü ve Arslan 2018). Edinsel başışıklık, fonksiyon gören immün sistem elemanlarına ve sonuçlarına göre humoral ve hücreyel başışık yanıt olmak üzere iki yolla elde edilir. Humoral başışık yanıt, B lenfositlerinin uyarılması ile başlayıp antikor üretimiyle sonuçlanan başışık yanıt şeklidir. Antikorlarla kazanılan bu başışıklığa humoral başışıklık denir. Hücreyel başışık yanıt, bazı T lenfositlerinin uyarılması ile şekillenen ve başta sitotoksik T lenfositleri olmak üzere çeşitli efektör hücrelerin aktivasyonu ile sonuçlanan başışık yanıt şeklidir. Hücrelerin daha etkin olduğu bu başışıklığa hücreyel başışıklık denir (Diker 1998; Doan vd., 2017).

1.3. Aşının Tarihçesi

İlk aşılama, Edward Jenner tarafından çiçek hastalığına karşı 1796 yılında uygulanmıştır. Jenner, çiçek hastalığına yakalanmış bir inekte oluşan püstülden (içinde irin bulunan kabarık lezyon) aldığı materyalle bir çocuğı aşılamış, bu çocukta oluşan püstül içerikleriyle diğer kişileri aşılayarak bu kişilerin insan çiçeğine karşı başışıklık

kazandıklarını kanıtlamıştır (Arda vd., 1994; Lin vd., 2015). Daha sonra 1885 yılında Louis Pasteur tarafından kuduz aşısının bulunması dünyada büyük bir yankı uyandırmıştır. Pasteur ayrıca tavuk kolerası ve şarbon hastalığına karşı aşığı keşfeden bir bilim adamıdır. Pasteur'ün öğrencileri olan L. C. Albert Calmette ve Camille Guérin, sığır tüberküloz etkenini 13 yıl besiyerinde pasaj yaparak kendi adlarıyla anılan insan verem aşısını (BCG, Bacille Calmette Guérin) 1921 yılında keşfetmişlerdir. Daha sonraki yıllarda aşı üretim teknolojisinin gelişmesiyle birlikte birçok hastalığa karşı aşılar üretilmiştir (Arda vd., 1994; Pasquale vd., 2015). Bununla birlikte geleneksel aşı üretim teknolojileriyle AIDS ve kanser gibi hastalıklara karşı etkili bir aşı elde edilememiştir (Silva vd., 2016).

1.4. Aşının Tanımı ve Önemi

Antibiyotikler bakterilerin sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılmakla birlikte, gerekli-gereksiz kullanılması hem ekonomik değildir hem de antibiyotik direnci şekillenebilir. Mikrobik hastalıklardan hayvanları korumanın en ekonomik ve başarılı yolu aşılama (Erganiş, 2010). Aşı genel anlamda, organizmaya verildiklerinde bağışık yanıtı yol açarak canlıyı hastalıklardan koruyan maddelerdir. Hem hücresel hem de humoral bağışıklık oluştururlar. Aşı olarak kullanılan maddeler, hastalık etkenlerinin ölü ya da hastalık yapma gücü zayıflatılmış mikroorganizmaları (atenue), mikroorganizmaların özel antijenik maddeleri ya da bunların hücre dışına saldıkları toksinlerin antijenleri olabilir (Bilgehan, 1996). Aşılar, insan ve hayvanları hastalıklardan korumak, hastalık etkenlerinin saçılmasını ve yayılmasını önlemek, hastalıkların morbidite ve mortalitesini en alt seviyeye indirmek, sağaltım masraflarını ve verim kayıplarını azaltmak vb. amaçlarla uygulanmaktadır (Karayel ve Alkan, 2015). Aşılar, hayvan popülasyonlarında enfeksiyöz hastalıkların koruma ve kontrolünde etkin rol alarak antibiyotik kullanımına olan ihtiyacı azaltabilir (Hoelzer, vd., 2018).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) belirlediği politikalar ile insanlarda görülen boğmaca, çocuk felci, difteri, *Haemophilus influenza* tip B, hepatit A, hepatit B, kabakulak, kızamık, kızamıkçık, pnömokok, suçiçeği, tetanoz ve tüberküloz gibi hastalıklar için aşılama programları birçok ülkede uygulanmaktadır. Bu kapsamda ülkemizde de Sağlık Bakanlığı tarafından “Genişletilmiş Bağışıklama Programı” başlatılmıştır (Gülcü ve Arslan, 2018). Dünyada düzenli aşılama programlarının sonucu olarak, 1980 yılında WHO tarafından çiçek hastalığının eradike edildiği deklare edilmiştir

(Lin vd., 2015). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının yayınladığı Hayvan Hastalıkları ile Mücadele ve Hayvan Hareketleri Kontrolü Genelgesi kapsamında şarbon, şap, koyun-keçi vebası, brusella, kuduz, koyun-keçi çiçeği, mavi dil ve sığırların nodüler ekzantemi hastalıklarına karşı aşılama programında yer almıştır (URL-1, 2018). Ülkemizde özel sektör tarafından üretilen veya ithal edilen klostridial aşılar (enterotoksemi, botulismus, enfeksiyöz nekrotik hepatitis, bradzot ve yanıkara aşıları) hayvanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Baş ve Alp, 2005; Aytekin vd., 2011).

1.5. Aşı Çeşitleri

Aşılar, canlı ve inaktif etken içermelerine göre canlı ve inaktif aşılar; mikroorganizma türüne göre bakteriyel, viral ve paraziter aşılar; hazırlanış yöntemlerine göre de konvansiyonel ve biyoteknolojik aşılar şeklinde sınıflandırılır (Diker, 1998).

1.5.1. Konvansiyonel Aşılar

Hastalıklardan korunmak için klasik yöntemlerle mikroorganizmalardan veya bunların toksinlerinden hazırlanan ve halen çok kullanılan aşılardır (Arda vd., 1994).

1.5.1.1. Canlı aşılar

Aşı içerisinde hastalık yapma gücü azaltılmış canlı mikroorganizma bulunur. Hastalık yapma yeteneğini kaybeden veya çok zayıflayan, fakat immunojenik özelliğini koruyan mikroorganizmalara uygulanan işleme atenüasyon ve bu mikoroganizmalardan elde edilen aşılar da atenüe aşı denir. Viruslar, protozoonlar ve bazı bakterilere karşı canlı aşılar hazırlanır. Hücre içinde yaşayan mikroorganizmaların öldürülmesinde sitotoksik T lenfositlerinin etkin olduğu hücresel bağışıklık en etkili savunma mekanizmasıdır. Canlı aşılar hücre içi mikroorganizmalara karşı etkin koruma sağlar ve uzun süreli bağışıklık oluşturur (Diker, 1998). Canlı aşılar hem hücresel hem humoral bağışıklık oluşturmakla birlikte aşı içerisindeki etken patojen özellik kazanarak immun yetmezliği olan canlılarda hastalığa yol açabilmektedir (Shams, 2005).

İnsanlarda kullanılan çiçek, kızamık, kabakulak, kızamıkçık, çocuk felci ve verem aşıları, hayvanlarda kullanılan *Brucella abortus* S19, *Brucella melitensis* Rev-1,

Newcastle, Marek, Gumboro, koyun çiçek ve kuduz (kelev) aşıları canlı aşılardır (Arda vd., 1994; Bilgehan 1996).

1.5.1.2. Ölü (İnaktif) Aşılar

İnaktif aşılar, kimyasal (formol, beta-propiolakton fenol) ve fiziksel (UV ışınları ve ısı) yöntemlerle öldürülmüş mikroorganizmaları içeren aşılardır. İnaktif aşılar ekzojen antijen olarak algılanır ve antijen sunan hücreler tarafından işlenip yardımcı T lenfositlerine sunulurlar. Antikorların ön plana çıktığı humoral bağışıklık oluştururlar (Diker, 1998; Altuğ vd., 2013). İnaktif aşılar örnek olarak insanlarda kullanılan tifo, tifüs, kolera, hepatit A, veba ve kuduz, hayvanlarda kullanılan kanatlı korizası, agalaksi ve koyun vibriosis aşıları verilebilir (Arda vd., 1994; Male vd., 2008; Altuğ vd., 2013). İnaktif aşılar saha koşullarında kararlı, düşük maliyetli ve çoğunlukla güvenli olmalarına karşın, canlı aşılar göre daha az etkindirler ve kısa süreli bağışıklık oluştururlar. Bu nedenle etkili bir bağışıklık oluşturmak için ölü aşılar adjuvant katılması ve rapel doz (tekrarlanan doz) uygulaması gerekmektedir. Rapel gerektiren aşılar hayvanlarda stres oluşturmakta ve verim kaybına yol açmaktadır. İnaktif aşılar endotoksinler gibi istenmeyen komponentlere bağlı yan etkiler şekillenebilir (Perrie vd., 2008; Büyüktanır, 2010).

1.5.1.3. Toksoid Aşılar

Bazı bakteriler insan ve hayvanlarda sadece toksinleriyle hastalık oluşturdıklarından, toksinlerin inaktive edilmesiyle hazırlanan aşılar toksoid aşı adı verilir. Toksoid aşılar, daha çok humoral bağışık yanıtı uyarmaktadır. Bu aşılar hücresel bağışık yanıtı çok az uyarırlar veya hiç uyarmazlar. Bu aşılar hazırlanırken detoksifikasyon için formaldehid gibi kimyasal maddeler katılır (Arda vd., 1994; Shams, 2005). İnsanlarda kullanılan tetanoz, difteri ve hayvanlarda kullanılan klostridial aşılar toksoid aşıdır (Male vd., 2008; Altuğ vd., 2013).

1.5.2. Biyoteknolojik Aşılar

Biyoteknolojik yöntemler kullanılarak hazırlanan, konvansiyonel aşılar göre daha etkili ve güvenli aşılar. Bu aşılar genellikle genetik mühendisliği teknolojisiyle

hazırlanırlar (Diker, 1998; Büyüktanır, 2010).

1.5.2.1. DNA Aşıları

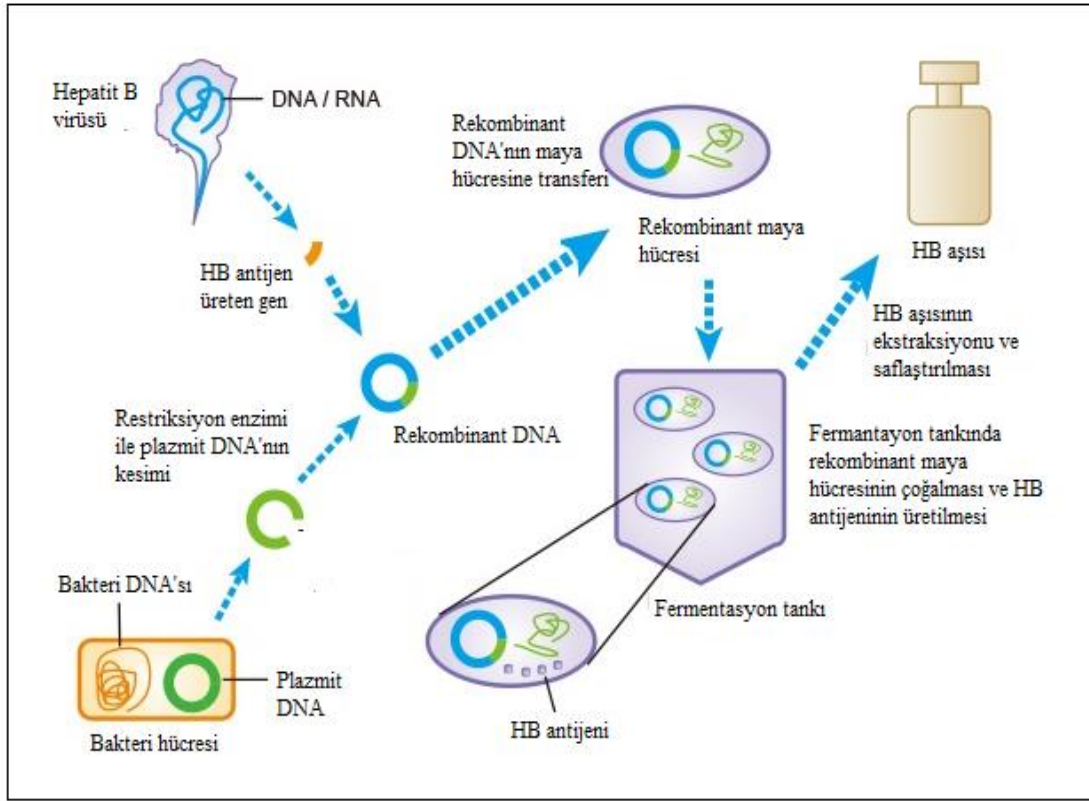
DNA aşıları mikroorganizmaların antijenik karakterdeki proteinlerini kodlayan genlerin yerleştirildiği ekspresyon plazmid vektörlerden oluşurlar. Antijenin kodladığı DNA parçası bir transkripsiyon başlatıcısı (promotor) ile plazmide yerleştirilerek elde edilir (Gülcü ve Arslan, 2018). Proteini kodlayan geni içeren plazmit DNA kas içi yolla verildiğinde aşı olarak kullanılır ve uzun süreli bir bağışıklık oluşturur (Nascimento ve Leite, 2012).

DNA aşılarının konvansiyonel aşılarından farkı gerçek bir patojen veya patojenlerin purifiye ya da rekombinant proteinleri olmamaları ve aşılama sonrası in vivo olarak sentezlenmeleridir. Bu nedenle DNA aşılarının hem humoral hem de hücresel bağışıklık açısından avantajları vardır (Scalk vd., 2006; Karayel ve Alkan, 2015). Canlı aşılarında aşı suşunun patojen fenotipe dönüşme ve aşı sonrası enfeksiyona yol açma riski olmasına karşın DNA aşılarında böyle bir durum söz konusu değildir (Dufour, 2001). DNA aşılarının dezavantajlarından birisi, plazmit DNA'nın hücresel DNA'ya entegre olmasıdır. Günümüzde entegre olan DNA aşılarının mutasyona neden olup tümör baskılayan genleri inaktive etmesi ve spesifik DNA sekanslarının anti-DNA antikorlarını indüklemesi ve otoimmün hastalıklara yol açabilmeleri bir endişe kaynağıdır (Glenting ve Wessels, 2005). DNA aşılarıyla aşılama sonucu, bağışıklık sistemine sunulan antijenler CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfosit hücre yanıtını uyardıkları için hem hücresel hem de humoral yanıt şekillenmesine yol açarlar. DNA aşılarının taşınması esnasında soğuk zincire gerek duyulmaması, antijenin ekspresyonu ile immün yanıtın sürekli uyarılmasına bağlı olarak uzun süreli bir bağışıklığın şekillenmesi gibi avantajları vardır (Grunathan vd., 2000; Dunham, 2002).

1.5.2.2. Rekombinant DNA Aşıları

Hastalık etkeninin antijenik komponentlerini kodlayan gen bir vektöre (plazmit, bakteriyofaj, virus gibi) nakledildikten sonra gen ürününü elde etmek için kullanılan vektör, konak hücreye aktarılır. Konak hücre olarak *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* kullanılır. Elde edilen ürün aşı olarak kullanılır (Şekil 1.2). Bir mikroorganizma çok sayıda antijenik komponent içermesine karşın bunların ancak bir kısmı koruyucu

immun yanıt oluşturma özelliği taşımaktadır. Aşı antijenin seçiminde en önemli husus enfeksiyon etkenlerinin yapısal ve biyolojik açıdan korunmuş ve koruyucu özelliklere sahip antijenlerinin belirlenmesidir. Bu koruyucu antijenlerin belirlenmesinde poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE), western blot, aminoasit ve gen dizi analizi gibi yöntemlerden yararlanılır (Henderson, 2005). *Saccharomyces cerevisiae*' da üretilen ilk subunit rekombinant hepatit B aşısı insan hekimliğinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Valenzuale vd., 1982). Veteriner hekimlikte, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* ve *Actinobacillus pleuropneumonia* enfeksiyonlarına karşı subunit aşılarla ilgili çalışmalar yapılmıştır (Oliveira ve Splitter, 1996; Nayak vd, 1998; Cassataro vd., 2005).



