

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

NAZAL YOL İLE UYGULANAN AŞI TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

GENADA SINANI

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 2702100184-Genada Sinani tarafından hazırlanan Nazal Yol ile Uygulanan Aşı Taşıyıcı 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 çalışmasıyla 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.

Genada Sinani

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, tezimin yönetilmesi ve çalışmalarımın yönlendirilmesinde her zaman ilgi, destek ve yardımlarını gördüğüm değerli danışman hocam Doç. Dr. Erdal CEVHER'e;

Engin bilgi ve tecrübelerini samimiyet ile benimle paylaşan ve çalışma disiplinini örnek aldığım sevgili hocam Prof. Dr. H. Oya ALPAR'a;

Doktora eğitimim süresince her olanağı sağlayan Eczacılık Teknolojisi Bölüm Başkanı ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet ARAMAN'a;

Çalışmada kullandığım polimerlerin sentezi ve karakterizasyonunu gerçekleştiren Prof. Dr. Saadet PABUCCUOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. M. Koray GÖK'e;

Tezimin hazırlanması sırasında gösterdiği anlayış için Prof. Dr. Akgül YEŞİLADA'ya

In vivo çalışmalarımın yürütülmesindeki destek ve katkılarından dolayı Doç. Dr. Alper OKYAR'a;

SDS-PAGE çalışmalarım için değerli vaktini bana ayıran Doç. Dr. Pınar AKSOY SAĞIRLI'ya;

Tezimdeki hücre kültürü çalışmalarım sırasında sağladıkları bilgi ve yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Ayca YILDIZ PEKÖZ ve Arş. Gör. Dr. Hande TEKARSLAN'a;

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma, gösterdikleri anlayış ve verdikleri destek ile yanımda olan sevgili dostlarıma;

Doktora eğitimim süresince beni destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca sonsuz sevgilerini her daim gösteren, varlıklarından gurur duyduğum canım ANNEM, BABAM ve KARDEŞİM'e hoşgörü ve destekleri ile her zaman yanımda oldukları ve beni motive ettikleri için çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36160

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Xİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... XVİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ XX
ÖZET ..... XXİİİ
ABSTRACT ..... XXİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Giriş 3
2.2. İmmünizasyon 3
2.2.1. İmmün Sistem Hakkında Temel Bilgiler ve İmmünolojik Yanıt Çeşitleri 4
2.2.1.1. Doğal İmmün Sistem: 4
2.2.1.2. Kazanılmış İmmün Sistem 5
2.2.2. Mukozal Bağışıklık 7
2.3. Aşılar 8
2.3.1. Aşı Çeşitleri 9
2.3.1.1. İnaktif (ölü) Aşılar 9
2.3.1.2. Konjuge Aşılar 9
2.3.1.3. Canlı Zayıflatılmış Aşılar 10
2.3.1.4. Altbirim Aşıları 10
2.3.1.5. DNA Aşıları 11
2.3.2. Aşıların Etkinliğini Değiştiren Faktörler 11
2.3.3. Yeni Nesil Aşılar Hakkında Güncel Yaklaşımlar 12
2.4. Non-invaziv Yol ile Aşı Uygulanması 14
2.4.1. Transdermal Yol ile Aşı Uygulanması 15
2.4.2. Mukozal İmmünizasyon ve Mukozal Yol ile Aşılama 15

2.4.2.1. Mukozal İmmün Sistem: Yapısı ve Özellikleri/Organlar 17
2.4.2.2. Oral Yol ile Aşılama 18
2.4.2.3. Nazal Yol ile Aşılama 20
2.4.2.4. Pulmoner Yol ile Aşılama 21
2.4.2.5. Diğer Yollar ile Aşılama (Oküler, Sublingual, Vajinal, Rektal): 21
2.5. Aşı Formülasyonları Hakkında Genel Bilgiler 22
2.5.1. Aşı Formülasyonlarında Kullanılan Adjuvanlar 22
2.5.2. Aşı Geliştirilmesinde Adjuvanların Önemi 24
2.5.2.1. İmmün Sistemi Uyaran Adjuvanlar 25
2.5.2.2. Bakteri Enterotoksinleri 26
2.5.2.3. Lipopolisakkaritler 27
2.5.2.4. Monofosforil lipit A (MPL) ve Türevleri 28
2.5.2.5. Muramil dipeptit ve Türevleri 28
2.5.2.6. Sitokinler 29
2.5.2.7. CpG oligonükleotidleri 29
2.5.3. Aşı Taşıyıcı Sistemler 30
2.5.3.1. Mineral Tuzları 31
2.5.3.2. Viral Taşıyıcı Aşılar 32
2.5.4. Partiküler Aşı Taşıyıcı Sistemler 33
2.5.4.1. Lipozomlar 34
2.5.4.2. ISCOM™ ve ISCOMATRIX™ 34
2.5.4.3. Virozomlar 35
2.5.4.4. Proteozomlar 36
2.5.4.5. Sentetik Biyomimetik Supramoleküler Biyovektörü (SMBV)™ 36
2.5.5. Polimerik Partiküler Taşıyıcı Sistemler 37
2.5.5.1. Poli(laktik asid) (PLA) ve Poli(laktik-*ko*-glikolik asid) (PLGA) 37
2.5.5.2. Poli(β-amino ester) (PbAE) 38
2.5.5.3. Kitosan 39
2.6. Nazal Yol ile Uygulanan Aşı Taşıyıcı Sistemlerin Özelliklerini Etkileyen Faktörler 40
2.6.1. Partikül Boyutu 40
2.6.2. Zeta Potansiyel (Yüzey yükü) 41
2.6.3. Hidrofobik Özellikleri 42

3. GEREÇ VE YÖNTEM 43
3.1. Materyal ve Cihazlar 43
3.1.1. Materyaller 43
3.1.2. Kullanılan Cihazlar 45
3.2. Polimerlerin Sentezi 46
3.2.1. Aminlenmiş Kitosan Polimerinin Sentezi 46
3.2.2. Aminlenmiş ve Tiyollenmiş Kitosan Polimerinin Sentezi 47
3.2.3. Poli(β-amino ester) Polimerinin Sentezi 48
3.3. Polimer Yapılarının Karakterizasyonu 49
3.3.1. Fourier Transform-Infrared Spektrometrisi (FT-IR) ile Polimer Yapılarının Karakterizasyonu 49
3.3.1.1. FT-IR ile Amin-kitosan ve Amin-tiyol-kitosan Polimer Yapılarının Karakterizasyonu 49
3.3.1.2. FT-IR ile Poli(β-amino ester) Polimer Yapısının Karakterizasyonu 49
3.3.2. Proton Nükleer Magnetik Resonans (^{1}H-NMR) Spektroskopisi ile Polimer Yapılarının Karakterizasyonu 49
3.4. Nanopartikül Formülasyonların Hazırlanmasında Önformülasyon Çalışmaları ... 50
3.4.1. İyonotropik Jelasyon Yöntemi ile Farklı Çözücü Ortamında Aminlenmiş Kitosan Polimeri ile Boş Nanopartiküllerin Hazırlanması 50
3.4.2. İyonotropik Jelasyon Yöntemi ile Farklı Çözücü Ortamında Aminlenmiş ve Tiyollenmiş Kitosan Polimeri ile Boş Nanopartiküllerin Hazırlanması 52
3.4.3. Boş Poli(β-amino ester)-poli(laktik-*ko*-glikolik asit) Nanopartiküllerin Hazırlanması 52
3.5. Sığır Serum Albümini Yüklü Modifiye Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması 55
3.5.1. İyonotropik Jelasyon Yöntemi ile Sığır Serum Albümini içeren Amin-kitosan:TPP Nanopartiküllerinin Hazırlanması 55
3.5.2. İyonotropik Jelasyon Yöntemi ile Sığır Serum Albümini İçeren Amin-tiyol-kitosan:TPP Nanopartiküllerinin Hazırlanması 55
3.5.3. Çift Emülsiyon Çözücü Uçurma Yöntemi ile Sığır Serum Albümini İçeren Poli(β-amino ester)-poli(laktik-*ko*-glikolik asit) Nanopartiküllerinin Hazırlanması .. 56
3.6. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu 58
3.6.1. Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı Analizi 58
3.6.2. Zeta Potansiyeli Analizi 59

3.6.3. Nanopartikül Formülasyonların Fiziksel Stabilitesinin İncelenmesi 59
3.6.4. Santrifüj İşleminin PbAE-PLGA Nanopartiküllerinin Fiziksel Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi 59
3.6.5. Boş ve BSA Yüklü Amin-kitosan:TPP ve Amin-tiyol-kitosan:TPP Nanopartiküllerinin Veriminin Tayin Edilmesi 60
3.6.6. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Nanopartiküllerin Morfolojik Olarak İncelenmesi 60
3.7. Nanopartiküllerin Protein Enkapsülasyon Etkinliğinin İncelenmesi 60
3.7.1. Modifiye Kitosan:TPP Nanopartiküllerinde Protein Enkapsülasyon Etkinliğinin İncelenmesi 61
3.7.1.1. Bradford Yöntemi için Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu 61
3.7.1.2. Doğrusallık 62
3.7.1.3. Doğruluk 62
3.7.1.4. Kesinlik 63
3.7.1.5. Seçicilik 63
3.7.1.6. Teşhis Limiti ve Miktar Tayini Limiti 64
3.7.2. PbAE-PLGA Nanopartiküllerin Protein Enkapsülasyon Etkinliğinin İncelenmesi 64
3.7.2.1. Bikinkoninik Asit Yöntemi için Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu ..65
3.7.2.2. Doğrusallık 65
3.7.2.3. Doğruluk 66
3.7.2.4. Kesinlik 66
3.7.2.5. Seçicilik 67
3.7.2.6. Teşhis Limiti ve Miktar Tayini Limiti 67
3.8. Nanopartiküllere Yüklenen BSA'nın SDS-PAGE Bütünlüğünün İncelenmesi ...67
3.9. Hücre kültürü 68
3.9.1. Calu-3 Hücrelerinin Kültürü 68
3.9.2. A549 Hücrelerinin Kültürü 69
3.10. Polimerlerin ve Nanopartikül Formülasyonlarının Calu-3 ve A549 Hücre Hatlarında Sitotoksisitelerin İncelenmesi 70
3.10.1. Sitotoksisite Çalışması 70
3.11. BSA Yüklü Modifiye Kitosan Nanopartikülleri ile İmmünizasyon Çalışması ...71
3.11.1. Hayvanlar 71

3.11.2. İmmünizasyon Çalışma Protokolü 71
3.11.1. Numunelerin Toplanması.....72
3.12. İmmün Cevabın İncelenmesi 74
3.12.1. Sistemik ve Mukozal Antikorların Analizi 74
3.12.2. Primer Dalak Hücrelerinin Kültürü, *in vitro* Ortamda Dalak Hücrelerinin Yeniden Uyarılması ve Antijene Özgü Sitokin Analizleri.....75
3.12.2.1. Primer Dalak Hücrelerinin İzolasyonu.....75
3.12.2.2. Dalak Hücrelerinin *in vitro* Ortamda Model Antijen ile Yeniden Uyarılması 75
3.13. İstatistiksel Değerlendirme 77
4. BULGULAR.....78
4.1. Polimerlerin Yapılarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular 78
4.1.1. FT-IR Spektrofotometrisi Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Polimer Yapılarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular 78
4.1.1.1. FT-IR Spektrofotometrisi Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Amin-kitosan ve Amin-tiyol-kitosan Polimer Yapılarının Analizine Ait Bulgular.....78
4.1.1.2. FT-IR Spektrofotometrisi Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Poli(β-amino ester) Polimer Yapısının Analizine Ait Bulgular 80
4.1.2. ^{1}H-NMR Spektroskopisi ile Polimer Yapılarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular.....81
4.2. Bradford Yöntemi ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular....83
4.2.1. Doğrusallık.....83
4.2.2. Doğruluk 85
4.2.3. Kesinlik 85
4.2.4. Seçicilik.....86
4.2.5. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL) 86
4.3. Bikinkoninik Asit Yöntemi ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular.....86
4.3.1. Doğrusallık.....86
4.3.2. Doğruluk 87
4.3.3. Kesinlik 87
4.3.4. Seçicilik.....88
4.3.5. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL) 88
4.4. Nanopartikül Önformülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular 89

4.4.1. Boş Amin-kitosan Nanopartiküllerin Optimizasyonuna Ait Bulgular.....89
4.4.1.1. Distile Su Ortamında Hazırlanan Amin-kitosan Nanopartiküllerinin (AKS) Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı Analizi.....89
4.4.1.2. %0,9 NaCl Ortamında Hazırlanan Amin-kitosan Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı Analizi.....89
4.4.1.3. Fosfat tamponu (pH 7,4) Ortamında Hazırlanan Amin-kitosan Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı Analizi 90
4.4.2. Boş Amin-tiyol-kitosan Nanopartiküllerinin Optimizasyonuna Ait Bulgular..91
4.4.2.1. Distile su Ortamında Hazırlanan Amin-tiyol-kitosan Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı Analizi.....91
4.4.2.2. %0,9 NaCl Ortamında Hazırlanan Amin-tiyol-kitosan Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı Analizi.....91
4.4.2.3. Fosfat Tamponu Ortamında Hazırlanan Amin-tiyol-kitosan Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı Analizi 92
4.4.3. Boş PbAE-PLGA Nanopartiküllerinin Optimizasyonu 93
4.4.3.1. Santrifüj İşleminin PbAE-PLGA Nanopartiküllerinin Fiziksel Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi 93
4.5. Nanopartikül Formülasyonlarının Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular 94
4.5.1. Amin-kitosan ve Amin-tiyol-kitosan Nanopartikül Formülasyonları ile yapılan Fiziksel Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular 94
4.5.2. PbAE-PLGA Nanopartikül Formülasyonları ile Yapılan Fiziksel Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular 94
4.5.3. Modifiye Kitosan Nanopartiküllerinin BSA Enkapsülasyon Etkinliğine Ait Bulgular.....109
4.5.4. PbAE-PLGA Nanopartiküllerin BSA Enkapsülasyon Etkinliğine Ait Bulgular.....111
4.6. Nanopartiküllerin Üretim Verimine Ait Bulgular.....112
4.7. Nanopartiküllerin Morfolojik Olarak İncelenmesi 113
4.7.1. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Nanopartiküllerin İncelenmesi 113
4.8. Nanopartiküllere Yüklenen BSA'nın SDS Bütünlüğünün İncelenmesine Ait Bulgular.....116
4.9. Hücre Canlılık (Sitotoksisite) Çalışmaları.....116
4.9.1. Calu-3 Hücre Hattında MTT Testi.....117
4.9.2. A549 Hücre Hattında MTT Testi.....118

4.10. İmmünizasyon Çalışmaları 119
4.10.1. Nazal ve Subkütan Yol ile İmmünizasyondan Sonra İmmün Yanıtların İncelenmesi Çalışmaları 119
4.10.1.1. Nazal Yoldan İmmünizasyondan Sonra Antikor Yanıtlarının İncelenmesi 119
4.10.1.2. Subkütan Yol ile İmmünizasyondan Sonra Antikor Yanıtlarının İncelenmesi 122
4.10.2. Nazal ve Subkütan Yol ile İmmünizasyondan Sonra *İn vitro* Ortamda Dalak Hücrelerinin Yeniden Uyarılması Sonucu Salgılanan Antijene Spesifik Sitokinlerin Analizi 125
4.10.2.1. Nazal Yol ile İmmünizasyondan Sonra *İn vitro* Ortamda Dalak Hücrelerinin Yeniden Uyarılması ile Salgılanan Antijene Spesifik Sitokinlerin Analizi 125
4.10.2.2. Subkütan Yol ile İmmünizasyondan Sonra *İn vitro* Ortamda Dalak Hücrelerinin Yeniden Uyarılması sonucu Salgılanan Antijene Spesifik Sitokinlerin Analizi 129
5. TARTIŞMA 135
KAYNAKLAR 155
ETİK KURUL KARARI 181
ÖZGEÇMİŞ 182

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Yeni aşıların geliştirilmesinde gerekli hususlar 14
Tablo 2-2: Mukozal immün sistemi 18
Tablo 2-3: Mukozal enfeksiyonlara karşı kullanılan ruhsatlı aşılar 19
Tablo 2-4: İnsanlarda klinik çalışması yapılmış adjuvanlar 23
Tablo 2-5: Aşı adjuvanların özellikleri 25
Tablo 2-6: İmmün sistemi uyaran maddelerinin oluşturduğu immün yanıtlar 26
Tablo 2-7: Aşı taşıyıcı sistemlerin uyardığı immün yanıtlar 30
Tablo 3-1: Amin-kitosan nanopartiküllerin hazırlanmasında distile su, % 0,9 NaCl çözeltisi ve fosfat tamponu (pH 7,4) çözücü ortamında kullanılan optimizasyon parametreleri 51
Tablo 3-2: PbAE-PLGA nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan optimizasyon parametreleri 54
Tablo 3-3: BSA yüklü amin-kitosan:TPP nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan optimizasyon parametreleri 55
Tablo 3-4: BSA yüklü PbAE-PLGA nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan optimizasyon parametreleri 57
Tablo 3-5: İmmünizasyon çalışma tasarımı 72
Tablo 4-1: Kitosan polimerine ait FT-IR spektrumunda tespit edilen absorpsiyon bandları 79
Tablo 4-2: Amin-kitosan polimerine ait FT-IR spektrumunda tespit edilen absorpsiyon bandları 79
Tablo 4-3: Amin-tiyol-kitosan polimerine ait FT-IR spektrumunda tespit edilen absorpsiyon bandları 79
Tablo 4-4: Poli(β-amino ester) polimerin FT-IR spektrumunda tespit edilen absorpsiyon bandları 80
Tablo 4-5: BSA'ın Bradford yöntemi ile miktar tayininin doğrusallığına ait bulgular .. 84
Tablo 4-6: BSA'ın Bradford yöntemi ile miktar tayini yönteminin doğruluğuna ait bulgular 85
Tablo 4-7: BSA'ın Bradford yöntemi ile miktar tayini yönteminin gün içi kesinlik bulguları 85

Tablo 4-8: BSA'ın Bradford yöntemi ile miktar tayini yönteminin günler arası kesinlik bulguları 85
Tablo 4-9: BSA'ın Bikinkoninik asit yöntemi ile miktar tayininin doğrusallığına ait bulgular 87
Tablo 4-10: BSA'ın Bikinkoninik asit yöntemi ile miktar tayini yönteminin doğruluğuna ait bulgular 87
Tablo 4-11: BSA'ın Bikinkoninik ait yöntemi ile miktar tayini yönteminin gün içi kesinlik bulguları 88
Tablo 4-12: BSA'ın Bikinkoninik ait yöntemi ile miktar tayini yönteminin günler arası kesinlik bulguları 88
Tablo 4-13: Distile su ortamında hazırlanan AKS nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı 89
Tablo 4-14: %0,9 NaCl ortamında hazırlanan AKS nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı 90
Tablo 4-15: Fosfat tamponu (pH 7,4) ortamında hazırlanan AKS nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı 90
Tablo 4-16: Distile su ortamında hazırlanan ATKS nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı 91
Tablo 4-17: %0,9 NaCl ortamında hazırlanan ATKS nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı 92
Tablo 4-18: Fosfat tamponu (pH 7,4) ortamında hazırlanan ATKS nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı 92
Tablo 4-19: Boş PbAE-PLGA nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı 93
Tablo 4-20: BSA yüklü ve boş PbAE-PLGA nanopartiküllerinin santrifüj işleminden sonra partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel değerleri 93
Tablo 4-21: +4±1°C de bekletilen BSA yüklü amin-kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü (nm±SS) ve büyüklük dağılımı (PDI) sonuçları 95
Tablo 4-22: +25±5°C de bekletilen BSA yüklü amin-kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü (nm±SS) ve büyüklük dağılımı (PDI) sonuçları 96
Tablo 4-23: +4±1°C'de bekletilen BSA yüklü amin-kitosan nanopartiküllerinin zeta potasiyeli (mV±SS) değerlerine ait sonuçlar 99

Tablo 4-24: +25±5°C'de bekletilen BSA yüklü amin-kitosan nanopartiküllerinin zeta potasiyeli (mV±SS) değerlerine ait sonuçlar 100
Tablo 4-25: +4±1°C de bekletilen BSA yüklü amin-tiyol-kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü (nm±SS) ve büyüklük dağılımı (PDI) sonuçları 101
Tablo 4-26: +25±5°C de bekletilen BSA yüklü amin-tiyol-kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü (nm±SS) ve büyüklük dağılımı (PDI) sonuçları 102
Tablo 4-27: 4±1°C'de bekletilen BSA yüklü amin-tiyol-kitosan nanopartiküllerinin zeta potasiyeli (mV±SS) değerlerine ait sonuçlar 105
Tablo 4-28: +25±5°C'de bekletilen BSA yüklü amin-tiyol-kitosan nanopartiküllerinin zeta potasiyeli (mV±SS) değerlerine ait sonuçlar 105
Tablo 4-29: +4±1°C'de bekletilen PbAE-PLGA nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü (nm±SS) ve büyüklük dağılımı (PDI) sonuçları 106
Tablo 4-30: +4±1°C'de bekletilen PbAE-PLGA nanopartiküllerinin zeta potasiyeli (mV±SS) değerlerine ait sonuçlar 106
Tablo 4-31: Amin-kitosan nanopartiküllerinin BSA enkapsülasyon etkinliğine ait bulgular 109
Tablo 4-32: Amin-tiyol-kitosan nanopartiküllerin BSA enkapsülasyon etkinliğine ait bulgular 110
Tablo 4-33: PbAE-PLGA nanopartiküllerinin BSA enkapsülasyon etkinliğine ait bulgular 111
Tablo 4-34: Amin-kitosan nanopartiküllerinin üretim verimine ait bulgular 112
Tablo 4-35: Amin-tiyol-kitosan nanopartiküllerinin üretim verimine ait bulgular 112

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Mukozal yüzeylerde oluşan immün yanıtların şematik gösterimi 17
Şekil 2-2: Aşı taşıyıcı sistemi olarak kullanılan sistemlerin şematik gösterimi 31
Şekil 3-1: Sığır serum albüminin yapısı 43
Şekil 3-2: Aminlenmiş kitosan sentezinin şematik gösterimi 46
Şekil 3-3: Aminlenmiş ve tiyollenmiş kitosan sentezinin şematik gösterimi 47
Şekil 3-4: Poli(β-amino ester) polimer sentezinin şematik gösterimi 48
Şekil 3-5: İyonik jelasyon yöntemi ile hazırlanan TPP ile amin-kitosan nanopartiküllerinin oluşumunun şematik gösterimi 50
Şekil 3-6: Modifiye kitosan:TPP nanopartikülleri hazırlamak için kullanılan iyonik jelasyon yönteminin şematik gösterimi 51
Şekil 3-7: Poli(β-amino ester)-poli(laktik-*ko*-glikolik asit) nanopartiküllerini hazırlamak için kullanılan çift emülsiyon çözücü uçurma yönteminin şematik gösterimi 53
Şekil 3-8: İmmünizasyon protokolü 73
Şekil 3-9: ELISA testinin şematik gösterimi 77
Şekil 4-1: a) Kitosan b) Amin-kitosan ve c) Amin-tiyol-kitosan polimerlerine ait FT-IR spektrumları 78
Şekil 4-2: Poli(β-amino ester) polimerine ait FT-IR spektrumu 80
Şekil 4-3: Kitosan polimerine ait ^{1}H-NMR spektrumu 81
Şekil 4-4: Amin-kitosan polimerine ait ^{1}H-NMR spektrumu 82
Şekil 4-5: Amin-tiyol-kitosan polimerine ait ^{1}H-NMR spektrumu 82
Şekil 4-6: Poli(β-amino ester) polimerine ait ^{1}H-NMR spektrumu 83
Şekil 4-7: Bradford yöntemi ile elde edilen BSA miktar tayini yöntemine ait kalibrasyon eğrisi grafiği 84
Şekil 4-8: Bikinkoninik asit yöntemi ile elde edilen BSA miktar tayini yöntemine ait kalibrasyon eğrisi grafiği 86
Şekil 4-9: AKS-3 formülasyonunun hazırlandıktan hemen sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı 97
Şekil 4-10: AKS-3 formülasyonunun +4±1°C'de 1 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı 97
Şekil 4-11: AKS-3 formülasyonunun +4±1°C'de 3 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı 97

Şekil 4-12: AKS-3 formülasyonunun +4±1°C'de 6 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı 98
Şekil 4-13: AKS-3 formülasyonunun +4±1°C'de 12 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı 98
Şekil 4-14: ATKS-3 formülasyonunun hazırlandıktan hemen sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı 103
Şekil 4-15: ATKS-3 formülasyonunun +4±1°C'de 1 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı 103
Şekil 4-16: ATKS-3 formülasyonunun +4±1°C'de 3 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı 103
Şekil 4-17: ATKS-3 formülasyonunun +4±1°C'de 6 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı 104
Şekil 4-18: ATKS-3 formülasyonunun +4±1°C'de 12 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı 104
Şekil 4-19: PbAE-PLGA-2 formülasyonunun hazırlandıktan hemen sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı 107
Şekil 4-20: PbAE-PLGA-2 formülasyonunun +4±1°C'de 1 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı 107
Şekil 4-21: PbAE-PLGA-2 formülasyonunun +4±1°C'de 3 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı 108
Şekil 4-22: PbAE-PLGA-2 formülasyonunun +4±1°C'de 6 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı 108
Şekil 4-23: PbAE-PLGA-2 formülasyonunun, +4±1°C'de 12 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı 108
Şekil 4-24: Amin-kitosan:TPP oranının amin-kitosan nanopartiküllerinin BSA enkapsülasyon etkinliğine etkisini gösteren grafik 110
Şekil 4-25: Amin-tiyol-kitosan:TPP oranının amin-tiyol-kitosan nanopartiküllerinin BSA enkapsülasyon etkinliğine etkisini gösteren grafik 111
Şekil 4-26: Amin-kitosan nanopartiküllerinin SEM görüntüleri 113
Şekil 4-27: Amin-tiyol-kitosan nanopartiküllerinin SEM görüntüleri 114
Şekil 4-28: PbAE-PLGA nanopartiküllerinin SEM görüntüleri 115
Şekil 4-29: Hazırlama yönteminin BSA yüklü nanopartikül formülasyonlarının SDS protein bütünlüğüne etkisine ait bulgular 116

Şekil 4-30: Nanopartikül formülasyonlarının Calu-3 hücrelerinin yaşayabilirliğine etkisi 117
Şekil 4-31: Polimer çözeltilerinin Calu-3 hücrelerinin yaşayabilirliğine etkisi 117
Şekil 4-32: Nanopartikül formülasyonlarının A549 hücrelerinin yaşayabilirliğine etkisi 118
Şekil 4-33: Polimer çözeltilerinin A549 hücrelerinin yaşayabilirliğine etkisi 118
Şekil 4-34: İ.n. uygulamadan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde ölçülen serum Anti-BSA IgG titreleri 119
Şekil 4-35: İ.n. uygulamadan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde ölçülen serum Anti-BSA IgG_1 titreleri 120
Şekil 4-36: İ.n. uygulamadan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde ölçülen serum Anti-BSA IgG_{2a} titreleri 121
Şekil 4-37: İ.n. uygulamadan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde ölçülen serum Anti-BSA IgG_1 ve serum IgG_{2a} antikor titrelerinin oranı 121
Şekil 4-38: İ.n. uygulamadan sonra 253. günde vajinal yıkama çözeltisinde ölçülen sIgA antikor titreleri 122
Şekil 4-39: S.c. uygulamadan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde ölçülen serum Anti-BSA IgG antikor titreleri 123
Şekil 4-40: S.c. uygulamadan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde ölçülen serum Anti-BSA IgG_1 antikor titreleri 124
Şekil 4-41: S.c. uygulamadan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde ölçülen serum Anti-BSA IgG_{2a} antikor titreleri 124
Şekil 4-42: S.c. uygulamadan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde ölçülen serum Anti-BSA IgG_1 ve serum Anti-BSA IgG_{2a} antikor titrelerinin oranı 125
Şekil 4-43: İ.n. yoldan immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen IL-2 seviyeleri 126
Şekil 4-44: İ.n. yoldan immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen IL-4 seviyeleri 126
Şekil 4-45: İ.n. yoldan immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen IL-6 seviyeleri 127
Şekil 4-46: İ.n. yoldan immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen IL-10 seviyeleri 128

Şekil 4-47: İ.n. yoldan immünizasyondan sonra in vitro ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen INF-ɣ seviyeleri 129
Şekil 4-48: S.c. yol ile immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen IL-2 seviyeleri 130
Şekil 4-49: S.c. yol ile immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen IL-4 seviyeleri 131
Şekil 4-50: S.c. yoldan immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen IL-6 seviyeleri 132
Şekil 4-51: S.c. yoldan immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen IL-10 seviyeleri 133
Şekil 4-52: S.c. yoldan immünizasyondan sonra in vitro ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen INF-ɣ seviyeleri 134

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

°C	Santigrat Derece
µL	Mikrolitre
A549	İnsan akciğer karsinom hücresi
AKS	Aminlenmiş kitosan
ASH	Antijen sunan hücreler
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
ATKS	Aminlenmiş ve tiyollenmiş kitosan
BCA	Bikinkoninik Asit
BSA	Sığır serum albumini
Calu-3	İnsan akciğer adenokarsinom hücresi
CpG ODN	Sitozin-fosfat-guanin oligodeoksinükleotidi
DC	Dendritik hücre
dk	dakika
DMEM	Dulbecco Modifiye Eagle Besiyeri
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DT	Difteri toksoidi
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorban Testi
EMEM	Eagle Minimum Esansiyel Besiyeri
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Amerikan İlaç ve Gıda ve Teşkilatı
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
HIV	İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
^{1}H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans

HRP	Horseradish peroksidaz
Ig	İmmünoglobulin
IL	İnterlökin
INF-ɣ	İnterferon gama
i.m.	İntramüsküler
i.n.	İntranasal
i.v.	İntravenöz
KS	Kitosan
M hücreler	Mikrofold hücreleri
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MTL	Miktar Tayini Limiti
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
Mw	Molekül Ağırlığı
NALT	Nazal mukozaya bağlı lenfoid doku
NK	Doğal öldürücü hücreler
nm	Nanometre
NP	Nanopartikül
PbAE	Poli(β-amino ester)
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PCL	Polikaprolakton
PCS	Foton Korelasyon Spektroskopisi
PDI	Polidispersite indeksi
PEG	Polietilen glikol
PLA	Poli(laktik asit)

PLGA	Poli(laktik-*ko*-glikolik asit)
PVA	Polivinil alkol
RSS	Relatif Standart Sapma
s.c.	Subkütan
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
sIgA	Salgılanan İmmünoglobulin A
SS	Standart Sapma
TCR	T-hücre reseptörleri
Th	Yardımcı T hücresi
TL	Teşhis limiti
TLR	Toll benzeri reseptör
TNF	Tümör nekrozu faktörü
TPP	Tripolifosfat

ÖZET

Sinani G. Nazal Yol ile Uygulanan Aşı Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2016.

Mukozal yol ile uygulanan aşılar sistemik immün yanıt ile birlikte mukozal immün yanıt da oluşturmaktadır. Nazal mukoza hem sistemik hem de mukozal bağışıklama için etkin bir bölgedir. Genellikle nazal yol ile uygulanan aşılar ile oluşan immün yanıt zayıftır. Adjuvanların veya aşı taşıyıcı sistemlerin kullanımı mukozal yoldan uygulanan aşıların immün yanıtını arttırmaktadır. Nanoteknoloji alanındaki gelişmeler ile farklı partikül boyutuna, yüzey yüküne ve yüzey özelliklerine sahip polimerik aşı taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesine olanak sağlanmıştır. Biyouyumlu ve biyoparçalanabilir kitosan ve poli(laktik-*ko*-glikolik asid) polimerleri ile hazırlanan partiküler sistemler mukozal adjuvant özelliği göstermiştir. Pozitif yüklü poliester polimerleri kolay sentezlendiğinden ve biyoparçalanır olduğundan farklı özellikte ilaçlar için etkin taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasına olanak vermektedir. Çalışmada, adjuvan özelliğini arttırmak amacıyla, kitosan esaslı biyopolimer ile sentetik poliester polimerleri ilk kez sentezlenmiş ve yapıları FT-IR spektroskopi ve ^{1}H-NMR ile ispatlanmıştır. Modifiye kitosan partikülleri tripolifosfat kullanılarak iyonotropik jelasyon yöntemi, poliester yapısında partikülleri ise çift emülsiyon uçurma yöntemi ile hazırlanmıştır. Aşı taşıyıcı sistem olarak kullanılacak nanopartikülere (NP) model antijen olarak sığır serum albumini (BSA) yüklenmiştir. Partikül boyutu 100-250 nm arasında değişen, +4±1°C'de fiziksel stabiliteye ve pozitif yüzey yüküne sahip ve enkapsülasyon etkinliği yüksek (%78-%91) partiküller elde edilmiştir. Taramalı elektron mikroskobu ile elde edilen fotoğraflar partikül yüzeyinin yuvarlak ve pürüzsüz olduğu göstermiştir. Enkapsülasyon işleminin BSA proteinin yapısal bütünlüğünü değiştirmediği SDS-PAGE ile kanıtlanmıştır. Calu-3 ve A549 hücre hatlarında yapılan toksisite çalışmaları (MTT testi) sonucunda, NP'lerin 2 mg/mL konsantrasyona kadar düşük toksisite gösterdiği ispatlanmıştır. Balb/c farelerde yapılan *in vivo* çalışmalar kapsamında incelenen serum antikor ve sitokin seviyeleri, nazal yol ile uygulanan NP'lerin, s.c. yol ile uygulanan NP'lerden özellikle 2. dozdan sonra daha yüksek sistemik (hümoral ve hücresel) ve mukozal immün yanıt oluşturduğunu göstermiştir. Geliştirilen partiküler sistemler, nazal yol ile aşıların uygulanması için uygun fiziksel özelliklere ve uzun süreli stabiliteye sahip oldukları, adjuvan özellik göstererek immün yanıtı arttırdıkları için nazal aşı taşıyıcı sistemler olarak kullanımları umut vaad etmektedir.

Anahtar Kelimeler: nazal aşı, nanopartikül, kitosan, poliester, poli(laktik-*ko*-glikolik asit)

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36160

ABSTRACT

Sinani G. Development of Vaccine Carrier Systems for Nasal Delivery. Istanbul University, Institute of Health Science, Pharmaceutical Technology Department, PhD Thesis, Istanbul. 2016.

