Állatorvostudományi Egyetem

Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Vírusok beépítése biopolimer alapú nanoszálakba

Készítette: Gránitz Nóra

Témavezető: Dr. Marosi András
ÁTE, egyetemi adjunktus

Budapest

2022

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 3
2. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS 4
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 6
3.1. Az elektrosztatikus szálképzés vagy electrospinning (ES) 6
3.1.1. Az ES története 6
3.1.2. Az ES folyamata 6
3.1.3. ES-hez használt oldószerek 7
3.2. Az ES összehasonlítása egyéb szárítási módszerekkel 8
3.2.1. Liofilizálás 8
3.2.2. Porlasztva szárítás 8
3.2.3. Az ES előnyei 8
3.3. Nanoszálak biogyógyászati felhasználása 9
3.3.1. Szövetsebészeti felhasználás 10
3.3.2. Sebkezelésben történő felhasználás 10
3.3.3. Gyógyszeripari felhasználás 10
3.4. Nanotechnológia a vakcinológiában 11
3.5. Alternatív vakcinázási módok 11
3.5.1. Aeroszolos vakcinázás 12
3.5.2. Ivóvizes vakcinázás 13
4. ANYAG ÉS MÓDSZER 15
4.1. Felhasznált vírusok és reagensek 15
4.1.1. Felhasznált vírusok 15
4.1.2. Alapanyagok és segédanyagok 15
4.2. Vírusszuszpenziók előkészítése 15
4.2.1. Vírusok felszaporítása sejttenyészeten 15
4.2.2. Vírusszuszpenziók ultracentrifugálása 16
4.2.3. Vírusszuszpenziók szálképzés előtti titrálása 17
4.3. Tolerancia vizsgálat 18
4.4. Elektrosztatikus szálképzés 18
4.4.1. HSES gép 18
4.4.2. Szálképzés menete 19
4.4.3. Szálak begyűjtése és kezelése 19

4.5. Vírustitrálás 20
4.6. qPCR vizsgálat 20
4.6.1. Nukleinsav izolálás 20
4.6.2. TaqMan qPCR és SyBR Green RT-qPCR 21
4.7. Scanning elektronmiszkópos vizsgálat (SEM) 22
5. EREDMÉNYEK 23
5.1. Előkísérletek 23
5.1.1. Vírusszupenziók előkészítése 23
5.1.2. Tolerancia-vizsgálat 24
5.2. Elektrosztatikus szálképzés 24
5.2.1. Első szálképzés 25
5.2.2. Második szálképzés 26
5.2.3. Harmadik szálképzés 28
5.2.4. Negyedik szálképzés 29
5.2.5. Ötödik szálképzés 30
6. MEGBESZÉLÉS 31
ÖSSZEFOGLALÁS 33
SUMMARY 34
IRODALOM JEGYZÉK 35
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ÉS NYILATKOZATOK 38

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AL = lízispuffer

BoHV-1 = szarvasmarha herpeszvírus-1

CPE = citopatogén hatások

Ct = threshold cycle, küszöbciklus

DNS = dezoxiribonukleinsav

DMEM = Dulbecco's modified Eagle's Medium

ECM =extracelluláris mátrix

EDTA = etilén-diamin-tetraacetát

ES = electrospinning, elektrosztatikus szálképzés

FBS = foetal bovine serum, fötális borjúsavó

HSES = high-speed electrospinnig, nagysebeségű elektrosztatikus szálképzés

IBR = infectious bovine rhinotracheitis, szarvasmarha fertözö orr- és légcsőgyulladása

IgA = immunglobulin A

MDBK = Madin-Darby bovine kidney (Madin-Darby borjúvese)

NP = nanopartikulák

PAA = poliakrilsav

PBS = phosphate buffered saline, foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldat

PEO = polietilén-oxid

PVA = polivinil-alkohol

PVP = polivinil-pirrolidin

qPCR = kvantitatív (real-time) polimeráz láncreakció

RNS = ribonukleinsav

RT = reverz transzkriptáz

SEM = scanning elektronmikroszkóp

$TCID_{50}$ = tissue culture infectious dose 50 (szövettenyészetet fertőző dózis 50)

TGEV = transmissibilis gastroenteritis vírus

UDG = uracil-DNS glikoziláz

2. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A fertőző betegségek elleni aktív védekezés legfontosabb eszközei a vakcinák. Az élő – hagyományosan vagy géntechnológiával attenuált – kórokozókat tartalmazó oltóanyagok használata számos előnnyel jár az inaktivált vagy alegység vakcinákhoz képest: legtöbbször erősebb, tartósabb immunitás érhető el, a humorális mellett celluláris immunválaszt is kiváltanak és sokszor kevesebb dózis szükséges a megfelelő hatékonysághoz. Előállításuk és megfelelő stabilitásuk, tárolhatóságuk biztosítása azonban komoly kihívást jelent. TDK dolgozatomban egy olyan, rengeteg potenciált tartalmazó módszert szeretnék bemutatni, amely ebben a feladatban nyújthat segítséget. A mikrobiológia és az anyagtudomány határterületét érintő kísérleteink során élő vírusokat építettünk be elektrosztatikusan képzett nanohordozó szálakba, hogy minél nagyobb arányan és hosszabb ideig megőrizzük fertőzőképességüket.

Az elektrosztatikus szálképzés (electrospinning, ES) egy innovatív, rohamosan fejlődő technológia, amellyel elektrosztatikus erő felhasználásával készíthetünk mikro- és nanométer közötti átmérőjű szálakat. Az ES elve már több mint egy évszázada ismert, az érdeklődés középpontjába azonban csak az 1990-es évektől került. Napjainkban az ES egy gyorsan fejlődő tudományág, amelyet rengeteg alkalmazási területen vesznek igénybe, a textilipartól a biotechnológiáig.

Az ES lehetővé teszi egyes anyagok – főként polimerek – oldatainak vagy olvadékainak átalakítását folytonos szálakká. Az eljárás során polimer oldatsugarak elektromos mezővel feltöltött közegben haladnak a földelt kollektor felé, miközben az elektrosztatikus erőtér hatására az oldószer elpárolog belőlük, így alakulhatnak ki a szilárd nanoszálak a kollektoron.

A vírustartalmú vakcinák szilárd formulációjára jelenleg a liofilizálás (fagyasztva szárítás) és a porlasztva szárítás áll rendelkezésre. A fagyasztva szárítás egy energia- és időigényes, szakaszos eljárás, amely során a liofilizálandó anyagok fagyasztásnak és magas nyomásnak vannak kitéve. A porlasztva szárítás a liofilizáláshoz képest gazdaságosabb folyamat, azonban a szárítógáz hőmérséklete nagyon magas, így a hőérzékeny fehérjék denaturálódhatnak. Az ES ezzel szemben egy kíméletes, költséghatékony szárítási módszer, amellyel kiküszöbölhetők a jelenlegi eljárások hátrányai; folyamatosan üzemeltethető, kevés energiát igényel a működtetése, és a keletkező sugaraknak nagy a folyadékfelületük, így pillanatszerűen száradnak. Napjainkban a liofilizálás a legnépszerűbb szárítási módszer, de

a porlasztva szárítást is széles körben alkalmazzák, míg az ES – előnyei ellenére – az ipari léptékű termelésbe még nem került be [1,2,3,4].

A kutatásunk célkitűzése az volt, hogy ES módszerrel olyan nanoszálakat állítsunk elő, amelyek intakt, életképes virionokat tartalmaznak, és amelyekben a beépített vírusok megőrzik fertőzőképességüket az előállítást és tárolást követően, akár kedvezőtlen környezeti viszonyokkal szemben is. Ez előnyössé tenné felhasználásukat élővírusos vakcinákban, főként a nagyüzemi állattartás területén. A nanoszálak alternatív bejuttatású (orális, aerogén) vakcinákban is lényeges szerepet kaphatnak, ugyanis megfelelő módosításokkal (mukoadhezív jelleg, gyorsított felszívódás) erőteljesebb lokális – IgA (immunglobulin A) típusú – immunitást is kiválthatnak. Egyéb nanohordozókkal végzett kísérletek alapján ezen vakcinák applikációja hatékonyabbá tehető, ami felveti a lehetőségét annak, hogy a nanoszálakkal is hasonló eredmény érhető el.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Az elektrosztatikus szálképzés vagy electrospinning (ES)

3.1.1. Az ES története

Az ES létrejöttének kezdetei egészen 1745-ig vezethetők vissza, amikor Borse nagy elektromos potenciál hatására folyadékcseppekből aeroszolokat hozott létre. A következő lépcsőfokot Cooley és Morton 1902-ben és 1903-ban felfedezett, elektromos impulzus hatására folyadékot permetező eszköze jelentette. Ezt követően 1929-ben Hagiwaba képes volt elektromos töltéssel mesterséges selymet előállítani, majd a módszert továbbfejlesztve Anton Formhals Mainz 1934-ben a műanyagok elektromos szálképzésével foglalkozott. 1970-ben Simm és mtsai. már képesek voltak 1 milliméternél kisebb szálak előállítására is [5].

Habár az elektrosztatikus szálképzés kezdetei régre nyúlnak vissza, korábban csak kutatási céllal foglalkoztak a témával, kereskedelmi forgalomba nem kerültek az így létrehozott termékek. Az alkalmazott tudományok területén az 1990-es években került az érdeklődés középpontjába az ES és a benne rejlő potenciál [4,5].

A régebben használt egytűs rendszerek nem voltak alkalmasak az ipar igényeinek kielégítésére. Ennek az akadálynak a kiküszöbölésére jöttek létre a nagysebességű elektrosztatikus szálképzés eszközei (high-speed electrospinning, HSES). A HSES során ugyanannyi idő alatt több nanoszál előállítása lehetséges, ugyanis a forgótárcsás, több nyílással is ellátott fonófej és a nagyfeszültség együttes használata nagyobb áteresztőképességhez vezet [1,6,7,8].

3.1.2. Az ES folyamata

Az ES készülékben az alapanyagként használt (általában valamilyen polimer-) oldatot kibocsájtó tű vagy fonócsavar és a földelt fémkollektor között magas feszültséget alakítunk ki. Ennek hatására megjelenik az előbukkanó folyadékcseppből kialakuló Taylor kúp. Amikor az elektrosztatikus erő elég magas lesz ahhoz, hogy felülmúlja a folyadék felületi feszültségét, a Taylor kúpból folyadéksugár lép ki. Ez az instabil folyadéksugár a földelt kollektor felé haladva több sugárrá válik szét, amelyek megnyúlnak és elvékonyodnak, így kialakítva a szálszerkezetet. A nagy fajlagos felület miatt az oldószer a folyamat közben elpárolog, így egy szilárd anyagot tudunk összegyűjteni a kollektorként használt fémlemezről vagy hengerről [4].

A keletkező szálak vastagsága az alkalmazott feszültségtől, a kollektorok távolságától, valamint a folyadéksugarak stabilitásától függ. A stabilitást a folyadékok felületi feszültsége határozza meg, míg a nyújtást az elektrosztatikus erők. A stabilitás és a nyújtás hányadosát nevezzük Rayleigh-féle hasadási indexnek. Ha megfelelően nagy feszültséget biztosítunk, a folyadéksugarak a nyújtás során nem szakadnak el, így hosszú szálakat kaphatunk [9].

3.1.3. ES-hez használt oldószerek

Az ES függ az oldat az egyes tulajdonságaitól, mint például a viszkozitás, felületi feszültség vagy az elektromos vezetőképesség. Az oldat viszkozitásának elég magasnak kell lennie ahhoz, hogy a polimermolekulák között összefonódások tudjanak kialakulni; azaz, hogy a szálképződés megtörténhessen. Kulcsfontosságú a polimer megfelelő feloldása, hogy így a kívánt koncentrációjú oldatot kaphassuk. Az ES optimális működéséhez megfelelő mennyiségű oldószerre van szükség, aminek illékonynak kell lennie ahhoz, hogy el tudjon párologni, ugyanakkor nem lehet túlságosan illékony sem, mert akkor eltömődést okozhat a fonófej végén [4,10]. Az ES során előnyösek a vízben oldható polimerek, mivel a víz oldhatósági tulajdonságait (hőmérséklet, pH) többféleképpen is be tudjuk állítani, de egyéb oldószerek hozzáadásával is befolyásolhatjuk az alapanyagokat. Ilyen vízben oldható polimerek például a PVA (polivinil-alkohol), PEO (polietilén-oxid), PVP (polivinil-pirrolidin), PAA (poliakrilsav). Az ezekből készült szálak víz hatására lebomlanak (visszaoldódnak). A PVA és a PAA szállak vízzel szembeni ellenállóságát növelhetjük polialdehidekkel történő észterezési reakciókkal [5].

Korábbi, baktériumokkal végzett kísérletek bizonyították, hogy ha a polimer rendszerekhez szacharóz, illetve trehalóz segédanyagokat adunk, növelhető a nanoszálakba integrált baktériumok életképessége a szálak tárolása során. Ez más cukortartalmú segédanyagokkal is lehetséges lehet, ilyenek például a frukto-oligoszacharidok, inulin, sovány tejpor, glükóz, laktóz, vagy a mannit [7].

Az ES-el előállított nanoszálak különféle biologikumokat is hordozhatnak: vírusokat, baktériumokat, enzimeket vagy monoklonális ellenanyagokat is keverhetünk a kiindulási oldatokhoz. A módszerhez használhatunk természetes vagy szintetikus polimereket, kevert polimer rendszereket (kopolimereket), nanorészecskékkel vagy hatóanyagokkal kiegészített polimereket, de akár fémeket vagy kerámia ötvözeteket is. Az ES végeredményeként új, összetett kémiai struktúrák keletkezhetnek, ami sokrétű felhasználási lehetőségeket rejt [3,5,11]. A polimereken kívül egyéb alapanyagok oldatai is használhatók a szálképzéshez, például ciklodextrinek [1].