Şekil 1.2. Rekombinant hepatit B aşısının üretimi (URL-2, 2018).

1.5.2.3. Sentetik Peptit Aşıları

Hastalık etkenlerinin immunojenik komponentleri polipeptidlerden oluşur. Koruyucu bağışıklığı sağlayan peptitler kimyasal yöntemlerle sentezlenir ve aşı olarak kullanılır. Hepatit B, şap ve influenza A viruslarına karşı deneysel sentetik peptit aşıları geliştirilmiştir (Diker, 1998).

1.5.2.4. Antiidiyotip Aşılar

Antijen üzerindeki epitopa karşı oluşan monoklonal antikorlar deney hayvanlarına verilir. Monoklonal antikorlara karşı oluşan antiidiyotip antikorlar safşatırılıp aşı olarak kullanılır (Arda, 1994; Diker, 1998). *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria meningitidis* enfeksiyonlarına karşı antiidiyotip aşılar geliştirilmiştir (Bilgehan, 1996).

1.6. Adjuvantlar

Kendileri antijen olmadıkları halde antijenle birlikte organizmaya verildiklerinde antijenlerin immunojenik özelliğini artıran maddelere adjuvant denir (Bilgehan, 1996). Latince “adjuvare” yardım anlamına gelmektedir. Adjuvant kelimesi “adjuvare”den türemiştir (Lee ve Nguyen, 2015). İlk adjuvant 1920 yılında keşfedilmiştir (Ramon, 1925). Freund vd. (1937) mineral yağ, su ve ölü tüberküloz bakterilerinden oluşan bir adjuvantı bulmuşlar ve bu adjuvanta Freund adjuvantı adını vermişlerdir. Daha sonraları adjuvant aktiviteye sahip birçok madde bulunmasına karşın toksik etkilerinden dolayı aşılar da kullanımı kabul görmemiştir. İnsan aşılarında kullanım için onaylanan adjuvantlar sınırlı sayıdadır. Alüminyum tuzları, MF59, ASO3, virozomlar ve ASO4 adjuvantları lisanslı aşı adjuvantlarıdır (Lee ve Nguyen, 2015). Hayvan aşılarında hem alüminyum bileşikler hem de yağ emülsiyonları kullanılmaktadır. Freund’un tam olmayan adjuvantı halen kullanılmakla birlikte, Freund’un tam adjuvantı toksik etkisinden dolayı yasaklanmıştır. Adjuvantlarla birlikte alınan antijenlerin çoğu dentritik hücreler tarafından lenf nodüllerine taşınır. Dentritik hücreler, makrofajlar ve B lenfositleri gibi antijen sunan hücreler (ASH) antijeni işler ve büyük doku uyuşum kompleks molekülleri içerisinde T hücrelerine sunarlar (Spickler ve Roth, 2003). Adjuvantların değişik etki mekanizmaları vardır (Tablo 1.1). Antijenlerin depolanmalarını sağlayarak uzun süreli bir uyarıma neden olurlar. Ayrıca bağışıklığın şekillenmesinde görev alan hücrelerin uyarılması ve çoğalmalarını sağlarlar (Arda, vd., 1994; Aiyer-Harini vd., 2013; Gupta and Chaphalkar, 2015). Emülsiyonlar, mikropartiküller, ISCOMS (bağışıklık uyarıcı kompleksler) ve lipozomlar gibi adjuvantlar aşı salınım sistemi adjuvantları olarak görev yaparlar. Lipopolisakkarit, saponin, mononofosforil lipid A ve sitokinler gibi adjuvantlar immüno stimulator adjuvantlardır (Singh ve O’Hagan, 2003; Shams, 2005).

Tablo 1.1. Bazı önemli adjuvantların etki tarzları (Diker, 1998).

Tip	Adjuvant	Etki tarzı
Alüminyum tuzları	Alüminyum fosfat Alüminyum hidroksit Alum	Depo etkisi
Su-yag emülsiyonları	Freund'un tam olmayan adjuvantı	Depo etkisi
Bakteriyel fraksiyonlar	Anaerobik korinebakteri BCG Muramil dipeptid <i>Bordetella pertussis</i> LPS	Makrofaj uyarıcı Makrofaj uyarıcı Makrofaj uyarıcı Lenfosit uyarıcı Makrofaj uyarıcı
Yüzey aktif ajanlar	Saponin Lizolesitin Plunorik deterjanlar	Antijen işleme uyarıcı Antijen işleme uyarıcı Antijen işleme uyarıcı
Kompleks karbonhidratlar	Glukanlar Dekstran sülfat	Makrofaj uyarıcı Makrofaj uyarıcı
Karışık adjuvantlar	Freund'un tam adjuvantı	Makrofaj ve T hücre uyarıcı

1.6.1. Alüminyum Bileşikleri

Alüminyum tuzları, hem insan hem de hayvan aşılarında uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Uzun süre bağışıklık oluşturmak için genellikle birden fazla doza ihtiyaç duyulur. Bazen alerjik reaksiyonlar ve enjeksiyon alanında granulomların oluşmasına yol açabilirler (Spickler ve Roth, 2003). Genellikle Th2 hücrelerinin uyarılmalarını sağladıklarından humoral bağışıklığın şekillenmesinde etkindirler. İnsanlarda lisanslı hepatit A, hepatit B, difteri, tetanoz, hemofilus tip B, meningokok ve insan papilloma virüs aşılarında kullanılmıştır. Bu adjuvantlar bazı dezavantajlara sahiptirler. Alüminyum tuzları dondurulamaz, filtrasyonla sterilize edilemez ve liyofilize edilemezler (Gupta 1998; Lee ve Nguyen, 2015).

1.6.2. Freund Adjuvantı

Çok eskiden beri bilinen bir adjuvanttır. Su, yağ ve ölü tüberküloz bakterileri veya bundan elde edilen muramil-dipeptid katılarak hazırlanır. Buna Freund'un tam adjuvantı adı verilir. Ölü tüberküloz bakterileri içermeyen sadece mineral yağ ve sudan oluşan adjuvant, Freund'un tam olmayan adjuvantı olarak adlandırılır. Mineral yağ kısmı depo

etkisi oluştur. Muramil-dipeptid kısmı makrofajları ve yardımcı T lenfositlerini uyarır (Bilgehan, 1996; Diker, 1998; Male, vd., 2008).

1.6.3. Saponinler

Saponinler bitkilerde bulunan steroid veya triterpenoid yapıdaki glikozidlerdir. Güney Amerika’da *Quillaja saponaria* ağacından üretilen quil A isimli adjuvant veteriner aşılarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Arda vd. 1994; Aiyer-Harini vd., 2013). Saponinler immunomodölatör adjuvantlardır. Hem hücresel hemde humoral bağışık yanıtı uyarırlar (Spickler ve Roth, 2003).

1.6.4. Emülsiyonlar

Yağ emülsiyonlu adjuvantlar, su, yağ ve stabilizatör olarak bir sürfaktan maddeden oluşmaktadır. Aşı adjuvantı olarak emülsiyonlar uzun zamandan beri kullanılmaktadır. En bilinen aşı adjuvant emülsiyonu MF59’dur. MF 59 sitrat bufferi içindeki skualen, span 85 ve tween 80’den oluşur. MS59 adjuvantlı mevsimsel grip aşısı 1997 yılında Avrupa’da onaylanmıştır (O’hagan, 2007). Adjuvant olarak kullanılan skualen içeren diğeri bir emülsiyon AS03’dür (Del Giudice vd., 2018). AS03 içeren lisanslı H5N1 ve H1N1 influenza aşıları üretilmektedir (Lee ve Nguyen, 2015).

1.6.5. Virozomlar

Virozomlar, viral lipit ve glikoproteinlerden oluşan fakat virusun genetik bilgisini içermeyen yapılardır. Virozomlar uzun süre ve yüksek kalitede antikor oluşumuna neden olurlar. Antijenin yapısını korurlar ve güvenlidirler. Ayrıca çocuklar, yaşlılar ve immun sistemi baskılanmış kişilerde kullanım için uygundurlar. İnfluenza virusu için üretilen virozom aşısının Avrupa’da, hepatit A aşısının ise Asya, Avrupa ve Güney Amerika’da kullanımı onaylanmıştır (Riese vd., 2013).

1.6.6. Bağışıklık Uyarıcı Kompleksler (ISCOMS)

Saponin, kolesterol, fosfolipidlerin protein antijeni karışımından oluşan adjuvantlardır. Hayvan aşılarında kullanılmaktadırlar. QS-21 bileşiğinin toksik etkisinden

dolayı insan aşılarında kullanımı onaylanmamıştır. Diğer bir bileşik olan ISCOMMATRIX mukozal aşılarda etkili bir adjuvanttır. ISCOMMATRIX'in insan influenza, hepatit C ve papilloma virus aşılardaki etkinliğinin klinik denemeleri devam etmektedir. Th1, Th2 ve sitotoksik T hücrelerinin uyarımlarına neden olduklarından hem hücresel hem de humoral yanıtta etkin rol oynarlar (Spickler ve Roth, 2003; Lee ve Ngyuen, 2015).

1.6.7. Sitokinler

Sitokinler bağışık yanıtın şekillenmesinde vücuttaki çeşitli hücreler (makrofajlar, B ve T lenfositleri) tarafından salınan hormon benzeri maddelerdir (Bilgehan, 1996). Bazı sitokinlerin adjuvant etkisinin olduğu ortaya konmuştur. İnterferon gama ve koloni stimulan faktör (GM-CSF) gibi sitokinlerin son zamanlarda etkili bir adjuvant oldukları bildirilmiştir (Aucouturier vd., 2001).

1.6.8. Kitosan

Kitosan doğal bir polimer olup, makrofaj aktivasyonu, sitokin üretimi ve antikör sentezinin artışına neden olur (Shakya ve Nandakumar, 2013). Hepatit B aşısı üretiminde kitosan biyopolimeri denenmiştir (Prego vd., 2010). Diğer bir çalışmada ise, tetanoz toksoidi hem kitosan hem de PLGA polimerleri kullanılarak kobaylarda tek dozda etkili tetanoz aşısı geliştirilmiştir (Jaganathan vd., 2005).

1.6.9. Poli (D, L-Laktik-Ko-Glikolik Asit) (PLGA)

Antijenlerin kapsüllenmesinde ve kontrollü salınımı için çok farklı polimer tipleri kullanılmaktadır (Tablo 1.2). Nanopartiküller ilk kez 40 yıl önce aşılarda ve kanser tedavisinde kullanılan ilaçların taşınması amacıyla geliştirilmiştir (Kumar, 2000; Öztürk, 2010; Derman vd, 2013). Doğal veya sentetik polimerlerle hazırlanan nanopartiküllerin boyutları 10-1000 nm arasında değişmektedir (Derman vd., 2013). Polilaktik asit (PLA), Poliglikolik asit (PGA) ve bunların kopolimeri olan Poli (D, L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi biyobozunur ve biyoyumlu polimerlerden üretilen nanopartiküller ve mikropartiküller ilaç salınımı için yaygın olarak kullanılmaktadır (Cohen-Sela vd., 2009). PLGA doku mühendisliğinde ve aşılarda kontrollü salınımı için en fazla kullanılan ve FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanan bir polimerdir (Kerimoğlu ve

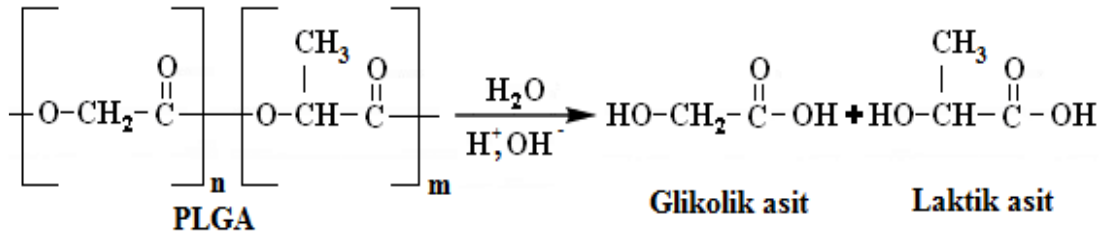
Alarçin, 2012). PLGA mikrosferli aşlar tek doz ile hem hücresele hem de humoral yanıtı uyarırlar (Shakya ve Nandakumar, 2013; Bailey vd., 2017).

Tablo 1. 2. Mikrokapsüllemede kullanılan polimerler (Lin vd., 2015)

	Polimerin tipi	Polimerik materyal
Doğal polimerler	Karbonhidratlar	Agaroz
		Aljinat
		Kitosan
		Polidekstran
		Nişasta
	Proteinler	Albümin
		Kollajen
		Jelatin
	Diğerleri	Kalsiyum karbonat
		Lipidler
Sentetik polimerler	Biyobozunmayanlar	Trikalsiyum fosfat
		Akrolein
		Glisidil metakrilat
		Laktidler
		Polianhidrid
		Polimetilmetakrilat
		Poliaminokarbonatlar
	Biyobozunanlar	Glikolidler
		Hidrojeller
		Parafin
		Poli(laktid)
		Poli (laktid-ko-glikolid)
		Poliakrilatlar
		Poliakriloitritil
		Poliamid
		Poli amino asitler
		Polikaprolaktonlar
		Poli etilen glikol
		Poliüretan

Polimerler aşı antijenini korur ve depo görevi yaparak antijenin kontrollü salınımını sağlarlar. Polimerik partiküllerin tek doz aşların ve mukozal aşların geliştirilmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Lin, vd., 2015). Klasik adjuvantlarla karşılaştırıldığında toksik

olmamaları, biyoyumlu ve biyobozunur olmaları önemli bir avantaj sağlamaktadır. PLGA, laktik ve glikolik asit monomerlerinden oluşan bir kopolimerdir. PLGA biyopolimerinin vücutta hidrolizi sonucu laktik ve glikolik asit oluşur (Şekil 1.3). Daha sonra bu ürünler, sitrik asit döngüsüne girerek vücuttan karbondioksit ve su olarak uzaklaştırılır (Kerimoğlu ve Alarçin, 2012; Derman vd., 2013).



