T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

MUKOZAL İMMÜNİZASYON AMACIYLA AŞI TAŞIYICI NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

MELİKE DURAN

DANIŞMAN
DOÇ. DR. ERDAL CEVHER

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2016

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Doktora Programında 2702100084-Melike Duran tarafından hazırlanan Mukozal İmmünizasyon Amacıyla Aşı Taşıyıcı Nanopartiküler Sistemlerin Geliştirilmesi başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

13 / 04 / 2016

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) İmzası

1.Doç.Dr. Erdal Cevher (Tez Danışmanı) (İstanbul Üniversitesi/Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Teknoloji ABD)

2.Prof. Dr. Ahmet Oğul Araman (İstanbul Üniversitesi/Eczacılık Fakültesi /Farmasötik Teknoloji ABD)

3.Prof.Dr. Yıldız Özsoy Erginer (Tez İzleme Komitesi Üyesi) (İstanbul Üniversitesi/Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Teknoloji ABD)

4.Doç.Dr. Oya Kerimoğlu(Tez İzleme Komitesi Üyesi) (Marmara Üniversitesi/Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Teknoloji ABD)

5.Yrd.Doç.Dr. Neslihan Üstündağ Okur (İstanbul Medipol Üniversitesi /Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Teknoloji ABD)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

MELİKE DURAN

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca tecrübelerinden yararlandığım, kendisinden birçok şey öğrendiğim değerli tez danışmanım Doç. Dr. Erdal CEVHER'e,

Bu çalışma boyunca bana yol gösteren ikinci tez danışmanım Prof. Dr. Oya H. ALPAR'a,

Doktoram süresince gerekli olanakları sağlamada yardımlarını esirgemeyen Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet O. ARAMAN'a,

İn vivo hayvan deneylerinde her türlü yardımı ve desteği veren Doç. Dr. Alper OKYAR'a,

FTIR spektralarının yorumlanmasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren Yrd. Doç. Dr. Mehmet Koray GÖK'e,

SDS-PAGE çalışmasında bilgi ve tecrübeleriyle bana destek olan Doç. Dr. Pınar AKSOY SAĞIRLI'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Hücre kültürü çalışmalarında bana yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Ayca YILDIZ PEKÖZ ve Arş. Gör. Dr. Şeyma Hande TEKARSLAN'a,

Tezim süresince varlığıyla bana destek olan Ecz. Genada SİNANİ'ye,

Çalışmam boyunca tüm problemlerimde ve mutluluklarımda yanımda olan Uzm. Ecz. Burcu MESUT ve Uzm. Ecz. Deniz MORİNA'ya,

Bu süreçte yanımda olan tüm öğretim üyesi ve yardımcılarına, araştırma görevlilerine,

Hayatımı değerli kılan ve bir an olsun destek ve sevgilerini benden esirgemeyen aileme ve eşime, tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 28487

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Xİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XVİ
ÖZET ..... XVİİİ
ABSTRACT ..... XİX
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Aşılamaya Genel Bakış 4
2.2. Aşı Çeşitleri 4
2.2.1. Canlı Attenüe (Zayıflatılmış) Aşılar 5
2.2.2. Ölü ve İnaktif Aşılar 6
2.2.3. Alt Birim Aşılar 6
2.2.4. Toksoid Aşılar 6
2.2.5. DNA İçeren Aşılar 7
2.3. İmmün Sistem 7
2.3.1. Doğal Bağışıklık 7
2.3.2. Edinsel Bağışıklık 8
2.4. Mukozal İmmünite 9
2.4.1. Mukoza ile İlgili Lenfoid Doku (MALT) 11
2.4.1.1. Barsak İlgili Lenfoid Doku (GALT) 12
2.4.1.2. Nazal İlgili Lenfoid Doku (NALT) 13
2.4.1.3. Bronşlarla İlgili Lenfoid Doku (BALT) 14
2.5. Mukozal Aşı Formülasyonlarında Adjuvanların Yeri ve Önemi 15
2.6. Mukozal Adjuvanlar 17
2.6.1. Enterotoksinler 17
2.6.2. Lipopolisakkaritler ve Monofosforil Lipid A (MPL®) 17

2.6.3. İmmünostimülatör CpG Motifleri 18
2.6.4. Saponin Türevleri 18
2.6.5. MF59 19
2.6.6. Sitokinler ve Kemokinler 20
2.6.7. Virozomlar ve Virüs Benzeri Partiküller 21
2.6.8. Lipit İçeren Partiküler Aşı Taşıyıcı Sistemler 22
2.6.9. Polimer İçeren Taşıyıcı Sistemler 23
2.7. Kitosan Tuzları ve Trimetil Kitosan 24
2.8. Karboksimetil Kurdlan 26
2.9. Polielektrolit Kompleksiyon (PEC) Oluşumu ile Nanopartikül Hazırlama 27
2.10. Sığır Serum Albumini (BSA) Antijeni 27
2.11. A549 ve CALU-3 Hücre Hatları 28
3. GEREÇ VE YÖNTEM 29
3.1. BSA Antijeninin Özelliklerinin Belirlenmesi 32
3.1.1. BSA Antijeninin UV Spektrumu 32
3.1.2. BSA Antijeninin Bradford Yöntemiyle Kalibrasyonu 32
3.1.3. BSA Antijeninin Bradford Yöntemiyle Kalibrasyonunun Validasyonu 32
3.1.3.1. Doğrusallık 32
3.1.3.2. Doğruluk 33
3.1.3.3. Kesinlik 33
3.1.3.4. Özgünlük 33
3.1.3.5. Teşhis Limiti (LOD) 33
3.1.3.6. Miktar Tayini Limiti (LOQ) 34
3.2. Kitosan Klorür (CC) ve Kitosan Glutamat (CG) Hazırlanması 34
3.3. *N*-Trimetil Kitosan Klorür (TMC) Sentezi 34
3.4. Karboksimetil Kurdlan (CMC) Sentezi 35
3.5. Sentezlenen Polimerlerin Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrometresi ile Analizi 35
3.6. TMC ve CMC'nin Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektrometresi ile Analizi 35
3.7. Boş Nanopartiküllerin ve BSA Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması 36
3.8. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliğinin Tayini 37
3.9. Farklı Çözeltilerin Nanopartikül Formülasyonlarına Etkisi 38

3.10. Nanopartikül Boyutunun ve Boyut Dağılımının İncelenmesi 38
3.11. Partiküllerin Zeta Potansiyellerinin Öçülmesi 38
3.12. Nanopratiküllerin Fiziksel Stabilitesinin İncelenmesi 39
3.13. Santrifüj ve Liyofilizasyon İşlemlerinin Nanopartiküllerin Stabilitesi Üzerine Etkisi 39
3.14. Partiküllerin Morfolojisinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile İncelenmesi 39
3.15. SDS Protein Bütünlüğü Testi 40
3.16. Hücre Kültürü Çalışmaları 40
3.16.1. Calu-3 Hücre Kültürü Çalışmaları 40
3.16.1.1. Calu-3 Hücrelerinin Hazırlanması 40
3.16.1.2. Calu-3 Hücrelerinin Pasajlanması 41
3.16.2. A549 Hücre Kültürü Çalışmaları 41
3.16.2.1. A549 Hücrelerinin Açılması 41
3.16.2.2. A549 Hücrelerinin Pasajlanması 42
3.17.İn Vitro Sitotoksisite Testi 42
3.18. İmmünolojik Çalışmalar 43
3.18.1. Örneklerin Toplanması 45
3.18.2. Antikor Deneyleri 45
3.18.3. İmmünolojik Çalışmalara alınan Farelerin Primer Dalak Hücrelerinin İzolasyonu 46
3.18.4. Sitokin Analizi için Dalak Hüclerinin BSA Antijeni ile yeniden Uyarılması 47
3.18.5. Sitokin Analizleri 47
3.19. İstatiksel Çalışmalar 48
4. BULGULAR 49
4.1. BSA Antijeninin Özelliklerinin Belirlenmesine Ait Bulgular 49
4.1.1. BSA Antijeninin UV Spektrumuna Ait Bulgular 49
4.1.2. BSA Antijeninin Bradford Yöntemiyle Kalibrasyonunun Validasyonuna Ait Bulgular 49
4.1.2.1. Doğrusallık 49
4.1.2.2. Doğruluk 50
4.1.2.3. Kesinlik 51
4.1.2.4. Özgünlük 52

4.1.2.5. Teşhis Limit (LOD) ve Miktar Tayini Limiti (LOQ).....52
4.2. Kitosan Klorür (CC) ve Kitosan Glutamat (CG) Hazırlanması.....52
4.3. Trimetil Kitosan Klorür (TMC) Sentezi 53
4.4. Karbosimetil Kurdlan (CMC) Sentezi 54
4.5. Sentezlenen Polimerlerin Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrometresi ile Analizi.....54
4.5.1. Kitosan Klorür ve Kitosan Glutamatın FTIR Spektrometresi ile Analizi.....54
4.5.2. Trimetil Kitosan FTIR Spektrometresi ile Analizi 55
4.5.3. Karboksimetil Kurdlan FTIR Spektrometresi ile Analizi.....56
4.6. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektrometresi ile TMC ve CMC'nin Analizi 57
4.6.1. TMC'nin NMR Spektrometresi ile Analizi 57
4.7. Farklı Ortamların Nanopartikül Formülasyonlarına Etkisi.....59
4.8. CC-CMC, CG-CMC ve TMC-CMC Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu.....61
4.8.1. CC-CMC Nanopartiküllerinin Boyut, Zeta Potansiyeli ve Enkapsülasyon Etkinliği Sonuçları 61
4.8.2. CG-CMC Nanopartiküllerinin Boyut, Zeta Potansiyeli ve Enkapsülasyon Etkinliği Sonuçları 63
4.8.3. TMC-CMC Nanopartiküllerinin Boyut, Zeta Potansiyeli ve Enkapsülasyon Etkinliği Sonuçları 65
4.8.4. CC-CMC, CG-CMC ve TMC-CMC Nanopartiküllerinin Fiziksel Stabilitesinin İncelenmesine Ait Bulgular 67
4.8.5. Santrifüj ve Liyofilizasyon İşlemlerinin CC-CMC, CG-CMC ve TMC-CMC Nanopartiküllerinin Stabilitesi Üzerine Etkisine Ait Bulgular 72
4.8.6. CC-CMC, CG-CMC ve TMC-CMC Nanopartiküllerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Analizine Ait Bulgular.....74
4.9. Protein Bütünlüğü Testine Ait Bulgular 76
4.10. İn Vitro Sitotoksisite Testine Ait Bulgular 78
4.11. İmmünolojik çalışmların sonuçları 79
4.11.1. Antikor Deneylerinin Sonuçları.....79
4.11.1.1. Intranazal Olarak Uygulanan Formülasyonlar Sonrasında Elde Edilen Antikor Sonuçları.....79
4.11.1.2. Subkütan Olarak Uygulanan Formülasyonlar Sonrasında Elde Edilen Antikor Sonuçları.....83

4.11.1.3. İntranazal Olarak Uygulanan Formülasyonlar Sonrasında Elde Edilen Lokal Anti BSA IgA Yanıtları 87
4.11.2. Uyarılan Dalak Hücrelerinden Elde Edilen Sitokin Sonuçları.....88
4.11.2.1. İntranazal yoldan Formülasyon Uygulanan Hayvalara Ait Dalak Hücrelerinden Elde Edilen Sonuçlar.....89
4.11.2.2. Subkütan Yoldan Formülasyon Uygulanan Hayvalara Ait Dalak Hücrelerinden Elde Edilen Sonuçlar.....93
5. TARTIŞMA.....99
KAYNAKLAR.....116
ETİK KURUL KARARI..... **HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.**
ÖZGEÇMİŞ.....132

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: İnsanda Yaygın Olarak Kullanılan Aşıların Sınıflandırılması (Goldsby ve ark. 2006) 5
Tablo 3-1: İmmünizasyon Çalışma Programı 43
Tablo 4-1: BSA antijeninin standart eğrisine ait parametreler 50
Tablo 4-2: BSA antijeninin miktar tayini yönteminin doğrusallığına ait veriler 50
Tablo 4-3: BSA antijeninin miktar tayini yönteminin doğruluğuna ait veriler (n=6) 51
Tablo 4-4: BSA antijeninin miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirliğine ait veriler (n=6) 51
Tablo 4-5: BSA antijeninin miktar tayini yönteminin ara kesinliğine ait veriler (n=6) . 52
Tablo 4-6: Farklı ortamlardaki CC-CMC nanopartikül formülasyonlarının boyut ve zeta potansiyeli sonuçları 59
Tablo 4-7: Farklı ortamlardaki CG-CMC nanopartikül formülasyonlarının boyut ve zeta potansiyeli sonuçları 60
Tablo 4-8: Farklı ortamlardaki TMC-CMC nanopartikül formülasyonlarının boyut ve zeta potansiyeli sonuçları 60
Tablo 4-9: Boş ve BSA yüklü CC-CMC nanopartiküllerinin karşılatırmalı boyut, polidispersite indeksi ve Zeta potansiyeli verileri 61
Tablo 4-10: BSA yüklü CC-CMC nanopartiküllerinin boyut, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği ve verime ait veriler 62
Tablo 4-11: Boş ve BSA yüklü CG-CMC nanopartiküllerinin karşılatırmalı boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli verileri 63
Tablo 4-12: BSA yüklü CG-CMC nanopartiküllerinin boyut, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği ve verime ait veriler 64
Tablo 4-13: Boş ve BSA yüklü TMC-CMC nanopartiküllerinin karşılatırmalı boyut, polidispersite indeksi ve Zeta potansiyeli verileri 65
Tablo 4-14: BSA yüklü TMC-CMC nanopartiküllerinin boyut, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği ve verime ait veriler 66
Tablo 4-15: CC-CMC nanopartiküllerinin 4 haftalık stabilite sonuçları 67
Tablo 4-16: CG-CMC nanopartiküllerinin 4 haftalık stabilite sonuçları 69
Tablo 4-17: TMC-CMC nanopartiküllerinin 4 haftalık stabilite sonuçları 70

Tablo 4-18: 2:1 oranında sırasıyla CC ve CMC'den oluşan C3 formülasyonuna santrifüjün etkisinin incelenmesi (Santrifüj sürelerinin araştırılmasının yanında gliserol (0,2 mL)ilavesinin etkisi de incelenmiştir.) n=3 72
Tablo 4-19: 3:1 oranında sırasıyla CG ve CMC'den oluşan G5 formülasyonuna santrifüjün etkisinin incelenmesi (Santrifüj sürelerinin araştırılmasının yanında gliserol (0,2 mL)ilavesinin etkisi de incelenmiştir.) n=3 73
Tablo 4-20: 2:1 oranında sırasıyla TMC ve CMC'den oluşan C3 formülasyonuna santrifüjün etkisinin incelenmesi (Santrifüj sürelerinin araştırılmasının yanında gliserol (0,2 mL)ilavesinin etkisi de incelenmiştir.) n=3 73

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Aşı ile doğal ve edinilmiş bağışıklığın uyarılması (Akagi ve ark. 2012)..... 9
Şekil 2-2: Mukozal immün yanıtın başlatılması (Xu ve ark. 2014)..... 10
Şekil 2-3: Mukozal yüzeyin antijene maruz kalması sonrası sIgA'nın uyarılması (Chen 2000)..... 11
Şekil 2-4: Nazal yoldan uygulanan nanopartiküler aşı formülasyonunun izlediği yol (Slütter 2011)..... 14
Şekil 2-5: Mukozal immünizasyonda kullanılan taşıyıcı sistemlere örnekler (Gregory ve ark. 2013)..... 16
Şekil 2-6: Nanopartiküler aşı sisteminin immün yanıtı uyarması (Akagi ve ark. 2012) 24
Şekil 3-1: Nanopartiküllerin polielektrolit kompleksi yöntemiyle hazırlanması (Martino 2014 deki şekil modifiye edilerek çizilmiştir.)..... 37
Şekil 4-1: BSA antijeninin standart eğri grafiği..... 49
Şekil 4-2: Kitosan Klorür ve Kitosan Glutamat'ın şekilsel gösterimi..... 53
Şekil 4-3: N-TMC'ın sentez reaksiyonu..... 53
Şekil 4-4: CMC'nin sentez reaksiyonu..... 54
Şekil 4-5: Kitosan, Kitosan Klorür (CC) ve Kitosan Glutamat (CG)'a ait FTIR Spektrası 55
Şekil 4-6: Kitosan ve Trimetil Kitosan (TMC)'a ait FTIR spektrası..... 56
Şekil 4-7: Kurdlan (C) ve Karboksimetil Kurdlan (CMC)'a ait FTIR spektrası..... 57
Şekil 4-8: TMC'nin NMR spektrası..... 58
Şekil 4-9: CMC'nin NMR spektrası..... 58
Şekil 4-10: CC-CMC nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobundaki görüntüsü; Büyütme X50000..... 74
Şekil 4-11: CG-CMC nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobundaki görüntüsü; Büyütme X50000..... 75
Şekil 4-12: TMC-CMC nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobundaki görüntüsü; Büyütme X10000..... 76
Şekil 4-13: BSA yüklü nanopartiküllerin SDS-PAGE görüntü..... 77
Şekil 4-14: 0,05-5 mg/mL konsantrasyon aralığındaki trimel kitosan dispersiyonu (TMC disp.+BSA), kitosan klorür dispersiyonu (CC disp.+BSA), kitosan glutamat dispersiyonu (CG disp.+BSA) ve karboksimetil kudlan disperisyonu (CG disp.+BSA) ile 2:1

oranındaki TMC-CMC ve CC-CMC ve 3:1 oranındaki CG-CMC nanopartiküllerinin (sırasıyla, TMC-CMC NP+BSA, CC-CMC NP+BSA ve CG-CMC NP+BSA) A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi 78
Şekil 4-15: 0,05-5 mg/mL konsantrasyon aralığındaki trimel kitosan dispersiyonu (TMC disp.+BSA), kitosan klorür dispersiyonu (CC disp.+BSA), kitosan glutamat dispersiyonu (CG disp.+BSA) ve karboksimetil kudlan disperisyonu (CG disp.+BSA) ile 2:1 oranındaki TMC-CMC ve CC-CMC ve 3:1 oranındaki CG-CMC nanopartiküllerinin (sırasıyla, TMC-CMC NP+BSA, CC-CMC NP+BSA ve CG-CMC NP+BSA) CALU-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi 79
Şekil 4-16: BSA antijenine özgü IgG antikor titreleri (i.n.). 80
Şekil 4-17: BSA antijenine özgü IgG1 antikor titreleri (i.n). 81
Şekil 4-18: BSA antijenine özgü IgG_{2a} antikor titreleri (i.n.) 82
Şekil 4-20: BSA antijenine özgü IgG antikor titreleri (s.c.). 84
Şekil 4-21: BSA antijenine özgü IgG1 antikor titreleri (s.c.). 85
Şekil 4-22: BSA antijenine özgü IgG2a antikor titreleri (s.c.). 86
Şekil 4-23: Subkütan uygulama sonrasında serum anti-BSA IgG (IgG1 ve IgG2a) oranları 87
Şekil 4-24: BSA antijenine özgü IgGA antikor titreleri (i.n.). 88
Şekil 4-25: İntranazal uygulama sonrasında splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile tekrardan uyarılması sonucu elde edilen IL-2 yanıtları. 89
Şekil 4-26: İntranazal uygulama sonrasında splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile tekrardan uyarılması sonucu elde edilen IFN-γ yanıtları. 90
Şekil 4-27: İntranazal uygulama sonrasında splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile tekrarda uyarıması sonucu elde edilen IL-4 yanıtları. 91
Şekil 4-28: İntranazal uygulama sonrasında splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile tekrardan uyarılması sonucu elde edilen IL-6 yanıtları. 92
Şekil 4-29: İntranazal uygulama sonrasında splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile tekrardan uyarılması sonucu elde edilen IL-10 yanıtları. 93
Şekil 4-30: Subkütan uygulama sonrasında splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile tekrardan uyarılması sonucu elde edilen IL-2 yanıtları. 94
Şekil 4-31: Subkütan uygulama sonrasında splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile tekrardan uyarılması sonucu elde edilen IFN-γ yanıtları. 95

Şekil 4-32: İntranazal uygulama sonrasında splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile tekrardan uyarılması sonucu elde edilen IL-4 yanıtları. 96
Şekil 4-33: Subkütan uygulama sonrasında splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile tekrardan uyarılması sonucu elde edilen IL-6 yanıtları. 97
Şekil 4-34: Subkütan uygulama sonrasında splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile tekrardan uyarılması sonucu elde edilen IL-10 yanıtları. 98

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ASH	Antijen sunan hücre
BALT	Bronşlara bağlı lenfoid doku
BSA	Sığır serum albumini
CC	Kitosan klorür
CG	Kitosan glutamat
CMC	Karboksimetil Kurdlan
DD	Deasetilasyon derecesi
DH	Dendritik Hücre
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DSC	Diferansiyel taramalı kolorimetri
EE	Enkapsülasyon etkinliği
ELISA	Enzim bağlı immünosorban tayini
FAE	Foliküle ilişkili epitel hücreler
FDA	Amerikan gıda ve ilaç dairesi
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi
GALT	Bağırsağa bağlı lenfoid doku
i.m.	İntramusküler
i.n.	Intranazal
i.p.	İntraperitonal
i.v.	İntravenöz
IFN-γ	İnterferon gama
Ig	İmmünoglobulin
IL	İnterlökin
LT	Isıya dayanıksız enterotoksin
M-hücre	Mikrofold hücre
MALT	Mukozaya bağlı lenfoid doku
MHK	Major Histokompatibilite kompleksi
NALT	Buruna bağlı lenfoid doku
NP	Nanopartikül

ODN	Oligodeoksinükleotit
OVA	Ovalbumin
PAMP	Patojen ilişkili moleküler kalıplar
PBS	Fosfat tampon tuzu
PDI	Polidispersite indeksi
PEC	Polielektrolit kompleksi
PRR	Kalıp tanıma reseptörleri
RSD	Rölatif Standart Sapma
s.c.	Subkütan
SD	Standart sapma
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
sIgA	Salgısal immunoglobulin A
STL	Sitotoksik T lenfositleri
TCR	T hücre reseptörü
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
Th	Yardımcı T hücresi
TLR	Toll-benzeri reseptör
TMC	N-trimetil kitosan
TNF	Tümör nekroz faktörü
Treg	Düzenleyici T hücresi
VLPs	Virüs benzeri partiküller
ZP	Zeta potansiyeli

ÖZET

Duran, M. (2016). Mukozal immünizasyon amacıyla aşı taşıyıcı nanopartiküler sistemlerin geliştirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Mukozal immünizasyonun parenteral aşılamaya göre etkinlik ve hasta uyuncu gibi avantajları bulunmaktadır. Mukozal yoldan uygulanan aşı hem sistemik hem de mukozal immüniteyi uyarmakla beraber koruyucu bağışıklığın sağlanabilmesi için güçlü hedeflendirme sistemlerine ve adjuvanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Tezin ana hedefi de bu doğrultuda olup yeni, stabil ve yüksek immünojeniteye sahip aşı nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesidir. Bu çalışmada, anyonik bir polimer olan karboksimetil kurdlan (CMC) ile katyonik polimerler kitosan klorür (CC), kitosan glutamat (CG) ve N-trimetil kitosan (TMC) sentezlenmiş ve sonrasında polielektrolit kompleks yöntemi ile ilk kez CC-CMC, CG-CMC ve TMC-CMC nanopartiküllleri hazırlanmıştır. Nanopartiküllere model antijen olan sığır serum albumini (BSA) yüklenmiştir. Yüksek enkapsülasyon etkinliğine ve pozitif yüke sahip nanopartiküller elde edilmiştir. Ayrıca, partikülleri hazırlamak için en ideal ortamın su olduğu ve üç ay boyunca fiziksel stabilitelerini korudukları tespit edilmiştir. Nanopartiküllerin içerisine yüklenen antijenin yapısal bütünlüğü ise SDS-PAGE ile belirlenmiştir. Kullanılan polimerlerin ve nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin toksisitesini belirlemek amacıyla A549 ve Calu-3 hücre hatlarında sitotoksisite çalışmaları yapılmış ve nanopartikülerin katyonik polimerlerin tek başına kullanımlarına göre çok daha düşük toksisite gösterdiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilere göre, immünolojik çalışmalara CC-CMC ve TMC-CMC nanopartikül formülasyonları seçilerek devam edilmiştir. Balb/c dişi fareler kullanılarak 253 gün boyunca immünolojik çalışmalar sürdürülmüştür. Nazal yoldan uygulanan nanopartikül formülasyonlarının uzun süreli immünite sağladığı yapılan antikor (IgG, IgG1, IgG2a ve IgA) ve sitokin (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 ve IFN-gama) analizleri (ELISA) ile gösterilmiştir. Sonuç olarak, bu tez kapsamında, hasta uyuncu yüksek, in vitro/in vivo karakterizasyonları yapılmış, toksik olmayan, yeterli düzeyde ve uzun süreli koruyucu bağışıklığı sağlayan aşı taşıyıcı nanopartiküler formülasyonlar geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nanopartiküller, Kitosan, Kurdlan, Mukozal immünizasyon, Aşı taşıyıcı.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 28487

ABSTRACT

Duran, M. (2016). Developing of vaccine carrier nanoparticular systems for mucosal immunisation. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Technology. Doktora Tezi. İstanbul.

Mucosal immunization offers various advantages such as better efficacious and patient compliance over parenteral vaccination. Mucosal administration may provide mucosal immunity in addition to systemic protection however, to provide protective immunity requires potent delivery systems and/or adjuvants. The ultimate aim of this thesis, in line with that statement, is producing new, stable and highly immunogenic nanocarriers. In this study, carboxymethyl curdlan as a polyanionic polymer and chitosan chloride (CC), chitosan glutamate (CG) and N-trimethyl chitosan (TMC) as a polycationic polymer were synthetized. This is the first study that CC-CMC, CG-CMC and TMC-CMC nanoparticles were prepared via polyelectrolyte complex and loaded with bovine serum albumin (BSA) as a model antigen. Prepared nanoparticles have high encapsulation efficiency and positive surface charge. Also, water is the best media for producing nanoparticles and nanoparticles have stayed stable during three months. Structural integrity of BSA has proved via SDS-PAGE electrophoresis. Cytotoxicity test has done on A549 and Calu-3 cell lines. These nanoparticles had not shown cytotoxicity to the cell lines and nanoparticles resulted in higher cell viability as compared to the cationic polymers alone. For immunological studies, CC-CMC and TMC-CMC nanoparticle formulations were chosen under examining experimental data. Balb/c female mice were used for immunological studies during 253 days. Nasally administered nanoparticles provided long lasting immunity which was determined by antibody (IgG, IgG1, IgG2a and IgA) and cytokine (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and IFN-gamma) analyses (ELISA). As a result, optimized vaccine carriers have high patience compliancy, particular characterization properties, non-toxic, adequately and long-lasting protective immunity.

Key Words: Nanoparticles, Chitosan, Curdlan, Mucosal immunisation, Vaccine carrier.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 28487

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Biyoteknoloji alanındaki son gelişmeler, aşı antijenlerinden yararlanımın artmasına öncülük etmektedir (Mckeever ve Rege 1999). Şimdiye kadar geliştirilen aşıların çoğu, yüksek üretim maliyeti, düşük hasta uyuncu, düşük mukozal yanıt ve uygulama için eğitimli eleman ihtiyacı gibi dezavantajlarlara sahiptir (Vajdy ve ark. 2004). Enjeksiyon yoluyla kullanılan mevcut aşıdan hem etkinlik hem de hasta uyuncu açısından daha iyi bir aşı geliştirme gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, son yıllarda aşıların, oral veya nazal yol gibi mukozal yollardan uygulanması alternatif olarak görülmektedir (Almeida ve Alpar 1996; Illum ve ark. 2001; Illum 2007).

Solunum bölgesi ve özellikle nazal mukoza, kızamık, boğmaca, difteri ve grip gibi solunum yoluyla alınan antijenlerle temas edilen ilk noktadır. Mukozal immünizasyonda, lokal IgA (sIgA) antikorlarının salgılanması immünolojik savunmanın ilk aşamasını sağlamaktadır. Salgılanan IgA'lar (sIgA), hastalık etmenlerinin mukozaya yapışmasını önleyerek herhangi bir hastalığın gelişmesini engellemektedir (Boyaka ve ark. 1999). Ancak, mukozal yol ile uygulanan yüksek molekül ağırlıklı çözünebilir antijenler, çoğunlukla zayıf sistemik immün yanıt gösterirler. Bu duruma sebep olan etmenler; mukozal bariyerden makromoleküllerin sınırlı geçişi, makromoleküllerin hızlı bir şekilde mukosilier klirense uğramaları ve nazal bölgede aşı antijeninin degradasyonuna neden olan enzimlerin varlığıdır (Davis 2001; Illum 2006).

Bu problemlerin üstesinden gelebilmek için, antijenin immünojenitesini arttırmak amacıyla mukozal adjuvanların (CTB, LK halotoksin ve mutantları, CpG ve polikatyonlar) veya partiküler taşıyıcı sistemlerin (mikro/nanopartiküller, lipozomlar ve ISCOM'lar) kullanımı gibi farklı stratejiler geliştirilmiştir (Vajdy ve ark. 2004; Kensil ve ark. 2004; Ulmer 2004; O'Hagan ve Valiente 2003). Son yıllarda ana odak noktası mikro- ve nanopartiküllerden yararlanma üzerine olmuştur. Bu partiküllerin hazırlanmasında, iyi bir immün yanıt ortaya çıkartan poli(D,L-laktit-ko-glikolit) (PLGA) ve poli(L-laktit) (PLA) lar en yaygın kullanılan polimerlerdir (Davis 2006). PLGA ve PLA partikülerinin ana problemi ise; partikülleri hazırlarken antijenin degradasyon/denatürasyonuna yol açan organik çözücü kullanımı ihtiyacı ve hazırlama işleminin kompleks ve zaman harcayıcı olmasıdır (Freitas ve ark. 2005). Son yıllarda, bu polimerlere alternatif olarak kitosan ve türevleri kullanılmaya başlanmıştır (Illum ve ark. 2001; Moschos ve ark. 2004;

Van Der Lubben ve ark. 2001). Kitosan, kitin'in deasitilasyonuyla elde edilmektedir ve deniz ürünleri endüstrisinin bir yan ürünü olduğu için ucuz bir polimerdir. Bunun yanı sıra, biyoparçalanabilir ve düşük toksisiteye sahip olması nedeniyle biyomateryal ve ilaç yardımcı maddesi olarak kullanımı önem kazanmaktadır (Picker-Freyer ve Brink 2006; Singla ve Chaeka 2001; Thanou ve ark. 2001). Yapılan çalışmalar da, hücrelerarası sıkı bağlantı noktalarını açma yeteneğinden dolayı kitosan'ın, paraselüler taşınmayı arttırdığı ve makromoleküllerin absorsiyonunu arttırdığı görülmüştür (Smith ve ark. 2004). Ayrıca kitosan, mukoadhezif özelliklerinden dolayı, mukozal bölgede antijenin kalış süresini arttırmaktadır. Kitosanın çözelti formunun yanı sıra mikro- ve nanopartikül formülasyonlarının aşı taşıyıcı sistemler de kullanımı büyük umut vaat etmektedir (Chopra ve ark. 2006). Farklı çalışmalarda, kitosan nanopartiküllerinin nazal veya oral yoldan verilen çeşitli antijenlerin lokal ve sistemik immün yanıtlarını arttırdığı belirtilmiştir (Illum 2007; Vila ve ark. 2004; Van Der Lubben ve ark. 2003). Nanopartiküller, nazal ilişkili lenfoid dokuda (NALT) bulunan M (mikrofold) hücreleri tarafından etkin bir şekilde alındığından, nazal yolla antijen uygulamasında nanopartikül formülasyonlarının kullanımı, mikropartikül formülasyonlarına göre daha yüksek immün cevap oluşturmaktadır. M hücreleri tarafından alınan nanopartikül içerisindeki antijen, immün yanıtın uyarılmasında anahtar role sahip antijen sunan hücrelere (ASH) iletilir (Kuper ve ark. 1990).

Kurdlan mikrobiyal kaynaklı polisakkaritlerden biri olup β-(1→3) glikozidik bağlarla bağlı D-glukozun lineer noniyonik homopolimeridir. 1966'da Harada tarafından, Agrobacterium Biovar 1'in varlığında glukoz fermantasyonuyla üretilmiştir (Mocanu ve ark. 2009). Kurdlanın AIDS virüs enfeksiyonuna karşı inhibe edici etkisi ve kanda antikoagülan etkisi olduğu saptanmıştır. Bunun yanı sıra *in vitro* ve *in vivo* olarak düşük toksisiteye sahiptir. Ancak, kurdlanın suda çözünür olmaması biyolojik uygulamalarını sınırlandırmıştır. Çoğu polisakkarit için karboksimetil sübstitüsyonu fonksiyonel özelliklerin geliştirilmesi için uygun bir metot olarak düşünülmüştür. Kurdlanın karboksimetil türevinin suda iyi çözünürlüğe sahip olduğu ve antitümöral aktivitesinin yanısıra iyi biyoaktivite de gösterdiği bildirilmiştir (Gao ve ark. 2010).

Yakın geçmişte, kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde ilgi polielektrolit kompleksi (PEC) oluşturma yöntemi üzerine olmuştur. Genellikle PEC'ler iki zıt yüklü polimerin kompleks oluşturması veya bir polianyon ile bir katyonik

sürfaktanın reaksiyon oluşturmasıyla meydana gelmektedir. Bu iki sistem arasındaki ana fark, katyonik sürfaktanların katı durumda tipik olarak yüksek oranda düzenli mezofaz göstermesidir (Thünemann ve ark., 2004). Tabaka tabaka oluşturma (layer by layer) teknolojisi ve zıt yüklü polielektrolitlerin koaservasyonu olmak üzere PEC'ler iki şekilde oluşturulabilmektedir. Tabaka tabaka oluşturma teknolojisi nanopartiküllerin hazırlanması için çok amaçlı bir metot olmakla beraber birçok aşamaya ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle koaservasyon tekniği en çok tercih edilen seçenektir. Bu işlem tek aşamadan oluşmakta ve bir polimer çözeltisinin diğerine hızlı karıştırma esnasında ilave edilmesi ile hazırlanmaktadır. Stabil bir kolloidin oluşumu damlatma hızı, karıştırma hızı, damlacık büyüklüğü, sıcaklık ve pH gibi birçok parametreye bağlıdır (Schatz ve ark. 2004; Chen ve ark. 2005). Partiküllerin oluşumu, ev sahibi-misafir (host-guest) mekanizması ile gerçekleşir. Damla damla ilave edilen misafir polimer (iç kabuğu oluşturur) olup ilave edildiği polimer ev sahibi (dış kabuğu oluşturur) dir.

Tez kapsamında geliştirilen nanopartiküllerin adjuvan etkisi alum (alüminyum tuzları) ve CpG ODNs gibi adjuvanlarla kıyaslanmıştır. Alum, güvenliği ve etkinliği iyi bilinmekle beraber humoral immün yanıtı uyarmada etkindir. CpG ODN ise Toll benzeri reseptör 9 (TLR-9) agonisti olup kuvvetli hücresel immün yanıtı (Th1 ve sitotoksik T lenfosit yanıtları) uyarabilmektedir. Ayrıca, yapılan bir çalışmada, influenza aşısının CpG ODNs ile birlikte nazal uygulanmasının mukozal immün yanıtı anlamlı bir şekilde arttırdığı gözlenmiştir (Borges ve ark. 2008).

Bu çalışmada, pozitif yüklü kitosan türevleri (kitosan klorür, kitosan glutamat ve trimetil kitosan) ve negatif yüklü karboksi metil kurdlan kullanılarak, uygun yüzey yüküne sahip ve model antijen olarak sığır serum albumini (BSA) içeren polelektrolit kompleks nanopartikülleri hazırlanmıştır. Bu yeni ilaç taşıyıcı sistemin antijen yükleme kapasitesi, stabilitesi ve toksisitesi araştırılmış ve optimizasyon çalışmaları sonucunda seçilen ideal formülasyonlar nazal ve subkütan yol ile farelere uygulanmıştır. Model antijen BSA yüklü nanopartiküllerin uyardığı humoral, hücresel ve mukozal immün yanıtlar ile mukozal organlar tarafından salgılanan sitokinler ölçülmüştür. Böylece, iğnesiz, hasta uyuncu yüksek ve etkili bir aşı taşıyıcı sistem geliştirilmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aşılamaya Genel Bakış

Tarihte ilk kayıtlı immünizasyon girişimlerine bakıldığında, 16. yüzyılda çiçek hastalığını önlemek amacıyla yapılan variolasyon işlemlerine rastlanmaktadır. Bu işlem, enfekte olmuş bir hastadan alınan çiçek hastalığı püstüllerinin sağlıklı bireylere uygulanması şeklindedir (Sallusto ve ark. 2010). Aşılamadaki esas büyük ilerleme ise, 18. yüzyılın sonunda Edward Jenner'ın sığırlarda görülen çiçek virüsünü, çiçek hastalığından koruma amacıyla insanlara vermesiyle başlamıştır (Plotkin 2005). Koch ve Pasteur tarafından ise enfeksiyon hastalıklarının kaynağının mikrobiyal olduğu kanıtlanmıştır (Ullmann 2007)

Aşılama çalışmaları sayesinde çiçek hastalığı ortadan kalkmış ve çocuk felci, kızamık, hepatit B, hepatit A ve boğmaca gibi hastalıklardan korunma sağlanarak enfeksiyon hastalıklarından kaynaklanan ölümler büyük oranda azaltılmıştır. Her yıl iki milyonun üzerinde olası ölüm vakası ise aşılama sayesinde önlenmektedir (WHO 2010).

Günümüzde farklı enfeksiyon hastalıklarında kullanılan yaklaşık 26 çeşit aşı bulunmakla beraber bu aşıların tamamına yakını parenteral yoldan uygulanmaktadır. Ancak, geleneksel aşıların enjeksiyon şeklinde kullanılma zorunluluğu, yan etkileri, lokal immün yanıtları uyaramaması ve stabilite problemleri (buzdolabında saklama gerekliliği) gibi birtakım dezavantajları bulunmaktadır. Bununla beraber, yeni çıkan proteinik aşıların çoğu zayıf immünojenite göstermektedir. Bundan dolayı yeni aşı tiplerinin geliştirilmesi son derece önem arz etmektedir (Saatçi ve Bozkır 2003; Özsoy ve ark. 2009).

2.2. Aşı Çeşitleri

Günümüzde enfeksiyon hastalıklarının önlenmesinde kullanılan veya geliştirilen farklı aşı çeşitleri mevcuttur. İdeal koşullar altında, aşıların doğal ve edinsel olmak üzere bağışıklığın her iki kolunu da uyarmaları gerekmektedir (Clem 2011). Bununla beraber, her bir aşı çeşidinin kendi içinde avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu durum da belirli bir hastalığa karşı immün sistemin uyarılmasını ve aşı çeşidinin uygunluğunu kısıtlayabilmektedir. Aşıları içerdikleri antijene göre çeşitli gruplara ayırmak mümkündür. Bunların arasında; canlı atenüe (zayıflatılmış), ölü ve inaktif, alt birim, toksoid ve DNA aşıları yer almaktadır. İnsanlarda yaygın olarak kullanılan aşıların sınıflandırılması Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2-1: İnsanda Yaygın Olarak Kullanılan Aşıların Sınıflandırılması (Goldsby ve ark. 2006)

		Hastalık veya Patojen	Aşının Çeşidi
Bütün Organizmalar	**Bakteri Hücreleri**	Şarbon	İnaktif
		Kolera	İnaktif
		Boğmaca	İnaktif
		Veba	İnaktif
		Tüberküloz	Canlı atenüe BCG*
		Tifo	Canlı attenüe
	Viral Partiküller	Hepatit A	İnaktif
		İnfluenza	İnaktif
		Kızamık	Canlı atenüe
		Kabakulak	Canlı atenüe
		Çocuk felci (salk)	İnaktif
		Kuduz	İnaktif
		Rotavirüs	Canlı atenüe
		Kızamıkçık	İnaktif
		Su çiçeği	Canlı İnaktif
		Sarıhumma	Canlı inaktif
Saflaştırılmış Makromoleküller	**Toksoidler**	Difteri	İnaktif ekzotoksin
		Tetanoz	İnaktif ekzotoksin
	Kapsüler Polisakkaritler	*Haemophilus influenza* tip b	Polisakkarit+protein taşıyıcı
		Neissera meningitidis	Polisakkarit
		Streptococcus pneumoniae	23 farklı kapsüler polisakkarit
	Yüzey Antijeni	Hepatit B	Rekombinant yüzey antijeni (HBsAg)

BCG*: Bacillus Calmette-Guerin, *Mycobacterium bovis*'in avirulen (zararsız) bir soyudur.

2.2.1. Canlı Atenüe (Zayıflatılmış) Aşılar

Patojen bakterilerin ve virüslerin laboratuvar ortamında etkisinin zayıflatılmasıyla elde edilen aşılardır. Canlı atenüe aşılar, hastalığın kontrolü ve yok edilmesinde en güçlü aşı çeşididir. Aşılanma sonrası kuvvetli antikor ve hücresel immün yanıt elde

edilebilmektedir (Plotkin 2009). Ayrıca, uzun süreli bağışıklık da sağlanmaktadır. Bu avantajlarına rağmen, canlı mikroorganizmanın değişerek veya mutasyona uğrayarak virulan şekle dönüşüp hastalık yaratma riski bulunmaktadır. Bu özelliğinden dolayı soğukta saklanması ve taşınması gerekmektedir. Ayrıca güvenlik riski oluşturduğundan, zayıf bağışıklık sistemi olan bireylerde kullanımı uygun değildir. Bu tip aşılar arasında kızamık, kabakulak, kızamıkçık ve su çiçeği aşıları yer almaktadır (Plotkin ve ark. 2008).

2.2.2. Ölü ve İnaktif Aşılar

Bu tür aşılar, hastalığa yol açan mikrobun ısı, radyasyon veya kimyasallarla inaktif hale getirilmesi ile hazırlanmaktadır. Ölü mikroorganizmaların değişim geçirerek hastalığa yola açan formlarına geri dönme ihtimalleri bulunmadığından, mikroorganizmaların inaktif hale getirilmesi, aşıyı daha stabil ve güvenilir hale getirmektedir. Ancak, bu aşılar daha zayıf bir immün yanıt oluşturur ve bu nedenle bağışıklığın devamının sağlanması için dozun tekrarlanmasına ihtiyaç duyulur (Clem 2011). Ölü ve inaktıf aşılara örnek olarak grip aşısı verilebilir.

2.2.3. Alt Birim Aşılar

Bu aşılarda mikroorganizmanın tamamı yerine bağışıklığı en iyi şekilde uyaracak antijenik birimler bulunmaktadır. Böylece aşıdan kaynaklanan yan etkileri en aza indirilmektedir.

Alt birim aşı elde etmenin iki yöntemi bulunmaktadır. İlki, laboratuvar ortamında çoğaltılan mikroorganizmaların kimyasallarla parçalanarak antijenik bölgelerinin ayrılmasıdır. İkinci yöntemde ise, mikroorganizmadaki antijenik moleküller rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilmektedir. Bu yöntemle elde edilen aşılara rekombinant alt birim aşıları denmektedir. Hepaptit B aşısı bu tip aşıya örnektir (NIAID 2012; Clem 2011).

2.2.4. Toksoid Aşılar

Bakterilerden salgılanan toksinlerin, formalin gibi maddelerle muamele edilerek etkisiz hale getirilmesi sonucunda toksoidler (detoksifiye edilmiş toksin) elde edilmektedir. Toksoid aşılar vücuda verildiğinde, bağışıklık sistemi doğal toksinle nasıl savaşması gerektiğini öğrenir. Difteri ve tetanoz aşısı bu tip aşılardandır.

2.2.5. DNA İçeren Aşılar

DNA aşıları 1990'lı yılların başlarından itibaren bilimsel olarak ilgi odağı haline gelmiştir. DNA aşıları, ilgili antijenin kodunu taşıyan ve ekspresyonu memeli promotoru tarafından kontrol edilen plazmid DNA içermektedir. Böylece, aşı uygulandıktan sonra konağın immün sistemi antijeni eksprese etmektedir. Genetik materyalin *in vivo* olarak uygulanması sonucu genellikle humoral ve hücresel yanıtlar elde edilmektedir. Bu durum, DNA aşılarını, protein veya peptit yapısındaki konvansiyonel aşılardan ayırmaktadır. Ayrıca DNA aşısı yaklaşımı, canlı atenüe aşıda olduğu gibi güvenlik sorunlarının olmaması açısından ümit verici bulunmaktadır.

Ancak, DNA aşılarının, primatlar ve insanlarda düşük immünojenite göstermeleri önemli bir problemdir. Bu sorunun aşılabilmesi için çok sayıda deneysel ve klinik çalışma devam etmektedir (Coban ve ark. 2011; Kutzler ve Weiner 2008).

2.3. İmmün Sistem

Günlük hayatta mikroorganizmalarla sürekli temas içinde olmamıza rağmen, nadir olarak hastalık oluşabilmektedir. Hastalık oluşumunun engellenmesinde etkili olan ise vücudun kendi savunma mekanizmalarıdır. Gelişmiş omurgalılarda vücudun organizmalara karşı savunma sistemi iki ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar; doğal ve edinsel bağışıklıktır (Storni ve ark. 2005). Aşı uygulanması sonucu doğal ve edinsel bağışıklığın uyarılması Şekil 2-1'de gösterilmiştir.

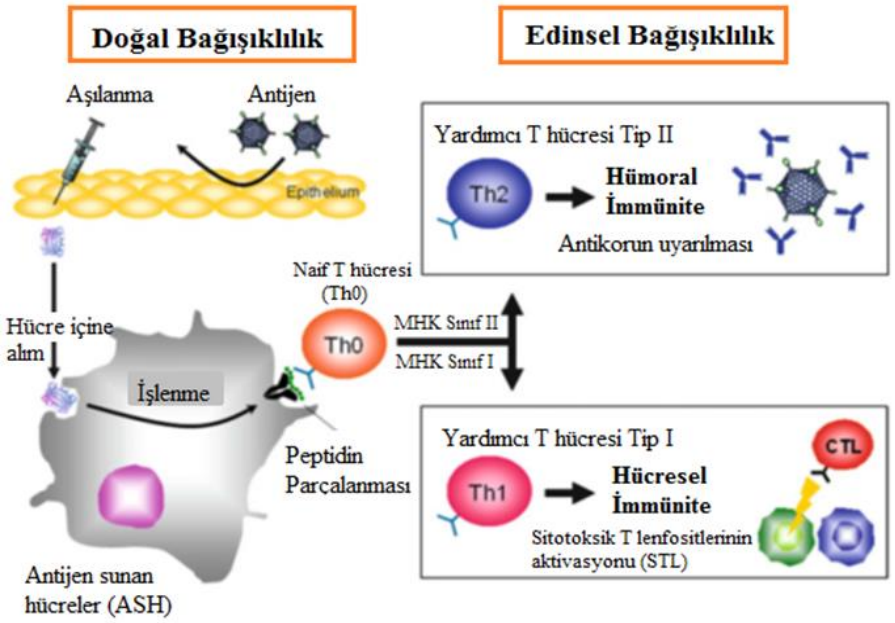
2.3.1. Doğal İmmünite

Doğal immün sistem, patojenik unsurlara karşı ilk savunma hattını oluşturan ve sürekli faal durumda olan deri, ateş, mukozal sekresyonlar, kimyasal medyatörler ve fagositik hücreler gibi çeşitli koruyucu unsurları içermektedir. (Chaplin 2010). Özellikle, makrofaj ve dendritik hücreler, fagositozla mikroorganizmaları yok ederek edinsel immünitenin uyarılması için antijen sunarlar. Doğal bağışıklığa ait yanıtlar, belli bir patojenik ajana özgü olarak gelişmemektedir. Bununla beraber doğal immün sisteme ait Toll benzeri reseptörler (TLRs) gibi kalıp tanıma reseptörleri (PRRs), mikroorganizmaların değişik türlerinin, bu mikroorganizmaların yüzeyinde bulunan patojen ilgili moleküler motifler (PAMPs) aracılığıyla tanınmasını sağlarlar (Akira 2003). Bir diğer deyişle, doğal bağışıklığın bu reseptörleri, mikroorganizmaların değişik türlerinin özgün tanınmasına izin verirken mikrobiyal türleri ise tek tek tanıyamamaktadır. Ayrıca bu özellik, doğal immün sistemin yanlışlıkla vücudun kendi

hücrelerini tanıyıp onlara saldırmalarını da engellemektedir. Ancak doğal immün sistem bir belleğe sahip olmadığından, aynı patojenle yeniden karşılaşıldığında daha gelişmiş bir immün yanıt alınamayacaktır (Clem 2011; Netea 2013).