3.2. Az ES összehasonlítása egyéb szárítási módszerekkel

A gyógyszeripar előnyben részesíti az orálisan adható gyógyszerformákat az egyszerűbb alkalmazásuk miatt. A szilárd gyógyszerformákat is jobban preferálják, ugyanis ezek stabilabbak, hosszabb ideig és környezeti hőn is tárolhatók, valamint könnyebb a szállításuk és a beadásuk is. Biohatóanyagok szilárd formájának előállítására korábban jellemzően a liofilizálás és a porlasztva szárítás állt rendelkezésre, ezeknek a módszereknek azonban számos hátránya van. Ezen hátrányok kiküszöbölésére alkalmas lehet az ES [3,4,6].

3.2.1. Liofilizálás

A liofilizálást vagy fagyasztva szárítást már évtizedek óta használják vírusmegőrzésre, a vakcinák stabilitásának növelésére [12]. A liofilizálás célja, hogy a vakcinavírus megőrizze a fertőzőképességét, a titerét, valamint az immunogenitását a tárolás során egészen az oltóanyag beadásának pillanatáig. Ennek megvalósítása nehéz, ugyanis számos befolyásoló tényezővel találkozunk, ilyenek a hőmérséklet, a pH, a szuszpenziós közeg, a fénynek való kitettség, valamint az antimikrobiális és inaktiváló szerek használata [13].

A liofilizálás sok energiát és időt igényel. A folyamat napokat, de akár heteket is igénybe vehet, és a módszer csak szakaszosan üzemeltethető. Mindemellett meglehetősen drága is, ugyanis komplex berendezéseket igényel, továbbá rengeteg villamos energia kerül felhasználásra a működés során [4].

3.2.2. Porlasztva szárítás

A porlasztva szárítást jelenleg főleg kis molekulák esetén használják; különösen amorf szilárd diszperziók készítésénél előnyös [14]. A folyamat során magas hőmérsékletre van szükség; ez hátrányos lehet hőérzékeny alkotórészek esetén, amelyek lebomolhatnak az eljárás közben. A porlasztva szárítás költsége a fagyasztva szárításhoz képest kedvezőbb, akár 4-7-szer alacsonyabb is lehet. Ez a szárítási mód a liofilizálással szemben folyamatos termelésre alkalmas. Energiafelhasználása azonban magas, mivel a forró gáz előállítása energiaigényes. Biologikumok formulációjánál nagy mennyiségű biológiai anyag felhasználására lehet szükség, ugyanis a termék visszanyerése csak 50% körül mozog [4,15].

3.2.3. Az ES előnyei

Az ES egylépcsős, folyamatos és gyors szárítási eljárás, amely nanoszekundomok alatt eltávolítja a folyékony oldószert a készítményből [3,4]. A folyamat során a hőmérséklet és a páratartalom szabályozása lényeges, de kíméletes környezeti paraméterek között

végezhető. Ezzel szemben a liofilizálás és a porlasztva szárítás során szélsőséges nyomás- és hőmérsékletváltozásoknak kell kitenni az anyagokat, így azok kiszáradhatnak, valamint mikroorganizmusok formulációja esetén csökkenhet azok életképessége. Ez alapján az ES egy kíméletesebb szárítási technikának tekinthető, ami előnyös lehet, ha az érzékeny biológiai anyagokat és fehérjéket kívánunk felhasználni [3,4,7].

A porlasztva szárításhoz képest a nagysebességű, méretnövelt szálképzési technológia (HSES – ld. 3.1.1.) termelékenysége nagyobb, miközben kevesebb oldószer felhasználása szükséges, és a nanoszálak nagy fajlagos felületének köszönhetően gyorsabban szabadulnak fel a hatóanyagok a szilárd gyógyszerkészítményekből [14]. A biológiai hatóanyagokkal végzett ES legtöbbször vizes oldatból valósítható meg, mert a szerves oldószerekre általában érzékenyek. A víz hátránya a szerves oldószerekkel szemben, hogy forráspontja magasabb, ezért alacsonyabb adagolási sebesség és kisebb termelékenység érhető el [4].

3.3. Nanoszálak biogyógyászati felhasználása

A fokozódó antibiotikum-rezisztencia és a nagyüzemi állattenyésztés igényei miatt az állatorvostudományban folyamatosan igény van újabb, innovatív technológiák bevezetésére. Ezen a téren az elmúlt 1-2 évtizedben a nanotechnológia is egyre komolyabb szerepet tölt be. A nanotudomány előrehaladtával, új rendszereket és technológiákat fejlesztenek ki, amelyek közé tartozik a hatóanyaghordozó nanoszálak ES-el való létrehozása is [16,17].

A nanoszálak felhasználására napjainkban egyre több példát találhatunk az orvostudományok és a gyógyszeripar területén. Ennek fő oka az, hogy a biológiai rendszerekben kulcsszerepet játszó fehérjék, vírusok, valamint baktériumok hasonló mérettartományba esnek, mint a nanostruktúrált rendszerek [5]. Sikeresen felhasználtak már nanoszálakat különböző hormonok, enzimek, proteinek, oligonukletidok és elő sejtek szilárd előállítására is [1,16]. A nanoszálak egyes tulajdonságai, mint például az oldhatóság, egyedi szálméret vagy az oldódási sebesség megváltoztatható a polimerkeverékek tulajdonságainak szabályzásával, így felhasználásuk igen sokrétű lehet [3,8].

Az ES által készített szálak összetétele, átmérője és porozitása is szabályozható. Nagy porozitásuk és felületük miatt az extracelluláris mátrix (ECM) utánzására is alkalmasak lehetnek, ennek következtében szerepük lehet a sejtkötődésben és a tápanyagok szállításban [10]. Nanométeres szinten a szálak képesek egy biomimetikus környezetet létrehozni, amely mikrométeres skálán háromdimenziós architektúrát mutat. Makroszkopikus szinten mind a mechanikai szilárdsága, mind a fiziológiai elfogadhatósága kiemelkedő a nanoszálaknak. Ezen tulajdonságaik miatt alkalmasak lehetnek biogyógyászati felhasználásra [17].

3.3.1. Szövetsebészeti felhasználás

A szövetsebészet első említése 1987-re tehető, azonban a mai napig kevés olyan anyag van, amely a szövetek helyettesítésére használható lehet. A szövethelyettesítő anyagok esetén az a cél, hogy az adott anyag minél jobban tudja utánozni az extracelluláris mátrixot, ugyanis az ECM analógok képesek fokozni a természetes szövetek helyreállítását. Az ECM analógok között az egyik legígéretesebb anyagnak a nanoszálak bizonyultak. A nanoszálak a beültetésük után képesek voltak egyesülni a környező szövettel, biztosítani a sejtek hatékony adhézióját, szaporodását, differenciálódását, migrációját, továbbá a neovaszkularizációt is elősegítették. Kísérletekben a tüdő-, a szív-, a bőrszövet; valamint a porc, a csont, az erek és a nyirokerek regenerációjára is pozitív hatással voltak [5,17,18].

3.3.2. Sebkezelésben történő felhasználás

A nanoszálak sebkezelés területén való felhasználása céljából is intenzív kutatások folynak, amelynek több oka van. A nanoszálak hasonlítanak az ECM elasztin és kollagén rostjaira, méretük és mechanikai tulajdonságaik lehetővé teszik a sebváladék elvezetését, a gázáteresztést, valamint megakadályozzák a sebek szennyeződését is. Ha a szálakat hidrofil anyagokból képezzük, akkor azok képesek a megfelelő nedvesség biztosítására is. A nanoszálak serkentik a hámsejtek migrációját, így segítve a gyógyulást. A szálak alkalmazásával a megfelelő sejtinfiltrációt nem akadályozzuk, így *in vivo* is alkalmazhatók [5,17].

3.3.3. Gyógyszeripari felhasználás

A nanoszálak gyógyszeripari felhasználásának fontos területe többek között a fehérjéknek a célszervbe való ellenőrzött bejuttatása. A szálak nagy felület/térfogat aránya, porozitása és testreszabhatósága alkalmassá teszi őket a gyógyszerek szállításához, illetve a gyógyszerek felszabadítását is megkönnyíti. A gyógyszerek szállításában háromféleképpen vehetnek részt a nanoszálak. Létrehozhatunk biopolimer-gyógyszer keverékeket, kapszulázhatunk vízoldható anyagokat, valamint lehetnek mag-héj szerkezeten belüli tárolók is. A hatóanyagok felszabadulása során történhet felszívódás a szálak felületéről, szilárdtest diffúzió a szálakon keresztül, illetve *in vivo* a rostok lebontásával is bekövetkezhet. [18,19]. A tumorterápia területén is szerepet kaphatnak a nanoszálak: egyes vizsgálatokban a lokális kemoterápiában használt daganatellenes szereket nanoszálakba integrálták [20].

3.4. Nanotechnológia a vakcinológiában

A nanotechnológia igénybevétele az állatorvosi vakcinázás területén még nem elterjedt; főleg a humán vakcinafejlesztés során használt kisállatmodelleken alapul. Az állategészségügyi vakcinák fejlesztése során teszteltek nanopartikulákat (NP) [21], mint egyes vakcinavírusok bejuttató hordozói [22]. A már piacra került nanogyógyszerek közül a legtöbbet a tumorterápia területén használják, azonban Svájcban már forgalomba hoztak influenza elleni nanovakcinát is [22].

A nanotechnológia segítségével növelhetjük a vakcinák hatékonyságát, erre már végeztek kísérleteket mind nazális, mind pulmonális alkalmazás mellett. Az antigének pulmonális úton való bejuttatása önmagukban nem mindig hoz létre megfelelő nyálkahártya-immunitást, de fokozhatjuk ezt a hatást, ha NP-kat használunk a célbajuttatásra [22].

Az inhalációs terápia területén is komoly szerepe lehet a biokompatibilis és vízoldható polimerekből készített nanoszálaknak [5].

3.5. Alternatív vakcinázási módok

A különböző védőoltásoknak rendkívül nagy szerepe van a fertőző betegségek leküzdésében és megelőzésében. Az egyes élelmiszertermelő állatok immunizálásával nem csak az állatok megbetegedését tudjuk megelőzni, de növelhetjük a termelésüket, csökkenthetjük a zoonózisok és a humán fertőzések számát, valamint visszaszoríthatjuk az antimikrobiális gyógyszeres terápiák iránti igényt, így a környezetben és az állati termékékben lévő gyógyszermaradványok mennyisége is csökkenthető. Az állatok vakcinázása során különösen fontos a költséghatékonyság, azaz minél alacsonyabb költségek árán minél erőteljesebb és szélesebb körű immunitás elérése. Mivel a gyógyszeres kezelések sokszor olcsóbbak, mint a vakcinázás, sok állattartó ezt a megoldást választja. Ezért is fontos a vakcinák előállítási költségeinek csökkentése [22].

A hagyományos vakcináknak számos hátránya van. Az élő-attenuált oltóanyagok esetén az előállítási költség magas, használatuk során virulenciájuk esetenként vad törzsekkel való rekombináció révén revertálódhat, valamint tárolásuk során komolyabb hűtésre van szükség. Az inaktivált vakcinák használata esetén gyakran még adjuválás mellett sem alakul ki kellően hatékony és hosszútávú immunitás, ezért több dózisból álló sorozatra van szükség, és jellemzően celluláris immunválaszt sem biztosítanak. A rekombináns alegységvakcinák használatánál is szükség van adjuvánsra és ismétlő oltásokra. Az RNS (ribonukleinsav) és

DNS (dezoxiribonukleinsav) alapú vakcinák esetén pedig a megfelelő stabilitás biztosítása jelent kihívást [16].

A vakcinák parenterális applikációjának számos hátránya ismert: egyrészt a beadásuk nem indukál immunválaszt a természetes bemeneti kapuban (pl. légutak nyálkahártyájában), másrészt nagy létszámú állományokban nehéz a széleskörű beadás lebonyolítása is [23]. A parenterális applikáció korlátozza a kombinációban beadható antigének mennyiségét és számát a nyálkahártyákon történő alkalmazással szemben [24].

Az aerogén úton fertőző kórokozók elleni, felső és alsó légutakat célzó vakcinázás azért lehet előnyös, mert ez a módszer hasonlít legjobban a fertőzés természetes útjához. A vakcina behatolási pontján kialakuló szekretoros IgA típusú védelem mellett az általános immunitáshoz is hozzájárul ez a beadási mód. Nagy előnye lehet ezeknek a vakcináknak, hogy bármelyik életkorban alkalmazhatóak lehetnek, mivel a nyálkahártya immunitása nem megy át olyan, az idős korral járó változásokon, mint ami a szisztémás immunrendszernél megtörténik. Ezenkívül a maternális ellenanyagok jelenléte mellett is alkalmazható, szemben a parenterális beadási móddal [24].

3.5.1. Aeroszolos vakcinázás

Az aeroszolos vakcináknak számos előnyük van a parenterális beadással szemben, miközben az intramuszkuláris vakcinázással hasonló immunitást biztosítanak. Az aeroszolos vakcinázás során hosszantartó nyálkahártya immunitást érhetünk el, megfelelő védelmet alakíthatunk ki a légúti megbetegedések ellen, valamint a nagyüzemi állatállományok tömegoltása gyorsabb. Nincs szükségünk továbbá tűre és fecskendőre az alkalmazásukhoz, így a fertőző hulladék mennyisége, és a iatrogen fertőzésátvitel kockázata is mérsékelhető [23,25].

A légúti nyálkahártya az immunizálás szempontjából nagyon jól használható, ugyanis könnyen hozzáférhető, valamint a legtöbb fertőző ágens a nyálkahártya felületén kezdi meg a fertőzésének folyamatát [23].

A baromfiknál már 1950-től használnak aeroszolos vakcinákat baromfipestis ellen. Ez a vakcinázási mód számos más betegség ellen hatékony lehet, ilyen például a baromfihimlő, a fertőző bronchitis, a sertéskolera, az Aujeszky-féle betegség, a fertőző eredetű gastroenteritisek, a pasteurellosis és a mycoplasmosis [22,23,24].