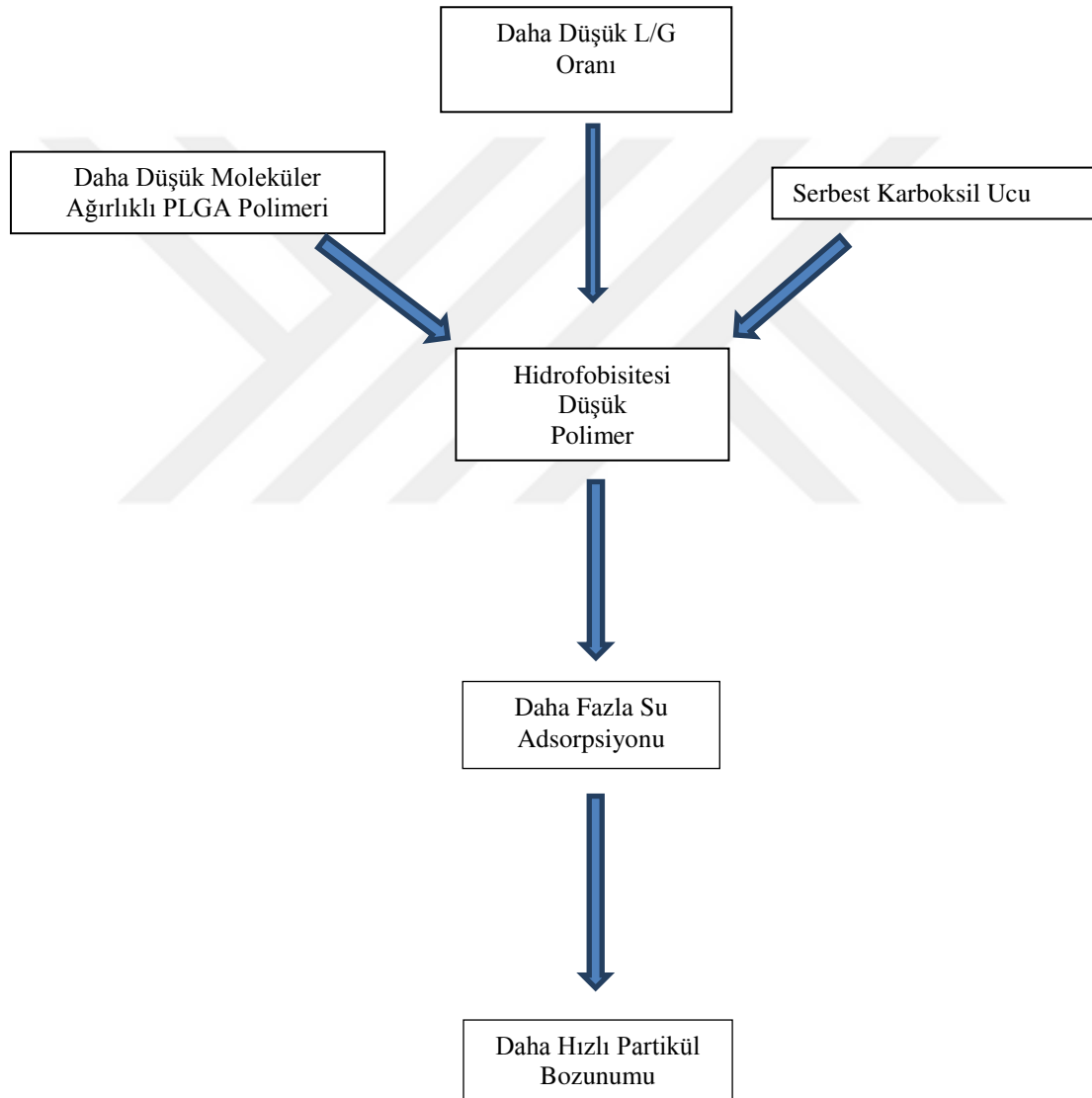
Şekil 1.3. PLGA biyopolimerinin hidrolizi (Derman vd., 2013).

PLGA'nın konvansiyonel adjuvantlara göre birçok avantajı olmasına karşın PLGA ile hazırlanan aşılarda bazı dezavantajları da bulunmaktadır (Tablo 1.3). PLGA partiküllerini hazırlama esnasında antijen kaybı görülebilir ve partiküller sterilize edilemez ve filtre edilemezler (Silva vd., 2016).

Tablo 1.3. PLGA kullanılarak hazırlanan aşılarda bazı avantajları ve dezavantajları (Silva vd., 2016).

Avantajları	Dezavantajları
• PLGA polimerleri biyolojik olarak parçalanabilirler ve FDA tarafından onaylanırlar. • PLGA partikülleri çeşitli yollarla verilebilir. • PLGA partikülleri aşı komponentlerinin toksitesini düşürebilir. • Partikül büyüklüğü, yüzey ve salınım özellikleri istenilen şekilde ayarlanabilir. • PLGA partikülleri antijenin kontrollü salınımını sağlar. • PLGA partikülleri antijeni korur. • PLGA partikülleri, antijenin sunan hücreler tarafından sürekli alınmasını sağlar.	• PLGA partiküllerinin negatif yükü partiküllerin alınması için dezavantaj oluşturur. • Antijenin özelliğine göre, PLGA partiküllerini hazırlama yöntemlerinin değiştirilmesi gerekir. • PLGA partikülleri sterilize edilemez ve filtre edilemez. • Hazırlama, depolama ve salınım esnasında antijen bozulabilir. • Çoğunlukla tam bir antijen salınımı gerçekleşmez. • Partikül büyüklüğü biyolojik bariyerlerden geçişi kısıtlayabilir.

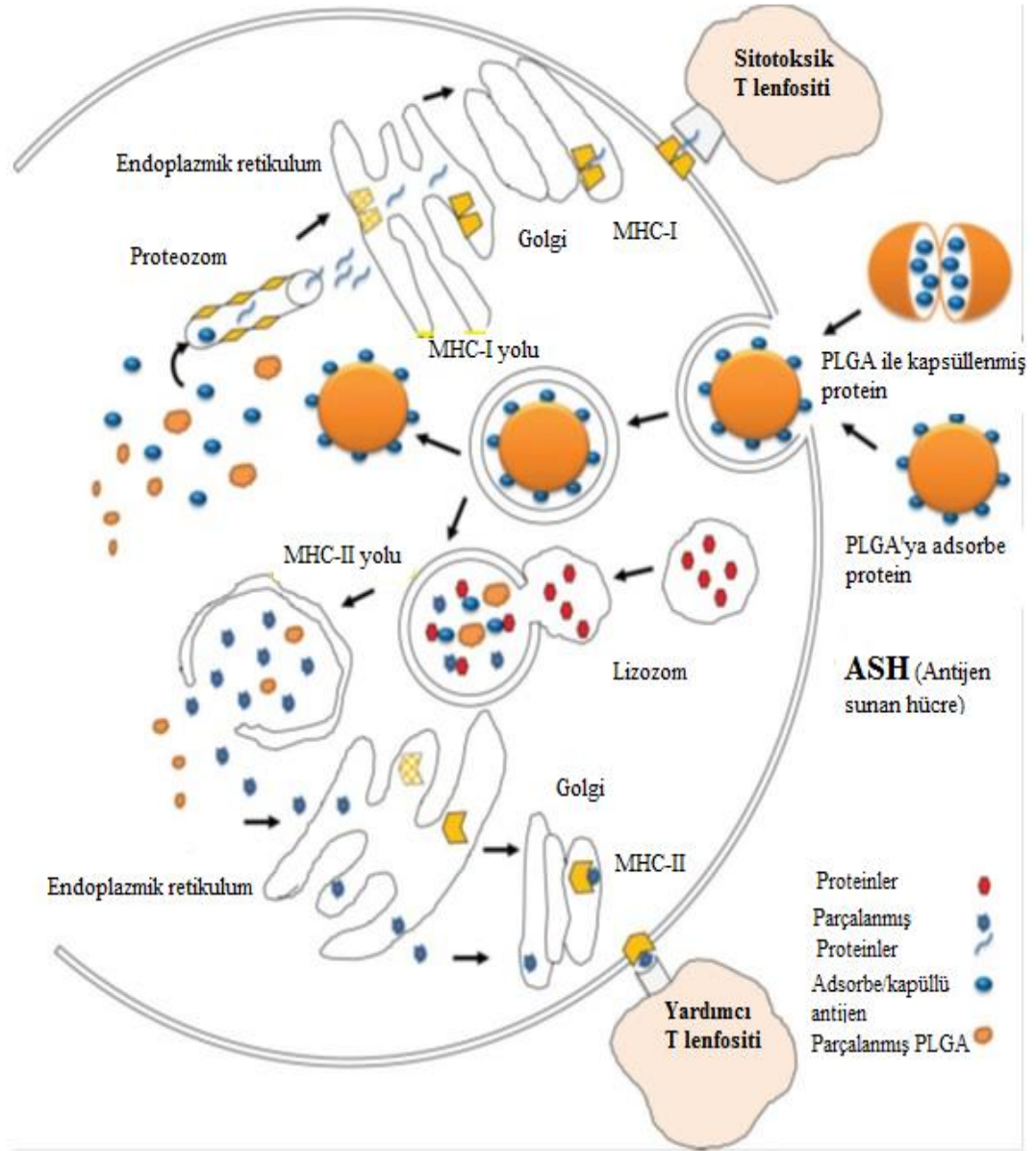
PLGA partikülleri hem CD4+ hem de CD8 + hücre yanıtını uyardıklarından hücre içi patojenlere karşı bağışıklık elde etmede tercih edilmektedirler. Polimerin moleküler ağırlığı (MW) antijenin salınım mekanizmasını etkiler. PLGA mikrosferlerinin başlıca avantajlarında biri seçilen polimerin molekül ağırlığı ve laktid/glikolid oranına bağlı olarak biyobozunurluk süresi birkaç günden başlayıp bir yıldan fazla sürebilmektedir (Woo, vd., 2018). Düşük moleküler ağırlıklı polimerden antijen salınımı daha hızlıdır (Şekil 1. 4).



Şekil 1.4. PLGA polimerinin biyobozunumunu etkileyen faktörler (Allahyari ve Mohit, 2016).

PLGA biyopolimerinin hidrofobisitesi arttığında daha yavaş biyobozunma meydana gelir (Johansen vd., 2000). Poli glikolik asitin yapısında metil grubu bulunmadığından poli laktik asitten daha hidrofiliktir (Giteau vd., 2008). Glikolik asitin oranı arttığında daha fazla su alımı gerçekleşir. Bu durum PLGA partiküllerinin miktarının azalmasına ve daha hızlı bozunmasına neden olur (Park, 1995). Molekül ağırlığı fazla olan polimerlerle karşılaştırıldığında, düşük molekül ağırlıklı polimerler daha iyi çözündüğünden kapsülleme sonunda daha küçük partiküller elde edilir. Daha küçük partiküller, antijenin yüzey alanının artmasına yardımcı olur. Daha hidrofobik materyaller kolaylıkla antijen sunan hücrelere girerler (Yang vd., 2001; Yeo ve Park, 2004). Hidrofobik partiküller makrofajlar tarafından daha etkili bir şekilde fagosite edilir. Bu yüzden hidrofobik polimerlerin aşı salınım sistemleri için uygun olabileceği bildirilmiştir (Convay vd., 1996; Johansen vd., 1999).

PLGA partikülleri ile alınan antijen, ASH tarafından 2 şekilde T lenfositlerine sunulur. Endojen antijenler ASH içerisinde işlenir. Burada antijenik protein parçalanır ve endoplazmik retikulumda Büyük Doku Uyuşum Kompleks (MHC) sınıf 1 moleküllerinin oluşuna yerleşir ve golgi aygıtıyla hücre yüzeyine sunulur. MHC sınıf 1 molekülleriyle sunulan antijeni sitotoksik T lenfositleri tanır. Bununla birlikte ekstraselüler antijenler endositik veziküller veya endozom içerisinde işlenir. Antijen, Büyük Doku Uyuşum Kompleks (MHC) sınıf 2 moleküllerinin oluşuna yerleşir ve aynı şekilde hücre yüzeyine sunulur. MHC sınıf 2 molekülleriyle sunulan antijeni yardımcı T lenfositleri tanır. ASH tarafından işlenen endojen antijenler sitotoksik T lenfositlerinin CD8 yüzey molekülleri ile ekzojen antijenler ise yardımcı T lenfositlerinin CD4 yüzey molekülleri ile etkileşime girerler (Şekil 1.5). Daha küçük partiküller epitel doku ve diğer biyolojik bariyerleri daha kolay geçerler. 20-200 nm arasındaki partiküller dentritik hücreler tarafından endositoz veya pinositoz yoluyla alınır ve hücresel immun yanıtı uyarır. Oysaki 0.5- 5 µm büyüklüğündeki partiküller fagositoz veya pinositoz yoluyla alınır ve genellikle humoral yanıtı uyarırlar (Oyewumi vd. 2010; Silva vd., 2016).

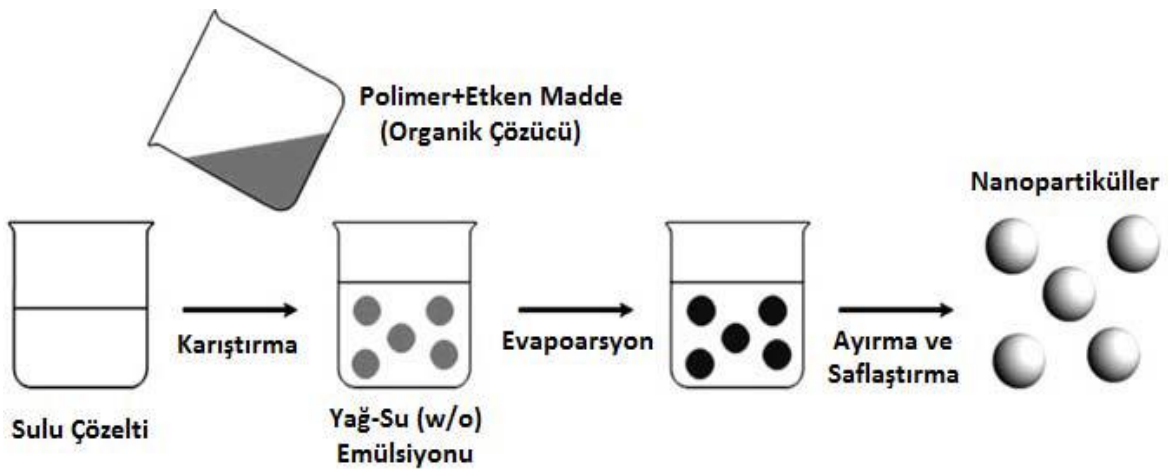


Şekil 1.5. PLGA ile kaplanmış antijenlerin yardımcı ve sitotoksik T lenfositlerine sunulumu (Allahyari ve Mohit, 2016).

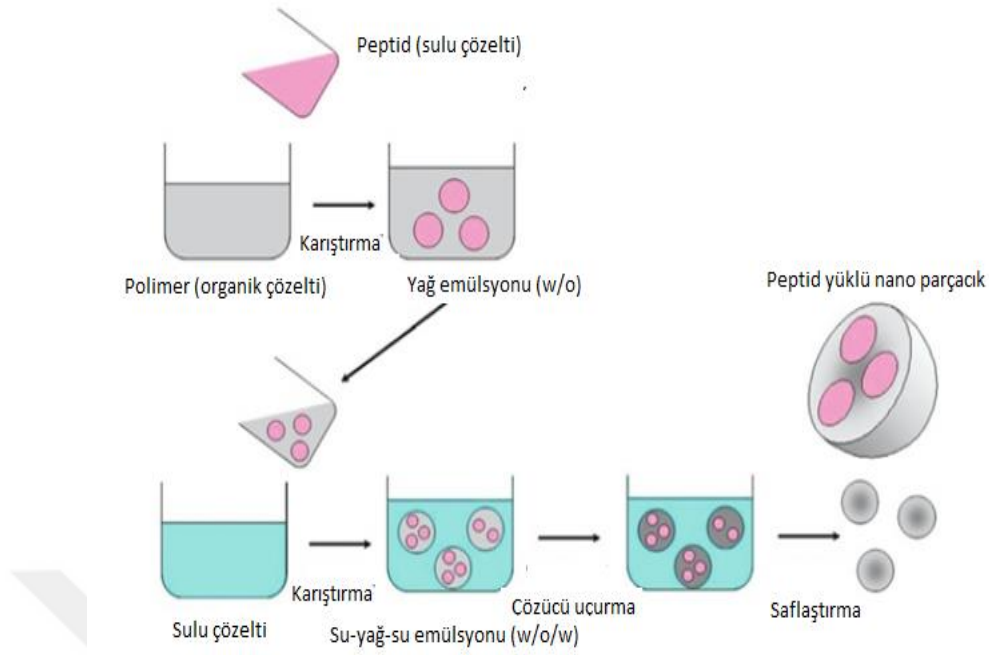
1.6.9.1. Polimerik Nanopartikülleri Hazırlama Yöntemleri

Polimerik nanopartikül hazırlamada farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar içerisinde emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniği en fazla kullanılan yöntemdir. Bu yöntem tekli ve çiftli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemleri şeklinde iki türlü uygulanmaktadır. Her iki yöntemde de sürfaktan olarak polivinil alkol kullanılır.