The delivery of vaccines by mucosal route can stimulate both mucosal and systemic immunity simultaneously. In particular, the nasal cavity is an easily accessible route for vaccination. In general, nasal delivery of vaccines results in poor immune responses. The use of various adjuvants and vaccine carrier systems has been found to improve the immune response of mucosal vaccines. Nanotechnology offers the opportunity to design particulate delivery systems varying in size, shape and surface properties for vaccine development. Particulate systems prepared from biodegradable and biocompatible chitosan and poly(lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) polymers have shown mucosal adjuvant activity. Biodegradable positively charged polyester polymers can be easily synthesised and are suitable delivery systems for various drugs. In this study, new modified chitosan derivative and synthetic polyester polymers with increased adjuvanticity were synthesised in house and their structures were confirmed by FT-IR spectroscopy and ^{1}H-NMR studies. Modifed chitosan nanoparticles (NPs) were prepared by ionotropic gelation with tripolyphosphate and polyester NPs were prepared by double emulsion solvent evaporation method. The potential of bovine serum albumin (BSA) loaded NPs as vaccine carrier systems was evaluated. Particles with high encapsulation efficiency (78%-91%), positive surface charge and particle size within the range of 100-250 nm stable at +4±1°C'de up to 1 year were obtained. Scanning electron microscope photographs revealed that particles were spherical with smooth surface. SDS-PAGE structural integrity of BSA in particles was confirmed and cytotoxicity studies in Calu-3 and A549 cells showed minimal toxicity of NPs at concentrations as high as 2 mg/mL. Antibody and cytokine results from *in vivo* studies in Balb/c mice performed to investigate immune response of NP formulations showed that intranasal administration of NP formulations, although not statistically significant, induced higher systemic (humoral and cellular) immune responses than NP formulations administered subcutaneously, especially after boosting. Also, mucosal immune responses were induced by intranasal administration of NPs. Vaccine carriers systems with suitable size, surface charge, stability and adjuvanicity for nasal antigen delivery were successfully prepared. These studies demonstrate that these NPs enhance immune response when applied nasally and can be promising vaccine carriers for nasal immunisation.

Key Words: nasal vaccine, nanoparticle, chitosan, poly (lactide-*co*-glycolide), polyester

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 36160

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yirminci yüzyıldan itibaren kullanılmaya başlanan aşılar, hastalıklardan koruma sağlayarak ya da var olan bir hastalığı tedavi ederek insanların yaşam kalitesini arttırmıştır (Plotkin 2005). Günümüzde kullanılmakta olan aşıların çoğu parenteral yoldan (i.m. ve s.c.) uygulansa da, son yıllarda non-invazif yoldan uygulanan aşılar üzerine araştırmalar giderek artmakta ve özellikle nanoteknoloji ve biyoteknoloji alanlarında gelişmeler sonucunda mukozal yoldan uygulanan yeni partiküler aşı taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi üzerine araştırmalar artarak devam etmektedir.

Nazal yol ile uygulanan aşı formülasyonlarında antijenin nazal mukozadan geçişini ve oluşturduğu immün yanıtı arttırmak, antijeni enzimatik degredasyondan ve mukosilier klirensten korumak amacıyla çeşitli adjuvanlar ve aşı taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir (Davis 2001). Mukozal adjuvanlar dışında son yıllarda partiküler aşı taşıyıcı sistemler (lipozom, mikroküre, nanopartikül, ISCOM) antijen alımının gerçekleştiği bölgelere hedeflendirme sağlayarak antijen alımını ve immün yanıtı arttırmaktadır (Saatçi ve Bozkır 2003; Ozsoy ve ark. 2009; Lawson ve ark. 2011).

Mikro/nanopartikül formülasyonları hazırlamak için en çok araştırılan polimerler, biyouyumlu, biyoparçalanabilir, kontrollü salım özelliği gösteren poli(laktik-*ko*-glikolik asid) (PLGA) ve kitosan polimerleridir (Li ve McCarthy 1999; Tamber ve ark. 2005). Gen transfeksiyon çalışmalarında, kanser ilaçlarının hedeflendirilmesinde ve hücre içi alım çalışmalarında başarılı sonuçlar gösteren poli(β-amino ester) (PbAE) polimerleri de son yıllarda ilgi çeken yeni ilaç taşıyıcı sistemlerdendir.

Çalışmada, nazal yol ile uygulandığında mukozal ve sistemik immüniteyi tetikleyen yeni nanopartiküler aşı taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için, aşı taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılmak üzere yeni biyouyumlu modifiye kitosan türevlerinin (aminlenmiş kitosan ve aminlenmiş ve tiyollenmiş kitosan) ve katyonik PbAE polimerlerinin tarafımızdan sentezlenmesi, bu polimerler ile PLGA polimerleri kombine edilerek model antijen sığır serum albümin (BSA) yüklü nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması ve optimizasyonu, *in vitro* testler sonucunda en iyi özellik gösteren

formülasyonların farelerde *in vivo* çalışmalar ile adjuvan özelliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Giriş

Aşıların tarihi gelişim süreci çok eski dönemlerde başlamakta ve günümüze kadar devam etmektedir. Tarihte aşıların kullanıldığına dair ilk kanıt, Çin'de Sung Hanedanı döneminde M.Ö. 590 yılında çiçek hastalığından korunmak amacı ile ciltte oluşan iltihabın sağlıklı kişilerin burnunun içine uygulanmasıdır. Fakat, bu aşılama yöntemi bazı uygulamalarda hastalığa neden olduğu için yaygın olarak kullanılmamıştır. Sistematik aşılama ise, yine çiçek hastalığına karşı olmak üzere, 1796 yılında bir İngiliz hekim ve bilim adamı olan Edward Jenner tarafından hastada sığır çiçek hastalığına bağlı oluşan döküntülerden alınan iltihabın (*Vaccinia* virüsünü) sağlıklı bireylere uygulanması ve bu aşılama yolunun geniş kitlelerde kullanılması ile başlatılmıştır (Plotkin 2005; Riedel 2005). Çiçek hastalığına karşı korunma amacıyla aşı kullanımı, Avrupa'da hızlı kabul edilmesine ve uygulanmasına rağmen, aşılama ile ilgili detaylı bilgilere ulaşılması ve yeni aşıların kullanıma girmesi yaklaşık 100 yıl sonra mümkün olmuştur. İnsanlara uygulanan ikinci aşı ise, Louis Pasteur tarafından 1885 yılında geliştirilen kuduz aşısıdır. Tifo aşısı ve kolera aşısı (1896) ile veba aşısı (1897) 19. yüzyıl da geliştirilen diğer aşılardır (Landry ve Heilman, 2005). Sonraki senelerde, yeni aşıların geliştirilmesi konusunda yavaşlama görülmesine rağmen, çeşitli aşılar kullanıma sunulmuştur. Günümüzdeki araştırmalar ise, kullanılmakta olan mevcut aşıların etkinliğinin arttırılması üzerine yoğunlaşmıştır. Modern tıbbın önemli buluşlarından olan aşılar, 1796'da Edward Jenner'in çiçek hastalığına karşı kullandığı ilk aşının kullanıma girmesiyle beraber, hastalıklardan korunmada ve hastalıkların yok edilmesinde yaşam süresi ve kalitesini yükseltmiştir (Landry ve Heilman, 2005). Günümüzde 70'ten fazla aşı, yaklaşık 30 patojene karşı kullanılmak üzere onay almıştır. Yeni aşı geliştirme çalışmaları ise halen yoğun bir şekilde devam etmektedir.

2.2. İmmünizasyon

Kişiye bağışıklık kazandırmak amacıyla vücuda immün yanıtı uyaran maddelerin verilmesi immünizasyon olarak bilinmektedir. İmmünizasyondan sorumlu olan hücre ve organların tümüne ise immün sistem adı verilir. Vücut, potansiyel olarak kendisi için

yabancı maddeleri tanıyabilme ve zararlı olabilecek etkenlere karşı kendisini koruyabilme özelliğine sahiptir. Bu maddelerin vücuda girmesi ile başlayan ve immün sistemin farklı kompartmanlarının birbiri ile ilişkili olarak karşılıklı ve düzenli etkileşimleri ile ortaya çıkan cevaba immün yanıt denir. İmmün yanıtı uyaran maddelere ise antijen adı verilir.

2.2.1. İmmün Sistem Hakkında Temel Bilgiler ve İmmünolojik Yanıt Çeşitleri

İmmün sistem, organizma için ‘‘yabancı’’ olan her canlı veya cansız etkenlere ve malign hücrelere karşı vücudun savunma mekanizmalarını aktifleştirerek onların yok olmasını sağlamaktadır. Otoimmün hastalığı olarak bilinen durumlarda ise vücut sağlıklı hücrelere karşı immün yanıt oluşturmaktadır. Oldukça karmaşık olan immün sisteminin anlaşılması, insan sağlığın korunması ve aşıların etkinliği için önemlidir. İmmün sistem, oluşturduğu immün cevaba göre ikiye ayrılmaktadır:

1. Doğal immün sistem
2. Kazanılmış immün sistem

2.2.1.1. Doğal İmmün Sistem:

Doğal immün sistem, doğum ile kazanılan ve farklı patojenlerin vücuda girmesiyle uyarılan vücudun genel savunma mekanizmasıdır. Doğal immün sistem, antijene özgü reseptörü olmayan doğal öldürücü hücreler (NK), makrofajlar ve nötrofillerden oluşmaktadır. Uyarılmış aktif makrofajlardan salgılanan IFN-α, IFN-β ve TNF-α gibi sitokinler de doğal immün sisteminin birer elemanı olarak işlev görmektedir. Doğal immün sistemin bileşenleri, vücuda giren bütün yabancı maddelere karşı aynı biçimde karşılık vermekte ve vücut aynı yabancı madde ile her karşılaştığında aynı şiddette immün yanıt oluşturmaktadır. Patojenlerin varlığında uyarılan doğal bağışıklık sistemi hücreleri çoğalmamakta ve farklılaşmamaktadır. Ayrıca, doğal immün yanıtın uyarılması ile immünolojik hafıza hücreleri oluşmamaktadır. Doğal immün sistemin anahtar hücreleri olarak kabul edilen antijen sunan hücreler (ASH) (makrofajlar ve dendritik hücreler), antijen, virüs, bakteri ve partikül şeklinde vücuda giren yabancı maddeleri tanımakta ve kazanılmış immün sisteme sunmaktadır (Pashine ve ark. 2005). B hücreleri de özel koşullarda antijen sunma özelliğe sahiptir (Ashwell ve ark. 1985; Rodríguez-Pinto 2005). Antijenler, dendritik hücrelerin yüzeyine, hücre içinde sentezlenen MHC (Majör

Histokompatibilite Kompleksi) molekülleri ile birleşerek kompleks halinde sunulmadan önce, hücre içinde proteolitik parçalanma ile küçük peptidlere ayrılmaktadır. Doğal immün yanıtın oluşması, vücudun patojenle ilk karşılaşmasın da önemlidir. Ayrıca, mukus tabakası ile örtülü olan mukozal yüzeyler (solunum, gastrointestinal ve vajinal) yapısal bariyer gibi görev yapmakta ve mikroorganizmaların vücuda girişini engellemektedir.

2.2.1.2. Kazanılmış İmmün Sistem

Vücuda giren yabancı maddelerin tanınması ile, özgül immün yanıt oluşturan kazanılmış immün sistem hücreleri klonal çoğalmaya başlamaktadır. Hızla çoğalan ve yeni fonksiyonel özellikler kazanan bu hücreler hafıza özelliği geliştirmekte ve aynı yabancı madde ile tekrar karşılaşıldığında çok daha hızlı ve etkili bir immün yanıt oluşturmaktadır. Kemik iliğinde pluripotent kök hücrelerinin lenfoid kök hücrelerine farklılaşmasıyla oluşan B ve T hücreleri ile, bu hücrelerin salgıladıkları antikor ve sitokinler kazanılmış immün sistemin başlıca elemanlarıdır. Antijenlere karşı özgül immün yanıt, T-hücre reseptörleri (TCR) ve B-lenfositlerin yüzeyinde eksprese olan antijene özgü reseptörler aracılığı ile sağlanmaktadır. Erken safhalarda lenfosit gelişimi için antijenin varlığı gerekmese de, hücrelerin farklılaşması, çoğalması ve immünolojik hafıza oluşturması antijene bağlıdır. Aşıların kullanımı ile kazanılmış immünitenin uyarılması hedeflenmektedir (Alberts ve ark. 2002; Janeway ve ark. 2001). Kazanılmış immün sistemin oluşturduğu immün yanıtlar, yanıtların oluşturulmasında görev alan immün sistem elemanlarına göre ikiye ayrılmaktadır; 1. Hümoral immünite: Antijeni spesifik olarak tanıyarak ortadan kaldırılmasını sağlayan B lenfositleri ile antikor olarak tanımlanan immünoglobulinler (Ig) başlıca sorumludur. 2. Hücresel immünite: Antijeni spesifik olarak tanıyan T lenfositler başlıca sorumludur.

Hümoral bağışıklık

Hümoral immün yanıtın oluşturulmasından sorumlu olan B hücreleri, antijeni, yüzeylerindeki özgül immünoglobulin reseptörleri ile tanımaktadırlar. B lenfositlerin aktivasyonu, antijenin MHC molekülleri tarafından T-yardımcı hücrelerine (Th) sunulmasından sonra, Th hücrelerinin salgıladığı sitokinler aracılığı ile ya da başka bir uyarıcının etkisi ile gerçekleşmektedir. Aktivasyon sonucunda B lenfositleri, antikor yapan

ve salgılayan efektör B hücrelerine (plazma hücreleri) ve hafıza hücrelerine dönüşmektedirler. Hafıza B hücreleri, oluşumlarına neden olan antijene özgüdür ve aynı antijen ile yeniden karşılaştığında onu tanıyarak daha yüksek miktarda, daha hızlı, daha uzun süre için plazma B hücrelerinin (plazmosit) oluşmasına, dolayısı ile de daha fazla ve daha hızlı antikor üretimine yol açmaktadır. B hücreleri, efektör plazma hücrelerine dönüştüğünde yüksek seviyede antikor salgılama yeteneği kazanmaktadır (Abbas ve ark. 2012). IgM, primer immün yanıt esnasında ilk salgılanan ve immün yanıtın başladığını gösteren ilk Ig dir. IgG ise genelde IgM antikorların salgılanmasından sonra salgılanmakta ve opsonizasyondan sorumludur. IgG, IgG_1 ve IgG_{2a} olmak üzere 2 alt gruba ayrılır. IgA'nın bir tipi olan salgılanan IgA (sIgA) ise mukozal yüzeylerde bulunmaktadır. sIgA yabancı maddeleri nötralize etmekte ve/veya bunların epitel hücrelere yapışmasını önlemektedir. Hümoral immünite, özellikle ekstrasellüler patojenlere karşı immün yanıtın oluşturulmasında önemlidir.

Hücresel bağışıklık

Hücresel immün yanıtının oluşmasından sorumlu olan T hücrelerinin yanında, vücuda giren yabancı maddelerin ortadan kaldırılması veya zararsız hale getirilmesi için fagositik hücreler (makrofaj ve granülositler), doğal öldürücü hücreler ve diğer bazı hücreler de görev almaktadır. Bunların yanında, bazen antikorlar da opsonizasyon, antikora bağımlı hücresel toksisite gibi işlemlerle hücresel immün yanıtın oluşmasına katkıda bulunur. Protein yapısındaki antijenler, ASH'lerde küçük peptidlere ayrıldıktan sonra, MHC-I ve ya MHC-II molekülleri ile T lenfositlere sunulur ve bu hücrelerin yüzeyinde bulunan antijene uygun TCR sayesinde tanınır. Antijeni tanıyan T hücreleri farklılaşmaya ve hücreler arasında mesaj taşıyan sitokin denen peptid yapıda ki molekülleri salgılamaya başlar. Bu hücrelerin gelişiminde, CD4+ ve CD8+ reseptörleri özellikle önemlidir. CD4+ hücreleri MHC-II moleküllerine bağlanmakta ve tüm immün yanıt olayların temel hücresi olan Th olarak görev yapmaktadır. CD4+ T-hücresi MHC-II moleküllerine bağlanan antijeni tanımakta ve sentezlenen sitokinlere bağlı olarak Th0 hücresinden Th1 ya da Th2 hücresine farklılaşmaktadır. İmmün yanıtın devamı için Th1 ve Th2 hücrelerinin rolü çok önemlidir. Th1 sitotoksik T hücreleri, makrofajları ve diğer dendritik hücreleri aktive ederek hücresel immüniteye yol açan INF-γ, IL-2, gibi sitokinlerin salgılanmasını sağlar.

Th2 hücreleri ise, B hücrelerini harekete geçirmekte ve özgül antikor yapımını artıran IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-10 sitokinleri salgılamaktadır. Sitokinler immün yanıtın regülasyonunda rol almaktadır. Salgılanan INF-γ, Th2 hücrelerinin çoğalmasını durdururken, IL-10 sekresyonu ise Th1 hücrelerinin inhibisyonu/supresyonundan sorumludur. Antikor üretimi bu şekilde kontrol edilmektedir. Viral bir patojen ile enfekte hücreler ise, MHC-I moleküllerinin antijen ileoluşturdukları kompleksin CD8+ T hücrelerine bağlanmasından ve sitotoksik T hicrelerini uyarmasından sonra , lizis ile yok edilmektedir. Hücresel sitotoksisite, ortamda özgül antikorların bulunması ile artmaktadır. Enfekte hücrelerin doğrudan lizis ile yok edilmelerinin yanında, TNF-α, IFN-γ ve lenfotoksin içeren pek çok sitokinde salgılamaktadır. Hücresel immün yanıtın oluşması özellikle pekçok virüs, bakteri, mantar, parazit ve kanser hücrelerinin ortadan kaldırılması için özellikle önem taşımaktadır.

Antijen, uygulama yolu ve kullanılan aşı adjuvanları oluşan immün yanıtının tipini belirlemektedir.

2.2.2. Mukozal Bağışıklık

Mukozal yüzeyler, vücut ile dış ortam arasında en büyük ve önemli bariyeri oluşturmaktadır (Lawson ve ark. 2011). Mukoza, vücuda giren patojenler için ilk temas noktası olduğundan, onların vücuda girişinin, çoğalarak enfeksiyon oluşturmasının ve vücutta yayılmasının önlenmesinde önemlidir. Vücuda giren patojenler, mukozayı, vücutta çoğalmak ya da vücudun diğer yerlerine yayılmak için kullanmaktadır. Doğal bağışıklık sistemi, patojenlerin ilk aşamada eliminasyonunda, kazanılmış bağışıklık sistemi ise, daha önce karşılaşılan patojenlerin enfeksiyon oluşturmalarının önlenmesinde rol oynamaktadır. Mukozal bağışıklık sistemi doğal ve kazanılmış bağışıklık mekanizmaları arasında karmaşık bir ağ oluşturmaktadır (Kang ve Cerutti, 2010). Mukozaya bağlı lenfoid dokuda (MALT) bulunan ve özelleştirilmiş hücreler olan M (Mikrofold) hücreleri, antijenin mukozal yüzeylerden etkin bir şekilde alımını sağlayarak, immün yanıtın başlatılması için dendritik hücrelere sunar (Corr ve ark. 2008). Dendritik hücreler ise, immün cevabın başlatılması için naif T-hücrelerin çoğalmasını ve T-hücrelerin alt tiplerine (Th1, Th2, Th17, ya da düzenleyici T hücreleri) farklılaşmasını uyarır. Dendritik hücreler ve T-hücreler aynı zamanda B-hücrelerinin mukozal yüzeylerde farklılaşmasında ve antikor üretimini başlatılmasında görev alır ve bunun sonucunda *ortak mukozal bağışıklık sistemi*

(CMIS) oluşur. Ortak mukozal bağışıklık sistemi, vücudun herhangi bir mukozal bölgesine uygulanan aşı ile uyarılır ve aşının uygulandığı bölgeden uzak mukozal yüzeylerde de immün yanıt oluşur. Mukozada salgılanan antikorların %80'ni oluşturan salgılanan IgA (sIgA), mukozal bağışıklığın ana antikorudur. Mukozal bağışıklık sistemi, sIgA'in salgılanmasıyla bakteri ve virüslerin mukozaya yapışmasını ve organizmaya girişlerini engeller (Almeida ve Alpar 1996). Antikor üretiminin çoğunlukla T-hücrelere bağlı olduğu düşünülmesine rağmen, T-hücrelerden bağımsız olarak B hücrelerinin doğrudan DC ya da epitel hücreler tarafından salgılanan BAFF ve/veya APRIL ile uyarıldığı ve sIgA salgılanmasını sağladığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Puga ve ark. 2010). Bu olgunun aşılama ile mukozal bağışıklık üzerine etkisi sadece birkaç çalışmada incelenmesine rağmen, korucuyu mukozal immün yanıt oluşmasında önemlidir (Katsenelson ve ark. 2007; Tertilt ve ark. 2009). Mukozal bağışıklık üzerine yardımcı T hücrelerinin önemi bilinmesine, son zamanlarda mukozal bağışıklık üzerine Th17 hücrelerinin ve IL-17 nin de rolünün olduğu anlaşılmıştır (Khader ve ark. 2009; Lin ve ark. 2010). IL-17, sIgA düzeylerini arttırmakta (Jaffar ve ark. 2009) ve B-hücrelerinin IgA salgılayan hücrelere farklılaşmasını kolaylaştırmaktadır (Ranchin ve ark. 2009).

2.3. Aşılar

Organizmaya uygun yollardan verildiğinde (ağız, deri, derialtı, vb.) immün yanıt oluşturarak, canlının hastalıklardan korunmasını ya da var olan bir hastalığın tedavisini sağlayan maddelere aşı denir.

Belirli bir hastalığa karşı korunmak amacıyla tasarlanan *profilaktik aşıların* yanında, özellikle biyoteknolojik gelişmeler sonucunda, var olan bir hastalığı tedavi etmek amacıyla *terapötik aşılar* da geliştirilmiştir. Terapötik aşıların lenfoma, lösemi, beyin, meme, akciğer, böbrek, rahim ağzı kanserlerin (Melero ve ark. 2014), romatoid artrit gibi enflamatuar hastalıkların (Zimmerman ve ark. 2010), Hepatit B ve Hepatit C gibi kronik hastalıkların (Buchmann ve ark. 2013; Fournillier ve ark. 2013) tedavisinde kullanımı araştırılmıştır. Bu aşılar, hücresel immüniteyi arttırarak mevcut enfeksiyonu veya malign hücreleri yok etme potansiyeline sahiptir. Bu nedenle, hastalıklar üzerinde kontrolü ve mevcut enfeksiyonların tedavisini sağlamak için terapötik aşıların geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Provenge®, 2010 yılında prostat kanseri tedavisinde kullanılmak üzere

Amerikan Gıda ve İlaç Teşkilatı (FDA) tarafından onaylanmış ilk terapötik kanser aşısıdır (Cheever ve Higano, 2011).

2.3.1. Aşı Çeşitleri

2.3.1.1. İnaktif (ölü) Aşılar

İnaktif aşılar, hastalık etkeni olan patojen, bakteri ya da virüslerin hastalık oluşturan özelliklerinin, fiziksel (ısı) ya da kimyasal (formaldehit, aseton) yöntemlerle ortadan kaldırılarak inaktif hale getirilmesi ile elde edilmektedir. İnaktivasyon işlemi sonucunda, immün yanıt oluşturan özellikler korunmaktadır. Çocuk felci, tifo, hepatit A, boğmaca ve kuduz aşıları inaktif aşılara örnektir. İnaktif aşılar, güvenilirliği yüksek, stabil ve kolay saklanabilen aşılardır. Spesifik immün yanıtı oluşturma gücüne sahiptirler (Jinskoot ve Kersten 2011) Bu aşıların uygulanması ile genel olarak hümoral bağışıklık sistemi uyarılmaktadır. Salgılanan antikor düzeyleri ise, oluşan immün yanıtın gücünü belirlemektedir. Sitotoksik hücresel immün yanıtın düşük düzeyde uyarılması ya da hiç uyarılmaması ve mukozal yüzeylerde sIgA salgılanmaması bu tip aşıların en büyük dezavantajıdır. Ayrıca, zayıf immünojenik özelliklerinden dolayı bu aşılara karşı gelişen koruyucu bağışıklık yanıtı zamanla azalmaktadır. Bu nedenle, istenilen düzeyde immün yanıtı ve ömür boyu aşılama sağlamak için tekrar dozların uygulanması gerekmektedir (Plotkin ve Plotkin 2013).

2.3.1.2. Konjuge Aşılar

Konjuge aşılar, bakteri duvarından elde edilen kısımların taşıyıcı bir proteine bağlanmasıyla oluşmaktadır. Aşı bileşiminde kullanılan bakteri parçası tek başına güçlü immün yanıt oluşturamadığından taşıyıcı bir proteinle konjuge edilmesi ile enfeksiyonlara karşı immünite sağlamaktadır. *Haemophilus spp.* ve *Streptococcus pneumoniae* gibi bakterilerin polisakkarit yapısında olan dış kapsülleri patojeniktir. Protein yapısında olan antijenlere karşı oluşan timusa-bağlı immün yanıtların aksine, polisakkarit yapısında olan antijenlere karşı T-hücresine bağlı olmayan immün yanıt oluşmaktadır (Berger 1998). Oluşan bu immün yanıt, gençlerde ve özellikle 2 yaş altındaki çocuklarda immün sistem yeterince gelişmediğinden, suboptimal düzeydedir. Bu yüzden, polisakkaritler, immün sisteminin önceden karşılaştığı (tetanoz ve difteri toksoidi) taşıyıcı proteinlerle konjuge

edilmektedir. Polisakkarit-protein yapısında bu antijenlere karşı oluşan immün yanıt T-hücrelere bağlı olmakta ve immünolojik hafıza gelişmektedir. Tekrarlanan dozlar sonucunda çocuklarda yükselmiş antikor düzeyleri görülmektedir. Bu aşılara örnek, 1987 yılında ruhsat alan konjuge *Haemophilus influenzae* B aşısı ve 2000 yılında ruhsat alan pneumococcal aşısıdır (Goldblatt 2000).

2.3.1.3. Canlı Zayıflatılmış Aşılar

Canlı zayıflatılmış (atenüe) aşılar, organizmada çoğalmakta ve genellikle vahşi virüslerin neden olduğu enfeksiyonlar gelişmeden viral replikasyonu indüklemekte ve immün yanıt uyarmaktadır. Canlı zayıflatılmış aşılara karşı uyarılan immün yanıt, doğal enfeksiyona karşı oluşan immün yanıt ile benzerdir. Oral yoldan uygulanan canlı zayıflatılmış aşılar hariç, immün yanıt oluşturmak için tek doz yeterli olduğu için, genellikle tekrarlanan dozların uygulanması gerekmemektedir. Bu aşılar hümoral, mukozal ve hücresel immün yanıtları uyararak doğal enfeksiyonlara karşı organizmanın bağışıklığını arttımaktadır. Canlı zayıflatılmış aşıların dezavantajı, özellikle bebeklerde, immün yetmezliği olan kişilerde ve duyarlı kişilerde fırsatçı patojen gibi davranarak ters etki göstermesi ve hastalık oluşturmasıdır (Clem 2011). Örneğin, aşılamadan kaynaklanan paralitik çocuk felci (VAPP), canlı zayıflatılmış çocuk felci aşısı bağışıklık sistemi baskılanmış kişilere uygulanmasından sonra görülmektedir (Mermel ve Sutter 1993). Canlı zayıflatılmış aşılar, ısı veya ışığa maruz kaldıklarında kolay bozulduğundan kullanım ve depolama sırasında dikkatli olunmalıdır.

2.3.1.4. Altbirim Aşıları

Altbirim aşılar hastalık etkeni olan ve immün sistemini uyarabilen patojenin yüzeysel polisakkaritler (*Hemophilus influenzae* aşısı) ya da spesifik viral proteinler (Hepatit B aşısı) gibi antijen özelliği gösteren fragmanlarının saflaştırılmasıyla geliştirilmektedir. Altbirim aşılar, zayıflatılmış aşılara göre daha kolay üretilmektedir. Daha az yan etkiye sahip güvenilir aşılardır. Çoğunlukla rekombinant DNA teknolojisi ile elde edildiğinden yüksek miktarda üretilebilmektedir (Hansson ve ark. 2000). Ancak, antijen özelliği gösteren ve uzun süre bağışıklık sağlayan epitopların tanımlanması zordur. Günümüzde kullanılan altbirim aşılara örnek, rekombinant teknolojisi ile üretilen Hepatit B

aşısıdır. Bu aşı, Hepatit B yüzey antijen (HbsAg) geninin maya hücrelerine klonlanması ve sonucunda maya hücrelerinde HbsAg'in ekspresyonu ile elde edilmektedir (Valenzuela ve ark. 1982). Benzer rekombinant DNA teknolojisi ile Lyme hastalığına karşı altbirim *Borrelia burgdorferi* aşısı geliştirilmiştir (Steere ve ark. 1998). Ancak, Lyme hastalığına karşı geliştirilen tek aşı olmasına rağmen, gösterdiği yan etkilerden dolayı 2002 yılında piyasadan çekilmiştir (Poland 2011). Peptid yapısında altbirim aşıların immünojeniteleri zayıf olduğundan, yeterli düzeyde immün yanıt oluşturmak için, immün sistemi uyarıcı kompleksler, virüsa benzeyen partiküller ve/veya antijen kaplı ya da antijeni enkapsüle eden taşıyıcı sistemler ile birlikte kullanılmaktadırlar.

Toksoid aşılar ise, mikroorganizmaların ürettiği zararlı toksin inaktive edilerek elde edildiğinden, altbirim aşıların alt sınıfı olarak düşünülmektedir. Bu aşılara örnek, tetanoz ve difteri toksinleridir (Jinskoot ve Kersten 2011).

2.3.1.5. DNA Aşıları

Bu tip aşılar, DNA teknolojisi temeline dayanmaktadır. Antijen özelliği gösteren bir proteinin kodunu taşıyan gen bir ekspresyon plasmidine bağlandıktan sonra organizmaya verilir, genin ekspresyonu vücut içinde gerçekleşir, sentezlenen gen ürünü protein de vücutta kodlanmış olduğu antijene karşı immün sistemi uyararak bağışıklık oluşturur. DNA aşıları, üretimi kolay, geleneksel aşılara göre daha dayanıklı ve güvenli aşılardır. Uygulandıklarında hem hümoral hem de sitotoksik T hücre immün yanıtlarını uyardığından oldukça etkilidirler. Hayvanlar üzerinde ümit verici sonuçlar alınmasına rağmen, henüz insanlarda kullanılan onaylı bir DNA aşısı yoktur.

2.3.2. Aşıların Etkinliğini Değiştiren Faktörler

İstenilen düzeyde immün yanıtın başlamasında çeşitli faktörler etkilidir. İlk olarak, kullanılacak bakteri veya virüsün suşu dikkatli seçilmeli ve dozu ayarlanmalıdır. İkinci olarak, kazanılmış immün yanıtının oluşması için doğal immün sisteminin uyarılması önemlidir (Hoebe ve Janssen 2004). Bu nedenle, erken immün yanıtın başlamasında rolü olan ve aşıların immün yanıt oluşturma gücünü arttıran maddelerin (adjuvan) kullanımı ile aşı taşıyıcı sistemlerin özellikleri, optimum bir immün yanıtının başlanması için büyük önem taşımaktadır (O'Hagan 2001).

Aşıların etkinliğini değiştiren faktörler aşağıdaki gibidir:

- İmmünojenin yapısı (canlı, ölü, vb.,) ve dozu
- Formulasyonda kullanılan adjuvan ya da taşıyıcı sistem
- Aşı takvimi
- Aşının uygulama yolu
- Aşılanan kişinin yaşı
- Genetik özellikler (MHC polimorfizmi)
- Sağlık durumu (immün sistem yetmezliği gibi) (Newman ve Powell 1995).

2.3.3. Yeni Nesil Aşılar Hakkında Güncel Yaklaşımlar

Yeni aşı antijenlerin üretimi daha etkili aşıların geliştirilmesine yol açmıştır. Zayıflatılmış canlı aşılar ile kıyaslandığında, daha güvenli ve yapısal özellikleri (fiziksel ve kimyasal) daha iyi tanımlanmış olduğu için araştırmacılar, inaktif ve altbirim aşılar üzerine yapılan araştırmalara daha fazla yoğunlaşmıştır. Ancak, yeni antijenlerin geliştirilmesi üzerine çok sayıda araştırma yapılırken, aşı formülasyonların geliştirilmesi ile ilgili araştırmalar sınırlıdır (Rappuoli 2007).

Son yıllarda, hastalıklarda görülen artış, biyoterorizm korkusu, hastalıklar için sıkı eradikasyon planlarının yapılması ve özellikle biyoteknolojik modern biyoteknoloji alanında ki dev ilerlemeler, gen sekanslarının ve mikropların patojenez mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, ayrıca immün sistem işlevleri hakkında ayrıntılı bilgilerin artması, yeni aşı taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi üzerine araştırmaları arttırmıştır (Mäkelä 2000).

Yeni nesil aşılarda aranan özellikler ve bu aşıların geliştirilmesinde izlenecek yollar aşağıda listelenmiştir:

1. *Yan etkileri az, güvenilirliği yüksek aşılar olması:* Yapılan araştırmalarda, daha ucuz, yüksek etkinlikte, ömür boyu bağışıklık sağlayan, yeni doğanlara uygulanabilen, ısıya dayanıklı, tercihen non-invazif yoldan uygulanan aşı sistemlerinin geliştirilmesi hedeflenmektedir (Matthias ve ark. 2007). Proteinik yapıdaki maddeler, antikor üretimini ve Tip2 immün yanıtı uyardığı için, yeni nesil aşıların geliştirilmesinde iyi adaylardır.

2. *Farklı tipte immün yanıt elde edilmesi ve oluşan immün yanıtın uzatılması:* Uyarılan immün yanıtın tipi patojenlerin yok edilmesinde önemli rol oynamaktadır.

Günümüzde aşıların büyük çoğunluğu nötralizasyon için gerekli antikorları uyararak hümoral immün yanıt oluşturmakta ve koruma sağlamaktadır (Plotkin 2010). Görülme sıklığı her geçen gün artan ve yaşamı tehdit eden, aşılama ile önlenebilecek sıtma, verem ve İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü (HIV) gibi hastalıklara karşı koruma sağlamak için, hümoral immün yanıt ile birlikte hücresel immün yanıtı da uyaran aşıların geliştirilmesinin önemli olduğunu belirtilmiştir (Rappuoli 2007).

3. *Enjeksiyon sayısının azaltılması ya da enjeksiyon yolu ile uygulanmayan aşıların kullanılması:* Günümüzde kullanılan aşıların büyük çoğunluğu intramüsküler (i.m.) ve subkutan (s.c.) yoldan uygulanmakta ve yükleme dozu gerektirmektedir (Pirofski ve Casadevall 1998; Harandi ve ark. 2010; FDA, 2014). Yeni teknolojilerin kullanımı ile aşıların uygulama sıklığını azaltmak Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) öncelikli hedeflerindendir. Mikroenkapsülasyon teknolojisi kullanılarak, polimerik partiküllere yüklenen antijenin vücutta farklı hızlarda salımı sonucunda, antijenin ortamda daha uzun süre kalması ve buna bağlı olarak aşılama sayısının azaltılması sağlanabilmektedir. Ancak, bu şekilde geliştirilen aşıların immün yanıtların da farklılıklar olacağı için yeni aşı takvimlerinin hazırlanmasına ihtiyaç duyulacaktır.

4. *Kullanılmakta olan aşılara alternatif yeni aşıların geliştirilmesi:* Fizikokimyasal özellikleri iyi tanımlanmış, rekombinant DNA teknolojisiyle hazırlanan daha ucuz aşıların üretimi hedeflenmektedir. Buna rağmen, yeni aşıların üretim maliyeti halen yüksektir.

5. *Yeni hedefler:* Hastalıklara karşı koruma sağlamanın yanı sıra, kanser, astım ve otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek yeni terapötik aşıların geliştirilmesi hedeflenmektedir (Johnson ve ark. 2009; Balazs ve ark. 2012).

Tablo 2-1'de yeni aşılardan beklenen özellikler ve yenilikler özetlenmiştir.