2.3.2. Edinsel İmmünite

Edinsel immün sisteminin temel elemanları B ve T lenfositleridir. B lenfositleri antijenden bağımsız kemik iliği içinde gelişir ve sonrasında olgunlaşmamış B lenfositleri olarak perifere çıkarak IgM salgılarlar. Burada B hücreleri naif B hücrelerine farklılaşarak IgD salgılamaya başlar ve yabancı antijenle karşılaştıkları yer olan sekonder lenfoid dokudan (lenf nodları, dalak, ve mukoza ilgili lenfoid dokular (MALT)) dolaşıma girerler. T lenfositleri ise kemik iliğindeki genel lenfosit projenitörde gelişmektedir. T hücreleri, kemik iliğini terkederek CD4+ veya CD8+ T hücrelerine olgunlaştıkları timusa yerleşirler (Margolick ve ark. 2006). B hücreleri ve antikorlar humoral immüniteyi, T hücreleri ise hücre kaynaklı immüniteyi oluşturmaktadır. Doğal katil hücreler ise, B ve T hücreleri gibi lenfosit soyundan gelmekle beraber, yalnızca doğal immün yanıtla ilgisi bulunmaktadır (Clem 2011). T ve B hücreleri yüzeylerinde bulunan antijene özgü reseptörler sayesinde hedef antijenler için eşsiz bir özgüllük sağlamaktadır. B ve T lenfosit antijen spesifik reseptörler, T hücre reseptör (TCR) ve immünoglobulin reseptör genlerini oluşturan (germ hattı) gen bileşenlerinin yeniden düzenlenmesiyle oluşmaktadır. Bu rekombinasyon mekanizması, herhangi bir antijenle karşılaştığında onu tanıyacak özgüllükte antijen reseptörleri ve aynı antijenle tekrardan maruziyette hızlı, etkin ve spesifik yanıt için özgün immünolojik hafıza sağlamaktadır (Fearon ve Locksley 1996).

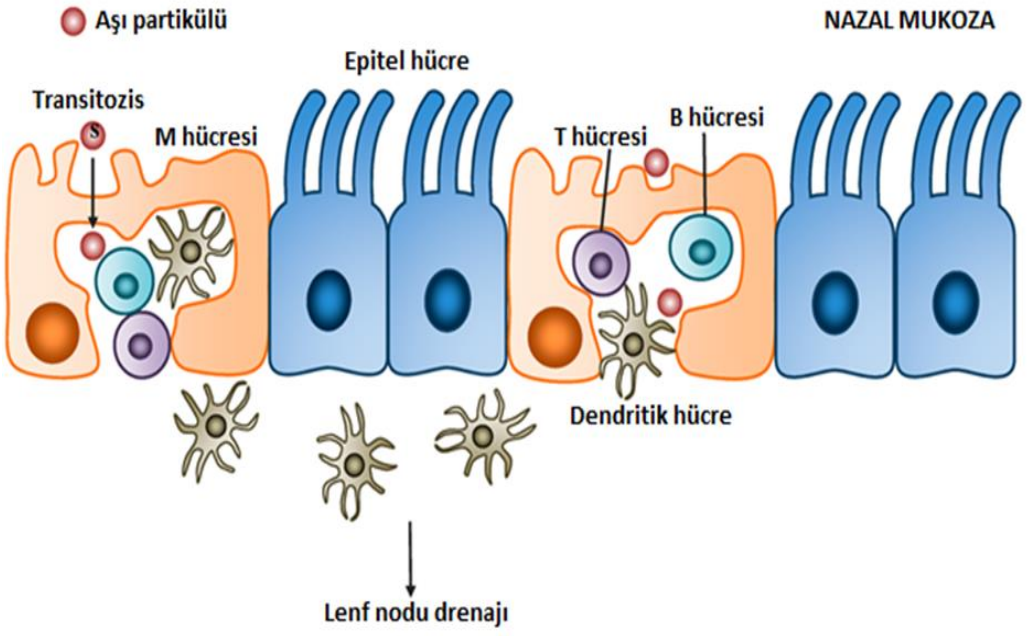


Şekil 2-1: Aşı ile doğal ve edinilmiş bağışıklığın uyarılması (Akagi ve ark. 2012)

2.4. Mukozal İmmünite

Herhangi bir aşılamanın başarılı olabilmesi için iki temel duruma ihtiyaç vardır, Birincisi immün sistemin hastalıklara karşı güçlü bir savunma oluşturabilmesi için potansiyelinin arttırılması ve ikincisi ise, tek bir aşı uygulamadan sonra uzun süreli koruyucu immünitenin uyarılmasıdır. Sonuç olarak, aşıların geliştirilmesi her zaman için hem hümoral hem de hücresel immünitenin birlikte uyarılmasına odaklanmıştır. Günümüzde kullanılan aşıların çoğu intramüsküler veya bir adjuvanla beraber verilen subkütan enjeksiyon şeklindedir. Bu strateji sistemik immün yanıtı uyarmada elverişli gözükse de genellikle mukozal yüzeylerde oluşturduğu yanıt zayıftır (Otczyk ve Cripps 2010).

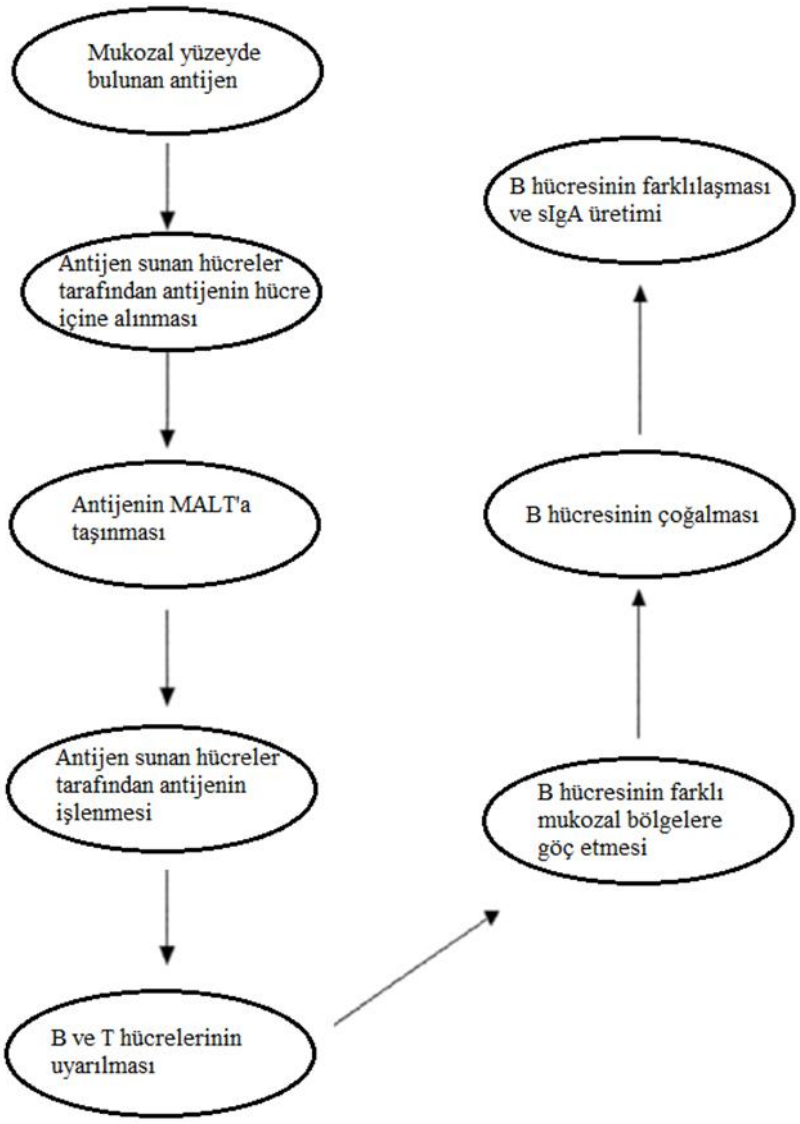
Yetişkin bir insanda sindirim, solunum ve genitoüriner boşluklardaki mukozanın kapladığı alan 400 m2 olup yaklaşık olarak deriden 200 kat daha büyüktür. Tahmini olarak enfeksiyon ajanlarının %70'i mukozal yollardan vücuda giriş yapmaktadır (Neutra ve ark. 1996). Mukozal yüzeylerde koruma sağlayan özelleşmiş mukozal immün sisteme, sürekli immün gözetim tarafından dış ortamdan bilgi elde edilerek iletilmektedir. Bu durumda mukozal yüzeylerde kuvvetli immünolojik aktivite söz konusu olmaktadır. Mukozal immün sistem; dokular, lenfoid ve lenfoid olmayan hücreler ile antikor, kemokin ve sitokin gibi efektör moleküllerden oluşmuş bir iletişim ağıdır (Woodrow ve ark. 2012). Mukozal immün yanıtın başlatılması Şekil 2-2'de gösterilmiştir.



Şekil 2-2: Mukozal immün yanıtın başlatılması (Xu ve ark. 2014)

Aşı partikülleri M hücreleri tarafından alınarak transitoz aracılığıyla altta bulunan immün hücrelerine taşınmaktadır. Mukozal bölgede bulunan dendritik hücreler yakındaki lenf noduna drene olarak T hücrelerine antijeni sunmaktadır.

Mukozal immünitede yer alan başlıca antikor çeşidi sIgA (salgısal immünoglobulin A)'dır. IgA, miktar bakımından vücutta en çok bulunan immünoglobulindir. IgA'nın büyük bir kısmı gastrointestinal sıvı, tükürük, göz yaşı, idrar ve diğer vücut salgılarında bulunmaktadır. sIgA'nın işlevleri sayesinde mukozal epitele patojenlerin veya onların toksik ürünlerinin adsorpsiyonu engellenmektedir. sIgA'nın bir başka özelliği ise, antijenlerin ortadan kaldırılmasının inflamasyona yol açmayacak mekanizmalarla sağlanmasına katkıda bulunmaktadır (Brandtzaeg 2007; Dietrich ve ark. 2003). Mukozal yüzeyin antijene maruz kalması sonrasında sIgA'nın uyarılması Şekil 2-3'de gösterilmiştir.



Şekil 2-3: Mukozal yüzeyin antijene maruz kalması sonrası sIgA'nın uyarılması (Chen 2000)

2.4.1. Mukoza ile İlişkili Lenfoid Doku (MALT)

Mukozal immün sistem mukozal bariyerin devamlılığını sağlayan indüktif ve efektör olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır. Antijen sunma, indüktif bölgelerde meydana gelir ve bu durum da naif T ve B hücrelerinin başlangıç aktivasyonunu sağlamaktadır. Efektör bölgelerde ise bu hücreler, ektravazasyon ve farklılaşmayı göstermekte olup, sIgA gibi antijene özgü antikorlar ve immün hücreler kendilerine özgü fonksiyonları kazanmaktadır. Mukoza ile ilgili lenfoid doku (MALT) olarak bilinen bölgeye özgü lenfoid dokular ve bu yapının etrafını çevreleyen mukozaya drene olan bölgesel lenf

nodları, mukozal immün yanıtlar için başlıca indüktif bölgelerdir. MALT, anatomik bögelere göre alt gruplara ayrılmaktadır. Bunların arasında barsak ilgili lenfoid doku (GALT), nazal ilgili lenfoid doku (NALT), bronşlarla ilgili lenfoid doku (BALT) ve daha az karakterize olmuş meme, tükürük bezi ve ürogenital organlar yer almaktadır (Otczyk ve Cripps 2010).

2.4.1.1. Bağırsak İlişkili Lenfoid Doku (GALT)

Peyer plaklarının bulunduğu distal ileum, apandisit ve çok sayıda izole lenfoid foliküllerini içeren GALT, MALT'ın büyük bir kısmını meydana getirmektedir. GALT'ın kubbe şeklindeki yapıları karakteristik folikül ilişkili epitel (FAE, M hücreleri içermektedir) tarafından çevrilmiştir (Brandtzaeg ve Pabst 2004; Apodaca ve ark. 1991). İnsan M hücrelerini ilk tanımlayan Owen ve Jones olmuştur (Weaver ve ark. 1991). M hücreleri, yanyana dizilmiş ince bağırsak epitel hücreleri gibi mikrovililere sahip olmayıp epitelyum içinde mikro katlanmalar (microfold) yapan hücrelerdir. M hücreleri, çıkıntılı golgi komplekslerine ve çok sayıda granüllü endoplazmik retikulum tarafından çevrelenen miktokondriye sahiptir (Hathaway ve Kraehenbuhl 2000). M hücreleri, çok ince ve çan şeklinde özelleşmiş epitel hücreleri olup, canlı ve çoğalmayan antijenlerin (özellikle partiküller) bağırsak lümeninden etkin bir şekilde taşınarak organize lenfoid dokulara ulaşmasını sağlamaktadır (Neutra ve ark. 2001). M hücreleri, yüzey epitelinin son derece önemli bir kısmını oluşturmaktadır ve bundan dolayı çok sayıda enteropatojenik enfeksiyon ajanı M hücrelerini giriş için bir kapı gibi kullanır. M hücresinin bazolateral kısmı, T ve B lenfositleri ile makrofajları içeren büyük bir intraepitel cep oluşturabilmek için, derin bir şekilde içeriye doğru büzülmüştür (Neutra ve ark. 1996). Yapının bu şekilde özelleşmesi sonucu apikal ve bazolateral yüzeylerin birbirine olan mesafesi kısalmış ve böylece de epitel bariyeri transitoz ile geçmek zorunda olan veziküllerin kat etmesi gereken mesafe büyük ölçüde azalmış olmaktadır. Yabancı antijenlerin veya partiküllerin endositoz ya da fagositoz ile alımı sonrasında, M hücresi lizozomlarında çok kısa kalarak ya da hiç kalmadan doğrudan intraepitelya cebe hızla transitoz olmaktadır. Antijen, M hücresi tarafından taşındıktan sonra işlenerek makrofajlara, dendritik hücrelere ve B hücrelerine sunulmaktadır. Bunun sonucunda IgA üretimi meydana gelmektedir. Dimerik veya polimerik IgA antikorları seçici olarak epitelyal polimerik immunoglobulin reseptörlerine bağlanıp transitoz ile epitel

hücrelerden glandüler ve mukozal sekresyonlarla salgılanmaktadır (Apodaca ve ark. 1991).

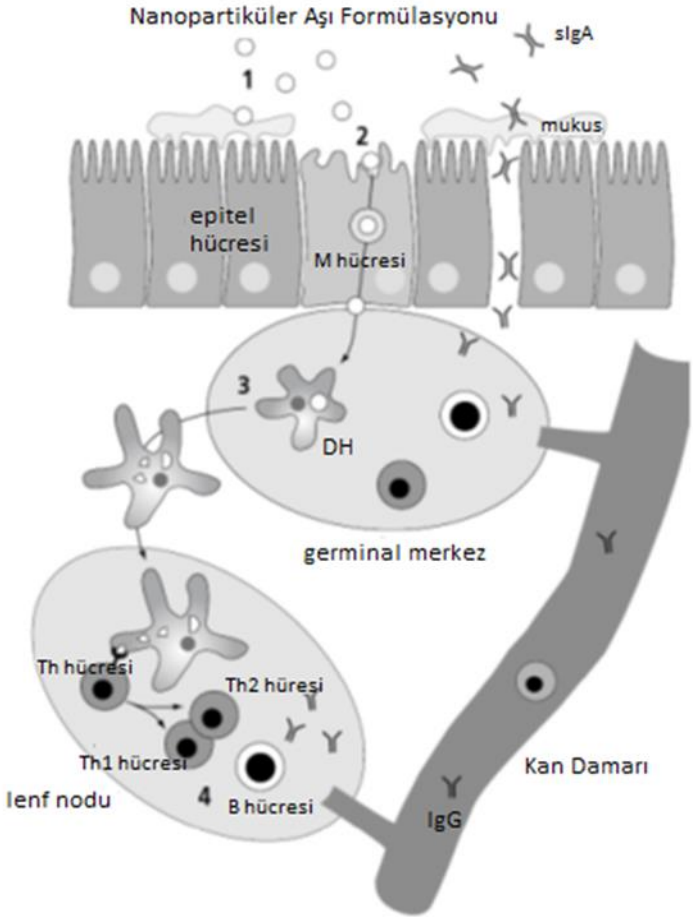
İlk kez kullanıldığı 1961 yılından bu yana yaygın olarak uygulanan oral aşı, canlı atenüe sabin çocuk felci aşısıdır. Bu aşının dünyadaki çocuk felcinin yok edilmesinde gösterdiği başarı, diğer oral yoldan uygulanan canlı atenüe aşıların geliştirilmesine destek vermiş ve oral aşıların uygulama yolu kolaylığı açısından bir standart belirlemiştir (Giudice ve Campbell 2006).

2.4.1.2. Nazal İlişkili Lenfoid Doku (NALT)

NALT'ı hedefleyen nazal yoldan ugulanan çeşitli aşılar geliştirilmiştir (Dietrich ve ark. 2003; Quiding-Jarbrink ve ark. 1995). Bu aşılardan biri soğuğa uyumlu canlı inflıuenza aşısı (FluMist® Medimmune) olup, önceden doldurulmuş tek kullanımlık cihaz aracılığıyla aşıyı nostrillerin içine sprey şeklinde göndermektedir. FluMist® aşısı, 5 yaş ile 49 yaş arasındaki sağlıklı insanların kullanımı için 2003 yılında FDA'den onay almıştır. Bu aşı ile ilgili yetişkinlerde ve 15 aylığa kadar olan çocuklarda etkinlik, immünojenite ve güvenlik açısından çalışmalar yapılmıştır. Çocuklarda güvenli, iyi tolere edilebilen ve %93'e kadar kültürü onaylanmış influenzaya karşı etkili bulunmuştur. Bu canlı atenüe influenza aşısının önemli bir güvenlik özelliği ise, virüsün nazofarengeal epitel hücrelerinin dışında etkili bir şekilde çoğalma yeteneğinden yoksun olmasıdır (Giudice ve Campbell 2006).

Nazal immün indüktif bölgeler, nazofarengeal boşluğun yakınında veya içinde nazal boşluğun ön yüzeyinde bulunmaktadır. Bu bölgelerin bulunduğu konum, hava kaynaklı antijenlerin immün hücrelerle en yüksek oranda karşılaştığı yerdir. Tutunan partiküler yapıdaki antijenler, NALT'ın üstünü kaplayan M hücreleri tarafından etkili bir şekilde alınırken silyalı hücreler tarafından ise alınamamaktadır. Nazal yoldan uygulanan aşı formülasyonun izlediği yol Şekil 2-4'de gösterilmiştir. Çözünür yapıdaki anijenler ise respiratuar epiteli baştan sona geçebilmektedir. Bu nedenle, M hücrelerine antijenleri taşıyabilmek için, mukoadezif polimerlerden yararlanılarak etkili nano taşıyıcıların geliştirilmesi ile ilgili yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Sıçanlardaki NALT'ın hücresel bileşenlerinde B ve T lenfositleri, makrofajlar ve foliküler dendritik hücreler yer almaktadır (Kuper ve ark. 1992). İntranazal immünizasyon belki de serumun yanı sıra lokal ve uzaktaki mukozal sekresyonlardaki antikor yanıtlarını uyarabilmek için en etkili mukozal yoldur. Kolera toksini B alt ünitesi ve mukoadezif polimerler gibi tutunma

özelliğine sahip moleküller, antijenin nazal boşlukta kalma süresini arttırmaktadır. Bu antijenler, epitelin arasına karışan dendritik hücreler tarafından alınmaktadır (Holt ve ark. 1994; Malik ve ark. 2014).



Şekil 2-4: Nazal yoldan uygulanan nanopartiküler aşı formülasyonunun izlediği yol (Slütter 2011)

1) Mukoadezyon, 2) M hücreleri tarafından antijenin alımı, 3) taşınma ve DH'ın uyarılması ve olgunlaşması, 4) B ve T hücrelerinin uyarılması. (DH: Dendritik Hücre, Th hücresi: Yardımıcı T hücresi)

2.4.1.3. Bronşlarla İlişkili Lenfoid Doku (BALT)

BALT, lenfoid hücrelerin oluşturduğu büyük bir kümelenmedir. B hücreleri genelde folikülün içinde bulunurken, T hücreleri ise bronş duvarındaki endotelyal venüllerin etrafında bulunmaktadır (Pabst ve Tschernig 2010).

BALT, alt solunum yolunun ve bronşun hümoral korunmasında başlıca immün indüktif bölgedir. Solunum yolunda lenfoid dokunun dört büyük bileşeni bulunmaktadır.

Bunlar; solunum mukozasının epitel hücrelerinin arasında bulunan T hücreleri, mukozanın lamina propriasında dağınık halde bulunan B hücreleri, bronş epitelinin altında bulunan organize lenfoid doku ve drene lenf nodlarıdır (Malik ve ark. 2014).

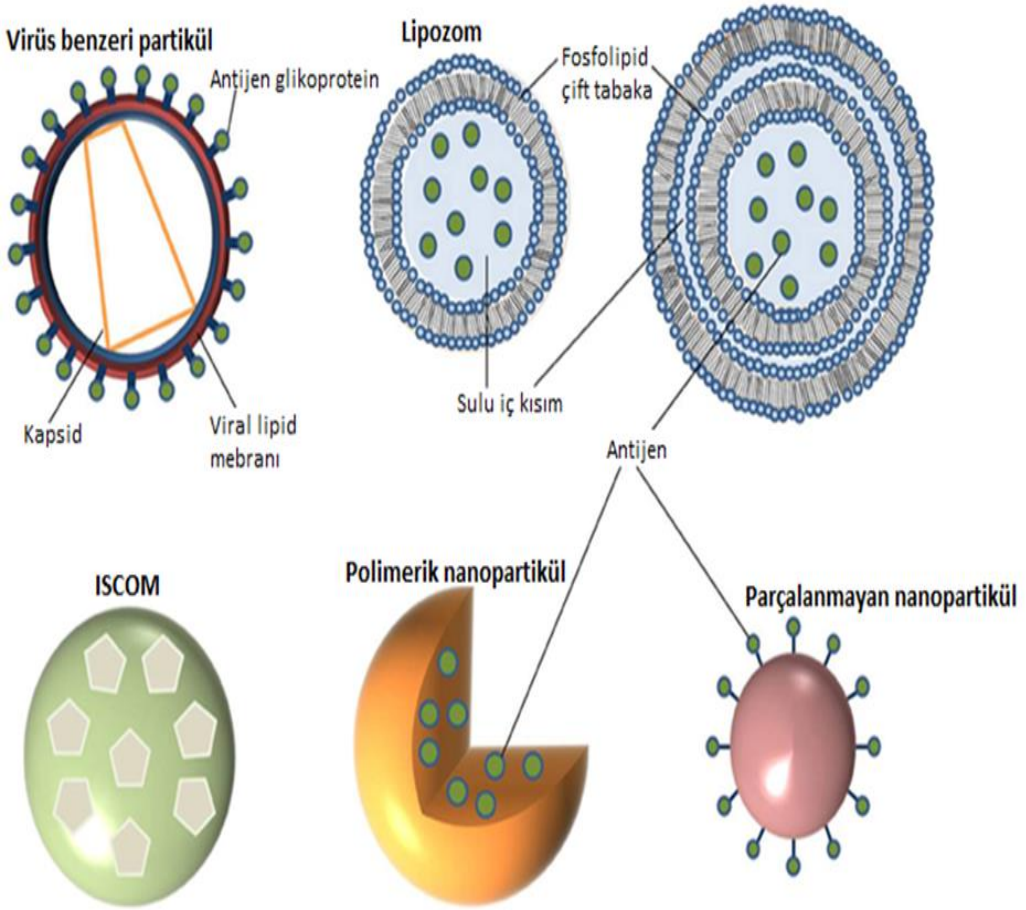
Mukozal aşılamada bir diğer yöntem olan aerosol aşılama, iğnesiz aşılamada ümit veren bir yöntemdir ve özellikle pediyatrik nüfuslardaki kitlesel aşılamaya karşı uygun olacağı düşünülmektedir. Aerosol aşı uygulama, genellikle nebulizer tarafından üretilen küçük partiküllerin akciğerlere ulaşmasını kapsamaktadır. Aerosol aşılama belki de biyoterorizm olayını engellemede veya gelişmekte olan ülkelerde kitlesel aşılama programlarının uygulanabilmesi gibi büyük popülasyonların hızlı bir şeklide bağışıklık kazanması alanında bir olanak sağlayabilir. İlaveten, bu aşı uygulama yöntemi, hava kaynaklı birçok önlenebilir hastalığın doğal giriş yolunu izlemektedir (örneğin, kızamık hastalığı). Aeorosol halinde verilen aşılar, tamamen ağrısız, iğne kullanmadan uygulanan aşılardır ve uygulama için tıbbi personele gerek duyulmaz (Giudice ve Campbell 2006).

2.5. Mukozal Aşı Formülasyonlarında Adjuvanların Yeri ve Önemi

Adjuvanlar elde edildikleri kaynaklara, fizikokimyasal özellikleri veya etki mekanizmalarına göre farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Mukozal adjuvanlar, immünuyarıcı moleküller ve aşı taşıyıcı sistemler olmak üzere genel olarak iki kategoriye ayrılmıştır: (Freytag ve Clements 2005).

İmmünuyarıcılar: Doğrudan immün sisteme etki ederek, immün sistemi uyaran antijenlere karşı oluşan yanıtı uyarmaktadır. TLR ligantları, monofosforil lipid A (MPL), sitokinler, saponinler ve bakteriyel ekzotoksinler örnek olarak verilebilir.

Taşıyıcı sistemler: Antijenlerin uygun bir şekilde immün sisteme ulaşmasını ve sunulmasını sağlamaktadırlar. Bunun içinde, antijene karşı oluşan spesifik immün yanıtı arttırmak amacıyla kontrollü salım yapan ve depo etkisi sağlayan taşıma sistemleri yer almakta ve ayrıca bu sistemler immünuyarıcıları da içeriğinde taşıyabilmektedirler. Örnek olarak, emülsiyonlar (MF59 gibi), virozomlar ve biyoparçalanır polimerik partiküler sistemler verilebilir (Arca ve ark. 2009). Bu taşıyıcı sistemlerden bazıları Şekil 2-5'de gösterilmiştir.



Şekil 2-5: Mukozal immünizasyonda kullanılan taşıyıcı sistemlere örnekler (Gregory ve ark. 2013)

Mukozal yoldan uygulanan aşılar geleneksel aşılara göre çok sayıda potansiyel avantaja sahiptir. Bunların arasında; mukozal yanıtın yanı sıra sistemik yanıtın da uyarılabilmesi, artan stabilite sonucu daha uzun raf ömrü ile iğnelere ihtiyacın ortadan kalkması ve buna bağlı olarak aşıların uygulanabilmesi için gerekli olan özel eğitilmiş sağlık personeline ihtiyaç duyulmaması yer almaktadır (Freytag ve Clements 2005). Bununla birlikte, mukozal yol ile verilen antijenler genellikle zayıf immünojenik özelliktedir. Bundan dolayı, etkili bir edinsel bağışıklık oluşturabilmek amacıyla uygun bir şekilde doğal bağışıklığı uyarabilen, mukozal indüktif bölgelere hedeflendirilmiş ve antijeni ortama ait faktörlerden koruyabilecek bir aşı formülasyonu geliştirmek son derece büyük bir öneme sahiptir (Arca ve ark. 2009).

Adjuvan ve/veya taşıyıcı sistemin seçimindeki can alıcı nokta, sadece gerekli olan immün yanıtları uyarması değil aynı zamanda mukozal yüzeylerin çeşitli işlevlerini ve

bütünlüğünü sürdürebilmesini sağlamasıdır. Ayrıca bu sistemin güvenli olması ve düzenleyici kurumların talep ettiği kalite standartlarını karşılayabiliyor olması gerekmektedir. Bu kriterlerin karşılanabilmesi zorluklar içermektedir. Klinik öncesi ve klinik çalışmalarla yenilikçi yöntemler geliştirilmiş olmasına rağmen bugüne kadar mukozal aşılamada tamamen oturmuş standart bir prosedür oluşturulamamıştır. Dünyada birkaç tane mukozal aşı insan sağlığı için onay alabilmiştir. Bu aşılar içinde çocuk felci virüsü, *Salmonella typhi*, *Vibrio colera* ve rotavirüsüne karşı oral yoldan uygulanan aşılar bulunmaktadır ve nazal yoldan uygulanan aşı olarak ise mevsimsel influenza aşısı ve H1N1 swine grip aşısı yer almaktadır (Jabbal-Gill ve ark. 2012).

2.6. Mukozal Adjuvanlar

2.6.1. Enterotoksinler

Bakteriyel toksinler ve onların mutantlarının, aşıların mukozal immün yanıtlarını güçlendirdiği gösterilmiştir. Kolera toksini (CT), bilinen en güçlü mukozal adjuvan olmakla beraber yüksek toksisite göstermektedir. A ve B alt birimlerinden oluşan kolera toksini, intestinal epitel hücreye B alt birimi aracılığıyla bağlanmaktadır. Sonrasında, A alt birimi hücre içine girerek A1 ve A2'ye ayrılmaktadır. A1 alt birimi CT'nin toksik etkisinden sorumludur. CT'nin oral yoldan alınması, diğer proteinlere karşı oluşan oral toleransı ortadan kaldırarak kuvvetli intestinal ve plazma IgG yanıtlarını uyarmaktadır. *Escherichia coli* ısıya dayanıksız toksini (LT) ise, CT'yle hem benzer yapıya hem de benzer aktivitelere sahip olan bir adjuvandır. Bu toksinlerin her ikisi de mukozal adjuvanlar olarak başarıyla kullanılmaktadır.

LT ve CT'nin mutantları ise toksik olmayıp mukozal seviyede güçlü adjuvan özellik göstermektedir. Bu özellik ise, A alt birimine yönelik oluşturulmuş mutasyon sonucu elde edilmiştir. Bu mutantlardan bir tanesi olan LTK63'ün, intranazal, intragastrik ve intravajinal uygulandığında adjuvan olarak etkili olduğu belirtilmiştir (Goyal ve ark. 2008; Stevceva ve Ferrari 2005).

2.6.2. Lipopolisakkaritler ve Monofosforil Lipid A (MPL®)

MPL® immün sistemi uyarıcı TLR-4 agonistidir ve *Salmonella minnesota* R595'den elde edilen detoksifiye lipopolisakkaritten (LPS) oluşmuştur. Gram negatif bakteri hücre duvarının önemli bir bileşeni olan LPS, kuvvetli bir adjuvan olmakla beraber yüksek derecede toksik özellik göstermektedir. Toksisitesinin nedeni molekülün

lipid A bölgesidir. Detoksifikasyon işlemi sonucu oluşan MPL® tek başına adjuvan olarak kullanılabildiği gibi, formülasyonların (su içinde yağ emülsiyonu) içeriğine de girebilmektedir (Peek ve ark. 2008). MPL® nin oral veya nazal yolla uygulanması sonrasında, sistemik ve/veya mukozal antijene özgü antikorlar uyarılmaktadır (Goyal ve ark. 2008).

2.6.3. İmmünuyarıcı CpG Motifleri

Doğal immünite, memeli hücrelerinde bulunmayan ancak mikrobiyal patojenlerin üzerinde bulunan yapısal kalıpları tanıyabilmektedir. Bundan dolayı, bakteriyel DNA doğal immünite için güçlü bir uyarıcı özelliktedir (Stevceva ve Ferrari 2005).

Bakteriyel DNA benzeri sentetik oligodeoksinükleotidler (ODNs), immün sistemi uyarıcı özelliği bulunan belirli baz içeriğine sahip (CpG motifleri) bir veya daha fazla sitozin guanin dinükleotidi içermektedir. CpG DNA'ya karşı gelişen hızlı immün yanıtın temelinde, doğal immünitenin savunma mekanizmalarından biri olan Toll benzeri reseptörlerin (TLR) mikrobiyal moleküllere ait yapısal kalıpları spesifik olarak tanıması yer almaktadır. Bu tanıma sonucunda, proenflamatuar sitokinlerin üretimi ve kostimülatör moleküllerin ekspresyonunun artışı gerçekleşmektedir. Böylece, sadece doğal immün yanıtın değil edinilmiş immün yanıtın da aktivasyonu sağlanmaktadır. CpG'nin mukozal adjuvan özelliği, tek başına veya başka bir adjuvanla birlikte verilerek influenza ve hepatit B aşıları için incelenmiş ve CpG'nin kullanımı ile birlikte hücresel immün yanıtın yanında gelişmiş mukozal ve sistemik antikor yanıtı da elde edilmiştir (McCluskie ve Davis 2000; Goyal ve ark. 2008).

CpG'nin, Th2 yanıtı uyaran alum gibi adjuvanlarla kombine olarak kullanıldığı bir çalışmada, Th1 yanıtı güçlü bir şekilde uyardığı gözlenmiştir (McCluskie ve Davis 1998). Bir diğer önemli avantajı ise, depo etkisi sağlayabilmesidir ve diğer antijenlerle hazırlanan formülasyonlarda hem kendisinin hem de antijenin salım süresini uzatmaktadır. CpG ODN, nanopartiküllerle birarada verildiğinde ise, CpG'nin mukozal yüzeylerde parçalanması engellenmektedir (Borges ve ark. 2010).

2.6.4. Saponin Türevleri

Saponin adjuvanı, kolesterol ve oluşan porlar ile etkileşime girerek hücre membranına eklenmekte ve böylece antijenin membrandan geçişini kolaylaştırmaktadır. Quil A saponin, *Quillaja saponaria*'nın ağaç kabuğundan elde edilen immünuyarıcı bir

adjuvandır. QS-21 ise, Quil A saponinin düşük toksisiteye sahip saf fraksiyonudur. Parenteral aşı formülasyonları ile birlikte verildiğinde QS-21, hem humoral hem hücresel immüniteyi güçlendirebilmektedir. Saponinler, aynı zamanda, CD8(+) sitotoksik T lenfosit cevabını arttırır ve mukozal antijenlere karşı oluşan immün yanıtı güçlendirir. Ancak yüzey aktif ajan oldukları için in vitro çalışmalarda hemolize yol açtıkları tespit edilmiştir. Saponin içeren çeşitli adjuvanlar mevcuttur (Freytag ve Clements 2005; Yurdakök ve İnce 2008). İçlerinde en yaygın olarak çalışılanları ise immün sistemi uyaran kompleksler (ISCOM®) ve ISCOMATRIX®'tir.

ISCOM® ve ISCOMATRIX®: Klinik olarak çalışılmış, güçlü adjuvan aktiviteye sahip diğer bir aşı taşıyıcı sistem olan ISCOM® (Antijen içeren immün sistemi uyaran kompleks), yaklaşık 40 nm boyutunda kafes benzeri partiküler yapıya sahip olup, antijen, kolesterol, fosfolipid ve saponin adjuvanı Quil A'dan oluşmaktadır. Matriks yapı, protein antijenlerinin (tipik olarak hidrofobik membran proteinleri) apolar etkileşimleri sonucu oluşmaktadır (Peek ve ark. 2008).

Mukozal yoldan verildiğinde ISCOM® ların, hümoral, hücresel ve mukozal immün yanıtları uyardığı çok sayıda çalışmada gösterilmiştir. Fareler nazal yoldan influenza-ISCOM® ile aşılandığında, canlı virüse karşı bağışıklık kazanılmış ve sitotoksik T lenfosit yanıtı alınmıştır. Yine bu çalışmada, nazal yolla uygulama ile, , subkütan uygulamaya göre çok daha yüksek mukozal IgA yanıtı elde edilmiştir (Sjolander ve ark. 2001; Stevceva ve Ferrari 2005).

ISCOM®'dan farklı olarak antijen içermeyen, ISCOMATRIX® isimli bir adjuvan ve aşı taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Antijen, aşı formüsyonundaki ISCOMATRIX®'e sonradan katılmaktadır. Bu adjuvan ISCOM®'a benzer immün yanıt oluşturmasına rağmen, hidrofobik antijenlere olan gerekliliği ortadan kaldırması nedeniyle, daha fazla sayıda aşı uygulaması için kullanılabilmektedir (Peek ve ark. 2008).

2.6.5. MF59

Lisanslı aşı formülasyonlarının içinde diğer aşı taşıma sistemleri yer alırken, MF59 şimdiye kadar insan kullanımı için onaylanmış tek nano boyuttaki aşı adjuvanıdır. Ancak, Amerika Birleşik Devletleri'nden henüz lisans alamamıştır. MF59 yaklaşık 250 nm boyutunda damlacıklardan oluşan su içinde yağ emülsiyonudur. Skualen (%4,3 h/h) ve iki farklı sürfaktan (Tween 80 (%0,5 h/h) ve Span 85 (%0,5 h/h)), sitrik asit tamponu

içinde emülsifiye edilmiştir. MF59'un adjuvan mekanizmasının temelinde sitokin üretimini doğrudan uyarmasının yer aldığı düşünülmektedir (Peek ve ark. 2008).

2.6.6. Sitokinler ve Kemokinler

Çoğu adjuvanın aktivitesi, proenflamatuar veya Th1/Th2 sitokin ve kemokinlerinin aracılığıyla oluşmaktadır. Bundan dolayı, yeni adjuvanların ortaya konulmasındaki yaklaşımlardan biri de, *in vivo* uyarıyı sağlayan sinyallerin taklit edilmesidir. Bu amaçla, mukozal adjuvan olarak etkinliği araştırılmış sitokin ve kemokinler mevcuttur.

Tip I Interferon (IFN): Son yıllarda bazı çalışmalar göstermiştir ki, tip I IFN, T hücreleri ve dendritik hücreler gibi immün hücrelerin farklılaşmasını ve işlevini etkilemekte ve etkin bir biçimde primer antikor yanıtlarını güçlendirmektedir (Ryan ve ark. 1999). İnfluenza aşısı ile tip I IFN'un nazal uygulanması, özellikle serum antijen spesifik IgG2a ve mukozal IgA antikor yanıtlarını etkili bir şekilde uyardığı ve bu influenza virüsü tekrar vücuda verildiğinde tam koruma sağladığı belirtilmiştir (Freytag ve Clements 2005).

Interlökin-5 (IL-5): IL-5, B hücrelerinden salgılanan IgA'nın sekresyonunu arttırmakta ve B hücrelerinin IgG üretimini etkilemektedir. IgA'nın patojenlere karşı mukozal savunmadaki önemi göz önüne alındığında, bu özellik, mukozal immün yanıtın güçlendirilmesinde önemli potansiyele sahiptir. Bu bağlamda yapılan bir çalışmada, rekombinant vaccinia (ineklerde çiçek hastalığı) virüs vektörlerindeki IL-5 için bulunan genlerin ekspresyonu, farenin akciğerindeki IgA aktivitesini önemli derecede arttırmıştır (Stevceva ve Ferrari 2005).

Interlökin-12 (IL-12): IL-12, hücresel immün cevabın başlatılması ve düzenlenmesinde anahtar rolü olan bir sitokindir. Bakteriler ve hücre içi parazitlere yanıt olarak makrofajlar, monositler, dendritik hücreler ve B lenfosit hücreleri tarafından salgılanmaktadır. Bir dizi zincirleme reaksiyon sonucunda IL-12 salgılanması, yardımcı T hücrelerinden IFN-Ɣ ve IFN-α üretimine sebebiyet vermektedir (Yurdakök ve İnce 2008).

Kemokinler: Kemokinler, çok çeşitli hücrelerden üretilen kemotaktik proteinler olup, esasen belli çeşitteki lökositleri kimyasal olarak çekici ve aktive edici olarak etki etmektedirler. Kemokinler, proteinlerin sistein (C) kalıntılarının düzenlenmelerine göre

dört sınıfa ayrılmaktadır; C, CC, CXC ve CX3C. Çeşitli kemokinler mukozal adjuvanlar olarak kullanılmaktadır (Lillard ve ark. 2001).

Rantes: RANTES, bir CC kemokini olup monositler, doğal öldürücü hücreler, bellek T hücreleri ve DH'ler için güçlü bir kimyasal çekici özelliktedir. Ovalbumin (OVA) ve RANTES'in intranazal yoldan fareye verilmesi sonucunda, OVA-spesifik serum ve mukozal yanıtlarında, CD4+ T hücre çoğalması ile mukozal ve sistemik kompartmanların her ikisinde birden sitokin yanıtlarda güçlenme meydana gelmiştir (Lillard ve ark. 2001).

Lenfotektin: Lenfotektin, bir C sınıfı kemokin olup kemotaktik aktivitesi başlıca T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler üzerinedir. OVA ile lenfotektinin nazal yoldan beraber verilmesi sonucu, OVA-spesifik serum antikorlarının uyarılması güçlenmiştir (Stevceva ve Ferrari 2005).

2.6.7. Virozomlar ve Virüs Benzeri Partiküller

Virozomlar: Virozomlar, ortalama çapı 150 nm olan küçük küresel veziküller olup genetik materyalden yoksun boş influenza virüs zarflarının yeniden yapılandırılması ile oluşmuşlardır. Yapılarında, fonksiyonel viral zarf glikoproteinleri içermektedirler (örneğin, influenza virüsündeki hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz). Biyolojik olarak aktif HA proteininin, sadece yapısal stabilitenin sağlanmasında değil, antijen formülasyonlarının reseptör aracılı alımı ve hücre içi işlenmesini kolaylaştırmak gibi işlevleri bulunmaktadır. Böylece, hem hücresel hem de humoral immün yanıtı uyarabilmektedir (Huckriede ve ark. 2005). Virozomun yüzeyine adsorbe olan antijenler, MHK 2 yolağı ile parçalanarak humoral yanıtın uyarılmasını sağlarken, Virozom'a enkapsüle halde olan antijenler ise, MHK 1 yolağı ile sitotoksik T lenfositleri aktive etmesinin yanı sıra CD4+ ve CD8+ yanıtlarının elde edilmesini sağlamaktadır (Otczyk ve Cripps 2010).

Virozom içeren belli sayıda aşı piyasaya sürülmüştür. Bunlardan ilki Epaxal™ olup, hepatit A aşısı olarak Berna Biologics şirketi (Bern, Switzerland) tarafından üretilmiş ve 1994 yılında çeşitli Avrupa, Asya ve Güney Amerika ülkelerinde onay almıştır (Metcalfe ve Glück 2006). Aynı firmanın ilk kez 1997 de İsviçre de lisans aldığı grip aşısı olan Inflexal® V ise, şu anda 25 ülkede kullanılmaktadır (Mischler ve Metcalfe 2002). Virozomlardan yararlanılan bir diğer grip aşısı Invivac® da Hollanda ve İsviçre'de lisans almıştır. NasalFlu®, itranazal grip virozam aşısı olup içinde ayrıca mukozal bir

adjuvan olan *E. Coli* ısıya dayanıksız enterotoksini (LT) içermektedir. Bu aşı Berna Biologics şirketi tarafından İsviçre'de piyasa çıkarılmış olup, aşıyı kullanan insanlarda yüz felci (Bell's Palsy) görülme sıklığının artışı nedeniyle piyasadan kaldırılmıştır (Huckriede ve ark. 2005; Peek ve ark. 2008).

Virüs benzeri partiküller (VLP'ler): Bir diğer çoğalma özelliği olmayan virüs taşıyıcı sistem virüs benzeri partiküllerdir. VLP'ler, viral kapsidin özgün yapısını koruyarak hücresel resptörlere sahip canlı virüsün antijen sunmasını taklit etmektedir. Bundan dolayı, kuvvetli hümoral ve sitotoksik T lenfosit yanıtı da dahil olmak üzere hücresel immün yanıt elde edilebilmektedir (Grgacic ve Anderson 2006). VLP'ler, çoğalma ve enfeksiyon oluşturma için gerekli olan viral nükleik asitlere sahip olmadığı için güvenlidirler. VLP'ler, akut gastroenterit veya mide gribinin önlenmesi amacı ile, nazal yolla uygulanan Norwalk VLP aşısının (Ligocyte Pharmaceuticals, Inc., US) geliştirilmesi için kullanılmıştır. Norwalk VLP aşısı ayrıca, nazal hedeflendirmeyi güçlendirmek amacıyla adjuvan olarak Monofosforil Lipid A (MPL®, GSK) ve kitosan (ChiSys®) (Archimedes Development Ltd., UK) içermektedir (Otczyk ve Cripps 2010).

2.6.8. Lipit İçeren Partiküler Aşı Taşıyıcı Sistemler

Lipit bazlı formülasyonlar, enfeksiyon hastalıklarına karşı aşı geliştirme de umut verici bir mukozal antijen taşıyıcı sistemdir. Lipit bazlı sistemlere artan ilginin nedenleri arasında; iyi karakterize edilmiş olmaları, biyoparçalanır ve biyouyumlu olmaları, antijene özgü mukozal immün yanıtın uyarılması, enkapsüle edilen biyomoleküllerin asidik ve enzimatik degradasyondan korunması, immün hücreler tarafından özelleşmiş antijen alımı/sunumu ve enkapsüle edilen maddenin sürekli salımı sayılabilir.

Lipozomlar, ilaç taşıyıcı sistem olarak en önemli adaylardan biridir ve sistemik immünizasyon açısından yoğun olarak araştırılmıştır. Son 10 yılda ise mukozal aşı taşıyıcı olarak da değerlendirilmişlerdir. Lipozomlar, stabilte açısından hassas yapıya sahip olmalarına rağmen, intestinal lümende antijeni, antijen sunma yolağına taşıyacak kadar yeterli stabiliteye sahiptirler (Goyal ve ark. 2008).

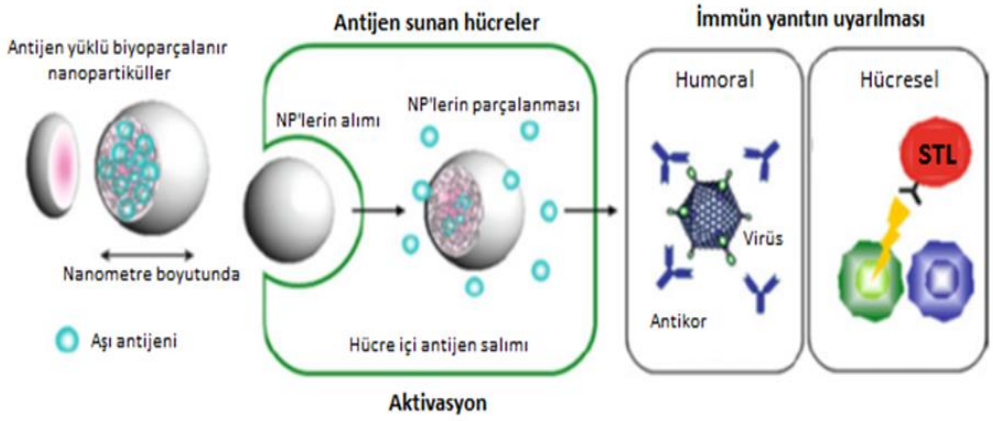
Lipozomlar, fosfolipid bir kabuk ile sulu bir çekirdekten oluşan küresel yapılardır. Aşı taşıyıcı olarak kullanıldığında, antijen çekirdeğin içine enkapsüle edilebilir, çift lipit tabakaya yüklenebilir veya yüzeye adsorbe ettirilebilir (Peek ve ark. 2008).

Lipozomal *Yersinia pestis* aşısı fareye nazal immünizasyon amacı ile verildiğinde, yüksek antijen spesifik mukozal IgA ve IgG antikor yanıtları elde edilmiştir (Freytag ve Clements 2005).

2.6.9. Polimer İçeren Taşıyıcı Sistemler

Son yıllarda, nanometre veya mikrometre boyutundaki partiküllerin antijen taşıyıcıları olarak kullanımları artış göstermektedir. Bunun nedeni, çözeltideki serbest antijenlere kıyasla partiküllerle verilen antijenin, antijen sunan hücreler (ASH) tarafından alımının daha kolay olmasıdır. Teorik olarak, nanopartiküllerin mikropartiküllerden daha güçlü adjuvan olması beklenmekte olup, 500 nm ve altı büyüklükteki nanopartiküllerin dendritik hücreler ve makrofajlar gibi ASH'ler tarafından alımının optimal düzeyde olduğu bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, 20-200 nm boyutundaki nanopartiküllerin antijen sunması için lenf nodlarına serbestçe gidebildiği, 500-2000 nm boyutundaki partiküllerin ise enjeksiyon bölgesinden lenf nodlarına geçebilmek için dendritik hücrelere ihtiyaç duyduğu bildirilmiştir. Bilimsel çalışmalar, nanopartiküller, antijen sunumu için sadece antijen sunan hücre trafiğini kullanmadığını, tek başlarına da lenf nodlarına ulaşabildiğini ve bu yolla daha güçlü immün yanıt elde edilebileceğini göstermiştir (Singh ve ark. 2007; Foged ve ark. 2005; Manolova ve ark. 2008; Sloat ve ark. 2010).