Hazırlanan mikropartiküller santrifüj edilerek ayrılır, kurutulur veya liyofilize edilir (Derman vd., 2013; Allahyari ve Mohit, 2016). Tekli emülsiyon (w/o) çözücü difüzyon/evaporasyon yönteminde etken madde ve polimer organik çözücüde çözündürülür ve sulu ortama aktararak nanopartikül üretilir (Şekil 1.6). İkili emülsiyon (w/o/w=su/yağ/su) yönteminde etken maddenin sulu çözeltisi polimer içeren çözeltiye aktarılır. Oluşan w/o emülsiyonu sulu faz içerisinde emülsifiye edilerek w/o/w ikili emülsiyon oluşturulur (Şekil 1.7). Çözücü buharlaştırılarak uzaklaştırılır ve nanopartiküller elde edilir (Derman vd., 2013). Püskürterek kurutma yönteminde protein içeren su yağ emülsiyonu atomizor kullanılarak sıcak hava yardımıyla kuru toz haline getirilir. Koaservasyon yöntemi bir faz ayırma tekniğidir. Protein gibi ilaçlar organik solvet içinde çözünmüş PLGA polimeriyle karıştırılır. Daha sonra bu emülsiyona PLGA'nın çözünürlüğünü azaltan çözücü olmayan bir madde eklenir. Böylece protein, PLGA'nın sıvı fazı içinde kapsülendir (Mundargi vd., 2008; Allahyari ve Mohit, 2016).

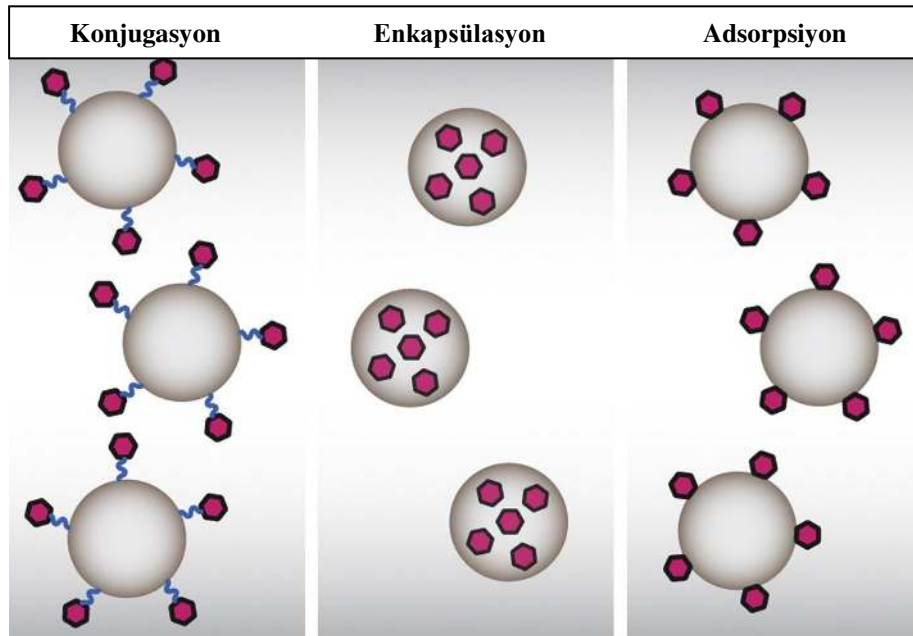


Şekil 1.6. Nanopartiküllerin tekli emülsiyon w/o çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanması (Derman vd., 2013).



Şekil 1.7. Nanopartiküllerin ikili emülsiyon w/o/w çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanması (Derman vd., 2013).

Nanopartikül ile antijenin etkileşimi, basit fiziksel adsorpsiyon veya daha kompleks yöntemlerle (kimyasal konjugasyon veya enkapsülasyon gibi) sağlanabilir (Şekil 1.8). Adsorpsiyon yönteminde nanopartikül madde ile antijenin etkileşimi nispeten zayıftır. Enkapsülasyon ve kimyasal konjugasyon yöntemleri daha güçlü bir etkileşim sağlarlar (Zhao vd., 2014).



Şekil 1.8. Nanopartikül ile antijenin etkileşimi (Zhao vd., 2014).

1.6.9.2. PLGA Kullanılarak Geliştirilen Aşılar

Son yıllarda insan aşılarının üretiminde PLGA'nın kullanımı ile ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır. Birden fazla dozda verildiğinde yeterli bağışıklığın elde edilebildiği toksoid aşılar alternatif olarak polimerlerle hazırlanan tek doz aşıların etkinliği üzerinde çalışmalar yürütülmektedir. Bununla birlikte hücre içinde yaşayan mikroorganizmalara (viruslar, bazı bakteriler ve protozoonlar) karşı aşı geliştirme çalışmalarında PLGA kullanımı giderek artmaktadır. Woo vd. (2018), difteri toksoidini düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı PLGA biyopolimerini kullanarak çift emülsiyon ve solvent ekstraksiyon tekniği ile kapsüllemişler, kapsüllemeye her iki polimer birlikte kullanıldığında alüminyum hidroksit adjuvantlı aşından daha güçlü bir bağışıklık elde ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, düşük moleküler ağırlıklı polimer ile hazırlanan mikrosferlerden antijen salınımının ilk 2 haftada yavaş olduğunu fakat 3-7 hafta arasında daha hızlı olduğunu, bununla birlikte daha büyük moleküler ağırlıklı polimer ile hazırladıkları mikrosferlerden antijen salınımının başlangıçta hızlı ve bağışıklık seviyesinin yüksek olduğunu saptamışlardır. Jaganathan vd. (2004), tek doz rekombinant hepatit B aşısını geliştirmek amacıyla yaptıkları çalışmada, protein stabilizatörü (trehaloz) ve antiasit madde ($Mg(OH)_2$) kullanarak çift emülsiyon yöntemi ile PLGA mikrosferleri hazırlamışlar, kobaylara aşırı tek doz verdiklerinde alüminyum hidroksitli aşının çift dozundan daha iyi bir bağışık yanıt elde ettiklerini bildirmişlerdir. Shi vd. (2002), PLGA ve alüminyum hidroksit kullanılarak üretilen hepatit B aşısının farelerde bağışıklık düzeyini karşılaştırmışlar, PLGA ve alüminyum hidroksit birlikte kullanıldığında, aşının tek dozunun, yalnız PLGA ile üretilen aşının tek dozundan ve yalnız alüminyum hidroksit ile üretilen aşının çift dozundan daha iyi bağışık yanıt oluşturduğunu bildirmişlerdir. Quintilio vd. (2009), herhangi bir stabilizatör madde kullanmadan difteri ve tetanoz toksoidlerini PLGA ile kapsülleyerek aşı üretmişler, PLGA ve alüminyum hidroksit birlikte kullanıldığında, aşının çift dozunun kobaylarda aşılama 112 ün sonra 60 IU/ml düzeyinde, bununla birlikte sadece alüminyum hidroksitli aşının çift dozunun 2 IU/ml düzeyinde antikor oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Li vd. (2016), PLGA ile hazırlanan boğmaca aşısının farelerde yeterli bir bağışıklık oluşturduğunu ve klasik aşılar alternatif olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Jaganathan vd. (2005), PLGA ve kitosan mikrosferli tetanoz aşısı ile çift doz alüminyum hidroksit adjuvantlı aşırı karşılaştırmışlar, 60. günün sonunda hemen hemen aynı düzeyde antikor titresi saptamışlardır. Aynı araştırmacılar kapsülleme işlemi

esnasında stabilizatör olarak trehaloz kullandıklarında antikor titresinin arttığını ve antijenin yapısının korunduğunu bildirmişlerdir. Khademi vd. (2018), verem hastalığı etkeni *Mycobacterium tuberculosis* antijenini PLGA ile kapsüllemişler ve farelerde güçlü bir immun yanıtın şekillendiğini bildirmişlerdir. Rosas vd. (2002), sıtma etkeni *Plasmodium falciparum*'un subunit SPf66 antijenini PLGA ile kapsülleyerek hastalığa karşı aşı geliştirmişler, aşılanan farelerde ve maymunlarda yüksek düzeyde antikor oluştuğunu saptamışlardır. Hayvan aşıları ile ilgili olarak da bazı çalışmalar yapılmıştır. Taha-Abdelaziz vd. (2018), *Campylobacter jejuni* antijenini PLGA ile kapsülleyerek tavukları oral yolla aşılamışlar ve hayvanların bağırsaklarında *C. jejuni* kolonizasyonunun azaldığını ortaya koymuşlardır. Sığır paratüberkülozu (Souza vd., 2017) ve kuş gribi (Avian Influenza) (Singh vd., 2016) hastalıklarına karşı PLGA mikrosferli aşılar geliştirilmiştir.

1.7. Çalışmanın Amacı

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 oedematiens* tip B'dir. Hastalığın oluşumunda bakterinin ürettiği özellikle alfa toksin önemli bir rol oynamaktadır. 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. Hayvan yetiştiricileri bazen aşının ikinci dozunun yapılmasını ihmal etmekte ve tek doz aşı hayvanları korumamaktadır. 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. Daha önce insan toksoid aşılarının geliştirilmesinde PLGA kullanılmış olmakla birlikte, bir hayvan aşısı olan enfeksiyöz nekrotik hepatitis toksoid aşısının geliştirilmesinde PLGA'nın ilk kez denenmesi son derece önemlidir.

2. MATERYAL ve METOT

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 alınmış olup, çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Koordinasyon Birimi tarafından MF.16.70 nolu proje ile desteklenmiştir.

2.1. Bakteri Suşu ve Standart Toksin

Aşı üretiminde kullanılan *Clostridium oedematiens* tip A (UK) suşu ve Toksin Nötralizasyon Testinde (TNT) kullanılan *C. oedematiens* tip A alfa (α) standart toksin (L+/20), Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığına bağlı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden satın alındı.

2.2. Deney Hayvanları

Üretilen aşının bağışıklık gücünü ölçmede kullanılan 400-500 gr ağırlığındaki 30 adet erkek kobay (Guinea pig) ile toksin titresinin belirlenmesi, detoksifikasyon kontrolü ve TNT testinde kullanılan 18-20 gr ağırlığındaki beyaz fareler Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden temin edildi.

2.3. Poli (D, L-Laktik-Ko-Glikolik Asit) (PLGA)

Antijenin kapsüllenmesinde PLGA (Sigma, lactide/glycolide: (50/50), MW: 30.000-60.000) biyopolimeri kullanıldı.

2.4. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan, polivinil alkol (Sigma), trehaloz (Merck), Mg(OH)₂ (Merck), metilen klorid (Sigma), maltoz (Acros), glikoz (Merck), NaCl (Merck), fenol (% 99.5) (Acros), L-sistein hidroklorid (Merck), sodyum ditiyonit ((Merck), alüminyum hidroksit (Across), demir sülfat (Across), bakteriyolojik pepton (Conda) ve formaldehid solüsyonu

(%37) (Merck) ticari firmalardan satın alındı.

2.5. Besiyerleri

C. oedematiens tip A suşunun üretimi için Tarrozi buyyon, toksin üretimi için Ardehali besiyeri kullanıldı (Ardehali vd., 1986; Baş ve Alp, 2005). Bu ortamlar aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

2.5.1. Tarrozi Buyyon

Yaklaşık 500 gr ağırlığındaki taze yağsız dana karaciğeri doğrandı ve içinde 1 litre distile su bulunan kap içerisinde kaynatıldı. Daha sonra karaciğer tanecikleri tülbentten süzülerek sıvıdan ayrıştırıldı. Karaciğer sıvısı bir balon içerisinde toplandı. Kaynatılan karaciğer parçaları distile suyla yıkandı ve zarları soyulduktan sonra bu parçalar vida kapaklı tüplere girebilecek büyüklükte doğrandı. Daha sonra aşağıda belirtilen ortam hazırlandı.

Et peptonu	10 gr
NaCl	5 gr
Glikoz	10 gr

Karaciğer sıvısı ve distile su ile hacim 1 litreye tamamlandıktan sonra pH 7.8'e ayarlandı.

Vida kapaklı tüplere doğranmış olan karaciğer parçalarından bir kısım ve yukarıda hazırlanan besiyerinden 2 kısım konduktan sonra 121 °C'de 15 dakika otoklav edildi. Ekim yapılmadan önce tüpler 20 dakika sürede kaynatıldı ve ekim ısisına kadar soğutulduktan sonra ekim yapıldı.

2.5.2. Ardehali Besiyeri

Pepton	40 gr
NaCl	2.5 gr
Karaciğer Ekstraktı	5 gr
Maltoz	10 gr

L-sistein HCL	1 gr	
Demir Sülfat Sol.	2.5 ml (0.1 gr FeSO ₄ , 2.5 ml 1/50'lik H ₂ SO ₄ içinde çözdürüldü)	
Sodyum ditiyonit	0.2 gr	
Distile su	1000 ml	pH:8

Yukarıda belirtilen maddeler distile suda çözdürüldü ve kaynama noktasına getirilerek 10 dakika bu ısıda tutuldu. Soğutma işleminden sonra dipte biriken sediment atıldı ve üstteki supernatant alındı. Supernatantın hacmi ölçüldü ve 2.2 katı distile su ilave edildikten sonra besiyeri sterilize edildi. % 50'lik glikoz solüsyonu membran filtreden (0.22 µm por çaplı) geçirildi ve % 1 oranında bu besiyerine eklendi.

2.5.3. Diğer Besiyerleri

Aşının inaktivasyonundan sonra canlılık kontrolü için kıymalı buyyon, nutrient buyyon (LAB M) ve nutrient agar (LAB M) besiyerleri kullanıldı. Canlılık ve sterilit kontrollerinde kullanılan kıymalı buyyon ile sterilit kontrollerinde kullanılan kanlı agar, PPLO agar ve sabouraud dextrose agar, Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden temin edildi.

2.6. Lowry Yöntemi ile Protein Miktarının Belirlenmesi İçin Kullanılan Çözeltiler

PLGA mikrosferleri içerisindeki protein miktarının belirlenmesinde aşağıda belirtilen çözeltiler kullanıldı.

Çözelti A: 0.1 M NaOH içeren % 2'lik Na₂CO₃ çözeltisi

Çözelti B: % 1'lik NaK tartarat

Çözelti C: % 5' lik CuSO₄

Çözelti D: 48 ml Çözelti A, 1 ml Çözelti B ve 1 ml Çözelti C alınarak hazırlandı.

Çözelti E: 2.5 ml folin fenol ve 2.5 ml distile su karıştırılarak hazırlandı.

Sığır Serum Albümini (BSA): 5 mg BSA 5 ml distile suda çözdürülerek hazırlandı.