A légutak azonban kihívást is jelentenek a védőoltások használata szempontjából. Az antigének szétterjedésének hatékonysága a szervezetben ennél a beadási módnál kérdéses lehet, ezáltal nem biztos, hogy minden esetben kialakul a megfelelő szisztémás immunitás.

Ennek a problémának a kiküszöbölésére lehet alkalmas többek között a nanotechnológia: egyes kísérletek eredményei kimutatták, hogy nanopartikulákkal formulált vakcinák használatával tartósabban magasabb ellenanyagtiterek érhetők el, tehát a NP-k képesek fokozni az immunaktivitást [21,22].

A nazális és a pulmonális bevitel esetén a tüdőbe való lejutás korlátozott lehet, emlősöknél a NP-k elakadhatnak a légutak folytonos elágazása és szűkölése miatt, de a felső légutakban az oropharynx és az orrüreg nyálkahártyája is akadályt képezhetnek, részecske-tisztító funkciójuk révén [21,22].

Az inhalálható nazális vakcinák megfelelőek a tömeges oltásokhoz, de szabályozott hatóanyagleadású eszközök készítése nehéz az állatfajok fiziológiai különbségei miatt. A madarak és az emlősök egyértelmű anatómiai különbsége mellett az egyes fajok között is találunk különbséget a biotranszformáció sebessége, a légzési minta és a szöveti eloszlás tekintetében. Ebből adódóan minden inhalálható vakcinát az adott célállatfajra kell kifejleszteni [22,26].

Nem csak az egyes anatómiai különbségek határozzák meg a vakcinák használatát, az állatok elhelyezésének is szerepe van a hatékonyságban. A baromfiknál kifejezetten előnyös az aeroszolos vakcinák használata, hiszen a tartásmód miatt közel vannak egymáshoz, kisebb testű állatok, és a tüdőben egyirányú áramlás van, így jobban le tudnak rakódni a tüdőben a részecskék. Ugyanakkor a környezeti szennyezésre is figyelmet kell fordítani az aeroszolos vakcinák használatánál. A kérődzők esetén a testfelépítés és a tartásmód miatt az inhalációs sprayk kevésbé használhatóak. A kedvtelésből tartott állatoknál (kutya, macska, ló) a kifejezett inhalációnak, illetve a közvetlen intranazális alkalmazásnak is lehet létjogosultsága az immunizálásban [22,27].

3.5.2. Ivóvizes vakcinázás

Az ivóvizes vakcinázás egy egyszerű és kényelmes vakcinázási módot biztosít a nagy baromfi és sertéstartó telepeken, főként az emésztőszervrendszeri vírusokkal szemben [28,29]. Az ivóvízzel történő immunizálás alkalmazásával csökkenteni tudjuk az állatokra ható stresszt, a költségeket, a munkaerőigényt, valamint a közvetlen kezelést is minimalizálni tudjuk [29,30].

Az ívóvizes vakcinák beadásának előnyei mellett kihívásokat is találunk, ugyanis az alacsony gyomor pH, a bél- és májenzimek lebonthatják a vakcinák hatóanyagát, mielőtt megtörténne az immunizálás [31].

Az ivóvizes vakcinázásnál érdemes odafigyelni arra, hogy minden állat odaférjen az itatóhoz a vakcinázás ideje alatt, valamint hogy a vízigénynek megfelelően elegendő víz álljon rendelkezésre, amely jó minőségű és nem tartalmaz káros anyagokat. Emellett az állatok vízfelvételének szempontjából a víz pH-ja, íze és szaga is fontos lehet [28].

A vízadagoló rendszerekben megfelelő dózist kell elérnie az antigénnek, illetve az állatoknak is optimális adagot kell felvenniük, hogy az immunválasz ki tudjon alakulni. Ennek érdekében célszerű a vakcinázást megelőzően 1-2 órával vízmegvonást alkalmazni és olyan mennyiségben koncentrálni a vízben lévő vakcinamennyiséget, hogy azt a sertések 4, a baromfik pedig 2 órán belül felvegyék. Ezen felül a vízvezetékekből az egyéb gyógyszereket és fertőtlenítő szereket el kell távolítani [28,32].

Az ivóvizes vakcinázások során már felhasználtak egyes nanorészecskéket is, amelyek segítségével az immunválasz növekedését váltották ki [33].

Az utóbbi 20 évben a biológiailag lebomló polimerek egyre nagyobb szerepet kapnak az orális gyógyszeradagolás területén. A biopolimerek előnyei közé tartozik a szöveti kompatibilitás, a biológiai lebonthatóság, az alacsony toxicitás; védik a készítményeket a gastroinestinális rendszer káros hatásaitól, valamint tartós felszabadulást biztosítanak, így a beadási gyakoriság is csökkenthető [34]. Az orális vakcinák nanohordozókkal történő formulálása nagy lehetőségeket rejt a (haszon)állategészségügyben, a korábban említett nehézségekre megfelelő választ adhatnak az ily módon alkalmazott oltóanyagok, amelyek az ivóvízben (és akár a takarmányban) történő immunizálást hatékonyabbá és gazdaságosabbá tehetik [33].

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Felhasznált vírusok és reagensek

4.1.1. Felhasznált vírusok

A kísérletekhez a *Herpesviridae* víruscsaládba tartozó BoHV-1 (*Bovine alphaherpesvirus-1*), valamint a *Coronaviridae* családba tartozó TGEV (*Alphacoronavirus 1*) vírusokat használtuk. Előbbi a szarvasmarha fertőző orr- és légcsőgyulladásának (IBR), utóbbi a sertések transmissibilis gastroenteritisének kórokozója. Mindkét vírus lipidburokkal rendelkezik; a BoHV-1 örökítőanyaga DNS, a TGEV-é pedig RNS. A BoHV-1 a Járványtani Tanszék Virológia Csoportja által klinikai mintából izolált vírustörzs, a TGEV-t a Tanszék Immunológia Csoportjából Dr. Lőrincz Márta bocsátotta rendelkezésre.

4.1.2. Alapanyagok és segédanyagok

A ES-hez – a szerves oldószerek használatának elkerülése érdekében – vízoldható alapanyagokat választottunk. Kísérleteinkben a kutatási partnerünk javaslatára HPβCD (2-hidroxipropil-β-ciklodextrin); PVPVA64 (vinilpirrolidon-vinilacetát kopolimer) és PVA [+0,6% PEO] (polivinilalkohol és polietilénoxid) alapanyagokat használtunk fel.

A második szálképzéstől kezdve segédanyagokat is felhasználtunk a vírusok stabilizálásának javítása érdekében. Segédanyagnak két cukorszármazékot, a szacharózt és a mannitot választottuk. A polimereket és segédanyagokat a Merck-től szereztük be.

Az első szálképzés alkalmával PVPVA64 oldatot használtunk, a második alkalommal PVPVA64 és PVA+PEO alapanyagokkal történt a szálképzés, amely során az utóbbit 16 tömeg% mannittal egészítettük ki. A harmadik kísérlet során PVA+PEO polimert alkalmaztunk, amelyhez 17% szacharózt, illetve 17% manitot adtunk. A negyedik szálképzéshez az alábbi anyagokat választottuk: PVPVA64 5% mannit vagy szacharóz kiegészítéssel, valamint PVA+PEO 17% szacharózzal kiegészítve. Az ötödik kísérlet során PVPVA64-et használtunk fel önmagában, illetve 5% mannittal és 5% szacharózzal. Az első négy ES BoHV-1 vírussal zajlott, az ötödik pedig TGEV-vel.

4.2. Vírusszuszpenziók előkészítése

4.2.1. Vírusok felszaporítása sejttenyészeten

A vírusokat fogékony sejtekben szaporítottuk el: a BoHV-1 vírushoz MDBK (Madin-Darby bovine kidney), míg a TGEV-hez ST/E62 sejtvonalat alkalmaztunk. A vírusokat frissen passzált sejttenyészetekre oltottuk szuszpenziós módszerrel. A passzálás előtt inverz

mikroszkóppal (Leica DMi1) ellenőriztük a sejtek morfológiáját és konfluenciáját, majd eltávolítottuk a tápfolyadékot, és két mosási folyamatot végeztünk el PBS segítségével. Ezt követően az emésztéses lépés során tripszin (+0,05% EDTA) oldatot adtunk a sejtekhez és 5 percig inkubáltuk őket 37°C-on, majd az emésztés hatékonyságát inverz mikroszkóppal ellenőriztük. Ezután friss tápfolyadékot adtunk a sejtekhez (DMEM – Dulbecco's modified Eagle's Medium, 5 vagy 10% fötális borjúsavóval [FBS] kiegészítve) és az összetapadt sejtek szétválasztásához pipettával szuszpendáltuk őket. A kész sejtszuszpenziót új tenyésztőflaskákba osztottuk szét, majd további tápfolyadékot pipettáztunk hozzájuk. Az új flaskák közül egyet fertőzetlenül hagytunk negatív kontrollként, míg a többihez hozzáadtuk a vírustartalmú inoculomot és inkubátorba helyeztük a tenyésztőedényeket. A sejttenyészeteket naponta mikroszkóppal ellenőriztük a citopatogén hatások megfigyelése érdekében. Általában 4-5 nap múlva nagy arányú fertőzöttséget figyelhettünk meg, ekkor a felülúszókat háromszori fagyasztást és felolvasztást követően összegyűjtöttük, és titerüket meghatároztuk (vírustitrálás – ld. 4.2.3.). Szükség esetén a felülúszót továbboltottuk egy újabb sejttenyészetre. 2-3 passzázs után kellően magas titereket értünk el (BoHV-1: $10^{7,37}$, TGEV: $10^{6,8}$ $TCID_{50}$/ml). A sejttenyésztéshez a Lonza cég termékeit vettük igénybe (DMEM, FBS, tripszin-EDTA).

4.2.2. Vírusszuszpenziók ultracentrifugálása

A vírusszuszpenziók tisztítása és koncentrálása céljából preparatív ultracentrifugát használtunk. Első lépésként a felszaporított vírusszuszpenziókat 15 percig centrifugáltuk 10 000×g-vel a sejttörmelék eltávolításához. Ezt követően összegyűjtöttük a felúszót, amelyet az ultracentrifugálás megkezdéséig jégen tartottunk. Az ultracentrifugába helyezés előtt a vírusszuszpenziókat táramérleg segítségével egyenlő mennyiségekre osztottuk szét steril, 38,5 ml-es Beckman Coulter centrifugacsövekben. Erre azért volt szükség, hogy a gép kiegyensúlyozott legyen a folyamat alatt. A vírusszuszpenziókat 80 000×g (BoHV-1), illetve 100 000×g (TGEV) relatív centrifugális erővel, 4°C-on 1,5 órán keresztül ultracentrifugáltuk (Beckman Coulter Optima XL-90, SW 18 Ti rotorral) a vírusrészecskék pelletizálásához. A pelletről eltávolítottuk a felülúszót, majd 12 óra áztatás után 500 µl PBS vagy 10% savótartalmú DMEM tápfolyadékban reszuszpendáltuk. Az ultracentrifugált vírust, a kiindulási szuszpenziót és a felülúszót megtitráltuk (ld. 4.2.3.).

4.2.3. Vírusszuszpenziók szálképzés előtti titrálása

Ahhoz, hogy meg tudjuk határozni, hogyan változott a szálképzés során a fertőzőképes virionok mennyisége, a szálképzés előtt is szükséges volt elvégezni egy titrálást a vírusok infektív titerének meghatározásához. A módszerhez véghígításos titrálást használtunk, amelynek lényege, hogy a vírusszuszpenziót addig hígítjuk, amíg a vírusra jellemző citopatogén hatások (CPE) el nem tűnnek.

Adszorpciós módszer

Egy 96 lyukas mikrotiter lemez minden lyukába 180 µl 0% savót tartalmazó tápfolyadékot helyeztünk, majd az első oszlopba bemértünk 20-20 µl tömény vírust (4 párhuzamos lyuk/vírus). Ezt követően 20 µl-kel végigtitráltuk az elsőtől a tizedik oszlopig, majd a tizedik oszlopból kivettünk 20-20 µl-t. Egy már előre elkészített, a lyukakban 80-90%-ban konfluens sejttenyészeteket tartalmazó lemezről óvatosan leszívtuk a tápfolyadékot, ezt a lemez fedelével védve végeztük, hogy ne száradjanak ki a sejtek. A hígításra használt lemezről 50 µl-eket mértünk át a sejtes lemez megfelelő helyeire; a hígabbtól a töményebb vírusszuszpenziók felé haladva, hogy ne befolyásoljuk a titrálás eredményét. 1 óra inkubációt követően 150 µl 5% savót tartalmazó tápfolyadékot pipettáztunk minden lyukba.

Szuszpenziós módszer

Egy 96 lyukas mikrotiter lemez minden lyukába 135 µl 0% savót tartalmazó tápfolyadékot helyeztünk, majd az első oszlopba bemértünk 15-15 µl tömény vírust (4 párhuzamos lyuk/vírus). Ezt követően a 15 µl-kel végigtitráltuk az elsőtől a tizedik oszlopig, majd a tizedik sorból kivettünk 15-15 µl-t. A sejteket tartalmazó palackot megpasszáltuk (ld. 4.2.1.), majd a sejtszuszpenziót megfelelő sűrűségűre hígítottuk 10% savót tartalmazó tápfolyadékkal. Azt, hogy a 65 µl-ben egy-egy lyukra elegendő legyen a sejtszám, a sejtkontroll részen ellenőriztük. Végül minden lyukba 65 µl sejtszuszpenziót pipettáztunk.

Ezek után mindkét folyamat lépései megegyeztek, vagyis a vírusra jellemző ideig tartó inkubáció következett (37°C, 5% CO_2), majd a CPE-k megjelenésének a mikroszkópos vizsgálata.