Polianhidritler, poliortoesterler, hiyalüronik asit ve poli(laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) gibi polimerler partiküler sistemlerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır (Arca ve ark. 2009). Aşı taşıyıcı olarak en yaygın çalışılan polimerler ise, PLGA ve polilaktik asittir (PLA). Bu polimerler, biyoparçalanır ve biyouyumlu olup insanlarda kullanımı (dikiş ipliği, implantlar) onaylanmıştır. Bu formülasyonlarda antijen, partikülün içine enkapsüle edilir ya da partiküllerin yüzeyine adsorbe edilir. Ayrıca farklı molekül ağırlığına sahip polimerler kullanılarak, partiküllerin hidroliz ile parçalanma süresi ayarlanabilir ve böylece enkapsüle edilen antijen için bir depo gibi davranarak antijenin kademeli olarak salınmasını sağlar (Peek ve ark. 2008). Nanopartiküler aşı sistemlerinin immün yanıtı uyarması Şekil 2-6'de gösterilmiştir.



Şekil 2-6: Nanopartiküler aşı sisteminin immün yanıtı uyarması (Akagi ve ark. 2012)

NP: Nanopartikül, STL: Sitotoksik T lenfositi.

Partiküler sistemlerin hazırlama yöntemleri, antijen stabilitesini etkileyen önemli bir parametredir. Hazırlama esnasında organik çözelti ve yüksek sıcaklık uygulanması, antijenin degradasyonuna veya denatürasyonuna neden olabilir. Aljinat ve kitosan gibi polimerler kullanılarak hazırlanan partiküler sistemlerde, organik çözücü ve yüksek sıcaklıktan kaçınıldığı için, antijenin stabilitesi de korunabilmektedir (Arca ve ark. 2009).

2.7. Kitosan Tuzları ve *N*-Trimetil Kitosan

Kitin, selülozdan sonra doğa da en çok bulunan biyopolimer olup, kabukluların ve böceklerin dış iskeletlerinde ya da bakteri ve mantar gibi bazı mikroorganizmaların hücre duvarlarının yapısında bulunmaktadır. Kitosan, kitinin deasetilasyonu ile elde edilir ve lineer β-(1→4) bağları ile bağlı anhidro-d-glikozamin ve anhidro-N-asetil-d-glikozamin kopolimerlerinden meydana gelir (Arca ve ark. 2009).

Kitosanın mukoadezyon özelliğinin temel mekanizması, pozitif yüklü polimer ile hücre yüzeyi ve mukus gibi negatif yüklü materyaller arasındaki elektrostatik etkileşime dayanmaktadır. Mukus, yüksek oranda siyalik asit bulunduran müsin içermektedir. Fizyolojik pH'da siyalik asit net bir negatif yük taşımaktadır ve bunun sonucunda müsin ile kitosan kuvvetli bir elektrostatik etkileşim meydana getirmektedir. Kitosanın absorpsiyon sağlayan etkisi, sadece formülasyon ilemukozal dokular (örneğin, NALT ve GALT) arasındaki adezyon aracılığı ile değil, aynı zamanda kitosanın paraselüler transportu arttırma özelliğine de dayanmaktadır. Deney hayvanlarının yanısıra Caco-2 hücre hattında yapılan araştırmalarda, kitosanın paraselüler transportu arttırdığı ispatlanmıştır (Artursson ve ark. 1994). İmmünohistolojik çalışmalar, kitosanın, hücreler

arasında bulunan sıkı bağlantı noktalarını F-aktin filamentleri üzerinden etkilediğini ve bu yolla transportu arttırdığını ispatlamıştır (Jabbal-Gill ve ark. 2012).

Kitosanın primer amin gruplarının pKa değeri, asetilasyon derecesine bağlı olarak değişiklik göstermesine rağmen yaklaşık 6,5'tur. Kitosan, düşük pH'larda protonlanarak su da yüksek çözünürlüğe sahip olur. Nötral pH'da ise daha az yüke ve düşük çözünürlüğe sahiptir (Issa ve ark. 2005). Düşük çözünürlük nedeniyle uygulama alanları kısıtlandığı için, suda çözünür kitosan türevleri (örneğin trimetil kitosan-TMC) ve tuzları (örneğin; glutamat, aspartat, hidroklorür ve laktat) hazırlanmıştır (Arca ve ark. 2009; Jabbal-Gill ve ark. 2012).

Çoğu kitosan türevi sadece deneysel materyal olarak kullanılmaktadır. N-Trimetil kitosan (TMC) ile karboksimetil kitosan ticari olarak yüksek saflıkta bulunmasına rağmen düzenleyici otoriteler tarafından insanda kullanımı henüz onaylanmamıştır (Jabbal-Gill ve ark. 2012). Avrupa Farmakopesinde (EP2011), sadece kitosan klorüre ait bir monograf bulunmaktadır.

***N*-Trimetil Kitosan (TMC):** Kitosanın katernizasyonu ile N-trimetil kitosan klorür gibi türevleri elde edilmektedir. TMC, nötral ve bazik pH'larda çok iyi bir şekilde çözünmektedir. Kitosan ve kitosan tuzları gibi TMC de hafif asidik ortamda hidrofilik bileşiklerin ve peptit yapısındaki ilaçların tek tabakalı Caco-2 hücrelerinden paraselüler geçişini arttırmaktadır (Kotze ve ark. 1997). TMC nanopartiküllerinin aşı taşıyıcı sistem olarak potansiyeli, monovalan influenza alt birim aşısının nazal yoldan verilmesi için Amidi ve ark. (2007) tarafından araştırılmıştır. Antijen yüklü nanopartiküller, TMC çözeltisinin, monovalan influenza A alt birimi H3N2 ve tripolifosfat (TPP) içeren çözelti ile oda sıcaklığında karıştırlmasıyla hazırlanmıştır. Antijen yüklü TMC nanopartiküllerinin tek doz intranazal uygulaması,, antijenin intamüsküler uygulaması ile karşılaştırıldığında, anlamlı derecede yüksek hemaglütinasyon inhibisyonu ve total IgG yanıtı elde edilmiştir. Çalışmaya ait sonuçlar, TMC nanopartiküllerinin, intranazal yoldan uygulanan antijenler için güçlü ve yeni bir taşıyıcı sistem olabileceğini göstermiştir. N-trimetil kitosanın, hidrofilik moleküllerin nazal epitelden absorpsiyonunda temel bir rol oynadığı da ispatlanmıştır (Sahni ve ark. 2008).

Kitosan Klorür ve Kitosan Glutamat: Kitosanı su ortamında çözünür hale getirebilmek amacıyla hidroklorik asit ya da glutamik asitle tuzu oluşturulmuştur (Orienti ve ark. 2002; Cerchiara ve ark. 2003). Bu da kitosana kullanım kolaylığı ve yaygınlığı

kazandırmıştır. Yapılan bir klinik çalışmada, çözünür kitosan glutamatla formüle edilmiş influenza aşısının intranazal yoldan uygulanması ile polimerin immün yanıtları arttırıcı etkisi olduğu bulunmuştur (Read ve ark. 2005).

2.8. Karboksimetil Kurdlan

1,3-beta glukanların immün yanıtı uyardığı bilinmektedir. *İn vitro* çalışmalar, β-glukanların spesifik immün reseptörlere etki ettiğini göstermiştir. Bu durum da, makrofaj, nötrofil, monosit, doğal katil hücre ve dendritik hücreler gibi immün hücrelerin uyarılmasına sebep olmaktadır. β-glukanlar, hem doğal hem de edinilmiş yanıtları modüle etmektedir ve opsonik ya da opsonik olmayan fagositozu arttırmaktadır (Cremer ve ark. 2010). Aşı taşıyıcı sistem olarak tasarlanmış model antijen OVA taşıyan glukan partiküllerinin, oral yolla uygulandığında hümoral immün yanıtları uyardığı bildirilmiştir (Smet ve ark. 2013). Beta glukanlar genelde güvenli olarak tanımlanan (GRAS) ürünler olarak FDA tarafından onaylanmıştır. Glukan partikülleri, antijenin yapısının ve bütünlüğünün bozulmasını engeller ve antijeni antijen sunan hücrelere hedeflendir ir(Eldridge ve ark. 1990).

Kurdlan, 1,3-beta glukan yapısına sahip mikrobiyal polisakkaritlerden biri olup *Alcaligenes faecalis* suşundan elde edilmektedir ve 1,3-β bağlı D-glikoz birimlerinden oluşan doğal bir lineer (üçlü heliks) polisakkarittir. Kurdlanın AIDS virüs enfeksiyonuna karşı inhibe edici etkisi ve kanda koagülasyonu önleyici etkisi bulunmakla beraber *in vitro* ve *in vivo* düşük toksisiteye sahiptir (Na ve ark. 2000). Kurdlanın antikanser aktiviteleri yanı sıra adjuvan aktivitesi de bulunmaktadır. Ohno ve ark. (1988) ve Sasaki ve ark. (1979) kurdlanın adjuvan etkisinin karboksimetilasyon derecesine bağlı olduğunu göstermiştir.

Kurdlanın kendisi suda çözünmemesine rağmen karboksimetil türevinin suda çözünürlüğü iyidir (Lee ve ark. 2009). Vereschagin ve ark., (1998) karboksimetil glukan türevlerinin polianyon yükleri sayesinde makrofajlarda bulunan scavenger (çöpçü) reseptörlere seçici olarak bağlanarak bu hücrelerin aktivasyonunu sağladığını göstermişlerdir. Karboksimetil kurdlanın antitümöral aktiviteye de sahip olduğu bilinmektedir. Na ve ark. (2000) yaptıkları bir çalışmada karboksimetil kurdlandan yararlanarak hidrojel oluşturmuşlar ve bunu hepatik karsinoma hücre hattında denemişlerdir. İmmünolojik aktiviteyi attırdığı ve antikanser ilacının kontrollü salımını

sağladığı için karaciğer kanserinin tedavisinde kullanılabilecek iyi bir ilaç taşıyıcı sistem olduğu sonucuna varılmıştır.

2.9. Polielektrolit Kompleks (PEC) Oluşumu ile Nanopartikül Hazırlama

Nanopartiküller, suda çözünür olan veya olmayan polimerler kullanılarak farklı yöntemlerle hazırlanabilmektedir. Bu yöntemler; iyonotropik jelasyon, mikroemülsiyon, emülsiyon-çözücü uçurma, emülsiyon-çözücü difüzyon, polielektrolit kompleks, kompleks koaservasyon ve kopresipitasyondur. Bunların içinde en yaygın olarak kullanılanları iyonotropik jelasyon ve polielektrolit kompleks oluşumu yöntemleridir. Bu yöntemler de, organik çözücüye ya da yüksek kayma kuvvetine gerek olmaması nedeniyle hazırlama esnasında antijenin stabilitesi en yüksek seviyede korunabilmektedir (Jabbal-Gill ve ark. 2012).

PEC'in yapısı hidrofobik bir çekirdek ile bir kabuk tabakasından oluşmaktadır vezıt yüklü polimer çözeltilerinden birinin diğerine yavaş bir şekilde damlatılmasıyla hazırlanırlar (Daly ve Knorr 1988). Partiküllerin oluşumu, ev sahibi-misafir (host-guest) mekanizması ile gerçekleşmektedir. Damla damla ilave edilen misafir polimer (çekirdeği oluşturur) olup ilave edildiği polimer ise ev sahibi (dış kabuğu oluşturur) dir. Genellikle PEC'ler zıt yüklü iyonların birbirleri arasındaki elektrostatik etkileşimleri sonucu meydana gelmektedir.

PEC'ler ile ilgili çalışmalar özellikle ilaç taşıyıcı sistemler ve gen hedeflendirme alanlarında ivme kazanmıştır. PEC nanopartiküllerinin hazırlanması basit olup toksik organik çözücüler veya kimyasal çapraz bağlayıcılara ihtiyaç duyulmaz. Birçok faktör kompleks yapıyı ve fiziksel özellikleri etkileyebilmektedir. Bunlar arasında; poliiyonların iyonizasyon derecesi, ortamın pH'sı, etkileşim süresi, reaksiyon ortamının sıcaklığı ve iyonik kuvvet yer almaktadır (Polaxe ve Delair 2013; Il'ina ve Varlamov 2005).

2.10. Sığır Serum Albumini (BSA) Antijeni

BSA, suda çözünen ve yaklaşık 66 kDA molekül ağırlığına sahip bir proteindir. Genellikle aşı hedeflendirme çalışmalarında model antijen olarak kullanılmaktadır (Hamidi ve ark. 2007; Lemoine ve ark. 1998; Wang ve ark. 2012; Spiers ve ark. 2000). BSA, zayıf immünojeniteye sahip bir serum proteinidir (Sloat ve ark. 2010). Analizinin kolay olması, fizikokimyasal özelliklerinin iyi bilinmesi ve düşük maliyeti nedeniyle model antijen olarak uygun özelliklere sahiptir (Hoshi ve ark. 1998; Hamidi ve ark. 2007).

2.11. A549 ve CALU-3 Hücre Hatları

A549 hücre hattı: Bu hücre hattı 58 yaşındaki beyaz ırka ait bir erkeğin akciğer karsinomalı dokusundan çıkartılarak 1972 yılında oluşturulmuştur. A549 hücre hattı pulmoner epitelin tip II hücrelerinin karakteristik özelliklerine sahiptir. Tip II hücreler alveollerde çok sayıda bulunur ve özellikle lameler yapılar olarak adlandırılan organellerden ortama sürfaktan salgılar (Foster ve ark. 1998).

A549 hücre hattı sıklıkla partiküllerin ve kimyasalların toksikolojik etkilerinin araştırılmasında kullanılmaktadır ve bu nedenle, iyi oturmuş bir referans hücre hattı olarak hizmet etmektedir (Bornholdt ve ark. 2007).

CALU-3 hücre hattı: Calu-3 hücre hattı 25 yaşında beyaz ırka ait bir insandan 1975 yılında Fogh tarafından elde edilmiştir (Florea ve ark. 2003). İnsan akciğer adenokarsinoma hücre hattı olan Calu-3, üst solunum yolunun seröz hücrelerine benzer özelliklere sahiptir. Bu hücreler tek tabakadan oluşup mukus ve sürfaktan bileşenleri salgılamaktadır (Amidi ve ark. 2006). Calu-3 hücre hattı bu özelliklerinden dolayı, müsin gen ekspresyonu ve sentezi, elektrolit transportu, epitel bariyer özelliklerinin incelenmesi ve düzenlemesi gibi alanlarda en çok çalışılan hücre hatlarından biridir. Ayrıca, nazal yoldan ilaç taşıyıcı sistemlerin uygulanmasıyla ilgili yapılan çalışmalarda, *in vitro* toksisitenin belirlenmesi ve ilaç taşıyıcı sistemlerin geçiş özelliklerinin incelenmesi amacıyla Calu-3 hücreleri kullanılmaktadır (Dimova ve ark. 2005).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler

2-Merkaptoetanol (BioRad, ABD)

96 Kuyucuklu Plaka (Costar, ABD)

ABTS (Merck, Almanya)

Alum-Alhydrogel %2 (InvivoGen, ABD)

Sığır Serum Albumini, Fraksiyon V (Sigma, Almanya)

Bradford Reaktifi (Sigma, Almanya)

Cell Freezing Medium-DMSO (Sigma, Almanya)

Coomassie Brilant Blue R250 (Glentham Life Sciences, İngiltere)

CpG ODN-ODN 2006 (İnvivogen, ABD)

D-(+)-Trehaloz dihidrat (Sigma, Almanya)

Dietil Eter (Merck, Almanya)

Dimetil Sülfoksit-DMSO (Merck, Almanya)

Diyaliz Tüpü- Visking® dialysis tubing 20/32 (Serva, Almanya)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma, Almanya)

ELISA Coating Buffer-5X (BioRad, ABD)

Elisa Max Deluxe Set IFN-γ (Biolegend, ABD)

Elisa Max Deluxe Set Il-10 (Biolegend, ABD)

Elisa Max Deluxe Set Il-2 (Biolegend, ABD)

Elisa Max Deluxe Set Il-4 (Biolegend, ABD)

Elisa Max Deluxe Set Il-6 (Biolegend, ABD)

ELISA Wash Buffer-20X (Biolegend, ABD)

Fetal Sığır Serumu-FBS (Sigma, Almanya)

Goat Anti Mouse IgA:HRP (AbD Serotec-BioRad, ABD)

Goat Anti Mouse IgG:HRP (AbD Serotec-BioRad, ABD)

Goat Anti Mouse IgG_1:HRP (AbD Serotec-BioRad, ABD)

Goat Anti Mouse IgG_{2a}:HRP (AbD Serotec-BioRad, ABD)

Hücre Kültür Kabı (25 cm^2, 75 cm^2 ve 150 cm^2) (SPL, Güney Kore)

Hücre Süzgeci- Cell Strainer 70 µm (SPL, Güney Kore)

İyodometan (Fluka, Almanya)

İzopropanol (Merck, Almanya)

Kitosan 9 cP (ChitoClear, Primex, İzlanda)

Kurdlan (Kirin Company, Japonya)

L-Glutamik Asit (Sigma, Almanya)

Laemmli Sample Buffer-4x (BioRad, ABD)

Metanol (Merck, Almanya)

Minimum Essential Medium Eagle's -EMEM, (Multicell, ABD)

N-metil-2-pirolidinon (Aldrich, Almanya)

PBS tablet pH 7.4 (Genaxxon Bioscience, Almanya)

Penisilin-Streptomisin (Sigma, Almanya)

Petri Kabı-60 mm x15 mm (SPL, Güney Kore)

Precision Plus Protein™ Standards Dual Color Protein Marker (BioRad, ABD)

RPMI 1640 (Lonza, Belçika)

SDS-PAGE Jel (BioRad Mini-Protean TGX Gels, ABD)

Sodyum Azit (Sigma-Aldrich, Almanya)

Sodyum İyodür (Sigma, Almanya)

Stop Solution (Biolegend, ABD)

Tripsin-EDTA Çözeltisi-%0,025 (Sigma, Almanya)

Tris/Glycine/SDS Buffer-10X (BioRad, ABD)

Tween 20 (GeneMark, Tayvan)

Kullanılan cihazlar

96 kuyucuklu plaka okuyucu-Multiskan Ex (ThermoLab Systems, ABD)

Derin dondurucu (-80°C)- (ThermoScientific, ABD)

Distile su aleti-Pure Lab Option (Elga, Fransa)

Etüv (Heraeus, Almanya)

FT-IR Spektrofotometre (Perkin Elmer, ABD)

Hassas terazi-TB Series (Denver Instruments, ABD)

Invert Mikroskop-CXX41 (Olympus, Japonya)

Karbon dioksit inkübatörü (ThermoScientific, ABD)

Liyofilizatör (Virtis, ABD)

Manyetik Karıştırıcı (İKA, Almanya)

NMR Spektrometresi- Unity INOVA 500 MHz (Varian, ABD)

Orbital Çalkalayıcı (Thermo Electron Corporation, ABD)

Otoklav (Tutnauer, Hollanda)

pH Metre (Inolab, WTW, Almanya)

Santrifüj (Allegra X-22R, Beckman Coulter, ABD)

Sınıf II Laminar Akış Kabini- (MSC Advantage, ThermoScientific, ABD)

Sıvı Azot Tankı-Arpege 70 (CryopAL, Fransa)

Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) (Quanta 450 FEG, FEI microscopes, ABD)

Ultrasonik banyo (Sonorex, Bandelin, Almanya)

Vertikal Jel Elektroforez (Mini Protean Tetra System, Biorad, ABD)

Vortex (Genius 3, IKA, Almanya)

Zetasizer Nano ZS (Malvern, İngiltere)

3.1. BSA Antijeninin Özelliklerinin Belirlenmesi

3.1.1. BSA Antijeninin UV Spektrumu

BSA antijeninin distile su ortamında konsantrasyonu bilinen çözeltileri hazırlanmış ve 200-600 nm aralığında UV spektrofotometrede spektrumları alınarak maksimum absorbans gösterdiği dalga boyları (λ_{max}) belirlenmiştir.

3.1.2. Bradford Yöntemiyle BSA Antijeninin Miktar Tayini

Bradford yöntemi, proteinlerin miktar tayininde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Redüktan maddelerin varlığında dahi doğru sonuçlar verebilmekte ve düşük miktardaki proteinlerin miktar tayininde kullanılabilmektedir. Mikro deney protokolü ile minimum 1 µg/mL'ye kadar olan konsantrasyonda protein miktarı tayin edilebilmektedir. Bu yöntem, protein örneklerinin coomassie boyası ile reaksiyonuna dayanmaktadır. Coomassie, proteine bağlandığında absorpsiyon dalga boyu 465 nm'den 595 nm'ye ani olarak kaymaktadır. Protein konsantrasyonları, protein standardlarının belli konsantrasyonlara seyreltilmesi aracılığıyla bulunabilmektedir. Nanopartiküller 15.000 rpm de 2 saat santrifüj edildikten sonra, üstteki sıvı kısımdan ve farklı konsantrasyonlardaki protein standartlarından 1'er mL alınarak ayrı ayrı küvetlere kondu. Her birinin üzerine 1'er mL bradford reaktifi eklenip 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Örneklerin absorbansları 595 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede okundu. Boş nanopartiküller kontrol olarak kullanılmıştır.

3.1.3. Bradford Yöntemiyle BSA Antijeninin Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Bir analitik yöntemin validasyonu, amaçlanan kullanıma uygunluğu için beklenen sonuçları vereceğinin kanıtlanması işlemidir. Kullanılan miktar tayininin validasyonu için doğruluk, kesinlik, özgünlük, teşhis sınırı, tayin alt sınırı, doğrusallık ve aralığı parametreleri kullanılmıştır (ICH Q2(R1)).

3.1.3.1. Doğrusallık

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, elde edilen bulguların örnek çözeltisi içindeki madde konsantrasyonu ile belli bir aralıkta doğrudan orantılı olması durumudur (ICH Q2(R1)). Miktar tayini yönteminin doğrusallığı için 1 mg/mL BSA stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltisi, farklı oranlarda seyreltilerek numuneler hazırlandı. 7 farklı konsantrasyonun (0,2, 0,5, 1, 2, 4, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5 ve 20 µg/mL) 3 ayrı ölçüm ile

elde edilen absorbans değerleri ile standart eğri çizildi. Doğru denklemi, determinasyon katsayısı (r^2), standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (%RSD) değerleri hesaplandı.

3.1.3.2. Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğunun yani gerçek değere olan yakınlığının belirlenebilmesi için belirli konsantrasyon aralığında üç farklı konsantrasyon seçilerek en az üçer kez hazırlanan numuneler % geri kazanım değerlerinin belirlenmesiyle tayin edilebilmektedir. Bu amaçla, 1 mg/mL konsantrasyonunda BSA stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltisinden 5; 7,5 ; 10 μg/mL olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanarak 595 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü. Yöntemin doğruluğu, geri kazanma değerleri saptanarak hesaplandı.

3.1.3.3. Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği, aynı homojen örnekten ardışık örneklemeyle elde edilen ölçümlerin sonuçlarının yakınlığıdır. Kesinlik, normal işlem koşulları altında, yöntemin tekrarlanabilirliğinin, ara kesinliğinin ve tekrar üretilebilirliğin ölçümüdür (ICH Q2(R1)). Bu çalışmada kesinliği belirleyebilmek için tekrarlanabilirlikten yararlanılmıştır. Bu da kısa zaman aralıklarında aynı işlem koşulları altındaki kesinliği ifade etmektedir. Belirli aralığı kapsayan en az üç konsantrasyon noktasında en az üçer kez ölçümle belirlenmiştir. Sonuçlar, hesaplanan konsantrasyonların ortalaması, standart sapması (SD) ve % bağıl standart sapması (%RSD) olarak verilir (ICH Q2(R1)). Yöntemin kesinliği için RSD değerinin % 2 den küçük olması gerekmektedir.

3.1.3.4. Özgünlük

Özgünlük, ölçülecek örneğin diğer bileşenler varlığındaki miktar tayini için yöntemin uygunluğunun belirlenmesidir (ICH Q2(R1)). Formülasyonda yer alan yardımcı maddelerin çözeltileri ve boş nanopartikül formülasyonları hazırlanmıştır. Analiz edien madde ile herhangi bir girişim yapıp yapmadığı saptanmıştır.

3.1.3.5. Teşhis Limiti (LOD)

Bir analitik yöntemin teşhis limiti, belirli koşullar altında örnek içinde analiz edilen maddenin teşhis edilebilen; ancak tayin edilemeyen en düşük konsantrasyonudur (ICH Q2(R1)).

$$LOD=3,3\cdot\sigma/S \quad (3\text{-}1)$$

σ: Regresyon doğrularının y kesişim değerlerinin standart sapması

S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

3.1.3.6. Miktar Tayini Limiti (LOQ)

Bir analitik yöntemin alt tayin sınırı, örnekteki maddenin uygun doğruluk ve kesinlikte kantitatif olarak tayin edilebilen en düşük miktarıdır (ICH Q2(R1)).

$$LOQ=10\cdot\sigma/S \quad (3\text{-}2)$$

σ: Regresyon doğrularının y kesişim değerlerinin standart sapması

S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

3.2. Kitosan Klorür (CC) ve Kitosan Glutamat (CG) Hazırlanması

Kitosan tuzları, daha önce yapılmış çalışmalarda (Orienti ve ark. 2002; Cerchiara ve ark. 2003) kullanılan yöntemlerde bazı değişiklikler yapılarak hazırlanmıştır. Kitosan tuzlarının hazırlanması için, 1 g kitosan 150 mL distile su içine eklendi ve manyetik karıştırıcıda karıştırılırken üzerine 1 mol kitosana eşdeğer miktarda hidroklorik asit veya glutamik asit ilave edildi .Kitosan tamamen çözündükten sonra distile suya karşı 72 saat dializ edilerek reaksiyona girmemiş tuzlar ortamdan uzaklaştırıldı. Elde edilen kitosan tuzu -50°C de 48 saat liyofilize edildi ve kullanıma kadar +4ºC de saklandı.

3.3. *N*-Trimetil Kitosan Klorür (TMC) Sentezi

2 g kitosan ve 4,8 g sodyum iyodür, 80 mL 1-metil-2-pirolidonun içinde yağ banyosunda 60°C'de 1 saat boyunca karıştırılarak çözündürüldü. Kitosan çözündükten sonra 11 mL %15'lik (a/h) sodyum hidroksit çözeltisi ve 11,5 mL metil iyodür eklenerek 1 saat karıştırıldı. Elde edilen ürün, 300 mL eter ve etanol (1:1) karışımı kullanılarak çöktürüldü ve sonrasında çökelti G3 cam fitre kullanılarak ayrıldı. Elde edilen ürün, etanol-eter karışımıyla yıkandıktan sonra oda sıcaklığında vakumlu etüvde kurutuldu. İkinci aşama için, kuru haldeki *N*-trimetil kitosan iyodür, 80 mL 1-metil-2-pirolidon içinde 60°C'deki yağ banyosunda 1 saat boyunca karıştırıldı. 4,8 g sodyum iyodür, 11 mL %15'lik (a/h) sodyum hidroksit çözeltisi ve 7 mL metil iyodür eklendikten sonra

60°C'de 30 dakika boyunca hızlı bir şekilde karıştırıldı. Sonrasında, 2 mL metil iyodür ve 0,6 g sodyum hidroksit pellet ilave edilerek 60°C'de 1 saat boyunca karıştırmaya devam edildi. Çöktürme ve yıkama basamakları birinci aşamadaki gibi yapıldı. Oluşan *N*-trimetil kitosan iyodür, 40 mL %10'luk sodyum klorür çözeltisinde 24 saat karıştırılarak çözündürüldü ve oluşan *N*-trimetil kitosan klorür (TMC) diyaliz tüpü kullanılarak 72 saat boyunca suya karşı diyaliz edildi. Saflaştırılan TMC -50°C de 48 saat liyofilize edildi ve kullanıma kadar +4ºC de saklandı.

3.4. Karboksimetil Kurdlan (CMC) Sentezi

Kurdlanın karboksimetilasyonu için Sasaki ve ark. (1979) tarafından geliştirilen yöntem bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır.

80 mL isopropil alkol içerisine 3 g kurdlan ilave edildikten sonra 30 dakika oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra üzerine, 8 mL %30'luk sodyum hidroksit çözeltisi, 1 mL'lik porsiyonlar halinde 15 dakika aralıklarla 90 dk boyunca ilave edilerek oda sıcaklığında karıştırıldı. 3,6 g sodyum monokloroasetat 3 porsiyon halinde 10'ar dakika aralıklarla karışıma eklenerek 55°C'de 5 saat boyunca karıştırıldı. Süspande haldeki ürün filtrasyon ile alınıp sırasıyla metanol-asetik asit (7:3 h/h), metanol-su (4:1 h/h), metanol ve aseton ile yıkandı. Sentezlenen CMC suda çözündürüldü ve 3 gün boyunca 4°C'de distile suya karşı diyaliz edildi. Saflaştırılan CMC, -50°C de 48 saat liyofilize edildi ve kullanıma kadar +4ºC de saklandı.

3.5. Sentezlenen Polimerlerin Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrofotometresi ile Analizi

ATR üniteli Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR spektrofotometresi kullanılarak, sentezlenen CC, CG, TMC ve CMC polimerlerinin 4000-650 cm^{-1} aralığındaki spektrumları alındı.

3.6. TMC ve CMC'nin Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektrometresi ile Analizi

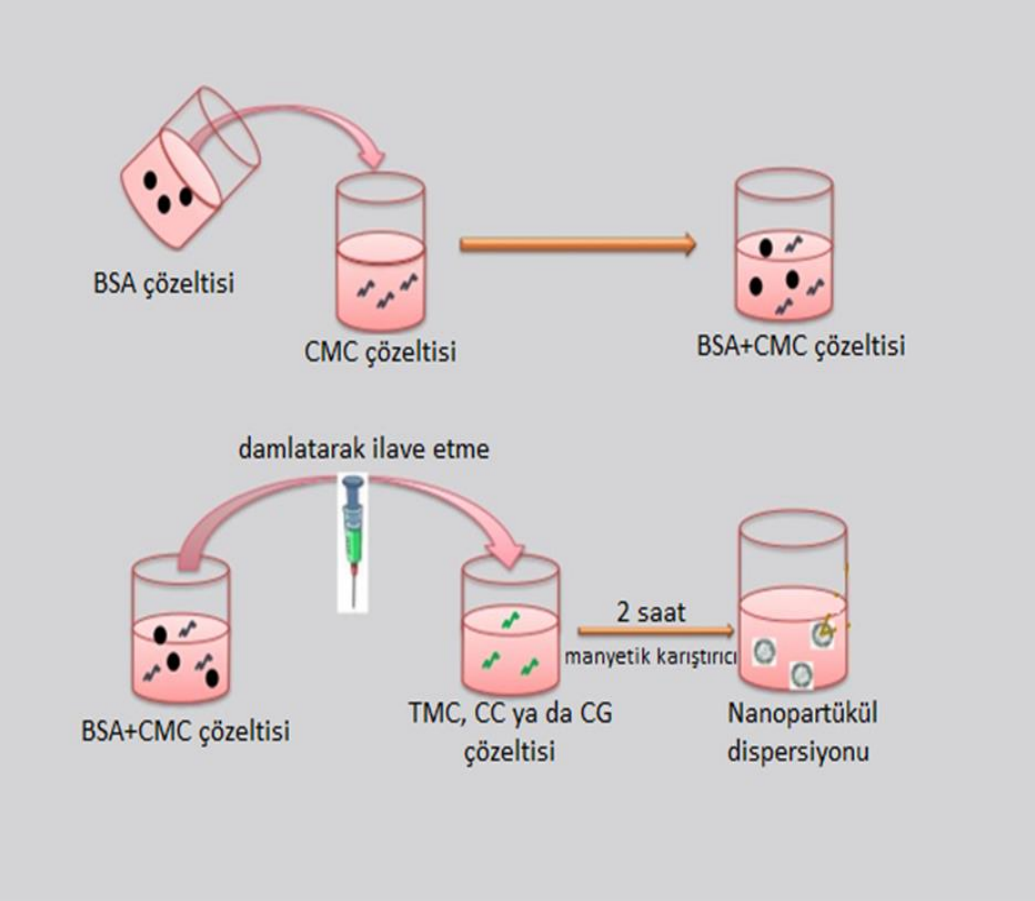
Döteryum oksit (D_2O) içinde çözündürülen TMC ve CMC polimerlerinin sırasıyla ^{1}H-NMR ve ^{13}C-NMR spektrumları, Varian Unity INOVA 500 MHz NMR spektrometresi ile alınmıştır. TMC'nin trimetilasyon ve dimetilasyon derecesi ^{1}H-NMR spektrumundan elde edilen verilerden aşağıdaki denklemlere (3-3 ve 3-4) göre hesaplanmıştır:

Trimetilasyon derecesi (%) = ((CH_3)3/[H]x9)x100 (3-3)

Dimetilasyon derecesi (%) = ((CH_3)2/x6)x100 (3-4)

3.7. Boş Nanopartiküllerin ve BSA Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması

Nanopartiküller, farklı konsantrasyonlardaki (0,25, 0,5, 1, 1,5, 2 ve 2,5 mg/mL) karboksimetil kurdlanın sulu çözeltisinin, farklı konsantrasyonlardaki (0,5, 1, 1,5, 2 ve 2,5 mg/mL) kitosan türevinin (CC, CG ya da TMC) sulu çözeltisine oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda damla damla ilave edilmesi ile hazırlanmıştır. Antijen yüklü nanopartikül elde etmek için ise BSA antijeni çekirdek tabakayı oluşturan karboksimetil kurdlan çözeltisine nanopartikül hazırlanmadan önce ilave edilmiştir. BSA'nın formülasyon içerisindeki final konsantrasyonu 7,5 µg/mL dir. Nanopartiküllerin polielektrolit kompleks oluşturma yöntemiyle hazırlanışı Şekil 3-1'de gösterilmiştir. Oluşan nanopartiküller 15.000 rpm'de 2 saat santrifüj edildikten sonra liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyondan sonra ağırlığı ölçülerek verimi hesaplanmıştır.



Şekil 3-1: Nanopartiküllerin polielektrolit kompleks oluşumu yöntemiyle hazırlanması (Martino 2014 deki şekil modifiye edilerek çizilmiştir.)

BSA: Sığır Serum Albumini, CC: Kitosan Klorür, CG: Kitosan Glutamat, CMC: Karboksimetil Kurdlan, TMC: Trimetil Kitosan.

3.8. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliğinin Tayini

Hazırlanan nanopartiküllerin içine yüklenen antijen miktarının tespiti için Bradford yönteminden yararlanılmıştır. Yöntem 3.1.2.'de çalışmanın yapılışı anlatılmıştır. Tüm analizler üç kere tekrar edilmiştir.

Nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği, aşağıda verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır (3-5):

(3-5)

$$\text{Enkapsülasyon Etkinliği (\%)} = \left(\frac{\text{Toplam protein miktarı-Serbest protein miktarı}}{\text{Toplam protein miktarı}} \right) \text{x100}$$

3.9. Farklı Hazırlama Ortamlarının Nanopartikül Formülasyonlarına Etkisi

Anyonik (CMC) polimer ile katyonik (CC, TMC veya CG) polimerlerin farklı kütlesel oranlarda (1:1'den 5:1'e) birleştirilmesi ile oluşturulan nanopartiküller 3 farklı ortamlarda hazırlandı. Bu ortamlar; fosfat tampon çözeltisi (PBS pH 7.4), izotonik sodyum klorür çözeltisi (%0,9) ve sudur. Hazırlama ortamının nanopartiküllerin büyüklüğüne ve büyüklük dağılımına, zeta potansiyeline ve stabilitesine olan etkisi araştırıldı.

3.10. Nanopartikül Büyüklüğünün ve Büyüklük Dağılımının İncelenmesi

Partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı, Foton Korelasyon Spektroskopisi (Nano-ZS Malvern Instruments Ltd., İngiltere) yöntemi kullanılarak ölçüldü. Foton korelasyon spektroskopisi, Brown hareketlerinden yola çıkarak gerçek partikül çapını ölçmektedir. Bu hareket dispersiyon içindeki partiküllerin rastgele hareketleri olup daha büyük partiküller daha yavaş hareket etmektedir. Bu hareket ışık saçılımı kullanılarak ölçülmektedir.

Her bir nanopartikül formülasyonu için üç ölçüm yapılarak ortalama partikül büyüklüğü ile büyüklük dağılımı (polidispersite) değerleri ve standart sapmaları hesaplanmıştır.

3.11. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyellerinin Ölçülmesi

Zeta potansiyeli, kolloidal sistemlerde elektrokinetik potansiyel için kullanılan bilimsel bir terimdir. Dispersiyon ortamı ve disperse olan nanopartiküle bağlı sıvının stasyoner tabakası arasındaki farkı açıklayan bir terimdir. Zeta potansiyeli, çifte tabakadaki elektrik yüzey potansiyeline ya da Stern potansiyeline eşdeğer olmamasına rağmen, çifte tabaka özelliklerinin karakterizasyonunda çoğunlukla uygun olan tek seçenektir. Zeta potansiyel ölçümü, yüklü kolloidlerin yüzeyinin karekterize edilmesinde günümüzdeki en basit ve doğrudan yol olup birimi ise genellikle milivolt olarak ifade edilir (Honary ve Zahir 2013).

Nanopartiküllerin zeta potansiyeli, elektroforetik ışık saçılım tekniği ile (Nano-ZS Malvern Instruments Ltd., İngiltere) ölçülmüştür. Nanopartiküller su içerisinde disperse edildikten sonra eletroforetik hücreye yerleştirilmiş ve elektroforetik hareketliliğin ölçülmesiyle oluşan veriler zeta potansiyeli değerlerine cihaz tarafından

çevrilmiştir. Her bir örnek için altı ölçüm yapılmış olup ortalama değerleri ile standart sapmaları hesaplanmıştır.

3.12. Nanopartiküllerin Fiziksel Stabilitesinin İncelenmesi

Saklama stabilitesi, farmasötik ürünün geliştirilmesindeki önemli bir faktördür. Partiküler aşı sistemlerinde ise saklama boyunca iki problemle karşılaşılabilmektedir. Bunlar, kolloidal stabilite veya aktif stabilite (antijen bütünlüğü) ile ilgilidir (Jiang ve ark. 2005).

Bu nedenle, hazırlanan nanopartiküllerin fiziksel stabilitesini araştırmak için tüm formülasyonlar +4±1 °C'de saklandı ve partikül boyutları, sırasıyla, hazırlandıktan hemen sonra, 1 hafta , 2 hafta, 4 hafta ve 12 hafta sonra ölçülerek partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımında ki olası değişmeler incelendi.

3.13. Santrifüj ve Liyofilizasyon İşlemlerinin Nanopartiküllerin Stabilitesi Üzerine Etkisi

Hazırlanan nanopartiküllerin büyüklüğüne ve büyüklük dağılımına santrifüj işleminin etkisini araştırmak amacıyla nanopartiküller, farklı sürelerde (30, 60 ve 120 dakika) 5.000 rpm de santrifüj edildi. Ayrıca, bir diğer işlemde de 0,2 mL gliserol yatağı oluşturulduktan sonra nanopartikül dispersiyonu 120 dakika ve 5.000 rpm'de santrifüj edildi. Böylece gliserolün nanopartiküllerin tekrar dağıtılabilirliğine etkisi incelendi.

Diğer bir çalışmada ise, partiküller santrifüjden sonra %5 (a/a) veya %20 (a/a) trehaloz içeren çözelti içerisinde redisperse edilerek liyofilizasyon işlemine tabi tutuldu. Böylece trehalozun, genellikle liyofilizasyon işlemi sonrası oluşabilen partikül agregasyonuna etkisi incelendi.

3.14. Partiküllerin Morfolojisinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile İncelenmesi

SEM, temel olarak yüksek enerjili elektron demeti ile çalışılan örneğin yüzeyinin taranması ve bu örnekten saçılan elektronların tespit edilip görüntü haline getirilmesi prensibine dayanan morfolojik bir inceleme yöntemidir.

Hazırlanan partiküllerin (CC-CMC, CG-CMC ve TMC-CMC nanopartikül formülasyonları) morfolojik incelemesi, Quanta 450 FEG Taramalı Elektron Mikroskobu ile yapılmıştır. Mikroskop incelemesinden önce, önce nanopartikül dispersiyonundan bir

damla bakır yüzeye damlatıldı ve sonrasında bir gece boyunca kuruması beklendi. Bakır yüzey kuruduktan sonra altınla kaplanarak mikroskopta örneklerin incelemesi yapıldı.

3.15. SDS Protein Bütünlüğü Testi

Nanopartiküllerin üretimi ve liyofilizasyonu esnasında çalışma koşullarının enkapsüle edilmiş BSA antijeninin bütünlüğüne etkisini belirlemek için sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanıldı. Nanopartiküller 1 mL eppendorf tüpün içindeki 100 µL pH 7.4 PBS'de disperse edilip nanopartiküllerin içindeki proteinin salımı için gece boyunca oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda (150 rpm) karıştırıldı. Sonrasında santrifüj edilerek üstte kalan sıvı kısımlar alındı ve yükleme tamponuyla (Laemmli Sample Buffer-4x ve 2-merkaptoetanol, BioRad) dört kez seyreltildi. Nanopartikül örnekleri, moleküler ağırlık işaretleyicisi (Precision Plus Protein™ Standards Dual Color Protein Marker - BioRad, ABD) ve standart BSA çözeltisi, %4-12 Bis-Tris jele yüklendi. Yürütme tamponu (Tris/Glycine/SDS Buffer-10x, BioRad) ile 120 mV'de yaklaşık 60 dk boyunca yürütüldü. Jel, Coomassie Brillant Blue R250 boyası (Glentham Life Sciences, İngiltere) içeren metanol, asetik asit ve su karışımına batırılarak orbital karıştırıcıda gece boyunca çalkalanmaya bırakıldı ve böylece jelin boyanması sağlandı. Boyama işleminden sonra, jel, asetik asit, metanol ve su karışımı ile yıkanıp boyadan arındırıldı ve jelin üzerindeki protein bantlarının görüntüsü incelendi.

3.16. Hücre Kültürü Çalışmaları

Pasaj nosu 3 ile 8 arasındaki Calu-3 (ATCC® HTB-55™) ve pasaj nosu 7 ile 16 arasındaki A549 (ATCC® CCL-185™) hücre hatları, hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının sitotoksisitesini belirlemek amacıyla kullanıldı.

3.16.1. Calu-3 Hücre Kültürü Çalışmaları

Calu-3 hücreleri ile çalışırken besiyeri olarak EMEM (%88), FBS (%10) ve penisilin-streptomisin (%2) kullanılmıştır.

3.16.1.1. Calu-3 Hücrelerinin Hazırlanması

1) Sıvı azot tankında -196°C'de muhafaza edilen hücreler çıkartıldıve 37°C'deki su banyosunda kısa sürede çözülmesi sağlandı.

2) 15 mL'lik falkon tüplere 9 mL besiyeri konup üzerine 1 mL hücre süspansiyonu eklendi. Sonrasında, 1.100 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek ortamdaki DMSO'dan hücrenin arındırılması sağlandı.

3) Santrifüjden sonra besiyeri ortamı uzaklaçtırıldı ve hücrelerin üzerine 1 mL taze besiyeri konarak pipetasyonla homojen bir şekilde hücrenin dağılması sağlandı.

4) 25 cm^2lik hücre kültür kabına 9 mL besiyeri ve 1 mL hücre süspansiyonu konup invert mikroskopta hücreler kontrol edildikten sonra CO_2 etüvüne yerleştirildi.

5) İki günde bir ortam değiştirildi. Hücre kültür kabı her gün invert mikroskop ile kontrol edildi ve hücre doluluk oranı %70-80 olduğunda pasajlama işlemi yapıldı. Calu-3 Hücrelerinin Pasajlanması

6) Calu-3 hücrelerinin pasajlanabilmeleri için kullanılan hücre kültür kabının yüzeyinin en az %70'inin hücrelerle doldurulmuş olması gerekmektedir.

7) Hücre kültür kabındaki besiyeri steril pipet ile çekilerek uzaklaştırıldı. Sonrasında serumun tamamen uzaklaşması için fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile 2 kez yıkama yapıldı.

8) Yıkama işleminden sonra tripsin eklenerek 15 dakika boyunca 37°C'deki CO_2 inkübatöründe bekletildi.

9) İnkübatörden çıkarılan kültür kabındaki hücreler pipetle nazikçe çekilerek içinde besiyeri bulunan falkon tübe aktarıldı ve tripsinin etkisi nötralize edildi.

10) Hücre sayımı için 25 µl hücre süspansiyonu ayrıldı. Geri kalan hücre süspansiyonu 3.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilip üstte kalan sıvı uzaklaştırıldı .

11) Konsantrasyonu ayarlanan hücreler (20.000 hücre/cm^2), içine besiyeri konmuş hücre kültür kabına ekildi.

3.16.2. A549 Hücre Kültürü Çalışmaları

A549 hücreleri ile çalışırken besiyeri olarak DMEM (%89), FBS (%10) ve penislin-streptomisin (%1) kullanılmıştır.

3.16.2.1. A549 Hücrelerinin Hazırlanması

1) Sıvı azot tankında -196°C'de muhafaza edilen hücreler alınarak 37°C'deki su banyosunda kısa sürede çözülmesi sağlandı.

2) 15 ml'lik falkon tüplere 5 mL besiyeri konup üzerine 1 mL hücre süspansiyonu eklendi. 1.600 rpm'de 8 dakika boyunca santrifüj edilerek ortamdaki DMSO'dan hücrenin arındırılması sağlandı.

3) Santrifüjden sonra besiyeri pipetle çekilip atıldı. Hücrenin üzerine 1 mL taze besiyeri konarak pipetasyonla homojen bir şekilde hücrenin dağılması sağlandı.

4) 25 cm^2'lik hücre kültür kabına 9 mL besiyeri ve 1 mL hücre konup invert mikroskopta kontrol edildikten sonra CO_2 inkübatörüne yerleştirildi.

5) İki günde bir ortam değiştirildi. Hücre kültür kabı her gün invert mikroskop ile kontrol edilerek hücre doluluk oranı %80-90 olduğunda pasajlama yapıldı.

3.16.2.2. A549 Hücrelerinin Pasajlanması

1) A549 hücrelerinin pasajlanabilmeleri için kullanılan hücre kültür kabının yüzeyinin en az %90'nının hücrelerle dolu olması gerekmektedir.

2) Hücre kültür kabındaki besiyeri steril pipet ile çekilerek uzaklaştırıldı. Sonrasında serumun tamamen uzaklaşması için fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile 2 kez yıkama yapıldı.

3) Yıkama işleminden sonra tripsin eklenerek 5 dakika 37°C'deki CO_2 inkübatöründe bekletildi.

4) CO_2 inkübatöründen çıkarılan hücre kültür kabındaki hücreler pipetle nazikçe çekildi ve içinde besiyeri bulunan falkon tübe konarak tripsinin etkisi nötralize edildi.

5) Hücre sayımı için 25 µl hücre süspansiyonu ayrıldı. Geri kalan hücre süspansiyonu ise 3.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek üstte kalan sıvı uzaklaştırıldı.

6) Konsantrasyonu ayarlanan hücreler (20.000 hücre/cm^2), içine besiyeri konmuş hücre kültür kaplarına ekildi.

3.17. *İn vitro* Sitotoksisite Testi

Hazırlanan nanopartiküllerin güvenilirliğini değerlendirebilmek amacıyla Calu-3 ve A549 hücre hatları ile sitotoksisite testi gerçekleştirilmiştir. Sitotoksisite testinde kullanılan bir tetrazolyum tuzu olan 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT), hücre içine alınır ve canlı hücreler tarafından mitokondriyal dehidrojenaz enzimi ile indirgenerek mor formazon kristalleri meydana getirir. MTT testi adı verilen bu yöntem ile hücre canlılığı test edilir.

Tez kapsamında geliştirilen BSA yüklü TMC-CMC, CC-CMC ve CG-CMC nanopartikülleri ile TMC, CC, CG ve CMC polimer dispersiyonlarının in vitro sitotoksisitesi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla, A549 ya da Calu-3 hücreleri düz tabana sahip 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 20.000 hücre olacak şekilde ekildi. Bu hücreler 48 saat boyunca 37°C'de %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi. Nanopartiküller ve polimerler 5 ile 0.005 mg/mL konsantrasyon aralığında olacak şekilde EMEM ya da DMEM ile seyreltilerek hücrelerin üstüne ilave edildi. Her bir örnek 3 kez çalışıldı .2 saat 37°C'de %5 CO_2 içeren etüvde inkübasyondan sonra, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 200 µL taze besiyeri ve 50 µL MTT koyuldu. 4 saat boyunca 37°C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde bekletildikten sonra besiyeri ile MTT uzaklaştırıldı ve ve her bir kuyucuğa 200 µl DMSO konmuştur. 15 dakika 37°C'de %5 CO_2 içeren etüvde bekletildikten sonra 96 kuyucuklu plaka okuyucusunda 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu .

3.18. İmmünolojik Çalışmalar

İn vitro ve *ex vivo* deneylerden elde edilen bulgular değerlendirildikten sonra, *in vivo* çalışmalara polimer oranı 2:1 oranındaki TMC-CMC (T3) ve CC-CMC (C3) nanopartikül formülasyonları ile devam edilmesi kararlaştırıldı. Seçilen formülasyonlar 6-8 haftalık dişi BALB/c farelere intranazal veya subkütan yoldan uygulanarak immünizasyon çalışmaları yapıldı. Bu çalışma için, yiyecek ve içeceğe erişimi serbest olan 15 fare grubu (n=5) kullanıldı. Hayvan deneyleri için İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli izinler alındı. İlk ve destekleyici immünizasyon uygulamaları ve kan alma işlemleri dietil eter ile hafif anestezi altında gerçekleştirildi.