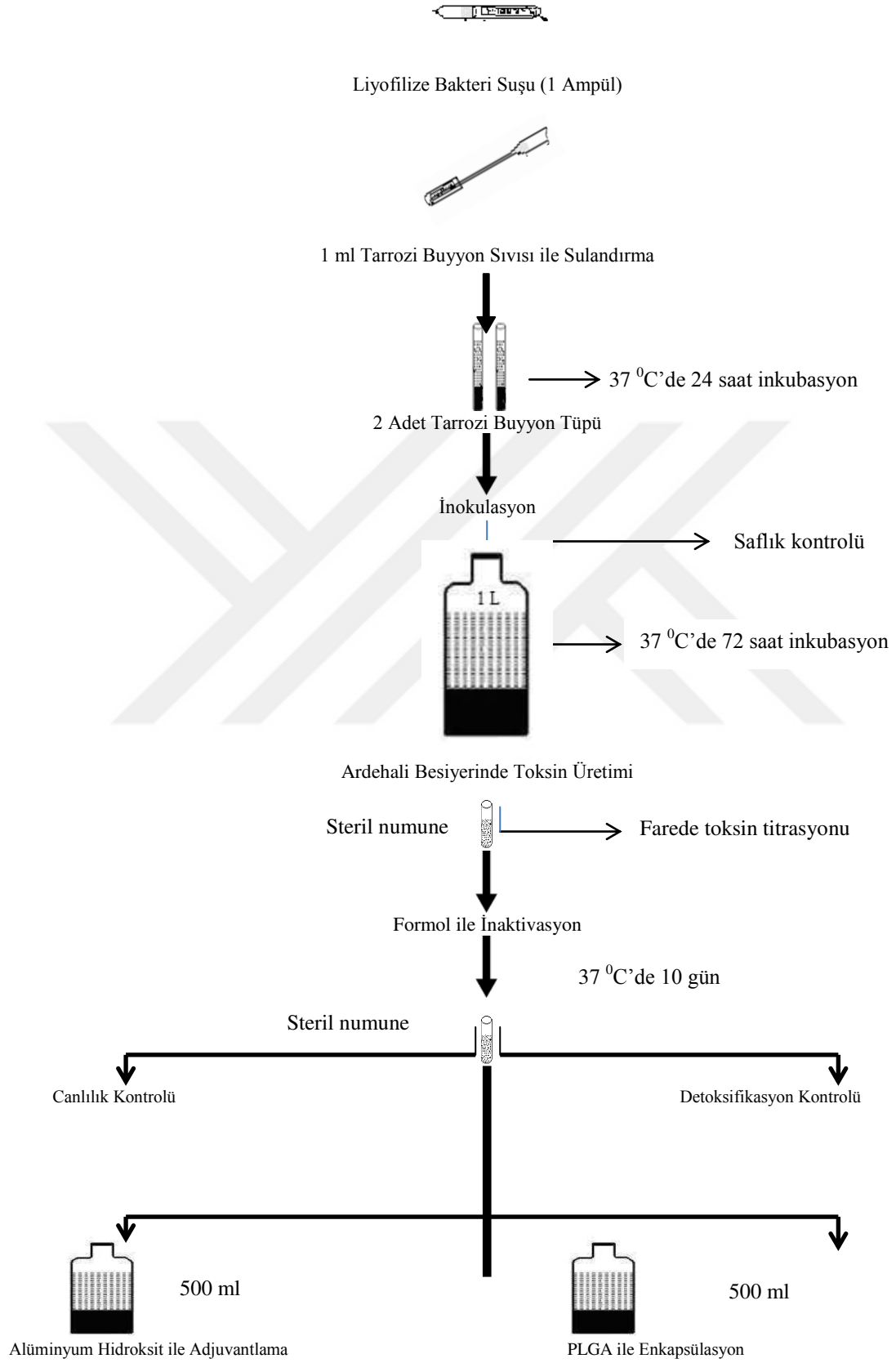
2.7. Aşı Üretim Çalışmaları

Liyofilize *C. oedematiens* tip A suşu 1 ml Tarrozi buyyon sıvısı ile sulandırıldı. Bu

sulandırmadan bir miktar alınarak daha önce kaynatılıp soğutulmuş iki adet Tarrozi buyyon tüplerine ekim yapıldı ve 37 °C’de 24 saat inkubasyona bırakıldı. Tarrazi buyyon kültüründen Gram boyama yapıldı ve besiyerlerine ekimler yapılarak saf olup olmadığı kontrol edildi. Saflık kontrolünden sonra Tarrozi buyyon kültürleri, içerisinde bir litre Ardehali besiyeri bulunan şişeye aktarıldı. Bu besiyeri 37 °C’de 72 saat anaerobik ortamda inkubasyona bırakıldı. Ardehali besiyerinde üreyen *C. oedematiens* kültürünün alfa toksin titresi belirlendi. Bunun için, kültür süpernatantının 100, 1/200, 1/400, 1/800 ve 1/1600 ‘lük dilusyonları hazırlandı ve her bir dilusyondan 18-20 gr ağırlığındaki iki beyaz fareye 0,2 ml miktarında arka bacak adalesine enjekte edildi. Fareler 72 saat gözlemlenerek MLD₅₀ /ml belirlendi. Titrasyon işleminden sonra, inaktivasyon için kültüre % 0.6 oranında formol katıldı ve 10 gün 37 °C’de bekletildi. İnaktivasyon işlemini takiben kültürden numune alınarak canlılık ve detoksifikasyon kontrolü yapıldı. Canlılık kontrolü için kıymalı buyyon, Tarrozi buyyon, nutrient buyyon ve nutrient agara ekim yapıldı ve besiyerleri 37 °C’de 1 hafta inkubasyona bırakıldı. Detoksifikasyon kontrolü için kültür süpernatantından 0,5’er ml alınarak 18–20 gr ağırlığındaki 2 beyaz fareye derialtı enjekte edildi ve fareler 7 gün boyunca gözlem altında tutuldu (Baş ve Alp, 2005). Daha sonra 1 litrelik kültürün yarısı alüminyum hidroksit ile adjuvantlama için ayrıldı. Diğer yarısı ise PLGA mikrosferlerinin hazırlanması için ayrı bir şişeye aktarıldı (Şekil 2.1).

2.8. Alüminyum Hidroksit ile Adjuvantlama

Herhangi bir bakteri ve aktif toksin içermediği belirlenen anakültür ve toksoid karışımına alüminyum hidroksit jeli %20 oranında ve % 80 lik fenol solüsyonu % 0.32 oranında katıldı. Oda ısısında bekletilen aşı 2 gün süre ile zaman zaman karıştırılarak adjuvanta adsorbe edildi. Sterilite kontrolü için; aerob bakteriler yönünden kanlı agara, anaerob bakteriler yönünden kıymalı buyyona, mikoplazmalar yönünden PPLO agara ve mantarlar yönünden sabouraud dextrose agara ekim yapıldı. Zararsızlık kontrolü için 2 adet kobaya derialtı yolla 0.5 ml aşı verilerek aşılandı ve lokal veya genel reaksiyonlar yönünden gözlem altına alındı. Aşı + 4 °C’de buzdolabında saklandı (Baş ve Alp, 2005).



Şekil 2.1. Aşı üretim şeması

2.9. PLGA Mikrosferlerinin Hazırlanması

PLGA mikrosferleri çift emülsiyon çözücü buharlaştırma metoduna göre hazırlandı (Jaganathan vd., (2005)). Kısaca, 2 ml toksoid içerisinde % 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 içerisinde boşaltıldı ve 1 saat karıştırıldı. Daha sonra santrifüj işlemi uygulanarak mikrosferler toplandı ve distile su ile yıkandı. Mikrosferler vakumlu desikatörde kurutuldu ve $+4^{\circ}C$ 'de buzdolabında saklandı. Bir aşı dozu (2 ml) toksoid miktarı kullanıldığında yaklaşık 1 gr kurutulmuş mikrosfer elde edildi (Şekil 2.2). Tüm hayvanları aşılayacak miktarda mikrosferler hazırlandı.



Şekil 2.2. Kurutulmuş PLGA mikrosferlerin görünümü

2.10. Taramalı Elektron Mikroskop ile Mikrosfer Büyüklüğü ve Şeklinin Belirlenmesi

Mikrosferin büyüklüğü ve şekli taramalı elektron mikroskop (SEM) ile incelendi. Bu işlem için Fırat Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunan Zeiss EVO MA10 marka taramalı elektron mikroskobundan faydalandı (Şekil 2.3). PLGA mikrosferlerinden küçük bir miktar alınarak numune tutucusunun üzerine yerleştirildi. Görüntü almadan önce örnek altın kaplama işlemine tabi tutuldu. Görüntüleme yöntemiyle mikrosferlerin şekli

incelendi ve çapları ölçüldü.



Şekil 2.3. PLGA mikrosferlerin taramalı elektron mikroskop ile analizi

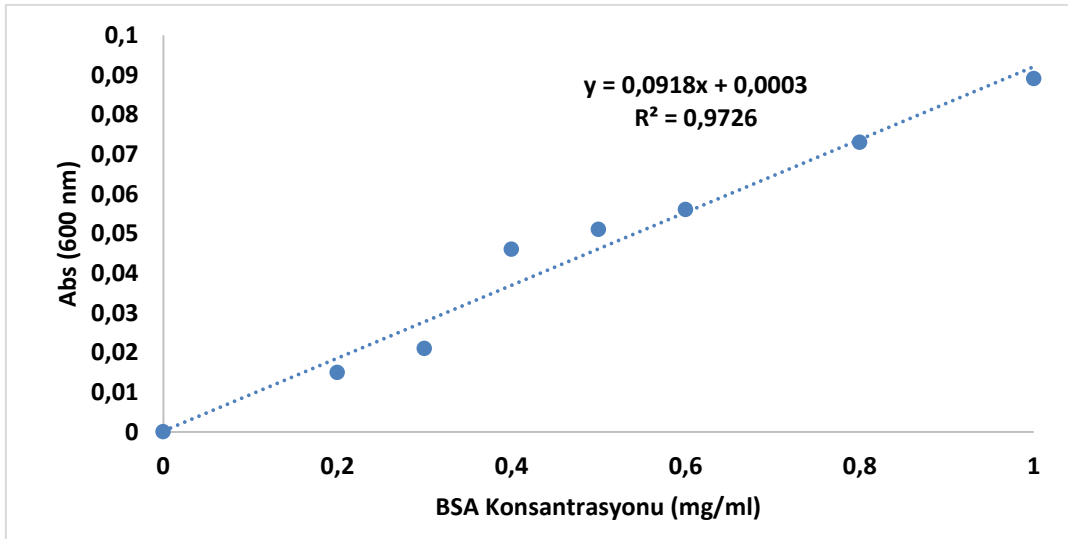
2.11. PLGA Mikrosferlerinin İçindeki Antijen Miktarının Belirlenmesi

PLGA mikrosferlerinin içindeki yüklü protein miktarını tespit etmek için % 5 sodyum dodesil sülfat içeren 0.1 M NaOH çözeltisinden 1 ml alınarak bir tüpe konu. zerine 5 mg mikrosfer eklendi ve çözdürüldü. Daha sonra 3000 rpm’de 4 dakika santrifüj işlemi uygulandı ve supernatant alınarak Lowry metodu ile analiz edildi (Rudra vd., 2011). Bunun için 1 mg/ml protein ihtiya eden sığır albumin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 l eklendi. Tüplere saf su ilave edilerek toplam hacim 100 l, olacak şekilde ayarlandı. Kr olarak bir tüpe 100 l saf su konuldu. Daha sonra her tüpe 2 ml zelti D eklendi ve oda ısısında 10 dakika bekletildi (ekil 2.4). Örnekler spektrofotometre küvetlerine konuldu ve UV spektrofotometre cihazı (Shimadzu UV-1800) kullanılarak 600 nm’de örneklerin kre karşı absorbansları okundu. Absorbans değerlerine karşılık gelen mg protein değerleri kullanılarak standart grafik hazırlandı (ekil 2.5). Numuneler içindeki protein miktarı standart grafikten elde edilen doğru denklemi kullanılarak hesaplandı (Quintilio vd., 2009; Ekmekci, 2016). Hem toksoid numuneden hem de mikrosferlerden 2’şer örneğin spektrofotometrede absorbansları okunarak

ortalamaları alındı. Mikrosferler içinde saptanan protein miktarı, başlangıçta kullanılan toksoid içerisindeki protein miktarına bölündü ve bulunan rakam 100 ile çarpılarak protein yüklenme oranı hesaplandı.



Şekil 2.4. Lowry metodunun uygulanışı

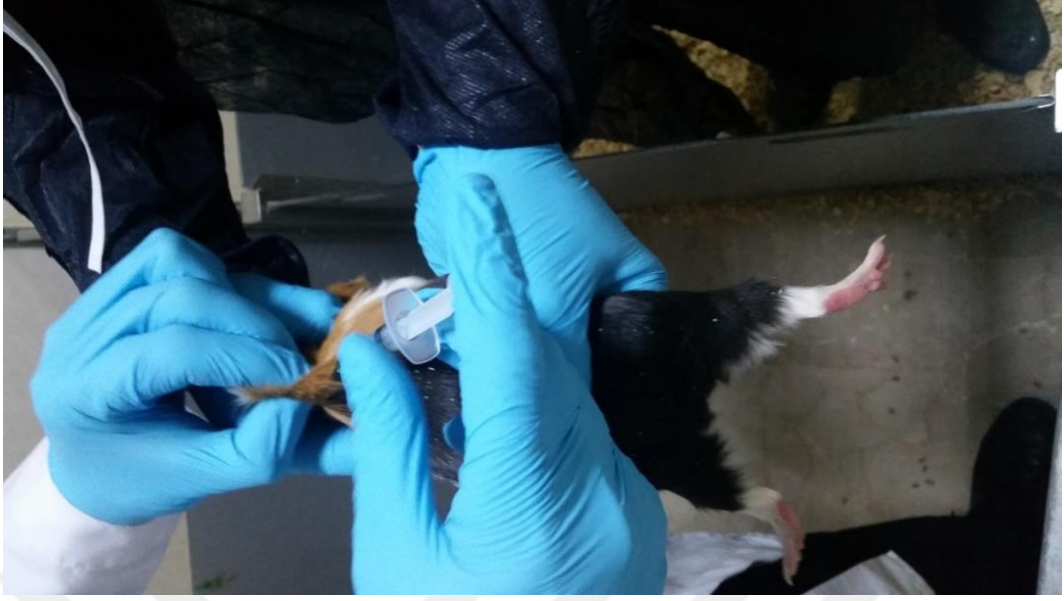


Şekil 2.5. PLGA mikrosferleri içerisindeki protein miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafiği

2.12. Başışıklık Kontrolü

Hayvanları başışıklamak için, kurutulmuş mikrosferler (15 gram) 30 ml PBS ile sulandırıldı. Alüminyum hidroksit adjuvantlı ve PLGA mikrosferli aşının başışıklık testleri için 400-500 gr ağırlığındaki erkek kobaylar kullanıldı. Her biri 10 kabaydan oluşan 3 grup oluşturuldu. Birinci gruptaki kobaylara 21 gün ara ile 2 ml allüminyum hidroksit adjuvantlı aşı deri altı yolla çift doz verildi. İkinci gruptaki kobaylara PLGA mikrosferli aşıdan 2 ml, üçüncü gruptaki kobaylara PLGA mikrosferli aşıdan 1 ml deri altı yolla tek doz enjekte edildi (Şekil 2.6). 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 (Baş ve Alp, 2005; Kılıç ve Kılınç, 2005). Bu testte, önceden letal dozu hesaplanmış *C. oedematiens* tip A alfa standart toksini (L+20, Dilüsyon Oranı: 1/6) kullanıldı. Her grupta aşıllı kobaylara ait serumların 1/2, 1/4, 1/5, 1/8, 1/16 ve 1/32 oranında dilüsyonları hazırlandı. Her grup için steril 6'şar adet tüp alındı. Tüplerin her birine yukarıda belirtilen oranda dilüe edilmiş standart toksinden 0.3 ml kondu. Birinci tüplere 1/2 oranında dilüe edilmiş serumdan, ikinci tüplere 1/4 oranında dilüe edilmiş serumdan, üçüncü tüplere 1/5 oranında dilüe edilmiş serumdan, dördüncü tüplere 1/8 oranında dilüe edilmiş serumdan, beşinci tüplere 1/16 oranında dilüe edilmiş serumdan ve altıncı tüplere 1/32 oranında dilüe edilmiş serumdan 0.3'er ml ilave edildikten sonra pipetle karıştırıldı. Toksin ve serum karışımları nötralizasyon için 37 °C'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra her karışımdan 2'şer beyaz farenin arka bacak adalesine 0.2 ml enjekte edildi ve fareler 72 saat gözlemlendi (Şekil 2.7). Ölümün olup olmasına göre sonuçlar değerlendirildi. Ayrıca standart toksinden 2 fareye 0,1'er ml dozunda kas içi verilerek toksinin kontrolü yapıldı.