Az infektív titereket a Spearmann-Kärber módszer szerint számoltuk ki. A számítás lényege, hogy a még pozitív (CPE-t mutató) sejttenyészetet eredményező legmagasabb hígításig (x) nézve az eredményeket; a negatív tenyészetek száma (Σr), a hígítási lépték (d) és az egy hígításon belüli párhuzamos minták száma (n) alapján határozzuk a leoltott

inoculum térfogatában jelen lévő, $TCID_{50}$-ben (tissue culture infectious dose 50) kifejezett vírustiter 10-es alapú logaritmusát. A számítás képlete a következő:

$$lg(TCID_{50}) = x + 1/2d - (d*\Sigma r)/n$$

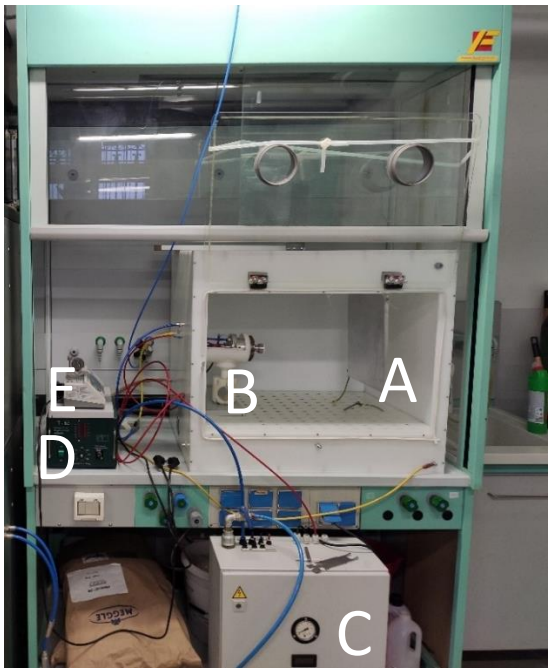
4.3. Tolerancia vizsgálat

A szálképzéseket megelőzően a vírusokat az ES-hez használt alapanyagokhoz kevertük, így vizsgálva azok kompatibilitását. A szálképzés során szükséges töménységű HPβCD, PVPVA64 és PVA-PEO vizes oldatokat készítettünk mágneskeverőn 24 óra alatt, majd 1-1 ml koncentrált vírusszuszpenziót adtunk hozzájuk. További 1 óra keverés után mintát vettünk a keverékekből, és sejttenyészeten megtitráltuk azokat (ld. 4.2.3.), összehasonlítva a kiindulási vírusszuszpenzióval.

4.4. Elektrosztatikus szálképzés

4.4.1. HSES gép

Az elektrosztatikus szálképzést HSES berendezés segítségével végeztük el. A HSES platform egy zárt termelőtérből, egy abban elhelyezett forgó porlasztófejből és a vele szemben felfüggesztett földelt gyűjtőlapból, egy adagoló (infúziós) pumpából, egy sűrített levegő meghajtású motorból és egy nagyfeszültségű tápegységből áll (**1. ábra**). A szálképzéshez méretnövelt termelésre alkalmas porlasztófejet (fonócsavart) használtunk, amelyen 8 nyílás található. Ezzel a berendezéssel a hagyományos egytűs ES szerkezethez képest körülbelül 100x nagyobb termelékenységet érhetünk el.



1. ábra: a kísérletekhez használt HSES készülék. A: gyűjtőlemez, B: porlasztófej (fonócsavar), C: pneumatikus motor, D: nagyfeszültségű tápegység, E: infúziós pumpa

4.4.2. Szálképzés menete

Az elkészült vírusszuszpenziókat a megfelelő homogenizálás érdekében mágneskeverőn kevertük el a szálképzéshez használt alapanyagokkal. Ezután a bekevert oldatot fecskendőbe szívtuk fel, majd a fecskendőt beillesztettük a szálképző szerkezettel összekötött infúziós pumpába, így a folyamat közben biztosítani tudtuk az egyenletes adagolási sebességet. A szálképzést megelőzően beállítottuk a megfelelő paramétereket a gépen. A feszültséget 40 kV-ra, a motor fordulatszámát 15.000 rpm-re, az adagolási sebességet pedig 20 ml/h-ra állítottuk be. A gyűjtőlemezre a szálképzést megelőzően egy alufóliát tettünk, így az alufóliával együtt el tudtuk távolítani az elkészült szálakat a termelés végén. A szálképzés folyamata mintánként körülbelül 20 percig tartott.

4.4.3. Szálak begyűjtése és kezelése

Az elkészült szálak rátapadtak a kollektoron található alufóliára, így azok begyűjtéséhez kaparókanalat alkalmaztunk. A szálak alufóliáról való eltávolítása közben mintát vettünk a scanning elektronmikroszkópos (SEM) vizsgálatok részére. Ezután analitikai mérlegen megmértük az egyes szálképzések után összegyűjtött szálak tömegét és 4 egyenlő részre osztottuk őket, hogy a közvetlenül a kísérlet után mérhető eredmény mellett a 4°C-on való 5, 15, valamint 31 napos tárolás után is meg tudjuk határozni a vírusok infektív titerét a nanoszálakban.

4.5. Vírustitrálás

Az elkészült szálakban található vírusok infektív titerét vírustitrálással határoztuk meg. A szálakat az ES után közvetlenül, illetve a különböző tárolási idők elteltével PBS-ben (phosphate buffered saline) feloldottuk, majd a 4.2.3. fejezetben leírtakkal megegyezően titráltuk.

4.6. qPCR vizsgálat

4.6.1. Nukleinsav izolálás

A nanoszálakból visszaoldott mintákból a vírus-specifikus nukleinsavak mennyiségét qPCR (kvantitatív real-time polimeráz láncreakció) módszerrel határoztuk meg. Ennek megkezdése előtt szükséges a nukleinsavak kivonása és tisztítása, amihez kromatográfiás módszerrel működő gyári kiteket használtunk. A BoHV-1 vírusból a DNS izolálásához a QIAamp DNA Mini Kit-et (Qiagen) használtuk, míg a TGEV RNS-ét a QIAamp Viral RNA Mini Kit-el (Qiagen) vontuk ki.

Az első lépésben DNS kivonásnál 200 µl mintát mértünk a mikrocentrifuga csövekbe, majd 20 µl proteináz-K enzimet adtunk hozzá a sejtek, illetve vírusrészecskék emésztésére. Ezt követően az elegyhez 200 µl lízispuffert (AL) adtunk, majd 15 másodperc vortexeléssel összekevertük a cső tartalmát. Ezután 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk az elegyet, majd 200 µl 100%-os etanolt adtunk hozzá a nukleinsav kicsapása céljából. Az RNS-izolálás módszere a leírtaktól néhány lépésben különbözik: a proteináz enzimet és carrier RNS-t tartalmazó AVL puffer 560 µl-éhez adtunk 140 µl mintát, majd 10 perc szobahőmérsékleten történő inkubálás után 560 µl etanolt adtunk a keverékhez. Ezt követően mindkét eljárás hasonlóan folytatódott: 15 másodpercig kevertük a mintákat vortexeléssel, majd szilika-oszlopot tartalmazó centrifuga csőbe (filteres cső) helyeztük őket és egy percig 6000×g sebességgel centrifugáltuk (RNS-nél a dupla térfogat miatt két lépésben tudtuk hozzáadni az oszlophoz a teljes folyadékmennyiséget). Ezek után két mosási lépés következett. Elsőként 500 µl AW1-es mosófolyadékot adtunk a mintákhoz majd 6000×g-vel centrifugáltuk egy percig. A második mosási folyamat során a gyűjtőcsövekben lévő folyadék leöntése után 500 µl AW2-es mosópuffert mértünk a filteres csőbe és három percig centrifugáltuk őket 20.000×g sebességgel. A megtisztított DNS-re 200 µl eluációs (AE) puffert mértünk (RNS-nél 60 µl AVE elúciós puffert használtunk erre a célra), majd egy percig 6000×g-n centrifugáltunk, így megkaptuk a mikrocentrifuga csövekben a PCR reakcióban használható tisztított nukleinsavakat tartalmazó szuszpenziót.

Amely esetekben nem közvetlenül a nukleinsav-kivonás után végeztük el a PCR vizsgálatot, a DNS vagy RNS mintákat -80°C-on tároltuk.

4.6.2. TaqMan qPCR és SyBR Green RT-qPCR

A két vírus nukleinsavának amplifikálásához különböző real-time PCR rendszert használtunk: a BoHV1 esetében TaqMan (próba) alapú qPCR-t, míg a TGEV esetében SyBR Green rendszerű RT- (reverz transzkripciós) -qPCR-t. Előbbihez a Luminaris Color Probe High ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific), utóbbihoz a Verso 1-step RT-qPCR SYBR Green ROX Kit (Thermo Scientific) kitet vettük igénybe. A reakcióelegyeket az **1. táblázatban** bemutatott összetétellel készítettük el, és a **2. táblázatban** leírt primereket és BoHV-1-specifikus próbát használtuk.

1. táblázat: a qPCR vizsgálatokhoz készített reakcióelegyek összetétele

BoHV-1 (TaqMan qPCR)	µl/minta	TGEV (SyBR Green RT-qPCR)	µl/minta
ddH_2O	4,65	ddH_2O	4,1
qPCR Master Mix 2×	7,5	1-step qRT-PCR RoxMix 2×	7,5
Primer F+R 10 µM	0,9	RT Enhancer	0,75
Probe 10 µM	0,45	Primer F+R 20 µM	1
Templát DNS	1,5	Verso Enzyme Mix	0,15
		Templát RNS	1,5
Összesen	**15**	**Összesen**	**15**

2. táblázat: a qPCR vizsgálatokhoz használt primerek és próbák

Primer		Hossz	Szekvencia
BoHV-1 forward	gB-F	21	TGTGGACCTAAACCTCACGGT
BoHV-1 reverse	gB-R	21	GTAGTCGAGCAGACCCGTGTC
BoHV-1 probe	gB-Pr	21	[6FAM]AGGACCGCGAGTTCTTGCCGC[TAM]
TGEV forward	TGE2	21	TAAGGAAGGGTAAGTTGCTCA
TGEV reverse	TGE3	21	TGGTCCATCAGTTACGCCGAA

A reakciókat egy Rotor-Gene 5-plex HRM (Qiagen) real-time PCR gépben futtattuk le, a **3. táblázatban** ismertetett hő-idő profilok alapján. Mivel a vírustartalmú nanoszálakban jelen lévő virális nukleinsavak mennyiségét csak szemikvantitatív módon hasonlítottuk egymáshoz és a kiindulási mintákhoz, a küszöbciklus (Ct)-értékeken felül a pontos

kópiaszámokat nem volt szükséges meghatározni. Így a kvantitatív számításhoz használható standard sort sem készítettünk a pozitív kontroll nukleinsavakból. A TGEV-nél a SyBR Green alapú reakció végén olvadáspont-analízissel határoztuk meg azt a hőmérsékletet, ahol a DNS két szála különvált egymástól (**3. táblázat**). Ez a PCR-termékek specificitásának igazolása céljából volt fontos.

3. táblázat: a qPCR reakciók protokollja

	BoHV-1			TGEV		
Lépés	°C	idő	Mérés	°C	idő	Mérés
UDG*-előkezelés	50	2 p				
RT				50	30 p	
Aktiváció	95	10 p		95	15 p	
Denaturáció	95	15 mp		94	15 mp	
Annealing	60	1 p	X	54	30 mp	
Extenzió				72	50 mp	X
Olvadáspont-analízis				70-90°C, 30 mp/0,5°C		X

*uracil-DNS glikoziláz

4.7. Scanning elektronmiszkópos vizsgálat (SEM)

A nanoszálak morfológiai vizsgálatát egy JEOL JSM-6380LA típusú scanning elektronmikroszkóppal végeztük el, 10-15 kV gyorsító feszültség és 10 mm-es mintatávolság mellett nagyvákuumban. A mintákat kétoldalú szén-ragasztóval rögzítettük egy réztuskóhoz, majd 45 másodpercig aranyoztuk inert argon atmoszféra alatt. A mintaelőkészítés célja a minta töltődésének elkerülése volt. Az áltagos szálátmérőt 50 mérési pontból számítottuk ki az ImageJ szoftver alkalmazásával.