İlk 7 grup, 20 µg BSA antijeni yüklü CC-CMC nanopartikül dispersiyonu, TMC-CMC nanopartikül dispersiyonu, CC-BSA dispersiyonu, TMC-BSA dispersiyonu, CMC-BSA dispersiyonu, CpG ODN-BSA dispersiyonu ve BSA dispersiyonu intranazal olarak uygulandı. Son 7 grupta CpG-BSA dispersiyonu yerine Alum-BSA verilmesi dışında aynı formülasyonlar subkütan olarak verildi. Hayvanlara destekleme dozu (20 µg BSA antijenine eşdeğer formülasyonlar), 14. günde verildi. 15. grup ise negatif kontrol amaçlı kullanıldığı için hiç bir şekilde immünizasyon uygulanmamıştır. İmmünizasyon çalışma programı Tablo 3.1'de belirtilmiştir.

Tablo 3-1: İmmünizasyon Çalışma Programı

Deney Grubu	Formülasyon	Veriliş yolu	Veriliş Zamanı
IN-1	BSA yüklü CC-CMC nanopartikül dispersiyonu	intranazal	1. ve 14. gün
IN-2	BSA yüklü TMC-CMC nanopartikül dispersiyonu	intranazal	1. ve 14. gün
IN-3	CC-BSA dispersiyonu	intranazal	1. ve 14. gün
IN-4	TMC-BSA dispersiyonu	intranazal	1. ve 14. gün
IN-5	CMC-BSA dispersiyonu	intranazal	1. ve 14. gün
IN-6	CpG ODN-BSA dispersiyonu	intranazal	1. ve 14. gün
IN-7	BSA dispersiyonu	intranazal	1. ve 14. gün
SC-1	BSA yüklü CC-CMC nanopartikül dispersiyonu	subkütan	1. ve 14. gün
SC-2	BSA yüklü TMC-CMC nanopartikül dispersiyonu	subkütan	1. ve 14. gün
SC-3	CC-BSA dispersiyonu	subkütan	1. ve 14. gün
SC-4	TMC-BSA dispersiyonu	subkütan	1. ve 14. gün
SC-5	CMC-BSA dispersiyonu	subkütan	1. ve 14. gün
SC-6	Alum-BSA dispersiyonu	subkütan	1. ve 14. gün
SC-7	BSA dispersiyonu	subkütan	1. ve 14. gün
Kontrol	-	-	-

BSA: Sığır serum albumini; CMC: Karboksimetil kurdlan; CC: Kitosan klorür; CG: Kitosan glutamat; TMC: Trimetil kitosan; CpG ODN: sitozin-fosfat-guanin oligodeoksinükleotidi.

ELISA (Enzim İlişkili İmmünoadsorban Deneyi), 1960'lı yıllarda geliştirilmiştir. Bu deney, özgün bir antikor ile analiz edilecek madde (antijen veya protein) arasındaki reaksiyona dayanmaktadır. Bu çalışmada iki farklı ELISA yöntemi kullanılmıştır: sandviç ELISA ve indirek ELISA'dır. İndirek ELISA antikorların ölçümü için kullanılırken, sandviç ELISA sitokinlerin tespit edilmesinde kullanılmaktadır. Bu iki yöntem arasındaki temel fark, indirek ELISA plakası antijenle kaplandıktan sonra primer ve ardından sekonder antikor eklenmektedir. Sandviç ELISA'da ise plaka özgün bir antikorla kaplanır ve sonrasında analiz edilecek madde eklenmektedir. İlaveten, tespit etmek için önemli olan ikinci işaretli antikor eklenmektedir. Her iki deneyin sonunda da substrat ilavesi gerekmektedir. İndirek ELISA'daki antikor miktarı negatif kontrolle karşılaştırılarak ölçülürken sandviç ELISA'da kalibrasyon eğrisi gerekmektedir.

Farenin kuyruk veninden belirli zaman aralıklarında alınan (13, 21, 60, ve 253. gün)100 µl hacmindeki kan örneklerindeki antikor yanıtları (IgG, IgG_1 ve IgG_{2a}) ELISA analizi ile test edildi. *İn vivo* çalışmalar toplam 253 gün sürdü ve çalışmanın sonunda fareler servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek vajinal yıkama işlemleri mikropipet ile 100 µl soğuk PBS (pH 7,4) uygulanarak gerçekleştirildi ve vajinal yıkama çözeltilerinde ELISA testi ile sIgA düzeyleri ölçüldü.

BSA antijenine spesifik sitokinlerin analizi için, hayvanların dalakları çıkartıldı ve primer hücreler, %10 FBS, 20 mM L-glutamin, 105 U/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin ilave edilimiş RPMI 1640 besiyerinde izole edildi. Primer hücreler, BSA antijeni ile uyarıldıktan sonra salgılanan spesifik sitokin (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 ve IFN-γ) miktarı ELISA MAX Deluxe Set (Biolegend, ABD) kitleri ile tespit edildi .

3.18.1. Örneklerin Toplanması

Kan örnekleri kuyruk veninden (13., 21., ve 60. gün) ve periorbital venden (253. gün) toplandı .100 µl olarak toplanan kan örnekleri boş bir ependorf tübe konarak bir gece boyunca +4°C'de buzdolabında saklandı. Sonrasında kan örnekleri 15.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek kanın serum kısmı alınıp yeni ependorf tüplere yerleştirildi. Serum örnekleri analize kadar -20°C'de saklandı. Vajinal sıvılar ve dalaklar 253. günde alındı. Vajinal yıkamalar için enzim inhibitörü içeren (100 mM fenilmetilsülfonil florür) soğuk PBS kullanıldı. Vajina üç sefer 33 µl PBS ile mikropipet kullanarak yıkandı ve yıkama çözeltisi ependorf tüpte toplanıp buzda bekletildi. Sonrasında örnekler 15.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj edilen örneğin üst kısmından 50 µl alındı ve analiz edileceği zamana kadar -20°C'de bekletildi. Sakrife edilen farelerden çıkarılan dalaklar PBS içinde buzda bekletildi ve her bir gruptan elde edilen dalaklar primer dalak hücrelerinin elde edilmesi için bir araya getirildi.

3.18.2. Antikor Deneyleri

Serum örneklerinde antikor (IgG, IgG_1 ve IgG_{2a}) tayini ve vajinal sıvılarda sIgA tayini için indirekt ELISA yöntemi kullanılmış ve deney aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

1) 96 kuyucuklu plaka gece boyunca +4±1°C'de BSA antijeniyle kaplandı. PBS (pH 7.4) içindeki 100 µl 20 µg/mL BSA antijeni çözeltisi her bir kuyucuğa yerleştirildi.

2) Plakalar kaplandıktan sonra 3 defa PBST (%0.05 h/h Tween 20 içeren PBS) ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurutuldu.
3) Bütün kuyucuklar 100 µl %2 yağsız süt tozu içeren PBS ile 37°C'de 1 saat boyunca bloke edildi.
4) Yıkama ve kurutma basamağı tekrar edildi.
5) Uygun olarak seyreltilmiş antikor içeren (IgA için 1/2 diğer antikorlar 1/32 oranında) 100 µl serum eklenmiştir ve seri olarak seyreltilmiştir.
6) 96 kuyucuklu plaka 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
7) Yıkama ve kurutma basamağı tekrar edildi.
8) Kuyucuk başına 50 µl PBS (pH 7.4) ile 1/4000 oranında seyreltme yapılan IgG peroksidaz antifare, IgG_1 peroksidaz antifare, $IgG2_a$ peroksidaz antifare veya IgA peroksidaz antifare eklendi.
9) 96 kuyucuklu plaka 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
10) Yıkama ve kurutma basamağı tekrar edildi.
11) Kuyucuk başına 50 µl olacak şekilde ABTS ilave edildi.
12) 96 kuyucuklu plaka 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
13) Plakalar mikroplaka okuyucuya (Multiskan® Ex, Thermo Scientific) yerleştirildi ve her bir kuyucuğun absorbansı 405 nm'de okundu.
14) Antikor titreleri, negatif kontrol grubuna ait absorbanslar ile karşılaştırılarak hesaplandı.

3.18.3. İmmünolojik Çalışmalara alınan Farelerin Primer Dalak Hücrelerinin İzolasyonu

Farelerin sakrifiye edilmesinden sonra dalakları çıkarıldı ve buz banyosu içinde ki soğuk steril PBS'in içine yerleştirildi. Her bir immünizasyon grubuna ait hayvanların dalakları aynı yerde toplandı. Dalaklar, tek kullanımlık 70 µm hücre eleğinden 5 ml çalışma besiyeri (%89 RPMI 1640; %10 FBS; %1 penisilin-streptomisin) yardımı ile nazikçe ezilerek geçirildikten sonra, elde edilen hücre süspansiyonunun çökmesi için beş dakika beklendi ve üzerine 40 mL çalışma besiyeri ilave edildikten sonra 200 *g* kuvvetinde 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, üst sıvı kısım

uzaklaştırıldı. Hücre topluluğu 10 mL çalışma ortamı eklenerek tekrarsüspande edildi ve santrifüj işlemi aynı şartlarda tekrarlandı. Son santrifüj işleminin ardından hücreler 5 mL'lik çalışma besiyeri içinde dağıtıldı ve canlı hücre sayısı Tripan mavisi kullanılarak hemositometre ile tespit edildi. Primer dalak hücrelerinin konsantrasyonu çalışma besiyeri kullanılarak $5x10^6$ hücre/mL'ye ayarlandı.

3.18.4. Sitokin Analizi için Primer Dalak Hücrelerinin BSA Antijeni ile yeniden Uyarılması

Steril 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna, ilgili gruba ait primer dalak hücresi süspansiyonlarından 100'er µL ekildi. Üzerine ise 100'er µL 10 µg/mL konsantrasyonda BSA antijeni içeren çalışma besiyeri ilave edildi. Üstü kapatılan plakalar, 37°C de %5 CO_2 içeren inkübatöre yerleştirilerek 72 saat bekletildi. İnkübasyondan sonra, hücre kültüründeki üstte kalan sıvılar toplanıp 200 g kuvvetinde 10 dakika boyunca santrifüj edildi.

3.18.5. Sitokin Analizleri

Santrifüjden sonra üstte kalan sıvıda sandviç ELISA yöntemi kullanılarak yapılan sitokin (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 ve IFN-γ) analizine ait deney protokolü aşağıda verilmiştir.

1) Çalışılacak sitokini kendisine bağlayacak olan antikor PBS ile istenilen çalışma konsantrasyonuna seyreltildi. Hazırlanan antikor çözeltisinden 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna100 µL ilave edildi ve plakalar oda sıcaklığında gece boyunca antikor ile kaplandı.
2) Plakalar kaplandıktan sonra üç defa PBST çözeltisi ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurutuldu.
3) Plakaların her bir kuyucuğuna 300 µL reaktif seyreltici ilave edildi ve antikorları bloke etmek amacıyla oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
4) Yıkama ve kurutma basamağı tekrar edildi.
5) Plakaların her bir kuyucuğuna reaktif seyreltici içindeki standart ve örneklerden 100'er µL eklendi ve plakaların üstü kapatılarak 2 saat boyunca inkübe edildi.
6) Yıkama ve kurutma basamağı tekrar edildi.

7) Her bir kuyucuğa reaktif seyreltici ile seyreltilen tespit antikorundan 100'er µL ilave edildi ve plakaların üstü kapatılarak tekrar2 saat boyunca inkübe edildi.
8) Yıkama ve kurutma basamağı tekrar edildi.
9) Her bir kuyucuğa Streptavidin-HRP'nin çalışma çözeltisinden 100'er µL eklendi. Plakaların üstü kapatılarak oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi.
10) Yıkama ve kurutma basamağı tekrar edildi.
11) Her bişr kuyucuğa 100'er µL substrat çözeltisi ilave edildi ve 20 dakika daha inkübe edildi.
12) Her bir kuyucuğa 50 µL durdurma çözeltisi (2 N H_2SO_4) ilave edildi ve plakalar nazikçe çalkalanarak kuyucuklardaki ortmaın karışması sağlandı.
13) Hemen ardından, her bir kuyucuğun optik dansitesi mikro plaka okuyucu ile 450 ve 570 nm'de tespit edildi. Hesaplama esnasında 570 nm'deki okumalara ait değerler, 450 nm'dekinden her bir plakanın optik eksikliklerini kaldırmak için çıkarıldı.
14) Sitokin seviyeleri kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı.

3.19. İstatiksel Çalışmalar

Hayvan çalışmalarından elde edilen *in vivo* data Mann-Whitney U test kullanılarak istatistiksel analize tabi tutulmuştur. $p<0,05$ anlamlılık açısından gösterge olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. BSA Antijeninin Özelliklerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

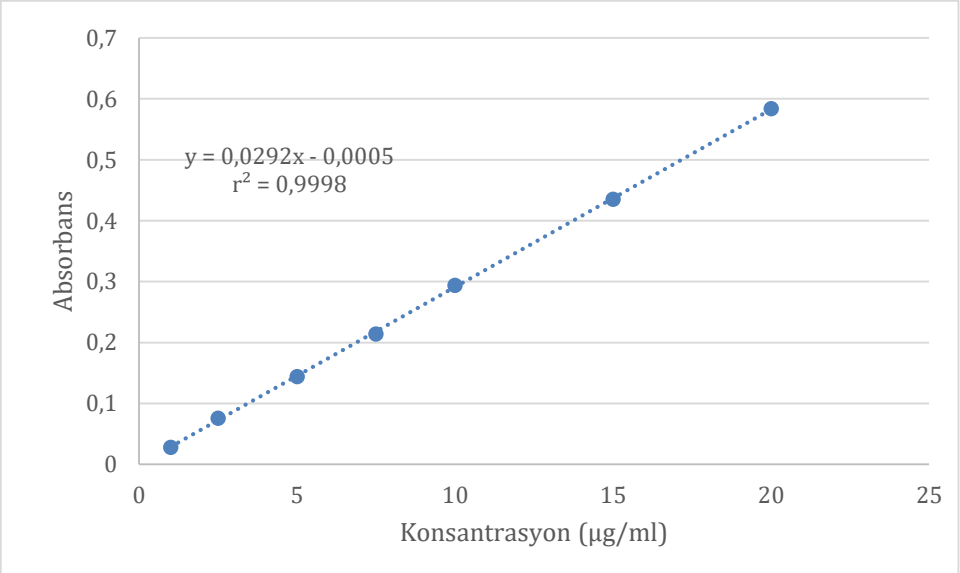
4.1.1. BSA Antijeninin UV Spektrumuna Ait Bulgular

BSA antijeninin sulu çözeltisinin, 200-600 nm aralığında UV-spektrofotometrede spektrumu alındığında, maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu (λ_{max}) 588 nm olarak bulunmuştur.

4.1.2. BSA Antijeninin Bradford Yöntemiyle Kalibrasyonunun Validasyonuna Ait Bulgular

4.1.2.1. Doğrusallık

BSA antijeninin Bölüm 3.1.3.1.'de açıklandığı şekilde yapılan çalışması sonrasında elde edilen standart eğri grafiği Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Standart eğriye ait parametreler Tablo 4.1'de ve standart eğrinin hazırlanmasında kullanılan ortalama absorbans (ABS_{ORT}), standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (%RSD) değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4-1: BSA antijeninin standart eğri grafiği

y= absorbans; x= konsantrasyon (µg/mL); r^2= determinasyon katsayısı

Tablo 4-1: BSA antijeninin standart eğrisine ait parametreler

Eğim	Kesişim	r^2
0,0292	0,0005	0,9998

Tablo 4-2: BSA antijeninin miktar tayini yönteminin doğrusallığına ait veriler

Konsantrasyon (μg/mL)	ABS_{ORT}	SD (±)	RSD (%)
1	0,028	0,0005	%1,75
2,5	0,076	0,001	%1,28
5	0,144	0,002	%1,39
7,5	0,214	0,003	%1,4
10	0,294	0,004	%1,36
15	0,435	0,004	%0,93
20	0,584	0,003	%0,52

4.1.2.2. Doğruluk

Üç farklı konsantrasyonda hazırlanan BSA antijen çözeltisinin altışer kez okuması yapılarak doğruluk çalışması gerçekleştirilmiştir. Her konsantrasyon için geri kazanım değeri (%), standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (%RSD) değeri Tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4-3: BSA antijeninin miktar tayini yönteminin doğruluğuna ait veriler (n=6)

Teorik Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama Pratik Konsantrasyon (µg/ml)	Geri Kazanım (%)	SD (±)	RSD (%)
5	4,87	97,4	1,283	1,32
7,5	7,41	98,8	1,179	1,19
10	9,83	98,3	1,267	1,29

4.1.2.3. Kesinlik

BSA antijeninin miktar tayininin kesinliğinin belirlenmesinde tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik parametreleri incelenmiştir. Bu bağlamda tekrarlanabilirlik testi için BSA antijen çözeltisinden üç farklı konsantrasyonda altışar kez okuma alınmıştır. Ölçümlere ait ortalama absorbans, konsantrasyon, standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (%RSD) değerleri Tablo 4.4'de verilmiştir. Ara kesinlik testi için ise birbirini takip eden iki günde üç farklı konsantrasyonda altışer kez okuma yapılmıştır. Ortalama konsantrasyon, standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (%RSD) değerleri Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4-4: BSA antijeninin miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirliğine ait veriler (n=6)

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Pratik Konsantrasyon (µg/mL)	SD (±)	RSD (%)
5	4,955	0,067	1,34
7,5	7,312	0,126	1,73
10	10,08	0,178	1,76

Tablo 4-5: BSA antijeninin miktar tayini yönteminin ara kesinliğine ait veriler (n=6)

Teorik Konsantrasyon (μg/mL)		Ortalama Pratik Konsantrasyon (μg/mL)	SD (±)	RSD (%)
5	1. gün	4,955	0,067	1,34
	2. gün	4,967	0,080	1,62
7,5	1. gün	7,312	0,126	1,73
	2. gün	7,506	0,116	1,54
10	1.gün	10,080	0,178	1,76
	2.gün	10,131	0,188	1,86

4.1.2.4. Özgünlük

Formülasyonda yer alan yardımcı maddelerin ayrı ayrı çözeltileri ve her bir boş nanopartikül formülasyonunun UV spektrofotometrede 200-650 nm aralığında spektrumları alınmış ve BSA antijen çözeltisinin maksimum absorbans gösterdiği 588 nm'de pik verip vermediğine bakılmıştır. Sonuç olarak kullanılan hiçbir maddenin ve nanopartikül formülasyonunun o dalga boyunda pik vermediği saptanmıştır.

4.1.2.5. Teşhis Limit (LOD) ve Miktar Tayini Limiti (LOQ)

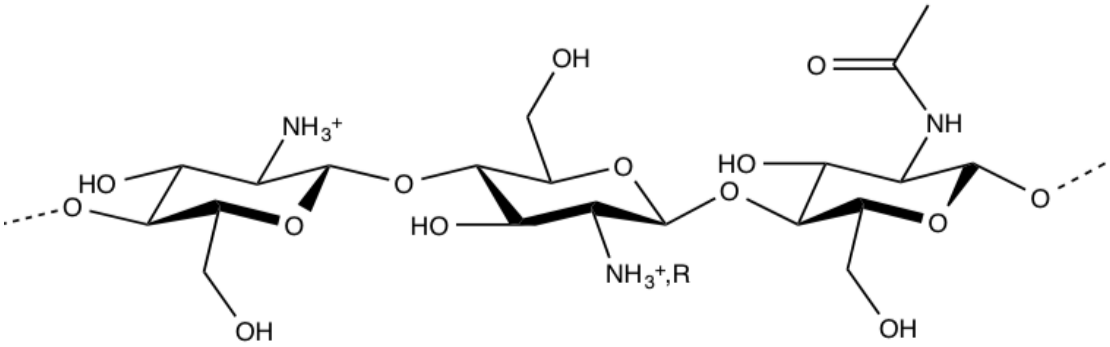
Yöntem 3.1.3.5. ve 3.1.3.6'da bahsedildiği şekilde hesaplanarak LOD ve LOQ değerleri bulunmuştur.

LOD= 0,205 μg/mL

LOQ= 0,685 μg/mL

4.2. Kitosan Klorür (CC) ve Kitosan Glutamat (CG) Hazırlanması

Yöntem 3.2'ye göre hazırlanan polimerler %80'nin üzerinde verimle elde edilmiştir. Elde edilen CC ve CG şekil 4-2'de gösterilmiştir.

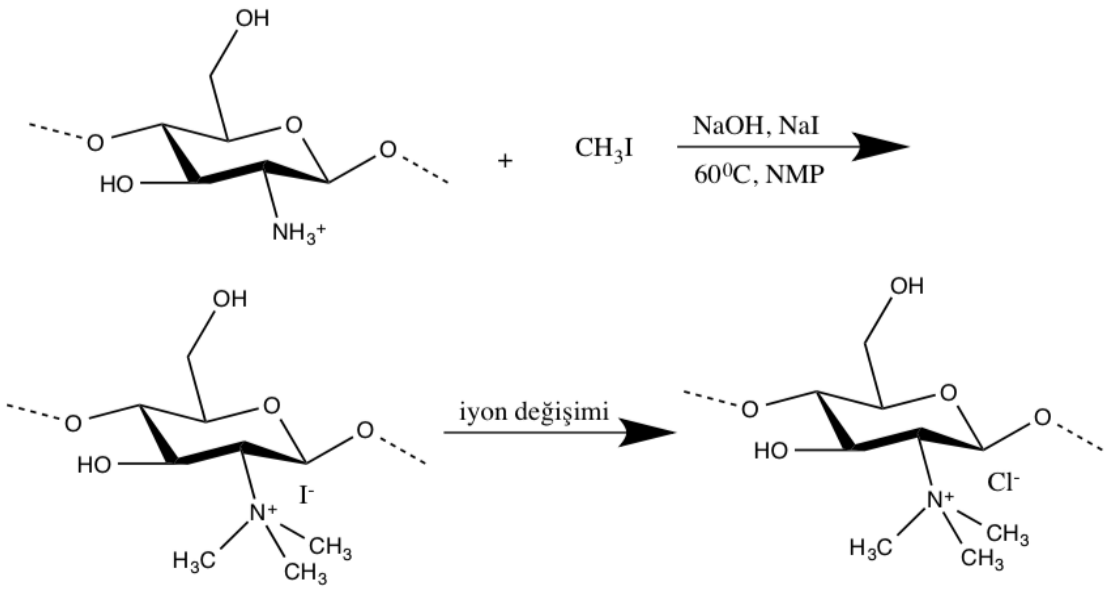


Şekil 4-2: Kitosan klorür ve kitosan glutamat'ın şekilsel gösterimi

R eğer -Cl ise Kitosan Klorür; R eğer –$OOCCH_2CH_2CHNHCOOH$ ise Kitosan Glutamat'tır.

4.3. *N*-Trimetil Kitosan Klorür (TMC) Sentezi

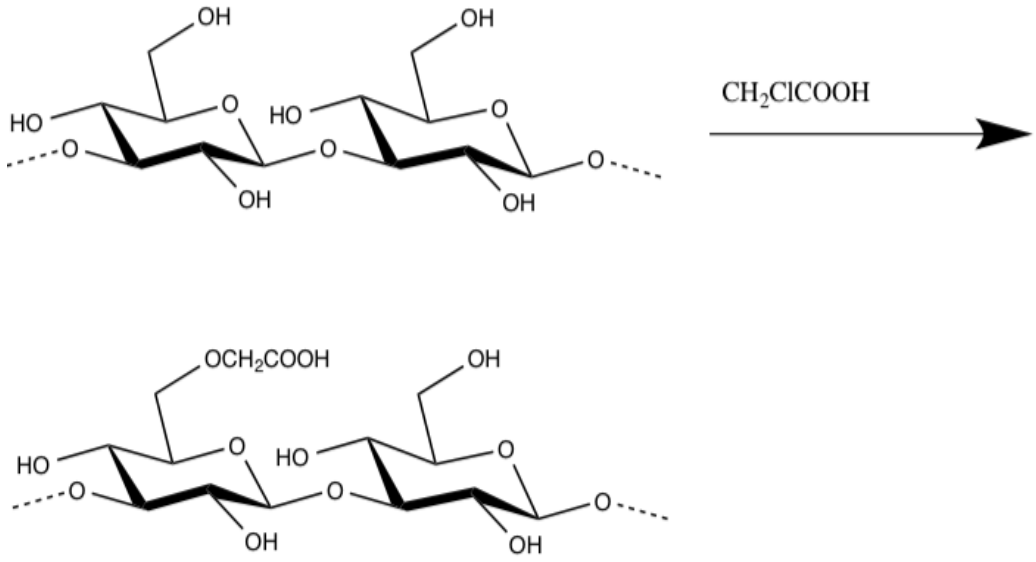
Yöntem 3.3.'te bahsedildiği şekilde TMC'nin sentezi iki aşamalı olarak yapılmıştır. TMC'nin sentez reaksiyonu Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4-3: TMC'nin sentez reaksiyonu

4.4. Karbosimetil Kurdlan (CMC) Sentezi

Yöntem 3.4.'te anlatıldığı şekilde CMC sentezi yapılmıştır. Kurdlanın karboksimetilasyonu sonucu oluşan CMC'nin sentez reaksiyonu Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



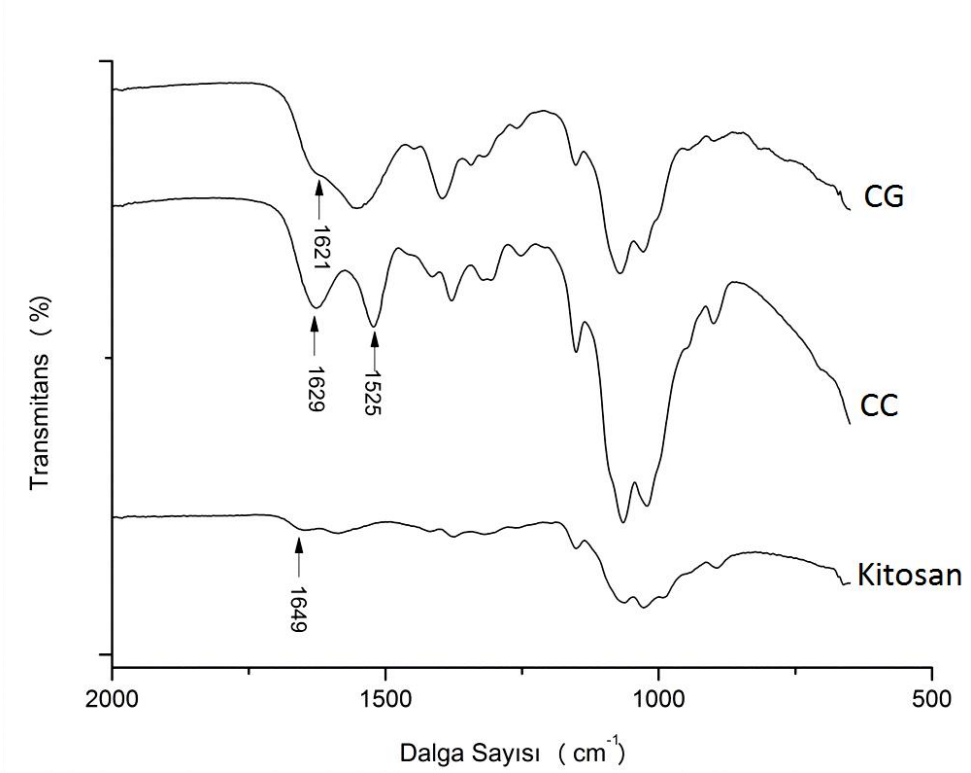
Şekil 4-4: CMC'nin sentez reaksiyonu

4.5. Sentezlenen Polimerlerin Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrometresi ile Analizi

Yöntem 3.5.'te bahsedildiği şekilde sentezlenen polimerlerin FT-IR spektrumları elde edilmiştir.

4.5.1. Kitosan Klorür ve Kitosan Glutamatın FT-IR Spektrometresi ile Analizi

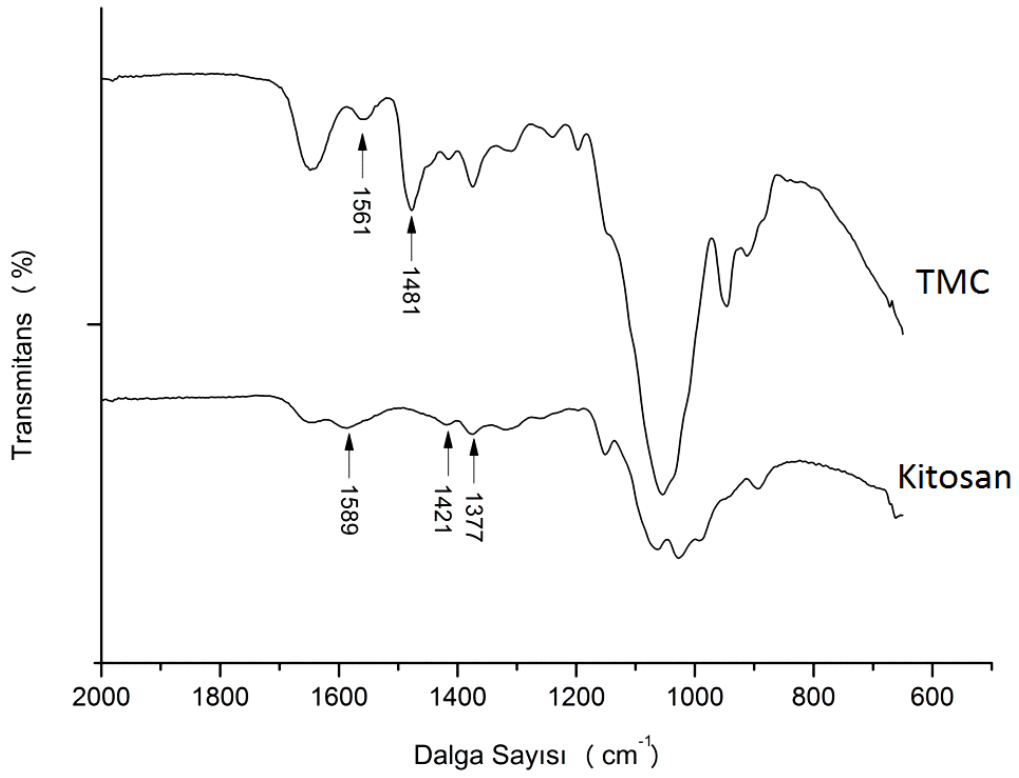
Şekil 4.5'de kitosan, CC ve CG'ye ait FT-IR spektrumları verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi, kitosanın yapısındaki amino gruplarına (NH_2) ait maksimumu 1649 cm^{-1}'de bulunan karakteristik yaygın pikin, CC'ye ait spektrumda kaybolarak 1629 cm^{-1} ve 1525 cm^{-1}'de iki yeni keskin pik olarak görülmesi bu reaksiyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Yine, CG'ye ait FT-IR spektrumunda, kitosanın NH_2 gruplarına ait 1649 cm^{-1}'de bulunan karakteristik pikin kaybolarak 1621 cm^{-1}'de omuz şeklinde görülmesi, kitosandan CG elde reaksiyonunun gerçekleştiğini göstermektedir (Orienti ve ark. 2002).



Şekil 4-5: Kitosan, Kitosan Klorür (CC) ve Kitosan Glutamat (CG)'a ait FTIR Spektrası

4.5.2. *N*-Trimetil Kitosanın FT-IR Spektrometresi ile Analizi

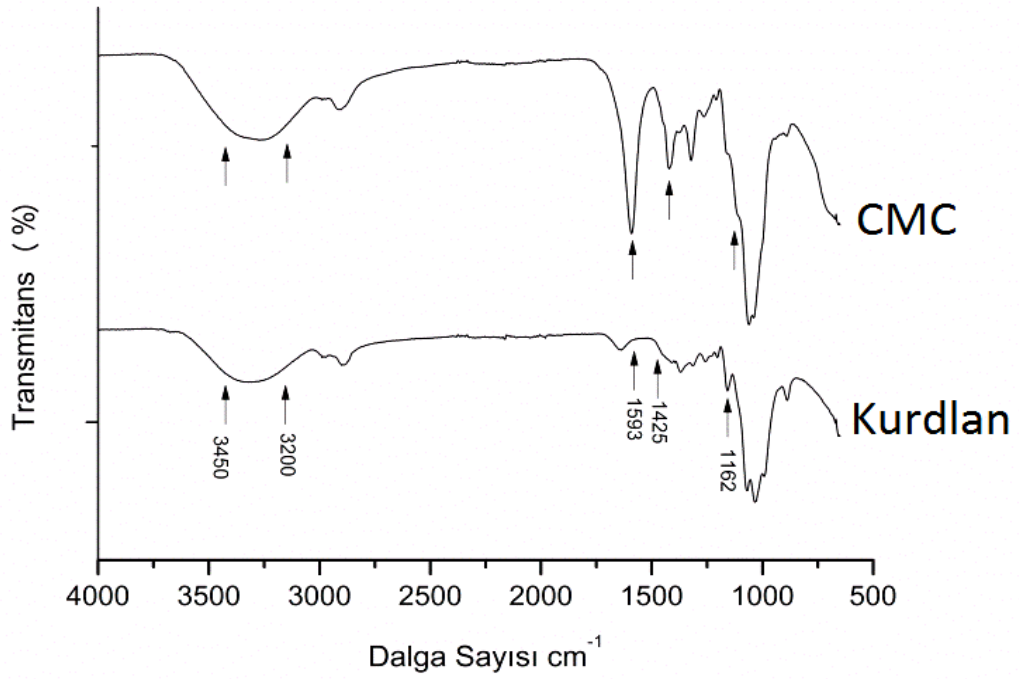
Şekil 4.6'da kitosan ve TMC'ye ait FT-IR spektrumu verilmiştir. Kitosan ait spektrumda, 1589 cm^{-1}'de kitosanın yapısında bulunan N-H bağlarına ait yaygın pik ve 1421-1377 cm^{-1} aralığında bulunan C-N bağının gerilme titreşiminden ileri gelen pikler görülmektedir (Mourya ve Inamdar 2009). TMC'ye ait FT-IR spektrumunda ise, kitosandan farklı olarak 1481 cm^{-1}'de metil gruplarına ait asimetrik gerilme titreşimine ait keskin pikin görülmesi, kitosanın yapısındaki N-H bağlarına ait pikin (1589 cm^{-1}'de görülen) TMC'de 1561 cm^{-1}'e kayması, kitosandan TMC elde reaksiyonunun gerçekleştiğini göstermektedir (Mourya ve Inamdar 2009; Jia ve ark. 2001; Xu ve ark. 2010).



Şekil 4-6: Kitosan ve *N*-Trimetil Kitosan (TMC)'a ait FTIR spektrası

4.5.3. Karboksimetil Kurdlanın FT-IR Spektrometresi ile Analizi

Şekil 4.7'de kurdlan ve CMC'ye ait FT-IR spektrumu verilmiştir. Kurdlana ait spektrumda, 3200-3450 cm^{-1} aralığında (maks. 3320 cm^{-1}) karakteristik absorpsiyon tepeleri, , 1170-1080 cm^{-1} aralığında kurdlanın yapısında bulunan glukosidik halkaya ait derin ve yaygın pik ve 1162 cm^{-1}'de metilol grubuna ait serbest OH gruplarının C-O bağının gerilme titreşimine ait pik görülmektedir (Gök 2008). CMC'ye ait FT-IR spektrumunda ise, kurdlandan farklı olarak, 1593 cm^{-1} ve 1425 cm^{-1} de graft zincirdeki COO^- (karboksilat) gruplarına ait sırasıyla asimetrik ve simetrik gerilme titreşimine ait absorpsiyon tepelerinin bulunması ve kurdlanın metilol grubuna ait serbest OH gruplarının C-O bağının gerilme titreşimine ait 1162 cm^{-1}'deki pikin kaybolması, kurdlandan CMC elde reaksiyonunun gerçekleştiğini göstermektedir (Gao ve ark. 2008).

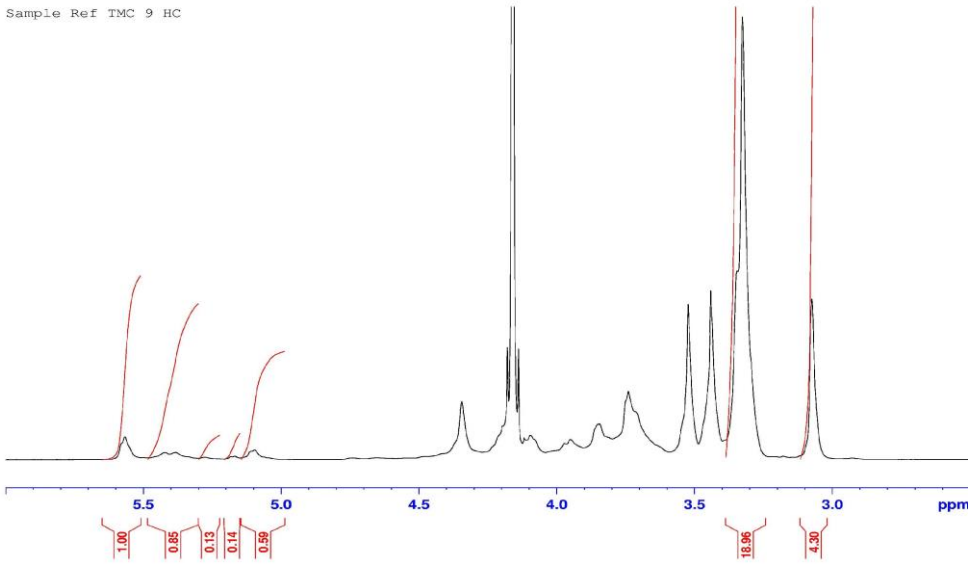


Şekil 4-7: Kurdlan ve Karboksimetil Kurdlan (CMC)'a ait FTIR spektrası

4.6. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektrometrisi ile TMC ve CMC'nin Analizi

4.6.1. *N*-Trimetil Kitosanın ^{1}H-NMR Spektrometrisi ile Analizi

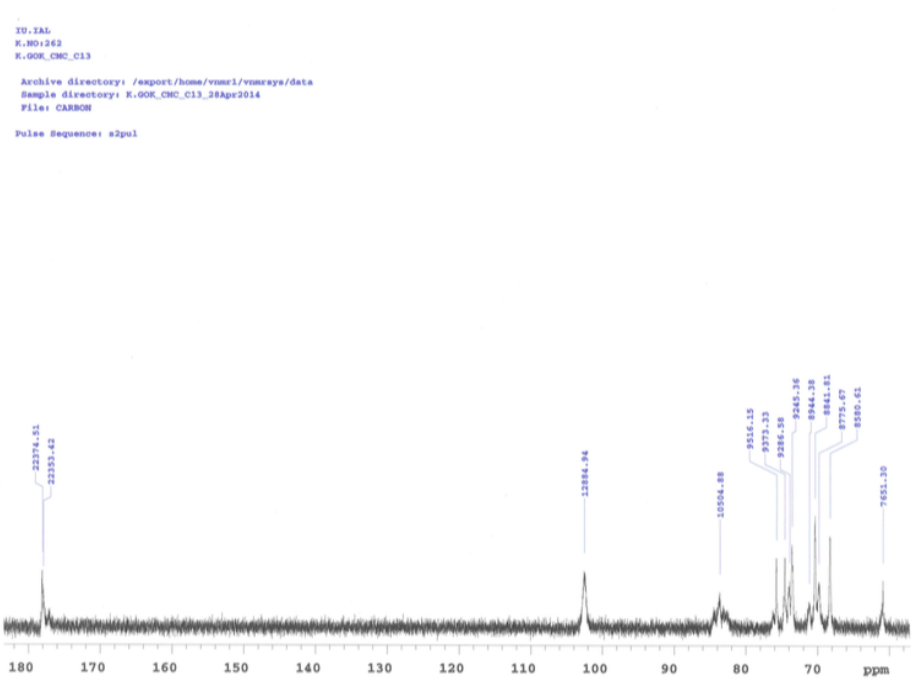
TMC'ye ait ^{1}H-NMR spektrumu Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4-8: TMC'nin ^{1}H-NMR spektrumu

4.6.2. Karboksimetil Kurdlanın ^{13}C-NMR Spektrometresi ile Analizi

CMC'ye ait ^{13}C-NMR spektrası Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4-9: CMC'nin NMR spektrumu

4.7. Farklı Hazırlama Ortamlarının Nanopartikül Formülasyonlarına Etkisi

Fosfat tampon çözeltisi (PBS pH 7.4), izotonik sodyum klorür çözeltisi (%0.9) ya da suda farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan CC-CMC, CG-CMC ve TMC-CMC nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı (PDI) ve zeta potansiyeli ölçümlerine ait sonuçları sırasıyla Tablo 4.6, Tablo 4.7 ve Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4-6: Farklı ortamlardaki CC-CMC nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyeli sonuçları

			PBS (pH 7,4)			Salin çözeltisi			Su		
F	**CC**	**CMC**	**Boyut (nm±SD)**	**PDI ±SD**	**ZP (mV±SD)**	**Boyut (nm±SD)**	**PDI ±SD**	**ZP (mV±SD)**	**Boyut (nm±SD)**	**PDI ±SD**	**ZP (mV±SD)**
C4	**1**	**1**	Agregasyon Gözlendi			Agregasyon Gözlendi			Agregasyon Gözlendi.		
C3	**1**	**0,5**	Agregasyon Gözlendi.			245±2,3	0,203± 0,013	20,8±0,6	239±1,6	0,236± 0,009	48,7±0,4
C5	**1,5**	**0,5**	Agregasyon Gözlendi.			262,8±4,9	0,228± 0,028	23,3±0,5	307,3±7,0	0,364± 0,018	53,3±0,6
C8	**2**	**0,5**	Agregasyon Gözlendi.			271,3±3,8	0,238± 0,009	26,1±0,8	405±3,4	0,275± 0,009	51,9±0,6
C12	**2,5**	**0,5**	Agregasyon Gözlendi.			277,7±5,7	0,272± 0,015	28,5±0,9	482,3±11,5	0,385± 0,048	54,2±0,9

F: Formülasyon; CC: Kitosan klorür (mg/mL); CMC: Karboksimetil kurdlan (mg/mL) Boyut: Partikül büyüklüğü (nm±SD) PDI: Polidispersite indeksi ZP: Zeta potansiyeli (mV±SD)

Tablo 4-7: Farklı ortamlardaki CG-CMC nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyeli sonuçları

			PBS (pH 7,4)			Salin çözeltisi			Su		
F	**CG**	**CMC**	**Boyut (nm±SD)**	**PDI ±SD**	**ZP (mV±SD)**	**Boyut (nm±SD)**	**PDI ±SD**	**ZP (mV±SD)**	**Boyut (nm±SD)**	**PDI ±SD**	**ZP (mV±SD)**
G4	**1**	**1**	Agregasyon Gözlendi.			Agregasyon Gözlendi.			Agregasyon Gözlendi.		
G3	**1**	**0,5**	Agregasyon Gözlendi.			229,4±6,7	0,197± 0,023	17,4±0,6	Agregasyon Gözlendi.		
G5	**1,5**	**0,5**	Agregasyon Gözlendi.			244,3±2,8	0,209± 0,016	20,2±0,5	299,3±2,4	0,209± 0,007	36,1±0,2
G8	**2**	**0,5**	Agregasyon Gözlendi.			251,1±5,4	0,224± 0,032	21,6±0,8	288,5±0,6	0,222± 0,01	42,9±0,4
G12	**2,5**	**0,5**	Agregasyon Gözlendi.			258,2±8,1	0,234± 0,006	23,5±0,4	443,4±16,9	0,206± 0,002	44,7±0,7

F: Formülasyon CG: Kitosan Glutamat 9 Cp (mg/mL) CMC: Karboksimetil kurdlan (mg/mL) Boyut: Partikül büyüklüğü (nm±SD) PDI: Polidispersite indeksi ZP: Zeta potansiyeli (mV±SD)

Tablo 4-8: Farklı ortamlardaki TMC-CMC nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyeli sonuçları

			PBS (pH 7,4)			Salin çözeltisi			Su		
F	**TMC**	**CMC**	**Boyut (nm±SD)**	**PDI ±SD**	**ZP (mV±SD)**	**Boyut (nm±SD)**	**PDI ±SD**	**ZP (mV±SD)**	**Boyut (nm±SD)**	**PDI ±SD**	**ZP (mV±SD)**
T4	**1**	**1**	Agregasyon Gözlendi.			Agregasyon Gözlendi.			Agregasyon Gözlendi.		
T3	**1**	**0,5**	Agregasyon Gözlendi.			Agregasyon Gözlendi.			211±3,6	0,194± 0,015	40,9±0,3
T5	**1,5**	**0,5**	231,6±2,8	0,220± 0,013	14,8±0,3	428,8±3,6	0,460± 0,056	18,1±0,6	319,1±3,9	0,252± 0,007	49,1±0,9
T8	**2**	**0,5**	210,3±1,3	0,213± 0,011	18,2±1,2	260±2,4	0,230± 0,025	19,6±0,8	404,8±6,4	0,264± 0,012	53,3±0,4

F: Formülasyon TMC: *N*-Trimetil kitosan 9 Cp (mg/mL); CMC: Karboksimetil kurdlan (mg/mL) Boyut: Partikül büyüklüğü (nm±SD); PDI: Polidispersite indeksi; ZP: Zeta potansiyeli (mV±SD)

4.8. CC-CMC, CG-CMC ve TMC-CMC Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

4.8.1. CC-CMC Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğü, Büyüklük Dağılımı, Zeta Potansiyeli ve Enkapsülasyon Etkinliği Sonuçları

CC-CMC nanopartiküller boş veya 7,5 μg/mL BSA yüklü olarak hazırlamıştır. Hazırlandıktan sonra nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyelleri ölçümüştür. Boş ve BSA yüklü nanopartiküllerin karşılaştırmalı olarak partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı (PDI) ve zeta potansiyeli verileri Tablo 4.9'da belirtilmiştir.

Tablo 4-9: Boş ve BSA yüklü CC-CMC nanopartiküllerinin karşılatırmalı Partikül Büyüklüğü, Büyüklük Dağılımı, ve Zeta potansiyeli verileri

F	CC (mg/mL)	CMC (mg/mL)	Boş CC-CMC nanopartikülleri			BSA yüklü CC-CMC nanopartikülleri		
			Boyut (nm±SD)	PDI±SD	ZP (mV±SD)	Boyut (nm±SD)	PDI±SD	ZP (mV±SD)
C1	0,5	0,25	208,6±2,3	0,173±0,008	33,1±2,2	188,4±1,3	0,206±0,018	36,2±0,7
C2	0,5	0,5	Agregasyon Gözlendi.					
C3	1	0,5	289,8±3,2	0,323±0,053	44,4±0,5	239±1,6	0,236±0,009	48,7±0,4
C4	1	1	Agregasyon Gözlendi.					
C5	1,5	0,5	330±10,8	0,268±0,030	49,4±0,5	307,3±6,9	0,364±0,018	53,3±0,6
C6	1,5	1	407±0,5	0,456±0,010	38,7±0,5	376,1±3,4	0,345±0,039	38,7±0,7
C7	1,5	1,5	Agregasyon Gözlendi.					
C8	2	0,5	432±3,7	0,369±0,040	52±0,4	405±3,4	0,275±0,009	51,9±0,6
C9	2	1	458±6,0	0,368±0,039	45,9±0,3	453,1±6,1	0,383±0,024	48,3±0,3
C10	2	1,5	427,2±4,5	0,418±0,015	35,5±1,0	398,4±3,1	0,474±0,016	34,7±0,5
C11	2	2	Agregasyon Gözlendi.					
C12	2,5	0,5	497,2±9,9	0,310±0,049	54,8±0,5	482,3±11,5	0,385±0.048	54,2±0,9
C13	2,5	1	568,4±16,5	0,433±0,007	50,9±0,9	562,2±23,2	0,407±0,032	50,5±0,8
C14	2,5	1,5	627,1±30,3	0,564±0,106	46,1±0,8	615,7±8,8	0,475±0,034	44,4±0,4
C15	2,5	2	568,5±12,9	0,609±0,134	34,4±0,5	553,4±17,3	0,627±0,121	32,5±0,7
C16	2,5	2,5	Agregasyon Gözlendi.					

F: Formülasyon; CC: Kitosan klorür 9 Cp (mg/mL); CMC: Karboksimetil kurdlan (mg/mL); Boyut: Partikül büyüklüğü (nm±SD); PDI: Polydispersite indeksi; ZP: Zeta potansiyeli (mV±SD).

7,5 µg/mL BSA yüklü CC-CMC nanopartiküllerine ait partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı (PDI), zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği ve üretim verimine ait veriler Tablo 4.10'da belirlenmiştir.