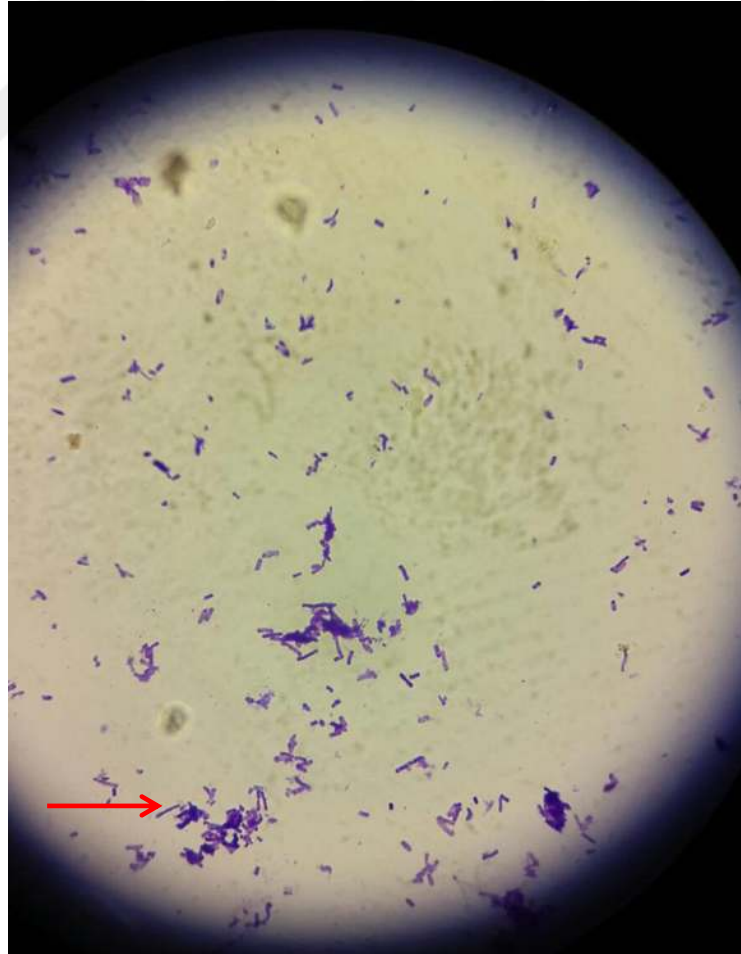
Şekil 2.6. Kobaylara deri altı yolla aşının uygulanışı



Şekil 2.7. Toksin+serum karışımlarının farelere kas içi yolla enjeksiyonu

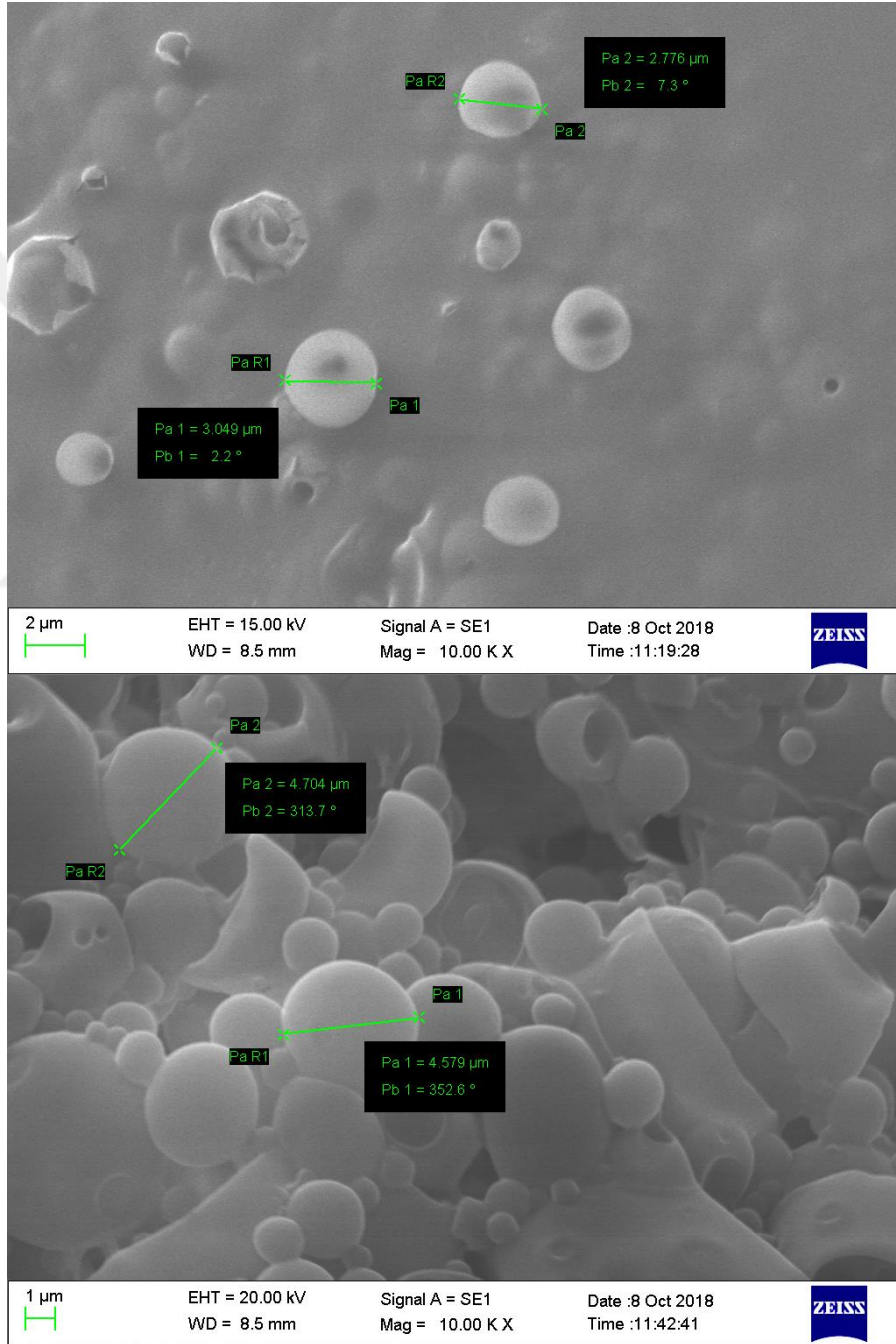
3. BULGULAR

Tarrozi buyyonda üreyen ana tohum suşu kültüründen yapılan Gram boyamada Gram pozitif, çomak şeklinde bazıları sporlu *C. oedematiens* bakterileri görüldü (Şekil 3.1). Saflık kontrolünde suşun saf olduğu belirlendi. Toksin üretim ortamı olarak kullanılan Ardehali besiyerinde üreyen kültürdeki *C. oedematiens* alfa toksin titrasyonunun 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 sterilité testinde herhangi bir üreme saptanmadı. Kobaylarda yapılan zararsızlık testi sonucunda, hayvanlarda herhangi bir olumsuz reaksiyon gözlemlenmedi.



Şekil 3.1. Gram boyama ile *C. oedematiens* bakterilerinin ışık mikroskopunda görünümü (x1000)

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 3.2).



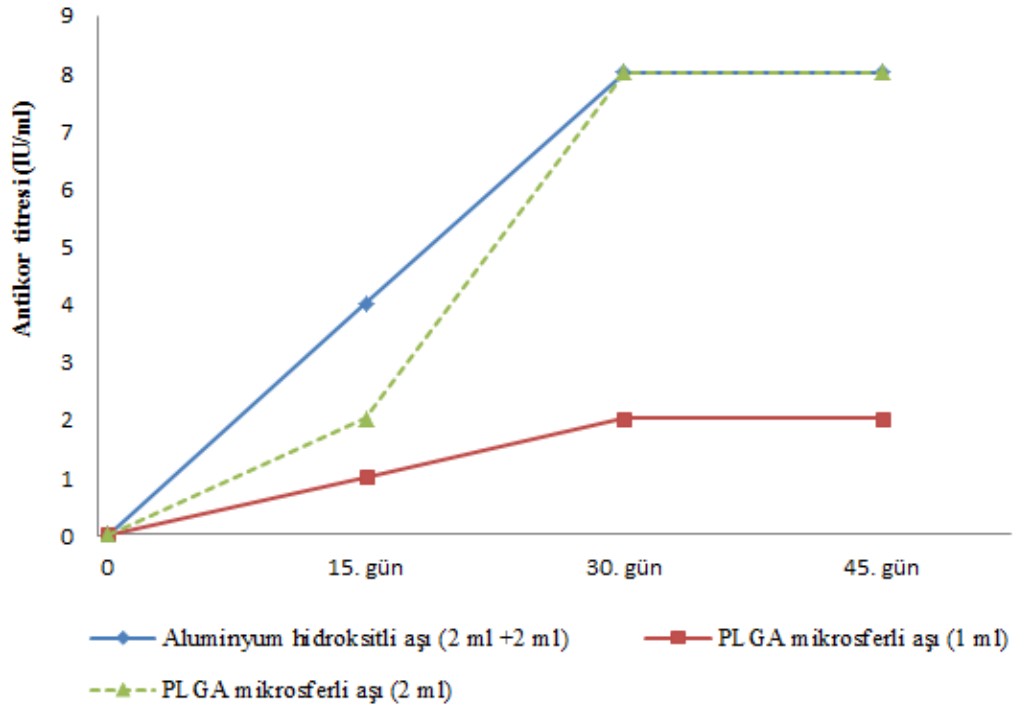
Şekil 3.2. PLGA mikrosferlerinin SEM görüntüsü

Alüminyum hidroksit adjuvantı katılmış aşı ile çift doz (2 ml+2 ml) aşılanmış kobayların kan serumlarında antikor düzeyi 15. günde 4 IU/ml, 30. ve 45. günlerde 8 IU/ml olarak belirlendi. Bununla birlikte PLGA mikrosferli aşı ile tek doz (2 ml) aşılanmış kobayların kan serumlarında antitoksin düzeyi 15. günde 2 IU/ml, 30. ve 45. günlerde 8 IU/ml, PLGA mikrosferli aşı ile yarım doz (1 ml) aşılanmış kobayların kan serumlarında antikor düzeyi 15. günde 1 IU/ml, 30. günde ve 45. günde 2 IU/ml olarak tespit edildi (Tablo 3.1).

Alüminyum hidroksit adjuvanlı aşı ile 2. aşılardan 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 saptanamadı (Şekil 3.3).

Tablo 3.1. Alüminyum hidroksit adjuvanlı ve PLGA mikrosferli aşının deney hayvanlarındaki bağışıklık sonuçları

Aşı Türü	Antikor titresi (IU/ml)		
	15. gün	30.gün	45. gün
Alüminyum hidroksitli aşı (çift doz)	4	8	8
PLGA mikrosferli aşı (tek doz)	2	8	8
PLGA mikrosferli aşı (yarım doz)	1	2	2



Şekil 3.3. PLGA mikrosferli ve alüminyum hidroksitli aşılardan sonra oluşan antikor titreleri

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

İnsan ve hayvan aşılarının geliştirilmesinde nanoteknolojinin kullanımı son yıllarda önem kazanmıştır (Kim, vd., 2014; Zhao vd., 2014). PLG ve PLGA gibi sentetik polimerler mükemmel biyobozunur ve biyouyumlu polimerlerdir. Bu nedenle nanopartikül hazırlamada yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Peek vd., 2008; Akagi, vd., 2012; Danhier vd., 2012). Sentetik polimerlere ilave olarak aljinat, inulin, pullulan ve kitosan gibi polisakkarit yapıdaki doğal polimerler de nanopartiküllü adjuvantların hazırlanmasında kullanılmıştır (Uenaka vd., 2007; Honda-Okuba vd., 2012; Li vd., 2013; Feng, vd., 2013). İnaktif aşılarda etkinliğini artırmak için aşılarda üretimi aşamasında çeşitli adjuvantlar katılır. Alüminyum bileşikler 90 yıldan fazla hem insan hem de hayvan aşılarının üretiminde kullanılan bir adjuvandır (Pasquale vd., 2015; Lee ve Nguyen, 2015). Alüminyum bileşiklerinin genellikle humoral bağışık yanıtı uyarması ve bu adjuvatların kullanılmasıyla üretilen inaktif aşılarda tek dozunun yeterli bağışıklığa yol açmaması dezavantaj oluşturmaktadır (Spickler ve Roth, 2003). Klasik adjuvantlara alternatif olarak, hem hücresel hem de humoral bağışık yanıtı uyaran bir polimer olan PLGA'nın, tek dozlu aşılarda geliştirilmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Bailey vd., 2017; Woo vd., 2018).