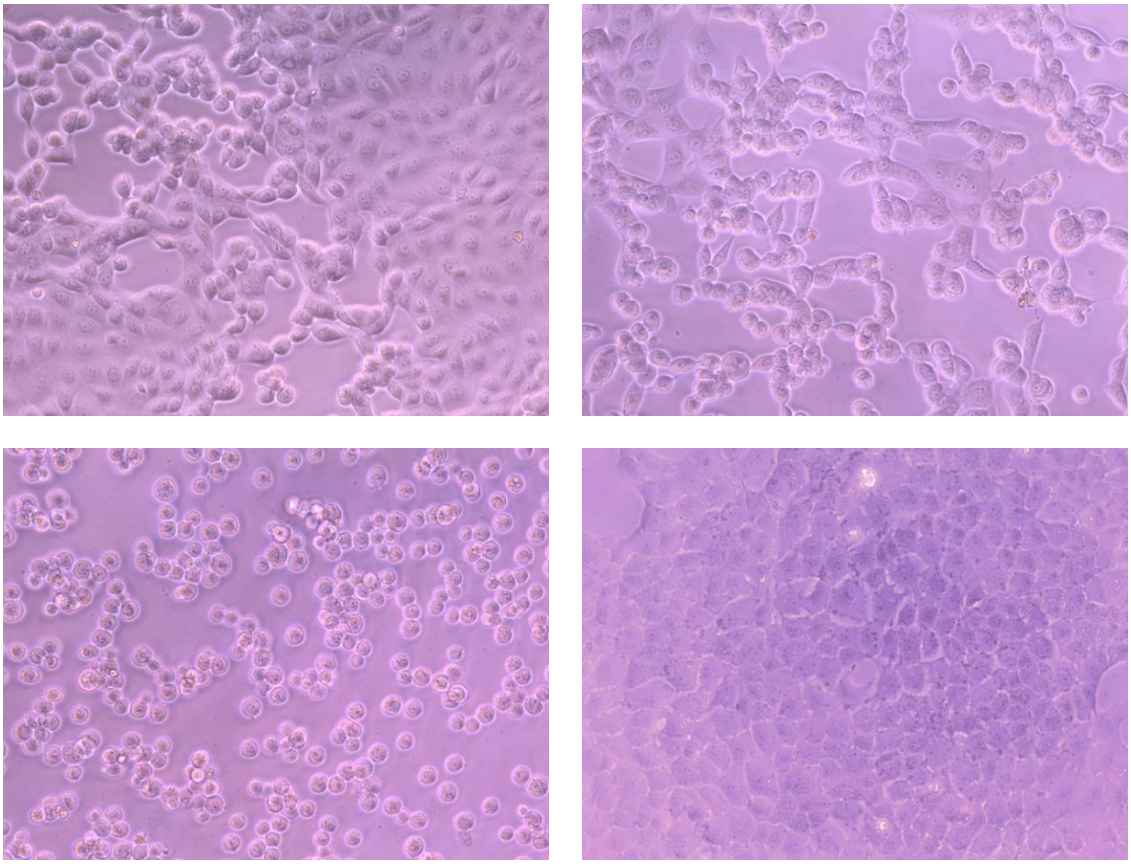
5. EREDMÉNYEK

5.1. Előkísérletek

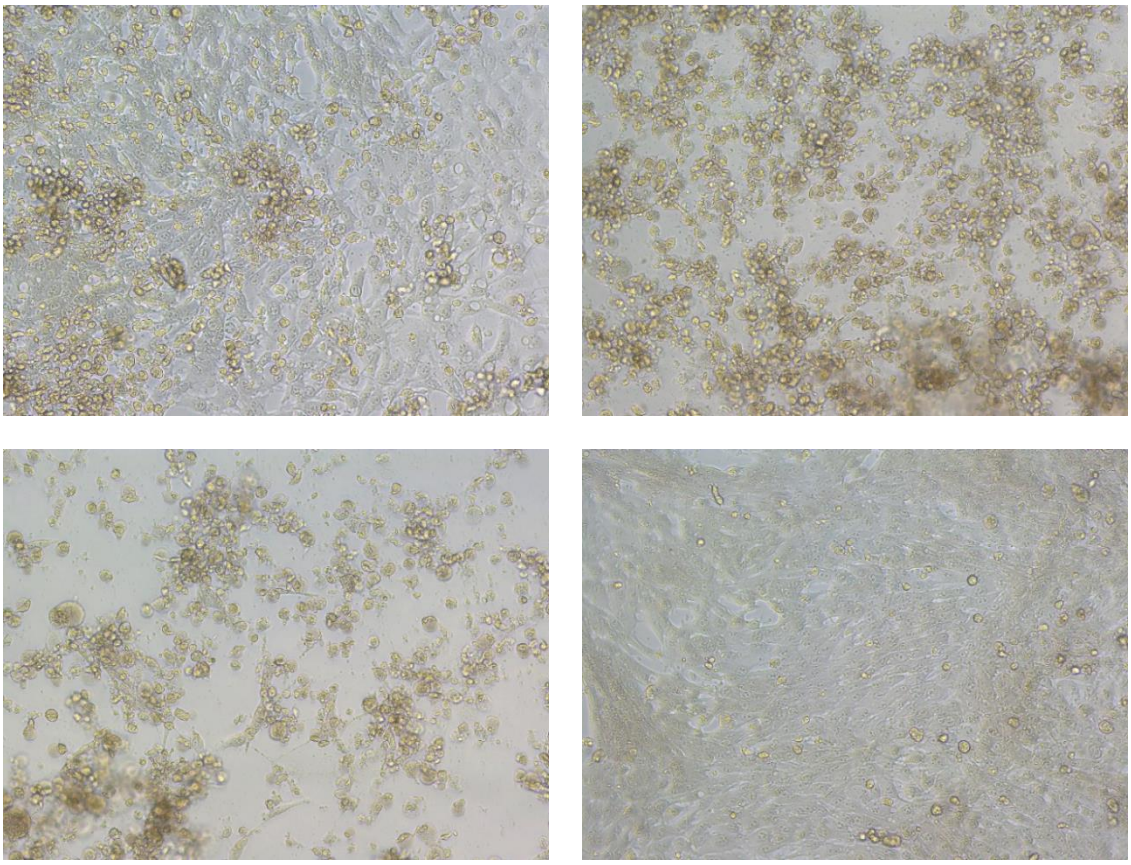
5.1.1. Vírusszupenziók előkészítése

A BoHV-1 vírust MDBK sejtekben passzálva $10^{7,37}$, míg a TGEV vírust ST/E62 sejtvonalon $10^{6,80}$ $TCID_{50}$/ml-re sikerült felszaporítanunk. A BoHV-1-nél az alphaherpesvírusokra jellemző CPE-kel találkozhattunk: szincícium képződés, sejtlekerekedés, illetve sejtlízis (**2. ábra**). A TGEV esetén sejtlízist és lekerekedéseket tudtunk megfigyelni (**3. ábra**).

Az ultracentrifugálás után sikerült a vírusszuszpenziót tovább koncentrálnunk: a BoHV-1-ből $10^{8,8}$ $TCID_{50}$/ml, a TGEV-ből $10^{7,78}$ $TCID_{50}$/ml vírustitert értünk el.



2. ábra: a BoHV-1 okozta sejtkárosító hatások (CPE) MDBK sejtvonalon. 200× nagyítás, fáziskontraszt felvételek. A bal felső kép enyhe fertőzöttséget mutat, a jobb alsó fertőzetlen kontroll sejttenyészet



3. ábra: a TGEV okozta sejtkárosító hatások (CPE) ST/E62 sejtvonalon. 200× nagyítás, fáziskontraszt felvételek. A bal felső kép enyhe fertőzöttséget mutat, a jobb alsó fertőzetlen kontroll sejttenyészet

5.1.2. Tolerancia-vizsgálat

A három tesztelt nanoszálképző vegyületből a PVPVA64 és PVA-PEO biopolimerek oldata önmagában nem befolyásolta a vírusok fertőzőképességét. A HPβCD-nel keverve ellenben teljesen megszűnt a BoHV-1 és TGEV infektivitása. Az inaktiváló hatás ellenére a qPCR vizsgálat alapján a ciklodextrinnel kezelt vírusfertőzött sejttenyészetek felülúszójában változatlan mennyiségben voltak jelen a virális nukleinsavak (ahogy természetesen a PVPVA64 és PVA-PEO használata esetén is). A kapott eredmények tükrében a HPβCD-t nem használtuk a további kísérletekben, hanem a másik két alapanyagra koncentráltunk.

5.2. Elektrosztatikus szálképzés

A kutatómunka során öt alkalommal végeztünk szálképzést, ebből az első négy esetben BoHV-1-et, míg az ötödik alkalommal TGEV-t építettünk a nanoszálakba. A kísérletek jellemzése (minták száma, vírus, alap- és segédanyagok), valamint az ES kihozatali aránya (a kollektorról begyűjtött szálas termék tömege a kiindulási szárazanyag tömegéhez viszonyítva) az egyes minták esetében a **4. táblázatban** látható.

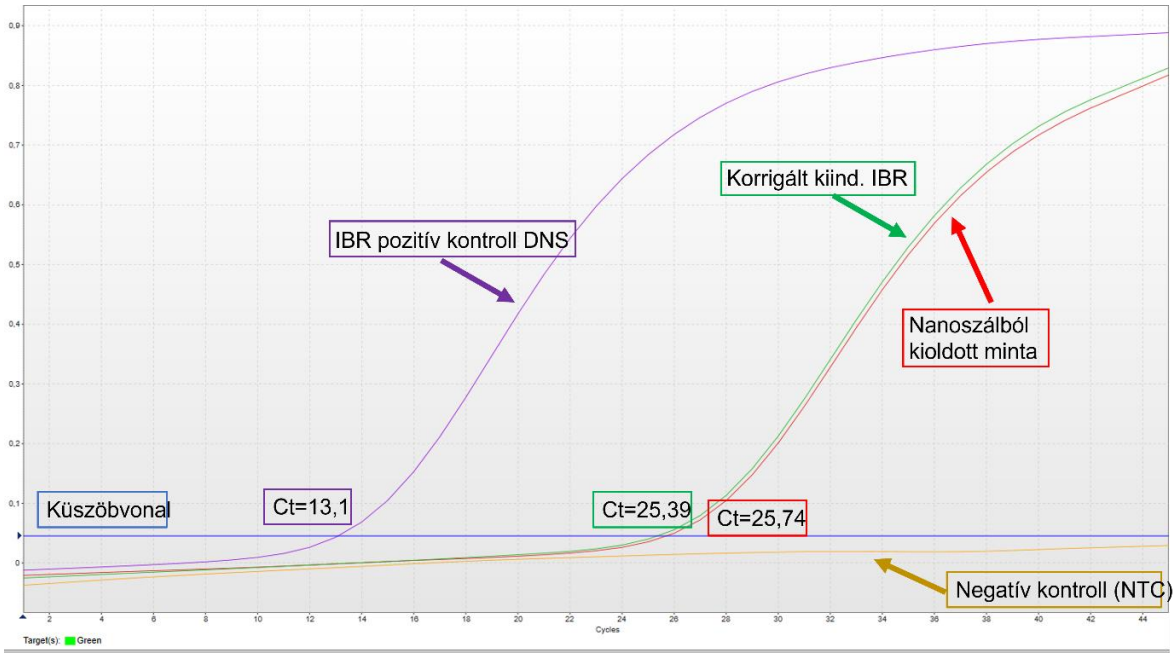
4. táblázat: a kísérleti elrendezések és a szálképzések hozama

	Vírus, kiindulási titer ($TCID_{50}$/ml)	Polimer + segédanyag	Hozam	Visszaoldás (nap)
1. szálképzés	BoHV-1	PVPVA64	10,57%	15.
2. szálképzés	BoHV-1	PVPVA64	15,67%	5.
	BoHV-1	PVA-PEO + mannit	12,07%	5.
3. szálképzés	BoHV-1	PVA-PEO + szacharóz	30,28%	0., 5.
	BoHV-1	PVA-PEO + mannit	28,14%	0., 5.
4. szálképzés	BoHV-1	PVPVA64	59,00%	0., 5., 15., 31.
	BoHV-1	PVPVA64 + szacharóz	47,13%	0., 5., 15., 31.
	BoHV-1	PVPVA64 + mannit	31,75%	0., 5., 15., 31.
	BoHV-1	PVA-PEO + szacharóz	43,35%	0., 5., 15., 31.
5. szálképzés	TGEV	PVPVA64	34,67%	0., 5., 15., 31.
	TGEV	PVPVA64 + szacharóz	35,27%	0., 5., 15., 31.
	TGEV	PVPVA64 + mannit	16,57%	0., 5., 15., 31.

5.2.1. Első szálképzés

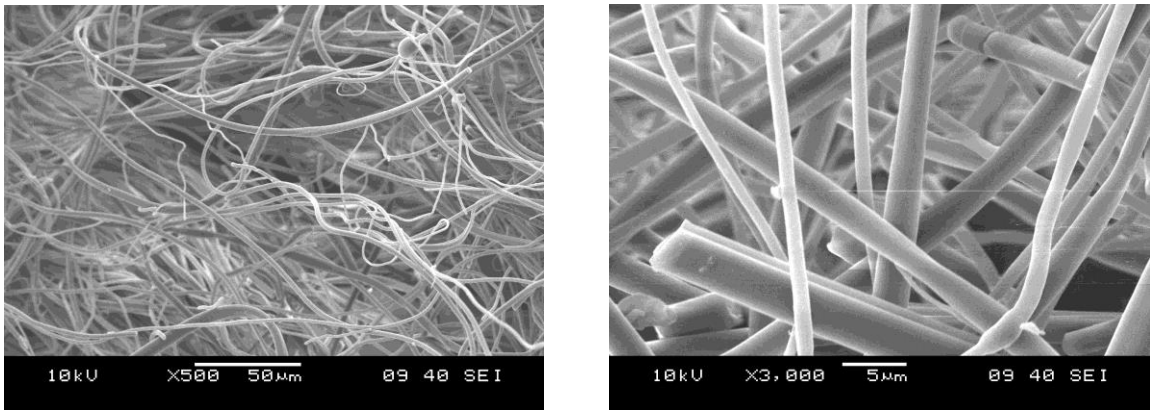
Az első szálképzés során ultracentrifugával pelletizált, majd steril PBS-ben reszuszpendált BoHV-1 vírusszuszpenziót használtunk fel, amit 50 tömeg%-os PVPVA64 oldathoz adtunk az ES elvégzéséhez. A szálképzés után 15 napig szobahőn tároltuk az elkészült nanoszálakat. Ezt követően PBS-ben feloldottuk a szálakat, hogy visszatitrálva megállapíthassuk, hogyan változott a vírustiter az ES és a tárolás hatására. A titrálás eredményeként azt kaptuk, hogy a kiindulási vírusmennyiségből számított elméletileg lehetséges legmagasabb titerhez képest jelentősen csökkent a visszatitrálható vírusok mennyisége: $10^{5,09}$-ről $10^{1,37}$ $TCID_{50}$/ml-re. Az elméleti maximális titert úgy számítottuk ki, hogy a polimeroldathoz hozzáadott vírusmennyiséget a nanoszálak kihozatali arányával és a visszaoldáshoz használt PBS pufferoldat hígítófaktorával korrigáltuk.

A szálakból visszaoldott mintából qPCR vizsgálatot is végeztünk, amely alapján megállapítható volt, hogy a vírusok nukleinsava változatlan mennyiségben volt megtalálható a szálakban a kiindulási vírusszuszpenzió korrigált eredményéhez képest, tehát csak a fertőzőképességükre volt negatív hatással az ES (**4. ábra**).