Tablo 4-10: BSA yüklü CC-CMC nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği ve üretim verimine ait veriler

F	CC (mg/mL)	CMC (mg/mL)	Boyut (nm±SD)	PDI±SD	ZP (mV±SD)	Verim (%)	E.E.
C1	0,5	0,25	188,4±1,3	0,206±0,018	36,2±0,7	55,48±6,5	78,33±9,8
C2	0,5	0,5	Agregasyon Gözlendi.				
C3	1	0,5	239±1,6	0,236±0,009	48,7±0,4	68,73±9,6	89±5,9
C4	1	1	Agregasyon Gözlendi.				
C5	1,5	0,5	307,3±6,9	0,364±0,018	53,3±0,6	52,10±7,2	82±6,8
C6	1,5	1	376,1±3,3	0,345±0,039	38,7±0,7	50,72±8,5	48,33±8,7
C7	1,5	1,5	Agregasyon Gözlendi.				
C8	2	0,5	405±3,4	0,275±0,009	51,9±0,6	45,94±8,1	80±9
C9	2	1	453,1±6,0	0,383±0,024	48,3±0,4	43,97±9,3	54,16±5,2
C10	2	1,5	398,4±3,2	0,474±0,016	34,7±0,5	54,91±5,6	31,66±9,6
C11	2	2	Agregasyon Gözlendi.				
C12	2,5	0,5	482,3±11,5	0,385±0.048	54,2±0,9	43,31±12,3	75,62±7,5
C13	2,5	1	562,2±23,3	0,407±0,032	50,5±0,8	48,04±5,8	50,21±8,4
C14	2,5	1,5	615,7±8,8	0,475±0,034	44,4±0,4	61,08±5,4	61,66±5,3
C15	2,5	2	553,4±17,3	0,627±0,121	32,5±0,7	59,39±13,5	40±7,4
C16	2,5	2,5	Agregasyon Gözlendi.				

F: Formülasyon; CC: Kitosan klorür 9 Cp (mg/mL); CMC: Karboksimetil kurdlan (mg/mL); Boyut: Partikül büyüklüğü (nm±SD); PDI: Polydispersite İndeksi; ZP: Zeta potansiyeli (mV±SD); E.E. : Enkapsülasyon etkinliği (%±SD)

4.8.2. CG-CMC Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğü, Büyüklük Dağılımı, Zeta Potansiyeli, Enkapsülasyon Etkinliği ve Üretim Verimine Sonuçları

CG-CMC nanopartikülleri boş veya 7,5 μg/mL BSA yüklü olarak hazırlanmıştır. Hazırlandıktan sonra nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyelleri ölçülmüştür. Boş ve BSA yüklü nanopartiküllerin karşılaştırmalı olarak partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı (PDI) ve zeta potansiyeli verileri Tablo 4.11'de belirtilmiştir.

Tablo 4-11: Boş ve BSA yüklü CG-CMC nanopartiküllerinin karşılatırmalı boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli verileri

F	CG (mg/mL)	CMC (mg/mL)	Boş CG-CMC nanopartikülleri			BSA yüklü CG-CMC nanopartikülleri		
			Boyut (nm±SD)	PDI±SD	ZP (mV±SD)	Boyut (nm±SD)	PDI±SD	ZP (mV±SD)
G1	0,5	0,25	Agregasyon Gözlendi.					
G2	0,5	0,5	Agregasyon Gözlendi.					
G3	1	0,5	Agregasyon Gözlendi.					
G4	1	1	Agregasyon Gözlendi.					
G5	1,5	0,5	271,3±1,7	0,182±0,015	31,6±0,5	299,3±2,4	0,209±0,007	36,1±0,3
G6	1,5	1	Agregasyon Gözlendi.					
G7	1,5	1,5	Agregasyon Gözlendi.					
G8	2	0,5	315,3±5,1	0,222±0,020	36,3±0,2	288,5±0,6	0,222±0,01	42,9±0,5
G9	2	1	225,1±2,8	0,199±0,037	17±0,4	282,0±5,9	0,281±0,033	24,4±0,4
G10	2	1,5	Agregasyon Gözlendi.					
G11	2	2	Agregasyon Gözlendi.					
G12	2,5	0,5	353,7±0,9	0,215±0,008	38,9±0,5	443,4±16,9	0,206±0,002	44,7±0,7
G13	2,5	1	416,8±11,1	0,396±0,016	29,5±0,8	421,6±6,2	0,287±0,006	35,6±0,8
G14	2,5	1,5	Agregasyon Gözlendi.					
G15	2,5	2	Agregasyon Gözlendi.					
G16	2,5	2,5	Agregasyon Gözlendi.					

F: Formülasyon; CG: Kitosan glutamat 9 Cp (mg/mL); CMC: Karboksimetil kurdlan (mg/mL); Boyut: Partikül büyüklüğü (nm±SD); PDI: Polydispersite indeksi; ZP: Zeta potansiyeli (mV±SD).

7,5 µg/mL BSA yüklü CG-CMC nanopartiküllerine ait partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı (PDI), zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği ve üretim verimine ait veriler Tablo 4.12'de belirlenmiştir.

Tablo 4-12: BSA yüklü CG-CMC nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı (PDI), zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği ve üretim verimine ait veriler

F	CG (mg/mL)	CMC (mg/mL)	Boyut (nm±SD)	PDI±SD	ZP (mV±SD)	Verim (%)	Enkapsülasyon Etkinliği ±SD
G1	0,5	0,25	Agregasyon Gözlendi.				
G2	0,5	0,5	Agregasyon Gözlendi.				
G3	1	0,5	Agregasyon Gözlendi.				
G4	1	1	Agregasyon Gözlendi.				
G5	1,5	0,5	299,3±2,4	0,209±0,007	36,1±0,3	50,72±6,4	81,27±5,3
G6	1,5	1	Agregasyon Gözlendi.				
G7	1,5	1,5	Agregasyon Gözlendi.				
G8	2	0,5	288,5±0,6	0,222±0,01	42,9±0,5	32±5,7	76,32±7,2
G9	2	1	282,0±5,9	0,281±0,033	24,4±0,4	52,28±4.3	47,83±12,3
G10	2	1,5	Agregasyon Gözlendi.				
G11	2	2	Agregasyon Gözlendi.				
G12	2,5	0,5	443,4±16,9	0,206±0,002	44,7±0,7	49,01±7,4	47,83±9,5
G13	2,5	1	421,6±6,2	0,287±0,006	35,6±0,8	43,97±6,5	62,88±6,9
G14	2,5	1,5	Agregasyon Gözlendi.				
G15	2,5	2	Agregasyon Gözlendi.				
G16	2,5	2,5	Agregasyon Gözlendi.				

F: Formülasyon; CG: Kitosan glutamat 9 Cp (mg/mL); CMC: Karboksimetil kurdlan (mg/mL); Boyut: Partikül büyüklüğü (nm±SD); PDI: Polydispersite indeksi; ZP: Zeta potansiyeli (mV±SD); E.E. : Enkapsülasyon etkinliği (%±SD)

4.8.3. TMC-CMC Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğü, Büyüklük Dağılımı, Zeta Potansiyeli, Enkapsülasyon Etkinliği ve Üretim Verimine ait Sonuçlar

TMC-CMC nanopartikülleri boş veya 7,5 µg/mL BSA yüklü olarak hazırlanmıştır. Hazırlandıktan sonra nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyelleri ölçülmüştür. Boş ve BSA yüklü nanopartiküllerin karşılaştırmalı olarak partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı (PDI) ve zeta potansiyeli verileri Tablo 4.13'de belirtilmiştir.

Tablo 4-13: Boş ve BSA yüklü TMC-CMC nanopartiküllerinin karşılatırmalı partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı, ve Zeta potansiyeli verileri

F	TMC (mg/mL)	CMC (mg/mL)	Boş TMC-CMC nanopartikülleri			BSA yüklü TMC-CMC nanopartikülleri		
			Boyut (nm±SD)	PDI±SD	ZP (mV±SD)	Boyut (nm±SD)	PDI±SD	ZP (mV±SD)
T1	0,5	0,25	159,9±2,6	0,174±0,023	35,5±1,4	153,2±0,5	0,196±0,014	37,2±1,1
T2	0,5	0,5	Agregasyon Gözlendi.					
T3	1	0,5	226,3±2,5	0,188±0,021	42,4±1,2	211±3,6	0,194±0,015	40,9±0,3
T4	1	1	Agregasyon Gözlendi.					
T5	1,5	0,5	315,4±6,2	0,221±0,010	49,2±0,8	319,1±3,9	0,252±0,007	49,1±0,9
T6	1,5	1	279±6,2	0,383±0,013	31,4±0,5	226,9±1,9	0,228±0,006	33,9±0,6
T7	1,5	1,5	Agregasyon Gözlendi.					
T8	2	0,5	411,7±9,8	0,258±0,007	54,2±1,0	404,8±6,4	0,264±0,012	53,3±0,4
T9	2	1	287,7±2,6	0,253±0,011	40±0,5	333±2,9	0,367±0,017	43,3±0,9
T10	2	1,5	245,7±14,3	0,357±0,013	22,7±0,6	215,9±5,2	0,323±0,049	23,5±0,6
T11	2	2	Agregasyon Gözlendi.					
T12	2,5	0,5	497±6,2	0,269±0,023	56,2±0,4	473,8±6,4	0,251±0,015	54,8±0,6
T13	2,5	1	465,8±5,1	0,451±0,005	47,3±0,3	444,7±3,3	0,433±0,030	47,2±3,7
T14	2,5	1,5	289,8±2,2	0,356±0,012	34,6±0,9	271±4,1	0,318±0,037	32,9±0,4
T15	2,5	2	Agregasyon Gözlendi.					
T16	2,5	2,5	Agregasyon Gözlendi.					

F: Formülasyon; TMC: *N*-Trimetil kitosan 9 Cp (mg/mL); CMC: Karboksimetil kurdlan (mg/mL); Boyut: Partikül büyüklüğü (nm±SD); PDI: Polydispersite indeksi; ZP: Zeta potansiyeli (mV±SD).

7,5 µg/mL BSA yüklü TMC-CMC nanopartiküllerine ait partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği ve üretim verimine ait veriler Tablo 4.14'de belirlenmiştir.

Tablo 4-14: BSA yüklü TMC-CMC nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği ve üretim verimine ait veriler

F	TMC (mg/mL)	CMC (mg/mL)	Boyut (nm±SD)	PDI±SD	ZP (mV±SD)	Verim (%)	E.E. (%)
T1	0,5	0,25	153,2±0,5	0,196±0,014	37,2±1,1	62,02±2,5	88,17±3,8
T2	0,5	0,5	Agregasyon Gözlendi.				
T3	1	0,5	211±3,6	0,194±0,015	40,9±0,3	53,94±3,7	89,78±4,3
T4	1	1	Agregasyon Gözlendi.				
T5	1,5	0,5	319,1±3,9	0,252±0,007	49,1±0,9	35,68±3,2	78,79±2,8
T6	1,5	1	226,9±1,9	0,228±0,006	33,9±0,5	56,46±1,5	82,64±4,7
T7	1,5	1,5	Agregasyon Gözlendi.				
T8	2	0,5	404,8±6,4	0,264±0,012	53,3±0,4	25,71±2,1	75,57±2,6
T9	2	1	333±2,9	0,367±0,017	43,3±0,9	50,6±1,3	85,11±3,2
T10	2	1,5	215,9±5,2	0,323±0,049	23,5±0,5	66,15±3,6	76,95±5,6
T11	2	2	Agregasyon Gözlendi.				
T12	2,5	0,5	473,8±6,4	0,251±0,015	54,8±0,5	22,64±2,3	85,7±4,5
T13	2,5	1	444,7±3,2	0,433±0,030	47,2±3,7	39,03±3,8	83,47±3,4
T14	2,5	1,5	271±4,1	0,318±0,037	32,9±0,4	55,85±4,4	81,86±4,3
T15	2,5	2	Agregasyon Gözlendi.				
T16	2,5	2,5	Agregasyon Gözlendi.				

F: Formülasyon; TMC: *N*-Trimetil kitosan 9 Cp (mg/mL); CMC: Karboksimetil kurdlan (mg/mL); Boyut: Partikül büyüklüğü (nm±SD); PDI: Polydispersite indeksi; ZP: Zeta potansiyeli (mV±SD); E.E. : Enkapsülasyon etkinliği (%±SD).

4.8.3.1. CC-CMC, CG-CMC ve TMC-CMC Nanopartiküllerinin Fiziksel Stabilitesinin İncelenmesine Ait Bulgular

CC-CMC, CG-CMC ve TMC-CMC nanopartiküllerinin fiziksel stabilitesini araştırmak amacıyla formülasyonlar +4±1°C'de saklanmıştır. Formülasyonların partikül büyüklükleri, hazırlandıktan hemen sonra, 1, 2, 4 ve 12 hafta sonrasında ölçülmüştür. Sonuçlar Tablo 4.15, Tablo 4.16 ve Tablo 4.17'de belirtilmiştir.

Tablo 4-15: CC-CMC nanopartiküllerinin +4±1 ºC'de 12 haftalık fiziksel stabilite sonuçları

	Hazırlandıktan sonra		**1 hafta sonra**		**2 hafta sonra**		**4 hafta sonra**		**12 hafta sonra**	
F	**Partikül Büyüklüğü ± SD**	**PDI ± SD**	**Partikül Büyüklüğü ± SD**	**PDI ± SD**	**Partikül Büyüklüğü± SD**	**PDI ± SD**	**Partikül Büyüklüğü± SD**	**PDI ± SD**	**Partikül Büyüklüğü ± SD**	**PDI ± SD**
C1	188,4±1,3	0,206±0,018	216,7±3,5	0,191±0,014	206±4,0	0,230±0,018	228,4±3,3	0,244±0,019	206,9±3,9	0,231±0,013
C2	Agregasyon Gözlendi.									
C3	239±1,6	0,236±0,009	246,5±4,4	0,315±0,051	247,9±3,4	0,248±0,013	246,7±3,5	0,234±0,007	278,9±5,7	0,248±0,012
C4	Agregasyon Gözlendi.									
C5	307,3±7,0	0,364±0,018	319,7±1,4	0,270±0,006	309,5±3,6	0,253±0,067	311,7±4,2	0,260±0,035	352,4±3,4	0,296±0,074
C6	376,1±3,4	0,345±0,039	377,6±6,8	0,339±0,025	365±2,9	0,350±0,032	381,0±3,9	0,354±0,032	340,8±3,1	0,394±0,034
C7	Agregasyon Gözlendi.									

C8	405,0±3,4	0,275±0,009	417,7±3,7	0,299±0,024	420,6±5,8	0,284±0,012	424,4±2,7	0,292±0,010	400,7±7,2	0,267±0,008
C9	453,1±6,04	0,383±0,024	456,5±7,5	0,374±0,008	501,9±5,8	0,426±0,027	490±4,0	0,385±0,022	501,1±7,0	0,383±0,016
C10	398,4±3,2	0,474±0,016	402,8±15,7	0,448±0,023	411,6±3,1	0,427±0,026	415,9±24,7	0,547±0,079	430±14,4	0,464±0,031
C11	Agregasyon Gözlendi.									
C12	482,3±11,5	0,385±0.048	490,6±8,3	0,323±0,031	492,9±7,2	0,287±0,012	503,8±9,9	0,301±0,012	566,8±1,3	0,397±0,008
C13	562,2±23,3	0,407±0,032	587,4±14,3	0,450±0,016	597,4±6,9	0,470±0,009	591,1±10,8	0,442±0,007	538,3±0,7	0,414±0,017
C14	615,7±8,8	0,475±0,034	603,0±15,6	0,514±0,092	623,3±9,8	0,516±0,029	613,7±10,8	0,479±0,012	605,3±9,3	0,499±0,028
C15	553,4±17,3	0,627±0,121	546,6±22,8	0,606±0,119	537,5±25,7	0,570±0,140	Agregasyon Gözlendi			
C16	Agregasyon Gözlendi.									

F: Formülasyon, PDI: Polidispersite İndeksi (±SD).

Tablo 4-16: CG-CMC nanopartiküllerinin +4±1 ºC'de 12 haftalık fiziksel stabilite sonuçları

	Hazırlandıktan sonra		**1 hafta sonra**		**2 hafta sonra**		**4 hafta sonra**		**12 hafta sonra**	
F	**Partikül Büyüklüğü ± SD**	**PDI ± SD**	**Partikül Büyüklüğü ± SD**	**PDI ± SD**	**Partikül Büyüklüğü ± SD**	**PDI ± SD**	**Partikül Büyüklüğü ± SD**	**PDI ± SD**	**Partikül Büyüklüğü ± SD**	**PDI ± SD**
G1	Agregasyon Gözlendi.									
G2	Agregasyon Gözlendi.									
G3	Agregasyon Gözlendi.									
G4	Agregasyon Gözlendi.									
G5	299,3±2,4	0,209±0,007	292,1±6,6	0,224±0,006	269,6±0,4	0,225±0,027	257,8±5,5	0,280±0,062	Agregasyon Gözlendi.	
G6	Agregasyon Gözlendi.									
G7	Agregasyon Gözlendi.									
G8	288,5±0,6	0,222±0,010	333,2±3,4	0,219±0,0100	329,6±4,2	0,243±0,0106	311,9±4,1	0,211±0,0304	249,4±1,3	0,306±0,024
G9	282,0±5,9	0,281±0,033	270,2±3,4	0,251±0,015	289,1±5,7	0,370±0,011	Agregasyon Gözlendi.			
G10	Agregasyon Gözlendi.									
G11	Agregasyon Gözlendi.									

G12	443,4±16,9	0,206±0,002	498,5±6,4	0,371±0,028	380,6±4,1	0,225±0,022	355,1±6,109	0,231±0,021	319,8±4,9	0,267±0,019
G13	421,6±6	0,287±0,006	369,6±4,9	0,233±0,014	419,4±7,7	0,362±0,027	364±16,4	0,329±0,081	Agregasyon Gözlendi.	
G14	Agregasyon Gözlendi.									
G15	Agregasyon Gözlendi.									
G16	Agregasyon Gözlendi.									

F: Formülasyon, Boyut: Boyut (nm±SD), PDI: Polidispersite İndeksi (±SD).

Tablo 4-17: TMC-CMC nanopartiküllerinin +4±1 ºC'de 12 haftalık fiziksel stabilite sonuçları

	Hazırlandıktan sonra		**1 hafta sonra**		**2 hafta sonra**		**4 hafta sonra**		**12 hafta sonra**	
F	**Partikül Büyüklüğü ± SD**	**PDI ± SD**	**Partikül Büyüklüğü ± SD**	**PDI ± SD**	**Partikül Büyüklüğü ± SD**	**PDI ± SD**	**Partikül Büyüklüğü ± SD**	**PDI ± SD**	**Partikül Büyüklüğü ± SD**	**PDI ± SD**
T1	153,2±0,5	0,196±0,014	155,6±0,9	0,166±0,006	161,5±1,3	0,169±0,021	160,4±1,7	0,190±0,012	160,2±1,4	0,182±0,036
T2	Agregasyon Gözlendi.									
T3	211,0±3,6	0,194±0,015	219,4±1,0	0,197±0,030	217,7±3,9	0,203±0,010	219,4±3,1	0,214±0,010	214,5±2,4	0,201±0,014
T4	Agregasyon Gözlendi.									

T5	315,4±6,2	0,221±0,010	318,3±5,8	0,241±0,024	317±1,4	0,252±0,015	312±3,4	0,250±0,009	299,6±4,1	0,241±0,009
T6	279,0±6,2	0,383±0,013	257,4±2,0	0,344±0,002	234,9±1,7	0,318±0,022	222,8±1,3	0,246±0,007	241,2±6,1	0,357±0,016
T7	Agregasyon Gözlendi.									
T8	404,8±6,4	0,264±0,012	400,6±5,2	0,275±0,031	381,2±6,6	0,254±0,015	378,3±11,2	0,237±0,019	322,6±3,6	0,289±0,016
T9	333±3,0	0,367±0,017	315,4±0,7	0,325±0,017	290,8±3,1	0,271±0,028	296,9±8,9	0,305±0,042	288,9±2,9	0,369±0,004
T10	215,9±5,2	0,323±0,049	322±5,6	0,385±0,009	212,1±3,6	0,242±0,008	204,4±4,5	0,272±0,025	210,7±21,0	0,267±0,063
T11	Agregasyon Gözlendi.									
T12	473,8±6,4	0,251±0,015	477,6±10,6	0,278±0,009	461,9±3,9	0,276±0,018	446,9±14,6	0,260±0,028	415,9±7,3	0,256±0,039
T13	444,7±3,3	0,433±0,030	383,8±10,7	0,387±0,022	341,6±1,4	0,301±0,018	331,2±7,7	0,289±0,028	341,2±3,6	0,396±0,007
T14	271±4,1	0,318±0,037	272,4±1,9	0,376±0,024	352,8±11,2	0,554±0,074	248,7±3,2	0,308±0,048	247,5±4,1	0,349±0,011
T15	Agregasyon Gözlendi.									
T16	Agregasyon Gözlendi.									

F: Formülasyon, Boyut: Boyut (nm±SD), PDI: Polidispersite İndeksi (±SD)

4.8.4. Santrifüj ve Liyofilizasyon İşlemlerinin CC-CMC, CG-CMC ve TMC-CMC Nanopartiküllerinin Fiziksel Stabilitesi Üzerine Etkisine Ait Bulgular

CC-CMC, CG-CMC ve TMC-CMC nanopartiküllerinin santrifüj ve/veya liyofilizasyon işlemi sonrasında yeniden disperse edilebilme özelliğini incelemek amacıyla yapılan çalışmanın sonuçları sırasıyla Tablo 4.18, Tablo 4.19 ve Tablo 4.20'de belirtilmiştir.

Tablo 4-18: 2:1 polimer oranına göre hazırlanmış CC-CMC nanopartiküllerinin (C3 formülasyonu) partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına santrifüj işleminin ve gliserol ilavesinin etkisinin incelenmesi (n=3)

Formülasyon	Gliserol (mL)	Santrifüj Süresi (dakika)	Partikül Büyüklüğü (nm±SD)	Polidispersite (±SD)
C3	-	-	236±2,4	0,216±0,021
C3-30	-	30	305,8±9,4	0,301±0,040
C3-60	-	60	Agregasyon Gözlendi.	
C3-120	-	120	Agregasyon Gözlendi.	
C3-Gliserol	0,2	120	368,2±6,7	0,209±0,020

Tablo 4-19: 3:1 polimer oranına göre hazırlanmış CG-CMC nanopartiküllerinin (G5 formülasyonu) partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına santrifüj işleminin ve gliserol ilavesinin etkisinin incelenmesi (n=3)

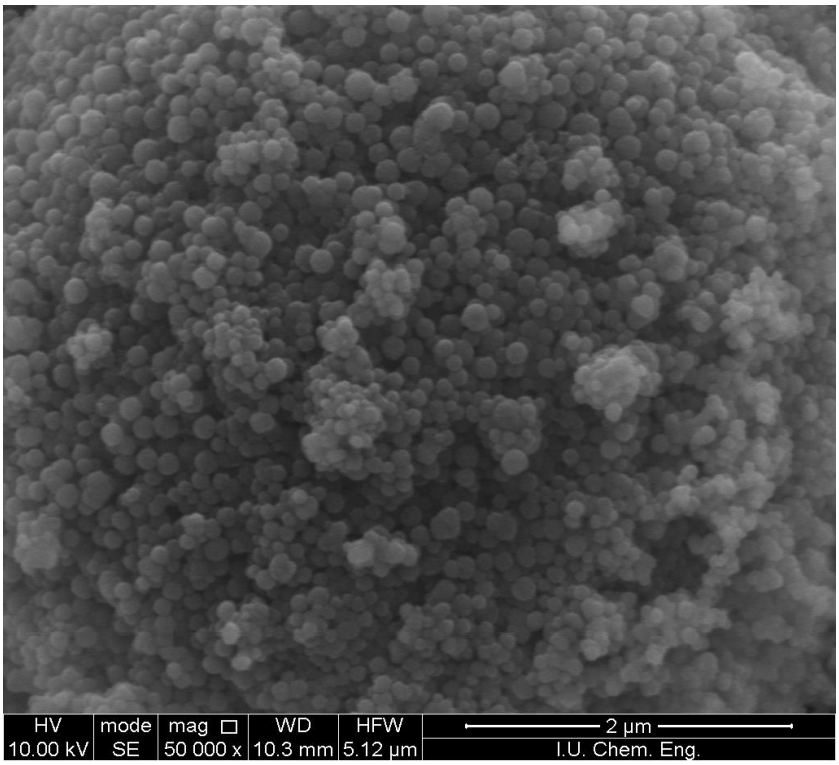
Formülasyon	Gliserol (mL)	Santrifüj Süresi (dakika)	Partikül Büyüklüğü (nm±SD)	Polidispersite (±SD)
G5	-	-	291,5±3,2	0,210±0,013
G5-30	-	30	332,2±7,6	0,249±0,010
G5-60	-	60	Agregasyon Gözlendi.	
G5-120	-	120	Agregasyon Gözlendi.	
G5-Gliserol	0,2	120	367,0±5,9	0,210±0,030

Tablo 4-20: 2:1 polimer oranına göre hazırlanmış TMC-CMC nanopartiküllerinin (T3 formülasyonu) partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına santrifüj işleminin ve gliserol ilavesinin etkisinin incelenmesi (n=3)

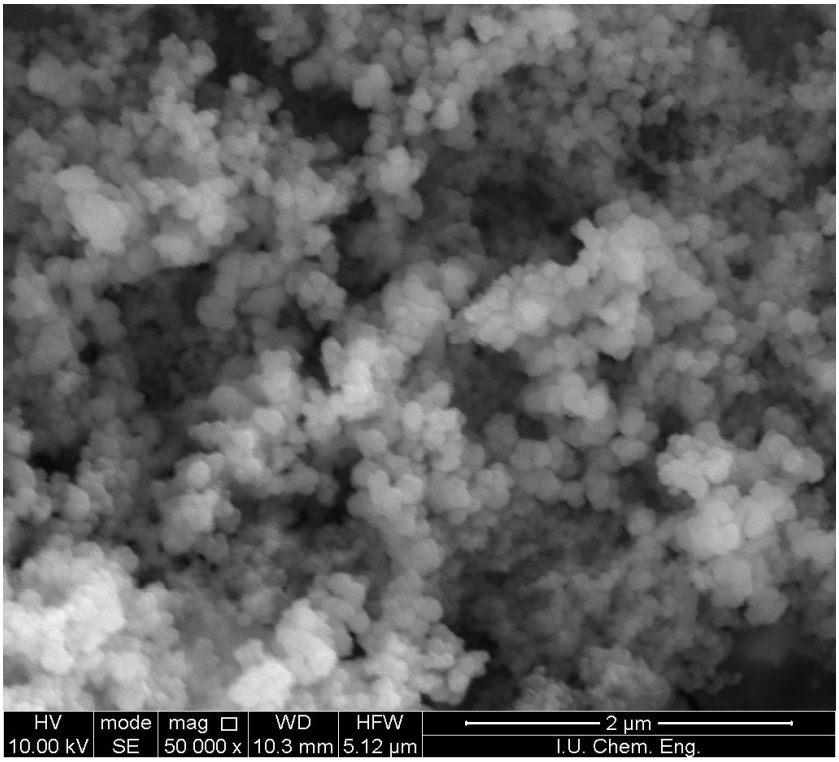
Formülasyon	Gliserol (mL)	Santrifüj Süresi (dakika)	Partikül Büyüklüğü (nm±SD)	Polidispersite (±SD)
T3	-	-	206,9±3,7	0,215±0,030
T3-30	-	30	211,0±0,3	0,235±0,010
T3-60	-	60	248,2±5,1	0,343±0,010
T3-120	-	120	Agregasyon Gözlendi.	
T3-Gliserol	0,2	120	251,0±5,2	0,230±0,010

4.8.5. CC-CMC, CG-CMC ve TMC-CMC Nanopartikül Formülasyonunun Morfolojisinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile İncelenmesine Ait Bulgular

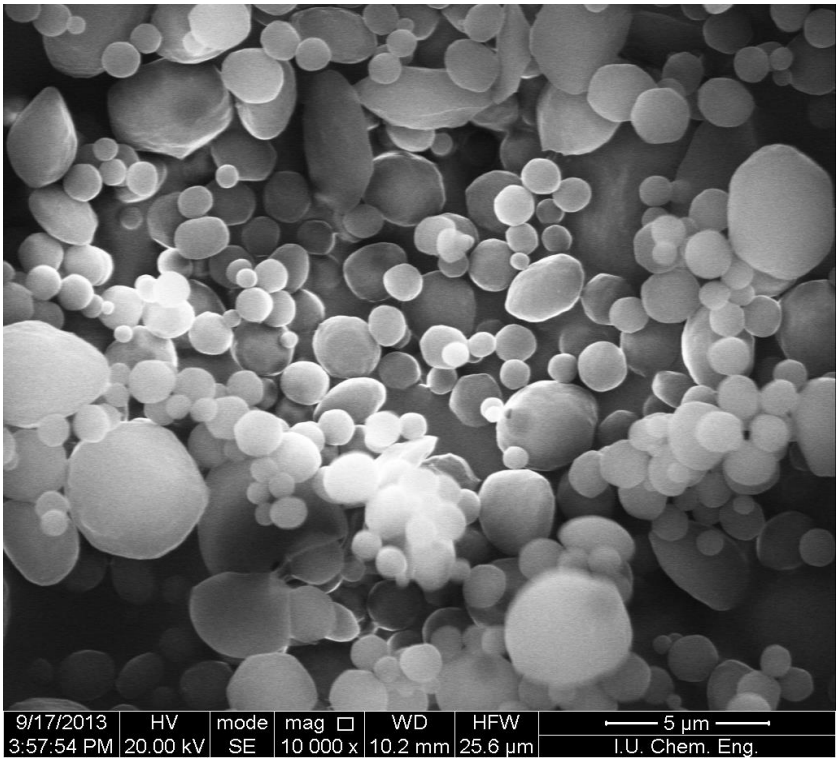
CC-CMC, CG-CMC ve TMC-CMC nanopartiküllerine ait SEM fotoğrafları sırasıyla Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4-10: 7,5 µg/mL BSA içeren CC-CMC (C3 Formülasyonu) nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobundaki görüntüsü; Büyütme X50.000.



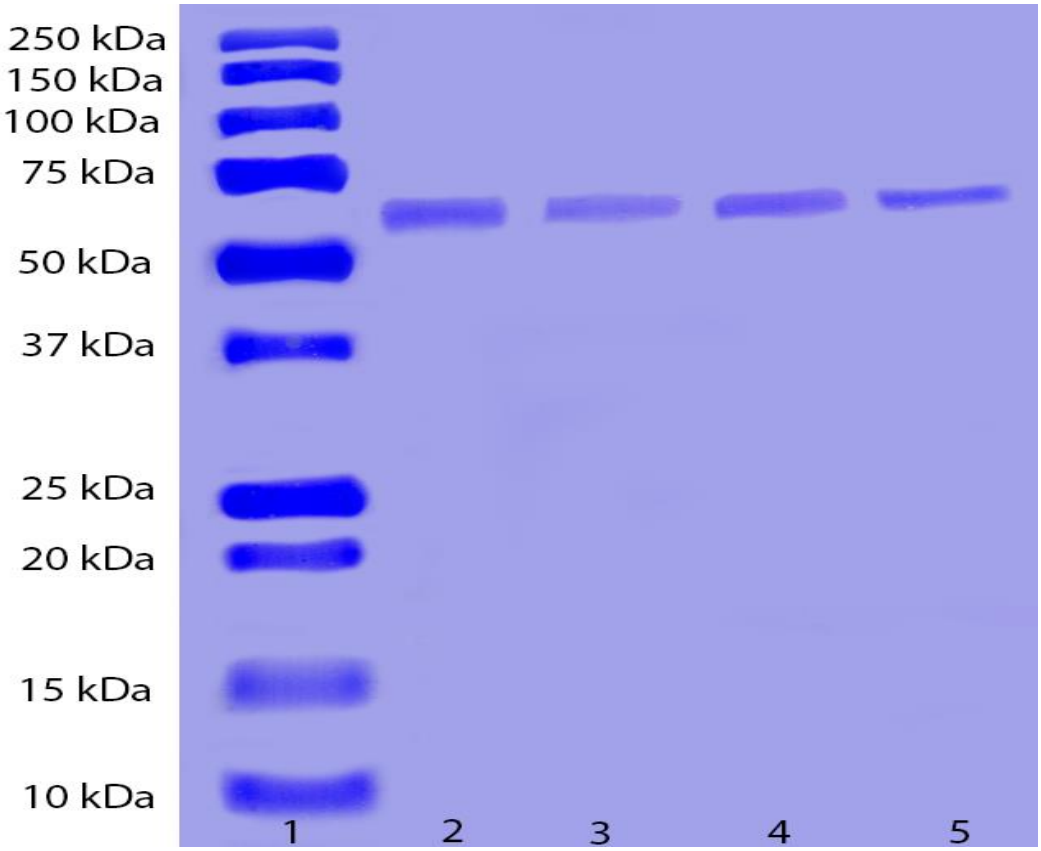
Şekil 4-11: 7,5 µg/mL BSA içeren CG-CMC (G5 Formülasyonu) nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobundaki görüntüsü; Büyütme X50.000.



Şekil 4-12: 7,5 µg/mL BSA içeren TMC-CMC nanopartiküllerinin (T3 Formülasyonu) taramalı elektron mikroskobundaki görüntüsü; Büyütme X10.000.

4.9. Protein Bütünlüğü Testine Ait Bulgular

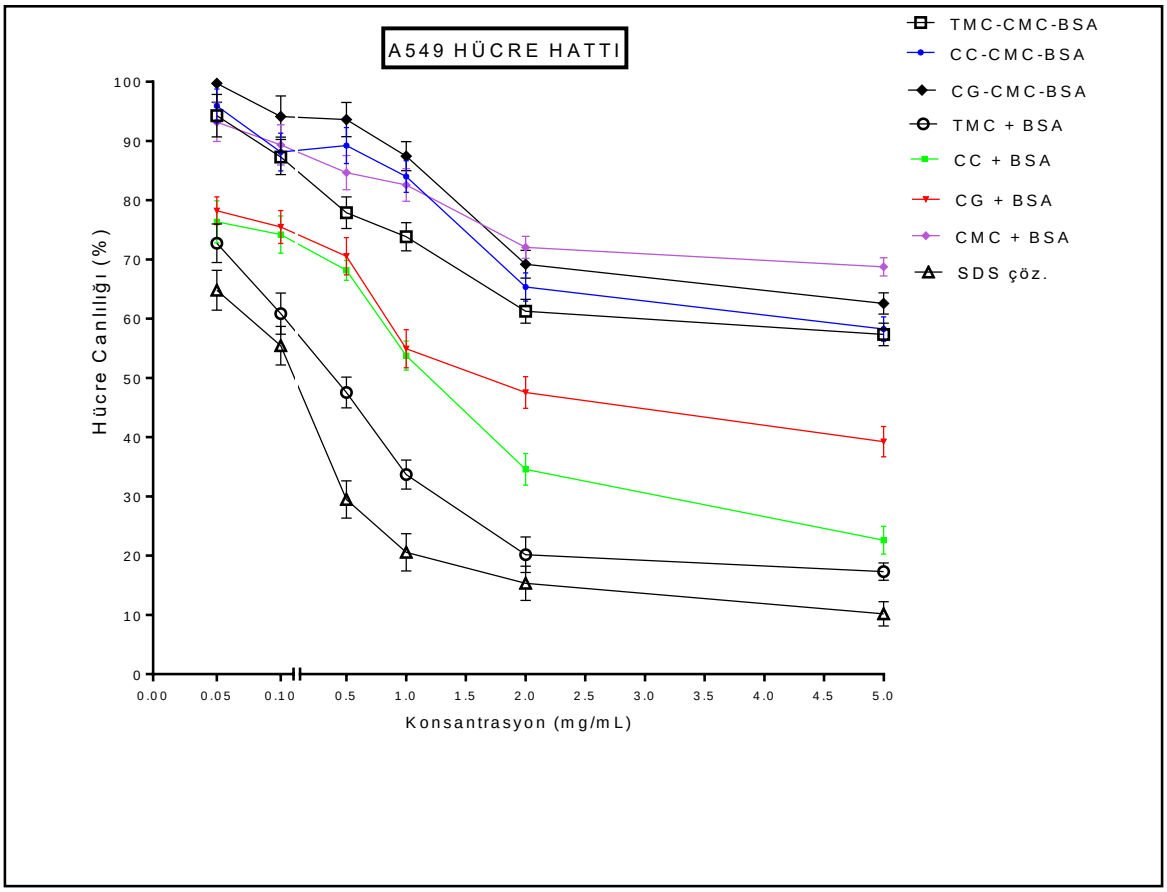
CC-CMC, CG-CMC ve TMC-CMC nanopartikül formülasyonlarına enkapsüle edilen BSA antijeninin, nanopartikül hazırlama sürecinde bütünlüğünü koruyup korumadığını, bu süreçte herhangi bir agregasyona veya degradasyona uğrayıp uğramadığını incelemek amacıyla SDS-PAGE testi yapılmış ve analizin sonucunda test edilen formülasyonlarda BSA antijeninin bütünlüğünü koruduğu tespit edilmiştir. Buna ait SDS-PAGE jeli görüntüsü Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



Şekil 4-13: BSA yüklü nanopartiküllerin SDS-PAGE görüntü

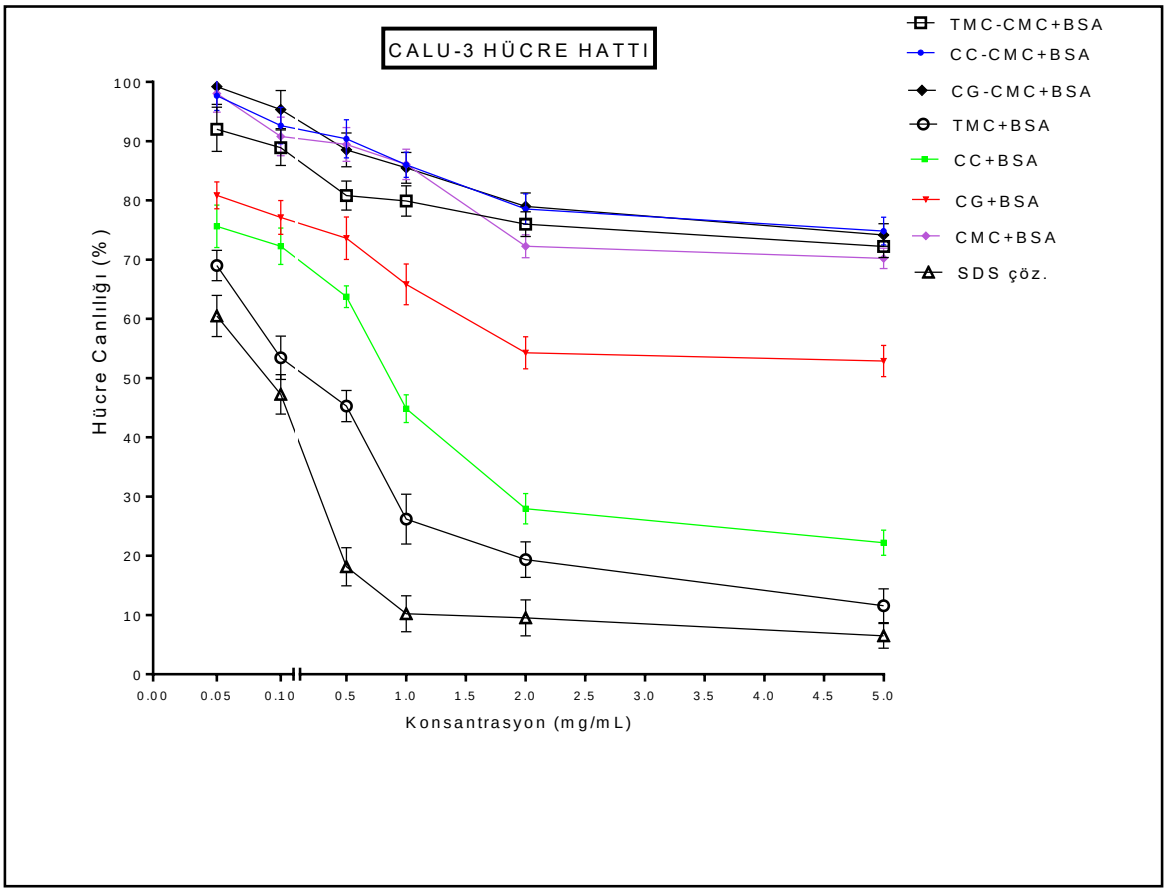
1 numaralı bant: Protein işaretleyici, 2 numaralı bant: BSA antijeni standart çözeltisi (7,5 µg/ml), 3 numaralı bant: BSA yüklü CC-CMC formülasyonu (C3), 4 numaralı bant: BSA yüklü CG-CMC formülasyonu (G5), 5 numaralı bant: BSA yüklü TMC-CMC formülasyonu (T3)

4.10. İn Vitro Sitotoksisite Testine Ait Bulgular



Şekil 4-14: 0,05-5 mg/mL konsantrasyon aralığındaki TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu, CG+BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu, 2:1 polimer oranında hazırlanmış BSA yüklü TMC-CMC (TMC-CMC-BSA) ve CC-CMC (CC-CMC-BSA) ile 3:1 oranında hazırlanmış BSA yüklü CG-CMC (CG-CMC-BSA) nanopartiküllerinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi

Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi pozitif kontrol olarak kullanılırken, hücre kültür besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 4-15: 0,05-5 mg/mL konsantrasyon aralığındaki TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu , CG+BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu, 2:1 polimer oranında hazırlanmış BSA yüklü TMC-CMC (TMC-CMC-BSA) ve CC-CMC (CC-CMC-BSA) ile 3:1 oranında hazırlanmış BSA yüklü CG-CMC (CG-CMC-BSA) nanopartiküllerinin CALU-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi

Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi pozitif kontrol olarak kullanılırken, hücre kültür besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

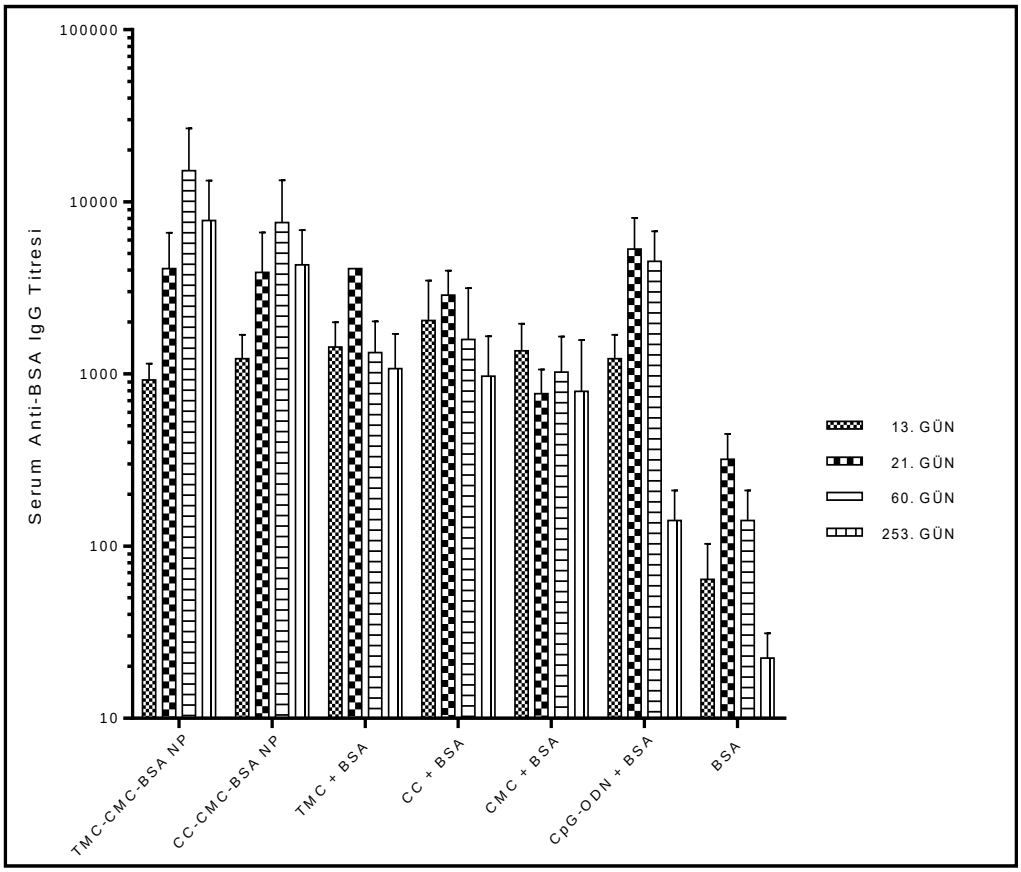
4.11. İmmünolojik Çalışmaların Sonuçları

4.11.1. Antikor Deneylerinin Sonuçları

4.11.1.1. Formülasyonların İntranazal Yolla Uygulanmasından Sonra Elde Edilen Antikor Sonuçları

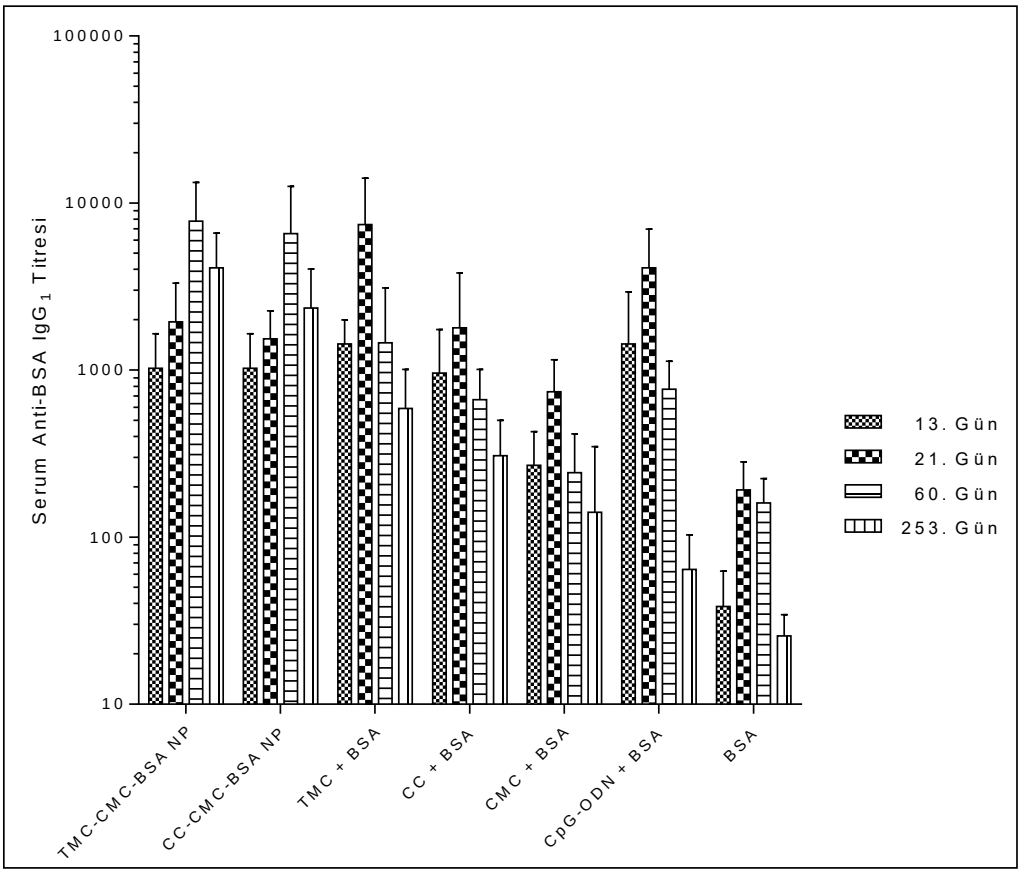
Formülasyonların (20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri, CC-CMC nanopatikülleri, TMC dispersiyonu, CC dispersiyonu, CMC dispersiyonu ve CpG-ODN formülasyonu ile sadece BSA antijeni (20 µg)) balb/c farelerine (n=5) intranazal yolla uygulanmasından sonra, 13., 21. 60. ve 253. günlerde alınan kan örneklerinden elde edilen serumlar indirek ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. Serum örneklerinde ölçülen

IgG, IgG_1 ve IgG_{2a} antikor titreleri sırasıyla Şekil 4.16, 4.17 ve 4.18'de verilmiştir. Ayrıca IgG_1/IgG_{2a} oranları Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



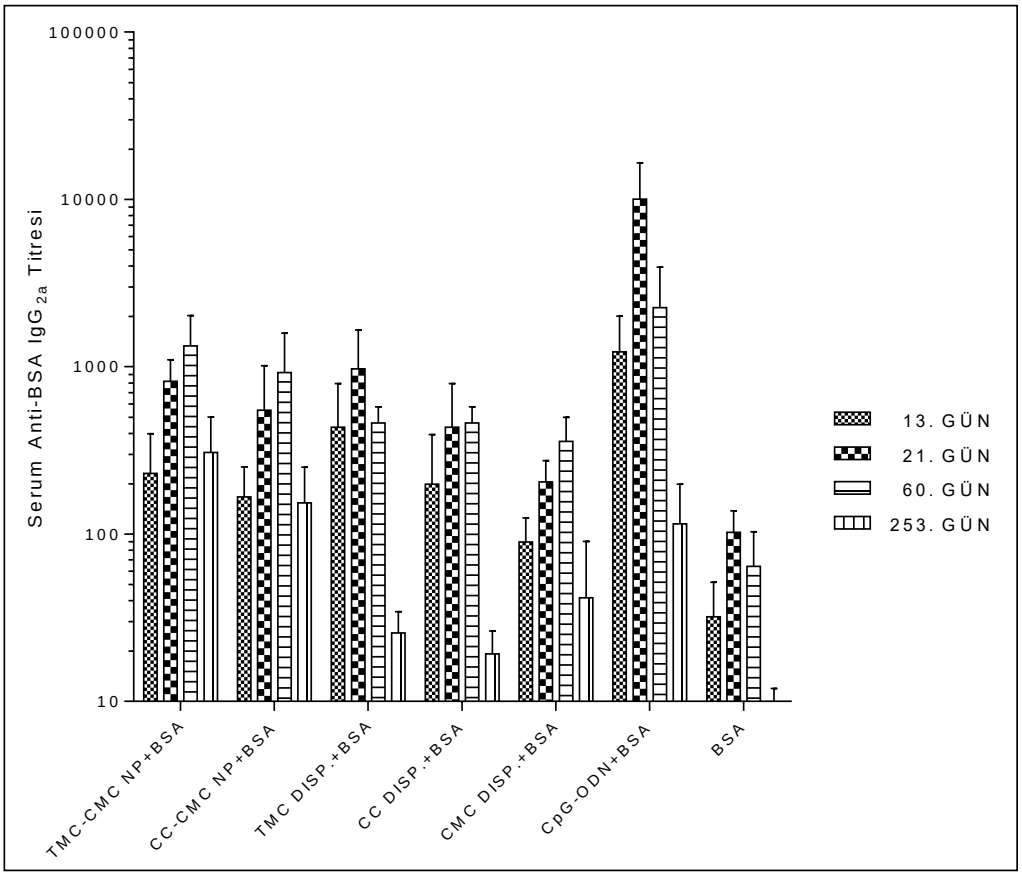
Şekil 4-16: BSA antijenine özgü IgG antikor titreleri (i.n.)