Bu çalışmada, laboratuvarında küçük ölçekli enfeksiyöz nekrotik hepatitis hastalığı aşısı üretilmiş ve adjuvant olarak alüminyum hidroksit ve PLGA biyopolimeri kullanılmıştır. Her iki adjuvant kullanılarak üretilen aşının kobaylarda oluşturduğu bağışıklık düzeyleri karşılaştırılmıştır. Aşılamadan sonraki 15. günde alüminyum hidroksit adjuvantlı çift doz aşının antikor titresi 15. günde 4 IU/ml iken, tek doz verilen PLGA mikrosferli aşının antikor titresi 2 IU/ml olarak belirlenmiştir. Ancak 30. ve 45. günlerde çift doz alüminyum hidroksit adjuvantlı aşı ile tek doz PLGA mikrosferli aşının antikor titresi aynı seviyede (8 IU/ml) bulunmuştur. PLGA mikrosferli aşı yarı doz (1 ml) verildiğinde uluslararası kabul edilen titrenin (2.5 IU/ml) altında bir titre elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, PLGA mikrosferli enfeksiyöz 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 tetanoz (Jagathan vd., 2005), difteri (Woo vd., 2018) ve hepatit B (Jaganathan vd., 2004; Sivakumar vd., 2008) aşılarda da yeterli bir

bağışıklık düzeyi elde edilmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, kapsulleme esnasında bir miktar protein antijeninin kaybına rağmen 30. günden sonra tek doz PLGA mikrosferli ve çift doz alüminyum hidroksitli aşının aynı düzeyde bağışıklık seviyesine ulaştığını göstermektedir. 15. günde PLGA mikrosferli aşının antikor titresinin düşük olması mikrosferler içerisinde ilk günlerde antijenin yavaş salınımından kaynaklanabilir. Polimerik partikül büyüklüğü, polimerin molekül ağırlığı ve hidrofobisitesi gibi faktörler antijen salınım süresini etkilemektedir. Düşük hidrofobisite ve daha küçük partikül büyüklüğüne sahip mikrosferden daha hızlı antijen salınımı gerçekleşir. Hidrofobisitesi yüksek ve daha büyük partiküllü mikrosferden antijen salınımı çok yavaştır (Johansen vd., 2000). PLGA polimerinin bozunma yarı ömrünün polimerin monomer kompozisyonuyla ilişkili olduğu, glikolid/laktid oranı 50/50 olduğunda bozunma yarı ömrünün minimum düzeyde gerçekleştiği bildirilmiştir (Miller vd., 1977; Cleland, 1995). 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 (Isobe vd., 1996). Diğer bir çalışmada ise, en yavaş hepatit B antijeni salınımı, laktid/glikolid oranı 50/50 olan PLGA polimeri kullanıldığında elde edilmiştir (Shi, vd., 2002). 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 (O'Hagan vd., 1993; Johansen, vd., 2007). Thomas vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, 5µm çapındaki hepatit B antijeni yüklü mikrosferlerin 12 µm çapındakilerden daha güçlü bir immun yanıt oluşturduğu saptanmıştır. Eldridge vd. (1991) tarafından yapılan çalışmada ise, stafilokok enteroksin B toksoidi yüklü 10 µm'den küçük PLGA mikrosferlerinin daha güçlü immune yanıt oluşturduğu belirlenmiştir. Joshi vd. (2012), ovalbümin antijeni yüklü 17 µm, 7 µm, 1 µm ve 300 nm büyüklüğündeki PLGA partiküllerin immun yanıt üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve daha küçük partiküllerin erken dönemde sitotoksik T lenfositlerini daha yüksek oranda aktive ettiklerini tespit etmişlerdir. Gutierro vd. (2002), 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. oedematiens* toksoidinin enkapsülasyonu için kullanılabileceğini göstermektedir.

Koyunların enfeksiyöz nekrotik hepatitis hastalığı etkeni olan *C. oedematiens* 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 en etkili toksin olup bu toksini içeren aşılardan koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Arda, vd., 1997; Blood ve Radostits, 1989). Amitmoto vd. (1998), 4 µg *C. oedematiens* alfa toksin içeren alüminyum fosfatlı aşığı kobaylara uygulamışlar ve tüm kobayların 10 IU ve daha fazla antikor titresine sahip olduğunu, 1 µg toksin içeren aşığı verdiklerinde 5 IU'nin altında antikor titresine sahip kobayların tümünün koruma testinde öldüğünü bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar kobaylardaki antikor titresini belirlemek için vero hücrelerini kullanarak toksin nötralizasyon testini uygulamışlardır. Yapılan bu çalışmada ise, kobaylarda antikor titreleri fare TNT ile ortaya konmuştur. Fare toksin nötralizasyon testinde aşıli hayvanlardan elde edilen serumlarla alfa toksin nötralize edilir ve farelerde ölüm olup olmamasına göre değerlendirme yapılır. Toksin titrasyonunun belirlenmesinde kullanılan in vitro testlerin in vivo testlere göre avantajları vardır. İn vitro testler daha güvenlidir ve çok sayıda farenin kullanılmasına ihtiyaç duyulmamaktadır (Hogarth-Scott vd., 1980). Bu çalışmaya benzer şekilde bazı araştırmacılar, enfeksiyöz nekrotik hepatitis hastalığı aşısının kobay antikor titrelerini belirlemek için fare TNT'ni kullanmışlardır (Kılıç ve Kılınç 2005; Baş ve Alp, 2005).

Bu çalışmada saptanan antikor titreleri, aynı suş kullanılarak Baş ve Alp (2005) tarafından hazırlanan monovalan ve kombine aşılardan elde edilen antikor değerinden (>10) biraz düşük bulunmuştur. Bu farklılık aşı hazırlama tekniğinin farklılığından kaynaklanabilir. Baş ve Alp (2005), 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. Kobayların aşılmasında her iki çalışmada da aynı hacimde aşı verilmekle birlikte konsantre edilmiş aşı içerisindeki antijen miktarının fazla olması daha yüksek oranda antikor oluşumuna neden olabilir. Nitekim Amitoo vd. (1998), *C. oedematiens* tip B toksoid aşısının kobaylara verdikleri aşı miktarını azalttıklarında antikor titresinin

düşüğünü belirlemişlerdir.

Aşı bağışıklık çalışmalarında elde edilen antikor titreleri hayvan türlerine göre değişebilmektedir. *C. oedematiens* aşısının bağışıklık çalışmaları tavşanlarda yapıldığında elde edilen titreler kobaylardan elde edilen titrelere göre 3-10 kat daha düşük bulunmuştur (Webster ve Frank, 1985). Baş ve Alp (2005), alüminyum hidroksitli *C. oedematiens* 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 Kılınç, (2005), 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 (Jaganathan vd., 2004). Protein stabilizatörü olarak sığır serum albümin (BSA), manntitol ve sükroz 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 (Jaganathan vd., 2005). Bununla birlikte, Quintilio vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, protein stabilizatörü içermeyen PLGA mikrosferleriyle kapsüllenmiş tetanoz ve difteri aşıları 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 vd. (2005), trehaloz ilave ederek tetanoz antijenini PLGA ve kitosan ile kapsüllediklerinde mikrosferler içine protein yüklenme oranını % 90'a çıktığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte bazı çalışmalarda (Johansen vd., 1999; Woo vd., 2018) daha düşük protein

yüklenme oranları belirlenmiştir. Protein yüklenme oranlarındaki bu farklılıklar, kullanılan polimerin tipi, antijenin özelliği ve mikrosfer hazırlama yöntemlerinin farklı olmasından kaynaklanabilir.

Bu çalışmada, mikrosferler çift emülsiyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Çift emülsiyon yöntemiyle mikrosferler hazırlanırken PLGA polimeri bir organik solvent içinde çözündürülür ve homojenize edilir. Daha sonra ikinci bir solvent ile çift emülsiyon yapılır, mikrosferler kurutulur ve toplanır (Shi vd., 2002). Bu çalışmaya benzer şekilde diğer çalışmalarda da çift emülsiyon yöntemi kullanılmıştır (Shi, vd., 2002; Jaganathan vd., 2004, Jaganathan vd., 2005; Quintilio vd., 2009; Woo vd., 2018; Khademi vd., 2018). Bununla birlikte, difteri toksoid aşısı için PLGA mikrosferlerinin hazırlanmasında püskürterek kurutma ve koaservasyon yöntemleri uygulanmıştır (Johansen vd., 2000).

Mikrosferlerin içindeki antijen miktarının belirlenmesinde uygulanan yöntemlere göre farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Johansen vd. (1999), polimer solventi olarak sodyum hidroksit/polisorbat ve diklormetanı kullanmışlar, iki solventin protein içeriği üzerinde etkisini karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar, polimer sodyum hidroksit/polisorbat içinde çözündürüldüğünde daha yüksek protein miktarı saptadıklarını bildirmişlerdir. Bununla birlikte diğer bir çalışmada sodyum hidroksit/polisorbat'ın difteri toksininin antijenitesinde kayba neden olduğu rapor edilmiştir (Xing vd., 1996). Bu çalışmada da yukarıdaki çalışmalara benzer şekilde mikrosferleri çözdürmek için 0.1 M NaOH çözeltisi kullanılmıştır.

Sonuç olarak, PLGA mikrosferli enfeksiyöz nekrotik hepatitis aşısının tek dozunun alüminyum hidroksitli aşının çift dozu ile aynı düzeyde bağışıklık oluşturduğu ortaya konmuştur. Bu sonuç veteriner toksoid aşılarının geliştirilmesine büyük katkı sağlayacaktır. Ancak polimerler kullanılarak üretilen aşılarda bağışıklık düzeyleri, mikrosferleri hazırlamada kullanılan yöntem, polimerin tipi, solventlerin çeşidi, protein stabilizatörleri gibi birçok faktörden etkilendiği için daha kapsamlı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

5. ÖNERİLER

- ❖ İnaktif ve toksoid aşların koruyuculuğu sınırlı ve kısa süreli olduğundan, belirli zaman aralıklarında rapel aşılamalara ihtiyaç duyulmaktadır. İnsanlarda difteri ve tetanoz hastalıklarından korunma için tek dozda yeterli bağışıklık sağlayan PLGA biyopolimerli aşlar geliştirilmiştir. Veteriner alanda PLGA biyopolimerli aşı çalışmaları oldukça azdır. Bu çalışmada, tek doz PLGA mikrosferli enfeksiyöz nekrotik hepatitis hastalığı aşısının koruyucu etki oluşturduğu ortaya konmuştur. Ancak polimerli veteriner aşlarının üretimi alanında yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.
- ❖ Veteriner alanda daha ekonomik olması için maliyeti düşük polimerler üretilmelidir. Farklı biyopolimerlerin veteriner aşlarının üretiminde kullanılabilirliği araştırılmalıdır.
- ❖ Biyopolimerler, biyobozunur ve biyoyumlu maddeler olduklarından ülkemizde gerek hayvan ve gerekse insan aşlarının üretiminde bu ürünlerin kullanılması desteklenmelidir.
- ❖ Ülkemizde hayvan aşları gerek kamu gerekse özel sektöre ait kurumlar tarafından üretilmektedir. Bu kurumlar nanoteknolojinin aşı üretiminde kullanılması için Ar-Ge faaliyetlerini geliştirmelidirler.
- ❖ Kapsülleme işleminde antjenin yapısına göre kullanılacak polimer seçimi ve kapsüllemeye kullanılacak yöntemler konusunda detaylı çalışmalar yapılarak, en iyi bağışıklık oluşturan polimerler seçilmeli ve protein denatürasyonunu en aza indirecek yöntemler uygulanmalıdır.

KAYNAKLAR

- Aiyer-Harini, P., Ashok-Kumar, H. G., Kumar, G. P. and Shivakumar, N.** 2013. An overview of immunologic adjuvants-A review, *J. Vaccines Vaccin.*, **4**, 1-4.
- Akagi, T., Baba, M. and 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.
- Allahyari, M. and Mohit, E.**, 2016. Peptide/protein vaccine delivery system based on PLGA particles, *Hum. Vaccin. Immunother.*, **12**, 806-828.
- Altuğ, N., Özdemir, R. ve Cantekin, Z.**, 2013., Ruminantlarda koruyucu hekimlik: I. aşı uygulamaları, *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **10**, 33-44.
- Amitoto, K., Sasaki, O., İsogai, M., Kitijima, T., Oishi, E., Okada, N. and Yasuhara, H.**, 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.
- Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M. ve Diker, K. S.**, 1994. İmmunoloji, Medisan Yayın Serisi No:13, Medisan Yayınevi, Ankara.
- Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Kahraman, M., Akay, Ö., Ilgaz, A., İzgür, M. ve Diker, K. S.**, 1997. Özel Mikrobiyoloji, Medisan Yayın Serisi No:13, Medisan Yayınevi, Ankara.
- Ardehali, M., Darakhshan, H. and 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.
- Aucouturier, J., Dupuis, L. and Ganne, V.** 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines, *Vaccine*, **19**, 2666-2672.
- Aytekin, İ., Kalınbacak, A. ve İşler, C. T.**, 2011. Ruminantlarda kullanılan aşılarda ve önemi, *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.*, **22**, 59-64.

- Bailey, B. A., Ochyl, L. J., Schwendeman, S. P. and Moon, J. J.,** 2017. Toward a single-dose vaccination strategy with self-encapsulating PLGA microspheres. *Adv., Healthcare Mater.*, **6**, doi: 10.1002/adhm.201601418.
- Baş, T. ve Alp R.,** 2005. Clostridial aşılarda kombinasyon hazırlanması, *Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, **36**, 35-45.
- Bilgehan, H.,** 1996. Temel Mikrobiyoloji ve bağışıklık Bilimi, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir.
- Blood, D. C. and Radostits, O. M.,** 1989. Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses, 7 th., London.
- Büyüktanır, Ö.,** 2010. Günümüzde biyoteknolojik aşılarda, *A.Ü. Vet. Bil. Derg.*, **5**, 97-105.
- Cassataro, J., Velikovsy, C. A., Barrera, S. and Estein, S. M.** 2005. A DNA vaccine coding for the *Brucella* outer membrane protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response, *Infect. Immun.*, **73**, 6537-6546.
- Cleland, J. L.** 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.
- Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H. D. and Golomb, G.,** 2009. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating, hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles, *J. Control Release*, **133**, 90-95.
- Conway, B. R. Eyles, J. E. and Alpar, H. O.** 1996., Immune response to antigen in microspheres of different polymers, *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.*, **23**, 335–336.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A. and Préat, V.,** 2012. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications, *J. Control Release*, **161**, 505–22.

- Del Giudice, G., Rappuoli, R. and Didierlauren, A. M.,** 2018. Correlates of adjuvants in licensed vaccines, *Semin. Immunol.*, doi.org/10.1016/j.smim.2018.05.001.
- Derman, S., Kızılbey, K. ve Akdeste, Z. M.,** 2013. Polimerik nanopartiküller, *Sigma*, **31**, 107-120.
- Diker, S.,** 1998. İmmunoloji, Medisan Yayın Serisi No: 37, Medisan Yayınevi, Ankara.
- Doan, T., Melvold, R., Viselli, S. and Waltenbaugh, C.,** 2017. İmmunoloji, Çev: Deniz, G., Erten, G. ve Camcıoğlu, Y., Nobel Tıp Kitabevleri Tic. Ltd.Şti, İstanbul.
- Dufour, V.,** 2001. DNA vaccines: new applications for veterinary medicine, *Vet. Sci. Tomorrow*, **2**, 1-26.
- Dunham, S. P.,** 2002. The application of nucleic acid in veterinary medicine, *Res. Vet. Sci.*, **73**, 9-16.
- Ekmekci, Z.,** 2016. Malatya kayısısı (*Prunus Armeniaca L.*) çekirdeğinden glukozidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, B.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Eldridge, J. H., Staas, J. K., Meulbroek, J. A., Tice, T. R. and Gilley, R. M.,** 1991. Biodegradable and biocompatible poly(dl-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies, *Infect. Immun.*, **59**, 2978–2986.
- Erganiş, O.,** 2010. Hayvansal aşılarda geliştirilmesinde üniversite-kamu-sanayi işbirliğinin rolü, *Eurasien J. Vet. Sci.*, **26**, 1-6.
- Feng, G., Jiang, Q., Xia, M., Lu, Y., Qiu, W., Zhao, D., Lu, L., Peng, G. and Wang, Y.,** 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**, e61135.

- Freund, J., Casals, J. and Hosmer, E. P.,** 1937. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **37**, 509–513.
- Giteau, A., Venier-Julienne, M. C., Aubert-Pouëssel, A. and Benoit J. P.,** 2008. How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles? *Int. J. Phar.*, **350**, 14-26.
- Glenting, J. and Wessels, S.,** 2005. Ensuring safety of DNA vaccines, *Microb. Cell. Fact.*, **4**, 26.
- Grunathan, S., Wu, C. Y., Freidag, B. L. and Seder, R. A.,** 2000. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity, *Curr. Opin. Immunol.*, **12**, 442-447.
- Gupta, R. K.,** 1998. Aluminum compounds as vaccine adjuvants, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **32**, 155-172.
- Gupta, A. and Chaphalkar, S. R.,** 2015. Vaccine adjuvants: the current necessity of life, *Shiraz E-Med. J.*, **16**, 1-11.
- Gutierro, I., Hernandez, R. M., Igartua, M., Gascon, A. R. and Pedraz, J. L.** 2002. Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA loaded nanospheres, *Vaccine*, **21**, 67-77.
- Gülcü, S. ve Arslan, S.,** 2018. Çocuklarda aşı uygulamaları: Güncel bir gözden geçirme, *D.Ü. Sag. Bil. Enst. Derg.*, **8**, 34-43.
- Henderson, L.M.,** 2005. Overview of marker vaccine and differential diagnostic test technology, *Biologicals*, **33**, 203-209.
- Hoelzer, K., Bielke, L., Blake, D. P., Cox, E., Cutting, S. M., Devriendt, B., Erlacher- Vindel, E., Goossens, E., Karaca, K., Lemiere, S., et. al.** 2018. Vaccines as alternatives to antibiotics for food producing animals, Part 2: new approaches and potential solutions, *Vet. Res.*, **49**, 70, <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0561-7>.