4. ábra: qPCR vizsgálat eredménye, 1. szálképzés. A vízszintes tengely a ciklusszámot, a függőleges a fluoreszcencia mértékét jelöli. A Ct érték a küszöbciklus (amely a templát nukleinsav-mennyiséggel fordítottan arányos): az a ciklus, amelynél a fluoreszcencia görbéje metszi a küszöbvonalat (a fluoreszcens jel erősödése exponenciálissá válik). IBR: BoHV-1

A nanoszálak SEM-mel végzett morfológiai vizsgálata az elvártnak megfelelő képet adott, tehát egy homogén szálas szerkezetet láthattunk **(5. ábra)**. A szálak átmérője 800-2000 nm közé esett. A beépített vírusokat a felvételeken nem tudjuk megtekinteni, mivel azok keresztmetszete kisebb, mint a szálaké.



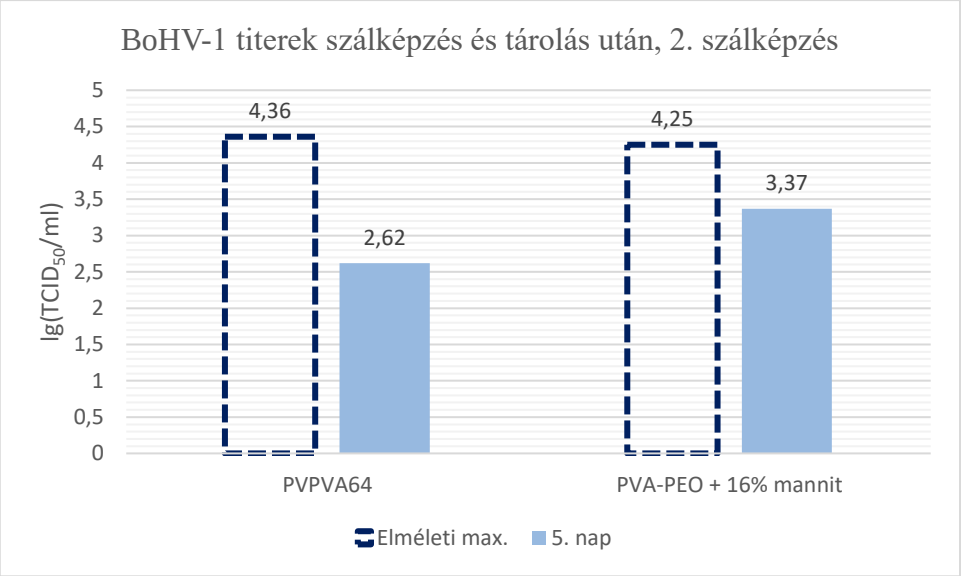
5. ábra: SEM felvétel, 1. szálképzés, PVPVA64 alapanyag + BoHV-1 (a vírus a képeken nem ábrázolódik)

5.2.2. Második szálképzés

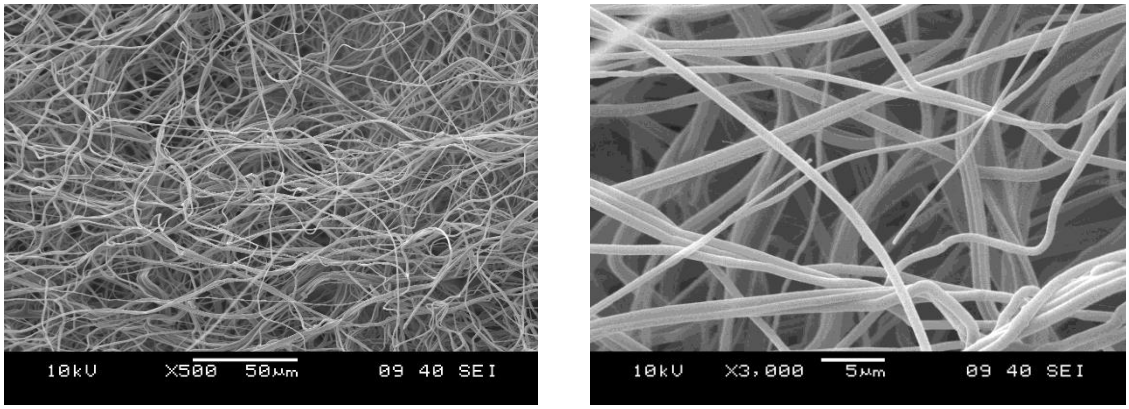
A második kísérlet során PBS helyett 10% fötális borjúsavót tartalmazó DMEM tápfolyadékot használtunk az ultracentrifugált BoHV-1 vírusszuszpenzió visszaoldására.. Ezenkívül az elkészült nanoszálakat szobahőmérséklet helyett 4°C-on tároltuk, amelynek

célja a magasabb vírustiter megtartása volt. A szálképzéshez PVPVA64, valamint PVA+PEO oldatot használtunk fel; ez utóbbi polimert 16 tömeg% mannittal egészítettük ki, amely stabilizáló segédanyagként szolgált a szálképzés során. Az eredmények kedvezőbbek voltak az első kísérlethez képest. Az 5. napon történő visszaoldás alapján a PVPVA64-el készült szálak vírustitere 1,74, míg a PVA+PEO+mannit alapúaké mindössze 0,88 nagyságrenddel (lg) csökkent a kiindulási vírusokhoz viszonyítva **(6. ábra).**

A scanning elektromikroszkópos felvételeken azt figyelhettük meg, hogy a PVA-PEO mátrixú nanoszálak az első szálképzésnél tapasztaltaknál tömöttebb szerkezetűek voltak, átmérőjük pedig 500 és 1000 nm között mozgott (**7. ábra**).



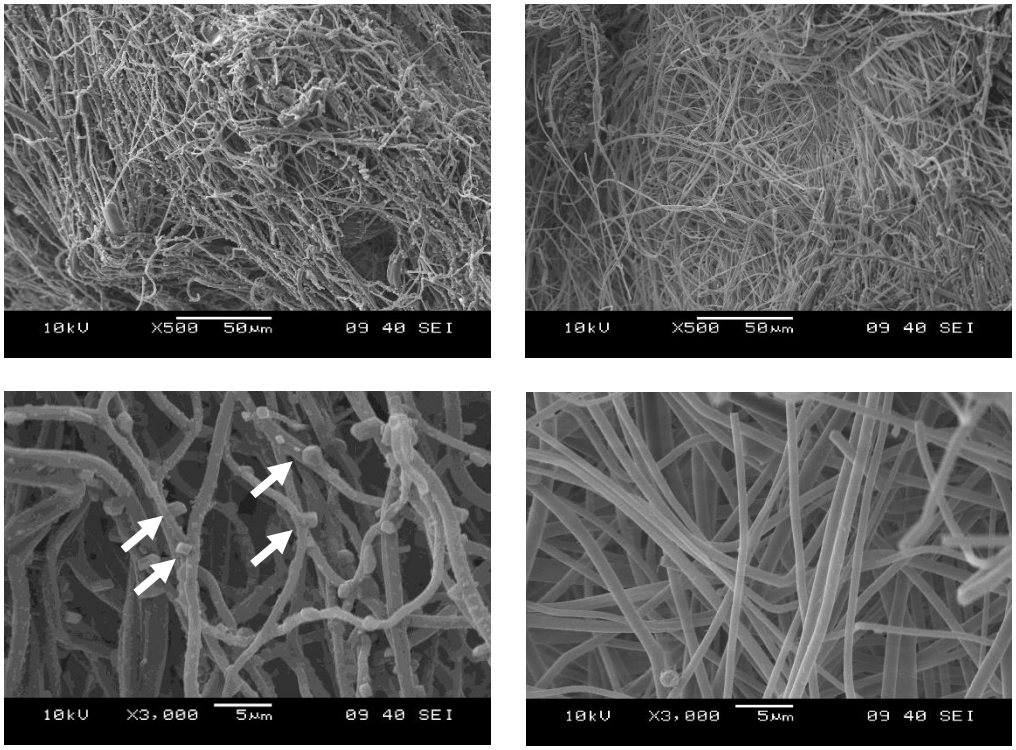
6. ábra: a vírustitrálás eredményei a második szálképzés után. Elméleti max.: a kiindulási vírusszuszpenzióból a nanoszálak hozamával és a visszaoldó puffer térfogatával korrigált érték



7. ábra: SEM felvétel, 2. szálképzés, PVA-PEO + mannit + BoHV-1 (a vírus a képeken nem ábrázolódik)

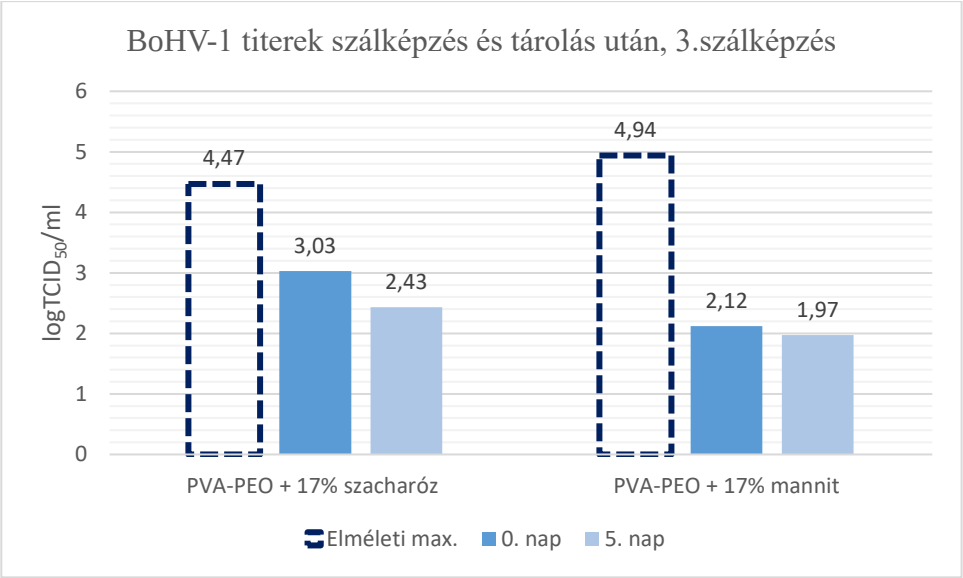
5.2.3. Harmadik szálképzés

A harmadik szálképzés során a második kísérlet eredményére alapozva PVA+PEO-t használtunk fel, amelyet a mannit mellett szacharóz segédanyaggal is kiegészítettünk. A szálképzés közben technikai problémákat tapasztaltunk: az elkészült szálak nem voltak megfelelően homogének, a kész nanoszálakba bezárt folyadékcseppek voltak láthatóak. A szálak erősen hozzátapadtak a kollektorhoz, így begyűjtésük nehéz volt; kevesebb terméket kaptunk a vártnál. A komplikációt az okozhatta, hogy a kísérlet alkalmával a laboratóriumban szokatlanul magas volt a páratartalom az időjárás következtében. Az elektronmikroszkópos felvételeken az amorf szálas anyag kezdődő visszakristályosodásának jeleit láthattuk (**8. ábra**).



8. ábra: SEM felvétel, 3. szálképzés PVA-PEO alapanyag. Segédanyag: bal oldali képeken szacharóz; jobb oldaliakon mannit. Az bal alsó képen megfigyelhető a PVA kezdődő visszakristályosodása (nyilak). Vírus: BoHV-1 (a vírus a képeken nem ábrázolódik)

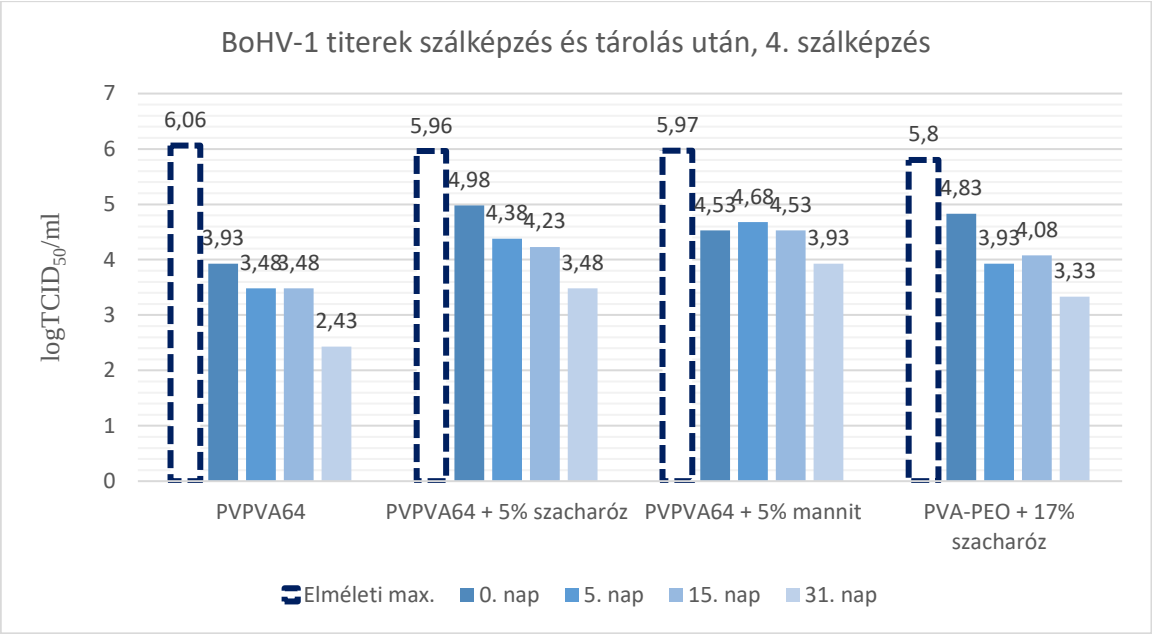
A szálképzés után a kész nanoszálakat két egyenlő részre osztottuk fel, ezek egyik felét a szálképzés napján (0. nap), a másikat pedig az 5. napon titráltuk vissza, hogy megvizsgáljuk, hogyan változott a vírustiter az ES, illetve a tárolás hatására. A szálképzést követő titrálás során jelentős visszaesést tapasztaltunk a vírusok infektív titerében **(9. ábra)**.