20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri (TMC-CMC-BSA) , CC-CMC nanopatikülleri (CC-CMC-BSA), TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu ve CpG-ODN + BSA karışımı ile sadece BSA antijeni (20 µg) Balb/c farelere intranazal yoldan (n=5) uygulandıktan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde kan alınarak IgG antikor titreleri belirlenmiştir. Aynı doz BSA antijeni (20 µg) içeren formülasyonlar 14. günde destekleme dozu olarak uygulanmıştır.



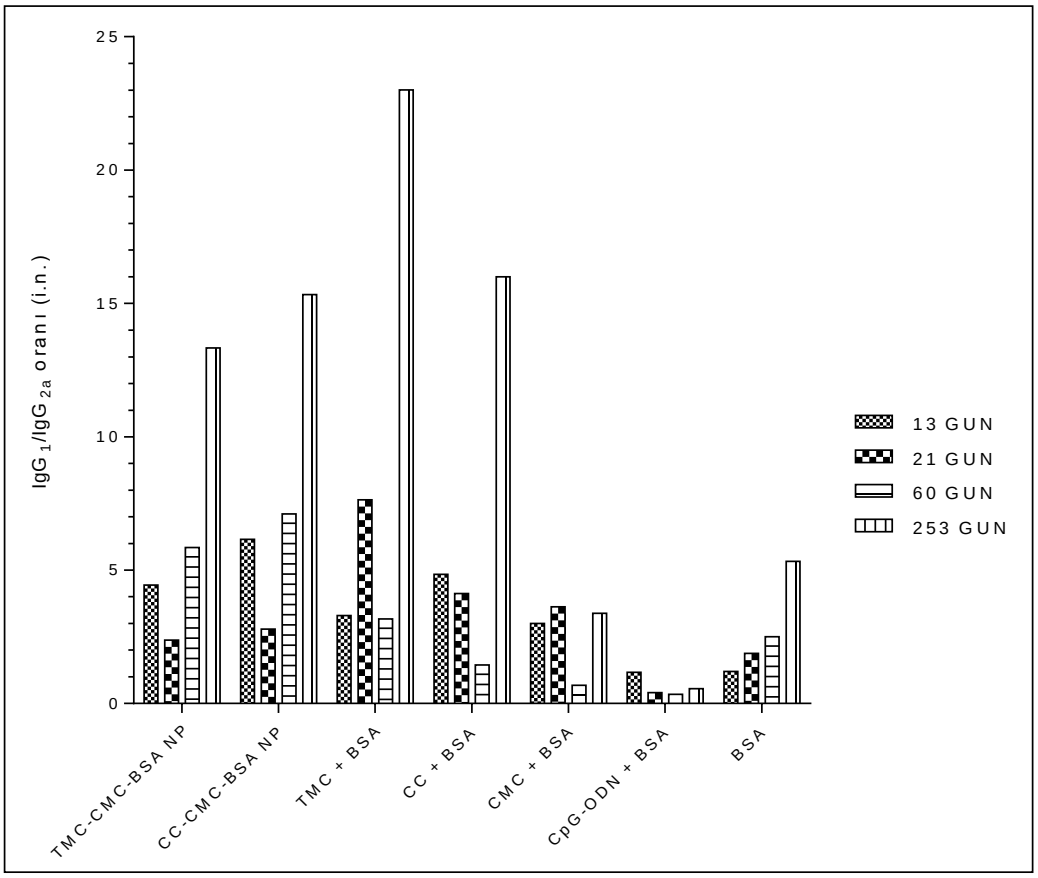
Şekil 4-17: BSA antijenine özgü IgG_1 antikor titreleri (i.n)

20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri (TMC-CMC-BSA) , CC-CMC nanopatikülleri (CC-CMC-BSA), TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu ve CpG-ODN + BSA karışımı ile sadece BSA antijeni (20 µg) Balb/c farelere intranazal yoldan (n=5) uygulandıktan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde kan alınarak IgG_1 antikor titreleri belirlenmiştir. Aynı doz BSA antijeni (20 µg) içeren formülasyonlar 14. günde destekleme dozu olarak uygulanmıştır.



Şekil 4-18: BSA antijenine özgü IgG_{2a} antikor titreleri (i.n.)

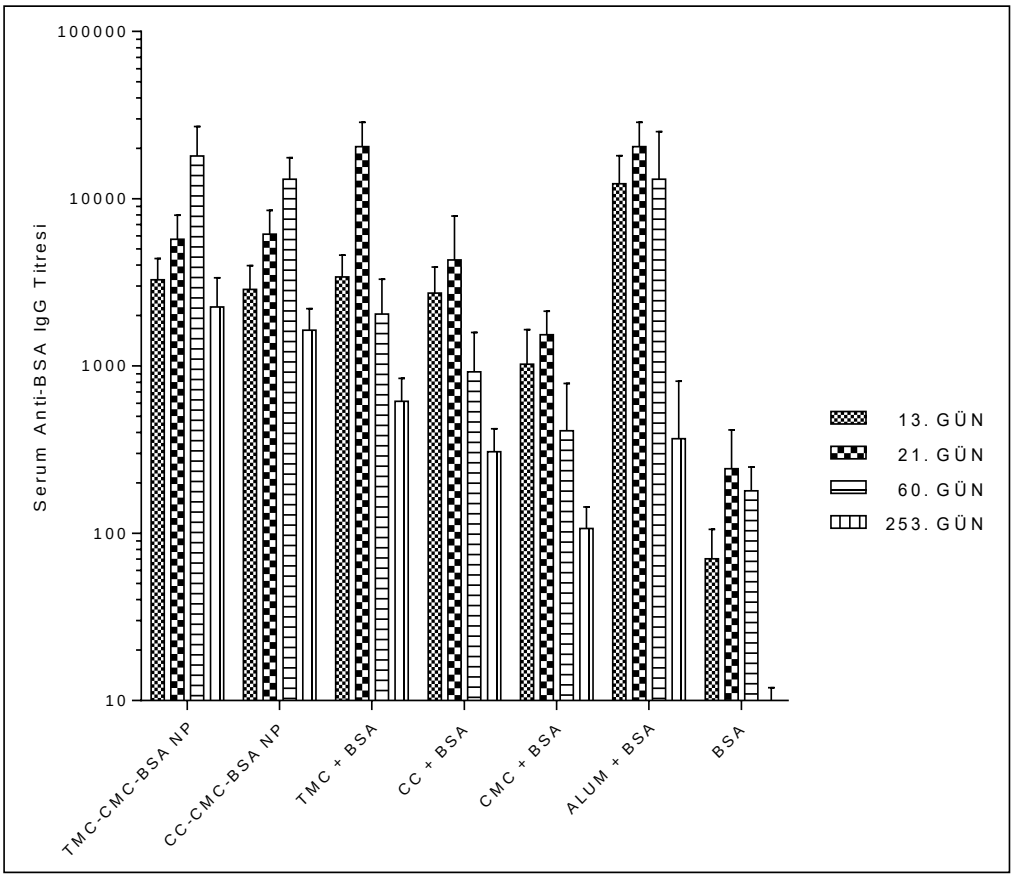
20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri (TMC-CMC-BSA) , CC-CMC nanopatikülleri (CC-CMC-BSA), TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu ve CpG-ODN + BSA karışımı ile sadece BSA antijeni (20 µg) Balb/c farelere intranazal yoldan (n=5) uygulandıktan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde kan alınarak IgG_{2a} antikor titreleri belirlenmiştir. Aynı doz BSA antijeni (20 µg) içeren formülasyonlar 14. günde destekleme dozu olarak uygulanmıştır.



Şekil 4.19: BSA antijenine özgü IgG alt gruplarının (IgG_1 ve IgG_{2a}) oranları (i.n.)

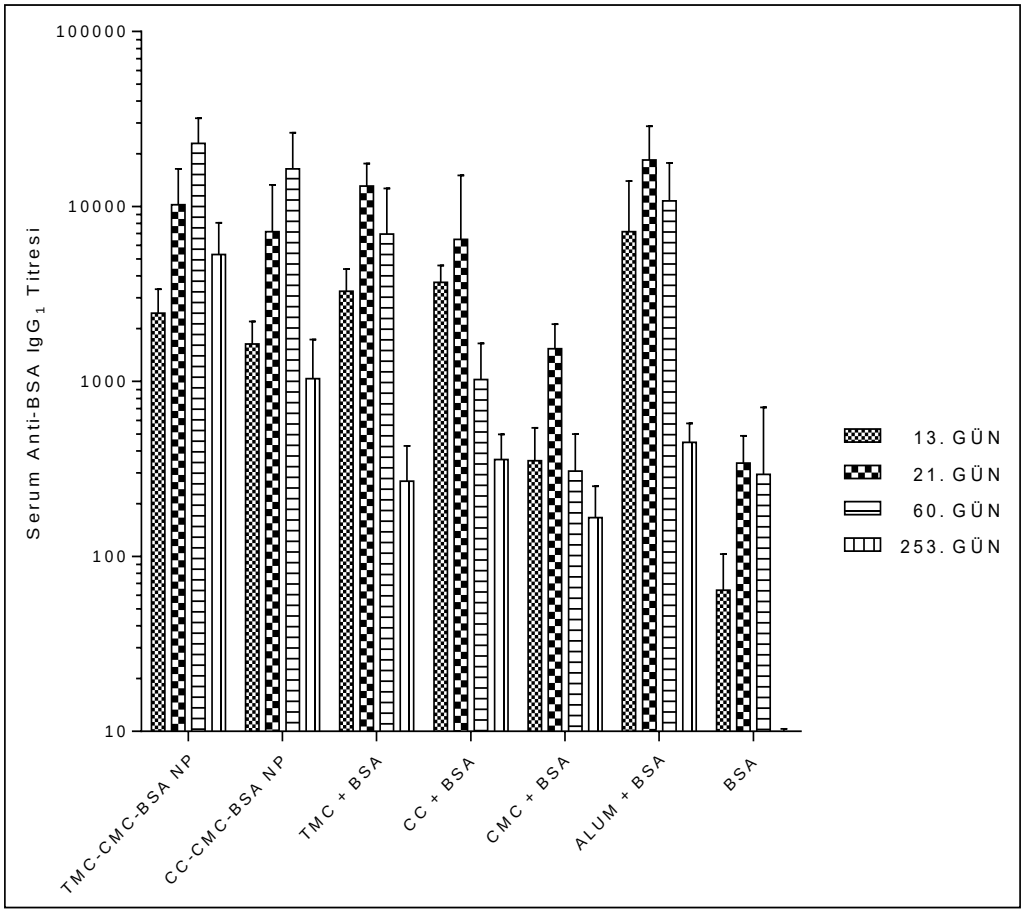
4.11.1.2. Subkütan Yolla Uygulanan Formülasyonlar Sonrasında Elde Edilen Antikor Sonuçları

Formülasyonların (20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri, CC-CMC nanopatikülleri, TMC dispersiyonu, CC dispersiyonu, CMC dispersiyonu ve CpG-ODN formülasyonu ile sadece BSA antijeni (20 µg)) balb/c farelerine (n=5) subkütan yolla uygulanmasından sonra, 13., 21. 60. ve 253. günlerde alınan kan örneklerinden elde edilen serumlar indirek ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. Serum örneklerinde ölçülen IgG, IgG_1 ve IgG_{2a} antikor titreleri sırasıyla Şekil 4.20, 4.21 ve 4.22'de verilmiştir. Ayrıca IgG_1/IgG_{2a} oranları Şekil 4.23'da gösterilmiştir.



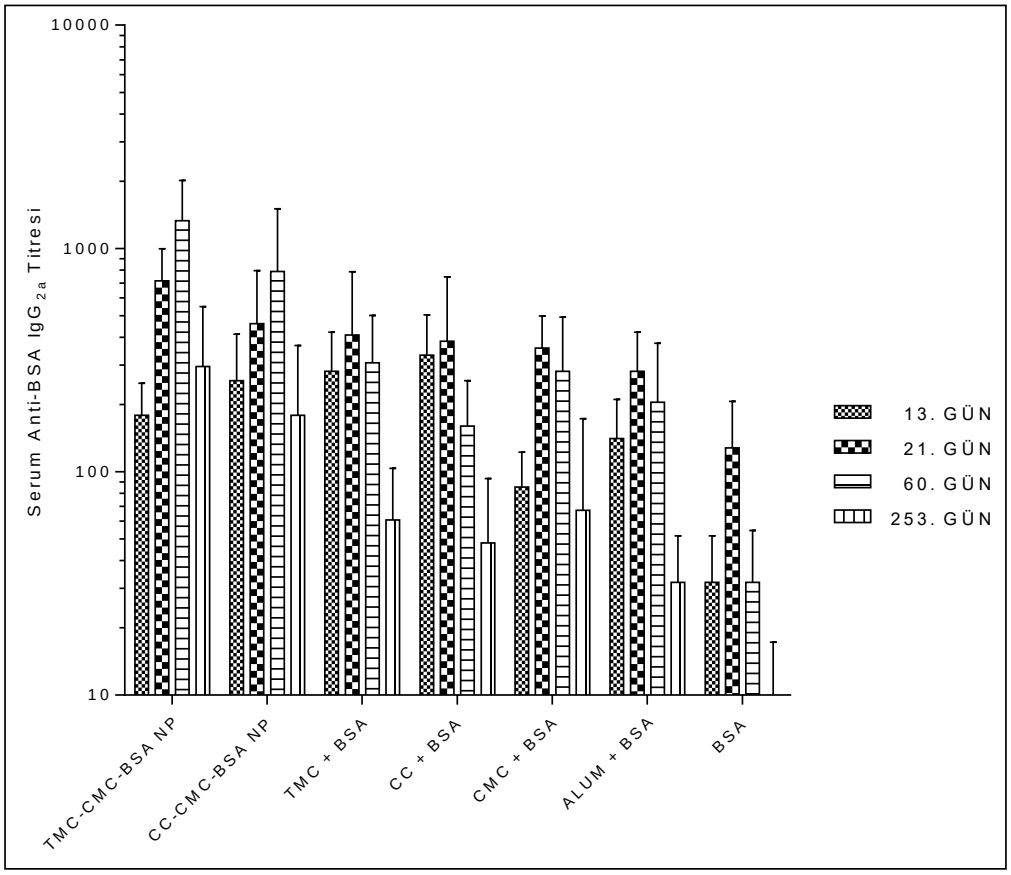
Şekil 4-20: BSA antijenine özgü IgG antikor titreleri (s.c.)

20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri (TMC-CMC-BSA) , CC-CMC nanopatikülleri (CC-CMC-BSA), TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu ve Alum + BSA karışımı ile sadece BSA antijeni (20 µg) Balb/c farelere subkütan yoldan (n=5) uygulandıktan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde kan alınarak IgG antikor titreleri belirlenmiştir. Aynı doz BSA antijeni (20 µg) içeren formülasyonlar 14. günde destekleme dozu olarak uygulanmıştır.



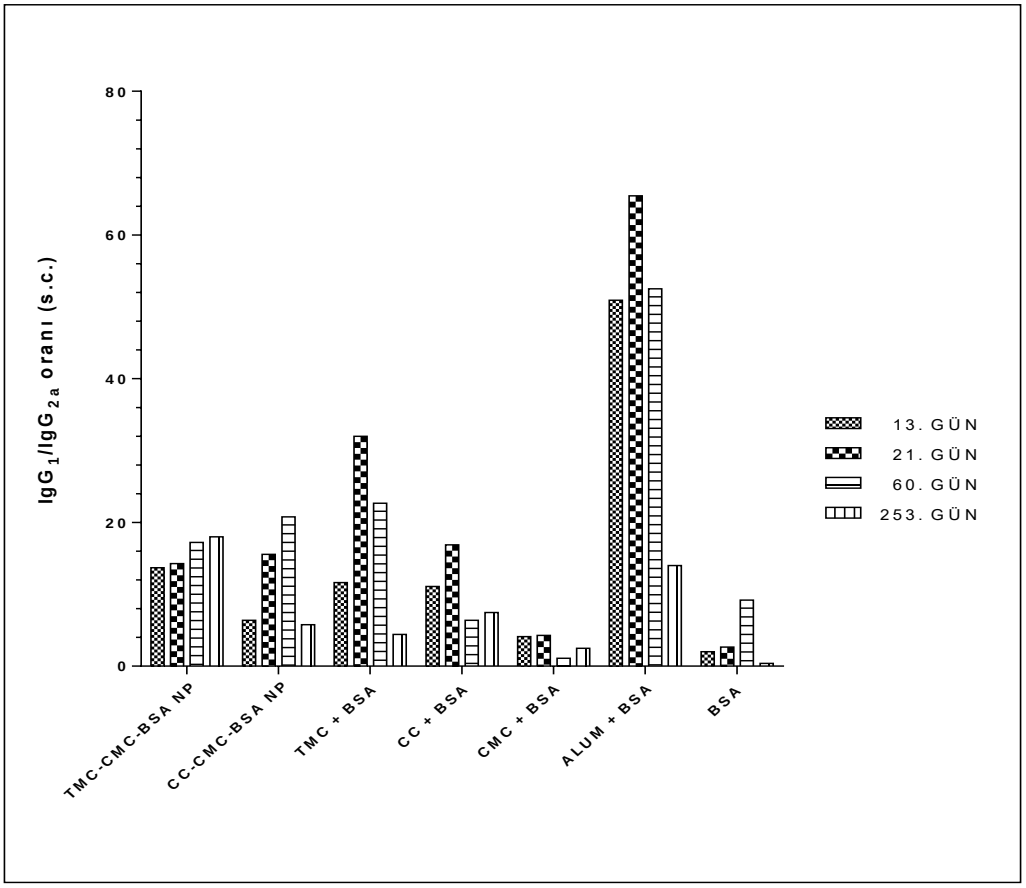
Şekil 4-21: BSA antijenine özgü IgG_1 antikor titreleri (s.c.)

20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri (TMC-CMC-BSA) , CC-CMC nanopatikülleri (CC-CMC-BSA), TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu ve Alum + BSA karışımı ile sadece BSA antijeni (20 µg) Balb/c farelere subkütan yoldan (n=5) uygulandıktan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde kan alınarak IgG_1 antikor titreleri belirlenmiştir. Aynı doz BSA antijeni (20 µg) içeren formülasyonlar 14. günde destekleme dozu olarak uygulanmıştır.



Şekil 4-22: BSA antijenine özgü IgG_{2a} antikor titreleri (s.c.).

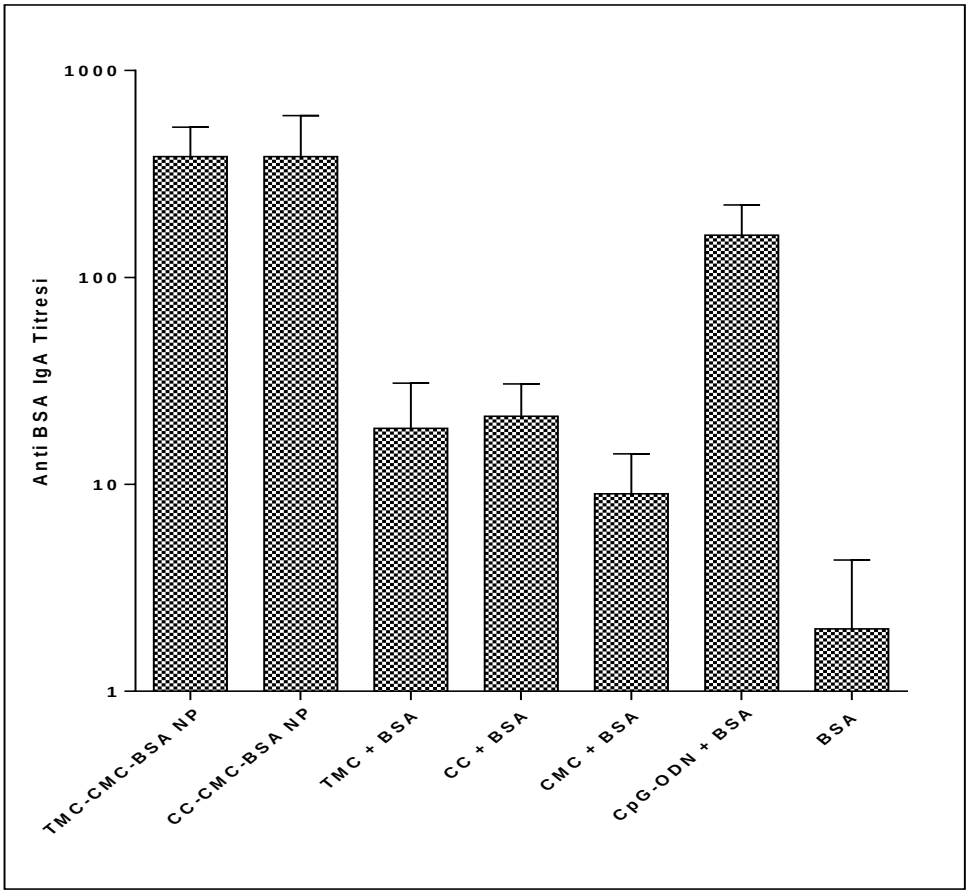
20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri (TMC-CMC-BSA) , CC-CMC nanopatikülleri (CC-CMC-BSA), TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu ve Alum + BSA karışımı ile sadece BSA antijeni (20 µg) Balb/c farelere subkütan yoldan (n=5) uygulandıktan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde kan alınarak IgG_{2a} antikor titreleri belirlenmiştir. Aynı doz BSA antijeni (20 µg) içeren formülasyonlar 14. günde destekleme dozu olarak uygulanmıştır.



Şekil 4-23: BSA antijenine özgü IgG alt gruplarının (IgG_1 ve IgG_{2a}) oranları (s.c.)

4.11.1.3. İntranazal Yolla Uygulanan Formülasyonlar Sonrasında Elde Edilen Lokal IgA Antikor Yanıtları

Formülasyonların (20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri, CC-CMC nanopatikülleri, TMC dispersiyonu, CC dispersiyonu, CMC dispersiyonu ve CpG-ODN formülasyonu ile sadece BSA antijeni (20 µg)), balb/c farelerine (n=5) intranazal yolla uygulanmasından sonra, 253. günde vajinal yıkama ile elde edilen mukozal sekresyon örnekleri ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen salgısal IgA (sIgA) antikor titreleri Şekil 4.24'te verilmiştir.



Şekil 4-24: BSA antijenine özgü IgA antikor titreleri (i.n.)

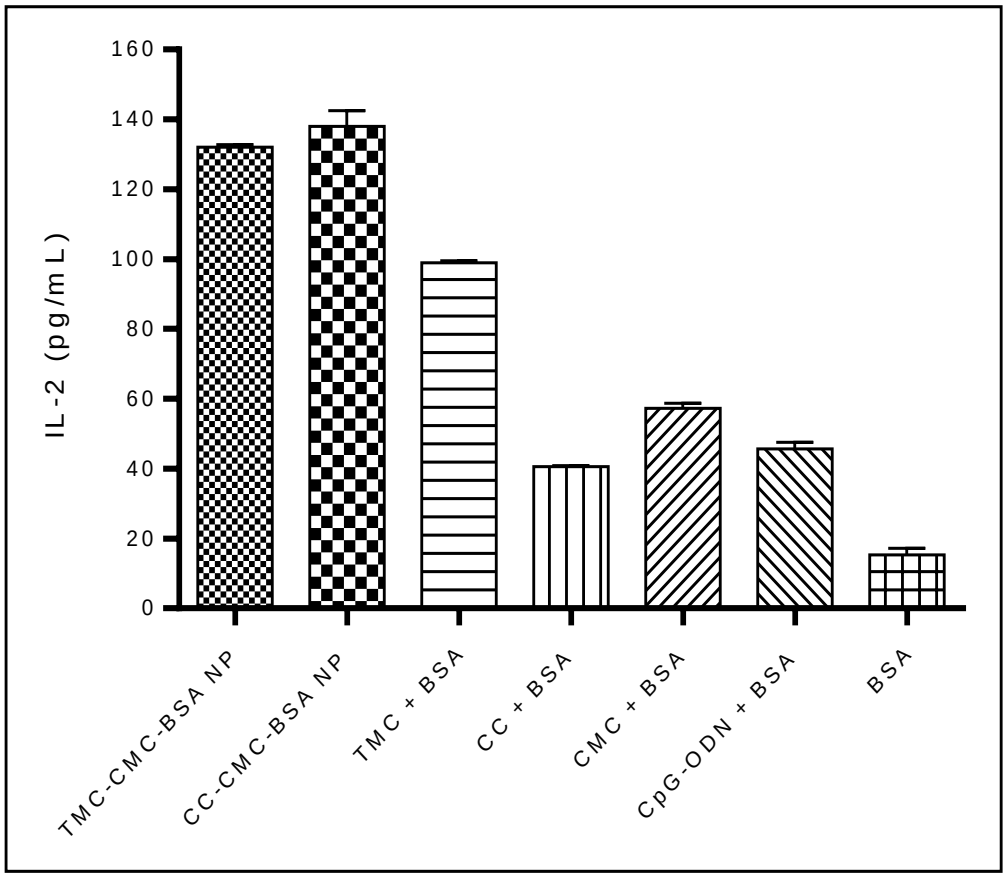
20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri (TMC-CMC-BSA) , CC-CMC nanopatikülleri (CC-CMC-BSA), TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu ve CpG-ODN + BSA karışımı ile sadece BSA antijeni (20 µg) Balb/c farelere intranazal yoldan (n=5) uygulandıktan sonra 253. günde vajinal yıkama ile elde edilen mukozal sekresyon örneklerinde sIgA antikor titreleri belirlenmiştir. Aynı doz BSA antijeni (20 µg) içeren formülasyonlar 14. günde destekleme dozu olarak uygulanmıştır.

4.11.2. BSA Antijeni İle Yeniden Uyarılan Primer Dalak Hücrelerinden (Splenosit) Salgılanan Sitokinlerin Analizine Ait Sonuçlar

Balb/c fareler sakrife edildikten dalakları çıkartılmıştır. Her bir grubun dalakları aynı yerde toplanarak primer dalak hücreleri izole edilmiştir. Primer hafıza hücreleri 10 µg/mL konsantrasyonda BSA ile yeniden uyarıldıktan sonra, hücreler tarafından salgılanan sitokinlerin (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 ve IFN-γ) miktarları sandviç ELISA yöntemi ile tespit edilmiştir.

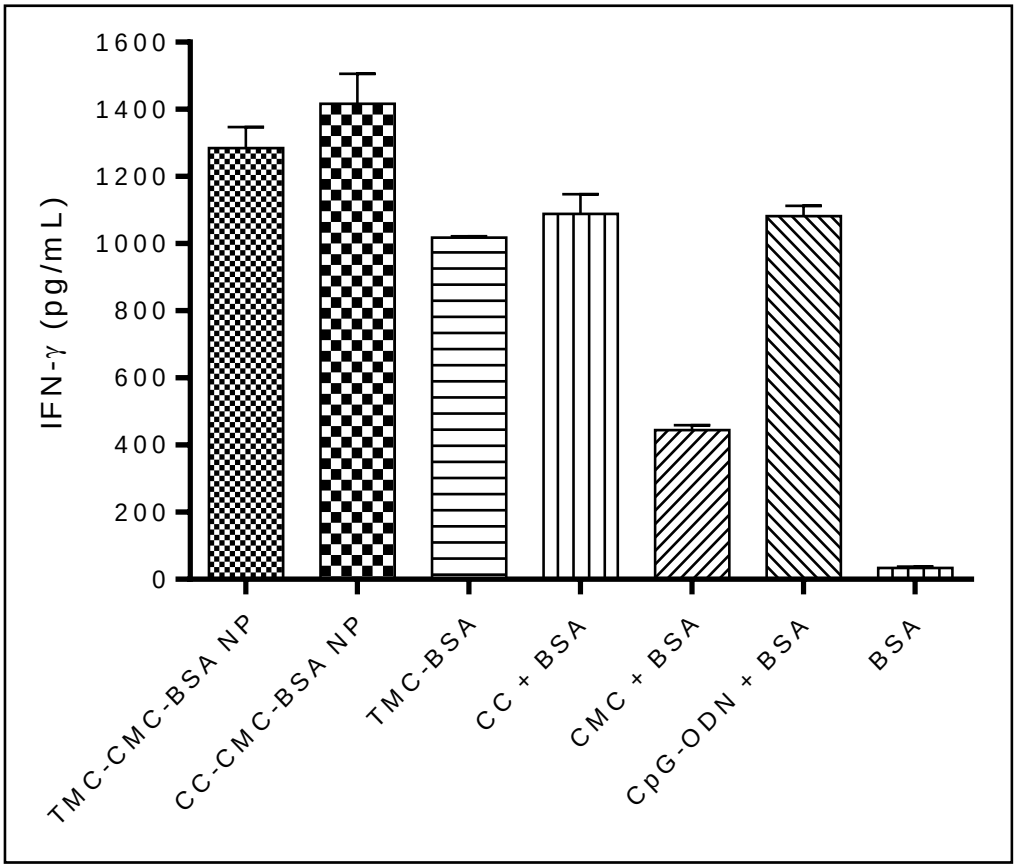
4.11.2.1. İntranazal Yol İle İmmünizasyonu Yapılan Hayvalara Ait Sitokin Sonuçları

İntranazal yol ile immünizasyonu yapılan hayvanların primer dalak hücrelerinin, BSA antijeni ile yeniden uyarılması sonucu hafıza hücreleri tarafından salgılanan IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 ve IFN-γ sitokin miktarları Şekil 4.25, 4.26, 4.27, 4.28 ve 4.29'da sırasıyla gösterilmiştir.



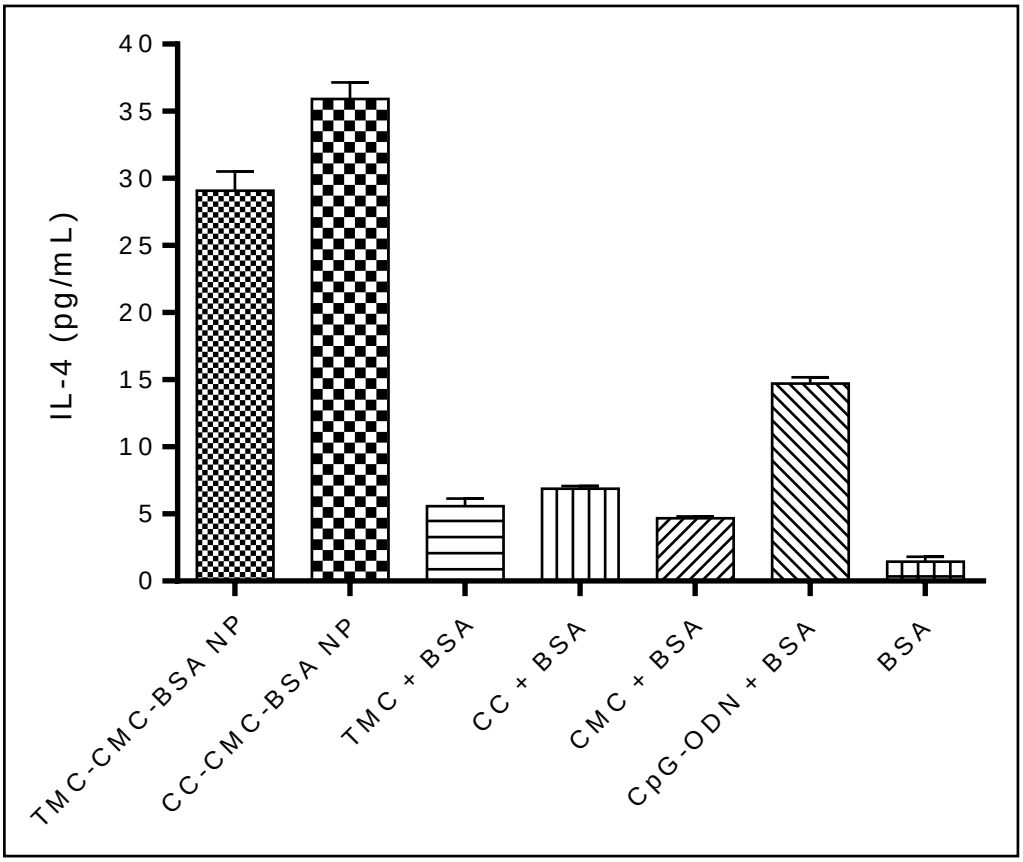
Şekil 4-25: Primer dalak hücrelerinin 10 µg/mL BSA antijeni ile yeniden uyarılması sonucu hafıza hücreleri tarafından salgılanan IL-2 seviyeleri (i.n.)

Sitokin seviyeleri, splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile 56 saat inkübasyondan sonra üstte kalan sıvıda ölçülmüştür. 20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri (TMC-CMC-BSA) , CC-CMC nanopatikülleri (CC-CMC-BSA), TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu ve CpG-ODN + BSA karışımı ile sadece BSA antijeni (20 µg) Balb/c farelere intranazal yoldan (n=5) uygulandıktan sonra 253. günde sakrife edilen farelere ait splenositlerde tespit edilen IL-2 seviyeleridir (n=5).



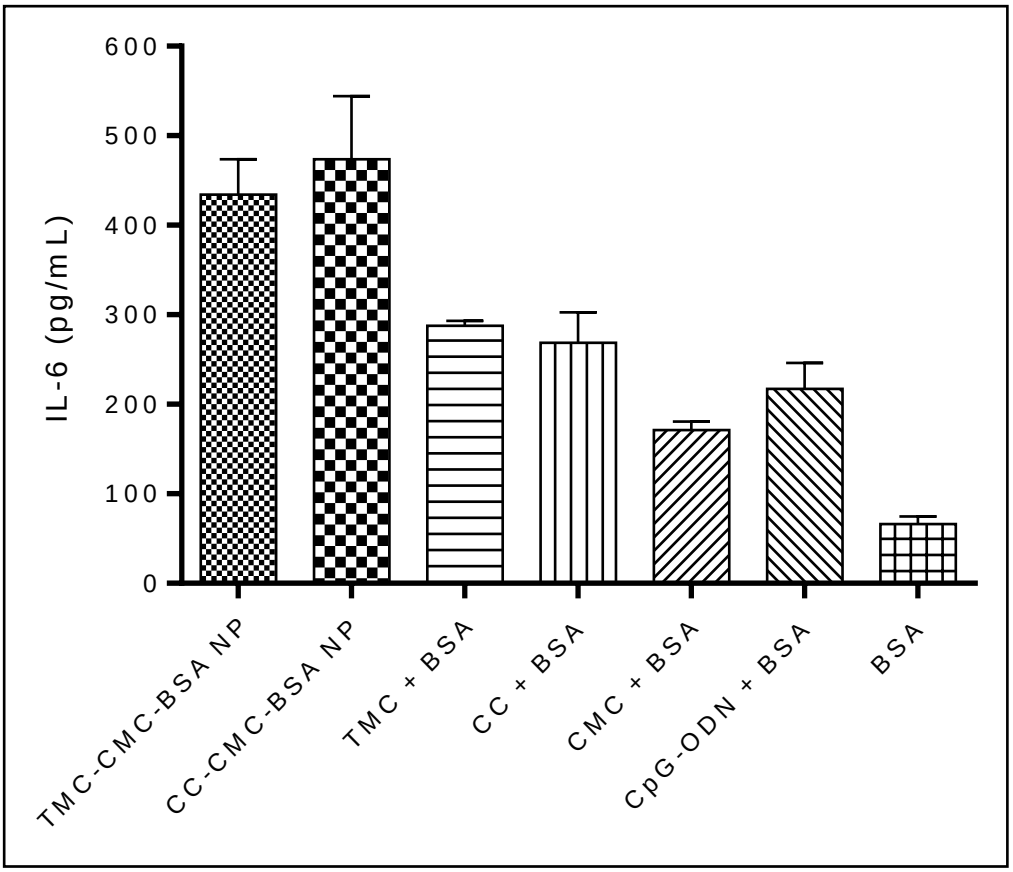
Şekil 4-26: Primer dalak hücrelerinin 10 µg/mL BSA antijeni ile yeniden uyarılması sonucu hafıza hücreleri tarafından salgılanan IFN-γ seviyeleri (i.n.)

Sitokin seviyeleri, splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile 56 saat inkübasyondan sonra üstte kalan sıvıda ölçülmüştür. 20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri (TMC-CMC-BSA) , CC-CMC nanopatikülleri (CC-CMC-BSA), TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu ve CpG-ODN + BSA karışımı ile sadece BSA antijeni (20 µg) Balb/c farelere intranazal yoldan (n=5) uygulandıktan sonra 253. günde sakrife edilen farelere ait splenositlerde tespit edilen IFN-γ seviyeleridir (n=5).



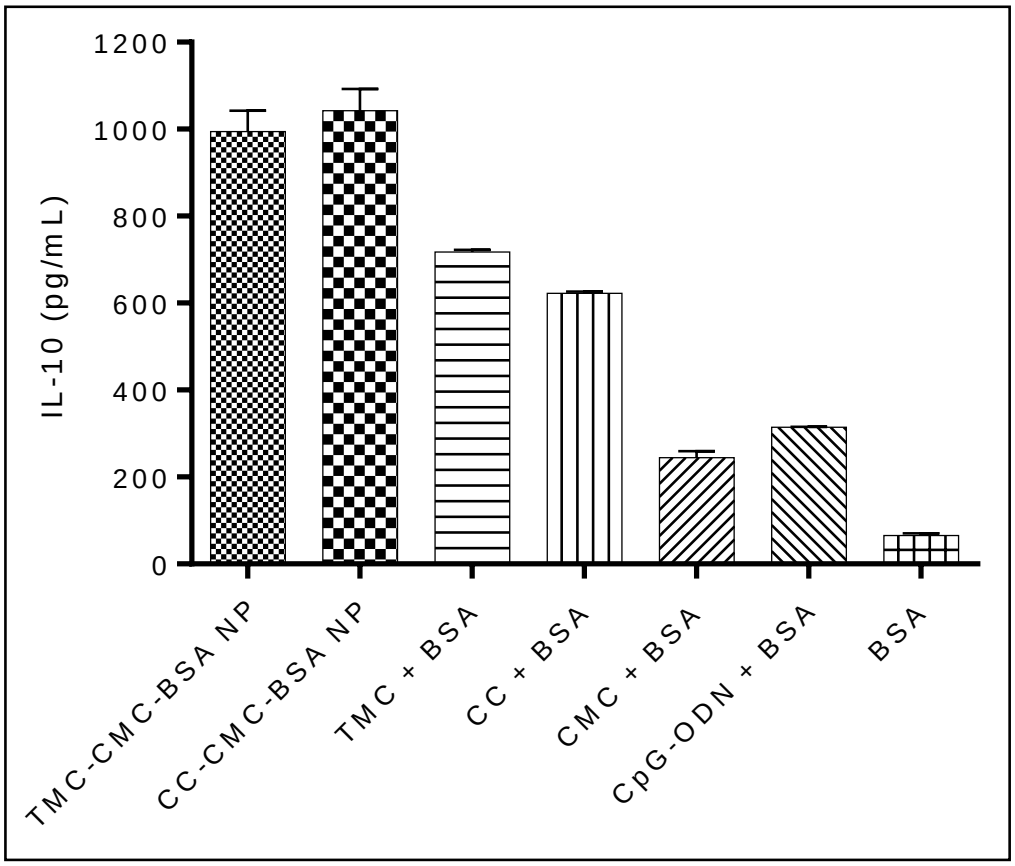
Şekil 4-27: Primer dalak hücrelerinin 10 µg/mL BSA antijeni ile yeniden uyarılması sonucu hafıza hücreleri tarafından salgılanan IL-4 seviyeleri (i.n.)

Sitokin seviyeleri, splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile 56 saat inkübasyondan sonra üstte kalan sıvıda ölçülmüştür. 20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri (TMC-CMC-BSA) , CC-CMC nanopatikülleri (CC-CMC-BSA), TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu ve CpG-ODN + BSA karışımı ile sadece BSA antijeni **(20 µg)** Balb/c farelere intranazal yoldan (n=5) uygulandıktan sonra 253. günde sakrife edilen farelere ait splenositlerde tespit edilen IL-4 seviyeleridir (n=5).



Şekil 4-28: Primer dalak hücrelerinin 10 µg/mL BSA antijeni ile yeniden uyarılması sonucu hafıza hücreleri tarafından salgılanan IL-6 seviyeleri (i.n.)

Sitokin seviyeleri, splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile 56 saat inkübasyondan sonra üstte kalan sıvıda ölçülmüştür. 20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri (TMC-CMC-BSA) , CC-CMC nanopatikülleri (CC-CMC-BSA), TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu ve CpG-ODN + BSA karışımı ile sadece BSA antijeni (20 µg) Balb/c farelere intranazal yoldan (n=5) uygulandıktan sonra 253. günde sakrife edilen farelere ait splenositlerde tespit edilen IL-6 seviyeleridir (n=5).

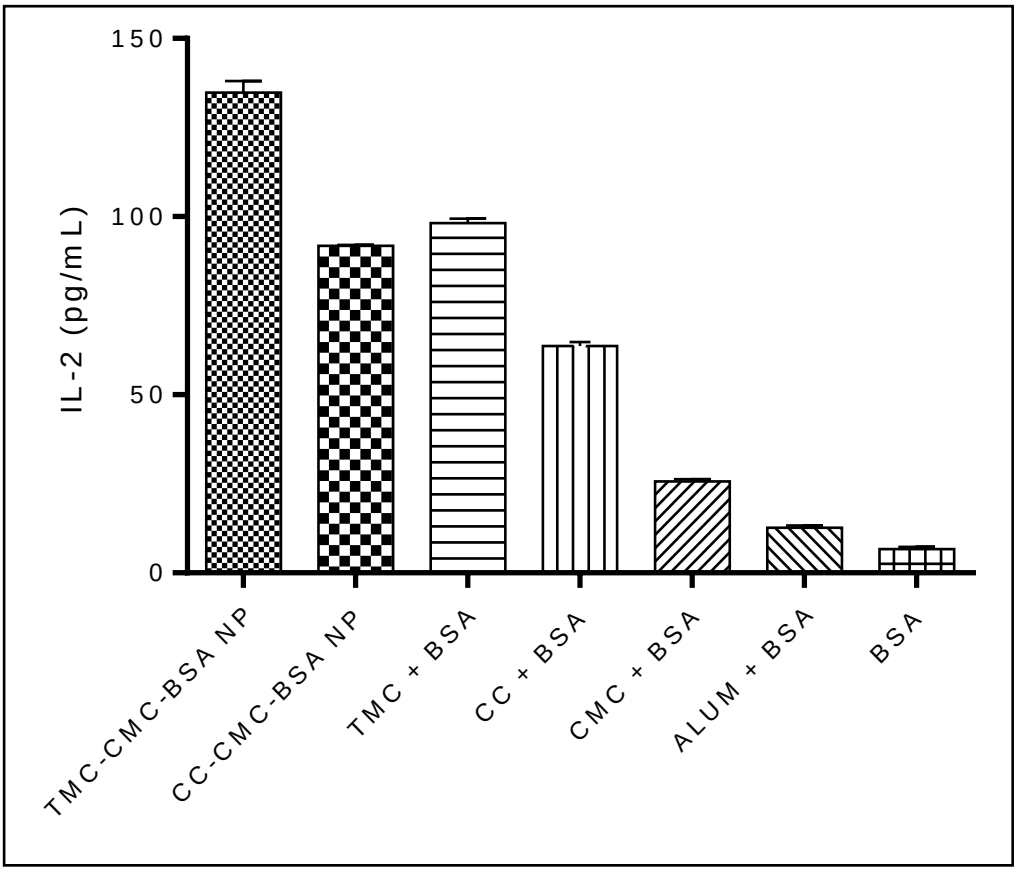


Şekil 4-29: Primer dalak hücrelerinin 10 µg/mL BSA antijeni ile yeniden uyarılması sonucu hafıza hücreleri tarafından salgılanan IL-10 seviyeleri (i.n.)

Sitokin seviyeleri, splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile 56 saat inkübasyondan sonra üstte kalan sıvıda ölçülmüştür. 20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri (TMC-CMC-BSA) , CC-CMC nanopatikülleri (CC-CMC-BSA), TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu ve CpG-ODN + BSA karışımı ile sadece BSA antijeni (20 µg) Balb/c farelere intranazal yoldan (n=5) uygulandıktan sonra 253. günde sakrife edilen farelere ait splenositlerde tespit edilen IL-10 seviyeleridir (n=5).

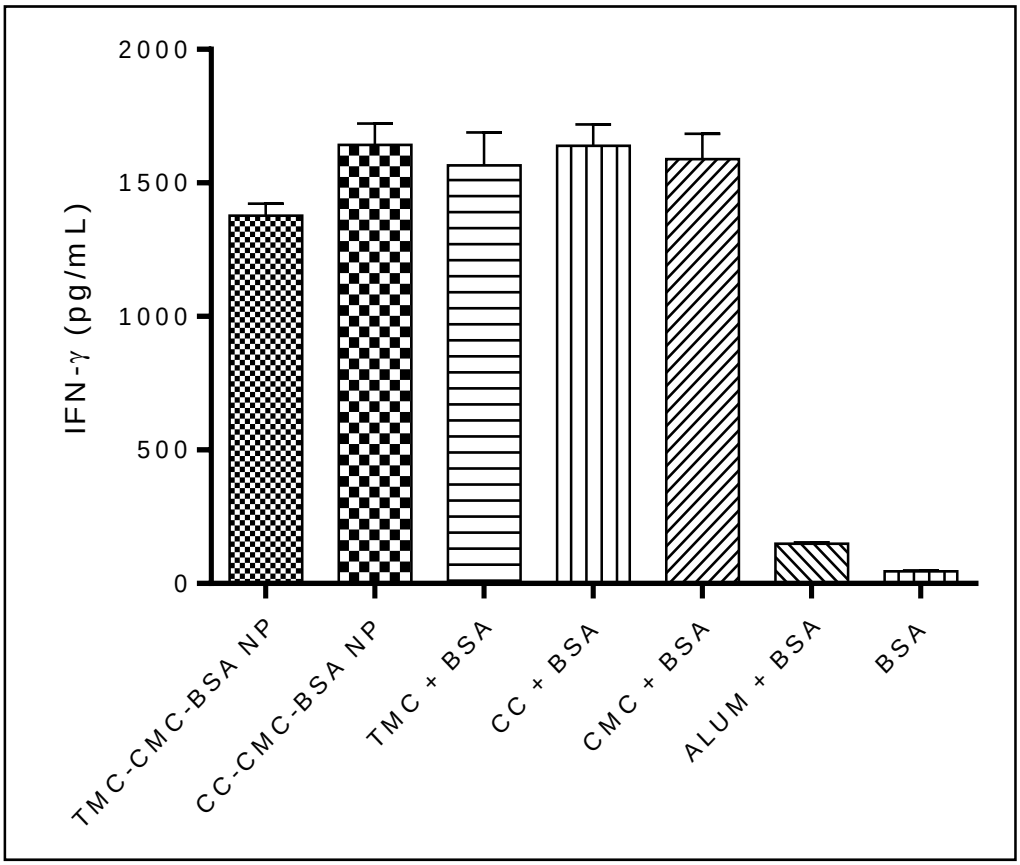
4.11.2.2. Subkütan Yol İle İmmünizasyonu Yapılan Hayvalara Ait Sitokin Sonuçları

Subkütan yol ile immünizasyonu yapılan hayvanların primer dalak hücrelerinin BSA antijeni ile yeniden uyarılması sonucu hafıza hücreleri tarafından salgılanan IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 ve IFN-γ sitokin miktarları Şekil 4.30, 4.31, 4.32, 4.33 ve 4.34'de sırasıyla gösterilmiştir.