- Hogarth-Scott, R. S., Liardet, D. M. and Morris, P. J.,** 1980. Levamisole vaccine combinations:1. Heightened antibody response, *Aus, Vet. J.*, **56**, 285-291.
- Honda-Okubo, Y., Saade, F. and Petrovsky, N.,** 2012. AdvaxTM a polysaccharide adjuvant derived from delta inulin, provides improved influenza vaccine protection through broad-based enhancement of adaptive immune responses, *Vaccine*, **30**, 5373–5381.
- Isobe, M., Yamazaki, Y., Oida, S. I., Ishihara, K., Nakabayashi, N. and Amagasa, T.** 1996., Bone morphogenetic protein encapsulated with a biodegradable and biocompatible polymer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **32**, 433–438.
- Jaganathan, K. S., Singh, P., Prabakaran, D., Mishra, V. and Suresh P.V.,** 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.
- Jaganathan, K. S., Rao, Y. U. B., Singh, P., Prabakaran, D., Gupta, S., Jain, A. and Suresh P. V.,** 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.
- Johansen, P., Tamber, H., Merkle, H. P. and Gander, B.,** 1999. Diphtheria and tetanus toxoid microencapsulation into conventional and end-group alkylated PLA/PLGA, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **47**, 193–201.
- Johansen, P., Linda, M., Tamber, H., Merkle, H. P., Gander, B. and Sesardic, D.,** 2000. Immunogenicity of single-dose diphtheria vaccines based on PLA/PLGA microspheres in guinea pigs, *Vaccine*, **18**, 209-215.
- Johansen, P., Martinez Gomez J. M. and Gander, B.,** 2007. Development of synthetic biodegradable microparticulate vaccines: a roller coaster story, *Exp. Rev. Vac.*, **6**, 471-474.
- Joshi, B.B., Geary, S. M. and Salem, A. K.,** 2012. Biodegradable particles as vaccine delivery systems: size matters, *The AAPS Journal*, **15**, 85-93.

- Karayel , İ. ve Alkan, F.,** 2015. DNA aşıları ve veteriner hekimlik alanında kullanımı, *Van Vet. J.*, **26**, 177-182.
- Kerimoğlu, O. and Alarçin.,** 2012. Poly(lactic-co-glycolic acid) based drug delivery devices for tissue engineering and regenerative medicine, *ANKEM Derg.*, **26**, 86-98.
- Khademi, F., Sahebkar, A., Fasihi-Ramandi, M. and Taher, R. A.,** 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.
- Kılıç, A. ve Kılınç, Ü.,** 2005. Enfeksiyöz nekrozan hepatit aşısı uygulanan koyunlarda aşının oluşturduğu bağışıklık düzeyinin araştırılması, *F.Ü. Sağ. Bil. Derg.*, **19**, 145-149.
- Kim, M. G., Park, J.Y., Shon, Y., Gunwoo, K., Gayong, S. and Yu-Kyoung, Oh.,** 2014. Nanotechnology and vaccine development, *Asian J. Pharm. Sci.*, **9**, 227-235.
- Kumar, M.,** 2000. Nano ve microparticles as controlled drug delivery devices, *J. Pharm. Sci.*, **3**, 234-258.
- Lee, S. and Nguyen, M. T.,** 2015. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases, *Immune Network*, **15**, 51-57.
- Levinson, W.,** 2008. Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmunoloji, Çev: Özgünen, T., Güneş Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., Ankara.
- Li, P., Luo, Z., Liu, P., Gao, N., Zhang, Y., Pan, H., Liu, L., Wang, C., Cai, L. and Ma, Y.,** 2013. Bio-reducible alginate-poly (ethylenimine) nanogels as an antigen-delivery system robustly enhance vaccine-elicited humoral and cellular immune responses, *J. Control Release*, **168**, 271–279.
- Li, P., Asokanathan, C., Liu, F., Khaing, K. K., Kmiec, D., Wei, X., Song, B., Xing, D. and Kong, D.,** 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.

Lin, C. Y., Lin, S. J., Yang, Y. C., Wang, D. Y., Cheng, H. F. and Yeh, M., 2015. Biodegradable polymeric microsphere-based vaccines and their applications in infectious diseases, *Hum. Vaccin. Immunother.*, **11**, 650-656.

Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B. and Roitt, I. 2008. İmmünoloji, Çev: İmir, T., Palme Yayınları: 491, Palme Yayın, Dağıtım, Pazarlama, İç ve Dış Tic. Ltd.Şti., Ankara.

Miller, R. A., Brady, J. M. and Cutright, D. E. 1977. Degradation rate of oral resorbable implants (polylactates & polyglycolates): Rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios, *J. Biomed. Mater. Res.*, **11**, 711–719.

Mundargi, R. C., Babu, V. R., Rangaswamy, V., Patel, P. and Aminabhavi, T. M., 2008. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly (d, l-lactide-co-glycolide) and its derivatives, *J. Control Release*, **125**, 193-209.

Nascimento I. P. and Leite L.C.C., 2012. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **45**, 1102-1111.

Nayak, A. R., Tinge, S. A., Tart, R. C., McDaniel, L. S., Briles, D. E. and Curtiss, R. 1998. A live recombinant avirulent oral *Salmonella* vaccine expressing pneumococcal surface protein A induces protective responses against *Streptococcus pneumoniae*, *Infect. Immun.*, **66**, 3744-3751.

O'Hagan, D. T., Jeffery, H. and Davis, S. S., 1993. Long term antibody responses in mice following subcutaneous immunization with ovalbumin entrapped in biodegradable microspheres, *Vaccine*, **11**, 965–969.

O'Hagan, D. T., 2007. MF59 is a safe and potent vaccine adjuvant that enhances protection against influenza virus infection, *Expert Rev. Vaccines*, **6**, 699-710.

Oliveira, S. C. and Splitter, G. A., 1996. Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection, *Vaccine*, **14**,

959-962.

- Oyewumi, M. O., Kumar, A. and Cui, Z.** 2010. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses, *Expert Rev. Vaccines*, **9**, 1095-1107.
- Öztürk, K.,** 2010. Serbest radikal temizleyici madde içeren nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin tasarımı ve değerlendirilmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, Hacettepe Üniversitesi. Ankara.
- Park, T. G.,** 1995., Degradation of poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition, *Biomaterials*, **16**, 1123-1130.
- Pasquale, A. D., Preiss, S., Da Silva, F. T and Garçon, N.,** 2015. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond, *Vaccines*, **3**, 320-343.
- Peek, L. J., Middaugh, C. R and Berkland, C.,** 2008. Nanotechnology in vaccine delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 915–928.
- Perrie, Y., Mohammed, A. R., Kirby, D. J., McNeil, S. E. and Bramwell, V. W.,** 2008. Vaccine adjuvant systems: Enhancing the efficacy of subunit protein antigens, *Int. J. Phar.*, **364**, 272-280.
- Prego, C, Paolicelli, P., Diaz, B., Vicente, S., Sanchez, A., Gonzalez-Fernandez, A. and Alonso, M. J.** 2010. Chitosan based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection, *Vaccine*, **28**, 2607–2614.
- Quintilio, W., Takata, C. S., Sant’Anna, O. A., da Costa, M. H. and Raw, I.,** 2009. Evaluation of a diphtheria and tetanus PLGA microencapsuled vaccine formulation without stabilizers, *Curr. Drug Deliv.*, **6**, 297-304.
- Ramon, G.,** 1925. Sur l’augmentation anormale de l’antitoxine chez le chevaux producteurs de serum antidiphtherique, *Bull. Soc. Cent. Med. Vet.*, **101**, 227–234.

- Riese, P., K. Schulze, T. Ebensen, B. Prochnow, and C. A. Guzman.,** 2013. Vaccine adjuvants: key tools for innovative vaccine design, *Curr. Top. Med. Chem.* **13**, 2562-2580.
- Rosas, J. E, Pedraz, J. L., Hernandez, R. M., Gascon, A. R., Igartua, M., Guzman, F., Rodriguez, R., Cortes, J. and Patarroyo, M. E.,** 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.
- Rudra, A., Santra, K. and Mukherjee, B.,** 2011. Poly(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres as a delivery system of protein ovalbumin used as a model protein drug, *Trends Appl. Sci. Res.*, **6**, 47-56.
- Scalk, J. A. C., Mooi, F. R., Berbers, G. A. M., van Alerts, L. J. M., Ovelgönne, H. and Kimman, T. G.,** 2006. Preclinical and clinical safety studies on DNA vaccines, *Hum. Vaccin*, **2**, 45-53.
- Shakya, A. K. and Nandakumar, K. S.,** 2013. Applications of polymeric adjuvants in studying autoimmune responses and vaccination against infectious diseases, *J. R. Soc. Interface*, **10**, 1-6.
- Shams, H.,** 2005. Recent developments in veterinary vaccinology, *Vet. J.*, **170**, 289-299.
- Shi, L., Caulfield, M. J., Chern, R. T., Wilson, R. A., Sanyal, G. and Volkin, D. B.,** 2002., Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-shot hepatitis B vaccine formulated with PLGA microspheres, *J. Pharmacet. Sci.*, **91**, 1019-1035.
- Silva, A. L., Soema, P. C. and Slütter, B.,** 2016, PLGA particulate delivery systems for subunit vaccines: Linking particle properties to immunogenicity, *Hum. Vaccin. Immunother.*, **12**, 1056-1069.
- Singh M. and O'Hagan.,** 2003. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants, *Int. J. Parasitol.*, **33**, 469-478.

- Singh, S. M., Alkie, T. N., Nagy, É., Kulkarni, R. R., Hodgins, D. C. and Sharif, S.,** 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.
- Sivakumar, S. M., Sukumaran, N., Murugesan, R., Shanmugarajan, T. S., Anbu, J., Sivakumar, L., Anilbabu, B., Srinivasarao, G. and Ravichandran, V.,** 2008. Immune augmentation of single contact hepatitis B vaccine by using PLGA microspheres as an adjuvant, *Indian J. Pharm. Sci.*, **70**, 487-90.
- Souza, C. D., Bannantine, J. P., Brown, W. C., Norton, M. G., Davis, W. C., Hwang, J. K., Ziaei, P., Abdellrazeq, G. S., Eren, M. V., Deringer, J. R., 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.
- Spickler, A.R. and Roth, J.A.,** 2003. Adjuvants in veterinary vaccines: Modes of action and adverse effects, *J. Vet. Intern. Med.*, **17**, 273–281.
- Taha-Abdelaziz, K., Hodgins, D. C., Alkie, T. N., Quinteiro-Filho, W., Yitbarek, A., Astill, J. and Sharif, S.,** 2018. Oral administration of PLGA-encapsulated CpG ODN and *Campylobacter jejuni* lysate reduces cecal colonization by *Campylobacter jejuni* in chickens, *Vaccine*, **36**, 388-394.
- Thomas, C., Gupta, V. and Ahsan, F.,** 2010. Particle size influences the immune response produced by hepatitis B vaccine formulated in inhalable particles, *Pharm. Res.*, **27**, 905-919.
- Uenaka, A., Wada, H., Isobe, M., Saika, T., Tsuji, K., Sato, E., Sato, S., Noguchi, Y., Kawabata, R., Yasuda, T., et al.** 2007. T cell immunomonitoring and tumor responses in patients immunized with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan (CHP) and NY-ESO-1 protein, *Cancer Immun.*, **7**, 9–19.

- URL-1**, <https://www.tarimorman.gov.tr/mevzuat>. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Hayvan Hastalıkları ile Mücadele ve Hayvan Hareketleri Kontrolü Genelgesi (2018/2). 19 Eylül 2018.
- URL-2**, <https://www.genscript.com/recombinant-vaccine.html>, What is an example of a recombinant vaccine? 11 Ekim 2018.
- Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W. J., Ammerer, G. and Hall, B. D.**, 1982. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast, *Nature*, **298**, 347-350.
- Webster, A. and Frank, C.L.**, 1985. Comparison immune response stimulated in sheep, rabbits and guinea pigs by the administration of multicomponent clostridial vaccines, *Australian Vet. J.*, **62**, 112-114.
- Woo, H. S., Kim, S. R., Yoon, M., Lee, E. S., Chang, I. H., Whang, Y. M., Lee, D. I., Kang, M. J. and Choi, Y. W.**, 2018. Combined poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing diphtheria toxoid for a single-shot immunization, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **19**, 1160-1167.
- Xing, D. K., McLellan, K. Corbel, M. J. and Sesardic, D.** 1996, Estimation of antigenic tetanus toxoid extracted from biodegradable microspheres, *Biologicals*, **24**, 57–65.
- Yang, Y. Y., Chung, T. S. and Ng, N. P.**, 2001. Morphology, drug distribution and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method, *Biomaterials*. **22**, 231–41.
- Yeo, Y. and Park, K.**, 2004. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch. Pharm. Res.*, **27**, 1–12.
- Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C. X., Mitter, N., Yu, C. and Middelberg, A. P.**, 2014. Nanoparticle vaccines, *Vaccine*, **32**, 327– 337.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Zehra AKINCI
Doğum Tarihi ve Yeri : 24 Kasım 1992, Elazığ / Türkiye
Telefon : +90 (554) 604-6186
e-mail : akinci.zehra@gmail.com

EĞİTİM

Fırat Üniversitesi, Elazığ, Türkiye Biyomühendislik (Yüksek Lisans, Devam ediliyor)
Fırat Üniversitesi, Elazığ, Türkiye Biyomühendislik (2013 mezun)
Maden Lisesi, Elazığ, Türkiye Lise (2009 mezun)

SERTİFİKALAR

- İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi (C Sınıfı)

PROJELER

- Daldırılmış fermantasyonla *Aspergillus niger* kullanılarak sitrik asit üretimi
- İmmunostimulant özellikli polimerlerin *C. perfringens* hastalıklarına karşı kullanılan aşılarda etkinliklerinin incelenmesi
- Şarap Üretimi

DİLLER

Türkçe, İngilizce (Advance), Almanca(Başlangıç)

BİLGİSAYAR PROGRAMLARI

- Microsoft Office yazılımları (MS Word, MS Excel, MS PowerPoint)
- C++ (Programlama Dili)
- ARDUINO
- ORIGIN
- AUTOCAD
- MATLAB
- CHEMCAD

DENEYİMLER

YAZ 2012 : Dollvet Veteriner Aşı, İlaç ,Biyolojik Madde Üretimi Sanayi Ticaret A.Ş.de stajyer olarak 1 ay süreli staj

YAZ 2011 : Fırat Üniversitesi Hastanesi Genetik Anabilim Dalında 2 yıl süreli gönüllü staj

ŞUBAT 2014-2016: Dora Ortak Sağlık ve Güvenlik Birimi-İş Güvenliği Uzmanı

ARALIK 2016: Sanovel İlaç San. ve Tic. A.Ş.-Ürün Tanıtım Temsilcisi (Devam ediyor)