Tablo 2-1: Yeni aşıların geliştirilmesinde gerekli hususlar*

Güvenilirlik:	Uygulandığında enfeksiyona sebep olmamalı
Koruma sağlamak:	Belirlenen antijenlere karşı koruma sağlamalı
Uzun süre koruma sağlamak:	Ömür boyu olmasa da patojene karşı koruma uzun süre boyunca sağlanmalı
Nötralize edici antikorların üretimini uyarmak:	Konakçıda patojenlerin (özellikle virüslerin) yerleşmesini engelleyen nötralize edici antikorların üretimini sağlamalı
Hücresel immün yanıtının oluşmasını sağlamak:	Özellikle hücre içi patojenlere karşı korunma da önemli olan hücresel immün yanıtı uyarmalı
Gerekli diğer hususlar:	Yan etkileri az veya kabul edilebilir düzeyde olmalı Üretim maliyeti düşük olmalı Stabiliteleri yüksek olmalı ve kolay saklanabilmeli Yüksek miktarda üretilebilmeli Kolay uygulanabilmeli

*Moylett ve Hanson 2003'ten modifiye edilmiştir.

2.4. Non-invaziv Yol ile Aşı Uygulanması

Aşılarla uygulanan antijenin immün sistem hücreleri tarafından tanınmasıyla immün sistem de çeşitli olaylar başlamaktadır. İmmün yanıtın uyarılması ve etkili bir immünizasyon için aşıların, uygulandığı bölgede immün sistem hücreleri ile etkileşemesi önem taşımaktadır. Parenteral yol ile uygulanan aşılar etkili ve hızlı immünizasyon sağlamasına rağmen, geniş kitlelerin aşılanmasında parenteral uygulama kolay değildir. Parenteral yoldan aşıların uygulanması için eğitimli personele ihtiyaç vardır ve enjeksiyondan dolayı hasta uyuncu az, üretim maliyeti yüksek ve oluşturduğu mukozal immün yanıt düşüktür (Simon ve ark. 2009). Özellikle az gelişmiş ülkelerde iğnelerin birden fazla kullanımına bağlı olarak, hepatit B, hepatit C ve HIV gibi kan ile bulaşan hastalıklar insandan insana geçebilmektedir (Shattock ve ark. 2008) .

Parenteral yola alternatif bir yol olan non-invazif yol ile aşıların uygulanması, özellikle az gelişmiş ülkelerde enjektörlerin birden fazla kullanımına bağlı olarak görülen hastalık yayılma riskini engelleyecek ve kullanım kolaylığından dolayı hasta uyuncunu da arttıracaktır (Nossal 2000). Transdermal ve mukozal yoldan aşı uygulanması, derinin ve mukozal yüzeylerin lenfoid dokular ve antijen sunan hücrelerce zengin olması nedeniyle,

etkili bir immünizasyon için avantaj sağlamaktadır (Kuper ve ark. 1992; Bos ve Kapsenberg 1993).

2.4.1. Transdermal Yol ile Aşı Uygulanması

Vücudumuzun en büyük organı olan deri, dış etkenlere karşı mekanik, fizikokimyasal ve immunolojik bariyer olarak görev yapmaktadır (Franz ve Lehman 2000). Geçmiş dönemlerde deri, aşıların uygulanamayacağı bir bariyer olarak görülürken, günümüzde ise immünolojik organlardan biri olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalar transdermal yolun aşı uygulanması için uygun bir yol olduğunu göstermiştir. Deriden penetre olan patojen, epidermis tabakasında bulunan ve deri yüzeyinin % 25'ini örten antijen sunan dentritik hücreler (Langerhans hücreleri) tarafından tanınır ve lenf düğümlerindeki T hücrelerine sunularak immün yanıt uyarılır (Denfeld ve Simon 2000; Giudice ve Campbell 2006). Transkutan immünizasyon, (Glenn ve ark. 2003), özellikle mikroiğnelerle transdermal immünizasyon (Van Damme ve ark. 2009; Indermun ve ark. 2014), ve immünostimülan yamaların (Glenn ve ark. 2000; Etchart ve ark. 2007) kullanımı ile gerçekleşmektedir.

2.4.2. Mukozal İmmünizasyon ve Mukozal Yol ile Aşılama

Mukozal immünizasyon, aşıların uygulanması için iğne gerektirmeyen bir immünizasyon şeklidir (De Magistris 2006; Simon ve ark. 2009). Şekil 2-1'de mukozal yüzeylerde immün yanıtın oluşumu gösterilmiştir. Mukozal yüzeylerde, mukozaya bağlı lenfoid dokuların (MALT) uyarılmasıyla oluşan immün yanıtın özellikleri ve önemi aşağıda belirtilmiştir.

- Mukozal yüzeyler, solunum, gastrointestinal ve ürogenital sistemi dış ortamdan epitel bariyer ile ayırarak doğal koruma sağlamaktadır.

- Patojenlerin çoğu mukozal yüzeylerden vücuda girdiğinden, bu bölgelerde mukozal immün yanıtın başlatılması için aşıların lokal uygulanması önem taşımaktadır. Mukozal yüzeylerde oluşan immün yanıt, *Helicobacter pylori, Vibrio cholerae, Shigella spp.*, gibi gastrointestinal, *Mycoplasma pneumoniae,* influenza virüsü gibi solunum, HIV, *Chlamydia trachomatis* gibi genital bölgelerde hastalık oluşturan patojenlerin mukozal epitele yapışmasını, koloni oluşturmasını, mukozaya geçişini ve çoğalmasını engellemekte,

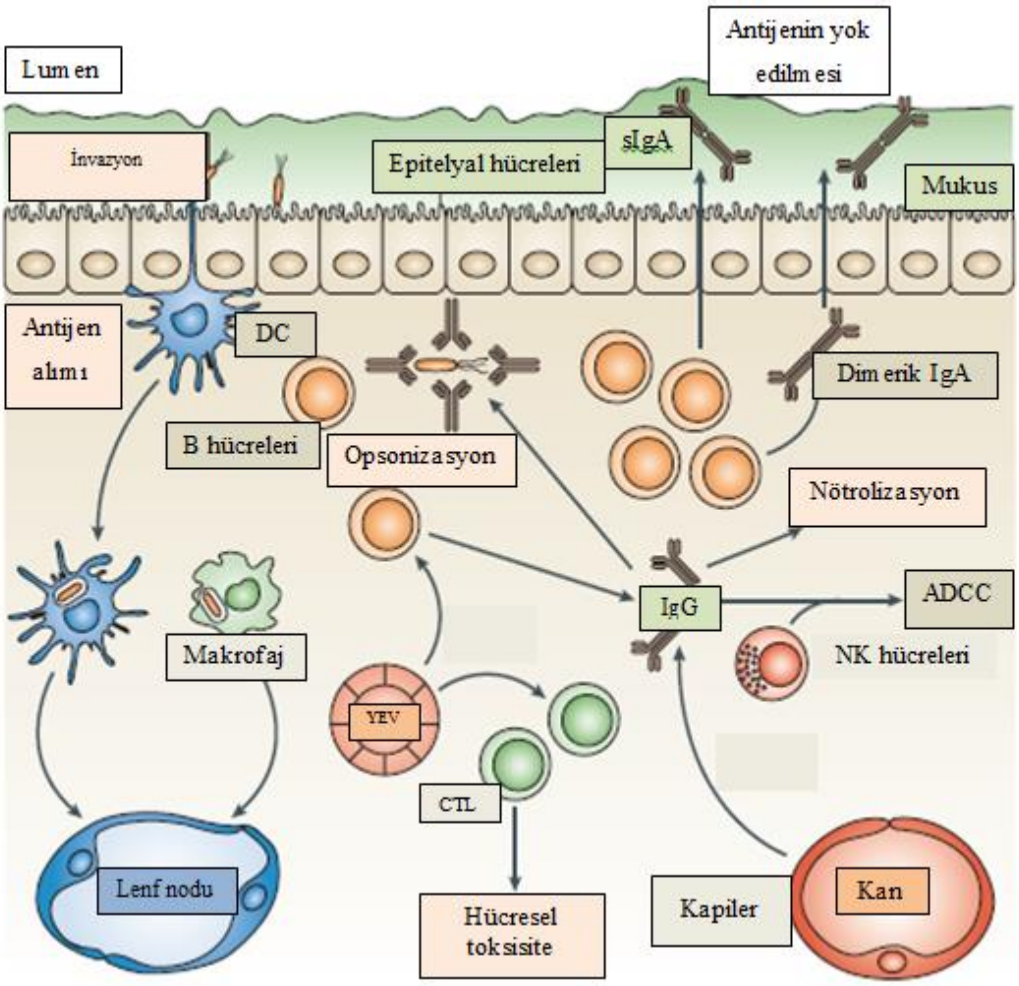
epitel hücrelerinin veya diğer hücrelerin etkilenmesini önlemektedir (Holmgren ve Czerkinsky 2005).

- Mukozal yüzeyler, ayrıca sitotoksik T lenfositlerin, yardımcı T (Th) hücrelerinin, doğal öldürücü (NK) hücrelerin aktivasyonunun sağlanmasında ve hücresel immün yanıtın oluşmasında önemli görevi vardır (Ogra ve ark. 1999).

-Mukozal immün yanıt, aşıların mukozal yüzeylere uygulanması sonucunda oluşmaktadır. Enjeksiyon yolu ile uygulanan aşılar, mukozal immün yanıt oluşturamazlar ve bu nedenle, mukozal yüzeylerde enfeksiyonlara karşı düşük etkinlik gösterirler (Lamm 1997; Levine 2000).

- Mukozal yüzeylerde, proteazlara karşı dayanıklı, dimerik ya da multimerik yapıda sIgA antikorların salgılanması mukozal immünizasyon için hayati önme taşımaktadır (Gallorini 2014). sIgA, mukus içerisindeki patojenleri hapsederek onların mukozal yüzeylere yapışmalarını engeller ve epitel yüzeyler ile doğrudan temasını keser (Lamm 1997; Hutchings ve ark. 2004).

- Mukozal yol ile uygulanan aşılar iğne gerektirmediğinden, iğnelerin tekrar kullanımına bağlı Hepatit B ve HIV gibi enfeksiyonların bulaşma riskini azaltmaktadır. Ayrıca, ağrı oluşturmadığından geniş kitlelerin aşılanması için rahat bir aşılama yolu oluşturmaktadır. Mukozal yol ile uygulanan aşılar, immün sistem yetmezliği olan kişilerde (örn. HIV hastalığı), parenteral yol ile uygulanan aşıların kullanımıyla uyarılamayan farklı tipte immün yanıtlar oluşturabilmektedir. Örneğin, oral yol ile uygulanan kolera aşısının AIDS hastalarında antikor yanıtını uyardığı gösterilmiştir (Eriksson ve ark. 1998).



Şekil 2-1: Mukozal yüzeylerde oluşan immün yanıtların şematik gösterimi

Mukozal yüzeylerde koruma sağlayan bir çok mekanizma mevcuttur. Kanda bulunan antijene spesifik B ve T hücreleri yüksek endotelli venülleri (YEV) tanımakta ve mukozaya girmektedir. Mukozal B hücrelerinin çoğu, mukusta bulunan patojenlerin yakalanmasında görev alan ve mukozada invazyonları engelleyen dimerik IgA salgılamaktadır. Mukozal yüzeylerde nötralize edici IgG'de bulunmaktadır. Enfekte hücreler, spesifik sitotoksik T lenfositler (CTLs) veya NK'ler tarafından antikorlar ile etkileşimde gerçekleşen antikora-bağlı-hücre sitotoksisitesi (ADCC) ile yok edilmektedir. Ayrıca, patojenler, dendritik hücreler (DC) ya da makrofajlar tarafından yakalanarak lenf nodlarına taşınmaktadır (Neutra ve Kozlowski 2006).

2.4.2.1. Mukozal İmmün Sistem: Yapısı ve Özellikleri/Organlar

Ağız, burun, akciğer, rektum, konjunktiva ve vajina gibi mukozal yüzeyler mukozal immün sistemi oluşturmaktadır. Mukozaya bağlı lenfoid dokular ve vücuttaki bölgeleri Tablo 2-2'de gösterilmektedir (Chadwick ve ark. 2010).

Tablo 2-2: Mukozal immün sistemi

Başlama yeri	Efektör bölge
Nazofarinkse bağlı lenfoid doku (NALT)	Nazofarinks mukozası
Bronşlara bağlı lenfoid doku (BALT)	Bronşiyal mukoza; Solunum sistemi
Bağırsaklara bağlı lenfoid doku (GALT)	Gastrointestinal mukoza
Konjunktivaya bağlı lenfoid doku (CALT)	Konjunktiva
Gözyaşı kanalına bağlı lenfoid doku (LDALT)	Oküler dokular
Larinkse bağlı lenfoid doku (LALT)	Larinks
Tükürük bezine bağlı lenfoid doku (DALT)	Tükürük bezleri
Deriye bağlı lenfoid doku (SALT)	Keratinositler; Langerhans hücreleri
Vulvovajinaya bağlı lenfoid doku (VALT)	Ürogenital yollar
Rektal lenfoepitely doku	Gastrointestinal mukoza

2.4.2.2. Oral Yol ile Aşılama

Oral yol, yüksek hasta uyuncu ve iğnelerin tekrar kullanıma bağlı enfeksiyon riski taşımadığından, özellikle sağlık personeline ulaşımı kolay olmayan toplumlarda en kolay aşılama yoludur (Sood ve Panchagnula 2001). Mukozal enfeksiyonlara karşı kullanılan aşıların çoğu oral yoldan uygulanmaktadır. Tablo 2-3'te gösterildiği gibi nazal yoldan uygulanan grip aşıları hariç, piyasada ki mukozal yol ile uygulanan diğer aşılar oral yoldan uygulanmaktadır (Holmgren ve Czerkinsky 2005).

Gastrointestinal kanalda bulunan epitel tabakası mikroorganizmalarca zengin bir ortam oluşturmaktadır. Epitel ve bağlı olduğu bezler (tükürük bezleri gibi), spesifik olmayan ve doğal koruma sağlayan müsin ve antimikrobiyal proteinler üretmektedir (Neutra ve Kraehenbuhl 2005). Mukozanın lamina propia tabakasında bulunan ve mukozaya bağlı lenfoid dokuların bir parçası olan gastrointestinal ilişkili lenfoid doku (GALT) da immün sistem hücreleri bulunmaktadır (Wershil ve Futura 2008). Burada, Peyer plaklarında bulunan M-hücreleri antijenleri immün cevabının başlatılması için mukozal lenfoid dokuya ulaştırmaktadır. Partiküler sistem içinde enkapsüle edilmiş antijenin gastrointestinal kanalda enzimlerden korunması, M hücreleri tarafından alımının

kolaylaşması ve uzun süreli salımının sağlanabilmesi nedeniyle, oral yol ile aşılama, parenteral yol ile aşılamaya önemli bir alternatiftir (Brayden ve ark. 2005). Partiküler aşı taşıyıcı sistemler oral yoldan aşılama için kullanıldığında, taşıyıcı sistemlerle uygulanmayan aşılara göre çok daha yüksek sistemik immün yanıt oluşturmaktadır (van der Lubben ve ark. 2001a; van der Lubben ve ark. 2001b; Gupta ve ark. 2007; Slütter ve ark. 2009). Oral yoldan uygulanan aşıların en önemli sorunu ise, partiküllerin bağırsakta geniş bir alana dağılması nedeniyle immün hücreler tarafından yeterli miktarda alınması için parenteral yoldan daha yüksek dozda antijene ihtiyaç duyulmasıdır (Jain ve ark. 2011).

Tablo 2-3: Mukozal enfeksiyonlara karşı kullanılan ruhsatlı aşılar*

Enfeksiyon ve aşı(lar)	Uygulama yolu	Doz	Ticari isim/ Üretici
Çocuk felci			
Canlı zayıflatılmış aşı (PV) (trivalan, divalan, monovalan)	Oral	3 doz	Çok sayıda
Kolera			
Kolera toksini B altbirimi + inaktive *V. Cholerae* O1 ve El Tor biyotipleri	Oral	2-3 doz	Dukoral (SBL Vaccin)/ Crucell
Inaktive *V. Cholerae* O1 ve El Tor biyotipleri	Oral	2-3 doz	Shanchol (Shantha Biotechnics)
CVD 103.HgR canlı zayıflatılmış *V.cholerae* O1 rekombinant suşu	Oral	1 doz	Orochol (Berna, SSVI)
Tifo			
Vi polisakkarit	s.c. ya da i.m.	1 doz	TyphimVi (Sanofi Pasteur)
Ty21a canlı zayıflatılmış aşı	Oral	3-4 doz	Vivotif (Berna, SSVI)/ Crucell
Rotavirüs			
Canlı zayıflatılmış monovalan insan rotavirüs suşu	Oral	3 doz	RotaRix (GlaxoSmithKline) RotaTeq (Merck)
Influenza			
Canlı zayıflatılmış trivalan/kuadrivalan influenza virüsü	Nazal	Çocuklarda 2 doz	FluMist (MedImmune)
Virozomal zayıflatılmış altbirim aşısı	Nazal	2 doz	NasalFlu**(Berna Biotech)
H1N1 canlı zayıflatılmış monovalan influenza virüsü	Nazal	1-2 doz	NASOVAC*** (Serum Institute of India)
Canlı zayıflatılmış trivalan influenza aşısı	Nazal	1 doz	NASOVAC-S^{TM} (Serum Institute of India)

*Lycke 2012'den modifiye edilmiştir.

**2000-2001 grip sezonunda İsviçre'de kullanılmıştır. *E.coli*'den elde edilen ısıya duyarlı toksini adjuvan olarak içeren NasalFlu® aşısı Bell paralizine neden olabildiğinden piyasadan geri çekilmiştir (Sendi ve ark.2004; Locher ve ark. 2006).

***2009 domuz gribi salgınına karşı geliştirilmiş ve kullanılmıştır.

2.4.2.3. Nazal Yol ile Aşılama

Hem sistemik hem de mukozal immünite için etkin bir bölge olan nazal mukoza, damar ağı açısından zengin ve geniş bir absorpsiyon alanına sahip olması, geçirgenliğinin fazla olması, aşıların bu bölgeye kolayca uygulanabilmesi ve uygulama için iğne gerektirmemesi, geniş kitlelerin kolayca aşılanabilmesine imkan tanıması nedeniyle önemli avantajlara sahiptir (Davis 2001).

Nazal yol ile uygulanan aşı formülasyonlarında antijenin nazal mukozadan geçişini ve oluşturduğu immün yanıtı arttırmak, antijeni enzimatik degredasyondan ve mukosilier klirensten korumak amacıyla çeşitli adjuvanlar ve aşı taşıyıcı sistemleri geliştirilmiştir (Davis 2001). Nazal yoldan aşılama, nazal mukozada salgılanmakta beraber, insan servikovajinal mukozada da IgA ve IgG antikorların salgılanmasına neden olmaktadır. Bu durum HIV gibi cinsel yoldan bulaşan hastalıklara karşı immünizasyonda önemlidir (Johansson 2001).

Nazal mukoza, inhale edilen makromoleküller için ilk temas yeridir. İnsanların üst solunum yollarında nazal mukozaya bağlı lenfoid dokuda (NALT) bulunan M hücreleri, antijenin etkin bir şekilde alımını sağlayarak lenfoid dokulara, B ve T hücrelerini içeren germinal merkezlere, plazma hücrelerine ve antijen sunan hücrelere taşımaktadır. Hem sistemik hem de mukozal bağışıklama için etkin bir bölge olan nazal mukozanın damar ağı açısından zengin ve geniş bir absorpsiyon alanına sahip olması, geçirgenliğinin fazla olması, enzimatik aktivitesinin düşük olması, aşıların bu bölgeye kolayca uygulanabilmesi ve uygulama için iğne gerektirmemesi, geniş kitlelerin kolayca aşılanabilmesi açısından nazal yolu üstün kılmaktadır (Davis 2001). Aşı taşıyıcı nanosistemler, antijeni nazal mukoza da enzimatik parçalanmadan korumakta ve immün sistem hücreleri tarafından antijenin daha kolay tanınmasını sağlayıp immün yanıtın başlamasını kolaylaştırmakta ve uzatılmış salım sağlayarak antijenin salımını kontrol etmektedir. (Ugwoke ve ark. 2005). İntranazal yol ile uygulanan serbest antijenler ise immün cevabı başlatamamaktadır. Ayrıca, nanotaşıyıcılar immün uyarıcı özelliğe de sahiptirler. Ancak, nanotaşıyıcı sistemlerin fizikokimyasal özellikleri, aşı formülasyonun etkinliğini önemli derecede etkiler. Lenfoid dokuda bulunan M-hücrelerin nanopartikülleri etkin bir şekilde aldığı bildirilmesine

rağmen, hücresel alım için optimum partikül büyüklüğü hakkında kesin bir sınır belirtilmemiştir.

2.4.2.4. Pulmoner Yol ile Aşılama:

Aşıların pulmoner yol ile uygulanması sonucunda lokal immün cevabın uyarılmasından *bronşlarla ilişkili lenfoid doku* (BALT) sorumludur. Solunum sisteminde bulunan mukus tabakası ve absorpsiyon yeri olan alveollere aşı formülasyonların taşınımının kolay olmaması, pulmoner yol ile aşılamayı zorlaştırmaktadır. Aşı taşıyıcı sistemlerin kullanıldığı çalışmalarda, taşıyıcı sistemin, antijenin lenfoid dokudan geçişini kolaylaştırdığı ve solunum sisteminde kalış süresini artırarak pulmoner yol ile güçlü immün yanıt elde edilmesini sağladığı gösterilmiştir (Alpar ve ark. 2005; Peeters ve ark. 2014). Etkili bir immün yanıtın oluşması için aşı taşıyıcı sistemlerin fizikokimyasal özellikleri (örn., aerodinamik çap) önemlidir. Ayrıca, mukoadezif sistemler pulmoner yol ile aşılama için uygundur (Cryan 2005). N-trimetil kitosan (TMC) polimeri ile hazırlanan difteri toksoidi (DT) yüklü partiküller pulmoner yol ile kobaylara uygulandıktan sonra oluşan immün yanıt, s.c. yol ile uygulanan alum-DT aşısının oluşturduğu immün yanıtdan daha yüksek bulunmuştur. Yine, pulmoner yolla uygulanan partiküler sistemler lokal sIgA sekresyonunu anlamlı şekilde arttırmıştır (Amidi ve ark. 2007).

2.4.2.5. Diğer Yollar ile Aşılama (Oküler, Sublingual, Vajinal, Rektal):

Oküler yol ile aşılama: Oküler aşılamada, *konjonktiva ile ilişkili lenfoid doku* (CALT) immün yanıttan sorumludur. Günümüze kadar oküler yolla denenen birçok aşı güvenli bulunmamış ve güçlü bir adjuvan kullanılmadığında düşük seviyede immün yanıt elde edilmiştir. Ancak, kitosan nanopartiküllerinin konjonktival epitel hücrelerine hızla penetre olabildiği ve tavşanların oküler yüzeyinde iyi tolere edildiği gösterilmiştir (Peniche ve Peniche 2007).

Sublingual yol ile aşılama: Günümüze kadar sublingual yol üzerine çok fazla araştırma olmamasına rağmen, son yıllarda özellikle alerjilere karşı immünizasyon sağlamak için çeşitli çalışmalar yürütülmüştür. Yapılan araştırmalar, sublingual yol ile aşılamanın etkinliğini ve güvenilirliğini ispatlamış, proteinler ve zayıflatılmış canlı

antijenler gibi birçok patojene karşı hem sistemik hem de mukozal immün yanıt elde edildiğini göstermiştir (van Overtvelt ve ark. 2006; Shim ve ark.2013).

Vajinal yol ile aşılama: Vajinal yoldan aşılama HIV, insan papilloma virüsü ve herpes virüsü gibi cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların tedavisi için ilgi çekmektedir (Wyatt ve ark. 1998; Kozlowski ve ark. 1999; Shen ve ark. 2003; Fraillery ve ark. 2009). Mukoadezif polimerik mikroküreler kullanılarak vajinal yolla yapılan aşılamanın mukozal immün yanıtı arttırdığı gösterilmiştir (Kunisawa ve ark. 2000). Nazal yoldan aşılama, sadece nazal mukozada değil, insan servikovajinal mukozasında da IgA ve IgG antikorların salgılanmasına neden olmaktadır. Bu durum HIV gibi cinsel yoldan bulaşan hastalıklara karşı immünizasyonda önem taşımaktadır (Johansson 2001).

Rektal yol ile aşılama: Rektal yol aşılama ile ilgili çok çalışma bulunmamasına rağmen, rektal yolun sistemik ve mukozal immünizasyon için uygun olduğu bildirilmiştir (Nakase ve ark. 2001). Rektal yoldan aşılama ile rektal sıvılarda oldukça yüksek spesifik IgA ve IgG seviyelerine ulaşılmıştır (Kozlowski ve ark. 1997; 2002).

2.5. Aşı Formülasyonları Hakkında Genel Bilgiler

2.5.1. Aşı Formülasyonlarında Kullanılan Adjuvanlar

Adjuvanlar tek başında antijenik özelliği olmayan, ancak birlikte uygulandığında antijenin oluşturduğu immün yanıtın başlatılmasına yardımcı olan, immün yanıtı arttıran ya da süresini uzatan maddeler ya da taşıyıcı sistemlerdir (Wack ve Rappuoli 2005; Lycke 2012). Adjuvanlar, sitokinleri, bakteriyel endotoksinleri, virüsleri, membran partikülleri, lipitleri, sitozin-fosfat-guanin oligodeoksinükleotidi (CpG ODN) gibi birçok madde ve taşıyıcı sistemleri kapsamaktadır (Vogel ve Powell 1995; Ruedl ve ark. 1996; Del Giudice ve Rappuoli 1999). Yoğun araştırmalara rağmen, günümüzde sınırlı sayıda adjuvan klinik çalışmalara geçmiş ve çok azı kullanım için onay almıştır (Tablo 2-4). MF59, 20 ülkede 14 yıldan uzun süredir özellikle yaşlılarda kullanılan grip aşısında (Fluad®) kullanılan emülsiyon tipinde güvenilir ve güçlü bir aşı adjuvanıdır (O'Hagan ve ark. 2012). İnsanlarda klinik çalışma yürütülmüş adjuvanlar Tablo 2-4'de verilmiştir.

Tablo 2-4: İnsanlarda klinik çalışması yapılmış adjuvanlar*

Adı	Firma	Sınıflandırma	Endikasyon	Ruhsat durumu	Uyarılan immün yanıt
İlk jenerasyon adjuvanları					
Alum	Çok sayıda	Mineral tuzları/ Aluminyum tuzları	Çoklu endikasyon	Ruhsatlı	Ab, Th2 (+ insanlarda Th1)
MF59	Novartis	Skualen y/s emülsiyonu	İnfluenza (Fluad)/ Pandemik influenza	Ruhsatlı (AB)	Ab, Th1 + Th2
Lipozomlar	Crucell	Lipit vezikülleri	HAV, influenza	Ruhsatlı (AB)	
Montanide	Birçok	s/y emülsiyonu	Malarya, kanser	Faz III	Ab, Th1 + Th2
PLGA	Novartis	Polimerik mikropartiküller	DNA aşısı (HIV)	Faz I	
Flagellin	Vaxinnate	Antijene bağlanan flagellin	İnfluenza	Faz I	Ab, Th1 + Th2
QS21	Antigenetics	Saponin	Çok sayıda	Faz I	
Adjuvan kombinasyonları					
AS01	GSK	MPL+lipozom+QS 21	Malarya, TB	Faz II	Ab, Th1
AS02	GSK	MPL+y/s emülsiyonu+QS21	Malarya	Faz II	Ab, Th1
AS03	GSK	y/s emülsiyonu+ α-tokoferol	Pandemik influenza (Pandemix)	Ruhsatlı (AB)	Ab, Th1 + Th2
AS04	GSK	MPL+Alum	HBV (Fendrix), HPV (Cervarix)	Ruhsatlı (AB)	Ab, Th1
RC-529	Dynavax	Sentetik MPL+Alum	HBV	Faz II	
ISCOM	CSL, Isconova	Saponin, kolesterol, fosfolipidler	Çok sayıda	Faz I	Ab, Th1, CD8+ T hücreleri
IC31	Intercell	Peptid + oligonükleotidler	TB	Faz I	Ab, Th1, CD8+ T hücreleri (konjuge olduğunda)

CpG 7909	Coley/Pfitzer, Novartis	Oligonükleotid+Alum, oligonükleotid + MF 59	HBV, malarya, HCV		Ab, Th1, CD8+ T hücreleri (konjuge olduğunda)
ISS	Dynavax	Oligonükleotid Alum	HBV	Faz II	
MF59+ MTP-PE	Chiron/ Novartis	Lipide olmuş MDP+y/s emülsiyonu	HIVi, influenza	Faz I	

* O'Hagan ve De Gregorio 2009, Coffman ve ark. 2010 ve Lycke 2012'den modifiye edilmiştir.

2.5.2. Aşı Geliştirilmesinde Adjuvanların Önemi

Aşı formülasyonlarında adjuvanların kullanım nedenleri aşağıda sıralanmıştır (Edelman 2000; O'Hagan 2001; O'Hagan ve De Gregorio 2009):

- Etkili bir immün yanıt oluşturmak için gerekli antijen miktarını azaltarak üretim maliyetini düşürmek (Boyle ve ark. 2007)

- İmmün yanıtını arttırmak ve tekrarlanan doz sayısını azaltarak hasta uyuncunu sağlamak (Halperin ve ark. 2006; Schwarz ve ark. 2009)

- Belirli popülasyonda (yaşlılar, çocuklar, kronik hastalığı ve immün yetmezliği olanlarda) immün yanıtı arttırmak (örneğin, yaşlılarda grip aşısının immün yanıtını arttırmak için MF59 kullanılmaktadır) (Podda 2001)

- Efektör T hücresi yanıtını ve antikor düzeylerini arttırmak
- Koruyucu immün yanıtların daha hızlı başlanmasını sağlamak
- Hafıza B ve T hücrelerinin oluşmasını sağlayarak immün yanıtın süresini uzatmak
- Peptidlerin antijenik özelliğini arttırmak
- İmmün yanıtın oluşum sürecini hızlandırmak, uzatmak ve gücünü arttırmak
- Antikorların özgüllüğünü, miktarını, izotiplerini ve alt sınıflarını ayarlamak
- Sitotoksik T hücre yanıtının oluşmasını sağlamak
- Mukozal immün yanıtın oluşumunu uyarmak (Coffman ve ark. 2010)

- İstenen tipte immün yanıt oluşturmak (Th2 hücrelerine karşı Th1, CD4+'ya karşı CD8+, spesifik antikor izotipleri (Tablo 2-4)

- Özellikle hafıza T hücrelerin üretimini arttırmak (Galli ve ark. 2009a; Leroux ve ark. 2010)

- Pandemilerde ilk oluşan immün yanıtları arttırmak (Galli ve ark. 2009b; Khurana ve ark. 2010).

İdeal adjuvan özellikleri

Aşı formülasyonlarında kullanılan adjuvanların taşıması gereken özellikler Tablo 2-5'te gösterilmiştir (O'Hagan ve De Gregorio 2009).

Tablo 2-5: Aşı adjuvanların özellikleri

Başarılı adjuvanlar	**Başarılı olmayan adjuvanlar**
Güvenilir	Kabul edilmeyen tolerabilite
İyi tolere edilebilen	Anlamlı lokal reaksiyonlar
Sentetik yoldan kolay elde edilen	Karmaşık, ölçek büyütmesi zor, formülasyonun optimize edilen şartlarda tekrarüretilememesi
Basit, ucuz bileşenler	Pahalı, bileşenleri güvenilir kaynaklardan elde edilmeyen ve uygun olmayan safsızlıklara sahip olması
Biyoparçalanan	Biyoparçalanan olmayan, enjeksiyon bölgesinde uzun süre yan etki göstermesi
Birçok aşı antijeni ile uyumlu	Farklı antijenler ile formüle edilmesi zor, antijenlerin stabilitesini negatif şekilde etkilemesi
Antijenin taşınmasını sağlaması ve immün yanıtları güçlendirmesi	Yardımcı diğer maddelerle geçimsizlik sorunu

2.5.2.1. İmmün Sistemi Uyaran Adjuvanlar

İmmün sistemi uyaran adjuvanlar, doğrudan immün sistem üzerine etki göstererek antijenlere karşı immün yanıtı uyarmakta ve arttırmaktadır. Adjuvanlar, elde edilen kaynaklara, fizikokimyasal özelliklerine ya da etki mekanizmasına göre sınıflandırılmaktadır. Tablo 2-6'da çeşitli immünostimülan maddelerinin oluşturduğu immün yanıt gösterilmektedir (Reed ve ark. 2009).

Tablo 2-6: İmmün sistemi uyaran maddelerinin oluşturduğu immün yanıtlar

İmmün sistemi uyaran maddeler	Hücresel etkileşim	İmmün yanıtın tipi
TLR ligandları		
Bakteriyal lipopeptidler, lipoprotein ve lipoteikoik asit; mikobakteriyal lipoglikan; maya zimosan, porin	TLR-2, 1/2, 2/6	Th1, Ab, NK hücreler
Viral çift sarmallı RNA	TLR-3	NK cell
Lipopolisakkaritler, Lipid A, monofosforil lipid A (MPL®), AGP'ler	TLR-4	Güçlü Th1, Ab
Flagellin	TLR-5	Th1, CTL, Ab
Viral tek sarmallı RNA, imidazokinolinler	TLR-7/8	Güçlü Th1, CTL
Bakteriyel DNA, CpG DNA, hemozoin	TLR-9	Güçlü Th1, CTL ve Ab; NK hücreler
Üropatojenik bakteri, protozoan profilin	TLR-11	Th1
Diğer		
Saponinler (Quil-A, QS-21, Tomatine, ISCOM, ISCOMATRIX™)	Antijenin işlenmesi	Güçlü Th1, CTL ve Ab; uzun süren hafıza
Sitokinler: GM-CSF, IL-2, IFN-γ, Flt-3	Sitokin reseptörleri	Th1, Ab
Bakteri toksinleri (CT, LT)	ADP ribosile edici faktörler	Ab

RNA: Ribonükleik asit, Ab: Antikor, ADP: Adenozin difosfat, AGP: Aminoalkil glukozaminid 4-fosfat, GM-CSF: Granülosit-makrofaj koloni stimule edici faktör, Flt-3: FMS-benzeyen tirozin kinaz-3.

2.5.2.2. Bakteri Enterotoksinleri

Vibrio cholera'dan elde edilen kolera toksini (CT) ve *Escherichia coli*'den elde edilen enterotoksijenik ısıya duyarlı (LT) toksini mukozal yollardan uygulandıklarında (oral ve nazal) güçlü mukozal immünojenik ve adjuvan özellik göstermektedir. CT ve LT en güçlü adjuvanlar arasında bulunmaktadır (Simmons ve ark. 2001). Farelerde yapılan bir çalışma da, oral ve nazal yoldan uygulanan tetanoz toksoidin CT ya da LT ile birlikte uygulanması ilemukozal yüzeylerde IgA üretimi anlamlı şekilde artış göstermiştir (Xu-Amano ve ark. 1993; Douce ve ark. 1997). Ancak, hayvan modellerinde olumlu sonuçlar elde edilmesine rağmen, insanlarda mikrogram düzeyinde LT ve CT'nin uygulanması,bile hastalıklara sebep olduğundan kullanımı sınırlandırılmıştır.