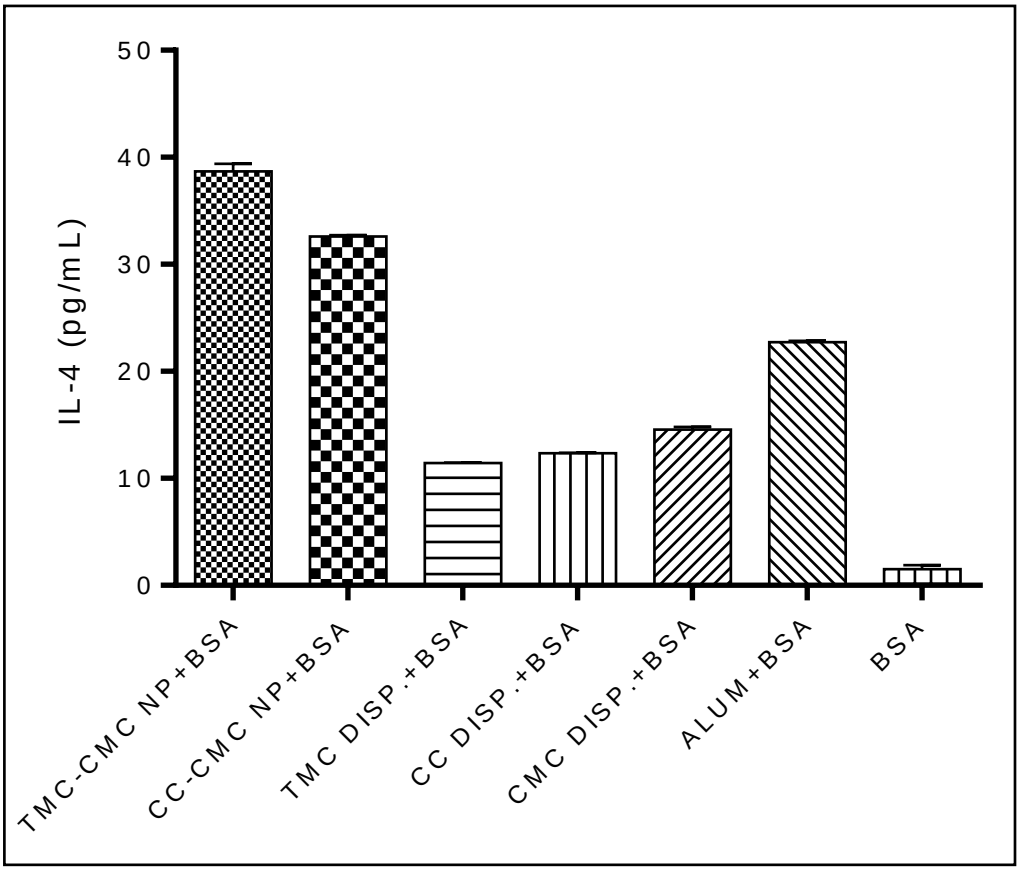
Şekil 4-30: Primer dalak hücrelerinin 10 µg/mL BSA antijeni ile yeniden uyarılması sonucu hafıza hücreleri tarafından salgılanan IL-10 seviyeleri (s.c.)

Sitokin seviyeleri, splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile 56 saat inkübasyondan sonra üstte kalan sıvıda ölçülmüştür. 20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri (TMC-CMC-BSA) , CC-CMC nanopatikülleri (CC-CMC-BSA), TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu ve Alum + BSA karışımı ile sadece BSA antijeni (20 µg) Balb/c farelere subkütan yoldan (n=5) uygulandıktan sonra 253. günde sakrife edilen farelere ait splenositlerde tespit edilen IL-2 seviyeleridir (n=5).



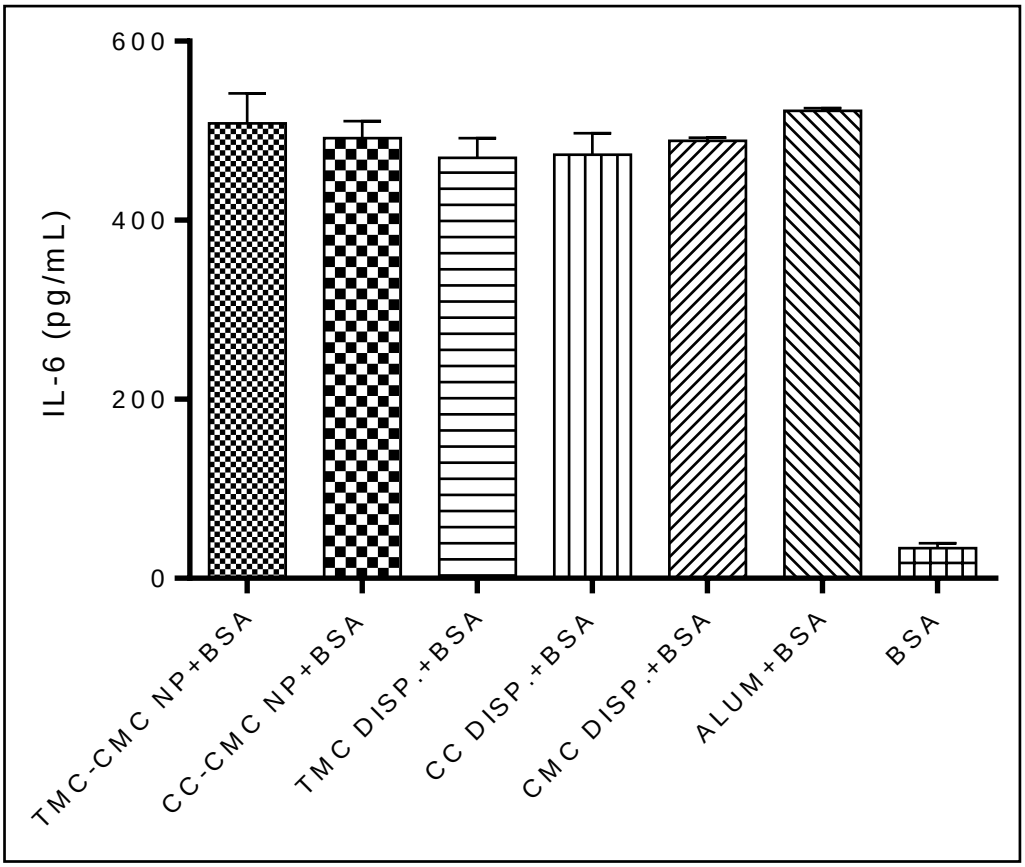
Şekil 4-31: Primer dalak hücrelerinin 10 µg/mL BSA antijeni ile yeniden uyarılması sonucu hafıza hücreleri tarafından salgılanan IFN-γ seviyeleri (s.c.)

Sitokin seviyeleri, splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile 56 saat inkübasyondan sonra üstte kalan sıvıda ölçülmüştür. 20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri (TMC-CMC-BSA) , CC-CMC nanopatikülleri (CC-CMC-BSA), TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu ve Alum + BSA karışımı ile sadece BSA antijeni (20 µg) Balb/c farelere subkütan yoldan (n=5) uygulandıktan sonra 253. günde sakrife edilen farelere ait splenositlerde tespit edilen IFN-γ seviyeleridir (n=5).



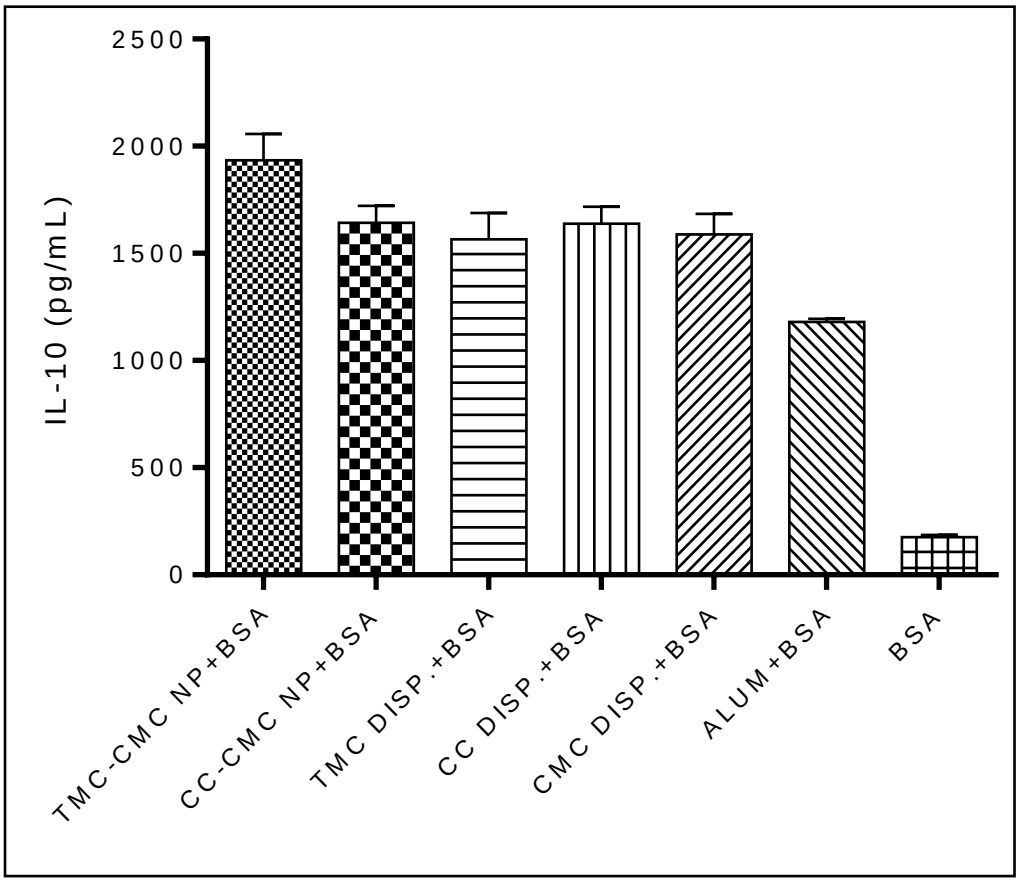
Şekil 4-32: Primer dalak hücrelerinin 10 µg/mL BSA antijeni ile yeniden uyarılması sonucu hafıza hücreleri tarafından salgılanan IL-4 seviyeleri (s.c.)

Sitokin seviyeleri, splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile 56 saat inkübasyondan sonra üstte kalan sıvıda ölçülmüştür. 20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri (TMC-CMC-BSA) , CC-CMC nanopatikülleri (CC-CMC-BSA), TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu ve Alum + BSA karışımı ile sadece BSA antijeni (20 µg) Balb/c farelere subkütan yoldan (n=5) uygulandıktan sonra 253. günde sakrife edilen farelere ait splenositlerde tespit edilen IL-4 seviyeleridir (n=5).



Şekil 4-33: Primer dalak hücrelerinin 10 µg/mL BSA antijeni ile yeniden uyarılması sonucu hafıza hücreleri tarafından salgılanan IL-6 seviyeleri (s.c.)

Sitokin seviyeleri, splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile 56 saat inkübasyondan sonra üstte kalan sıvıda ölçülmüştür. 20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri (TMC-CMC-BSA) , CC-CMC nanopatikülleri (CC-CMC-BSA), TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu ve Alum + BSA karışımı ile sadece BSA antijeni (20 µg) Balb/c farelere subkütan yoldan (n=5) uygulandıktan sonra 253. günde sakrife edilen farelere ait splenositlerde tespit edilen IL-6 seviyeleridir (n=5).



Şekil 4-34: Primer dalak hücrelerinin 10 µg/mL BSA antijeni ile yeniden uyarılması sonucu hafıza hücreleri tarafından salgılanan IL-10 seviyeleri (s.c.)

Sitokin seviyeleri, splenositlerin 10 µg/mL BSA antijeni ile 56 saat inkübasyondan sonra üstte kalan sıvıda ölçülmüştür. 20 µg BSA antijeni içeren TMC-CMC nanopartikülleri (TMC-CMC-BSA) , CC-CMC nanopatikülleri (CC-CMC-BSA), TMC + BSA dispersiyonu, CC + BSA dispersiyonu, CMC + BSA dispersiyonu ve Alum + BSA karışımı ile sadece BSA antijeni (20 µg) Balb/c farelere subkütan yoldan (n=5) uygulandıktan sonra 253. günde sakrife edilen farelere ait splenositlerde tespit edilen IL-10 seviyeleridir (n=5).

5. TARTIŞMA

Mukozal aşı hedeflendirme, çoğu patojenin vücuda giriş noktasının mukozal yüzeyler olması nedeniyle çok ilgi çekici bir çalışma alanı olmuştur. Mukozal yüzeyler arasında ise nazal bölge immünizasyon açısından ayrıca büyük bir öneme sahiptir. Bunun nedenleri arasında nazal epitelyumun göreceli olarak yüksek geçirgenliğe, düşük enzimatik aktiviteye ve immün sistemle ilgili hücrelere sahip olması yer almaktadır (Csaba ve ark. 2009)

Bu tez çalışması kapsamında, farklı kitosan türevleri ile hazırlanan nano aşı taşıyıcı sistemlerin nazal yolla immünizasyonda etkinliği incelenmiştir. Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan N-trimetil kitosan (TMC), kitosan klorür (CC) ve kitosan glutamat (CG) polimerleri, düşük molekül ağırlıklı kitosandan (9 cp) hareketle sentezlenmiştir. Nanopartikül formülasyonları, tez kapsamında sentezlenen pozitif yüklü kitosan polimerlerinin negatif yüklü karboksimetil kurdlan polimeri ile polielektrolit kompleksi oluşturmasına dayanarak hazırlanmıştır. CMC nin sentezi de tez kapsamında kurdlan'dan hareketle yapılmıştır. Polelektrolit kompleksi oluşturma yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllerin çekirdek tabakasını CMC oluştururken kabuk kısmını ise pozitif yüklü kitosan türevleri oluşturmuştur.

Model antijen sığır serum albumini (BSA) miktar tayininde su ortamı kullanılmıştır. Su ortamının seçilme nedeni BSA antijeni ve kullanılan polimerlerin suda çözünürlüğünün yüksek olmasıdır. Deneyler Bradford yönteminin esasları ve BSA antijeninin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu dikkate alınarak yapılmıştır. BSA antijeninin su ortamında ve 588 nm dalga boyunda maksimum absorbans gösterdiği belirlenmiştir.

BSA antijeninin miktar tayini için yapılan deneylerde, bu belirlenen dalga boyu kullanılmıştır. BSA antijeninin bilinen konsantrasyon değerlerine karşılık gelen absorbans değerleri tespit edildikten sonra, bu veriler kullanılarak miktar tayini kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Elde edilen kalibrasyon eğrisinin r^2 değerinin 1'e çok yakın olması, miktar tayini çalışma aralığında bulunan konsantrasyon değerlerinin güvenilir olacağını göstermektedir.

BSA miktar tayini için yapılan analitik yöntem validasyonunda; doğrusallık, doğruluk, kesinlik, özgünlük, teşhis sınırı ve tayin alt sınırı çalışmaları yapılmıştır.

Yapılan doğrusallık deneyinin sonucunda değerler grafik haline getirildikten sonra elde edilen doğruya ait r^2 değeri 1'e yakın ve regresyondan sapmanın standart hatasının düşük oluşu elde edilen verilerin güvenilirliğine işaret etmektedir.

Miktar tayininin doğruluğunu belirlemek amacıyla yapılan deney neticesinde elde edilen verilerde % bağıl standart sapma değerleri %2'den küçük bulunmuştur. Bu bağlamda miktar tayini için belirlenen yöntemin doğru sonuçlar verdiği gösterilmiştir.

Kesinlik çalışması tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik olmak üzere iki şekilde yapılmıştır. Ortaya çıkan verilerin, % bağıl standart sapmalarının %2' den küçük olduğu belirlenmiş olup çalışmanın tekrarlanabilirliği ve ara kesinliği kanıtlanmıştır.

Miktar tayini için seçilen Bradford yönteminin BSA antijenine özgü olup olmadığının belirlenmesi için, formülasyonun içinde bulunan her bir yardımcı maddenin formülasyondaki konsantrasyonlarında ve BSA antijeni içermeyecek şekilde çözeltileri hazırlanmıştır. Ayrıca çalışmada yer alan nanopartiküller de BSA antijeni içermeden hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti ve boş nanopartikül formülasyonlarının Bradford yöntemi kullanarak 200-600 nm dalga aralığında absorbans değerleri incelenmiştir. Çözelti ve boş nanopartikül formülasyonlarının hiçbiri BSA antijeninin maksimum absorbans gösterdiği 588 nm dalga boyunda girişimde bulunmamıştır. Bu da yapılan miktar tayini yönteminin BSA antijenine özgü olduğunu göstermektedir.

Bu miktar tayini yöntemine göre, BSA antijenine ait LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,205 µg/mL ve 0,685 µg/mL olarak bulunmuştur.

Şekil 4.5'de kitosan, CC ve CG'ye ait FT-IR spektrumları verilmiştir. Kitosana ait amin gruplarına ait 1649 cm^{-1}'deki karakteristik pikin, kitosan klorürde 1629 cm^{-1} ve 1525 cm^{-1}'de iki ayrı pik olarak, kitosan glutamatta ise 1621 cm^{-1}'de omuz şeklinde görülmesi kitosandan CC ve CG eldesinin gerçekleştirildiğini göstermektedir.

Şekil 4.6'da gösterildiği üzere TMC'nin FTIR spektrumunda kitosandan farklı olarak 1481 cm^{-1}'de bulunan metil gruplarına ait pik gözlenmiştir. Bununla beraber kitosanda 1589 cm^{-1}'de görülen N-H bağlarından ileri gelen pikin, TMC'de 1561 cm^{-1}'e kayması kitosandan TMC sentez reaksiyonunun gerçekleştiğini göstemektedir.

Şekil 4.7'de gösterildiği üzere CMC'nin FTIR spektrumunda COO- (karboksilat) gruplarına ait 1593 cm^{-1} ve 1425 cm^{-1}'deki pikler gözlenmiştir. Ayrıca, kurdlanda

bulunan OH gruplarının C-O bağından ileri gelen 1162 cm^{-1}'deki pikin kaybolması kurdlanın karboksimetilasyonu sonucu CMC'nin oluştuğunu göstermektedir.

TMC'ye ait ^{1}H NMR spektrası Şekil 4.8'de gösterilmiştir. 3.32 ppm de görülen pik N-trimetilasyonu ($N(CH3)_3$) gösterirken, 3.12 ppm de görülen pik ise N-dimetilasyonu ($N(CH3)_2$) göstermerktedir .Piklere ait bu değerler Le Dung ve ark. (1994) nın çalışmalarında elde edilen bulgular ile uyumludur. Piklerin denklem 3-3 ve 3-4'te belirtildiği şekilde hesaplanması sonucunda, sentezlenen TMC'nin dimetilasyon derecesi %22, trimetilasyon derecesi ise %77 bulunmuştur. Bu kadar yüksek katernizasyon derecesi elde edebilmek için TMC iki basamaklı sentez yöntemiyle elde edilmiştir. Sievel ve ark. (1998) nın modifiye ettiği bu yöntem de, baz reaksiyonunun tekrarlanması nedeniyle dimetilasyon anlamlı derecede düşerken trimetilesyon oranı artmaktadır. İlk sentez aşamasından sonra trimetilasyon derecesi yaklaşık %15 iken, trimetilasyon reaksiyonunun tekrarlanması ile bu değer %50 ye kadar artış gösterimştir. Tez kapsamında sentezlediğimiz TMC nin trimetilasyon derecesi liştersatürde kayıtlı olandan fazladır. Bunun nedeni ise, çalışmamızda TMC'nin saflaştırılmasında, literatürdekinin aksine kristalizasyon amacıyla antisolvent ile çöktürme yöntemi yerine, dializ yöntemi kullanılmasıdır.

CMC'ye ait ^{13}C NMR spektrumu Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Elde edilen bu spektrum, Jin ve ark. (2006)'nın yaptıkları çalışmada elde edilen spektruma benzerlik göstermektedir. Bu çalışmaya göre, ß-(1-3)-D–glukan yapısını ana zincirine ait pikler: 103,7 (C-1), 73,9 (C-2), 86,7 (C-3), 68,6 (C4), 76,6 (C5) ve 61,3 (C6)'dır. Sentezlediğimiz CMC'nin ^{13}C NMR Spektrumunda da referansa benzer şekilde ana zincire ait pikler tespit edilmiş ve orjinal polisakkarit yapısının korunduğu görülmüştür. CMC'nin NMR spektrumunda karboksimetil grubundan dolayı yaklaşık 178 ppm'de bir pik elde edilmiştir. Yine, 70 ppm civarında pik şiddetinin artması ise, daha önce 60 ppm civarında pik veren primer karbonun (C6), karboksimetil grubunun ilavesi sonucunda pikte yer değiştirmeye neden olduğunu göstermektedir.

Hazırlanan nanopartikül formülasyonları ile beraber formüle edilen biyoaktif bileşiklerin fizikokimyasal özelliklerinin ve aktivitelerinin korunması ve toksik olmaması amaçlanmaktadır (Umerska ve ark. 2012). Bu nedenle, nanopartiküllerin hazırlanmasında polielektrolit komplek oluşturma yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, kitosan türevlerinin (TMC, CC, ve CG) iyonize amin grupları (NH3+) ve CMC'nin karboksilik

asit grupları (COO-) arasındaki etkileşimler sonucunda polielektrolit kompleksler oluşmaktadır (Polaxe ve Delair 2013). Polielektrolit komplekslerinin hazırlanmasında kullanılan polimerlerin konsantrasyonu, pozitif/negatif yüklü polimer oranı, hazırlama ortamları, sıcaklık gibi parametreler, nanopartiküllerin partikül büyüklüğünü, büyüklük dağılımını ve fiziksel stabilitelerini önemli derecede etkilemektedir (Ramasamy ve ark. 2014).

Nanopartikülleri hazırlamak için en uygun uygun ortamı belirlemek amacıyla farklı ortamlarda (pH 7,4 PBS çözeltisi, izotonik sodyum klorür çözeltisi (%0.9 NaCl, salin) ve distile su) hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklükleri ve zeta potansiyelleri incelenmiş ve bulgular 4.7'de belirtilmiştir. Salin ve pH 7,4 PBS çözeltisinde hazırlanan bazı nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklükleri, su ortamında hazırlananlardan daha küçük boyutta (Tablo 4.6, Tablo 4.7 ve Tablo 4.8) olmasına rağmen, zaman içinde bu partiküllerin agregasyona uğradığı gözlenmiştir. Yine, salin ve pH 7,4 PBS çözeltisi ortamında hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyellerinin, su ortamında hazırlananlarınki ile karşılaştırıldığında, daha düşük olduğu görülmüş ve bu durumun da kolloidal instabiliteye neden olduğu belirlenmiştir. Bunun sebebinin, partikül yüzeyine adsorbe olabilecek miktarın üzerinde elektrolit varlığında zıt yüklü iyonların aşırı birikimi olduğu düşünülmektedir. Sulu ortam da hazırlanan partiküllerin fiziksel stabilitesi ise, salin ve PBS çözeltisinde hazırlananlarla karşılaştırıldığında, ortamda elektrolit bulunmaması ve buna bağlı olarak daha yüksek zeta potansiyel elde edilmesi nedeniyle, artış göstermiştir. Lin ve ark. (2007) yaptığı çalışmada da pH 7.4'te kitozanın deprotanosyonu sonucu nanopartiküllerin çöktüğü gözlenmiştir. Polaxe ve Delair (2013)'in çalışmalarında ise, partikül ara yüzeyindeki kitosan zincirlerinin protonlanarak sulu dış faza uzanması, partiküllerin zeta potansiyelini arttırmakta ve partikülleri agregasyondan korumaktadır.

Nanopartikülleri hazırlamak için en uygun ortamın su olduğu belirlendikten sonra, pozitif yüklü polimerin negatif yüklü polimere kütlesel oranları 1:1'den 5:1'e kadar olacak şekilde 16 farklı formülasyon hazırlanmış ve partiküllere teorik olarak 7,5 µg/mL model antijen BSA yüklenmiştir. BSA miktarı ise boş nanopartiküllerden çıkan sonuçlardan yola çıkarak devam edilmesi düşünen formülasyonların (C3 ve T3) ağırlığının %1'i oranında kabul edilmiştir Bu oranın seçilmesinde Pandit ve ark. (2007) çalışması örnek alınmıştır.Hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı

(Poldispersite indeksi, PDI), zeta potansiyeli, üretim verimi ve enkapsülasyon etkinliği incelenmiştir.

BSA yüklü nanopartiküllerin büyüklükleri 153 nm ile 562 nm arasında değişirken, boş nanopartiküllerin büyüklükleri 160 ile 568 nm arasında bulunmuştur. Genellikle, nanopartiküllerin BSA ile yüklenmiş halinin boş haline göre boyutu çok küçük miktarda düşme göstermiş olup göz önünde bulundurulmamıştır.

Pozitif yüklü polimerin (polikatyon) negatif yüklü polimere (polianyon) oranı 2:1 olan T1 kodlu BSA yüklü TMC-CMC nanopartikül (TMC-CMC-BSA) formülasyonu (153,2±0,5 nm) ve C1 kodlu BSA yüklü CC-CMC nanopartikül (CC-CMC-BSA) formülasyonu (188,4±1.3) kendi grupları içerisinde en küçük partikül büyüklüğüne sahip formülasyonlardır. BSA yüklü CG-CMC nanopartikül (CG-CMC-BSA) formülasyonu (282,0±5,9) ise en küçük partikül boyutunu 4:1 polimer oranında (G9) hazırlandığında vermiştir. Kitozan glutamat içeren nanopartikül formülasyonda kütlesel oranın daha büyük olması CEVHER ve ark. (2015) yaptığı çalışmada da gözlenmekte olup nedeni ise glutamik asit tuzunun pozitif zeta potansiyelini düşürmesi ve sonucunda nötralizasyona neden olarak nanopartikül formülasyonunun kolloidal stabilitesini yitirmesi olarak açıklanmıştır.

Bazı formülayonlarda ise agregasyon meydana gelmiştir. Bunun nedenlerinden biri ortamda yüksek miktarda madde (polimerler) bulunması olduğu düşünülmektedir ki bu durumun agregasyona neden olabileceği bilinmektedir (Schatz ve ark. 2004). Negatif yüklü CMC'nin yüksek miktarda kullanılması ve polikatyon/polianyon oranının 1 e yaklaşması ile pozitif yüklü kitosan türevi tamamen nötralize olmaktadır. Bu durumda, nanopartiküllerin zeta potansiyeli düşmekte ve kollodial stabiliteleri azalarak agregasyona neden olmaktadırlar ve fazla miktardaki CMC'nin sahip olduğu negatif iyon yükünün faz inversiyonuna yol açtığı düşünülmektedir. Polikatyon/polianyon kütle oranı 1'in üzerine çıktığında ise, partikül boyutu azalmış ve partikül yüzeyindeki net yük artışı sonucu kollodial stabilite artış göstermiştir. Bu sonuçlar Cevher ve ark. (2015) çalışması ile uyum içindedir.

Nanopartikül boyutu CMC'nin kütlesel miktarının arttırılmasıyla paralel olarak artmaktadır. Karboksimetil kurdlan büyük bir polimer olduğu için yüksek miktarlarda eklenmesi daha büyük partiküllerin oluşmasına neden olmaktadır.

Zeta potansiyel, kolloidal sistemlerde elektrokinetik potansiyel için kullanılan bilimsel bir terimdir. Dispersiyon ortamı ve disperse olan nanopartiküle bağlı sıvının stasyoner tabakası arasındaki farkı açıklayan bir terimdir. Zeta potansiyeli, çifte tabakadaki elektrik yüzey potansiyeline ya da stern potansiyeline eşdeğer olmamasına karşılık çifte tabaka özelliklerinin karakterizasyonunda çoğunlukla uygun olan tek seçenektir. Zeta potansiyelinin ölçümü yüklü koloidlerin yüzeyinin karekterize edilmesinde halihazırda en basit ve doğru yoldur (Honary ve Zahir 2013).

İn vitro toksisite ve antijen bütünlüğü testleri için TMC-CMC-BSA partikülleri ve CC-CMC-BSA partikülleri 2:1 (pozitif yüklü polimer : negatif yüklü polimer) oranında kullanılırken CG-CMC-BSA 3:1 oranında kullanılmıştır. Bununda nedeni, kitozan türevlerinin birbiri arasındaki yük dansite farklarından kaynaklanmaktadır. TMC ve CC'nin yük dansitesi CG'ye göre daha yüksektir. Bu nedenle CG miktarının oranı formülasyonda arttırılarak partikül yüzey yükü değiştirilmiş olup yapının kolloidal stabilitesi arttırılmıştır. Teorik olarak, (+/-) 30 mV üzerindeki zeta potansiyeline sahip nanopartiküller süspansiyon içinde stabil kalmaktadır bu da göstermektedir ki yüzey yükü partiküllerin agregasyonunu engellemektedir (Lebre ve ark. 2012).

Polikatyon/polianyon oranının artışı ile, nanopartiküllerin zeta potansiyelleri de pozitif yöne doğru artış göstermiştir. Örnek olarak 2:1 oranındaki C1 formülasyonunun zeta potansiyeli +36,2 iken 3:1 oranındaki C5 formülünün zeta potansiyeli +53,3'tür. CC-CMC-BSA nanopartiküllerinin +32,5-+54,2; CG-CMC-BSA nanopartiküllerinin +24,4-+44,7 ve TMC-CMC nanopartiküllerinin +23,5-+54,8 mV arasında zeta potansiyele sahip oldukları görülmüştür. Boş nanopartiküller, BSA yüklü nanopartiküllere göre genelde daha yüksek zeta potansiyele sahiptir. Bu durum BSA'in amfoterik özellikte bir madde olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Moghassemi ve ark. 2016).

Kitosan klorür ile hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyelleri, kitosan glutamat ile hazırlananlara göre daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni, glutamat iki karboksilik ve bir amin kalıntısı içermekte olup pKa değerleri sırasıyla 2,19, 4,25, ve 9,67'dir. pH 5'in üzerinde, proton vermiş karboksilik grubu negatif yüklü haldedir. Sadece kitosan zincirlerinin değil aynı zaman da karşıt iyon nanopartiküllerin oluşumunda yer alması gerekmektedir. Bu nedenle polimer tuzu seçiminin dikkatli bir şeklide yapılması gerekmektedir (Umerska ve ark. 2012).

Farmasötik dozaj şeklinin üretim veriminin yüksek olması, ürünün endüstriyel açıdan uygulanabilir olması açısından büyük önem taşımaktadır. Poliiyon kompleks oluşturma yöntemi ile hazırlanan formülasyonlardan elde edilen üretim verimleri %22,64 ile %68,73 arasında değişmektedir. Bu verim değerleri partikül hazırlamada kullanılan diğer tekniklerle elde edilen (örneğin, püskürterek kurutma ve süperkritik sıvı tekniği) verim değerlerinin üzerindedir (Huang ve ark. 2003).

BSA yüklü CC-CMC nanopartikül formülasyonlarından elde edilen üretim verimi %43,31 ile %68,73 arasında değişiklik göstermekle beraber en yüksek verim C3 formülasyonunda (%68,73) gözlenmiştir. BSA yüklü CG-CMC nanopartikül formülasyonlarından elde edilen üretim verimi ise %32 ile %52,28 arasında bulunmuştur. En yüksek verim G9 formülasyonunda (%52,28) gözlenmiştir. Son olarak, BSA yüklü TMC-CMC nanopartikül formülasyonlarından elde edilen üretim verimi değerleri %22,64 ile %66,15 arasındadır ve en yüksek verim T10 formülasyonunda (%66,15) gözlenmiştir. Elde edilen verim sonuçlarının geneline bakıldığnda katyonik polimerin anyonik polimere kütlesel oranı arttığında verimin azaldığı gözlenmiştir. Benzer sonuçlar Cevher ve ark. (2015) çalışmasında da belirtilmiş olup 2:1 kütlesel oranında hazırlanan nanopartiküllerin 5:1 oranında hazırlanan nanopartiküllere göre çok daha yüksek verim verdiğini saptamışlardır.

Tablo 4.10, 4.12 ve 4.14'de gösterilen üretim verimi değerleri incelendiğinde, nanopartiküllerin verimi Kitosan türevi/karboksimetil kurdlan oranından etkilenmektedir. Daha detaylı olarak bakıldığında kitosan türevine göre CMC'nin miktarının arttırılması verimde hafif bir artışa neden olmuştur. Bunun da nedeni, daha yüksek miktarda CMC'nin nanopartikül formülasyona katılması daha fazla sayıda partikül oluşumuna sebebiyet vermesidir. Liu ve ark. (2007) çaşışmasında da heparin/kitosan içeren polielektrolit kompleks oluşumlarında heparirinin miktarı arttırıldığında verimin arttığı gözlenmiştir.

Protein içeren ilaçların geliştirilmesi açısından partiküler taşıyıcıların yeterince yüksek oranda protein yüklemesine sahip olması önemlidir. Yüklenme, uygulanan tekniğe ve kullanılan etkin veya yardımcı maddelerin fizikokimyasal özelliklerine göre değişim göstermektedir. Bu çalışmada enkapsülasyon etkinliği , nanopartiküllerin santrifüjü sonrasında üstte kalan sıvıdan örnek alınarak bradford yöntemiyle değerlendirilmiştir.

BSA yüklü CC-CMC nanopartikül formülasyonlarından elde edilen enkapsülasyon etkinliği değerleri %31,66 ile %89 arasında değişiklik göstermekle beraber en yüksek değer C3 formülasyonunda (%89) gözlenmiştir. BSA yüklü CG-CMC nanopartikül formülasyonlarından elde edilen enkapsülasyon etkinliği değeri ise %47,83 ile %81,27 arasında bulunmuştur. En yüksek değer G5 formülasyonunda (%81,27) gözlenmiştir. Son olarak, BSA yüklü TMC-CMC nanopartikül formülasyonlarından elde edilen verim değerleri %75,77 ile %89,78 arasındadır ve en yüksek değer T3 formülasyonunda (%89,78) gözlenmiştir. Bu sonuçlar teorik yükleme %1 (a/a) olarak alındığında elde edilen sonuçlardır. %1 oranının seçilme nedeni ise partiküler aşı sistemlerinde yaygın olarak kullanılan bir oran olmasındandır (Pandit ve ark. 2007).

Saklama stabilitesi, farmasötik ürünün geliştirilmesindeki önemli bir faktördür. Partiküler aşılar sistemlerinde ise saklama boyunca iki problemle karşılaşılabilmektedir. Bunlar, kolloidal stabilite veya aktif stabilite (antijen bütünlüğü) ile ilgilidir (Jiang ve ark. 2005).

Bundan dolayı, hazırlanan nanopartiküllerin kolloidal stabilitesinin incelenmesi için farklı formülasyonların su içindeki partiküler dispersiyonları 12 hafta boyuncaboyunca +4±1 °C'de saklanmıştır. Ortalama partikül boyutları önceden belirlenen zaman noktalarında ölçülmüştür (hazırlandıktan sonra, 1.hafta, 2. Hafta, 4. hafta ve 12. hafta). Örneklerin çoğu su ortamında en az bir ay boyunca stabil kalmıştır. Bazı formülasyonların ise partikül boyutları ve PDI'larında hafif bir artış veya azalma meydana gelmiştir.

Katyonik polimerin anyonik polimere kütlesel orani arttıkça partikül boyutu küçülmekte olup partikül oluşum basamağı ve saklama süresince stabilite güçlenmiştir (2:1 orandaki C3 ve T3, 3:1 oranındaki G5 formülasyonu gibi). İkincisi bazı formülasyonlarda zamanla partikül boyutunda bulunduğu ortamdan ve oluşum oranlarından bağımsız olarak bazı düşüşler gözlenmiştir. Bu düşüşün nedeni olarak partiküllerin yavaş bir şekilde tekrardan organize olduğu düşünülmektedir. Polaxe ve Delair (2013)'in kitosan ve hyaluronik asitten oluşan nanopartiküllerin 30 günlük fiziksel stabilite çalışmasından elde edilen partikül büyüklüğü sonuçlarının zamana bağlı gösterdiği düşüş ile benzerlik göstermektedir.

Hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonlarının boyut, PDI, zeta potansiyeli, verim, enkapsülasyon etkinliği ve fiziksel stabilite sonuçları bir bütün olarak

değerlendirildiğinde her bir gruptan birer formülasyon olmak üzere toplamda üç formülasyonla sonraki çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir. Bu formülasyonlar C3, G5 ve T3'tür.

Sulu bir çözeltide oluşan nanopartikülleri bulunduğu ortamdan ayırmak için en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri de santrifüj işlemidir (Vila ve ark. 2004). Nanopartiküller santrifüjle ortamdan ayrıldıktan sonra, ısıya hassas protein yapısında madde içeren nanopartiküllerin liyofilizasyon işlemi ile kurutulurlar. Liyofilizasyon işlemi, dondurma ve sonrasında suyun uzaklaştırılması sırasında nanopartiküllerin kolloidal stabilitelerini bozacak stres etkisi yaratmaktadır. Bundan dolayı, liyofilizasyon işleminden önce donmaya karşı koruyucu maddelerin nanopartikül süspansiyonlarına eklenmesi gerekmektedir. Bu maddeler, nanopartiküllerin camsı bir matriks içerisinde hareketsiz şekilde kalmasını sağlayarak agregasyona uğramalarının engellemekte ve buz kristallerinin mekanik stresine karşı korunma sağlamaktadır (Sonaje ve ark. 2010)

Santrifüj işleminin nanopartiküllerin fiziksel stabilitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla BSA yüklü nanopartikül formülasyonları (CC-CMC, CG-CMC ve TMC-CMC nanpartikülleri) 5000 rpm'de 30, 60 veya 120 dakika ya da gliserol yatağı oluşturularak 120 dakika santrifüj edilmiştir. Liyofilizasyon işleminin nanopartiküllerin fiziksel stabilitesi üzerine etkisini incelemek için ise, 120 dakika süre ile 5000 rpm'de santrifüj edilen nanopartiküllere %5 veya %20 (a/a) oranında trehaloz ilave edilerek liyofilizasyon işlemi uygulanmıştır. Bütün bu işlemlerin sonrasında nanopartiküller, tekrar su içinde süspande edilerek partikül büyüklükleri ve büyüklük dağılımları incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.18, 4.19 ve 4.20'de gösterilmiştir.

5000 rpm de 120 dak santrifüj edildikten sonra hiçbir nanopartikül formülasyonun tekrar süspande edilemediği ve tümünün yüksek oranda agrege oldukları gözlenmiştir. Aynı devirde 60 dakika santrifüj işlemi sonrasında TMC-CMC nanopartikülleri dışındaki tüm nanopartikül formülasyonları agrege olurken, 30 dakika santrifüj sonrasında ise nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu ve PDI değerlerinde küçük artışlar görülmüştür. Santrifüj işleminde gliserol yatağının kullanılması tüm nanopartikül formülasyonlarının agregasyonunu önlemiştir.

Liyofilizasyon çalışmalarında ise %5 ya da %20 trehaloz ilavesi partiküllerin agregasyonunu engelleyememiştir.

Nanopartiküllere enkapsüle edilen protein yapısındaki antijenin aktivitesini koruyabilmesi için, hazırlama esnasında ve sonrasındaki aşamalarda karşılaşılabilecek fiziksel stres şartlarına karşı yapısal bütünlüğünü koruması gerekmektedir. Bundan dolayı protein bütünlüğünü incelemek için sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezinden yararlanılmıştır. Bu yöntem protein yapısındaki maddenin herhangi bir degradasyon veya agregasyona uğrayıp uğramadığı ile ilgili fikir vermektedir (Blanco ve ark. 1997).

Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan polielektrolit kompleksi oluşturma yöntemi, genelde enkapsüle edilen protein yapısındaki maddede agregasyon veya degradasyona neden olmayan bir yöntemdir. Çünkü bu yöntemde organik çözücü ve yüksek enerji uygulama gibi antijenin yapısına zarar verecek işlemler uygulanmamaktadır. Bu bilgiyle uyumlu olarak deneyin sonucunda da, nanopartiküllere yüklenmiş protenik antijenin bantı ile standart protein çözeltisinin gösterdiği antijen bandının pozisyonu aynı seviyede bulunmuş, agregasyon veya degradasyon sonucu molekül ağırlığındaki değişikliklere bağlı olarak hattın farklı bir bölgesinde oluşan herhangi bir bant gözlenmemiştir (Şekil 4.13). Bu da partiküllerin hazırlanması esnasında antijenin bütünlüğünü koruduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, polielektrolit kompleksi oluşturma yönteminin kullanıldığı diğer çalışmalarla (Briones ve Sato 2010; Cevher ve ark. 2015, Prego ve ark. 2010, Sayın ve ark. 2009) uyum içerisindedir.

Farklı konsantrasyonlardaki (0,05; 0,1; 0,5; 1 ;2 ve 5 mg/mL) CC-CMC, CG-CMC ve TMC-CMC nanopartikül dispersiyonlarının ve bu nanopartikülleri hazırlamak için kullanılan polimer çözeltilerinin A549 ve Calu-3 hücre hatlarına toksisitesi incelenmiştir. Polimerlerin ve nanopartikül formülasyonlarının A549 ve Calu-3 hücre hatlarında hücre yaşayabilirliğine (%) etkisi toksik bir materyal olan ve çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullanılan SDS çözeltisi ile karşılaştırılmıştır.

Yapılan MTT deneyinde elde edilen sonuçlar bulgular kısmında Şekil 4.14 ve 4.15'te gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, TMC polimer dispersiyonunun Calu-3 ve A549 hücre hatlarında SDS çözeltisine göre daha az toksisite gösterdiği ($p<0.05$), konsantrasyonun artışı ile 5 mg/mL'de ise benzer toksisiteye sahip olduğu görülmüştür ($p>0.05$). . Kitosan tuzları (CC ve CG) ise 5 mg/mL'ye kadar tüm denenen konsantrasyonlarda hem SDS hem de TMC'den çok daha düşük toksisite göstermiştir. Her iki polmer tuzunun toksisiteleri karşılaştırıldığında, A549 hücre hattında 1mg/mL

konsantrasyon değerine kadar benzer toksisite gösterirken ($p>0.05$) 2 mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyon değerlerinde CG dispersiyonu, CC dispersiyonundan daha düşük toksisite göstermiştir ($p<0.05$). Calu-3 hücre hattında ise, CG dispersiyonu tüm konsantrasyonlarda CC dispersiyonuna göre daha düşük toksisite göstermiştir ($p<0.05$).

CMC dipersiyonunun her iki hücre hattında da tüm konsantrasyonlarda diğer polimer dispersiyonlarına göre çok daha düşük toksisite gösterdiği görülmüştür ($p<0.05$). Polielektrolit kompleksi hazırlama yöntemiyle oluşturulan tüm nanopartikül formülasyonları da CMC dispersiyonu gibi, diğer katyonik polimer dispersiyonlarından daha düşük toksisite göstermiştir.

Nanopartikül formülasyonları içerisinde, kitosan tuzlarına göre daha fazla protonlanmış olan TMC ile hazırlanmış TMC-CMC-BSA nanopartikülleri, diğer nanopartiküllerden biraz daha fazla toksisite göstermiştir ($p<0.05$).Elde edilen bulgular Amidi ve ark. (2006)'nın sonuçları ile benzer doğrultudadır. Hücrelere 5 mg/ml konsantrasyonda verilen nanopartikül formülasyonlarının aynı konsantrasyondaki dispersiyon formüllerine göre daha düşük toksisite gösterdiği gözlenmiştir. Böylece polimerlerin olası toksik etkilerinin PEC yöntemiyle nanopartikül hazırlanması sonucu engellenebileceği gösterilmiştir. Çünkü bu hazırlama yönteminde organik çözücüler gibi toksisiteye neden olabilecek yardımcı maddeler kullanılmamış hazırlama ortamı olarak sudan yararlanılmıştır. Bu elde edilen sonuç Cevher ve ark. (2015) elde etikleri sonuçlarla uyum göstermektedir.

İn vitro optimizasyon ve hücre kültürü çalışmaları sonucunda seçilen formülasyonların sistemik ve mukozal immüniteye etkisini araştırmak amacıyla, nanopartiküller Balb/c farelere subkütan ve intranazal yolla verilmiştir.

İn vivo çalışmalar için TMC-CMC-BSA partikülleri ve CC-CMC-BSA partikülleri 2:1 (pozitif yüklü polimer : negatif yüklü polimer) oranında seçilmiştir. Partiküllerin boyutu ve boyut dağılımı adjuvan aktiviteleri açısından önemli olduğu genel olarak kabul görmektedir (Oyewumi ve ark. 2010). Negamoto ve ark. 0,4 ve 1 μm ortalama çapa sahip ovalbumin yüklü kitozan partikülleri hazırlamış ve sıçanlara intranazal olarak uygulandığında 3 μm boyutundaki partikülllere göre anlamlı derecede daha yüksek IgA üretimi göstermektedir. Bu tezde hazırlanan formülasyonlar ise nazal ya da subkütan olarak farelere uygulanmıştır. Nazal yoldan aşılama ile mukozal immünizasyon elde edebilmek amaçlanmıştır. Mukozal aşılama intranazal, oral,

pulmoner, rektal veya vajinal gibi birçok yolla sağlanabilmektedir. Bunların arasında, nazal ve oral yollar aşı uygulaması için en çok kullanılabilir ve uygulanabilir olanlardır. Nazal yoldan aşılamanın tercih edilmesinin sebebi, aşı uygulama için enzim ve pH açısından daha uygun bir ortam sağlamasıdır. Potansiyel olarak daha düşük dozda antijne gereksinim duyulmakta, doz uygulaması doğrudan olmakta ve hasta uyum sağlayabilmektedir. İlaveten, nazal kavite büyük bir yüzey alanına sahip olup solunum epitelinin altında bulunan lokal lenf nodları bulundurmaktadır. Ayrıca, yoğun damarlanma bölgesine sahip olduğu için venöz kan doğrudan sistemik dolaşıma katılmaktadır. İntranazal aşılama aracılığıyla solunum yolunda ve genital yolda kuvvetli yanıtlar elde edilmesiyle genel mukozal immün sistemi (CMIS) uyarılmaktadır. Bununla beraber geçmiş deneyimlere bakıldığında nazal formülasyonlar mukosilier klirens ve çözünür antijenlerin yetersiz alımı nedeniyle beklenilenin altında etki göstermiştir. Etkili bir mukozal aşı için, formülasyon antijenin stabil kalmasını, lenfatik sistemle etkileşim için gerekli olan zaman kadar antijenin taşınılan bölgede kalmasını, doğal ve hücresel sistemlerin her ikisini de uyarabilmeli ve patojene karşı uzun süreli bağışıklık sağlamalıdır (Jabbal-Gill ve ark. 2012).

Antijenler tarafından uyarılan sistemik immün yanıtlar hücresel ve hümoral olabilmektedir. Genelde, hümoral immün yanıt Th2 ile yönlendirilen immün yanıt ile kendini gösterirken, hücresel immün yanıt ise Th1 olarak göstermektedir. (Abbas ve Lichtman, 2006). Yanıtın Th1 veya Th2 olduğunu değerlendirmek için, B hücreleri tarafında salgılanan serum IgG alt sınıflarının (IgG_1 ve IgG_{2a}) ve hafıza T hücreleri tarafından salgılanan sitokinlerin belirlenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda, *in vivo* deneylerde, serum antikor seviyeleri indirekt ELISA ile dalak hücrelerinin yeniden uyarılması sonucu salgılanan sitokin miktarları ise sandviç ELISA yöntemi ile tayin edilmiştir.

Bu çalışmada serum IgG, IgG_1 ve IgG_{2a} antikor seviyeleri 13., 21., 60. ve 253. günlerde farelerden elde edilen kan örneklerinin analizi sonucu elde edilmiştir. IgG alt gruplarından IgG_1 Th2 yanıtının uyarılması, IgG_{2a} ise Th1 yanıtının uyarılması önem taşımaktadır (Abbas ve Lichtman, 2006).