9. ábra: a vírustitrálás eredményei a harmadik szálképzést követően

5.2.4. Negyedik szálképzés

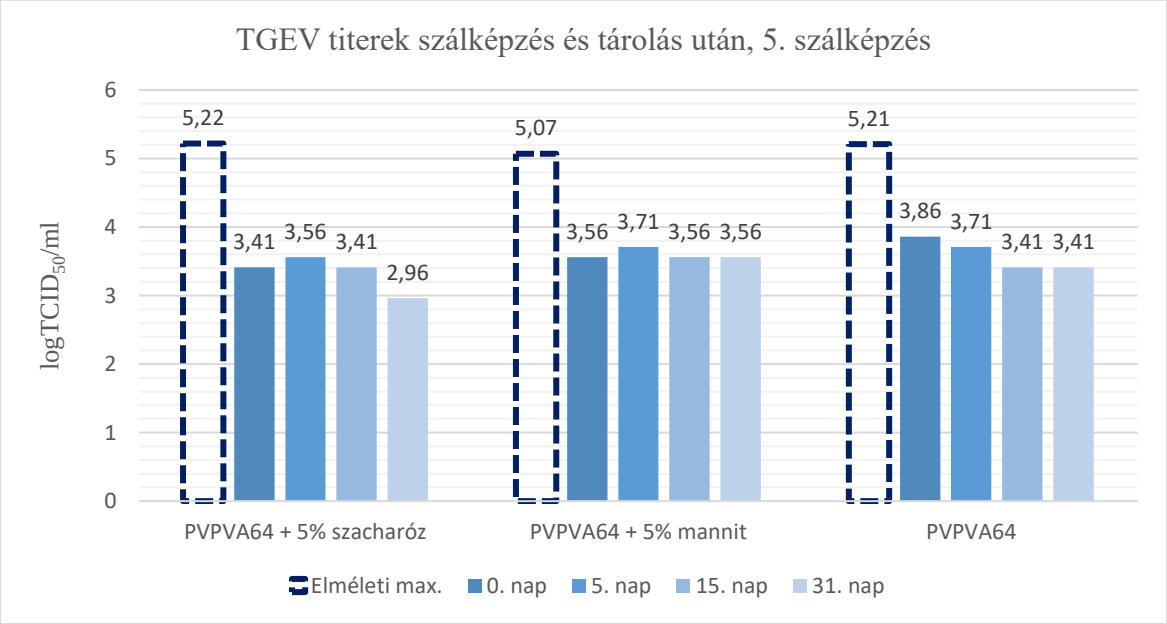
A negyedik szálképzés során a korábbi tapasztalatok alapján optimalizáltuk az ES eljárást. A PVPVA64 alapanyaghoz segédanyagként 5% szacharózt, illetve 5% mannitot adtunk, és a polimert önmagában is használtuk. A negyedik kombináció PVA+PEO + 17% szacharóz volt. A szálképzést követően a kész termékeket 4 részre osztottuk fel, hogy az azonnali (0. napi) eredmények mellett 5, 15, és 31 napos tárolást követően is meg tudjuk határozni a nanoszálak vírustartalmát. Az eredmények azt mutatták, hogy a stabilizáló adalékok igen fontosak az BoHV-1 infektivitásának megtartásához: a segédanyagok nélküli szálakban a vírusok titere nagyobb mértékben csökkent, mint a többi esetben. Szacharóz segédanyag használatával – mindkét polimernél – a közvetlenül az ES alatti veszteség kisebb, mint mannittal, azonban a tárolás során a mannitos szálakban stabilabb maradt a vírustiter **(10. ábra)**. A SEM felvételeken a nanoszálak morfológiája az 1. és 2. szálképzésben megfigyeltekhez hasonló volt (**5.** és **7. ábrák**). A qPCR vizsgálat alapján a BoHV-1-specifikus DNS kópiaszámok a 3. és 4. kísérletekben sem mutattak érdemi csökkenést a polimerekhez hozzáadott vírusszuszpenzióhoz képest.



10. ábra: a vírustitrálás eredményei a negyedik szálképzés után.

5.2.5. Ötödik szálképzés

Az ötödik szálképzést TGEV vírusokkal végeztük, amelynek során PVPVA64-et használtunk fel önmagában, valamint 5% szacharózzal illetve mannittal kiegészítve. A kísérleti protokollt a 4. szálképzésnek megfelelően alakítottuk ki. Eredményeink alapján az ES következtében végbement titercsökkenés a BoHV-1 vírushoz hasonló (szacharóz segédanyag esetén magasabb) volt, azonban a tárolás során lényegesen stabilabbnak bizonyultak a TGEV vírust tartalmazó nanoszálak. A fertőzőképes virionok mennyiségének csökkenése a vizsgált 31 nap alatt elhanyagolható volt **(11. ábra).**



11. ábra: a vírustitrálás eredményei az ötödik szálképzést követően.

6. MEGBESZÉLÉS

Napjainkban a fertőző betegségek elleni védekezés jelentősége megnövekedett az állat- és közegészségügyben egyaránt. A vírusfertőzések ellen jelenleg is a vakcinázás a legfőbb lehetőség a prevenció terén. A kellő hatékonyságú vakcinavírusok mellett azok előállítási technológiája és tárolás közbeni stabilitása is kulcsfontosságú. Kutatómunkánkban egy erre a célra még nem használt innovatív módszert, az elektrosztatikus szálképzést (ES) vizsgáltuk élő vírusok formulációjára, amely a jelenleg bevált eljárások alternatívája lehet.

Az ES-hez alapvető fontosságú a megfelelően használható szálképző vegyületek kiválasztása. A 2-hidroxipropil-β-ciklodextrin mindkét általunk vizsgált lipidburkos vírust inaktiválta előzetes tolerancia-vizsgálatunk során. A kimutatott antivirális hatást a szakirodalomban már leírták. Ennek oka, hogy a ciklodextrinnek üreges térszerkezete van, így a környezetéből kivonja a koleszterint (zárványkomplexeket képez), ennek következtében a burokkal rendelkező vírusok lipidszerkezete meggyengül, valamint a membránfúziót is gátolja, ami a sikeres sejtfertőzéshez szükséges [35,36]. A másik két kiválasztott alapanyag, a PVPVA64 és a PVA-PEO biokompatibilis polimerek ezzel szemben nem voltak hatással a vírustiterre.

Szálképzési kísérleteink során több különböző kísérleti körülményt, beállítást, alap- és segédanyagok eltérő kombinációit teszteltük a nanoszálakba beépített fertőzőképes vírusok minél nagyobb arányú megőrzésére. Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy az ES egy olyan formulációs eljárás, amely a környezeti hatásokra érzékenyebb, lipidburkos vírusok számára is jól tolerálható. Az előállítás során a vírustiter csökkenése 0,8-1,5 $\log_{10}$ közötti volt a megfelelő körülmények, illetve kombinációk beállítása után. Ezek az értékek a hagyományos formulációs módszerekkel összemérhetők [12]. Az ES folyamata közben fontos a páratartalom kontrollálása: a harmadik kísérletünk idején jellemző magas páratartalom negatív hatással volt a nanoszálak szerkezetére és minőségére, valamint az integrált vírusok életképességére egyaránt. Az eredmények rámutattak a tárolási körülmények fontosságára is: ha a vírustartalmú szálakat 4°C-on tartjuk, akkor nagymértékben csökkenthetők a veszteségek a hűtés nélküli tároláshoz képest. Első és második szálképzésünk tapasztalatait figyelembe véve megállapítható, hogy a magas infektív vírustiter fenntartása érdekében célszerű fehérjetartalmú közeget (pl. tápfolyadék) biztosítani az ultracentrifugált vírusok számára tiszta pufferoldat helyett. A fehérjék ugyanis védőkolloidot képeznek a virionok köré, amely megóvhatja őket a szálképzés és a tárolás alatti negatív hatásoktól.

A fertőzőképesség megőrzését nagymértékben elősegítik a cukoralapú segédanyagok. A kísérletek során azt figyeltük meg, hogy a szacharóz a szálképzés folyamata közben ad nagyobb védelmet, míg a mannit a tárolás alatt bizonyul hatékonyabbnak. Ennek legvalószínűbb oka az, hogy a szacharóz csökkenti a sokkhatást, amelyet a gyors dehidratáció hatása okoz a vírusoknak, a mannit pedig a szálak vízfelvételét korlátozza hosszabb távon.

Vizsgálataink alapján a TGEV-t tartalmazó nanoszálak titrálható vírusmennyisége egy hónapos tárolás alatt sem csökkent, így jóval stabilabbnak bizonyultak, mint a BoHV-1-et tartalmazók. Ezt azzal magyarázhatjuk, hogy bár mindkét vírus burkos, a TGEV egy emésztőszervi patogén, így jobb az általános ellenálló képessége, mint az érzékenyebb, légzőszervi kórokozó BoHV-1-nek. Mannittal kiegészített PVPVA64 polimer használata mellett ugyanakkor a BoHV-1-tartalmú szálak is számottevő védelmet jelentettek a vírusoknak. Más kutatásokban a mannit probiotikumok nanoszálba építésénél és vírusok liofilizálásánál is jótékony hatású volt a technológiai és hosszú távú stabilitásra [7,37].

Real-time PCR vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a nanoszálakból kioldott és a kiindulási vírusszuszpenziókból vett minták örökítőanyag-tartalma közel megegyezett. Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy közel az összes, szálképző oldatokhoz adott vírus ténylegesen beépült a nanoszálakba, és az ES folyamata következtében a vizsgált vírusok DNS-e vagy RNS-e nem károsodott.

Következtetéseinket összefoglalva megállapítható, hogy az ES-nek lehet szerepe a vakcinagyártásban, ami azért is kedvező lehetőség, mivel a módszer olcsóbb és folyamatos technológiaként gyorsabb, mint a jelenleg erre a célra alkalmazott eljárások. Az ES alapú vakcina-előállítás különösen ígéretes a nagyüzemi állattartásban használt perorális, illetve aeroszolos tömegoltásoknál, valamint kedvezőtlen környezeti körülmények között végzett vakcinázásoknál (például meleg égövi országokban). A jövőben célszerű további vizsgálatokat végezni ahhoz, hogy növelni tudjuk a nanoformulált vírusok eltarthatósági idejét, illetve hogy szélsőséges körülményeknek is ellenálló termékeket tudjunk készíteni. Ezekhez a kísérletekhez újabb vírusok és segédanyagok bevonása szükséges. A segédanyagok közül érdemes kipróbálni többek között az inulin, a kitozán, a poliszorbát és zselatin stabilizáló hatását is. A vírusok szempontjából célszerű megvizsgálni, hogy – egyéb burkos vírusok mellett – hogyan viselkednek lipidburokkal nem rendelkező RNS vagy DNS vírusok a szálképzések során.

ÖSSZEFOGLALÁS

Élővírusos vakcinák előállításánál komoly kihívást jelent, hogy a formulációs eljárás során és a tárolási idő alatt a lehető legkisebb mértékben csökkenjen a fertőzőképes vírusok mennyisége. E célnak megfelelően a stabilitás fokozására alkalmas lehet az elektrosztatikus szálképzés (ES), egy innovatív nanotechnológiai módszer, amellyel hatóanyaghordozó nanoszálak állíthatók elő. A vírusok nanoszálakba építésével egy olyan, környezeti hatásoknak ellenálló mátrix készíthető, amely védelmet biztosít a befoglalt vírusok számára. Az eljárás költséghatékonyabb és kíméletesebb, mint a hagyományosan használt liofilizálás vagy porlasztva szárítás.

Kísérleteink során a BoHV-1 vírust MDBK; a TGEV vírust pedig ST/E62 sejttenyészeteken szaporítottuk fel. A megfelelő titert elérő vírusszuszpenziókat preparatív ultracentrifugálással koncentráltuk és tisztítottuk. A vírusokat egy előkísérlet során az ES-hez használt szálképző oldatokhoz kevertük, hogy kimutassuk azok potenciálisan inaktiváló hatását. A szálképzéseket nagysebességű, méretnövelt termelésre alkalmas electrospinning készülékkel (HSES) végeztük. A stabilitás elősegítésére segédanyagként mannitot és szacharózt használtunk. Az elkészült nanoszálakból a fertőzőképes vírusok mennyiségét véghigításos titrálással határoztuk meg, a vírusok szálakban lévő örökítőanyag-tartalmát qPCR technikával mértük, a kész nanoszálak morfológiáját pedig scanning electronmikroszkóppal (SEM) vizsgáltuk.

A szálképzések előtt végzett tolerancia teszt során azt tapasztaltuk, hogy a β-ciklodextrin alapanyag antivirális hatást fejt ki a burkos vírusokra. A PVPVA64 és a PVA-PEO biopolimereket azonban kompatibilisnek találtuk a vizsgált vírusokkal, így a szálképzésekhez ezeket az alapanyagokat használtuk. A kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a vírusok jobban megőrzik a fertőzőképességüket az ES és az azt követő tárolás során, ha fehérjetartalmú oldatot használunk reszuszpendálásukra, ha a szálakat 4°C-on tároljuk, és különösen ha szacharóz vagy mannit segédanyagot adunk a szálképző közeghez. Mind a BoHV-1, mind a TGEV esetén a vírustiterek előállítási folyamat általi közvetlen csökkenése 0,8-1,5 $\log_{10}$ közötti volt a megfelelő körülmények, illetve kombinációk beállítása után. A nanoszálak egy hónapos tárolása alatt a vírusok infektív titere csak kis mértékben csökkent (BoHV-1, mannit segédanyag használata mellett), vagy teljesen stabil maradt (TGEV).