LT ve CT toksinleri, A ve B alt birimlerden oluşmaktadır. Kolera toksinin pentamerik B oligomeri epitel yüzeylerde bulunan GM-1 reseptörlerine bağlanırken,

enzimatik olarak aktif A alt birimi ise toksisiteden sorumlu olan kısımdır. Rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilen rekombinant CTB (rCTB) sadece kolera enteretoksinin toksik olmayan B birimden oluşmaktadır. Yapılan çalışmalar, CTB'nin nazal yolla uygulanan antijenin IgA seviyesini yükselttiğini göstermiştir (Wu ve Russell 1998). Oral yol ile uygulanan kolera aşısının oluşturduğu immün yanıtı arttırmak amacı ile CTB kullanılmaktadır (Ryan ve Calderwood 2000). Fakat, hastalığa karşı koruma sağlamasına rağmen, etkisi kısa sürmektedir (Hill ve ark. 2006).

Escherichia coli den elde edilen ısıya duyarlı (LT) toksini, kolera toksini gibi LT-A ve LT-B alt birimlerden oluşmaktadır. LTB biriminin GM-1 reseptörlerine bağlandığı ve nazal yoldan kullanıldığında yüz felcine yol açtığı düşünülmektedir (Zurbriggen ve ark. 2003). Nazal yol ile uygulanan ve LT içeren virozomal grip aşısı yüksek Bell paralizi oluşturma riskinden dolayı marketten geri çekilmiştir (Huckriede ve ark. 2005). Bu yüzden, LT-A birimini içeren, fakat LT-B biriminin yerine hücreye bağlanan uygun bir sekansının kullanıldığı toksik olmayan moleküller geliştirilmiştir (Salmond 2002). Preklinik çalışmalar, LT'nin toksik olmayan türevinin (LTK63), adjuvan özellik göstermesine rağmen (Ryan ve ark. 2000), Faz I klinik çalışmaları sonucunda Bell paralizisine neden olabileceğini göstermiştir (Lewis ve ark. 2009). Yeni nesil mukozal aşıların geliştirilmesinde bakteriyel toksinlerin, toksik olmayan adjuvan türevlerinin kullanılması büyük önem taşımaktadır.

2.5.2.3. Lipopolisakkaritler

Lipopolisakkaritler (LPS), gram-negatif bakterilerin hücre duvarının bir bileşenidir. TLR4 ilişkili sinyal yolak aktivasyonunu sağlayan LPS'ler, özellikle Th1 immün yanıtlarını uyarmaktadır (McAleer ve ark. 2007). Adjuvan etkisine rağmen LPS toksiktir ve insanlarda pirojenik özellik gösterir. LPS'nin yapısında bulunan Lipit A, bileşiğin toksisitesinden ve adjuvan etkisinden sorumludur. Bu yüzden bileşiğin saflaştırılması ve toksik olmayan yeni türevlerin elde edilmesi için çalışmalar yapılmıştır. LPS, asidik ortamda, adjuvan aktiviteye sahip ve daha az toksik türevi olan monofosforil lipit A'ya hidroliz edilmektedir (Qureshi ve ark. 1982).

2.5.2.4. Monofosforil lipit A (MPL) ve Türevleri

MPL® gram negatif bakteri olan *Salmonella minnesota*'dan elde edilen ve toksik olmayan lipopolisakkarit türevidir. Günümüzde piyasada ruhsatlı olan HBV ve papilloma aşılarının formülasyonunda bulunmaktadır (Baldridge ve Crane 1999; Casella ve Mitchell 2008). Lipopolisakkaritler gibi, ASH'lerde bulunan TLR4 reseptörleri ile etkileştiği düşünülmekte ve sitokinlerin salımını uyararak Th1 immün yanıtının oluşmasını sağlamaktadır (Ulrich ve Myers 1995). MPL® piyasada olan aşılarda kullanılan ve T-hücre efektör yanıtları tetikleyebilen ilk TLR ligantı ve biyolojik adjuvanıdır (Baldridge ve Crane 1999). MPL®'nin aluminyum hidroksit ile kombinayonu (AS04), onaylı Hepatit B (Fendrix®) ve HPV (Cervarix®) aşılarının bileşenidir. MPL, alerji aşılarında da Th1 immün yanıtını uyararak olumlu sonuçlar göstermiştir (Wheeler ve ark. 2001). Ayrıca, MPL'nin DNA aşıları (Sasaki ve ark. 1997) ve mukozal yol ile uygulanan aşılarda adjuvant olarak kullanılması ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Childers ve ark. 2000). Sulu formülasyonlarda kullanılan MPL, antikor yanıtları arttırırken, MPL'nin yağlı formülasyonları ise T-hücre yanıtlarını arttırmaktadır (Pichyangkul ve ark. 2004; Bojang ve ark. 2005).

2.5.2.5. Muramil dipeptit ve Türevleri

Muramil dipeptid (N-asetil muramil-L-ananil-D-izoglutamin) (MDP), mikobakterilerin hücre duvarından elde edilmektedir ve hücre duvarının adjuvan özellik gösteren en küçük yapıtaşıdır. Freund adjuvanının aktif bileşenidir (Merser ve ark. 1975; Nagao ve ark., 1979). Geçmişten beri yapılan araştırmalar, doğal ve sentetik birçok antijen için MDP ve türevlerinin, hem parenteral hem de mukozal uygulamalarda etkili bir adjuvan olduğunu göstermiştir (Friedman ve Warren 1984).

MDP ve kimyasal analogları hümoral yanıtı arttırmaktadır (Michalek ve ark. 1983; Jain ve ark.2009). Sendai virus and Rota virus mukozal enfeksiyonlarına karşı, MDP-Lys türevinin mukozal adjuvan olarak koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (Fukushima ve ark. 1996). MDP'nin diğer adjuvanlarla birlikte nazal yoldan kullanımı da immün yanıtı arttırmıştır (Moschos ve ark. 2004). MDP'nin retiküloendotelyal sistemi uyardığı, makrofajların migrasyonunu inhibe ettiği, makrofajları aktive ederken sitolitik aktivitelerini de arttırdığı rapor edilmiştir (Jain ve ark. 2009). Fakat, MDP ve peptid fosfatidiletanolamin

(MTP-PtdEtn) gibi sentetik analogların yan etkileri ve stabilite sorunları insanlardaki kullanımını da sınırlandırmaktadır (Audibert ve ark. 1980; Keitel ve ark. 1993). LPS ve türevleri ile yapılan araştırmalar, az olmasına rağmen oral yoldan uygulanan lipozom formülasyonlarında MDP'nin mukozal adjuvan görevi olduğu gösterilmiştir (Childers ve ark. 2000).

2.5.2.6. Sitokinler

Sitokinlerin çoğunun immün yanıtı modifiye etme özelliği bulunmaktadır. IL-1, IL-2, IL-12, IFN-γ ve GM-CSF adjuvan olarak en çok araştırılan sitokinlerdir (Heath 1995). Ancak, bu moleküller doza bağlı toksisite göstermektedir. Ayrıca, proteinik yapılarından dolayı stabilite sorunları, kısa *in vivo* yarılanma ömürleri ve pahalı olmaları nedeniyle enfeksiyon hastalıklarına karşı adjuvan olarak kullanılmaları pek mümkün görülmemektedir. Buna rağmen, kanser immünoterapisinde sitokinlerin klinikte kullanımı ilerleme göstermiştir (Salgaller ve Lodge 1998; Lee ve Margolin 2011).

2.5.2.7. CpG oligonükleotidleri

CpG, yapısında bulunan metile olmayan CpG dinükleotidlerden immünostimülatör etki gösteren, son yıllarda adjuvan etkisinden dolayı sıkça araştırılan bir bileşiktir. CpG, genelde sentetik oligonükleotidler formunda kullanılmakta olup sistemik (hümoral ve hücresel) ve antijene özel mukozal bağışıklığı tetiklemektedir. CpG adjuvanın etkisi, onun antijene konjuge edilmesiyle ya da ilaç taşıyıcı sistemlerle birlikte formüle edildiğinde artmaktadır (Singh ve O'Hagan 2002). Özellikle Th1 ve CTL immün yanıtlarını uyaran CpG'ler, TLR-9 ligantları olup TNF-α, IL-1, IL-6 ve IFN-α, IFN-γ ve IL-12 salımını tetiklemektedir (Bevan 2004) ve enfeksiyon hastalıklarında, alerji ve kanserde, fare ve primat modellerinde koruma sağlamaktadır (Harandi ve Holmgren 2004). Yapılan klinik çalışmalar, CpG'lerin, güvenli ve insanlarda kullanım için uygun olduğunu göstermiştir (Higgins ve ark. 2007). Biyolojik ortamda stabilite problemi ve kısa raf ömrü olan CpG'leri kullanıma uygun hale getirebilmek için, katyonik peptidler ya da taşıyıcı sistemler ile kompleksleşme veya antijene konjuge etme gibi yaklaşımlar bulunmaktadır (Reed ve ark. 2009).

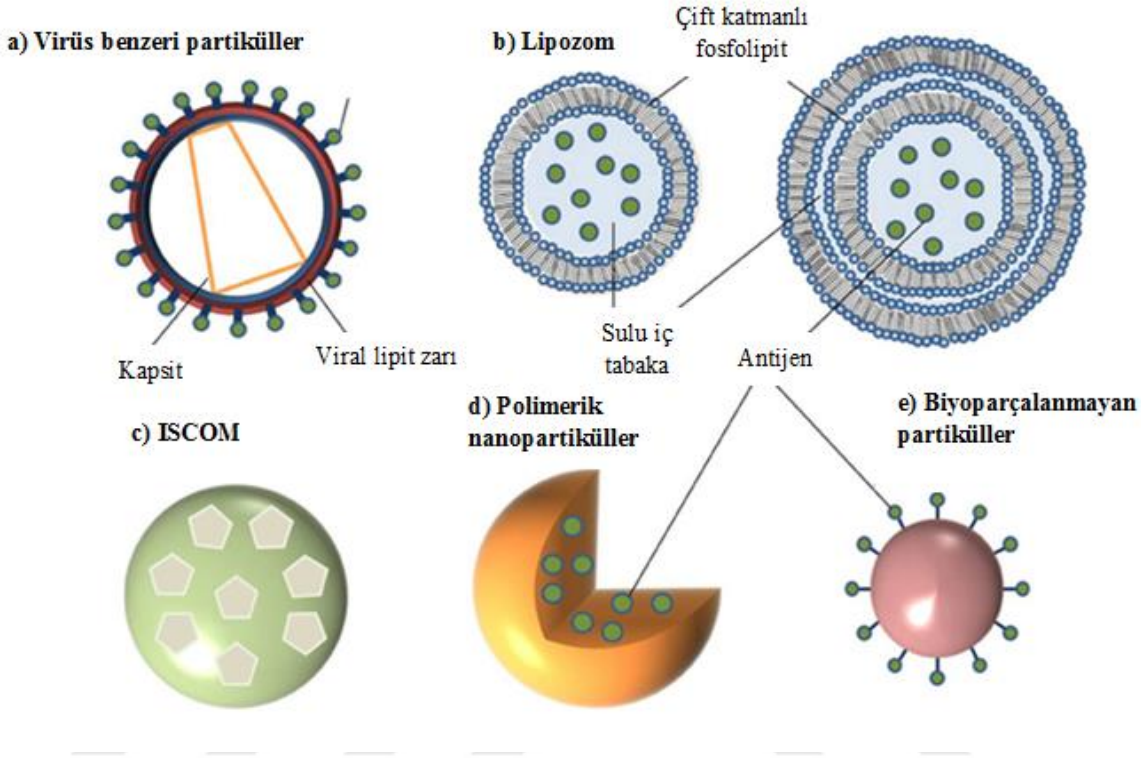
2.5.3. Aşı Taşıyıcı Sistemler

Aşı taşıyıcı sistemler, antijeni immün sistem elemanlarına sunmakta, kontrollü salım ve depo etki göstererek antijene karşı oluşan spesifik immün yanıtı arttırmaktadır. Aşı taşıyıcı sistemlerin oluşturduğu immün yanıtlar Reed ve ark. (2009) çalışmasından modifiye edilerek Tablo 2-7 de verilmiştir.

Tablo 2-7: Aşı taşıyıcı sistemlerin uyardığı immün yanıtlar

Aşı taşıyıcı sistemler	Oluşan immün yanıtların tipi				
	Th1 cevabı	Th2 cevabı	B-hücre cevabı	Mukozal yanıtlar	T- ve B-hücre yanıtları
Mineral tuzları (aluminyum tuzları, kalsiyumm fosfat, AS04 [Alum+MPL®])	+	++	+++	–	+
Emülsiyonlar [MF59™ (skualen/su), QS21, AS02 (skualen+MPL®+QS21), IFA, Montanide®, ISA51, Montanide®, ISA720]	++	–	+++	–	–
Lipozomlar (DMPC/Chol, AS01)	+++		+	–	+
Virozomlar (IRIV), ISCOM	++	++	+++	–	–
DC Chol, mineral yağı, IFA, Montanide®, skualen	–	++	+++	–	–
Mukozal taşıyıcı sistemler: Kitosan	–	–	–	–	++
Mikroküreler	+	–		–	–

Aşı taşıyıcı olarak yaygın kullanıma sahip partiküler sistemlerin yapıları Şekil 2-2'de gösterilmiştir.



Şekil 2-2: Aşı taşıyıcı sistemi olarak kullanılan sistemlerin şematik gösterimi

2.5.3.1. Mineral Tuzları

Parenteral yol ile (i.m. ve s.c.) uygulanan aşılarda adjuvan olarak genellikle mineral tuzları (aluminyum tuzları, kalsiyum fosfat) kullanılmaktadır. 50 yıldan uzun süredir tanınan ve Amerikan Gıda ve İlaç Teşkilatı tarafından onay almış aluminyum tuzları aluminyum hidroksifosfat, aluminyum hidroksi sulfat (alum), Th1 ve mukozal IgA antikor yanıtlardan çok Th2 immün cevabını tetikleyen ve sadece parenteral yoldan uygulanan aşıların formülasyonunda kullanılmaktadır. Bu adjuvanlar piyasada olan difteri-boğmaca-tetanoz, difteri-tetanoz (DT), Hepatit B ile kombine olan DT, *Haemophilus influenza* B ya da inaktif çocuk felci virüsü, Hepatit A (HAV), *Streptococcus pneumonia*, meningococcal ve insan papilloma virüsü (HPV) gibi birçok aşıda kullanılmaktadır (Clements ve Griffiths 2002). Aluminyum tuzları yüksek güvenilirlik profili göstermekte ve immünizasyon sonunda kanda yüksek ve uzun süreli antikor seviyeleri oluşturmaktadır. Ayrıca, büyük ölçekli üretimde kullanılmaktadır. Hücresel Th1 ve CTL immün yanıtları oluşturamaması

nedeniyle, verem, sıtma, leishmania, cüzzam ve AIDS gibi hastalıklara neden olan hücre içipatojenlerin yok edilmesi için geliştirilen aşılarda kullanılamamaktadır (Edelman 2002). Avantajlarına rağmen, aluminyum bileşikleri, subkütanöz nodüllere, granüloma ve apseye (Frost ve ark. 1985; Goto ve ark. 1997) neden olmaktadır. Ayrıca, etkilerinin azalmasına neden olduğu için alum içeren aşıların dondurulmaması gereklidir (Burgess ve McIntyre 1999).

2.5.3.2. Viral Taşıyıcı Aşılar

Viral taşıyıcı aşılar, immünizasyon sağlanmasının istenildiği patojenin genetik materyalini taşır ancak replike olmaz. Bu şekilde geliştirilen aşılar aynı zamanda canlı rekombinant aşılar olarak tanımlanmaktadır (Plotkin 2005) ve klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda ümit vaad eden aşı taşıyıcılar olarak görülmektedir (Hanke ve ark. 2007). Viral taşıyıcı aşılar kolay üretilebilmekte, güçlü immün yanıt oluşmasını sağlamakta ve iyi bir güvenilirlik profili göstermektedir (Shi ve ark. 2001; Santosuosso ve ark. 2005). Mukozal yoldan uygulanan adenoviral taşıyıcı sistemler birçok antijene karşı anlamlı mukozal immün yanıt oluşturmuştur (Fooks 2000). Özellikle DNA aşıları için, viral olmayan aşı taşıyıcı sistemler ile kıyaslandığında, viral taşıyıcı sistemler, *in vitro* ve *in vivo* ortamda daha iyi transfeksiyon etkinliği göstermiştir (McConkey ve ark. 2003; Moorthy ve ark. 2003; Moore ve Hill 2004; Casimiro ve ark. 2005). Üzerinde en çok araştırma yapılan adenovirüs ile nazal ve epikutan yoldan uygulanan grip aşısı ile yapılan klinik çalışmalarda, yüksek antikor seviyeleri ve iyi bir güvenilirlik profili elde edilmiştir (Shi ve ark. 2001; Van Kampen ve ark. 2005). Ayrıca, sitomegalovirüs antijenini eksprese eden canaripoks vektörü ile yapılan klinik çalışmalar da, spesifik sitotoksik T hücre (CTL) yanıtlarında artış görülmüş ve özellikle hücre içindeki viral patojenlere karşı immünite sağlanmıştır (Berencsi ve ark. 2001). Bu vektörlere ilaveten, poks virüsü, kızamık, veziküler stomatit virüsünün de dahil olduğu başka virüsler ile de çalışmalar bulunmaktadır (Harrop ve ark. 2006). Güvenilirlik sorunları, adenovirüslerin immünojenitesi, yüksek üretim maliyetleri ve gelişmiş kalite kontrol sistemi gereksinimi bu sistemlerin kullanımı sınırlandırmaktadır (Patil ve ark. 2005). Bu yüzden, son yıllarda çalışmalar viral olmayan aşı taşıyıcı sistemler üzerine yoğunlaşmıştır.

2.5.4. Partiküler Aşı Taşıyıcı Sistemler

Son yıllarda geliştirilen partiküler aşı taşıyıcı sistemler (lipozom, mikroküre ve nanoküre, emülsiyon, ISCOM), antijenin uzun süreli salım özelliklerini geliştirmesi, antijeni enzimatik degredasyondan koruması, mukosilier klirens ile antijenin nazal mukozadan uzaklaştırılmasını engellemesi, NALT gibi antijen alımının gerçekleştiği bölgelere hedeflendirme sağlayarak antijen alımını ve immün yanıtı arttırması nedeniyle büyük avantajlar sağlamaktadır. Aşı taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında polimerlerin kullanımı ile, farklı partikül boyutu, yükü ve yüzey özelliklerine sahip partiküler sistemler geliştirilebilmekte ve immün yanıt optimize edilebilmektedir (Saatçi ve Bozkır 2003; Ozsoy ve ark. 2009; Lawson ve ark. 2011). Partiküler aşı taşıyıcı sistemler antijen taşıyıcı sistem olmakla birlikte, kullanılan polimerin özelliğine bağlı olarak immünostimülatör özelliğe de sahiptirler (Ugwoke ve ark. 2005).

Partiküler sistemlerin adjuvan özellikleri aşağıda özetlenmiştir (Rice-Ficht ve ark. 2010):

- Partiküler aşı taşıyıcı sistem içerisindeki antijenin ASH'ler tarafından alımı, çözünmüş haldeki antijenden çok daha fazladır. Partiküler sistemler antijen alımını arttırarak immün yanıtı da arttırmaktadır.

- Partiküler sistemler, içine yüklenen antijen için depo görevi yapmakta ve intra ya da ekstrasellüler ortamda antijeni daha yavaş salayarak ortamda antijenin kalış süresini uzatmaktadır.

- Etkili ve uzun süren immün yanıtın oluşması için antijenin kinetiği önemlidir. Ortamda daha uzun süre antijenin bulunması immün yanıtı ve gücünü arttırmaktadır.

- Dendritik hücrelerde ve hayvan modellerinde, partiküler sistemlerin tek başında uygulanması doğal immün yanıt oluşumunu uyarmaktadır.

- Partiküler aşı taşıyıcı sistemler, büyüklüklerine ve fomülasyonlarda kullanılan içeriğe bağlı olarak endositoz ile reseptör aracılı veya reseptör aracısız (sıvı haldeki formülasyonlar) yollardan alınmakta ve MHC moleküllerinin aktive olduğu yolakların değişmesiyle kazanılmış bağışıklığı etkilemektedir.

- Partiküler aşı taşıyıcı sistemlerin en büyük avantajlarından biri de, antijeni ve adjuvanı aynı ASH'ye sunabilmesidir.

2.5.4.1. Lipozomlar

Lipozomlar, yapı ve içerik bakımından hücre zarı ile benzerlik gösteren fosfolipit yapıda veziküllerdir (Allen ve Cullis 2013) Lipozomların sulu tabakası bir ya da birkaç lipid tabakası ile çevrilmektedir (Kersten ve Crommelin 2003). Bakteriyel (Couvreur ve ark. 1991; Childers ve ark. 2002) ve viral enfeksiyonlara (Ambrosch ve ark. 1997; Ben-Yehuda ve ark. 2003) karşı aşı taşıyıcı sistem olarak kullanması yanında, tümörlerin immünoterapisinde de aşı taşıyıcı sistemi olarak kullanımı araştırılmıştır (Butts ve ark. 2005, 2011; Cardona 2006; Zhong ve ark., 2010). Lipozomlar antijeni hücre içinde parçalanmaktan koruyarak, *in vivo* ortamda T hücrelerinin primer aktivasyonunu uzatmaktadır. Birçok çalışma (Baca-Estrada ve ark. 2000; Sloat ve Cui 2006; Tafaghodi ve ark. 2006), i.n. uygulamadan sonra lipozomların mukozal immüniteyi artırdığını göstermiştir. Örneğin, lipozomlara yüklenen tetanoz toksoidinin nazal yoldan uygulanması ile yüksek mukozal sIgA seviyeleri elde edilmiştir (Tafaghodi ve ark. 2006). Ancak tüm bu avantajlara rağmen, lipozomların stabilite sorunları, kısa raf ömürleri, ve steril ürünlerin üretiminin zor olması kullanımını sınırlandırmaktadır.

2.5.4.2. ISCOM™ ve ISCOMATRIX™

ISCOM™ olarak tanımlanan ve immün sistemi uyaran kompleksler, *Quillaja saponaria* ağacından elde edilen ve immün sistemi uyaran saponinlerin (Quil A) yanında, kolesterol, fosfolipid ve hücre zarı antijeninden oluşmaktadır (Morein ve ark. 1984) ISCOM™'lar 40 nm büyüklüğünde küresel yapılardır (Sjölander ve ark. 2001). ISCOM'ların antijen alımını kolaylaştırması, antijen kalış süresini uzatması, dendritik hücrelerin aktivasyonunu uyararak güçlü, uzun süren antikor ve hücresel immün yanıt oluşturması, bu kompleksleri diğer adjuvanlardan ayırmaktadır (Maraskovsky ve ark. 2009). Ayrıca bu komplekslerin 2-8ºC'de 2 sene, 37ºC'de 3 aya kadar stabil olmaları, negatif yüklerinden dolayı pozitif yük taşıyan antijenlerle kolayca formüle edilebilmeleri, bu yapıların kullanımını arttırmaktadır (Pearse ve Drane 2005). Komplekslerin ISCOMATRIX ™ olarak adlandırılan ve antijen içermeyen şekli de geliştirilmiştir (Pearse

ve Drane 2005). İnsanlarla yapılan klinik çalışmalar da dahil olmak üzere, ISCOM ™ ve ISCOMATRIX ™ 'in heterojen kısımlarının (Quil A, QS-21) adjuvan olarak kullanıldığı detaylı çalışmalar literatürde bulunmaktadır (Cox ve ark. 1998; Rimmelzwaan ve ark. 2000). Ancak, halen kullanımda olan ISCOM™ içeren veteriner aşılar bulunmasına rağmen, saponin bazlı adjuvanların toksisitesi üzerindeki endişeler, bu sistemlerin insanlarda kullanımını sınırlandırmaktadır. Yapılan araştırmalar da, i.v. yoldan uygulanan Quil A- türevi ve Quil A- içermeyen ISCOM™'ların sıçan ve fareler üzerinde toksik olduğu görülmüştür. Karaciğer dejenerasyonuna neden olduğu düşünülen benzer sonuçlar, Quil A'nın s.c. ve intraperitoneal uygulamanın sonrasında da elde edilmiştir (Gregory ve ark. 2013).

2.5.4.3. Virozomlar

Virozomlar yaklaşık 150 nm büyüklüğünde lipit yapısında küresel, tek ya da çift katmanlı veziküllerdir. Virozomlar, influenza virüsünün yüzey glikoproteinleri olan, hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) ile doğal ve sentetik fosfolipitlerin kombine edilmesi ile elde edilir. Virozomlar biyouyumlu, toksik olmayan, hümoral ve hücresel immüniteyi uyaran sistemlerdir (Huckriede ve ark. 2003; Glück ve ark. 2004). Virozom yapısında ki grip aşıları Avrupa'da kullanılmaktadır (Inflexal V, Berna Biotech Ltd., ya da Influvac Plus®, Solvay Pharma, İsviçre; Invivac®, Solvay Pharmaceuticals BV, Holanda) ve yayınlanan çalışmalar bu aşıların çoçuklar ve yaşlılarda da güvenilir ve etkili olduğunu göstermiştir (Herzog ve ark. 2002; de Bruijn ve ark. 2004). Nazal yoldan uygulanan virozomal grip aşısı ile yapılan klinik çalışmalar sonucunda, bu aşının hücresel ve hümoral immün yanıtı uyardığı, mukozal yüzeylerde nötralize edici antikorların salınmasını ve patojenlere karşı korumayı arttırdığı görülmüştür (Glück ve ark. 2000). İsviçre'de ruhsat alan i.n. uygulanan virozomal grip aşısı (NasalFlu®), geçici yüz felcine neden olduğundan (Bell paralizi), kullanıma girdikten ilk dönemden sonra piyasadan geri çekilmiştir (Sendi ve ark. 2004). Virozomal aşı taşıyıcı sistemlerin *in vitro* ortamda ASH'leri aktive ettiği ve hayvan modellerinde respiratuar sinsisyal virüse karşı i.n. uygulamadan sonra serum IgG ve mukozal antikor cevabını arttırdığı görülmüştür (Shafique ve ark. 2013). Kabakulak virüsünü eksprese eden virozomal DNA aşısı ile i.n. yoldan aşılama ile hem Th1 hem de Th2 immün yanıtının oluştuğu gösterilmiştir (Cusi ve ark. 2000).

2.5.4.4. Proteozomlar

Proteozomlar *Neisseria meningitidis* dış membran proteinlerden oluşan proteinik yapıda hidrofobik nanoveziküllerdir. Dış membran proteinlerinin klinik kullanımı 80'li yıllarından beri araştırılmıştır. Proteozomlar, halen piyasada olan meningokok aşısında bulunmaktadır (Frasch ve Bash 2006). İnfluenza virüsü membran proteinleri gibi hidrofobi kısımları olan makromoleküller ile kovalent olmayan bir şekilde bağlanmakta ve bu makromolekülleri mukozal immün sisteme sunmaktadır (Treanor ve ark. 2006). Farelerde yapılan bir aşı çalışmasında, proteozom ile geliştirilen A/Taiwan/86 (H1N1) influenza virüsünün alt ünitesinin i.n. uygulanmasından sonra akciğer ve nazal mukoza da yüksek miktarda IgA sekresyonu gerçekleşmiştir (Plante ve ark. 2002). Sağlıklı erişkinlerde i.n. yoldan uygulanan proteozom yapısında ki grip aşısının, doza bağımlı olarak mukozal bağışıklığı uyardığı görülmüştür (Treanor ve ark. 2006). Bir başka aşı çalışmasında mukozal dokuları direk uyarmak amacı ile i.n. yoldan uygulama için *S. flexneri* 2a lipopolisakkaritleri ile *Neisseria meningitidis* dış membran proteinleri konjuge edilerek LPS-proteozom aşısı tasarlanmış ve sağlıklı erişkinlerde yapılan klinik çalışma sonucunda geliştirilen aşının immün sistemin uyarılmasında etkili olduğu bulunmuştur (Fries ve ark. 2001).

2.5.4.5. Sentetik Biyomimetik Supramoleküler Biyovektörü (SMBV)^{TM}

SMBV^{TM}, polisakkarit yapısında bir çekirdeğin lipozom membranı (dipalmitoil-fosfatidilkolin ve kolesterol) ile çevrilmesi ile oluşan küresel nanopartiküler sistemdir. Boyut ve yapısal olarak virüslere bezerliğinden dolayı taşıdığı antijene karşı güçlü immün yanıt oluşturur (De Miguel ve ark. 2000). Yapılan çalışmalar, bu sistemin mukozada kalış süresinin uzun olduğunu göstermiş ve özellikle nazal yol ile aşılama için ümit vaad eden bir aşı taşıyıcı sistem olduğunu göstermiştir. Sistemin hidrofilik-lipofilik çekirdek-dış membran yapısından dolayı farklı fizikokimyasal özelliklere sahip birçok antijen taşınabilmektedir. İntranazal yolla uygulanan SMBV^{TM} ile influenza aşısı beşinci aya kadar hem güçlü sistemik immün yanıt, hem de mukozal immün yanıt oluşturmuştur (von Hoegen 2001). Sağlıklı gönüllülerde yapılan Faz I çalışmasında, SMBV^{TM} aşı taşıyıcı sisteminin mukozal immün yanıtı anlamlı derece arttırdığı ve burun akıntısı dışında başka hiçbir yan etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Halperin ve ark. 2005).

2.5.5. Polimerik Partiküler Taşıyıcı Sistemler

Biyoparçalanır polimerlerin kullanıldığı aşı taşıyıcı sistemlerin başarılı ve etkili bir şekilde antijeni taşıması için, geliştirilen partiküler sistemin antijeni etkili bir şekilde enkapsüle etmeli, uygun büyüklükte olmalı ve antijen sunan hücrelerden alınması için uygun yüzey özelliklere sahip olmalıdır. Partiküllerin büyüklüğü ve yüzey yükü, *in vivo* davranışlarını, hücrelerle etkileşimlerini ve fagositik hücreler tarafından alımlarını önemli derecede etkilemektedir. Ayrıca, partiküllerin morfolojik özellikleri, kullanılan polimerin özelliklerine, yüzey aktif maddenin konsantrasyonuna ve hazırlama yöntemine bağlıdır (Rafati ve ark. 1997).

Poli (D,L-laktik-*ko*-glikolik asit), polilaktik asit, poli-ε-kaprolakton, kitosan ve türevleri, poliakrilik asit, poli (metakrilik asit), polialkil siyanoakrilat, nişasta, dekstran, jelatin ve aljinat polimerleri, mikro/nanopartiküler aşı taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılmıştır (Kammona ve Kiparissides 2012).

2.5.5.1. Poli(laktik asid) (PLA) ve Poli(laktik-*ko*-glikolik asid) (PLGA)

Mikro/nanopartikül formülasyonları hazırlamak için en çok araştırılan polimerler, alifatik poliester yapısındaki poli (laktik-*ko*-glikolik asid) (PLGA) ve poli (laktik asid) (PLA) polimerleridir. PLGA ve PLA polimerleri biyouyumlu, biyoparçalanabilir, kontrollü salım özelliği gösteren Amerikan İlaç ve Gıda Teşkilatı tarafından onaylı polimerlerdir (Li ve McCarthy 1999; Tamber ve ark. 2005). PLA, PLGA ve bu polimerlerin farklı molekül ağırlığına sahip kopolimerleri ile peptid, protein ve nükleik asit gibi makromolekülleri içeren formülasyonların geliştirilmesi mümkündür. PLA ve PLGA polimerlerinin tek doz aşılarının geliştirilmesinde kullanımı Dünya Sağlık Örgütü tarafından desteklenmektedir (Aguado 1993). Hepatit B yüzey antijenini PLGA mikrokapsüllere yüklemek için birçok çalışma yapılmıştır (Lee ve ark. 1997; Singh ve ark. 1997; Shi ve ark. 2002). Bu polimerler ile geliştirilen partiküler sistemler, antijen sunan hücreler tarafından alınıp immün yanıtı başlatmaktadır. Hepatit B yüzey antijenini de içeren bir grup antijenin PLGA/PLA mikro/nanopartikül formülasyonları hazırlanmış ve mukozal etkinlikleri incelenmiştir. Antijen yüklenen PLGA/PLA nanopartiküllerinin intranazal uygulamadan sonra mukozal ve sistemik immün yanıtı arttırdığı görülmüştür (Alpar ve ark. 2001; Jaganathan ve Vyas 2006). Partikülün yüzeyinin hidrofilik polietilen glikol (PEG) polimeri ve onun türevleri

ile modifiye edilmesi enkapsüle edilen proteinin stabilitesini artıran sterik bir engel oluşturmuştur. Tetanoz toksoidi enkapsüle edilmiş PLA-PEG nanopartiküllerinin i.n. uygulanması ile, nanopartiküllerden uzun süreli ilaç salımına bağlı olarak IgG antikor seviyesi 6 ay boyunca artış göstermiştir (Vila ve ark. 2004a). Yine, nükleik asit yüklenmiş PLA-PEG nanopartiküllerinin i.n. uygulamadan sonra ölçülen serum IgG düzeyleri, tek başına plazmid uygulamasından sonra elde edilen değerlerden anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulunmuştur (Vila ve ark. 2002). Yapılan çalışmalar, i.n. uygulamadan sonra partiküllerin hücre bariyerlerinden yüksek oranda geçtiğini göstermiştir (Csaba ve ark. 2006).

2.5.5.2. Poli(β-amino ester) (PbAE)

Poli(β-amino ester) (PbAE) polimerleri sentetik, pH'ya hassas, hidroliz yoluyla parçalanabilen, biyouyumlu katyonik polimerlerdir. Bu polimerler, amin monomerlerin diakrilatlara konjugasyonu ile sentezlenmektedir (Chen ve ark. 2007). Farklı tipteki amin ve akrilatlar kullanılarak, farklı çözünürlük özellikleri gösteren, yüksek ya da düşük katyonik yük yoğunluğuna ve farklı kristal yapıya sahip, birbirinden farklı degradasyon kinetik profili gösteren PbAE'ler sentezlenebilmektedir (Lynn ve ark. 2001). Fizyolojik koşullarda ester bağın hidrolizi sonucunda toksik olmayan küçük molekül ağırlıklı bis (β-amino asid) ve diol ürünlerine parçalanmaktadır. PbAE polimerleri, son yıllarda ilgi çeken yeni ilaç taşıyıcı sistemlerdendir. Bu polimerler ile yapılan gen transfeksiyon çalışmalarında, kanser ilaçlarının hedeflendirilmesinde ve hücre içi alım çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edilmiştir. PbAE polimerleri kullanılarak hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemler, polinükleotid, protein, peptid, antijen ve küçük molekül ağırlıklı ilaçların hücre içine hedeflendirilmesinde kullanılabilmektedir (Little ve ark. 2004; Shenoy ve ark. 2005a). Çözücü difüzyon yöntemi ile hazırlanan, küresel, pH'ya hassas polietilen oksit (PEO)-modifiye edilmiş PbAE nanopartikülleri, arttırılmış geçirgenlik ve alıkoyma (EPR) etkisi ile tümörlü bölgeye pasif hedeflendirme sağlamıştır. pH'a duyarlı PbAE nanopartikülleri, sitotoksik ajanların tümünü istenen bölgeye taşımış ve hızla antitumöral etki göstermiştir (Shenoy ve ark. 2005b). Poli (β-amino ester) polimerlerin kolay sentezlenmesi, uygun tasarlandığında pozitif yük taşıması ve pH'a bağlı parçalanma

göstermesi nedeniyle farklı özellikte ilaçlar için etkin taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasına olanak vermektedir.