İntranazal yolla uygulanan formülasyonların 13. günde oluşturduğu serum antikor seviyeleri incelendiğinde, CC-BSA dispersiyonunun en yüksek serum IgG titresine sahip olduğu görülmektedir. Yine, 13. günde BSA içeren polimer dispersiyonlarının (TMC-

BSA, CC-BSA ve CMC-BSA), nanopartikül formülasyonlarına (TMC-CMC-BSA ve CC-CMC-BSA) göre daha yüksek IgG antikor titrelerine sahip olduğu görülmüştür. 21. gün ve 60. gün yanıtlarına bakıldığında ise nanopartikül formülasyonlarının verdiği serum IgG titrelerinde sürekli artış gözlenirken, BSA + polimer dispersiyonlarında sadece 21. gün ölçümlerinde artış görülmüş ve 60. gündeki serum IgG titreleri azalmıştır. 253. günde ise tüm formülasyonlardaki serum IgG seviyelerinde önemli oranda düşüş gözlenirken, sadece nanopartikül formülasyonları yüksek seviyelerde IgG titresi göstermiştir. Bunun da sebebinin partiküler sistemlerde antijenin uzun süreli salımı olduğu düşünülmektedir. Bu da uzun süreli immünizasyon sağlamada TMC-CMC-BSA ve CC-CMC-BSA nanopartiküler aşı sistemlerinin umut verici olduğunu göstermektedir. Önemli bir mukozal adjuvan olan CpG ODN nin BSA antijeni ile birlikte uygulanması (CpG ODN-BSA) sonucu, 13. ve 21. günde yüksek serum IgG titresi elde edilirken, bu seviye 60.günde azalmaya başlamış ve 253. günde de çok düşük seviyelere gelmiştir ($p<0,05$). En düşük serum IgG antikor seviyesi sadece BSA uygulanan hayvanlarda elde edilmiştir. Subkütan yolla formülasyonların uygulandığı hayvanların serum antikor yanıtları incelendiğinde, intranazal yoldan uygulanan hayvanlardaki ile benzer bir profil izlemekle beraber serum IgG titreleri bir miktar daha yüksektir ($p<0,05$).

Serum IgG_1 antikor yanıtları incelendiğinde, intranazal yoldan uygulanan formülasyonlar arasında 13. ve 21. gündeki en yüksek yanıtları TMC-BSA dispersiyonu gösterirken, bu yanıt 60. ve 253. günde düşmüştür. CpG ODN-BSA formülasyonu da buna benzer bir antikor yanıtı profili göstermiştir. Nanopartikül formülasyonlarının serum IgG_1 antikor yanıtları ise 60. günde de artmaya devam etmiş, 253. günde bir miktar düşüş göstermesine rağmen hala yüksek seviyelerdedir ($p<0,05$). TMC-CMC-BSA ve CC-CMC-BSA nanopartiküllerinin intranazal yoldan elde edilen serum IgG_1 titreleri birbirine yakınken ($p>0.05$), subkütan uygulamada TMC-CMC-BSA nanopartiküllerinin IgG_1 antikor yanıtı daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Genel olarak serum IgG_1 antikor yanıtları intanazal yolla uygulanan formülasyonlarda, subkütan uygulananlara göre bir miktar daha düşüktür. En düşük IgG_1 antikor yanıtı ise tek başına BSA uygulanan hayvanlarda gözlenmiştir.

İntranazal yolla immünizasyondan sonra en yüksek IgG_{2a} antikor yanıtı CpG ODN-BSA uygulanan hayvanlarda elde edilmiştir. Bunun, nedeni olarak CpGODN'nin Th1 immün yanıtı uyaran güçlü bir mukozal adjuvan olmasından kaynaklanmaktadır

(Stevceva ve Ferrari 2005). İntranazal yolla uygulanan nanopartikül formülasyonlarının oluşturduğu IgG_{2a} antikor titrelerinin, özellikle 21., 60. ve 253. günlerde subkütan yolla uygulanan nanopartikül formülasyonların oluşturduğu antikor yanıta göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Uygulanan tüm nanopartikül formülasyonları (TMC-CMC-BSA ve CC-CMC-BSA) ile BSA + polimer dispersiyonları (TMC-BSA ve CC-BSA) ile, sadece BSA uygulananlara göre anlamlı derecede yüksek antikor yanıtları elde edilmiştir ($p<0.05$). Ayrıca destekleme dozundan sonra, tüm formülasyonların antikor yanıtlarında artış gözlenmiştir. Ancak bu durumun süreç içerisindeki devamlılığı formülasyonlara göre değişkenlik göstermektedir. Nanopartikül formülasyonları diğer formülasyonlara göre immün bağışıklığının sürdürebilirliği açısından daha başarılı bir grafik çizmiştir. Bunun nedeninin nanopartiküllerden yavaş antijen salımına bağlı olarak uzun süreli antikor yanıtının elde edilmesidir (Amidi ve ark. 2007).

Nanopartikül formülasyonlarının antikor yanıtları karşılaştırıldığında, TMC-CMC-BSA nanopartiküllerinin hem intranazal hem de subkütan uygulamada özellikle destekleme dozundan sonra CC-CMC-BSA nanopartikül formülasyonundan daha yüksek serum IgG, IgG_1 ve IgG_{2a} antikor yanıtları oluşturduğu görülmüştür ($p<0,05$).

IgG antikorunun alt tipini etkileyecek faktörler arasında, antijenin yapısı ve miktarı, antijenik uyarılmanın süresi ve yolu, yaş, immünojenik özellikler ve immün sistemin durumu yer almaktadır. Fare modelinde ve insanlarda yapılan birçok çalışmada, sitokinlerin, IgG altsınıflarını düzenlemede önemli rol aldığı gösterilmiştir. Bundan dolayı, aşılama sonrasında veya hastalıkta IgG altsınıflarının sentezlenmesinin incelenmesi, antikor üretiminde görev alan mekanizmalarla ilgili bir görüş sağlayabilmektedir (Gregorek ve ark. 2000). BSA antijeni ile hazırlanan formülasyonların uygulanmasından sonra immün yanıtın yönünü (hümoral veya hücresel) belirlemek için BSA antijenine özgü antikorların IgG alt sınıf profili (IgG_1/IgG_{2a}) incelenmiştir.

IgG_1/IgG_{2a} oranları, uygulanan formülasyonlarda hümoral immün sistemi uyaran IgG_1 antikor yanıtının hücresel immün sistemi uyaran IgG_{2a} antikor yanıtından daha güçlü olduğunu göstermiştir. Intranazal yolla uygulanan nanopartikül formülasyonları, subkütan yola göre daha düşük IgG_1 titreleri verirken ($p<0,05$), destekleme dozundan

sonra intranazal yolla uygulanan formülasyonlardan elde edilen IgG_{2a} antikor yanıtları subkütana göre çok daha yüksek bulunmuştur.

Salgısal IgA (sIgA) antikor titreleri sadece intranazal yoldan aşılanan farelerin vajinal sekresyonlarında 253. günde ölçülmüştür. Subkütan uygulamadan sonra mukozal immün yanıt alınamadığı için, bu yoldan immünizasyon yapılan hayvanların vajinal sekresyonlarında sIgG antikor yanıtı incelenmemiştir. (Holmgren ve Czerkinsky 2005). Nazal yoldan immunizasyonu yapılan hayvanların vajinal salgıları enzim inhibitörü içeren soğuk PBS ile yıkama yoluyla toplanmıştır. Mukozal immün yanıtın göstergesi olan sIgA yanıtlarına bakıldığında en yüksek yanıtlar nanopartikül içeren formülasyonlarda görülmüştür ($p<0.05$). CC-CMC-BSA nanopartikülleri iseTMC-CMC-BSA formülasyonunagöre daha yüksek sIgA antikor titresi vermiştir ($p<0,05$). En düşük sIgA yanıtı ise sadece BSA uygulanan hayvanlarda elde edilmiştir. Yine, TMC-BSA dispersiyonu, CC-BSA dispersiyonundan daha yüksek sIgG titresi verirken ($p<0,05$), CMC-BSA dispersiyonu her iki formülasyondan daha düşük yanıt göstermiştir ($p<0,05$).

Sitokin yanıtlarını elde etmek için fare gruplarından alınan dalaklardan primer dalak hücreleri izole edilmiştir. Dalak hücrelerinin 10 µg/mL BSA uygulanarak yeniden uyarılması sonucunda salgılanan IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 ve IFN-γ'nın miktarları sandviç Elisa testi ile ölçülmüştür. Bu sitokinlerin seçilmesinin nedeni ise IL-2 ve IFN-γ'nın Th1 yanıtının yani hücresel immünitenin; IL-4, IL-6 ve IL-10'un ise Th2 yanıtın yani humoral immünitenin bir göstergesi olarak kabul edilmesidir (Abbas ve Lichtman, 2006).

IL-2 sonuçları incelendiğinde, CC-CMC-BSA nanopartiküllerinin intranazal yoldan uygulanması sonucu subkütan yola göre daha yüksek miktarda IL-2 salgılandığı görülmektedir ($p<0.05$). TMC-CMC-BSA nanopartikülleri ise her iki yoldan da benzer IL-2 seviyeleri göstermiştir ($p>0.05$). İntranazal yoldan uygulanan formülasyonlara bakıldığında, nanopartikül uygulanmasından sonra elde edilen IL-2 seviyelerinin, polimer dispersiyonu uygulananlara göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Subkütan yoldan uygulanan formülasyonlara bakıldığında ise, TMC içeren nanopartikül (TMC-CMC-BSA) ve dispersiyonların(TMC-BSA) uygulandığı hayvanlarda en yüksek IL-2 seviyelerine ulaşılmıştır.

IFN-γ sonuçları incelendiğinde, intranazal yolla uygulanan nanopartikül formülasyonlarının uygulandığı hayvanların primer dalak hücrelerinde polimer dispersiyonu uygulananlara göre daha yüksek sitokin salgılanması gerçekleşmiştir

($p<0.05$). Subkütan yolla uygulanan formülasyonlar karşılaştırıldığında ise, nanopartikül ve dipresiyon formülasyonlarının birbirine benzer IFN-γ sitokin yanıtı verdiği ($p>0,05$), en yüksek IFN-γ seviyelerine CC-CMC-BSA nanopartikül formülasyonu uygulanan grupta ulaşıldığı görülmüştür. Sadece BSA uygulanan grupta ise, en düşük IL-2 ve IFN-γ sitokin yanıtları elde edilmiştir ($p<0.05$). Bu sonuçlar, intranazal uygulamadan sonra nanapartikül formülasyonlarının hücresel immüniteyi belli oranda geliştirdiğini göstermiştir.

Hümoral immün yanıtın göstergesi olarak seçilen IL-4, IL-6 ve IL-10 yanıtlarına bakıldığında ise, intranazal yolla uygulanan nanopartikül formülasyonlarının oluşturduğu sitokin yanıtları birbirine oldukça yakın iken ($p>0,05$), uygulanan gruplarda ulaşılmıştır. TMC-BSA ve CC-BSA dipersiyonları benzer sitokin seviyelerine sahipken ($p>0,05$), CMC-BSA dispersiyonu çok daha düşük sitokin yanıtı vermiştir ($p<0,05$). Subkütan yolla uygulanan formülasyonların ortaya çıkardığı humoral kökenli IL-4, IL-6 ve IL-10 sitokin yanıtlarına bakıldığında, en yüksek sitokin seviyelerine nanopartikül formülasyonlarının uygulandığı gruplarda ulaşılmıştır. TMC-CMC-BSA grubunda, CC-CMC-BSA grubuna göre daha yüksek sitokin yanıtı elde edilmiştir ($p<0,05$). Her iki uygulama yolunda da sadece BSA içeren formülasyonlar en düşük IL-4, IL-6 ve IL-10 yanıtları vermiştir ($p<0.05$).

Yapılan birçok çalışmada nazal yoldan uygulanan kitosan partiküler sistemler hümoral ve hücresel immün yanıtın her ikisinin de uyarılmasını sağlayabilmektedir. Nazal yoldan uygulama için çalışılan farklı biyoadezif polimerler arasında, kitosan immün sistemi uyarıcı, hücresel alımı ve permeasyonu arttıran biyoadezif özellikleri ve insanlar tarafından iyi tolere edilebilen bir madde olabilmesi sayesinde aşı taşıyıcı olarak avantajlara sahiptir. Antijen içeren kitosan nazal aşılarının uygulanması sonucu anlamlı derecede serum IgG yanıtlarının uyarıldığı bulunmuştur. Bulunan bu sonuç, aşının parenteral uygulanması sonrasında gelişen yanıta benzer olduğu görülmüştür (Arca ve ark. 2009). Alpar ve ark. (2005) yaptığı bir çalışmada boğmaca veya influenza antijeninin kitosan ile nazal uygulanması sonrası anlamlı derecede serum IgG ve salgısal IgA yanıtları elde edilmiştir. Bununla birlikte bu molekül parenteral yoldan yabancı antijenlerle verildiğinde T hücre ve antikor yanıtlarını uyarmaktadır. Bu durum kitosanın adjuvan etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Yapılan bu tez çalışmasında da kitozan türevi içeren nanopartikül formülasyonları iki farklı yoldan da (nazal ve subkütan) hem

hücresel hem de hümoral olarak sadece BSA antijeni içeren formülasyona göre anlamlı derecede daha yüksek yanıt göstermişlerdir ($p<0,05$). Elde edilen sitokin ve antikor yanıtları arasında birebir korelasyon yapmak mümkün olmamaktadır. Bununla beraber kullanılan antikorlardan IgG1 hümoral immüniteyi IgG2a ise hücresel immüniteyi göstermekte iken sitokinlerden IL-4, IL-6 ve IL-10 humoral immüniteyi IL-2 ve IFN-γ ise hücresel immüniteyi genellikle göstermektedir (Abbas ve Lichtman, 2006). Mukozal immün yanıtı ifade eden sIgA ise en yüksek nanopartikül formülasyonlarında gözlenmiştir. Bu durumun da NALT'da bulunan M hücreleri tarafından partiküler formülasyonların etkin bir şekilde alının ASH'lere sunulmasıyla ilgisi bulundunduğu düşünülmektedir (Slütter 2011).

Pozitif yüklü polimer (CC, CG ve TMC) ve negatif yüklü CMC, polimerin immün yanıtları arasındaki farklılık bir mekanizmayla açıklanabilmektedir. Yüzey yükündeki farklılıklar müsin ve biyoadezif polimerler arasındaki moleküler etkileşimlere (örneğin, elektrostatik, van der waals ve hidrojen bağı kuvvetleri) etki etmektedir. Negatif ve pozitif yüklü polimerlerin her ikiside elektronegatif gruplarla hidrojen bağı oluşturmaktadır. Anyonik CMC dispersiyonu negatif yüklü müsin tabakası ile itici elektrostatik güçler uyarılacaktır. Bu itici elektrostatik güçlerin tüm mukoadezif dayanıklılık üzerinde olumsuz etkisi bulunmaktadır. Yük değişiklikleri moleküler temas ve esnekliği ile ilişki içerisindedir. Bu durum iki farklı yüklü nanopartikül sistemlerinin immün yanıtları arasındaki farklılığı açıklayabilmektedir.

Tezden elde edilen bu sonuçlar ışığında, polielektrolit kompleks oluştıurma yöntemiyle elde edilen katyonik kitosan türevi ve anyonik karboksimetil kurdlandan oluşan nanopartiküller toksisite riski taşımamakla beraber hem humoral hem de hücresel yanıtı uyarabilen umut verici yeni bir nazal aşı taşıyıcı sistem adayı olarak değerlendirilebilir. Sonuç olarak bu nanopartikül formülasyonlarının mukozal ve parenteral immünizasyonun her ikisi için de güçlü bir aşı adjuvanı olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

Abbas, A.K. ve Lichtman, A.H. (2006). *Basic Immunology*. (2nd ed.), Philadelphia: Saunders Elsevier.

Akagi, T., Baba, M. ve Akashi, M. (2012). Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems: Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine. *Advances in Polymer Science*, **247**, 31-64.

Akira, S. (2003). Toll-like receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 38105-38108.

Almeida, A.J. ve Alpar, H.O. (1996). Nasal delivery of vaccines. *Journal of Drug Targeting*, **3**, 455-467.

Alpar, H. O., Somavarapu, S., Atuah, K. N. ve Bramwell, V. (2005). Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**, 411-430.

Amidi, M., Romeijn, S.G., Borchard, G., Junginger, H.E., Hennink, W.E. ve Jiscoot, W. (2006). Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *Journal of Controlled Release*, **111**, 107-116.

Amidi, M., Romeijn, S.G., Verhoef, J.C., Junginger H.E., Bungener, L., Huckriede, A. ve ark. (2007). N-Trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: Biological properties and immunogenicity in a mouse model. *Vaccine*, **25**, 144-153.

Apodaca, G., Bomsel, M., Arden, J., Breitfeld, P.P., Tang, K.C., ve Mostov, K.E. (1991). The polymeric immunoglobulin receptor. A model protein to study transcytosis. *Journal of Clinical Investigation*, **87**, 1877–1882.

Arca, H.Ç., Günbeyaz M. ve Şenel S. (2009). Chitosan-based systems for the delivery of vaccine antigens. *Expert Review of Vaccines*, **8**, 937-953.

Artursson, P., Lindmark, T., Davis, S. S. ve Illum, L. (1994). Effect of Chitosan on the Permeability of Monolayers of Intestinal Epithelial-Cells (Caco-2). *Pharmaceutical Research*, **11**, 1358-1361.

BERNARD ADAM SLÜTTER, Challenges and opportunities in nasal subunit vaccine delivery mechanistic studies using ovalbumin as a model antigen University of Leiden / Division of Drug Technology of LACDR 2011

Borges O., Cordeiro-da-Silva A., Tavares J., Santarém N., de Sousa A., Borchard G. ve Junginger H.E. (2008). Immuneresponse by nasal delivery of hepatitis B surface antigen and codelivery of a CpG ODN in alginate coated chitosan nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **69**, 405–416.

Borges O., Lebre F., Bento D., Borchard G. ve Junginger H.E. (2010). Mucosal Vaccines: Recent Progress in Understanding the Natural Barriers. *Pharmaceutical Research*, **27**, 211-223.

Bornholdt J., Saber A.T., Sharma A.K., Savolainen K., Vogel U. ve Wallin H. (2007). Inflammatory response and genotoxicity of seven wood dusts in the human epithelial cell line A549. *Mutation Research*, ***632***, 78–88.

Boyaka P.N., Marinaro M., Vankott J.L., Takahashi I., Fujihashi K., Yamamoto M. ve ark. (1999). Strategies for mucosal vaccine development. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **60,** 35-45.

Brandtzaeg, P. ve Pabst, R. (2004). Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends in Immunology*, **25**, 570–577.

Brandtzaeg P. (2007). Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine*, **25**, 5467-5484.

Briones, A.V. ve Toshinori Sato, T. (2010). Encapsulation of glucose oxidase (GOD) in polyelectrolyte complexes of chitosan–carrageenan. *Reactive & Functional Polymers*, **70**, 19-27.

Cerchiara, T., Luppi, B., Bigucci, F. ve Zecchi, V. (2003). Chitosan salts as nasal sustained delivery systems for peptidic drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **55**, 1623-1627.

Cevher, E., Salomon, S.K., Makrakis, A., Li, X.W., Brocchini, S. ve Alpar, H.O. (2015). Development of chitosan–pullulan composite nanoparticles for nasal delivery of vaccines: optimisation and cellular studies. *Journal of Microencapsulation*, **32**, 755-768.

Chaplin, D.D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **125**, 3-23.

Chen, H. (2000). Recent advances in mucosal vaccine development. *Journal of Controlled Release*, **67**, 117-128.

Chen, Q., Hu, Y., Chen, Y., Jiang, X. ve Yong, Y. (2005). Microstructure and property of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles prepared by macromolecular complexes. *Macromolecular Bioscience*, **5**, 993-1000.

Chopra, S., Mahdi, S., Kaur, J., Iqbal, Z., Talegaonkar, S. ve Ahmad, F.J. (2006). Advances and potential applications of chitosan derivatives as mucoadhesive biomaterials in modern drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **58**, 1021-1032.

Clem, A.S. (2011). Fundamentals of Vaccine Immunology. *Journal of Global Infectious Diseases*, **3,** 73–78.

Coban, C., Kobiyama, K., Aoshi, T., Takeshita, F., Horii, T., Akira, S. ve Ishii, K.J. (2011). Novel Strategies to Improve DNA Vaccine Immunogenicity. *Current Gene Therapy*, **11**, 479-484.

Cremer, L., Lupu, A.R., Badulescu, M.M., Mocanu, G., Mihai, D., Calugaru, A. ve ark. (2010). Assesment of two synthesized curdaln derivatives as possible antioxidants and/or modulators of human pmn cells respiratory burst. *Romanian biotechnological letters*, **15**, 5718-5728.

Csaba, N., Garcia-Fuentes, M. ve Alonso M.J. (2009). Nanoparticles for nasal vaccination. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **61**, 140-157.

Daly, M.M. ve Knorr, D. (2008). Chitosan-Alginate Complex Coacervate Capsules: Effects of Calcium Chloride, Plasticizers, and Polyelectrolytes on Mechanical Stability. *Biotechnology Progress*, **4**, 76-81.

Davis S.S. (2001). Nasal Vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **51**, 21-42.

Davis S.S. (2006). The use of polymers and polymer microparticles to provide improved responses after parenteral and mucosal administration. *Vaccine*. **24**, 7-10.

Dietrich, G., Griot-Wenk, M., Metcalfe, I.C., Lang, A.B. ve Viret, J.F. (2003). Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine*, **21**, 678-683.

Dimova, S., Brewster, M.E., Noppe, M., Jorissen, M. ve Augustijns, P. (2005). The use of human nasal in vitro cell systems during drug discovery and development. *Toxicology in Vitro*, **19**, 107–122.

Eldridge, J.H., Hammond, C.J., Meulbroek, J.A., Staas, J.K., Gilley, R.M. ve Tice, T.R. (1990). Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid-tissues.1. Orally-administered biode- gradable microspheres target the Peyer's patches. *Journal of Controlled Release*, **11**, 205–214.

Fearon, D.T. ve Locksley, R.M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, **272**, 50-54.

Florea, B.I., Cassara, M.L., Junginger, H.E. ve Borchard, G. (2003). Drug transport and metabolism characteristics of the human airway epithelial cell line Calu-3. *Journal of Controlled Release*, **87**, 131–138.

Foged, C., Brodin, B., Frokjaer, S. ve Sundblad, A. (2005). Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *International Journal of Pharmaceutics*, **298**, 315–322.

Foster, K.A., Oster, C.G., Mayer, M.M., Avery, M.L. ve Audus, K.L. (1998). Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Experimental Cell Research*, **243**, 359-366.

Freitas, S., Merkle, H.P. ve Gander, B. (2005). Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere prepararion process technology. *Journal of Controlled Release*, **102**, 313-332.

Freytag, L.C. ve Clements, J.D. (2005). Mucosal Adjuvants. *Vaccine*, **23**, 1804-1813.

Gao, F.P., Zhang, H.Z., Liu, L.R., Wang, Y.S., Jiang, Q., Yang, X.D. ve Zhang, Q.Q. (2008). Preparation and physicochemical characteristics of self-assembled nanoparticles of deoxycholic acid modified-carboxymethyl curdlan conjugates. *Carbonhydrate Polymers*, **71**, 606-613.

Gao, F., Li, L., Zhang, H.. Yang, W., Chen, H., Zhou, J. ve ark. (2010). Deoxycholic acid modified-carboxymethyl curdlan conjugate as a novel carrier of epirubicin: In vitro and in vivo studies. *International Journal of Pharmaceutics*, **392**, 254-260.

Giudice, E.L. ve Campbell, J.D. (2006). Needle-free vaccine delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58**, 68-89.

Goyal, A.K.,Khatri, K., Mishra, N. ve Vyas, S.P. (2008). New patents on mucosal delivery of vaccines. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **18**, 1271-1288.

Gregorek, H., Madaliński, K., Woynarowski, M., Mikołajewicz, J., Syczewska, M. ve Socha, J. (2000). The IgG subclass profile of anti-HBs response in vaccinated children and children seroconverted after natural infection. *Vaccine*, **18**, 1210-1217.

Gregory, A.E., Titball, R. ve Williamson, D. (2013). Vaccine delivery using nanoparticles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **3**, Article 13. Erişim 07.09.2015, http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2013.00013

Grenha, A., Gomes, M.E., Rodrigues, M., Santo, V.E., Mano, J.F., Neves, N.M. ve Reis R.L. (2010). Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **92**, 1265-1272.

Grgacic, E.V. ve Anderson, D.A. (2006). Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods*, **40**, 60-65.

Hamidi, M., Zarei, N., Zarrin, A.H. ve Mohammadi-Samani, S. (2007). Preparation and in vitro characterization of carrier erythrocytes for vaccine delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **338**, 70–78.

Hathaway, L.J. ve Kraehenbuhl, J.P. (2000). The role of M cells in mucosal immunity. *Cellular and Mucosal Life Sciences*, **57**, 323-332.

Holmgren, J. ve Czerkinsky, C. (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nature Medicine*, **11**, 45-53.

Holt, P.G., Haining, S., Nelson, D.J. ve Sedgwick, J.D. (1994). Origin and steady-state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways. *Journal of Immunology*, **153**, 256–61.

Honary, S. ve Zahir, F. (2013). Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **12**, 255-264.

Hoshi, S., Saito, N., Kusanagi, K., Ihara, T., ve Ueda, S. (1998). Adjuvant effects of fluoride on oral immunization of chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **63**, 253-263.

Huang, Y.C., Yeh, M.K., Cheng, S.N. ve Chiang, C.H. (2003). The characteristics of betamethasone-loaded chitosan microparticles by spray-drying method. *Journal of Microencapsulation*, **20**, 459-472.

Huckriede, A., Bungener, L., Stegmann, T., Daemen, T., Medema, J., Palache, A.M. ve ark. (2005). The virosome concept for influenza vaccines. *Vaccine*, **23**, 26-38.

II'ina, A.V. ve Varlamov, V.P. (2005). Chitosan-Based Polyelectrolyte Complexes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **41**, 5-11.

Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A.N. ve Davis, S.S. (2001) Chitosan as a novel delivery system for vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **51**, 81-96.

Illum, L. (2006). Nasal clearence in health and disease. *Journal of Aeorosol Medicine*, **19**, 92-99.

Illum, L. (2007). Nanoparticle systems for nasal delivery of drugs: A real improvement over simple systems? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **96**, 473-483.

International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2 (R1) (2005).

Issa, M.M., Köping-Höggard, M. ve Artursson P. (2005). Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs. *Drug Discovery Today*, **2**, 1-6.

Jabbal-Gill, I., Watts, P. ve Smith, A. (2012) Chitosan-based delivery systems for mucosal vaccines. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **9**, 1051-1067.

Jia, Z., Shen, D. ve Xu, Weiliang. (2001). Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydrate Research*, **333**, 1–6.

Jiang, W.L., Gupta, R.K., Deshpande, M.C. ve Schwendeman S.P. (2005). Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**, 391-410.

Kensil, C.R., Mo, A.X.Y. ve Truneh, A. (2004). Current vaccine adjuvants: An overview of a diverse class. *Frontiers in Bioscience*, **9**, 2972-2988.

Kotze, A.F., De Leeuw, B.J., Luessen, H.L., De Boer, A.G.,Verhoef, J.C.,ve Junginger, H.E. (1997). Chitosans for enhanced delivery of therapeutic peptides across intestinal epithelia: in vitro evaluation in Caco-2 cell monolayers. *International Journal of Pharmaceutics*, **159**, 243–253.

Kuper, C.F., Hameleers, D.M.H., Bruijntjes, J.P., van der Ven, I., Biewenga, J. ve Sminia, T. (1990) Lymphoid and Non-Lyphoid cells in Nasal –Associated Lmphoid-Tİssue (NALT) in the RAT-An Immunochemical and enzyme-histochemical study. *Cell and Tissue Research*, **259**, 371-377.

Kuper, C.F., Koornstra, P.J., Hameleers, D.M., Biewenga, J., Spit, B.J., Duijvestijn, A.M. ve ark. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunology Today*, **13**, 219–24.

Kutzler, M.A. ve Weiner, D.B. (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Review Genetics*, **9**, 776-788.

Kutzler, M.A.ve Weiner, D.B. (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics*, **9**, 776-788

Le Dung, P., Milas, M., Rinaudo, M., ve Desbriires, J. (1994). Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, **24**, 209-214.

Lebre, F., Borchard, G., de Lima, M. C. ve Borges, O. (2011). Progress towards a needlefree hepatitis B vaccine. *Pharmaceutical Research*, **28**, 986-1012.

Lee, C.M., Jeong, H.J., Kim, E.M., Cheong, S.J., Park, E.H., Kim, D.W. ve ark. (2009). Notes Synthesis and Characterization of Iron Oxide Nanoparticles Decorated with Carboxymethyl Curdlan. *Macromolecular Research*, **17**, 133-136.

Lemoine D., Wauters, F., Bouchend'homme, S. ve Pre'at, V. (1998). Preparation and characterization of alginate microspheres containing a model antigen. *International Journal of Pharmaceutics*, **176**, 9–19.

Lillard, J.W., Jr Boyaka, P.N., Taub, D.D. ve McGhee, J.R. (2001). RANTES potentiates antigen-specific mucosal immune responses. *Journal of Immunology*, **166**, 162-169.

Lin, Y.H., Mi, F.L., Chen, C.T., Chang, W.C., Peng, S.F., Liang, H.F., ve Sung, H.W. (2007). Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery. *Biomacromolecules*, **8**, 146-152.

Liu, Z., Jiao, Y., Liu, F. ve Zhang, Z. (2007). Heparin/chitosan nanoparticle carriers prepared by polyelectrolyte complexation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Erişim 13.06.2014, DOI: 10.1002/jbm.a.31407.

M.D Blanco, M.D. ve Alonso, M.J. (1997). Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **43**, 287-294.

Malik, B., Rath, G. ve Goyal, A.K. (2014). Are the anatomical sites for vaccine administration selected judiciously? *International Immunopharmacology*, **19**, 17-26.

Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P., ve Bachmann, M.F. (2008). Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European Journal of Immunology*, **38**, 1404–1413.

Margolick, J.B., Markham, R.B. ve Scott, A.L. (2006). Infectious Disease Epidemiology: Theory and Practice. İçinde Nelson K.E., (Ed.), *The immune system and host defense against infections*. Boston: Jones and Bartlett; 317-343.

Martino, A.D. (2014). Chitosan folic acid as system for site specific controlled release. Erişim 01.09.2015, Tomas Bata University in Zlin, Czech Republic: http://www.slideshare.net/antoniodimartino/chitosan-folic-acid-as-system-for-site-specific-controlled-release

McCluskie, M.J. ve Davis, H.L. (1998). CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice. *Journal of Immunology*, **161**, 4463-4466.

McCluskie, M.J. ve Davis, H.L. (2000). CpG DNA as mucosal adjuvant, *Vaccine*, 18, 231-237.

Mckeever, D.J. ve Rege, J.E.O. (1999). Vaccines and diagnostic tools for animal health: the influence of biotechnology. *Livestock Production Science*, **59**, 257-264.

MEHMET KORAY GÖK, Nişasta esaslı biyouyumlu polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu İstanbul Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı / Kimyasal Teknolojiler Bilim Dalı 2008

Metcalfe I.C. ve Glück R. (2006). Virosomes for vaccine delivery. İçinde Schijns, V.E.J.C. ve O'Hagan D.T. (Ed.), *Immunopotentiators in Modern Vaccines*. Burlington, MA: Academic Press; 179-189.

Mischler, R. ve Metcalfe, I.C. (2002). Inflexal V a trivalent virosome subunit influenza vaccine: production. *Vaccine*, **20**, 17-23.

Mocanu G., Mihai D., Moscovici M. Picton, L. ve LeCerf, D. (2009). Curdlan microspheres. Synthesis, characterization and interaction with proteins (enzymes, vaccines). *International Journal of Biological Macromolecules*, **44**, 215-221.

Moghassemi, S., Hadjizadeh, A., ve Omidfar, K. (2016). Formulation and Characterization of Bovine Serum Albumin-Loaded Niosome. Erişim 15.02.2015 DOI: 10.1208/s12249-016-0487-1.

Moschos, S.A., Branwell, V.W., Somavarapu, S.ve Alpar, H.O. (2004). Adjuvant synergy: The effects of nasal coadministration of adjuvants. *Immunology and Cell Biology*, **82**, 628-637.

Mourya, V.K. ve Inamdar, N.N. (2009). Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **20**, 1057-1079.

Na, K., Park, K.H., Kim, S.W. ve Bae, Y.H. (2000). Self-assembled hydrogel nanoparticles from curdlan derivatives: characterization, anti-cancer drug release and interaction with a hepatoma cell line (HepG2). *Journal of Controlled Release*, **69**, 225-236.

Netea, M.G. (2013). Training innate immunity: the changing concept of immunological memory in innate host defence. *European Journal of Clinical Investigation*, **43**, 881-884.

Neutra, M.R., Frey, A. ve Kraehenbuhl, J.P. (1996). Epithelial M Cells: Gateways for Mucosal Infection and Immunization. *Cell*, **86**, 345-348.

Neutra, M.R., Mantis, N.J. ve Kraehenbuhl, J.P. (2001). Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nature Immunology*, **2**, 1004-1009.

Nizri, G., Magdassi, S., Schmidt, J., Cohen, Y., ve Talmon, Y. (2004). Microstructural Characterization of Micro- and Nanoparticles Formed by Polymer−Surfactant Interactions. *Langmuir*, **20**, 4380-4385.

O'Hagan, D.T. ve Valiente N.M. (2003). Recent advances in the discovery of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2**, 727-735.

Ohno, Y., Aoki, N. Ve Maeda, M. (1988). Effects of natural human interferon-alpha, -beta and -gamma on interleukin 2 production in human peripheral lymphocytes. *Immunology Letters*, **17**, 339-344.

Orienti 2002. Orienti, I., Cerchiara, T., Luppi, B., Bigucci, F., Zuccari, G. ve Zecchi, V. (2002). Influence of different chitosan salts on the release of sodium diclofenac in colon-specific delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **238**, 51–59.

Otczyk, D.C. ve Cripps, A.W. (2010). Mucosal Immunization A Realistic Alternative. *Human Vaccines*, **6**, 978-1006.

Oyewumi, M. O., Kumar, A., ve Cui, Z. (2010). Nano-microparticles as immune adjuvants: Correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert Review of Vaccines*, **9**, 1095-1107.

Ozsoy, Y., Gungor, S. ve Cevher, E. (2009). Nasal delivery of high molecular weight drugs. *Molecules*, **14**, 3754-3779.

Pabst, R. ve Tschernig, T. (2010). Bronchus-associated lymphoid tissue: an entry site for antigens for successful mucosal vaccinations? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **43**, 137-141.

Pandit, S., Cevher, E., Zariwala, M.G., Somavarapu, S. ve Alpar, H.O. (2007). Enhancement of immune response of HBsAg loaded poly (L-lactic acid) microspheres against Hepatitis B through incorporation of alum and chitosan. *Journal of Microencapsulation*, **24**, 539-552.

Peek, L.J., Middaugh, C.R. ve Berkland, C. (2008). Nanotechnology in vaccine delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60**, 915-928.

Picker-Freyer, K.M. ve Brink, D. (2006). Evaluation of powder and tableting properties of chitosan. *AAPS Pharmscitech*, **7**, 75.

Plotkin, S.A. (2005). Vaccines: past, present and future. *Nature Medicine*, **11**, 5-11.

Plotkin, S.L. ve Plotkin, S.A. (2008). A short history of vaccination. İçinde S.A. Plotkin, W.A. Orenstein, ve P.A. Offit (eds.), *Vaccines*. Philadelphia, PA: Elsevier Inc.; 1-16.

Plotkin, S.A. (2009). Vaccines: the Fourth Century. *Clinical and Vaccine Immunology*, **16**, 1709-1719.

Polexe, R.C. ve Delair, T. (2013). Elaboration of Stable and Antibody Functionalized Positively Charged Colloids by Polyelectrolyte Complexation between Chitosan and Hyaluronic Acid. *Molecules*, **18**, 8563-8578.

Pregoa, C., Paolicellia, P., Díazb, B., Vicente, S., Sáncheza, A., González-Fernández A. ve Alonso, M.J. (2010). Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection. *Vaccine*, **28**, 2607-2614.

Quiding-Jarbrink, M., Granstrom, G., Nordstrom, J., Holmgren, C. ve Czerkinsky, C. (1995). Induction of compartmentalized B-cell responses in human tonsils. *Infection and Immunity*, **63**, 853-857.

Ramasamy, T. Tran, T.H., Cho, H.J., Kim, J.H., Kim, Y.I., Jeon, J.Y., Choi H.G., Yong, C.S. ve Kim, J.O. (2014). Chitosan-Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Nanoparticulate Carriers: Physicochemical and Biological Characterization. *Pharmaceutical Research*, **31**, 1302-1314.

Read, R.C., Naylor, S.C., Potter, C.W., Bond, J., Jabbal-Gill, I., Fisher A. ve ark. (2005). Effective nasal influenza vaccine delivery using chitosan. *Vaccine*, **23**, 4367-4374.

Ryan, E.T., Crean, T.I., John, M., Butterton, J.R., Clements, J.D. ve Calderwood, S.B. (1999). In vivo expression and immunoadjuvancy of a mutant of heat-labile enterotoxin of Escherichia coli in vaccine and vector strains of Vibrio cholerae. *Infection and Immunity*, **67**, 1694-1701.

Saatci, F. ve Bozkır, A. (2003). Aşıların nazal yoldan uygulanışı. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara*, **32**, 175-193.

Sahni, J.K., Chopra, S., Ahmad, F.J. ve Khar, R.K. (2008). Potential prospects of chitosan derivative trimethyl chitosan chloride (TMC) as a polymeric absorption enhancer: synthesis, characterization and applications. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **60**, 1111-1119.

Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Araki, K. ve Ahmed, R. (2010). From Vaccines to Memory and Back. *Immunity*, **33**, 451-463.

Sasaki, T., Abiko, N., Nitta, K., Takasuka, N. ve Sugino, Y. (1979). Antitumor activity of carboxymethylglucans obtained by carboxymethylation of (1-3)-ß-D-glucan from Alcaligenes var faecalis myxogenes IFO 13140. *European Jornal of Cancer*, **15**, 211-215.

Sayın, B., Somavarapu, S., Li, X.W., Sesardic D., Şenel, S. ve Alpar, O.H. (2009). TMC–MCC (N-trimethyl chitosan–mono-N-carboxymethyl chitosan) nanocomplexes for mucosal delivery of vaccines. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **38**, 362-369.

Schatz. C., Domard, A., Viton, C., Pichot, C. ve Delair, T. (2004). Versatile and efficient formation of colloids of biopolymer-based polyelectrolyte complexes. *Biomacromolecules*, **5**, 1882-1892.

Sieval, A. B., Thanou, M., Kotze, A. F., Verhoef, J. E., Brussee, J., ve Junginger, H. E. (1998). Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride. *Carbohydrate Polymers*, **36**, 157-165.

Singh, M., Chakrapani, A. ve O'Hagan, D. (2007). Nanoparticles and microparticles as vaccine delivery systems. *Expert Review of Vaccines*, **6**, 797-808.

Singla, A.K. ve Chaeka, M. (2001). Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **53**, 1047-1067.

Sjolander, S., Drane, D., Davis, R., Beezum, L., Pearse, M. ve Cox, J. (2001). Intranasal immunisation with influenza-ISCOM induces strong mucosal as well as systemic antibody and cytotoxic T-lymphocyte responses. *Vaccine*, **19**, 4072-4080.

Sloat, B.R., Sandoval, M.A., Hau A.M., He Y. ve Cui, Z. (2010). Strong antibody responses induced by protein antigens conjugated onto the surface of lecithin-based nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, **141**, 93-100.

Smet, R.D., Demoor, T., Verschuere, S., Dullaers, M., Ostroff, G.R., Leclercq, G. ve ark. (2013). β-Glucan microparticles are good candidates for mucosal antigen delivery in oral vaccination. *Journal of Controlled Release*, **172**, 671–678.

Smith, J., Wood, E. ve Dornish, M. (2004). Effect of chitosan an epithelial cell tight junctions. *Pharmaceutical Research*, **21**, 43-49.

Sonaje, K., Chen, Y.J., Chen, H.L., Wey, S.P., Juang, J.H., Nguyen, H.N. ve ark. (2010). Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly(g-glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials*, **31**, 3384-3394.

Spiers, I.D., Eyles, J.E., Baillie, L.W., Williamson, E.D. ve Alpar, H.O. (2000). Biodegradable microparticles with different release profiles: effect on the immune response after a single administration via intranasal and intramuscular routes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **52**, 1195-1201.

Stevceva, L. ve Ferrari, M.G. (2005). Mucosal Adjuvants. *Current Pharmaceutical Design*, **11**, 801-811.

Storni, T., Kündig, T.M., Senti, G. ve Johansen, P. (2005). Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**, 333-355.

Thanou, M., Verhoef, J.C. ve Junginger, H.E. (2001). Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **52**, 117-126.

Thomas, K., Goldsby, J., Osborne, R.A., Barbara, A. ve Kuby, J. (2006). *Kuby immunology*. (6th ed.), New York: Freeman WH.

Thünemann, A.F., Müller, M., Dautzenberg, H., Joanny, J.F. ve Löwen, H. (2004). Polyelectrolyte complexes. *Advances in Polymer Science*, **166**, 113-171.

Types of vaccines. Güncelleme 03.04.2012, Erişim 19.06.2015, National Institute of Allergy and Infectious Disease, http://www.niaid.nih.gov/topics/vaccines/understanding/pages/typesvaccines.aspx

Ullmann, A. (2007). Pasteur–Koch: Distinctive ways of thinking about infectious diseases. *Microbe*, **2**, 383-387.

Ulmer, J.B. (2004). Enhancement of vaccine potency through improved delivery. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **4**, 1045-1051.

Umerska, A., Palucha, K.J., Inkielewicz-Stepniak, I., Santos-Martinez, M.J., Corrigan, O.I., Medina, C. ve Tajber, L. (2012). Exploring the assembly process and properties of novel crosslinker-free hyaluronate-based polyelectrolyte complex nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*, **436**, 75-87.

Vajdy, M., Polo, J., Donnelly, J., O'Hagan, D. ve Singh, M. (2004). Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA- based vaccines. *Immunology and Cell Biology*, **82**, 617-627.

Van der Lubben, I.M., Verhhoef, J.C., Borchard, G. ve Junginger, H.E. (2001). Chitosan for mucosal vaccination. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **52**, 139-144.

Van der Lubben, I.M., Kersten, G., Fretz, M.M., Beuvery, C., Coos Verhoef, J. ve Junginger, H.E. (2003). Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphteria: oral and nasal efficacy studies in mice. *Vaccine*, **21**, 1400-1408.

Vereschagin, E.I., van Lambalgen, A.A., Dushkin, M.I., Schwartz, Y.S., Polyakov, L., Heemskerk, A., ve ark. (1998). Soluble glucan protects against endotoxin shock in the rat: The role of the scavenger receptor. *Shock*, **9**, 193-198.

Vila, A., Sanchez, A., Janes, K., Behrens, I., Kissel, T., Vila Jato, J.L. ve Alonso, M.J. (2004). Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carrier for nasal vaccine delivery in mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **57**, 123-131.

Wang, T., Jiang, H., Zhao, Q., Wang, S., Zou M. ve Chen, G. (2012). Enhanced mucosal and systemic immune responses obtained by porous silica nanoparticles used as an oral vaccine adjuvant: Effect of silica architecture on immunological properties. *International Journal of Pharmaceutics*, **436**, 351- 358.

Weaver, L.T., Wadd, N., Taylor, C.E., Greenwell, J. ve Toms, G.L. (1991). The ontogeny of serum IgA in the newborn. *Pediatric Allergy and Immunology*, **2**, 2-75.

WHO (2010). Immunization, Vaccines and Biologicals. Erişim 20.03.2012, http://www.who.int/immunization/en/#box

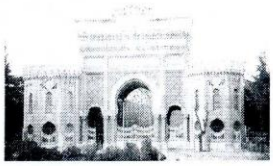
Woodrow, K.A., Bennett, K.M. ve Lo, D.M. (2012). Mucosal Vaccine Design and Delivery. *Annual Review of Biomedical Engineering*, **14**, 17-46.

Xu, T., Xin, M., Li, M., Huang, H. ve Zhou, S. (2010). Synthesis, characteristic and antibacterial activity of N,N,N-trimethyl chitosan and its carboxymethyl derivatives. *Carbohydrate Polymers*, **81**, 931-936.

Xu, Y., Yuen, P.W. ve Lam, J.K. (2014). Intranasal DNA Vaccine for Protection against Respiratory Infectious Diseases: The Delivery Perspectives. *Pharmaceutics*, **6**, 378-415.

Yurdakök, K. ve İnce, T. (2008). Aşı adjuvanları. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, **51**, 225-239.

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2012/163 29/11/ 2012

Sn: Doç. Dr. Erdal CEVHER
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Karar No :2012/163

Başvuru :22.11.2012

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen Araştırma Görevlisi Melike DURAN'a ait "Mukozal İmmünizasyon Amacıyla Hbsag Taşıyan Biyopolimerik Nanopartiküler Sistemlerin Geliştirilmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Fare
	Cinsiyeti	Dişi
	Sayısı	91
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		15.09.2013 / 15.12.2013

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İ.Ü.HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
İ.Ü.HADYEK Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Pınar YAMANTÜRK ÇELİK
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Yard. Doç. Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Mak.Yük.Müh. Yard.Doç.Dr.Burak OLGUN
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı:2016/14

23/03/2016

Sayın Doç. Dr. Erdal CEVHER
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Sorumluluğunu üstlendiğiniz Doktora Öğrencisi Melike DURAN'a ait "Mukozal immünizasyon amacıyla HBsAg taşıyan biyopolimerik nanopartiküler sistemlerin geliştirilmesi" başlıklı doktora tez projeniz 29.11.2012 tarih ve 2012/163 Karar Numarası ile Etik Kurulumuzun onayını almıştır. Ancak 01.03.2016 tarihli dilekçenizde ileri sürdüğünüz gerekçeler Kurulumuz tarafından değerlendirilmiş ve projenizde çalışma içeriğine dokunulmaksızın sadece Hepatit B yüzey antijeni HbsAg yerine aynı konsatrasyonda BSA kullanıldığı belirlenmiştir. Bu neden ile proje başlığınızın **"Mukozal immünizasyon amacıyla aşı taşıyıcı nanopartiküler sistemlerin geliştirilmesi"** olarak değiştirilmesi, çalışmada kullanılacak fare sayısının 91'den 75'e düşürüldüğü yönündeki teklifleriniz -daha önce aldığınız etik kurul karar ve sayısı geçerli olmak üzere- Kurulumuzca uygun bulunmuştur.

Gereği için bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A 221 nolu oda
Avcılar –İSTANBUL TEL : (0 212) 4737070/ 17031 E mail : hadyek@istanbul.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Melike	**Soyadı**	Duran
Doğ.Yeri	İstanbul	**Doğ.Tar.**	19.05.1988
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	**TC Kim No**	19534675684
Email	melike.sessevmez@istanbul.edu.tr	**Tel**	0530 828 03 91

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2010
Lise	Özel Kültür Fen Lisesi	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2011-
2.	Araştırma Görevlisi	Yeni Yüzyıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2011-2011
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(TOEFL) Puanı**
İngilizce	Çok iyi	iyi	iyi		75

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı			
ALES Puanı	92,85		

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office	İyi
GraphPad Prism 6	İyi
Chemdraw	İyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Duran M., Sinani G., Morina D., Alpar O., Cevher E., "A New N-Trimethyl Chitosan-Carboxymethyl Curdlan Nanoparticles as a Vaccine Carrier", International Multidisciplinary Symposium on Drug Research&Development, ANTALYA, TÜRKIYE, 28-30 Kasım 2013, pp.121-121

Morina D., Duran M., Sinani G., Cevher E., "Characterisation of Cyclodextrin Cefdinir Inclusion Complexes and Development of Oral Formulations", International Multidisciplinary Symposium on Drug Research&Development, ANTALYA, TÜRKIYE, 28-30 Kasım 2013, pp.92-92

Duran M., Sinani G., Morina D., Alpar O., Cevher E., "A New Biopolymer-Based Nanovaccine Carrier", 3rd Conference on Innovation in Drug Delivery: Advances in Local Drug Delivery, Pisa, ITALYA, 22-25 Eylül 2013, pp.108-108

Nanobiotechnology Days, İstanbul Kemerburgaz Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, 2015

İÜ Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Kursu, İstanbul Üniversitesi, DETAE, 2012

8th Worldmeeting on Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology (PBB World Meeting), APV, 2012

4. DETAE Günleri, İstanbul Üniversitesi, DETAE, 2012

First International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, Boğaziçi Üniversitesi, 2012

ISPE Türkiye 2012 Sonbahar Semineri "Containment", İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2012

Fundamentals and Applications Of Fluorescence Microscopy in Modern Cell Biology , Koç Üniversitesi ve American Society for Cell Biology, 2012

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Satranç, tarih, uluslararası ilişkiler