Eredményeink alapján az ES alkalmas módszer vírusok szilárd formulációjára; az eljárás érzékeny lipidburkos vírusok számára is jól tolerálható. Megfelelő segédanyagok felhasználásával a vakcinagyártásban a liofilizálás és a porlasztva szárítás alternatívájaként kaphat szerepet. Nagy lehetőséget rejt a nagyüzemi állattartásban használt perorális, illetve aeroszolos tömegoltásoknál, valamint kedvezőtlen környezeti körülmények között (például meleg égövi országokban).

SUMMARY

One of the substantial challenges of the production of live virus vaccines is the reduction of the infectious titre of viruses during formulation and storage. Electrospinning (ES), an innovative method of nanotechnology may be a suitable option to enhance stability via the incorporation of viruses (along with other biologicals) into nanofibres. The virus-carrying nanofibre matrix may promote resistance to environmental impacts, providing protection for the integrated viruses. This method is more cost-effective and operates at less demanding temperature and pressure conditions than traditionally used freeze-drying or spray-drying.

During our experiments, we propagated viruses BoHV-1 and TGEV on MDBK and ST/E62 cell cultures, respectively. Viral suspensions that reached appropriate titre were concentrated and purified by preparative ultracentrifugation. In a preliminary experiment, viruses were mixed with solutions that can be used as the basis of ES to reveal their potential inactivating effect. Scaled-up production of nanofibres was performed using a high-speed electrospinning (HSES) platform. Mannitol and sucrose were used as stabilizing additives. The quantity of infective virions dissolved from the nanofibres was detected by titration, the virus-specific nucleic acid copy numbers were measured with qPCR technique, and the morphology of the finished nanofibers was demonstrated by scanning electron microscopy.

The tolerance test performed before ES revealed that a possible ES agent, β-cyclodextrin exerts antiviral effect on enveloped viruses. However, biopolymers PVPVA64 and PVA-PEO were compatible with the tested viruses, thus we used these materials for fibre-forming. The results of the experiments showed that viruses more preserve their virulence during ES and subsequent storage if the solution used for their resuspension contains proteins, if the fibres are stored at 4°C, and especially if mannitol or sucrose is added to the fibre-forming medium. In the cases of both BoHV-1 and TGEV the direct reduction of the viral titres upon fibre-production was between 0.8-0.10 $\log_{10}$, using the appropriate settings and combinations. During a one-month-long storage of nanofibres, the infectious titre of the viruses decreased only slightly (BoHV-1, using mannitol) or remained stable (TGEV).

Based on our results, ES is a suitable method for the solid formulation of viruses – the process is well tolerated even by sensitive, enveloped viruses. Using the proper excipients this method may serve as alternative to freeze-drying and spray-drying in vaccine production. It provides a notable opportunity to enhance peroral and aerosol mass vaccinations of swine and poultry, and its use might also be considered under unfavourable environmental conditions (e.g. tropical countries).

IRODALOM JEGYZÉK

[1] Domján J, Vass P, Hirsch E, Szabó E, Pantea E, Andersen SK, Vigh T, Verreck G, Marosi G, Nagy ZK (2020) Monoclonal antibody formulation manufactured by high-speed electrospinning. International Journal of Pharmaceutics 591:120042. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120042

[2] S-WL, Belcher* AM (2004) Virus-Based Fabrication of Micro- and Nanofibers Using Electrospinning. In: ACS Publications. https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/nl034911t. Accessed 3 Oct 2022

[3] Dowlath S, Campbell K, Al-Barwani F, Young VL, Young SL, Walker GF, Ward VK (2021) Dry Formulation of Virus-Like Particles in Electrospun Nanofibers. Vaccines 9:213. https://doi.org/10.3390/vaccines9030213

[4] Vass P (2020) Vizes oldat alapú méretnövelt elektrosztatikus szálképzés alkalmazása a gyógyszeriparban. PhD értekezés, BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék **https://repozitorium.omikk.bme.hu/bitstream/handle/10890/15081/ertekezes.pdf?sequence=2**

[5] Greiner A, Wendorff JH (2007) Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. Angewandte Chemie International Edition 46:5670–5703. https://doi.org/10.1002/anie.200604646

[6] Hirsch E, Vass P, Demuth B, Petho Zs, Bitay E, Andersen SK, Vigh T, Verreck G, Molnar K, Nagy ZsK, Marosi Gy (2019) Electrospinning scale-up and formulation development of PVA nanofibers aiming oral delivery of biopharmaceuticals. Express Polym Lett 13:590–603. https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2019.50

[7] Hirsch E, Pantea E, Vass P, Domján J, Molnár M, Suhajda Á, Andersen SK, Vigh T, Verreck G, Marosi GJ, Nagy ZK (2021) Probiotic bacteria stabilized in orally dissolving nanofibers prepared by high-speed electrospinning. Food and Bioproducts Processing 128:84–94. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.04.016

[8] Nagy ZK, Balogh A, Démuth B, Pataki H, Vigh T, Szabó B, Molnár K, Schmidt BT, Horák P, Marosi G, Verreck G, Van Assche I, Brewster ME (2015) High speed electrospinning for scaled-up production of amorphous solid dispersion of itraconazole. International Journal of Pharmaceutics 480:137–142. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.01.025

[9] Sebe I, Petzke M, Zelko R, Kállai-Szabó B (2013) [Preparation and possibilities for pharmaceutical use of nano- and microfiber systems I]. Acta pharmaceutica Hungarica 83:96–104

[10] Xie J, Li X, Xia Y (2008) Putting Electrospun Nanofibers to Work for Biomedical Research. Macromolecular Rapid Communications 29:1775–1792. https://doi.org/10.1002/marc.200800381

[11] Ramakrishna S, Fujihara K, Teo W-E, Yong T, Ma Z, Ramaseshan R (2006) Electrospun nanofibers: solving global issues. Materials Today 9:40–50. https://doi.org/10.1016/S1369-7021(06)71389-X

[12]. Malenovská H (2014) The influence of stabilizers and rates of freezing on preserving of structurally different animal viruses during lyophilization and subsequent storage. J Appl Microbiol, 117:1810-9.

[13]. Hansen LJJ, Daoussi R, Vervaet C, Remon J-P, De Beer TRM (2015) Freeze-drying of live virus vaccines: A review. Vaccine 33:5507–5519. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.08.085

[14]. Démuth B (2018) Elektrosztatikus szálképzéssel előállított amorf szilárd diszperzió feldolgozhatóságának vizsgálata. MKF 124:43–48. https://doi.org/10.24100/MKF.2018.01.43

[15] Ameri M, Maa Y-F (2006) Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations. Drying Technology 24:763–768. https://doi.org/10.1080/03602550600685275

[16]. Cerbu C, Kah M, White JC, Astete CE, Sabliov CM (2021) Fate of Biodegradable Engineered Nanoparticles Used in Veterinary Medicine as Delivery Systems from a One Health Perspective. Molecules 26:523. https://doi.org/10.3390/molecules26030523

[17] Rošic R, Kocbek P, Pelipenko J, Kristl J, Baumgartner S (2013) Nanofibers and their biomedical use. Acta Pharmaceutica 63:295–304. https://doi.org/10.2478/acph-2013-0024

[18] Gunn J, Zhang M (2010) Polyblend nanofibers for biomedical applications: perspectives and challenges. Trends in Biotechnology 28:189–197. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.006

[19] Leung V, Ko F (2011) Biomedical applications of nanofibers. Polymers for Advanced Technologies 22:350–365. https://doi.org/10.1002/pat.1813

[20] Zeng J, Yang L, Liang Q, Zhang X, Guan H, Xu X, Chen X, Jing X (2005) Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation. Journal of Controlled Release 105:43–51. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.02.024

[21] Jia Y, Krishnan L, Omri A (2015) Nasal and pulmonary vaccine delivery using particulate carriers. Expert Opin Drug Deliv 12:993–1008. https://doi.org/10.1517/17425247.2015.1044435

[22] Calderon-Nieva D, Goonewardene KB, Gomis S, Foldvari M (2017) Veterinary vaccine nanotechnology: pulmonary and nasal delivery in livestock animals. Drug Deliv and Transl Res 7:558–570. https://doi.org/10.1007/s13346-017-0400-9

[23]. Roy CJ, Ault A, Sivasubramani SK, Gorres JP, Wei C-J, Andersen H, Gall J, Roederer M, Rao SS (2011) Aerosolized adenovirus-vectored vaccine as an alternative vaccine delivery method. Respiratory Research 12:153. https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-153

[24] Roth Y, Chapnik JS, Cole P (2003) Feasibility of Aerosol Vaccination in Humans. Ann Otol Rhinol Laryngol 112:264–270. https://doi.org/10.1177/000348940311200313

[25]. 1. Garton W (2016) Commercial chicken vaccination: part 1 – spray and aerosol usage. In: Vet Times. https://www.vettimes.co.uk/article/commercial-chicken-vaccination-part-1-spray-and-aerosol-usage/.

[26] Rothen-Weinhold null, Gurny null, Dahn null (2000) Formulation and technology aspects of conrolled drug delivery in animals. Pharm Sci Technol Today 3:222–231. https://doi.org/10.1016/s1461-5347(00)00276-5

[27]. Rathbone MJ, Martinez MN (2002) Modified release drug delivery in veterinary medicine. Drug Discovery Today 7:823–829. https://doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02362-0

[28] Iburg DM (2003) Drinking water vaccination against Salmonella - a proven concept also in day-old chicks. , Lohmann Information

[29] Kroll JJ, Roof MB, McOrist S (2004) Evaluation of protective immunity in pigs following oral administration of an avirulent live vaccine of Lawsonia intracellularis. American Journal of Veterinary Research 65:559–565. https://doi.org/10.2460/ajvr.2004.65.559

[30] Garton W (2016) Commercial chicken vaccination: part 2 – drinking water administration. In: Vet Times. https://www.vettimes.co.uk/article/commercial-chicken-vaccination-part-2-drinking-water-administration/.

[31] Davitt CJH, Lavelle EC (2015) Delivery strategies to enhance oral vaccination against enteric infections. Advanced Drug Delivery Reviews 91:52–69. https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.007

[32] Tizard IR (2021) Chapter 18 - Porcine vaccines. In: Tizard IR (ed) Vaccines for Veterinarians. Elsevier, pp 225-242.e1

[33] Ochoa-Repáraz J, Sebastià E, Sitjà M, Tamayo I, Irache JM, Gamazo C (2021) Protection Conferred by Drinking Water Administration of a Nanoparticle-Based Vaccine against Salmonella Enteritidis in Hens. Vaccines 9:216. https://doi.org/10.3390/vaccines9030216

[34] Jana P, Shyam M, Singh S, Jayaprakash V, Dev A (2021) Biodegradable polymers in drug delivery and oral vaccination. European Polymer Journal 142:110155. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110155

[35] Bezerra BB, Silva GPD da, Coelho SVA, Correa IA, Souza MRM de, Macedo KVG, Matos BM, Tanuri A, Matassoli FL, Costa LJ da, Hildreth JEK, Arruda LB de (2022) Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-BCD) inhibits SARS-CoV-2 replication and virus-induced inflammatory cytokines. Antiviral Res 205:105373. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105373

[36] Graham DRM, Chertova E, Hilburn JM, Arthur LO, Hildreth JEK (2003) Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus with beta-cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions: evidence for virion-associated lipid rafts. J Virol 77:8237–8248. https://doi.org/10.1128/jvi.77.15.8237-8248.2003

[37] Pastorino B, Baronti C, Gould EA, Charrel RN, Lamballerie X de (2015) Effect of Chemical Stabilizers on the Thermostability and Infectivity of a Representative Panel of Freeze Dried Viruses. PLOS ONE 10:e0118963. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118963

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ÉS NYILATKOZATOK

Hálás köszönettel tartozom mindenkinek, aki hozzájárult a tudományos diákköri munkám elkészítéséhez. Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Marosi Andrásnak, akinek lelkes bíztatása és tanácsai nélkül nem készülhetett volna el ez a dolgozat.

Valamint köszönöm Dr. Tenk Miklósnak a szívélyes fogadtatást a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszéken. Őszinte köszönettel tartozom a tanszék valamennyi munkatársának a segítségéért.

További köszönet illeti a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar (BME-VBK) Szerves Kémia és Technológia Tanszék, Gyógyszer- Környezeti- és Biztonságtechnológiai Anyagok Kutatócsoportjának a tagjait, különösen Dr. Hirsch Editet, és az ELKH Állatorvostudományi Kutatóintézet Molekuláris és Összehasonlító Virológia csoportjából Dr. Papp Tibort.

Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: GRÁNITZ NÓRA

Neptun-kódja: C8TFLG

A témavezető neve és beosztása: DR. MAROSI ANDRÁS, EGYETEMI ADJUNKTUS

Tanszék: JÁRVÁNYTANI ÉS MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

A diplomadolgozat címe: VÍRUSOK BEÉPÍTÉSE POLIMER ALAPÚ NANOSZÁLAKBA (TDK DOLGOZAT)

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2021	09	20	Téma áttekintése Laormunka bemutatása	
2.	2021	10	04	Sejttenyészetek passzálása	
3.	2021	11	03	Vírustitrálás	
4.	2021	12	15	Vírusszolálás sejttenyészeten	
5.	2022	01	12	Eredmények értékelése, konzultáció	

Érdemjegy az első félév végén: 5

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2022	02	04	Nukleinsav-kivonás	
2.	2022	02	23	Real-time PCR	
3.	2022	03	09	Vírustitrálás	
4.	2022	04	13	Nanoszálképzés (BME)	
5.	2022	05	13	Eredmények értékelése, dolgozat terv	

Érdemjegy a második félév végén: 5

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!

A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védésre alkalmasnak találtam.

……...
témavezető aláírása

Hallgató aláírása: Grótotz Nóra……

Tanszéki előadó aláírása: ……..……Átvétel dátuma: ……..…....

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!

NYILATKOZAT

Alulírott GRÁNITZ NORA nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe VÍRUSOK BEÉPÍTÉSE BIOPOLIMER ALAPÚ NANOSZÁLAKBA tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2022 évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2023. 11. 01.

Gránitz Nora

a hallgató neve és aláírása