2.5.5.3. Kitosan

Mukozal aşıların formülasyonları için en çok araştırılan polimerlerden olan kitosan, β-(1→4)-glikozidik bağlarla bağlanmış D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozamin gruplarını içeren, kitinin deasetilasyonu ile elde edilen, pozitif yüklü, ucuz bir lineer poliaminosakkarittir. Kitosanın biyouyumlu olması, mukozal yüzeyler ve diğer vücut sıvılarında bulunan lizozim, di-N-asetilkitobiaz gibi enzimler ile biyoparçalanabilir olması, düşük toksisiteye sahip olması ve vücuttan kolay uzaklaştırılabilmesi, Farmasötik Teknoloji alanında kullanımını arttırmaktadır (Senel ve McClureb 2004; Garcia-Fuentes ve Alonso 2012; Baldrick 2010). Kitosan, mukoadezif özelliğinden dolayı formülasyonların mukozada kalış süresini uzatmakta, hücreler arası sıkı bağlantı noktalarını açıp paraselüller transportu kolaylaştırmakta ve böylece makromoleküllerin mukozal absorpsiyonunu arttırmaktadır (Illum ve ark. 2001; Sonaje ve ark. 2011). Kitosan ve türevleri, tripolifosfat (TPP), sodyum aljinat gibi anyonik polimer ile iyonik etkileşime girerek nanopartikül oluşturmaktadır. Bazı çalışmalarda, kitosan nanopartiküllerinin nazal, pulmoner, oral yoldan verildiğinde immün cevabı arttırdığı görülmüştür (Amidi ve ark. 2010). Antijen yüklenmiş kitosan nanopartikülleri i.n. uygulamadan sonra difteri, boğmaca, grip gibi hastalıklara karşı immün yanıtı arttırmıştır (Illum ve ark. 2001). Son yıllarda, kitosanın özellikle nötral pH'da düşük çözünürlüğünü arttırmak, nanopartiküllerin hem fiziksel ve biyolojik stabilitesini hem de mukozal absorpsiyonunu geliştirmek amacıyla çeşitli türevleri hazırlanmıştır. Kitosanın, karboksimetilkitosan (CMC), trimetilkitosan (TMC) türevleri kullanılarak hazırlanan nanopartikülleri ile tetanoz toksoidinin intranazal etkinliği arttırılmıştır (van der Lubben ve ark. 2001; Sayin ve ark. 2008). DNA-kitosan kompleksleri de hepatit B'ye karşı nazal aşı taşıyıcı sistem olarak kullanılmıştır. Bu aşının farelere i.n. uygulanması ile, rekombinant antijenin alum ile birlikte ya da serbest plazmidin i.m. uygulanmasından sonra elde edilen serum IgG düzeyleri ile aynı sonuçlar elde edilmiştir. Bununla birlikte, i.n. uygulamadan sonra mukozal IgA düzeyleri ve hücresel immün yanıt artış göstermiştir (Khatri ve ark. 2008). Pentasodium tripolifosfat gibi bir polianyon ile kitosan polimerinin amin gruplarının çapraz bağlanmasıyla oluşan nanotaşıyıcı sistemler

nazal yoldan aşı taşınması amacıyla araştırılmıştır. Partiküllerin boyutu, yüzey yükü ve salım profili farklı molekül ağırlığına sahip kitosan ve kitosan türevi ve poloksamer, hiyalüronik asit, siklodekstrinler gibi maddelerin kullanımı ile optimize edilebilir (Janes ve ark. 2001; Vila ve ark. 2004b; Amidi ve ark. 2006). Ovalbumin içeren pozitif yüklü N-trimetil kitosan polimeri ile hazırlanmış nanopartiküllerin Calu-3 hücrelerinde toksik olmadığı ve *in vivo* alım çalışmalarında bu nanopartiküllerin nazal mukoza boyunca taşındığı gösterilmiştir (Amidi ve ark. 2006). Nagamoto ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, farklı büyüklüğe sahip kitosan partiküllerin ve kitosan kaplı emülsiyonların sıçanlarda i.n. ve intraperitonal uygulamadan sonra yüksek serum IgG ve mukozal IgA antikor düzeyleri oluşturduğu gösterilmiştir (Nagamoto ve ark. 2004).

2.6. Nazal Yol ile Uygulanan Aşı Taşıyıcı Sistemlerin Özelliklerini Etkileyen Faktörler

2.6.1. Partikül Boyutu

Partiküler aşı taşıyıcı sistemlerin partikül boyutu ve bileşimi, humoral ve hücresel immün yanıtın uyarılmasından sorumlu CD8+ T hücreleri ve/veya CD4+ T hücrelerini aktive ederek Th1 ve/veya Th2 immün cevabının oluşumunu etkilemektedir. Yine, geliştirilen sistemlerin partikül boyutu, nazal mukozadan geçişlerini ve partiküllerin içinde enkapsüle olan antijen miktarını etkilemektedir. Genelde, partikül boyutunun artması ile enkapsüle edilen antijen miktarı artmasına rağmen, partikülün yüzeyine adsorbe olan antijen miktarı partikül boyutunun azalmasına bağlı olarak artan yüzey alanı ile artış göstermektedir. Yapılan çalışmalar, NALT'ta bulunan M hücreleri tarafından alınması için aşı taşıyıcı sistemlerin partikül boyutu hakkında kesin sınırların olmadığını göstermesine karşın, küçük partiküllerin (genelde nano-boyutunda) daha kolay alındığı bilinmektedir (Koping-Hoggard ve ark. 2005; Vila ve ark. 2005; Rice-Ficht ve ark. 2010). Partikül boyutu 0,2-2 µm arasındaki partiküllerin NALT tarafından alınmaktadır (Kammona ve Kiparissides 2012). Vila ve ark. (2005), ^{125}I tetanoz toksoidi içeren 200 nm, 1,5 µm, 5 µm, ve 10 µm büyüklüğündeki PLA-PEG partiküllerin sıçanlarda i.n. yolla uygulanmasındansonra etkinliklerini incelemiş ve 10 µm büyüklüğündeki partiküller hariç, en fazla 200 nm boyutundaki nanopartiküller olmak üzere 5 µm ve altındaki tüm partiküllerin kanda ve lenf nodlarında tetanoz toksoidinin taşımını kolaylaştırdığını göstermiştir. 5 µm'den küçük partiküllerin daha büyük partiküllere göre yüksek oranda

hücresel alımının olması, nanopartiküllerin (50-300 nm) ve mikropartiküllerin (1-5 µm) büyüklüğünün sırasıyla virüs ve bakteri boyutuna benzerliğinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Xiang ve ark. 2006). Partikül büyüklüğü endositoz ile alınan partiküllerin alınma yollarını etkilemektedir (Xiang ve ark. 2006).

Partiküler aşı taşıyıcı sistemler, boyut ve bileşimine bağlı olarak endositoz yolaklarından birini uyarmaktadır. Aşı formülasyonlarında kullanılan partiküllerin boyutu (<0.5 µm) patojenlerle benzer olduğundan, ASH'ler tarafından yukarıda belirtilen yolaklardan biri ile alınmaktadır. Ayrıca, farklı partikül boyutuna sahip partiküllerin farklı yollardan alınması spesifik immün yanıtların uyarılması için avantajdır. Polistiren partiküllerin model olarak kullanıldığı bir çalışmada, 40-50 nm boyutundaki partiküllerin daha büyük partiküllere göre (>0.5 µm) daha fazla CD8+ ve CD4+ tip 1 T hücre yanıtları oluşturduğu, büyük partiküllerin ise daha iyi tip 2 ve antikor yanıtı oluşturduğu gösterilmiştir (Fifis ve ark. 2004). Mottram ve ark. (2007) ilk immünizasyondan sonra partikül boyutunun Tip 1/Tip 2 sitokinlerin salımını etkilediğini göstermiştir. Özellikle virüslere karşı etkili aşıların geliştirilmesinde bu bilgiler önemlidir. Farklı partikül boyutuna (20 nm, 40 nm, 49 nm, 67 nm, 93 nm, 101 nm, ve 123 nm) sahip OVA nanopartiküllerinin IFN-γ ve IL-4 salımı üzerine etkisi incelenmiştir. 40-49 nm büyüklüğündeki nanopartiküller CD8+ T hücrelerinden IFN-γ salımını uyarırken, 93-123 nm arasında ki partiküller CD4+ T hücre aktivasyonunu ve IL-4 salımını uyarmıştır.

Nazal yol ile uygulanan nanopartiküler aşı taşıyıcı sistemler 80'li yılların sonlarında araştırılmaya başlanmasına rağmen, bu sistemlerin klinik değerlendirme çalışmaları ancak son senelerde başlatılmıştır. İmmün sistem hakkında artan bilgi, nanoteknoloji alanındaki gelişmeler ve yoğun araştırmalar sonucunda i.n. yol ile uygulanan aşıların kullanıma girmesi ümit vaad etmektedir.

2.6.2. Zeta Potansiyel (Yüzey yükü)

Formülasyonların yüzey yükü, oluşturdukları immün yanıt yanında, antijenin enkapsülasyon etkinliğini ve stabilitesini, sistemin biyoadezif özelliğine bağlı olarak mukozada kalış süresini etkiler. Mukus tabakasının anyonik karakteri, M hücreleri ve epitel hücrelerinin hücre zarlarının negatif yüklü olması nedeniyle, pozitif yüklü partiküller

mukus ile etkileşime girer ve oluşan mukozadezyon sonucunda aşı taşıyıcı sistemin mukozada kalış süresi artarak antijen alımı da arttırılır. Partikül yüzeylerinin kitosan, poli-L-lizin (Thiele ve ark. 2003) ve protamin (Martinez ve ark. 2008) gibi pozitif yüklü bir polimer ile kaplanması ile partiküllerin hücresel alımlarının artış gösterdiği bildirilmiştir. Tetanoz toksoidi içeren kitosan kaplı lipozom formülasyonun daha güçlü immün yanıtı oluşturduğu görülmüştür (Martin ve ark. 2005). Formülasyonun yükü özellikle DNA plazmidlerin enkapsülasyonunu veya adsorbsiyonunu etkilemektedir. Sarmal yapısı ve negatif yükü nedeniyle, DNA aşı fromülasyonlarının enkapsülasyon etkinliği ve stabilitesi düşüktür. Bu yüzden, DNA aşılarının stabilitesini, enkapsülasyon etkinliğini ve yüklenen DNA miktarını arttırmak için katyonik formülasyonlar geliştirilmiştir. (Singh ve ark. 2000; Vajdy ve O'Hagan 2001; Xu ve ark. 2004). Ancak, katyonik aşı taşıyıcı sistemlerin mukozal ve sistemik immün cevabı arttırmalarına ve i.n. uygulamadan sonra sitotoksik T lenfosit oluşumunu uyarmalarına rağmen, bazı çalışmalarda taşıdıkları pozitif yüklerinden dolayı toksisiteye neden oldukları belirtilmiştir (Tiyaboonchai ve ark. 2003; Romoren ve ark. 2004).

2.6.3. Hidrofobik Özellikleri

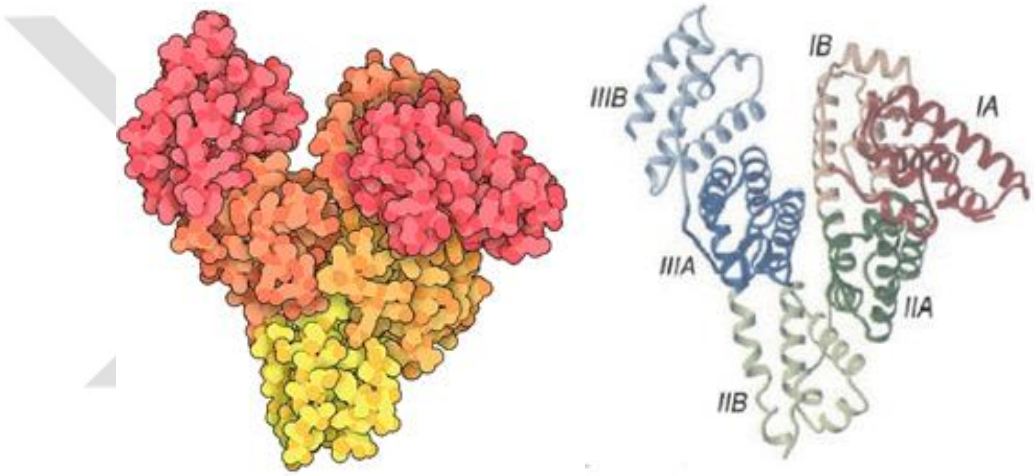
İntranazal yol ile aşılamada kullanılan partiküler aşı taşıyıcı sistemlerin oluşturduğu immün yanıtlar üzerine taşıyıcı sistemin hidrofobik özellikleri etki etmektedir. *In vitro* testlerde hücre içine alımı fazla olan hidrofobik yapıdaki taşıyıcı sistemlerin hayvan modellerinde immün yanıtı ve antikor düzeylerini arttırdığı belirtilmiştir (Raghuvanshi ve ark. 2002; Foged ve ark. 2005). Difteri toksoidi içeren polikaprolakton (PCL) nanopartiküllerinin, daha az hidrofobik olan PLGA-PCL ve PLGA nanopartikül formülasyonları ile kıyaslandığında, *in vitro* hücre içi alımları ve i.n. uygulamadan sonra spesifik IgG antikor düzeyleri daha yüksek bulunmuştur (Singh ve ark. 2006). Vila ve ark. (2004b) tarafından yapılan çalışmada ise, hidrofilik yüzeye sahip PLA-PEG nanopartiküllerinin yüzeyi daha hidrofobik PEGlenmemiş PLA nanopartikül formülasyonlarına göre nazal mukozada bulunan NALT hücreleri tarafından daha fazla alındığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmaların hepsi, nazal mukozadan alınan nanopartikül formülasyonlarının hidrofilik-lipofilik özellikleri için kesin bir sınırın olmadığını ve daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal ve Cihazlar

3.1.1. Materyaller

Model protein: Sığır serum albümini (BSA) (~66 kDa) (Sigma-Aldrich, Almanya).



Şekil 3-1: Sığır serum albüminin yapısı

Polimerler

Kitosan (20-300 cP, düşük molekül ağırlıklı) (Sigma-Aldrich, Almanya), poli(laktik-*ko*-glikolik asit) (PLGA 50:50) Resomer® RG502 (7 000-17 000) ve Resomer® RG 503 (24 000-38 000 kDa) (Evonik, Almanya), sodyum trifosfat pentabazik (Fluka, Almanya), poli(vinil alkol) (30-700 kDa, %89-97 hidrolize) (Sigma-Aldrich, Almanya).

Kitosan polimerin modifikasyonu için kullanılan maddeler: N-(2-hidroksietil)etilendiamin (HE-EDA) (Sigma-Aldrich, USA), etilendiamin (EDA) (Sigma-Aldrich, ABD), glasiyal asetik asit ve aseton (Merck, Almanya), allil disülfit (Sigma-Aldrich, ABD).

PbAE sentezi için kullanılan maddeler: monomerlerden bisfenol-A-etoksilat diakrilat (BFAEDA) ve etilendiamin (EDA) (Sigma-Aldrich, USA), tetrahidrofuran (THF) çözücü olarak (Sigma-Aldrich, ABD), dietileter kristalizasyon için (Merck, Almanya).

Hücreler: Calu-3 hücreleri (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu, ATCC®, pasaj no: 3-8 arasında), A549 hücreleri (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu, ATCC®, pasaj no: 7-16 arasında).

Diğerleri:

Bradford Reaktifi (Sigma-Aldrich, Almanya), Bikinkoninik Asit (QuantiPro™ BCA Assay Kit) (Sigma-Aldrich, Almanya), Alum (Invivogen, Fransa), CpG ODN **(**Invivogen, Fransa**),** DMEM (Sigma-Aldrich, Almanya), EMEM (Multicell, ABD), RPMI 1640 (Lonza, Belgium), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) (Sigma-Aldrich, Almanya), dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck Millipore, Almanya), fetal sığır serumu (FBS) (Sigma-Aldrich, Almanya), Pen/strep (Gibco, ABD), hücre dondurma ortamı (Sigma-Aldrich, Almanya), fosfat tampon çözeltisi tableti (PBS) (pH 7,4) (Genaxxon Bioscience GmbH, Almanya), hücre kültür flaskları (Spl, Kore), 96 kuyucuklu plaka (Costar, ABD), Tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, Almanya), 70 µm hücre süzgeci (Spl, Kore),

Mouse IFN-ɣ ELISA MAX™ Deluxe, Mouse IL-2 ELISA MAX™ Mouse IL-4 ELISA MAX™ Mouse IL-6 ELISA MAX™ Mouse IL-10 ELISA MAX™ Deluxe kitleri (Biolegend®, ABD), Elisa General Assay Diluent (Biolegend®, ABD), Elisa Wash buffer (Biolegend®, ABD), dipi düz 96 kuyucuklu ELISA plakaları (Thermo Scientific, ABD),

Goat Anti Mouse IgG:HRP, Goat Anti Mouse IgG1:HRP, Goat Anti Mouse IgG2a:HRP, Goat Anti Mouse IgA:HRP (Biorad, ABD), 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)-diamonyum tuzu (ABTS) çözeltisi (Merck Millipore, Almanya), Stop Çözeltisi (Biolegend®, ABD),

Sodyum azid (Sigma-Aldrich, Almanya), Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad, ABD), Laemmli sample buffer (Bio-Rad, ABD), β-mercaptoethanol (Biorad, ABD), Any kD™ Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels (Bio-Rad, ABD), 10x

Tris/Glycine/SDS yürütme tamponu (Bio-Rad, ABD), Coomassie Brillant Blue R250 (Glemtham Life Sciences, İngiltere).

- Asetik asit, diklorometan ve kullanılan diğer kimyasal maddelerin hepsi analitik kalitede kullanıldı ve Merck (Almanya) firmasından temin edildi. Çözeltilerin hazırlanmasında distile su kullanıldı.
- Hücre kültür çalışmalarında kullanılan çözeltiler (örn. tampon çözeltisi) ve malzemeler (örn. pipetler) kullanımdan önce sterilize edildi veya steril halde satın alındı.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

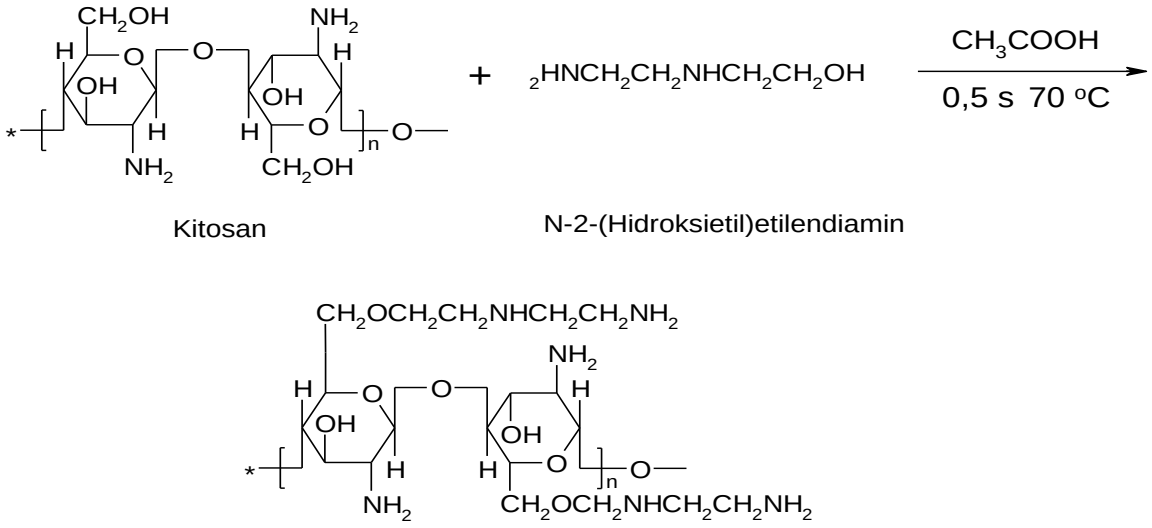
Zetasizer Nano ZS®	Malvern Instruments Ltd., İngiltere
UV-VIS Spektrofotometre	Shimadzu UV – 1610, Japonya
Dikey jel elektoforez sistemi	Mini-PROTEAN Tetra Hücre Bio-Rad, ABD
Güç ünitesi	Bio-Rad, ABD
Mikroplaka okuyucu	Multiskan Ex Thermo Scientific, ABD
Homojenizatör	CAT x620, Almanya
Liyofilizatör	Virtis Advantage Plus, İngiltere
Orbital çalkalayıcı	Thermo Electron Corporation, Model 420, ABD
Santrifüj cihazı	Allegra™X-22R Centrifuge, Beckman Coulter Inc., ABD; Nüve, CG-809, Türkiye
Ultrasonik su banyosu	Bandelin Sonorex, Almanya
Hassas terazi	Denver Instruments, TB-Series, ABD
Vorteks	IKA Genius 3, Almanya
Etüv	Heraeus, Almanya
pH-metre	Inolab WTW series, Almanya; Hanna Instruments HI-221, ABD
Distile su aleti	Elga, Pure Lab Option, ABD

CO_2 etüvü	Thermo Scientific forma direct heat, ABD
-30°C dondurucu dolabı	Electrolux, İsveç
-80°C dondurucu dolabı	T Series Thermo Scientific, ABD
Laminar akış kabini	Thermo Scientific MSC Advantage, ABD
Faz-kontrast invert mikroskop	Ckx 41 Olympus, Japonya
Otoklav	Tuttnauer, Hollanda
Sıvı azot tankı	Arpege, Fransa

3.2. Polimerlerin Sentezi

3.2.1. Aminlenmiş Kitosan Polimerinin Sentezi

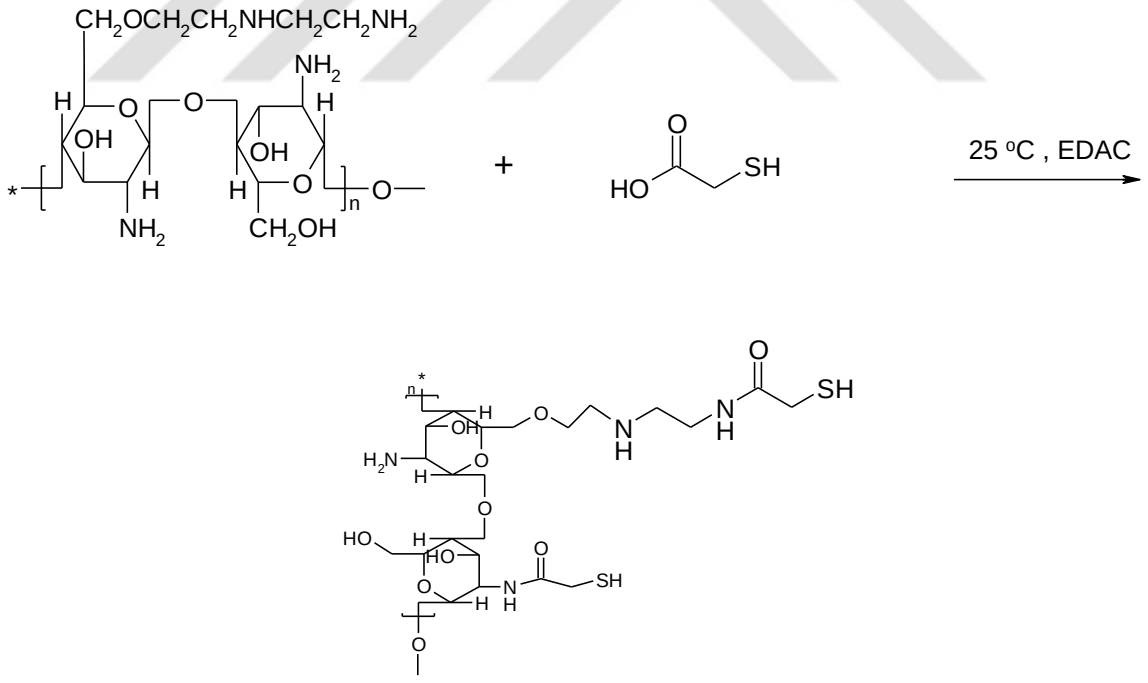
Aminlenmiş kitosan (amin-kitosan) polimerini sentezlemek için, 10 g kitosan % 4'lük asetik asit içerisinde sıcaklık yardımı ile çözündürüldü. Üzerine, kitosan'ın 1 glukozamin ünitesi başına 0,5 mol N-(2-hidroksietil)etilendiamin olacak şekilde ilave edildi. 70°C'de 30 dakika karıştırıldı ve reaksiyon gerçekleştirildi. Elde edilen aminlenmiş kitosan asetonda çöktürüldü ve 40°C de vakum altında kurutuldu. Şekil 3-2'de amin ile kitosan modifikasyonun şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 3-2: Aminlenmiş kitosan sentezinin şematik gösterimi

3.2.2. Aminlenmiş ve Tiyollenmiş Kitosan Polimerinin Sentezi

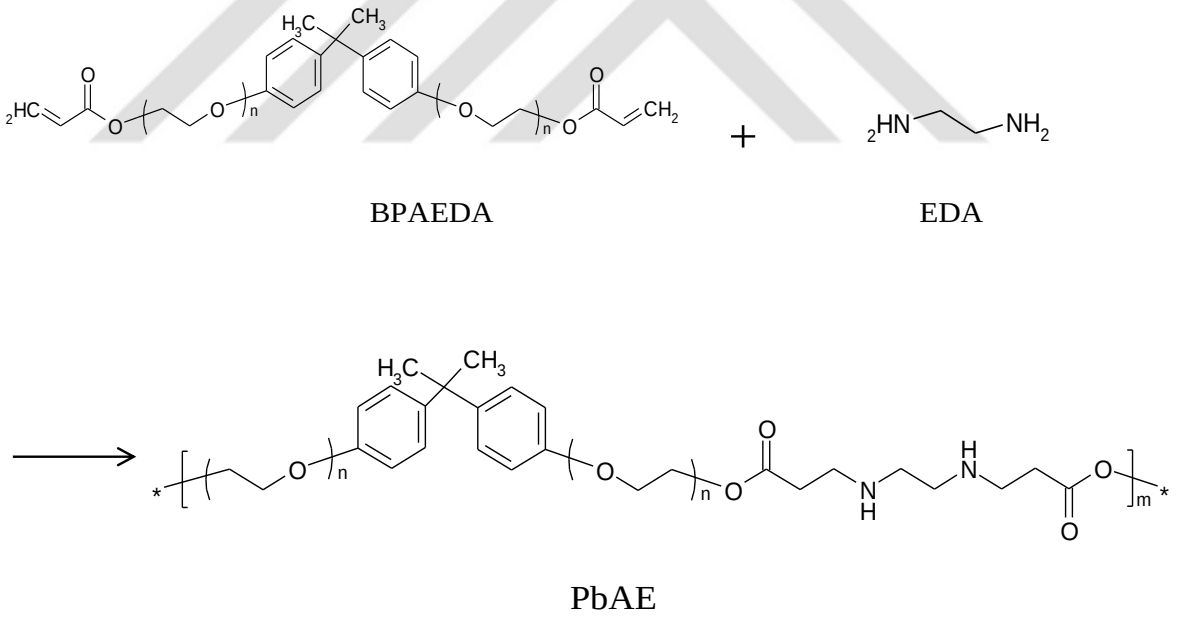
Aminlenmiş ve tiyollenmiş kitosan (amin-tiyol-kitosan) polimerini sentezlemek için yukarıdaki bölümde anlatılan 1 g amin-kitosan polimeri (AKS), %1 asetik asit çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında çözüldü. 1 g tiyoglikolik asit (TGA) reaktör içerisinde deiyonize suda çözüldü ve ardından TGA'nın karboksilik asid gruplarını aktive etmek için 50 mM EDAC (su içerisinde) ilave edildi. Amin-kitosan çözeltisi, reaktörde bulunan EDAC ile aktive edilmiş tiyoglikolik asit üzerine ilave edildi ve sülfidril gruplarının oksidasyonunu önlemek için karışımın pH'sı 5N HCl ile pH 5'e ayarlandı. 3 saat oda sıcaklığında azot gazı akımı altında karıştırıldı. Elde edilen amin-kitosan-TGA konjugatı diyaliz edildi. Diyaliz sonunda çözelti liyofilize edildi ve elde edilen toz halindeki konjugat +4ºC'de saklandı. Şekil 3-3'de tiyoglikolik asit ile amin-kitosan polimerinin modifikasyonunun şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 3-3: Aminlenmiş ve tiyollenmiş kitosan sentezinin şematik gösterimi

3.2.3. Poli(β-amino ester) Polimerinin Sentezi

Pozitif yüklü poli(β-amino ester) (PbAE) polimerini elde etmek için bisfenol-A-etoksilat diakrilat (BFAEDA)'ın tetrahidrofuran içerisinde ki çözeltisine 25°C de azot gazı akımı altında etilendiamin in THF içerisinde ki çözeltisi ilave edildi (diakrilat: diamin = 1:1,1 oranında). 50±1°C de inkübatör içerisinde azot akımı altında 48 saat boyunca sürekli karıştırılarak reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon süresi sonunda elde edilen PbAE ürünlerini saflaştırmak ve reaksiyona girmemiş monomerleri ayırmak için reaksiyon karışımı, devamlı karıştırılan susuz dietil eter içerisine damla damla ilave edildi. Üst faz atıldı ve çöken PbAE polimeri vakum altında oda sıcaklığında kurutularak +4°C'de saklandı. Şekil 3-4'de poli(β-amino ester) polimer sentezinin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 3-4: Poli(β-amino ester) polimer sentezinin şematik gösterimi

3.3. Polimer Yapılarının Karakterizasyonu

3.3.1. Fourier Transform-Infrared Spektrometrisi (FT-IR) ile Polimer Yapılarının Karakterizasyonu

3.3.1.1. FT-IR ile Amin-kitosan ve Amin-tiyol-kitosan Polimer Yapılarının Karakterizasyonu

Aminlenmiş kitosan polimerinin ve sonrasında bu polimerin tiyoglikolik asit ile modifikasyonun başarılı olup olmadığını saptamak ve modifiye edilen kitosan polimerlerinin yapısal özelliklerini incelemek amacıyla polimerlerin yapısı Fourier Transform-Infrared (FT-IR) spektroskopisi çalışmaları ile analiz edilmiştir. Kitosan, sentezlenen amin-kitosan ve amin-tiyol-kitosan polimerlerinin FT-IR spektrumları (Digilab Excalibur-FTS 3000 MX) doğrudan toz kütlelerden 400-4000 cm^{-1} aralığında alındı.

3.3.1.2. FT-IR ile Poli(β-amino ester) Polimer Yapısının Karakterizasyonu

Poli(β-amino ester) polimerinin sentezinin başarılı olup olmadığını saptamak ve polimerin yapısal özelliklerini incelemek amacıyla FT-IR spektroskopisi çalışmaları yapılmıştır. Poli(β-amino ester) polimerinin FT-IR spektrumları KBr içerisinde 1/200 oranında seyreltilerek FT-IR cihazında (Digilab Excalibur-FTS 3000 MX) 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında alınmıştır.

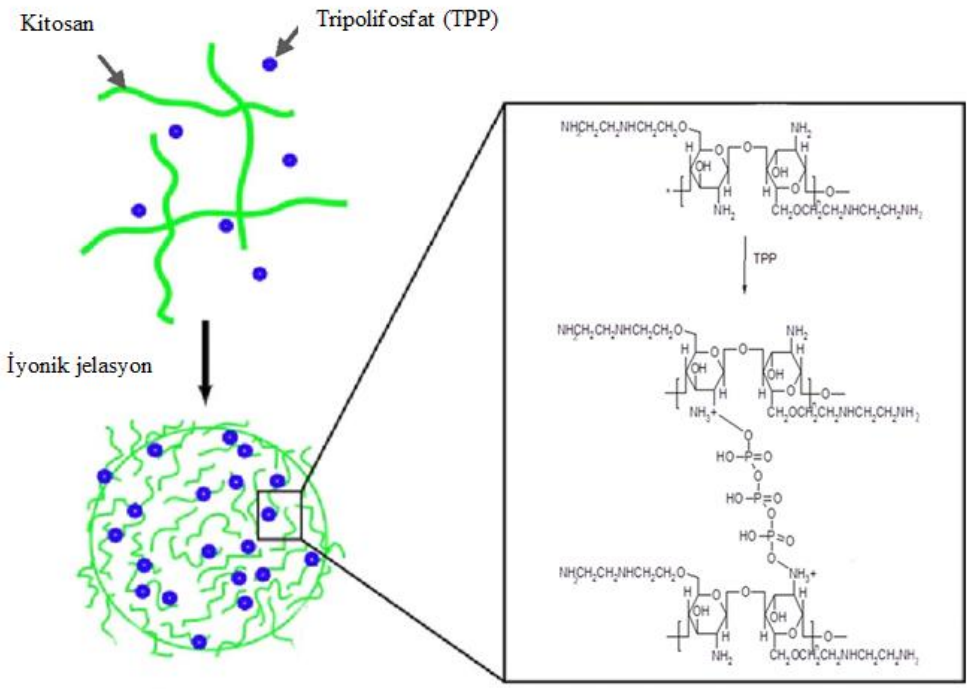
3.3.2. Proton Nükleer Magnetik Resonans (^{1}H-NMR) Spektroskopisi ile Polimer Yapılarının Karakterizasyonu

Amin-kitosan, Amin-tiyol-kitosan ve poli(β-amino ester) polimerlerinin yapıları ^{1}H-NMR spektroskopisi ile incelenmiştir. Amin-kitosan ve Amin-tiyol-kitosan polimerlerinin %1'lik asetik asit çözeltisi içinde, poli(β-amino ester) polimerinin ise dimetil sülfoksit (DMSO) içinde ^{1}H-NMR Spektroskopisi analizleri (Varian UNITY INOVA 500 MHz, 25°C) yapılmıştır.

3.4. Nanopartikül Formülasyonların Hazırlanmasında Önformülasyon Çalışmaları

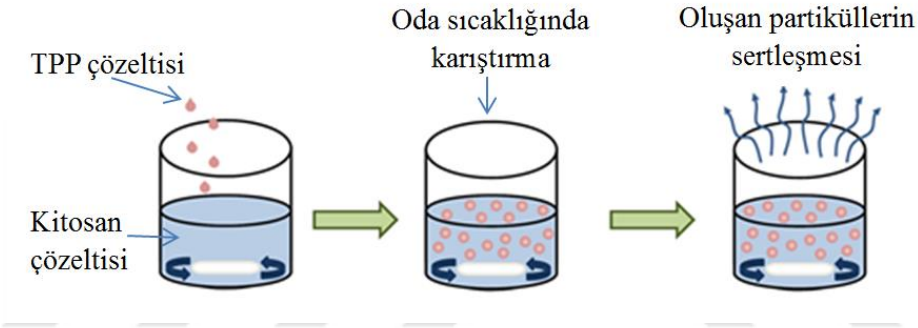
3.4.1. İyonotropik Jelasyon Yöntemi ile Farklı Çözücü Ortamında Aminlenmiş Kitosan Polimeri ile Boş Nanopartiküllerin Hazırlanması

Amin-kitosan polimeri ile iyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak farklı çözücü ortamlarında (distile su, %0,9 NaCl çözeltisi ve fosfat tamponu (pH 7,4)) nanopartiküller hazırlandı. Polikatyon yapısındaki amin-kitosan polimeri ile bir anyonik oligomerik çapraz bağlayıcı olan tripolifosfat (TPP) arasında gelişen iyonotropik jelasyon ile amin-kitosan polimerinin ana yapısında bulunan amin grupları çapraz bağlanır ve kolloidal bir sistem oluşturur. Şekil 3-5'te iyonotropik jelasyon yöntemi ile amin-kitosan polimerinin amin gruplarının tripolifosfat ile çapraz bağlanması ve nanopartiküllerin oluşumu şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3-5: İyonik jelasyon yöntemi ile hazırlanan TPP ile amin-kitosan nanopartiküllerinin oluşumunun şematik gösterimi

Amin-kitosan polimerinin %1'lik hidroklorik asit içerisindeki stok çözeltisinden (5 mg/mL) hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki 2 mL amin-kitosan çözeltisine manyetik karıştırıcı üzerinde iken TPP'nin sudaki çözeltisi damla damla ilave edildi. Oluşan nanopartiküllerin sertleşmesi için oda sıcaklığında 2 saat süreyle karıştırmaya devam edildi. Nanopartiküllerin hazırlama yöntemi şematik olarak Şekil 3-6'da gösterilmiştir. Hazırlanan nanopartikül formülasyonları +4±1°C'de saklandı ve 1 ay boyunca partikül boyutu ve dağılımı ölçülerek fiziksel stabiliteleri incelendi.



Şekil 3-6: Modifiye kitosan:TPP nanopartikülleri hazırlamak için kullanılan iyonik jelasyon yönteminin şematik gösterimi

Tablo 3-1'de, amin-kitosan:TPP nanopartiküllerinin iyonik jelasyon yöntemi ile hazırlanmasında kullanılan optimizasyon parametreleri verilmiştir. Amin-kitosan polimeri kullanılarak hazırlanan boş partikül formülasyonları AKS-B şeklinde ifade edilmiştir.

Tablo 3-1: Amin-kitosan nanopartiküllerin hazırlanmasında distile su, % 0,9 NaCl çözeltisi ve fosfat tamponu (pH 7,4) çözücü ortamında kullanılan optimizasyon parametreleri

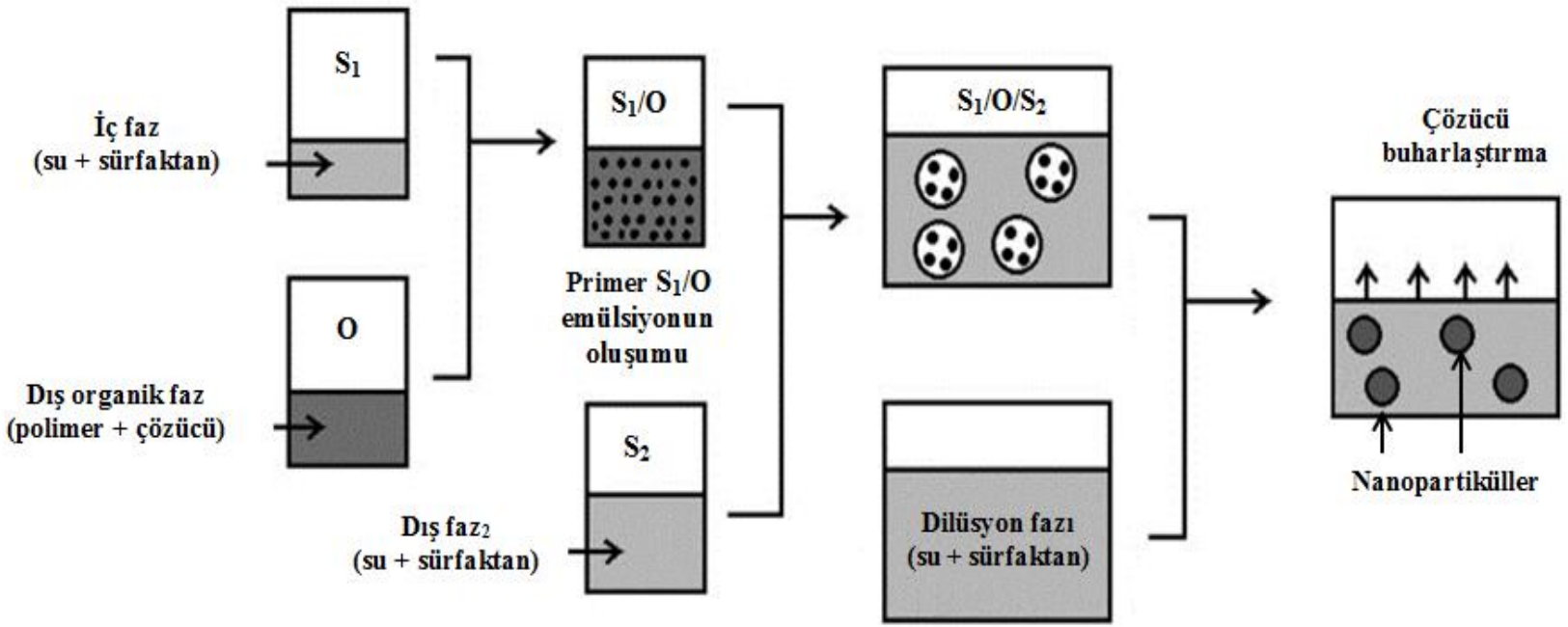
Amin-kitosan:TPP oranı	Amin-kitosan konsantrasyonu	TPP Konsantrasyonu
AKS-B1	1 mg/mL	1 mg/mL
AKS-B2	1 mg/mL	0,5 mg/mL
AKS-B3	1,5 mg/mL	0,5 mg/mL
AKS-B4	2 mg/mL	0,5 mg/mL
AKS-B5	2,5 mg/mL	0,5 mg/mL

3.4.2. İyonotropik Jelasyon Yöntemi ile Farklı Çözücü Ortamında Aminlenmiş ve Tiyollenmiş Kitosan Polimeri ile Boş Nanopartiküllerin Hazırlanması

Aminlenmiş ve tiyollenmiş kitosan polimeri ile iyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak farklı çözücü ortamında (distile su, %0,9 NaCl çözeltisi ve fosfat tamponu (pH 7,4)) nanopartiküller hazırlandı. Nanopartiküller, aminlenmiş kitosan polimerinin yerine aminlenmiş ve tiyollenmiş kitosan polimeri kullanılarak Yöntem 3.4.1.'de belirtilen yönteme göre hazırlandı ve +4±1°C'de 1 ay boyunca fiziksel stabiliteleri incelendi. Amin-tiyol-kitosan polimeri kullanılarak hazırlanan boş partikül formülasyonları ATKS-B şeklinde ifade edilmiştir.

3.4.3. Boş Poli(β-amino ester)-poli(laktik-*ko*-glikolik asit) Nanopartiküllerin Hazırlanması

Pozitif yüklü poli(β-amino ester) (PbAE) ve poli(laktik-*ko*-glikolik asit) (PLGA) polimeri ile çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi kullanılarak boş nanopartiküller hazırlandı. Polimerin molekül ağırlığı, emülsiyonun karıştırma hızı ve süresi gibi faktörlerinin nanopartikül özelliklerine etkisi incelendi. Bu amaçla, farklı molekül ağırlığına sahip PLGA (RG502 ve RG503) polimeri, PbAE polimeri ile birlikte bir organik çözücü içerisinde çözündürüldü ve partiküller çift emülsiyon uçurma yöntemi ile aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlandı. İç fazı oluşturan polivinil alkol (PVA) ün distile su içerisindeki çözeltisi, homojenizatör ile buz banyosunda karıştırılan %20 PbAE ve %80 PLGA polimer karışımının organik çözücü içerisindeki çözeltisine yavaş yavaş ilave edilerek yağ içinde su (S/Y) emülsiyonu hazırlandı. Elde edilen emülsiyon, homojenizatörde karıştırılan PVA çözeltisine ilave edilerek S/Y/S tipi emülsiyon oluşturuldu. Oluşan emülsiyon PVA içeren dilüsyon fazı ile seyreltildi. Elde edilen nanopartiküller oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 10 dk karıştırıldıktan kullanılan organik çözücü 100 mBar, 20-50 devir/dk, 25°C'de rota evaporatorda uçuruldu. Tablo 3-2'de çift emülsiyon uçurma yöntemi ile poli(β-amino ester)-poli(laktik-*ko*-glikolik asit) nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan optimizasyon parametreleri verilmiştir. PbAE ve PLGA polimerleri kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonları PbAE-PLGA-B şeklinde ifade edilmiştir. Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan poli (β-amino ester)-poli(laktik-*ko*-glikolik asit) nanopartiküllerinin hazırlama yönteminin şematik gösterimi Şekil 3-7'de gösterilmiştir.



Şekil 3-7: Poli(β-amino ester)-poli(laktik-*ko*-glikolik asit) nanopartiküllerini hazırlamak için kullanılan çift emülsiyon çözücü uçurma yönteminin şematik gösterimi

Tablo 3-2: PbAE-PLGA nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan optimizasyon parametreleri

Formülasyon	Hazırlama Metodu	Polimer Miktarı	İç Faz	Organik Faz	Primer Emülsiyon Karıştırma Hızı ve Süresi	Dış Faz	Çift Emülsiyon Karıştırma Hızı ve Süresi	Dilüsyon Fazı	Dilüsyon Karıştırma Hızı ve Süresi
PbAE-PLGA-B1	Çift emülsiyon çözücü uçurma	20mg PbAE 80mg RG502	%2,8 PVA 0,5 mL	5 mL DCM	9,500 devir/dk 1,5 dk	% 0,4 PVA 50 mL	9,500 devir/dk 2,5 dk	%0,1 PVA 100 mL	9,500 devir/dk 1,5 dk
PbAE-PLGA-B2	Çift emülsiyon çözücü uçurma	20mg PbAE 80mg RG503	%2,8 PVA 0,5 mL	5 mL DCM	9,500 devir/dk 1,5 dk	% 0,4 PVA 50 mL	9,500 devir/dk 2,5 dk	%0,1 PVA 100 mL	9,500 devir/dk 1,5 dk
PbAE-PLGA-B3	Çift emülsiyon çözücü uçurma	20mg PbAE 80mg RG502	%2,8 PVA 0,5 mL	5 mL DCM	11,000 devir/dk 1,5 dk	% 0,4 PVA 50 mL	9,500 devir/dk 2 dk	%0,1 PVA 100 mL	9,500 devir/dk 1,5 dk

3.5. Sığır Serum Albümini Yüklü Modifiye Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması

3.5.1. İyonotropik Jelasyon Yöntemi ile Sığır Serum Albümini içeren Amin-kitosan:TPP Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Nanopartikül formülasyonlarının optimizasyonunda model protein olarak sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Nanopartiküller 3.4.1.'de verilen yönteme göre distile su ortamında hazırlandı. Nanopartiküllere teorik polimer miktarının %1 i kadar BSA yüklendi. Farklı konsantrasyonda hazırlanan Amin-kitosan çözeltisine manyetik karıştırıcıda BSA içeren TPP çözeltisi damla damla ilave edilerek nanopartiküller hazırlandı. Tablo 3-3'te, iyonik jelasyon yöntemi ile BSA yüklü aminlenmiş kitosan:TPP nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan optimizasyon parametreleri verilmiştir. Amin-kitosan polimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonlar AKS şeklinde ifade edilmiştir.

Tablo 3-3: BSA yüklü amin-kitosan:TPP nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan optimizasyon parametreleri

Amin-kitosan:TPP oranı	Amin-kitosan konsantrasyonu	TPP Konsantrasyonu
AKS-1	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL
AKS-2	1 mg/mL	0,5 mg/mL
AKS-3	1,5 mg/mL	0,5 mg/mL
AKS-4	2 mg/mL	0,5 mg/mL
AKS-5	2,5 mg/mL	0,5 mg/mL
AKS-6	3 mg/mL	0,5 mg/mL
AKS-7	3,5 mg/mL	0,5 mg/mL
AKS-8	4 mg/mL	0,5 mg/mL

3.5.2. İyonotropik Jelasyon Yöntemi ile Sığır Serum Albümini İçeren Amin-tiyol-kitosan:TPP Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Aminlenmiş ve tiyollenmiş kitosan polimeri ile iyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak distile su ortamında BSA yüklü nanopartiküller hazırlandı. Nanopartiküller, aminlenmiş kitosan polimerinin yerine aminlenmiş ve tiyollenmiş kitosan polimeri kullanılarak Yöntem 3.4.1.'de belirtilen yönteme göre hazırlandı. Amin-tiyol-kitosan

polimeri kullanılarak hazırlanan BSA yüklü partikül formülasyonları ATKS şeklinde ifade edilmiştir.

3.5.3. Çift Emülsiyon Çözücü Uçurma Yöntemi ile Sığır Serum Albümini İçeren Poli(β-amino ester)-poli(laktik-*ko*-glikolik asit) Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Pozitif yüklü poli(β-amino ester) (PbAE) polimeri ile poli(laktik-*ko*-glikolik asit) (PLGA; RG502 ve RG503) polimerleri kullanılarak çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile BSA yüklü nanopartikül formülasyonları 3.4.3.'te anlatıldığı gibi hazırlandı. Model protein BSA, iç faz PVA çözeltisine, toplam polimer miktarının %1'i oranında ilave edildi. PbAE ve PLGA polimerleri kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonları PbAE-PLGA şeklinde ifade edilmiştir. Tablo 3-4'te çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan BSA yüklü PbAE-PLGA nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan optimizasyon parametreleri verilmiştir.

Tablo 3-4: BSA yüklü PbAE-PLGA nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan optimizasyon parametreleri

Formülasyon	Hazırlama Metodu	Polimer Miktarı	İç Faz	Organik Faz ve Miktarı	Primer Emülsiyon Karıştırma Hızı ve Süresi	Dış Faz	Çift Emülsiyon Karıştırma Hızı ve Süresi	Dilüsyon Fazı	Dilüsyon Karıştırma Hızı ve Süresi
PbAE-PLGA-1	Çift emülsiyon çözücü uçurma	20mg PbAE 80mg RG502	%2,8 PVA 0,5mL 1 mg BSA	5 mL DCM	9.500 devir/dk 1,5 dk	% 0,4 PVA 50mL	9.500 devir/dk 2,5 dk	%0,1 PVA 100mL	9.500 devir/dk 1,5 dk
PbAE-PLGA-2	Çift emülsiyon çözücü uçurma	20mg PbAE 80mg RG503	%2,8 PVA 0,5mL 1 mg BSA	5 mL DCM	9.500 devir/dk 1,5 dk	% 0,4 PVA 50mL	9.500 devir/dk 2,5 dk	%0,1 PVA 100mL	9.500 devir/dk 1,5 dk

3.6. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu ve dağılımı ile zeta potansiyeli aşağıda belirtildiği şekilde incelendi. Modifiye kitosan polimerleri (amin-kitosan ve tiyol-amin-kitosan) ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarındaki polimer konsantrasyonu ve nanopartikül hazırlama ortamı ile PbAE-PLGA nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan polimerlerin molekül ağırlığı, hazırlama esnasında uygulanan karıştırma hızı ve karıştırma süresi gibi faktörlerin, nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğüne, büyüklük dağılımına, ve zeta potansiyeline etkisi değerlendirildi.

3.6.1. Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı Analizi

Partiküllerin büyüklüğü ve büyüklük dağılımı, foton korelasyon spektroskopisi (PCS) yöntemi kullanılarak Malvern Zetasizer Nano ZS® cihazı ile ölçüldü. Ölçümler 25±0,1ºC'de yapıldı. Her numune için yapılan üç ayrı ölçümün Z-ortalama çapı hesaplandı. Her ölçüm 10 alt ölçümden oluşmaktadır. Formülasyonlara ait verilen değerler üç ayrı numune ölçümlerinin ortalama çap ve standart sapma değerleridir (nm± SS). Veriler PCS v1.52 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

Malvern Zetasizer Nano ZS®, dinamik ışık saçılımı yöntemi ile 2mW helyum-neon lazer ışık (633nm) kaynağından çözelti içerisine gönderilen ışığının, partiküllerin Brown hareketine bağlı saçılan ışığının şiddetinin ve değişiminin ölçülmesine dayanarak partikül boyutu ve dağılımını ölçmektedir. Bu cihaz ile büyüklüğü 0,3 nm - 10 μm arasındaki partiküllerin boyutunu ölçmek mümkündür. Partikül boyutu ortalama partikül büyüklüğü (Z-ortalama) şeklinde ifade edilmektedir.

Polidisperiste indeksi (PI): Partikül büyüklük dağılımını ifade etmektedir. 0,05'ten küçük polidispersite indeksi nadiren ölçülmekte ve genelde monodisperse sistemleri işaret etmektedir. 0,7'den büyük polidispersite değeri ise, partikül büyüklük dağılımının çok geniş olduğu ve büyük olasılıkla dinamik ışık saçılım (DLS) tekniğinin uygun bir yöntem olmadığını göstermektedir.

3.6.2. Zeta Potansiyeli Analizi

Nanopartiküllerin zeta potansiyeli Lazer Doppler mikro-elektroforez tekniği kullanılarak Malvern Zetasizer Nano ZS® cihazı ile ölçüldü. Nanopartiküllerin zeta potansiyelini ölçmek için numune kapiler hücreye konuldu. Her numune için yapılan üç ayrı ölçümün zeta potansiyeli hesaplandı. Her ölçüm 10 alt ölçümden oluşmaktadır. Üç numune için yapılan ölçümlerin ortalama değerleri ve standart sapmaları hesaplandı. Veriler PCS v1.52 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

Zıt yüklü iki elektrodun oluşturduğu elektriksel alanda partiküller belli bir hızda hareket etmektedir. Elektroforetik ışık saçılımı yöntemi ile partiküllerin elektroforetik hareketine bağlı ölçülen frekans kaymaları Smoluchouski yaklaşımı kullanılarak zeta potansiyeli değerine çevrilmektedir. Zeta potansiyeli hem partikülün yüzey yapısından hem de bulunduğu ortamın içeriğinden etkilenmektedir. Zeta potansiyel, partiküller arasındaki itme veya çekme değeri ölçümüdür ve kolloidal sistemin stabilitesi için önemli bir parametredir.

3.6.3. Nanopartikül Formülasyonların Fiziksel Stabilitesinin İncelenmesi

Yöntem 3.5.1.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan amin-kitosan:TPP ve Yöntem 3.5.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan amin-tiyol-kitosan:TPP nanopartikül formülasyonlarının fiziksel stabilitesi, buzdolabı (+4±1°C) ve oda sıcaklığı (+25ºC±5ºC) nda saklanan partiküllerin 12 ay boyunca partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyeli ölçülerek değerlendirildi. Yöntem 3.5.3.'te anlatıldığı şekilde hazırlanan PbAE-PLGA nanopartiküllerinin 12 aylık fiziksel stabilitesi ise +4±1°C'de saklanarak değerlendirildi. Formülasyonlara ait değerler üç ayrı numunenin ortalama değerleridir. Her bir numune için ise 3'er ölçüm yapılmıştır.

3.6.4. Santrifüj İşleminin PbAE-PLGA Nanopartiküllerinin Fiziksel Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi

Santrifüj işleminin Yöntem 3.4.3 ve Yöntem 3.5.3'te anlatıldığı şekilde hazırlanan boş ve BSA yüklü PbAE-PLGA nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına etkisi incelendi. Hazırlandıktan sonra partiküller +4±1°C 9 500 devir/dk 10 dk santifüj edildikten sonra distile suda disperse edildi. Formülasyonlara ait değerler üç ayrı numunenin ortalama değerleridir. Her bir numune için ise 3'er ölçüm yapılmıştır.

3.6.5. Boş ve BSA Yüklü Amin-kitosan:TPP ve Amin-tiyol-kitosan:TPP Nanopartiküllerinin Veriminin Tayin Edilmesi

Boş ve BSA yüklü nanopartikül formülasyonları hazırlandıktan sonra ependorf tüpte 2 saat 15 000 devir/dk'da santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üstteki çözelti uzaklaştırıldı ve çöken partiküller distile su ile yıkandıktan sonra tekrar aynı süre ve devirde santrifüj edildi. Çöken partiküller ayırıldıktan sonra liyofilize edildi. Elde edilen liyofilize partikül miktarı hassas terazide tartılarak amin-kitosan:TPP ve amin-tiyol-kitosan:TPP nanopartiküllerinin verimi hesaplandı. Nanopartikül üretim verimi, nanopartikül hazırlanma esnasında kullanılan toplam madde miktarı ile liyofilizasyon işleminin sonunda tartılan nanopartikül miktarı arasındaki farktan hesaplandı ve toplam madde miktarının yüzdesi olarak verildi. Değerler 3 ayrı üretim serisine ait analizin ortalaması olarak verildi.

3.6.6. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Nanopartiküllerin Morfolojik Olarak İncelenmesi

Amin-kitosan:TPP, amin-tiyol-kitosan:TPP ve PbAE-PLGA nanopartiküllerinin morfolojik özelliklerini incelemek amacıyla taramalı elektron mikroskobu (FEI, Quanto 450 FEG, USA) ile 5,00; 10,00 ve 20,00 kV gerilim altında ve farklı büyütme oranlarında (x5000, x10000, x20000, x40000, x50000, x100000) Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) fotoğrafları çekildi.

3.7. Nanopartiküllerin Protein Enkapsülasyon Etkinliğinin İncelenmesi

Nanopartiküllerin protein enkapsülasyon etkinliği nanopartikül hazırlanma esnasında kullanılan toplam protein miktarı ve santrifüj sonrası sıvı fazda (süpernatant) ölçülen enkapsüle olmayan protein arasındaki farktan hesaplanmıştır. Değerler 3 ayrı formülasyona ait analizlerin sonuçlarıdır ve boş nanopartiküller kontrol olarak kullanılmıştır. Nanopartiküllerde enkapsüle olan BSA miktarı Denklem 3-1'e göre hesaplanmıştır.

$$\textbf{\textit{Enkapsülasyon Etkinliği}}\ (\%) = \frac{\textit{Toplam protein miktarı} - \textit{Serbest protein mikarı}}{\textit{Toplam protein miktarı}}\ \boldsymbol{x\ 100} \qquad \textbf{(3-1)}$$

3.7.1. Modifiye Kitosan:TPP Nanopartiküllerinde Protein Enkapsülasyon Etkinliğinin İncelenmesi

Hazırlanan modifiye kitosan:TPP nanopartiküllerinde enkapsüle edilen BSA miktarı Bradford yöntemi ile tayin edildi (Gan ve Wang 2007). Hazırlanan nanopartiküller +4ºC'de 15 000 devir/dak da 2 saat santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan berrak çözelti de serbest protein miktarı tayin edildi ve hesaplama ile partiküllere yüklenen BSA miktarı hesaplandı. Boş modifiye kitosan:TPP nanopartikülleri konrol grubu olarak kullanıldı. Sonuçlar 3 ayrı örneğin ortalaması ± standart sapma şeklinde verilmiştir.

Yöntemin güvenilirliğini saptamak üzere analitik yöntem validasyon çalışması yapılmıştır.

Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

BSA tayini kullanılan Bradford yöntemi, Coomasie brillant blue G (parlak mavisi) nin farklı konsantrasyonlardaki proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek farklı şiddetlerde mavi renk oluşturması ve oluşan rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

Bradford yöntemi, modifiye kitosan:TPP nanopartiküllerinde enkapsüle olan protein miktarını belirlemek için kullanıldı. Ölçümler spektrofotometrik yöntem (Shimadzu, UV-VIS, Japan) kullanılarak maksimum absorbans değeri 595 nm dalga boyunda protokolde kayıtlı olan talimatlar uygulanarak yapıldı (Sigma-Aldrich, Bradford testi ürün protokolü).

3.7.1.1. Bradford Yöntemi için Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, bir test yönteminin beklenen sonuçları her zaman kesin ve doğru verdiğinin kanıtlanması işlemidir (ICH Topic Q2 (R1) 1995). Modifiye kitosan:TPP nanopartiküllerine enkapsüle edilen protein miktarının tayini için kullanılan analitik yöntemin validasyonu için, doğrusallık (linearity), doğruluk (accuracy), kesinlik (precision), seçicilik (specificity), teşhis limiti (detection limit) ve miktar tayini limiti (quantitation limit) parametreleri literatüre göre çalışıldı (ICH Harmonised Tripartite Guideline 1995).

3.7.1.2. Doğrusallık

Analitik yöntemin doğrusallığı, çok iyi tanımlanmış belirli bir konsantrasyon aralığında elde edilen bulguların, örnek çözeltisi içindeki madde konsantrasyonu ile doğru orantılı olmasıdır (ICH Topic Q2 (R1) 1995). Miktar tayini yönteminin doğrusallığı, madde konsantrasyonu belli en az beş standart örneğin değerlendirilmesi ile sağlanmaktadır.

Bradford Testi İçin Standart Eğrinin Hazırlanması

Miktar tayini yönteminin doğrusallığı için, BSA nın % 0,9 NaCl içinde ki 1 mg/mL konsantrasyonda BSA içeren stok çözeltisinden 100 µL alındı ve balon jojede distile su ile hacmi 2 mL ye tamamlandı. 50 µg/mL konsantrasyonda BSA içeren bu ara stoktan sırasıyla 10 µL, 25 µL, 50 µL, 75 µL ve 100 µL alındı ve her birinin hacmi distile su ile 0,5 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan 5 farklı konsantrasyondaki (1; 2,5;, 5; 7,5; 10 µg/mL) standart çözeltilerine üretici firmanın protokolünde kayıtlı yönteme uygun hacimde Bradford reaktifi eklendi ve oluşan rengin sabitlenmesi için 10 dk bekletildikten sonra numunelerin absorbansları spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçüldü. Konsantrasyona karşı 3 ayrı numunenin 3 ayrı ölçüm ile elde edilen absorbans değerleri işaretlenerek standart eğri çizildi. Doğru denklemi, determinasyon katsayısı (r^2), standart sapma (SS) ve relatif standart sapma (% RSS) değerleri hesaplandı.

3.7.1.3. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğu, yöntemi kullanarak elde edilen değerlerin gerçek değere yakınlığını ifade etmektedir.

Miktar tayini yönteminin doğrusallığı için, BSA'nın % 0,9 NaCl içinde ki 1 mg/mL konsantrasyonda BSA içeren stok çözeltisinden 100 µL alındı ve balon jojede distile su ile hacmi 2 mL ye tamamlandı. 50 µg/mL konsantrasyonda BSA içeren bu ara stoktan sırasıyla 25 µL, 50 µL ve 100 µL alındı ve her birinin hacmi distile su ile 0,5 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan farklı konsantrasyondaki (2,5; 5; 10 µg/mL) numunelerin üzerine üretici firmanın protokolünde kayıtlı yönteme uygun hacimde Bradford reaktifi ilave edildi ve oluşan rengin sabitlenmesi için 10 dk bekletildi. UV spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçüm sonrasında elde edilen absorbans değerlerinden Yöntem 3.7.1.2.'deki

doğru denklemi yardımıyla çözeltilerdeki BSA konsantrasyonu hesaplandı. Yöntemin doğruluğu geri kazanma değerleri hesaplanarak saptandı.

3.7.1.4. Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği belirli çalışma koşullarında tekrarlanan ölçümlerle elde edilen sonuçların birbirine yakınlığını ifade eder. Bağımsız analiz sonuçları arasındaki tutarlılığı gösterir. Yöntem kesinliği standart sapma (SS) veya bağıl standart sapma (%RSS) şeklinde gösterilir.

Bradford ile analitik yöntemin kesinliğinin tayini için Yöntem 3.7.1.2.'de belirtilen konsantrasyonda çözelti hazırlandı ve aşağıda belirtildiği şekilde çalışıldı.

Gün içi kesinlik: Bradford reaktifi ile reaksiyona girmiş 3 farklı konsantrasyonda ki (2,5 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL) BSA çözeltisi oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra 595 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede absorbansları ölçüldü. Konsantrasyon hesaplanmasında 3 ölçüm sonunda elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması kullanıldı. Doğru denklemi kullanılarak BSA miktarı, sonuçların ortalamaları ve SS ve % RSS değerleri hesaplandı.

Günler arası kesinlik: Bir gün içinde yapılan kesinlik çalışmaları aynı şekilde 2. ve 3. günlerde de tekrarlandı. Birinci, ikinci ve üçüncü günlerde elde edilen sonuçların ortalamaları, SS ve % RSS değerleri hesaplandı.

3.7.1.5. Seçicilik

Seçicilik, bir analitik yöntemde aranan analitin numundeki diğer maddelerin varlığında ayırt edebilme yeteneğine denir ve miktar tayini için analitik yönteminin uygunluğunu gösterir. Analitik yöntemin seçiciliğini belirlemek için, aranan analitin bulunduğu numunedeki diğer maddelerin analit ile girişim yapıp yapmadığı incelenir.

Hazırlanan modifiye kitosan nanopartiküllerinde enkapsüle olan BSA için miktar tayini yönteminin seçiciliği belirlemek amacıyla, BSA'nın distile su içerisinde 5 µg/mL konsantrasyonda ki çözeltisi hazırlandı ve doğruluk çalışmasında anlatıldığı şekilde çalışılarak BSA'ya ait piklerin nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan modifiye polimerlere ait pikler ile girişim yapıp yapmadığı saptandı. Bunun için, BSA yüklenmeyen nanopartikül formülasyonları hazırlandı, 595 nm dalga boyunda absorbansları

ölçüldü ve boş nanopartikül formülasyonlarının bu dalga boyunda absorbans gösterip göstermediği tespit edildi.

3.7.1.6. Teşhis Limiti ve Miktar Tayini Limiti

Analitik yöntemin teşhis limiti (TL), minimum tayin edilebilir örnek miktarını ifade etmektedir. Miktar tayini limiti (MTL) ise, bir analitik yöntemin doğruluğu ve kesinliği kullanılarak tayin edilen analitin en düşük miktarıdır. TL ve MTL tayini için, kalibrasyon doğrusunun eğimi veya kesişim noktasının (en az 3 doğruya ait) standart sapmaları (δ) kullanılmaktadır (ICH Tripartite Guideline 1995). Bu amaçla, hesaplanan 3 adet kalibrasyon doğrusunun eğimlerine ait δ değerleri aşağıdaki formüllere yerleştirildi (3-2 ve 3-3), TL ve miktar tayini limiti (MTL) hesaplandı.

$$\mathbf{TL} = \frac{\mathbf{3.3\delta}}{\mathbf{S}} \qquad \mathbf{(3\text{-}2)}$$

$$\mathbf{MTL} = \frac{\mathbf{10\delta}}{\mathbf{S}} \qquad \mathbf{(3\text{-}3)}$$

S = Ortalama kalibrasyon doğrusu eğimi

δ= kalibrasyon doğrusunun eğimine ait standart sapma değeri

3.7.2. PbAE-PLGA Nanopartiküllerin Protein Enkapsülasyon Etkinliğinin İncelenmesi:

PbAE-PLGA nanopartiküllerde enkapsüle edilen BSA miktarının tayininde, literatürde kayıtlı (Gutierro ve ark. 2002) UV spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlardan organik çözücü rota evaporatörde 150 mBa 25ºC'de 45 dk süresince uçuruldu. Ardından numune 9 500 devir/dk da 4ºC'de 2 saat santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstteki berrak çözeltide kalan ve enkapsüle olmayan serbest protein miktarı, spektrofotometrik olarak bikinkoninik asit yöntemi ile tayin edildi. Sonuçlar üç ayrı numunenin ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

Bikinkoninik Asit Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Bikinkoninik asit (BCA) yöntemi peptit bağlarının bakır ile kompleks oluşturma esasına dayanır ve reaktif olarak BCA kullanılır. Bu yöntem, alkali çözeltideki proteinlerin Cu^{+2} ile kompleks oluşturması sonucunda Cu^{+1} iyonunu indirgemesi ve daha sonra indirgenmiş Cu^{+1} iyonlarının BCA ile verdiği renkli kompleksin maksimum absorbans gösterdiği 562 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanır. Renk yeşilden koyu mora dönüşür. Oluşan rengin şiddeti protein yoğunluğu ile orantılıdır. BCA reaktifi bakır iyonu ile oldukça spesifik bağlar oluşturabildiğinden bu yöntemde girişimler azdır. Bu nedenle, diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında BCA yönteminin, protein miktarı tayin edilecek çözeltide yüzey aktif madde varlığında dahi kullanılması uygundur. BCA yöntemi PbAE-PLGA nanopartiküllerde enkapsüle olan protein miktarını belirlemek için kullanıldı. Ölçümler spektrofotometrik yöntem kullanılarak 562 nm dalga boyunda protokolde kayıtlı olan talimatlar uygulanarak yapıldı (QuantiPro™ BCA Assay Kit ürün protokolü, Sigma-Aldrich).

3.7.2.1. Bikinkoninik Asit Yöntemi için Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Bikinkoninik asit yönteminin validasyonunda, Yöntem 3.7.1.1.'de bahsedilen validasyon parametreleri çalışıldı.

3.7.2.2. Doğrusallık

PbAE-PLGA nanopartiküllerinde enkapsüle edilen BSA'nın miktar tayini yönteminin doğrusallığı,Yöntem 3.7.1.2'de bahsedilen prensiplere göre çalışıldı.

Bikinkoninik Asit Testi İçin Standart Eğrinin Hazırlanması

Miktar tayini yönteminin doğrusallığı için, BSA nın % 0,9 NaCl içinde ki 1 mg/mL konsantrasyonda BSA içeren stok çözeltisinden 100 µL alındı ve balon jojede distile su ile hacmi 2 mL ye tamamlandı. 50 µg/mL konsantrasyonda BSA içeren bu ara stoktan sırasıyla 5 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL ve 300 µL alındı ve her birinin hacmi distile su ile 0,5 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan 5 farklı konsantrasyondaki (0,5; 5; 10; 20; 30 µg/mL) standart çözeltilerine üretici firmanın protokolünde kayıtlı olan QuantiPro BCA yöntemine uygun QA, QB ve QC reakiflerinden hazırlanan BCA reaktifi eklendi ve oluşan rengin

sabitlenmesi için 37ºC'de 2 saat bekletildikten sonra absorbansları spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda ölçüldü. Konsantrasyona karşı 3 ayrı numunenin 3 ayrı ölçüm ile elde edilen absorbans değerleri işaretlenerek standart eğri çizildi. Doğru denklemi, determinasyon katsayısı (r^2), standart sapma (SS) ve relatif standart sapma (% RSS) değerleri hesaplandı.

3.7.2.3. Doğruluk

Bikinkoninik asit yöntemin doğruluğunu saptamak için, BSA'nın % 0,9 NaCl içinde ki 1 mg/mL konsantrasyonda BSA içeren stok çözeltisinden 100 µL alındı ve balon jojede distile su ile hacmi 2 mL'ye tamamlandı. 50 µg/mL konsantrasyonda BSA içeren bu ara stoktan sırasıyla 50 µL, 100 µL ve 300 µL alındı ve her birinin hacmi distile su ile 0,5 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan farklı konsantrasyondaki (5; 10; 30 µg/mL) numunelerin üzerine üretici firmanın protokolüne uygun hazırlanmış 0,5 mL BCA reaktifi ilave edildi ve oluşan rengin sabitlenmesi için 37ºC'de 2 saat bekletildi. UV spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda ölçüm sonrasında elde edilen absorbans değerlerinden Yöntem 3.7.2.2.'deki doğru denklemi yardımıyla çözeltilerdeki BSA konsantrasyonu hesaplandı. Yöntemin doğruluğu geri kazanma değerleri hesaplanarak saptandı.

3.7.2.4. Kesinlik

Bikinkoninik asit yönteminin kesinliğinin tayini için yöntem 3.7.2.3.'de belirtilen konsantrasyonlarda stok çözelti hazırlandı ve aşağıda belirtildiği şekilde çalışıldı.

Gün içi kesinlik: BCA reaktifi ile reaksiyona girmiş 3 farklı konsantrasyonda ki (5; 10; 30 µg/mL) BSA çözeltisi 37ºC'de 2 saat bekletildikten sonra oda sıcaklığına getirildi ve UV spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Konsantrasyon hesaplanmasında 3 ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması kullanıldı. Doğru denklemi kullanılarak BSA miktarı, sonuçların ortalamaları, SS ve % RSS değerleri hesaplandı.

Günler arası kesinlik: Bir gün içinde yapılan kesinlik çalışmaları aynı şekilde 2. ve 3. günlerde de tekrarlandı. Birinci, ikinci ve üçüncü günlerde elde edilen sonuçların ortalamaları, SS ve % RSS değerleri hesaplandı.

3.7.2.5. Seçicilik

PbAE-PLGA nanopartiküllerinde enkapsüle edilen BSA'nın miktar tayini yönteminin seçiciliğini belirlemek amacıyla, BSA'nın distile su içerisinde 10 µg/mL konsantrasyonunda ki çözeltisi hazırlandı ve doğruluk çalışmasında anlatıldığı şekilde çalışılarak BSA'ya ait piklerin nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan PbAE ve PLGA polimerlerine ait pikler ile girişim yapıp yapmadığı saptandı. Bunun için, BSA yüklenmeyen nanopartikül formülasyonları hazırlandı, 562 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü ve boş nanopartikül formülasyonlarının bu dalga boyunda absorbans gösterip göstermediği tespit edildi.

3.7.2.6. Teşhis Limiti ve Miktar Tayini Limiti

Yöntem 3.7.1.6'da anlatıldığı şekilde teşhis limiti (TL) ve miktar tayini limiti (MTL) hesaplandı.

3.8. Nanopartiküllere Yüklenen BSA'nın SDS-PAGE Bütünlüğünün İncelenmesi

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi, SDS ve ß-merkaptoetanol gibi denatüre edici maddelerin yardımıyla proteinlerin molekül ağırlıklarına göre poliakrilamid jel üzerinde yürütülerek ayrılmasını ve jel üzerinde tek bant oluşturarak proteinlerin ayırt edilmesini sağlayan bir tekniktir. Nanopartiküllerde enkapsüle edilen BSA'nın bütünlüğüne hazırlama yönteminin etkisini belirlemek amacıyla nanopartikül formülasyonları SDS-PAGE kullanarak test edildi. Bu amaçla, nanopartikül formülasyonları liyofilize edildikten sonra ependorf tüp içinde ki fosfat tamponu (pH 7,4) nda 2 mg/mL konsantrasyon da olacak şekilde disperse edildi ve nanopartikül içindeki proteinin ekstre edilmesi için gece boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Ependorf tüpleri 15 000 devir/dk'da 5 dk santrifüj edildi ve üstteki berrak çözelti alındı.

Örneklerin Hazırlanması:

Amin-kitosan, amin-tiyol-kitosan ve PbAE-PLGA nanopartikül formülasyonlarının yukarıdaki yönteme göre elde edilen süpernatant çözeltilerinden ve standart BSA çözeltisinden (1 mg/mL) 22,5 µL alındı ve 4X'lik yükleme tamponu (Laemli Sample Buffer, Biorad) ile protokole uygun olarak gerekli miktarda karıştırıldıktan sonra protein denatürasyonunu sağlamak amacıyla 95°C'de 5 dk inkübe edildi. Primer yapılarına

dönüşen protein çözeltileri SDS-PAGE hazır jel tabakalarına yüklendi. Jel tabakanın bir kuyucuğuna da standart protein belirteci yüklendi.

Jelin Yürütülmesi

Hazır jel tabakaları elektroforez ünitesinin tankına yerleştirildi. Jel tabakaları yerleştirildikten sonra jeli ihtiva eden tank protokole uygun taze hazırlanan Tris/Glycine/SDS yürütme tamponu (Bio-rad, ABD) ile dolduruldu ve sistem 150 voltta yürütüldü.

Proteinlerin Jel Üzerinde Görünür Hale Getirilmesi / Jelin Boyanması

Protein elektroforezi bittikten sonra jel, sistem üzerinden ve cam plakalar arasından çıkarıldı ve boyama küvetine yerleştirildi. Jel üzerindeki proteinleri boyamak için, jel, metanol:asetik asit:su (45:10:45 h/h) içerisinde ki Coomassie Brillant Blue R-250 (3 g/L) boya çözeltisinde hafifçe çalkalanarak bir gece bekletildi. Jel, yüzeyindeki boyayı uzaklaştırmak için önce birkaç kez metanol:su:asetik asit (25:65:10 h/h) karışımından oluşan yıkama çözeltisinde yıkandı ve daha sonra asetik asit:metanol:su (10:5:85 h/h) karışımında 1 saat bekletildi. Proteinlerin jelde oluşturmuş oldukları bantlar görüntülenerek proteinin SDS-PAGE bütünlüğü incelendi.

3.9. Hücre kültürü

3.9.1. Calu-3 Hücrelerinin Kültürü

Calu-3 hücreleri, iyi tanımlanmış insan bronşiyal adenokarsinom hücreleridir. Solunum yolu hücresi olarak yaygın kullanılmalarının nedeni, bronşiyal epitel hücrelerin özelliklerini göstermeleri, mukus salgılamaları ve sıkı bağlantı noktaları ile tek tabaka oluşturmalarıdır (Foster ve ark. 2000; Macdonald ve ark. 2013).

Calu-3 hücreleri (ATCC®, pasaj no: 3-8) %10 oranında (h/h) fetal sığır serumu (FBS) ve %2 100 U/mL penisilin G ve 100 µg/mL streptomisin içeren temel besi ortamında (EMEM), 37ºC'de, %5 CO_2 ve %95 nem içeren inkübatörde 75 cm^2'lik kültür flaskları içinde çoğaltıldı. Hücrelerin 2-3 günde bir besiyeri değiştirildi; eski besiyeri kültür flasklarından uzaklaştırıldıktan sonra yerine 15 mL yeni besiyeri eklendi ve 37ºC'de, %5 CO_2 ve % 95 nem içeren ortamda inkübe edildi. Hücreler 70-80% doygunluğa ulaştıktan

sonra, kültür flaskındaki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 3 mL steril fosfat tamponu ile (pH 7,4) yıkandı. Bu işlem 2 kere tekrarlandıktan sonra fosfat tamponu uzaklaştırıldı. Hücreleri flasklardan ayırmak için hücre kültür flasklarına 3,5 mL tripsin/EDTA çözeltisi eklendi ve yaklaşık 3 dk 37°C'de, %5 CO_2 ve %95 nem ortamında inkübe edildi. Hücreler kültür flasklarından ayrıldıktan sonra steril falkon tüplere besiyeri içinde alındı ve 11 000 devir/dk'da 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden önce hücre süspansiyonundan 50 µL alınarak hemositometre ile hücre sayımı yapıldı. Santrifüj işleminden sonra, dibe çöken hücrelerden üstte kalan besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler besiyerinde tekrar dağıtılarak 96-kuyucuklu plakalara eşit miktarda ekildi. Her bir kuyucukta hücre doygunluğu %70-80'e ulaşıldığında toksisite testi yapıldı.

3.9.2. A549 Hücrelerinin Kültürü

A549 hücreleri insan akciğer karsinom hücreleridir. Bu hücreler daha çok alveolar epitel hücre özellikleri taşımaktadır (Hasan 2013).

A549 hücreleri (ATCC®, pasaj no: 7-16) %10 oranında (h/h) fetal sığır serumu (FBS) ve %1 100 U/mL penisilin G ve 100 µg/mL streptomisin içeren Dulbecco modifiye Eagle ortamında (DMEM), 37ºC'de, %5 CO_2 ve %95 nem içeren inkübatörde 75 cm^2'lik kültür flaskları içinde çoğaltıldı. Hücrelerin 2-3 günde bir besiyeri değiştirildi; eski besiyeri kültür flasklarından uzaklaştırıldıktan sonra yerine 15 mL yeni besiyeri eklendi ve 37ºC'de, %5 CO_2 ve %95 nem içeren ortamda inkübe edildi. Hücreler 80-90% doygunluğa ulaştıktan sonra kültür flaskındaki besiyeri uzaklaştırıldı ve 3 mL steril fosfat tamponu ile (pH 7,4) yıkama yapıldı. Bu işlem 2 kere tekrarlandı ve işlem sonunda fosfat tamponu uzaklaştırıldı. Hücreleri flasklardan ayırmakiçin hücre kültür flasklarına 3 mL tripsin/EDTA çözeltisi eklendi ve yaklaşık 5 dk 37°C'de, %5 CO_2 ve %95 nem ortamında inkübe edildi. Hücreler kültür flasklarından kaldırıldıktan sonra steril falkon tüplere besiyeri içinde alındı ve 3 000 devir/dk'da 3 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden önce hücre süspansiyonundan 50 µL alınarak hemositometre ile hücre sayımı yapıldı. Santrifüj işleminden sonra, dibe çöken hücrelerden üstteki besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler besiyerinde tekrar dağıtılarak 96-kuyucuklu plakalara eşit miktarda ekildi. Her bir kuyucukta hücre doygunluğu %80-90'a ulaştığında toksisite testi yapıldı.

3.10. Polimerlerin ve Nanopartikül Formülasyonlarının Calu-3 ve A549 Hücre Hatlarında Sitotoksisitelerin İncelenmesi

Sentezlenen polimerlerin ve bu polimerler ile hazırlanan BSA yüklü amin-kitosan, amin-tiyol-kitosan ve poli(β-amino ester)-poli(laktik-*ko*-glikolik asit) nanopartiküllerinin güvenle kullanılıp kullanılamayacağını değerlendirmek amacıyla MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) testi yapıldı.

3.10.1. Sitotoksisite Çalışması

MTT testi indirekt olarak hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan yaygın bir kolorimetrik yöntemdir. Yöntem, hücre içine alınan MTT'nin canlı hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrojenaz enzimi tarafından indirgenmesiyle mor formazon kristallerinin oluşumuna dayanmaktadır (Mosmann 1983; Riss ve ark. 2004). Hücre membranlarından geçmeyen formazon kristalleri sağlıklı hücrelerin içerisinde birikmektedir. Canlı hücrelerde MTT, koyu mavi renkten mor formazon kristallerine dönüştüğü için renk değişimi gözlenmektedir. Yöntemde, canlı hücreler ile orantılı olarak oluşan formazon kristalleri dimetil sülfoksit içerisinde çözülür ve renk değişimi absorbans olarak mikroplaka okuyucua spektrofotometrik yöntem ile ölçülür.

Calu-3 ve A549 hücre hücre hatlarında MTT testi

Steril düz yüzeyli 96-kuyucuklu plaka içerisinde her bir kuyucukta $4x10^5$ hücre (Calu-3) ya da $2x10^4$ hücre (A549) olacak şekilde hücreler ekildi ve 37°C'de, %5 CO_2 ve %95 nem içeren ortamda plakaya yapışması için inkübe edildi. Nanopartiküllerin EMEM besiyerinde (Calu-3) ya da DMEM besiyerinde (A549) 2 mg/mL konsantrasyondaki dispersiyonu hazırlandıktan sonra, her bir kuyucuktaki hücrelerin üzerine 0 mg/mL'den 2 mg/mL konsantrasyonuna kadar (0; 0,05; 0,1; 0,5; 1 ve 2 mg/mL) ilave edildi (n=3). Plakanın 37°C, %5 CO_2 ve %95 nem ortamında 2 saat inkübasyonundan sonra, hücrelerin canlılığı MTT ile incelendi. MTT testi literatürde kayıtlı protokollere uygun yapılmıştır (Grenha ve ark. 2007). Her bir kuyucuğa 50 µL MTT çözeltisi (5mg/mL; pH 7,4 fosfat tamponu içinde) ilave edildi ve plaka 2 saat daha 37°C, %5 CO_2 ve %95 nem ortamında inkübe edildi. Kuyucukların içerisinde oluşan formazon kristallerine zarar vermemek için, plakanın içerisindeki besiyeri dikkatli bir şekilde alındı. Her bir kuyucuğa 200 µL dimetil

sülfoksit (DMSO) ilave edildi ve formazon kristallerinin çözülmesi sağlandı. Plakalar 5 dk 37°C'de inkübe edildi ve her bir kuyucuğun spektrofotometrik olarak 570 nm dalga boyunda absorbansları okundu. Pozitif kontrol olarak sodyum dodesil sülfat çözeltisi kullanıldı. Hücrelerin inkübe edildiği besiyeri negatif kontrol olarak kullanıldı ve hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi. Farklı konsantrasyonlardaki nanopartiküllerin, Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirliğine etkisi % olarak hesaplandı. Sonuçlar, 0-2 mg/mL konsantrasyon aralığında 3 ayrı numunenin ortalaması ± standart sapması şeklinde verilmiştir (3-4).

$$\textbf{Hücre canlılığı}\ (\%) = \frac{\textbf{Abs}_{\text{örnek}}}{\textbf{Abs}_{\text{kontrol}}}\ \boldsymbol{x}\ \mathbf{100} \qquad \textbf{(3-4)}$$

3.11. BSA Yüklü Modifiye Kitosan Nanopartikülleri ile İmmünizasyon Çalışması

3.11.1. Hayvanlar

İn vivo çalışma, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Bakım Ünitesi'nde gerçekleştirildi. Hayvanlar İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi ve deney öncesinde 2 hafta laboratuvar şartlarına adaptasyon için 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüsü sağlanarak, etik ilke ve kurallara uygun şekilde 22°-25°C sıcaklıkta barındırıldı. Çalışmada 25-30 g ağırlığında 6-8 haftalık dişi BALB/c fareler kullanıldı. Fareler, rastgele olarak Tablo 3.5'te gösterildiği şekilde (n=5/grup) 10 gruba ayrıldı. Çalışma süresince deney hayvanlarına herhangi bir kısıtlama uygulanmadı. Deney hayvanları üzerinde yapılan bütün işlemler kayıt altına alındı.

3.11.2. İmmünizasyon Çalışma Protokolü

Yapılan deneyler etik ilke ve kurallara uygun bir şekilde gerçekleştirildi. Farelere serbest BSA veya BSA içeren nanopartikül formülasyonları i.n. ya da s.c. yoldan uygulandı (Tablo 3-5). Uygulanan immünizasyon protokolü şematik olarak Şekil 3-8 de gösterilmiştir.

Tablo 3-5: İmmünizasyon çalışma tasarımı

Gruplar	Fare sayısı	Uygulama yolu	Uygulanan formülasyon
Grup I	5	i.n.	AKS-BSA NP dispersiyonu
Grup II	5		ATKS-BSA NP dispersiyonu
Grup III	5		PbAE-PLGA-BSA NP dispersiyonu
Grup IV	5		BSA
Grup V	5		CpG ODN-BSA dispersiyonu
Grup VI	5	s.c.	AKS-BSA NP dispersiyonu
Grup VII	5		ATKS-BSA NP dispersiyonu
Grup VIII	5		PbAE-PLGA-BSA NP dispersiyonu
Grup IX	5		BSA
Grup X	5		Alum-BSA dispersiyonu
Grup XI	5	kontrol	

*NP: nanopartikül

3.11.1. Numunelerin Toplanması

Serumda oluşan antikor yanıtları değerlendirmek amacı ile Şekil 3-8'de belirtilen günlerde farelerden kan alındı. Mukozal immün yanıtı incelemek için 253. günde farelerde vajinal yıkama yapıldı ve numuneler alındı.

Farelerden kan alınması: Farelerin kuyruk veninden heparinize olmayan kapiler tüpler kullanılarak kan alındı. Kan örnekleri gece boyunca 4°±1C'de pıhtılaşmaya bırakıldı. 15 500 devir/dk'da 5 dk santrifüj edildikten sonra ayrılan serum temiz ependorf tüplere alındı ve analiz edilene kadar -20°C'de saklandı.

Vajinal yıkama işlemi: Vajinal yıkamalardan önce fareler üretan çözeltisi (4 mg/µL) ile uyuşturuldu. %0,05 Tween 20 ve 100 mM fenilmetilsulfonil florür içeren 50 µL fosfat tamponu (pH 7,4) çözeltisi ile 4 kere farelerin vajinası pipet ucu yardımı ile yıkandı. Toplanan vajinal yıkama numuneleri buzdolabında 4±1°C'de 1 gece bekletildi ve hücresel debrisi ayırmak için 15 500 devir/dk'da 5 dk santrifüj edildikten sonra temiz ependorf tüplere alındı ve analiz gününe kadar -20°C'de saklandı.

1. Gün:	Farelere 20 µg serbest BSA ya da 20 µg BSA ya eşdeğer nanopartikül formülasyonları uygulandı. İ.n. ve s.c. uygulama öncesinde fareler, eter ile (100 cm^3'lük cam kavanoza, pamuğa emdirilmiş olarak 30 mL eter) hafif anesteziye alındı. İ.n. uygulama için her bir burun deliğine 10µL, toplam 20 µL mikropipet ucu yardımı ile uygulandı. S.c. uygulamada, 100 µL ense bölgesinde deri altına enjekte edildi.
13. Gün:	Kuyruk veninden kan toplandı (100 µL) => Primer yanıt
14. Gün:	*İn vivo* çalışmanın 1. günü uygulanan formülasyonlar aynı şekilde tekrar dozu olarak uygulandı.
21. Gün:	Kuyruk veninden kan toplandı (100 µL) => Sekonder yanıt
60. Gün	Kuyruk veninden kan toplandı (100 µL) => Sekonder yanıt
253. Gün	Kuyruk veninden kan toplandı (100 µL) => Sekonder yanıt Mukozal vajinal yıkama toplandı => Mukozal yanıt Dalaklar toplandı => Hümoral ve Hücresel immün yanıtı

Şekil 3-8: İmmünizasyon protokolü

3.12. İmmün Cevabın İncelenmesi

3.12.1. Sistemik ve Mukozal Antikorların Analizi

BSA proteinine karşı serumda oluşan IgG, IgG_1 ve IgG_{2a} ile vajinal yıkama çözeltilerindeki sIgA antikor seviyelerini ölçmek için indirekt ELISA testi yapıldı. Çalışmanın protokolü aşağıda verilmiştir.

- 96-kuyucuklu ELISA plakaların her bir kuyucuğuna 100 µL 20 µg/mL BSA içeren pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi ilave edildi ve gece boyunca 4°C'de bekletilerek kuyucuk yüzeyleri antijen ile kaplandı. Bağlanmayan antijeni uzaklaştırmak için ELISA plakaları 3 defa %0,05 (h/h) Tween 20 içeren pH 7,4 fosfat tamponu ile (yıkama çözeltisi) ile yıkandı. Kuyucuklardaki yıkama tamponunu tamamen uzaklaştırmak için plakalar her yıkama sonrasında kağıt havlu üzerinde kurutuldu.
- Yıkama işleminden sonra bağlanmayan protein kısımlarını bloke etmek amacıyla her bir kuyucuğa %2 (a/h) süt tozu içeren 100 µL fosfat tampon çözeltisi (pH 7,4) ilave edildi ve plakalar 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
- Bu sürenin sonunda bloke edici çözelti uzaklaştırıldı ve ELISA plakaları 3 defa yıkama çözeltisi ile yıkandı.
- PBS'te ki serum örnekleri (1/32 dilüsyon) ile vajinal yıkamalar ELISA plaklarına eklendi (50 µl) ve aynı tampon çözeltisi ile ardışık dilüsyon yapılarak bir sonraki kuyucukta 2 kat seyreltildi. Dilüsyon işleminden sonra, plaka 1 saat 37°C'de inkübe edildi.
- Bu sürenin sonunda ELISA plakaları 3 defa yıkama çözeltisi ile yıkandı.
- Keçi antifare immünoglobulinlerin her biri (IgG, IgG_1, IgG_{2a} ya da IgA) fosfat tampon çözeltisinde (pH 7,4) 1:4000 oranında seyreltildikten sonra her bir kuyucuğa 50 µL ilave edildi ve plakalar 1 saat 37°C'de inkübe edildi.
- Plakalar yine 3 defa yıkama çözeltisi ile yıkandı ve 50 µL substrat çözeltisi (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)-diamonyum tuzu) (ABTS)) eklendi. Plakalar aluminyum folyo ile sarıldı ve 37°C'de 30 dk inkübe edildi.
- İnkübasyon süresinin sonunda her bir kuyucuğa 50 µL durdurma çözeltisi ilave edildi ve absorbansları mikroplaka okuyucuda 405 nm'de okundu.

Negatif kontrol olarak herhangi bir protein veya nanopartikül formülasyonu uygulanmamış fare serumu kullanıldı. Negatif kontrol değerine karşı absorbans gösteren en yüksek dilüsyon, antikor titresi olarak kabul edildi.

3.12.2. Primer Dalak Hücrelerinin Kültürü, *in vitro* Ortamda Dalak Hücrelerinin Yeniden Uyarılması ve Antijene Özgü Sitokin Analizleri

3.12.2.1. Primer Dalak Hücrelerinin İzolasyonu

Deney gruplarındaki fareler 253 gün olan çalışma süresi sonunda servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edildi. Dalakları çıkartıldı ve soğuk steril fosfat tampon çözeltisi (pH 7,4) içine konuldu. Aynı protein veya nanopartikül formülasyonu uygulanmış fare gruplarına ait dalaklar birleştirildi.

Primer dalak hücrelerini izole etmek için, dalaklar, 15 mL kültür ortamının (%10 fetal sığır serumu, 2 mM L-glutamin, 100 U/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin içeren RPMI 1640 ortamı) yardımı ile 70 µm por çapında steril hücre süzgecinden geçirilerek falkon tüplere alındı. Falkon tüplerdeki hücre süspansiyonu 200 *g* kuvvetinde 10 dk santrifüj edildi ve üstteki kültür ortamı uzaklaştırıldı. Hücreler 10 mL kültür ortamında süspande edildikten sonra 200 *g* kuvvetinde 10 dk süresince yeniden santrifüj edildi. Bu süre sonunda hücreler 5 mL kültür ortamında tekrar süspande edildikten sonra Tripan mavisi testi ve hemositometre canlı hücre sayımı yapıldı. Canlı hücre sayımından sonra, kültür ortamı ile dilüe edilerek hücre konsantrasyonu $5x10^7$ hücre/mL'ye ayarlandı. Primer hücre süspansiyonları, formülasyonların uygulanması sonucu farelerde oluşan immün cevaba özgün olarak salgılanan sitokinleri incelemek amacıyla kullanıldı.

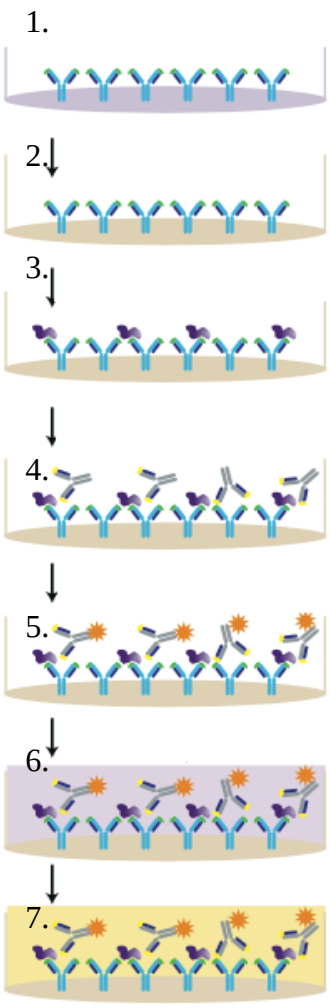
3.12.2.2. Dalak Hücrelerinin *in vitro* Ortamda Model Antijen ile Yeniden Uyarılması

Dalak hücrelerinin *in vitro* ortamda model antijen ile yeniden uyarılması sonucunda oluşan sitokin seviyeleri direkt ELISA testi ile değerlendirildi. Yöntem 3.12.2.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanan her hücre süspansiyonundan 100 µL alındı ve steril 96-kuyucuklu plakaya konulduktan sonra her bir kuyucuğa antijenin (BSA) kültür ortamında ki 10 ya da 20 µg/mL konsantrasyonda ki çözeltisinden 100 µL ilave edildi. Plakalar 37°C'de %5 CO_2 ve %95 nem içeren ortamda 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda plaka kuyucuklarından hücre süpernatant çözeltileri alındı, 200 *g*

kuvvetinde 10 dk santrifüj edildi ve analize kadar -80°C'de saklandı. IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 ve INF-γ sitokinlerinin analizi, ELISA MAX^{TM} Deluxe Sets kitleri ile üretici firmanın protokolüne uygun yapıldı. Çalışmada kullanılan ayrıntılı protokol aşağıda verilmiştir. Şekil 3-9'de ELISA testi şematik olarak gösterilmiştir. Sitokin konsantrasyonu, üretici firmanın her sitokin analizi için ayrı sağladığı rekombinant interlökinleri kullanılarak elde edilen standart eğri denkleminden hesaplandı. Analiz edilen sitokine göre dilüsyon oranı ve standart eğrinin konsantrasyon aralığı değişmektedir.

Direkt ELISA Yöntemi ile Sitokin Analizi protokolü:

- 96-kuyucuklu ELISA plakasının kuyucuklarına 100 µL kaplama çözeltisi içerisinde sitokine özgü bağlayıcı antikor konuldu ve plakanın üstü kapatıldıktan sonra gece boyunca 4°C'de bekletildi.
- Plakalar 4 kez 300 µL yıkama çözeltisi ile yıkandı ve her yıkama sonrasında plakalar kağıt havlu üzerinde kurutuldu. Spesifik olmayan bağlanmaları inhibe etmek amacıyla kuyucuklara inhibisyon çözeltisi konuldu ve plakalar oda sıcaklığında 200 devir/dk'da çalkalanarak 1 saat boyunca inkübe edildi.
- Bekletme süresinin sonunda plakalar yukarıda anlatıldığı şekilde 4 kez yıkandı ve her bir kuyucuğa gerekli dilüsyonları yapılmış standart ve örnek numuneleri (100 µl/kuyucuk) ilave edildikten sonra (n=3) plakalar 2 saat boyunca oda sıcaklığında 200 devir/dk'da çalkanarak inkübe edildi.
- Yukarıda anlatılan şekilde yıkama işlemi tekrarlandı ve 100 µL tespit (deteksiyon) antikoru ilave edildikten sonra plakalar 1 saat boyunca yukarıda anlatılan şartlarda inkübe edildi.
- İnkübasyon süresinin sonunda plakalar yukarıda anlatıldığı şekilde tekrar yıkandı ve her bir kuyucuğa 100 µL Avidin-HRP çözeltisi ilave edildikten sonra ve 30 dk inkübasyona bırakıldı.
- Plakalar, son olarak yukarıda anlatıldığı gibi yıkama çözeltisi ile 5 kez yıkandı ve her bir kuyucuğa yeni hazırlanan 100 µL 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine (TMB) substrat çözeltisi ilave edildikten sonra alüminyum folyo ile sarıldı ve 20 dk karanlıkta bekletildi.
- Bu sürenin sonunda her bir kuyucuğa 100 µL durdurma çözeltisi ilave edildi.
- Absorbansı 450 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucu yardımı ile okundu.



1. 96-kuyucuklu ELISA plakası sitokine özgü bağlayıcı antikoru konulur ve gece boyunca 4°C'de bekletilir.
2. Plakalar yıkanır. İnhibisyon çözeltisi konulur ve plakalar oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edilir.
3. Plakalar yıkanır. Gerekli dilüsyonları yapılmış standart ve örnek numuneleri ilave edildikten sonra plakalar çalkanarak inkübe edildi.
4. Plakalar yıkanır. Tespit antikoru ilave edildikten sonra plakalar çalkalanarak inkübe edilir.
5. Plakalar yıkanır. Her kuyucuğa Avidin-HRP çözeltisi ilave edildikten sonra 30 dk inkübasyona bırakılır.
6. Plakalar, son olarak yıkanır. Her kuyucuğa TMB substrat çözeltisi ilave edildikten sonra, plakalar alüminyum folyo ile sarılır ve 20 dk karanlıkta bekletilir.
7. Renk oluşumuna bağlı değişen absorbans 450 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucu yardımı ile okundu.

Şekil 3-9: ELISA testinin şematik gösterimi

3.13. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesinde GraphPad Prism 6 programı kullanıldı. Elde edilen sonuçlara Tek Yönlü Anova testi uygulandı. Yapılan tüm istatistiksel analizlerde $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

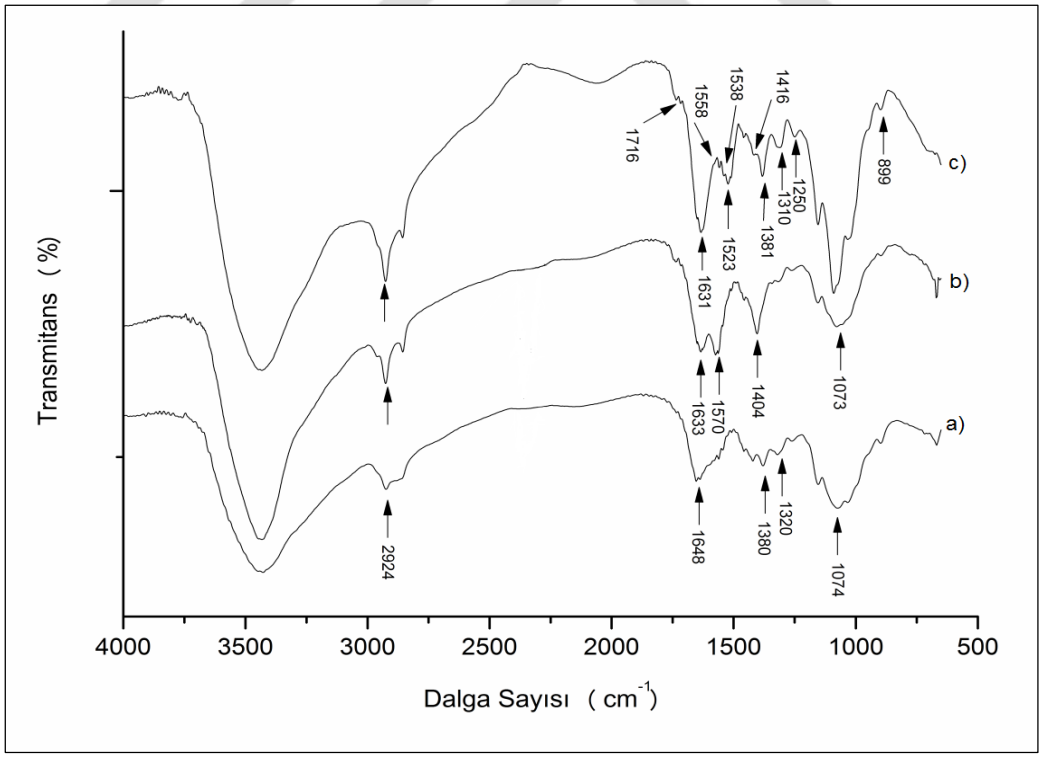
4. BULGULAR

4.1. Polimerlerin Yapılarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular

4.1.1. FT-IR Spektrofotometrisi Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Polimer Yapılarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular

4.1.1.1. FT-IR Spektrofotometrisi Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Amin-kitosan ve Amin-tiyol-kitosan Polimer Yapılarının Analizine Ait Bulgular

Yöntem 3.3.1.1'de anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen kitosan, amin-kitosan ve amin-tiyol kitosan polimerlerine ait FT-IR spektrumları Şekil 4-1'de gösterilmiştir. Kitosan, amin-kitosan ve amin-tiyol-kitosan polimerlerinin FT-IR spektrumunda tespit edilen absorpsiyon bandları sırasıyla, Tablo 4-1, Tablo 4-2 ve Tablo 4-3'te verilmiştir.



Şekil 4-1: a) Kitosan b) Amin-kitosan ve c) Amin-tiyol-kitosan polimerlerine ait FT-IR spektrumları

Tablo 4-1: Kitosan polimerine ait FT-IR spektrumunda tespit edilen absorpsiyon bandları

Absorpsiyon bandı (cm^{-1})	Açıklama
3250 - 3750	NH simetrik gerilme bandı ile üst üste katlanmış -OH gerilme bandı
2924	C-H gerilme bandı
1648	C=O (sekonder amid) gerilme bandı
1400 - 1300 (maksimumları 1380 ve 1320)	metilol grupların bükülme titreşim bandı
1074	-C-O-C- grubuna ait asimetrik gerilme bandı

Tablo 4-2: Amin-kitosan polimerine ait FT-IR spektrumunda tespit edilen absorpsiyon bandları

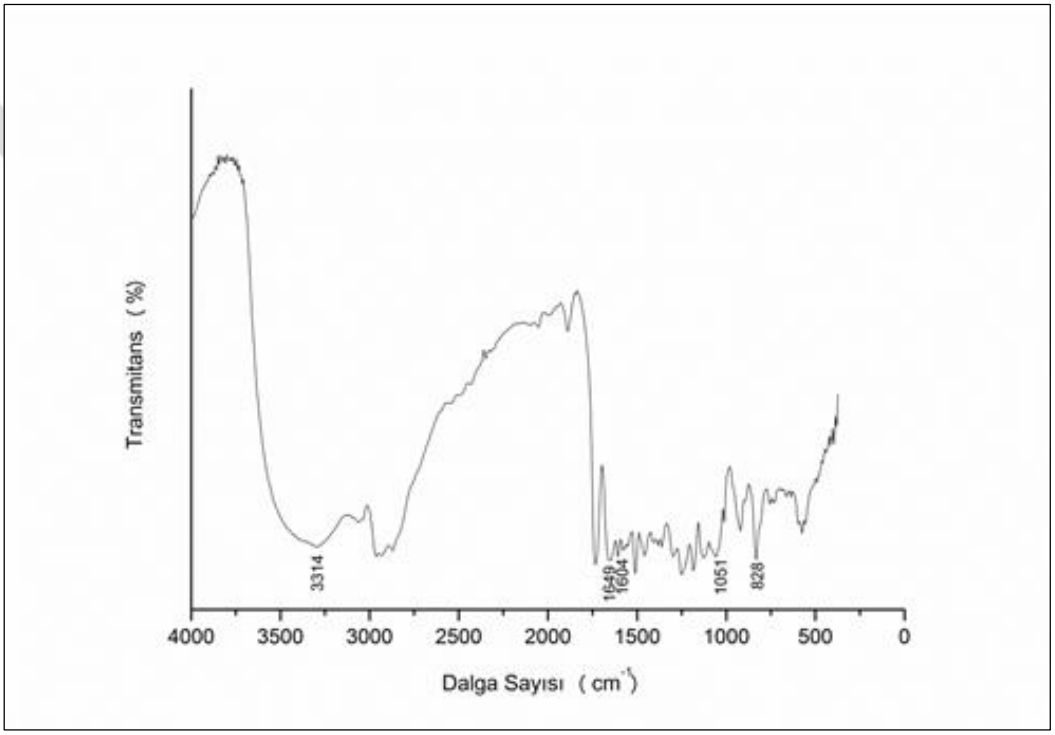
Absorpsiyon bandı (cm^{-1})	Açıklama
1633	C=O (sekonder amid) gerilme bandı
1570	NH bağın (sekonder amin) deformasyon titreşim bandı
1404	alifatik eter yapısındaki -CH_2OCH_2- bağların gerilme bandı
1073	-C-O-C- grubuna ait asimetrik gerilme bandı

Tablo 4-3: Amin-tiyol-kitosan polimerine ait FT-IR spektrumunda tespit edilen absorpsiyon bandları

Absorpsiyon bandı (cm^{-1})	Açıklama
2926	CH_2 bağın asimetrik gerilme titreşim bandı
1716	C=O (amid yapısına ait) gerilme titreşim bandı
1570-1500 (maksimumları 1558, 1538, 1523)	C-N bağların (amid yapısına ait) gerilme titreşim bandı
1631	C=O bağın (amid yapısına ait) gerilme titreşim bandı
1416	CH_2 bağın (CH_2SH grubuna ait) deformasyon titreşim bandı
1381, 1310, 1250	CN ve NH bağların (amid yapısına ait) gerilme ve bükülme titreşim bantları
1250	SH bağın (CH_2SH grubuna ait) deformasyon titreşim bandı
899	serbest SH bağın (CH_2SH grubuna ait) titreşim bandı

4.1.1.2. FT-IR Spektrofotometrisi Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Poli(β-amino ester) Polimer Yapısının Analizine Ait Bulgular

Yöntem 3.3.1.2.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen poli(β-amino ester) polimerine ait FT-IR spektrumu Şekil 4-2'de gösterilmiştir. Poli(β-amino ester) polimerinin FT-IR spektrumunda tespit edilen absorpsiyon bandları Tablo 4-4'de verilmiştir.



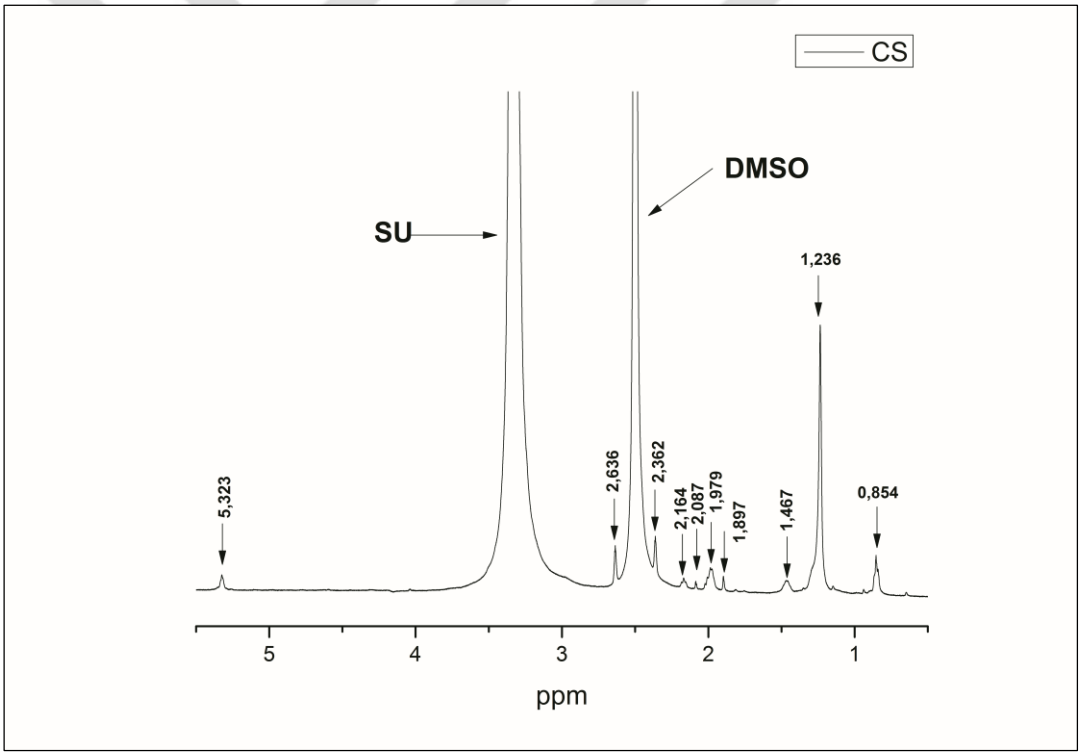
Şekil 4-2: Poli(β-amino ester) polimerine ait FT-IR spektrumu

Tablo 4-4: Poli(β-amino ester) polimerin FT-IR spektrumunda tespit edilen absorpsiyon bandları

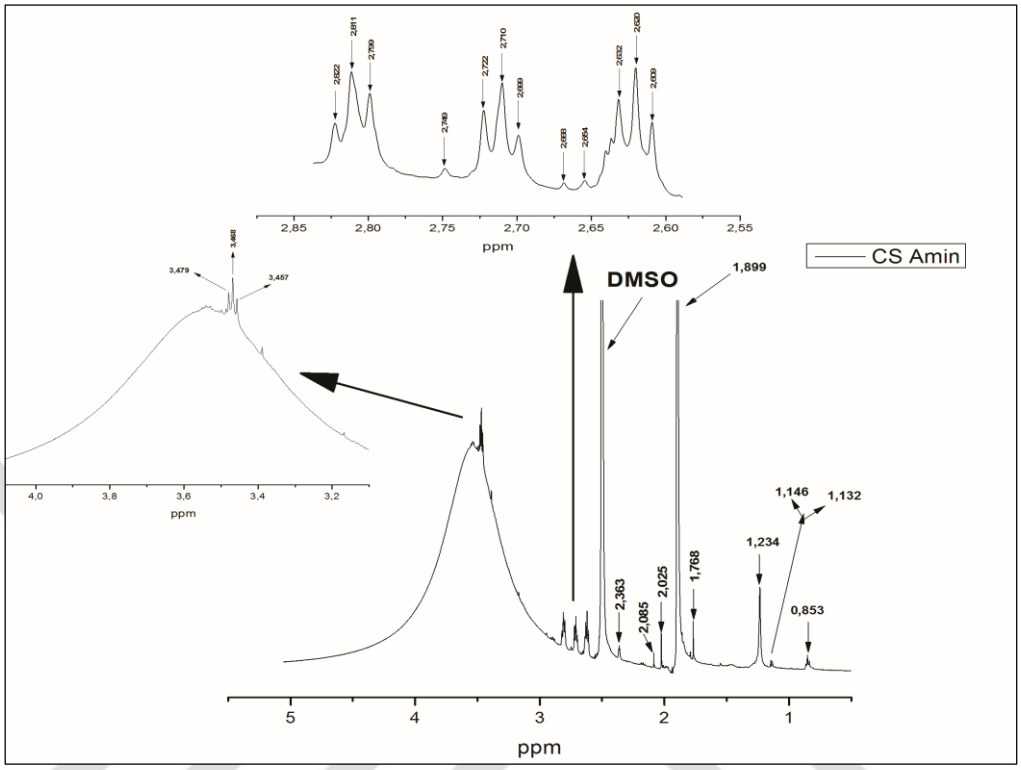
Absorpsiyon bandı (cm^{-1})	Açıklama
3100-3500 cm^{-1}	NH bağın (CH_2-NH-CH_2 sekonder amin yapısına ait) gerilme titreşim bandı

4.1.2. ^{1}H-NMR Spektroskopisi ile Polimer Yapılarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular

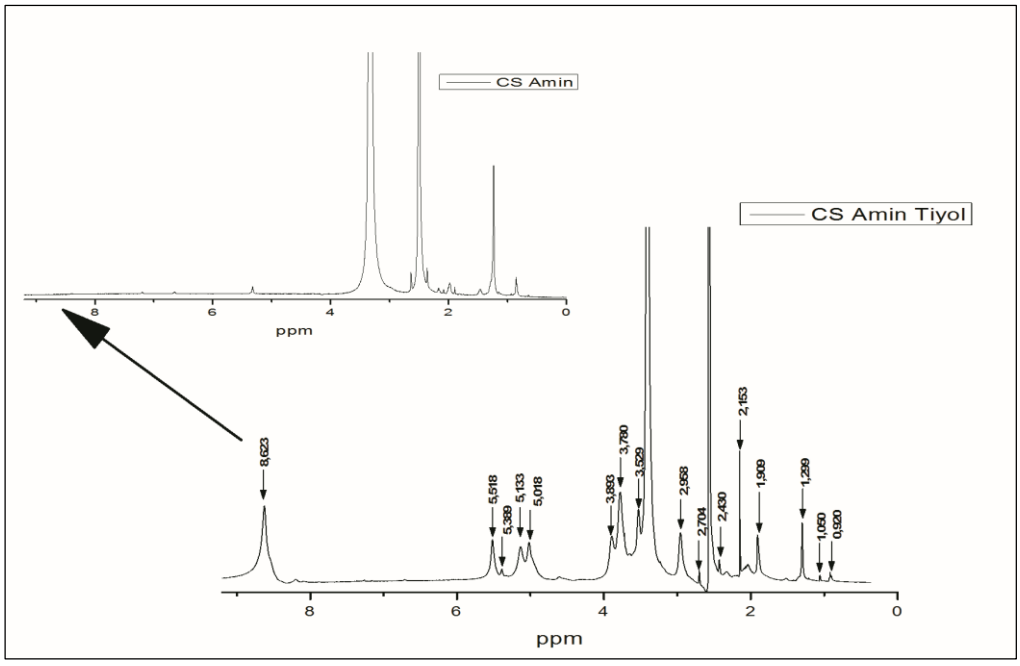
Amin-kitosan, amin-tiyol-kitosan ve poli(β-amino ester) polimerlerinin yapıları proton NMR (^{1}H-NMR) spektroskopisi ile incelenmiştir. Amin-kitosan ile amin-tiyol-kitosan polimerlerinin %1'lik asetik asit çözeltisi içindeki, poli(β-amino ester) polimerinin ise dimetil sülfoksit (DMSO) içindeki çözeltileri hazırlanarak ^{1}H-NMR Spektrumları alınmıştır. Şekil 4-3'te kitosan, Şekil 4-4'te amin-kitosan, Şekil 4-5'te amin-tiyol-kitosan, Şekil 4-6'da poli(β-amino ester) polimerlerine ait elde edilen ^{1}H-NMR spektrumları gösterilmiştir.



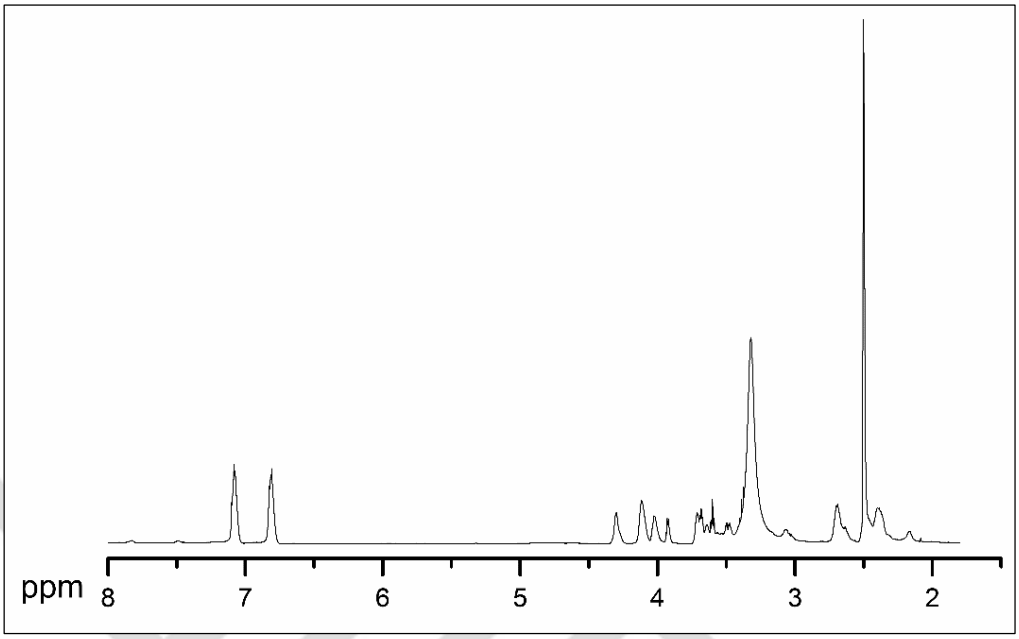
Şekil 4-3: Kitosan polimerine ait ^{1}H-NMR spektrumu



Şekil 4-4: Amin-kitosan polimerine ait ^{1}H-NMR spektrumu



Şekil 4-5: Amin-tiyol-kitosan polimerine ait ^{1}H-NMR spektrumu

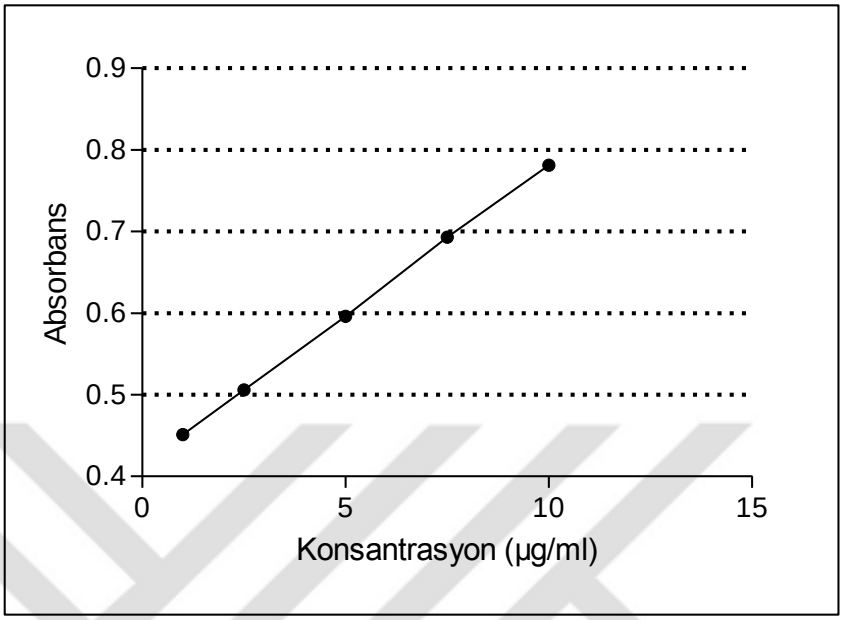


Şekil 4-6: Poli(β-amino ester) polimerine ait ^{1}H-NMR spektrumu

4.2. Bradford Yöntemi ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular

4.2.1. Doğrusallık

BSA'nın Yöntem 3.7.1.2.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4-7'de gösterilmiştir. Doğru denklemi ve determinasyon katsayısı (r^2) ise aşağıda verilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin çizilmesinde kullanılan ortalama absorbanslar, standart sapma (SS) ve relatif standart sapma (%RSS) sonuçları Tablo 4-5'te verilmiştir.



Şekil 4-7: Bradford yöntemi ile elde edilen BSA miktar tayini yöntemine ait kalibrasyon eğrisi grafiği

Bradford yöntemi ile elde edilen BSA miktar tayini yöntemine ait kalibrasyon denklemi ve determinasyon sabiti aşağıda verilmiştir.

$y = 0{,}0368x+0{,}4141$ r^2: 0,9998

y: Absorbans

x: Konsantrasyon (µg/ml)

r^2: Determinasyon katsayısı

Tablo 4-5: BSA'ın Bradford yöntemi ile miktar tayininin doğrusallığına ait bulgular (n=3)

Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama absorbans	SS(±)	RSS(%)
1	0,451	0,009	1,887
2,5	0,506	0,004	0,694
5	0,596	0,012	1,935
7,5	0,693	0,009	1,294
10	0,781	0,003	0,412

4.2.2. Doğruluk

Üç farklı konsantrasyondaki BSA çözeltisinin miktar tayini için, Yöntem 3.7.1.3'te anlatıldığı şekilde çalışılarak yöntemin doğruluğu tespit edildi. Her konsantrasyon için geri kazanma değeri (%), standart sapma (SS) ve relatif standart sapma (% RSS) değeri Tablo 4-6'da verilmiştir.

Tablo 4-6: BSA'ın Bradford yöntemi ile miktar tayini yönteminin doğruluğuna ait bulgular (n=3)

Konsantrasyon (µg/mL)	Geri kazanma	Geri kazanma (%)	SS(±)	RSS(%)
2,5	2,715	108,587	0,004	0,701
5	5,486	109,728	0,006	0,987
10	9,753	97,527	0,003	0,448

4.2.3. Kesinlik

BSA'ın Yöntem 3.7.1.4.'te belirtildiği gibi yapılan miktar tayinine ait gün içi kesinlik bulguları Tablo 4-7'de, günler arası kesinlik bulguları ise Tablo 4-8'de verilmiştir.

Tablo 4-7: BSA'ın Bradford yöntemi ile miktar tayini yönteminin gün içi kesinlik bulguları (n=3)

Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama absorbans	SS(±)	RSS(%)
2,5	0,501	0,006	1,247
5	0,588	0,003	0,450
10	0,748	0,005	0,686

Tablo 4-8: BSA'ın Bradford yöntemi ile miktar tayini yönteminin günler arası kesinlik bulguları (n=3)

Konsantrasyon (µg/mL)	1.gün	2.gün	3.gün	Ortalama absorbans	SS(±)	RSS(%)
2,5	0,510	0,503	0,506	0,506	0,004	0,694
5	0,589	0,585	0,595	0,590	0,005	0,854
10	0,752	0,742	0,746	0,747	0,005	0,674

4.2.4. Seçicilik

Yöntem 3.7.1.5.'te anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar sonucunda, nanopartikül formülasyonunda kullanılan polimerlerin, 595 nm dalga boyunda absorbans göstermediği tespit edildi.

4.2.5. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL)

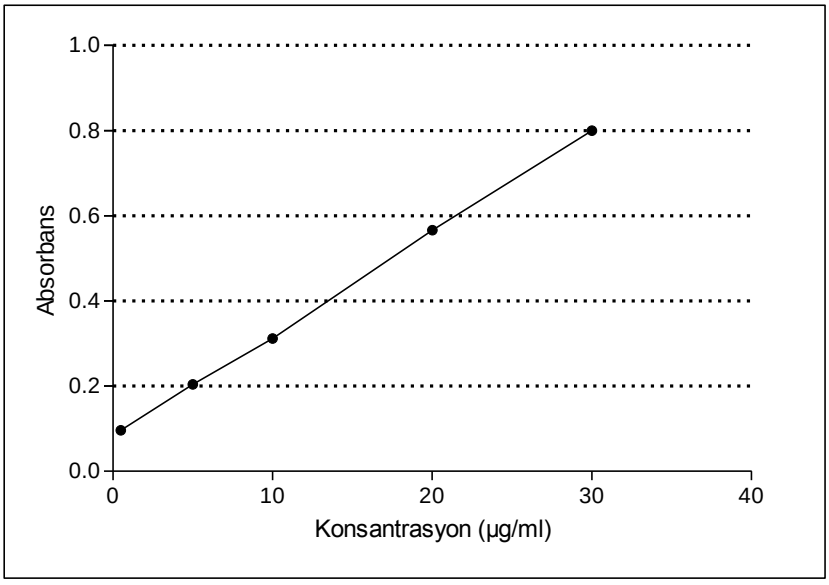
Yöntem 3.7.1.6.'da anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen ölçüm sonuçları ve verilen formüller yardımı ile hesaplanan TL ve MTL değerleri aşağıda verilmiştir.

∂ değeri: 0,0003 TL: 0,0237 µg/mL MTL: 0,0719 µg/mL

4.3. Bikinkoninik Asit Yöntemi ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular

4.3.1. Doğrusallık

BSA'in Yöntem 3.7.2.2.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi grafiği Şekil 4-8'de gösterilmiştir. Doğru denklemi ve determinasyon katsayısı (r^2) aşağıda verilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin çizilmesinde kullanılan ortalama absorbanslar, standart sapma (SS) ve relatif standart sapma (%RSS) sonuçları Tablo 4-9'da verilmiştir.



Şekil 4-8: Bikinkoninik asit yöntemi ile elde edilen BSA'nın kalibrasyon eğrisi grafiği

y = 0,024x-0,0817 r^2: 0,9996

y: Absorbans

x: Konsantrasyon (µg/ml)

r^2: Determinasyon katsayısı

Tablo 4-9: BSA'ın Bikinkoninik asit yöntemi ile miktar tayininin doğrusallığına ait bulgular (n=3)

Konsantrason (µg/mL)	Ortalama absorbans	SS(±)	RSS(%)
0,5	0,096	0,002	1,586
5	0,204	0,004	1,724
10	0,312	0,002	0,668
20	0,566	0,011	1,947
30	0,800	0,009	1,154

4.3.2. Doğruluk

Üç farklı konsantrasyondaki BSA'ın miktar tayini için, Yöntem 3.7.2.3.'te anlatıldığı şekilde çalışılarak yöntemin doğruluğu tespit edildi. Her konsantrasyon için geri kazanma değeri (%), standart sapma (SS) ve relatif standart sapma (% RSS) değeri Tablo 4-10'da verilmiştir.

Tablo 4-10: BSA'ın Bikinkoninik asit yöntemi ile miktar tayini yönteminin doğruluğuna ait bulgular (n=3)

Konsantrasyon (µg/mL)	Geri kazanma	Geri kazanma (%)	SS(±)	RSS(%)
5	4,929	98,583	0,003	1,528
10	10,735	107,347	0,007	1,962
30	30,193	100,644	0,010	1,224

4.3.3. Kesinlik

BSA'ın Yöntem 3.7.2.4.'te belirtildiği gibi yapılan miktar tayini yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları Tablo 4-11, günler arası kesinlik bulguları Tablo 4-12'de verilmiştir.

Tablo 4-11: BSA'ın Bikinkoninik ait yöntemi ile miktar tayini yönteminin gün içi kesinlik bulguları (n=3)

Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama absorbans	SS(±)	RSS(%)
5	0,227	0,004	1,920
10	0,372	0,007	1,980
30	0,693	0,014	1,949

Tablo 4-12: BSA'ın Bikinkoninik ait yöntemi ile miktar tayini yönteminin günler arası kesinlik bulguları (n=3)

Konsantrasyon (µg/mL)	1.gün	2.gün	3.gün	Ortalama absorbans	SS(±)	RSS(%)
5	0,230	0,224	0,225	0,226	0,003	1,420
10	0,375	0,381	0,367	0,374	0,007	1,876
30	0,693	0,717	0,715	0,708	0,013	1,880

4.3.4. Seçicilik

Yöntem 3.7.2.5'te anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar sonucunda, nanopartikül formülasyonunda kullanılan polimerlerin 562 nm dalga boyunda absorbans göstermediği tespit edildi.

4.3.5. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL)

Yöntem 3.7.2.6.'da anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen ölçüm sonuçları ve verilen formüller yardımı ile hesaplanan TL ve MTL değerleri aşağıda verilmiştir.

∂ değeri: 0,0004 TL: 0,0698 µg/mL MTL: 0,2116 µg/mL

4.4. Nanopartikül Önformülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

4.4.1. Boş Amin-kitosan Nanopartiküllerin Optimizasyonuna Ait Bulgular

4.4.1.1. Distile Su Ortamında Hazırlanan Amin-kitosan Nanopartiküllerinin (AKS) Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı Analizi

Distile su ortamında Yöntem 3.4.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanan AKS nanopartiküllerinin, hazırlandıktan 2 saat sonra ve +4±1°C de 1 hafta, 2 hafta ve 4 hafta bekletildikten sonra partikül boyutu ve boyut dağılımına ait analiz sonuçları Tablo 4-13'de gösterilmiştir.

Tablo 4-13: Distile su ortamında hazırlanan AKS nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı (PDI)

Distile su	Partikül büyüklüğü (nm±SS) / PDI			
	2 saat sonra	**1 hafta sonra**	**2 hafta sonra**	**4 hafta sonra**
AKS-B1	8836,5±354,26 PDI:0,50	agregasyon	agregasyon	agregasyon
AKS-B2	9017±84,85 PDI:0,63	agregasyon	agregasyon	agregasyon
AKS-B3	167,6±27,58 PDI: 0,30	200,8±4,4 PDI: 0,29	242,45±0,21 PDI: 0,39	254,4±4,38 PDI: 0,39
AKS-B4	137,7±5,80 PDI: 0,29	168,7±8,20 PDI: 0,44	135,9±13,44 PDI: 0,31	137,6±12,45 PDI: 0,26
AKS-B5	162,3±23,76 PDI: 0,35	158,4±13,29 PDI: 0,34	160,7±18,24 PDI: 0,34	162,75±27,65 PDI: 0,31

4.4.1.2. %0,9 NaCl Ortamında Hazırlanan Amin-kitosan Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı Analizi

%0,9 NaCl ortamında Yöntem 3.4.1.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan AKS nanopartiküllerinin, hazırlandıktan 2 saat sonra ve +4±1°C de 1 hafta, 2 hafta ve 4 hafta bekletildikten sonra partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait analiz sonuçları Tablo 4-14'de gösterilmiştir.

Tablo 4-14: %0,9 NaCl ortamında hazırlanan AKS nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı

%0,9 NaCl	Partikül büyüklüğü (nm±SS) / PDI			
	2 saat sonra	**1 hafta sonra**	**2 hafta sonra**	**4 hafta sonra**
AKS-B1	agregasyon	agregasyon	agregasyon	agregasyon
AKS-B2	agregasyon	agregasyon	agregasyon	agregasyon
AKS-B3	97,94±2,73 PDI: 0,16	115,55±13,36 PDI: 0,18	115±5,23 PDI: 0,17	119,35±5,30 PDI: 0,17
AKS-B4	107,3±1,98 PDI: 0,20	118,5±8,77 PDI: 0,21	121,85±12,94 PDI: 0,21	130,25±23,55 PDI: 0,29
AKS-B5	112,7±0,99 PDI: 0,25	120,3±4,67 PDI: 0,23	121,85±0,21 PDI: 0,23	120,3±4,10 PDI: 0,23

4.4.1.3. Fosfat tamponu (pH 7,4) Ortamında Hazırlanan Amin-kitosan Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı Analizi

Fosfat tamponu (pH 7,4) ortamında Yöntem 3.4.1.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan AKS nanopartiküllerinin, hazırlandıktan 2 saat sonra ve +4±1°C de 1 hafta, 2 hafta ve 4 hafta bekletildikten sonra partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait analiz sonuçları Tablo 4-15'te gösterilmiştir.

Tablo 4-15: Fosfat tamponu (pH 7,4) ortamında hazırlanan AKS nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı

Fosfat tamponu (pH 7,4)	Partikül büyüklüğü (nm±SS)/PDI			
	2 saat sonra	**1 hafta sonra**	**2 hafta sonra**	**4 hafta sonra**
AKS-B1	agregasyon	agregasyon	agregasyon	agregasyon
AKS-B2	agregasyon	agregasyon	agregasyon	agregasyon
AKS-B3	agregasyon	agregasyon	agregasyon	agregasyon
AKS-B4	103,45±0,35 PDI: 0,26	105,85±0,35 PDI: 0,23	104,75±0,92 PDI: 0,24	104,05±2,05 PDI: 0,24
AKS-B5	112,55±0,35 PDI: 0,26	114,55±0,92 PDI: 0,26	114,9±1,98 PDI: 0,25	113,10±3,54 PDI: 0,26

4.4.2. Boş Amin-tiyol-kitosan Nanopartiküllerinin Optimizasyonuna Ait Bulgular

4.4.2.1. Distile su Ortamında Hazırlanan Amin-tiyol-kitosan Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı Analizi

Distile su ortamında Yöntem 3.4.2.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan ATKS nanopartiküllerinin, hazırlandıktan 2 saat sonra ve +4±1°C de 1 hafta, 2 hafta ve 4 hafta bekletildikten sonra partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait analiz sonuçları Tablo 4-16'da gösterilmiştir.

Tablo 4-16: Distile su ortamında hazırlanan ATKS nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı

Distile su	Partikül büyüklüğü (nm±SS) / PDI			
	2 saat sonra	**1 hafta sonra**	**2 hafta sonra**	**4 hafta sonra**
ATKS-B1	agregasyon	agregasyon	agregasyon	agregasyon
ATKS-B2	agregasyon	agregasyon	agregasyon	agregasyon
ATKS-B3	106,10±1,21 PDI: 0,42	114,63±2,35 PDI: 0,42	108,40±1,57 PDI: 0,40	107,63±0,45 PDI: 0,40
ATKS-B4	109,03±2,32 PDI: 0,38	106,60±3,73 PDI: 0,38	137,83±0,65 PDI: 0,49	141,57±16,88 PDI: 0,44
ATKS-B5	115,63±1,06 PDI: 0,31	110,60±2,36 PDI: 0,39	110,90±0,98 PDI: 0,32	162,47±10,60 PDI: 0,48

4.4.2.2. %0,9 NaCl Ortamında Hazırlanan Amin-tiyol-kitosan Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı Analizi

%0,9 NaCl ortamında Yöntem 3.4.2.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan ATKS nanopartiküllerinin, hazırlandıktan 2 saat sonra ve +4±1°C de 1 hafta, 2 hafta ve 4 hafta bekletildikten sonra partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait analiz sonuçları Tablo 4-17'de gösterilmiştir.

Tablo 4-17: %0,9 NaCl ortamında hazırlanan ATKS nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı

%0,9 NaCl	Partikül büyüklüğü (nm±SS)/PDI			
	2 saat sonra	**1 hafta sonra**	**2 hafta sonra**	**4 hafta sonra**
ATKS-B1	agregasyon	agregasyon	agregasyon	agregasyon
ATKS-B2	177,23±2,25 PDI: 0,23	1000,73±58,90 PDI: 0,66	1244,00±58,39 PDI: 0,55	6671,33±1665,17 PDI: 0,89
ATKS-B3	94,58±0,81 PDI: 0,16	104,63±1,10 PDI: 0,15	110,33±1,30 PDI: 0,14	2720,00±339,81 PDI:0,16
ATKS-B4	89,00±0,98 PDI: 0,16	106,63±0,45 PDI: 0,25	95,85±1,66 PDI: 0,15	115,77±0,83 PDI:0,15
ATKS-B5	88,48±0,81 PDI: 0,18	104,23±0,98 PDI: 0,25	100,37±4,06 PDI: 0,16	96,56±1,39 PDI:0,30

4.4.2.3. Fosfat Tamponu Ortamında Hazırlanan Amin-tiyol-kitosan Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı Analizi

%0,9 NaCl ortamında Yöntem 3.4.2.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan ATKS nanopartiküllerinin, hazırlandıktan 2 saat sonra ve +4±1°C de 1 hafta, 2 hafta ve 4 hafta bekletildikten sonra partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait analiz sonuçları Tablo 4-18'de gösterilmiştir.

Tablo 4-18: Fosfat tamponu (pH 7,4) ortamında hazırlanan ATKS nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı

Fosfat tamponu (pH 7,4)	Partikül büyüklüğü (nm±SS)/ PDI			
	2 saat sonra	**1 hafta sonra**	**2 hafta sonra**	**4. hafta**
ATKS-B1	agregasyon	agregasyon	agregasyon	agregasyon
ATKS-B2	agregasyon	agregasyon	agregasyon	agregasyon
ATKS-B3	473,13±20,65 PDI: 0,86	agregasyon	agregasyon	agregasyon
ATKS-B4	130,90±1,00 PDI: 0,44	136,57±2,50 PDI: 0,46	108,43±0,51 PDI: 0,41	111,37±3,12 PDI: 0,41
ATKS-B5	91,97±1,02 PDI: 0,28	92,13±1,69 PDI: 0,27	150,93±1,43 PDI: 0,48	105,33±2,40 PDI:0,41

4.4.3. Boş PbAE-PLGA Nanopartiküllerinin Optimizasyonu

Yöntem 3.4.3.'te anlatıldığı gibi çift emülsiyon yöntemi ile hazırlanan boş PbAE-PLGA nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı Tablo 4-19'de gösterilmiştir.

Tablo 4-19: Boş PbAE-PLGA nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı

Formülasyon	Partikül boyutu (nm±SS)	PDI değerleri
PbAE-PLGA-B1	256,90±11,74	0,22
PbAE-PLGA-B2	237,75±0,64	0,16
PbAE-PLGA-B3	246,40±1,40	0,18

4.4.3.1. Santrifüj İşleminin PbAE-PLGA Nanopartiküllerinin Fiziksel Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi

Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan ve sırasıyla Yöntem 3.6.4.'te anlatıldığı şekilde santrifüj edilen PbAE-PLGA nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı ile zeta potansiyel değerleri Tablo 4-20'de verilmiştir.

Tablo 4-20: BSA yüklü ve boş PbAE-PLGA nanopartiküllerinin santrifüj işleminden sonra partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel değerleri

Formülasyon	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV±SS)
PbAE-PLGA-B1	229,73±11,16	0,15	+49,73±6,06
PbAE-PLGA-B2	223,63±4,66	0,10	+42,23±6,65
PbAE-PLGA-1	214,15±2,90	0,15	+41,45±6,35
PbAE-PLGA-2	207,30±4,10	0,08	+36,00±6,45

4.5. Nanopartikül Formülasyonlarının Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular

4.5.1. Amin-kitosan ve Amin-tiyol-kitosan Nanopartikül Formülasyonları ile yapılan Fiziksel Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular

Yöntem 3.5.'te anlatıldığı şekilde distile su ortamında hazırlanan ve fiziksel stabilitesi belirli zaman aralığında incelen nanopartikül formülasyonlarının, +4±1°C de 12 ay ve +25ºC±5ºC'de 6 ay boyunca saklandığında partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve yüzey yükünde değişiklik olup olmadığı incelendi. +4±1°C ve +25ºC±5ºC'de saklanan BSA yüklü amin-kitosan nanopartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı sırasıyla, Tablo 4-21 ve Tablo 4-22'de, zeta potansiyel değerleri ise sırasıyla Tablo 4-23 ve Tablo 4-24'te verilmiştir. +4±1°C ve+25º±5ºC'de saklanan amin-tiyol-kitosan nanopartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı sırasıyla Tablo 4-25 ve Tablo 4-26'da, zeta potansiyel değerleri ise sırasıyla Tablo 4-27 ve Tablo 4-28'de verilmiştir.

Ayrıca, Şekil 4-9 ile Şekil 4-13 arasında +4±1°C'de bekletilen AKS-3, Şekil 4-14 ile Şekil 4-18 arasında ise aynı şartlarda bekletilen ATKS-3 nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramlar verilmiştir.

4.5.2. PbAE-PLGA Nanopartikül Formülasyonları ile Yapılan Fiziksel Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular

Yöntem 3.5.'te anlatıldığı şekilde hazırlanan ve +4±1°C'de saklanan BSA yüklü ve boş PbAE-PLGA nanopartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı değerleri Tablo 4-29'da, zeta potansiyel değerleri ise Tablo 4-30'da verilmiştir.

Ayrıca, Şekil 4-19 ile Şekil 4-23 arasında +4±1°C'de saklanan PbAE-PLGA nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramlar verilmiştir.

Tablo 4-21: +4±1°C de bekletilen BSA yüklü amin-kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü (nm±SS) ve büyüklük dağılımı (PDI) sonuçları

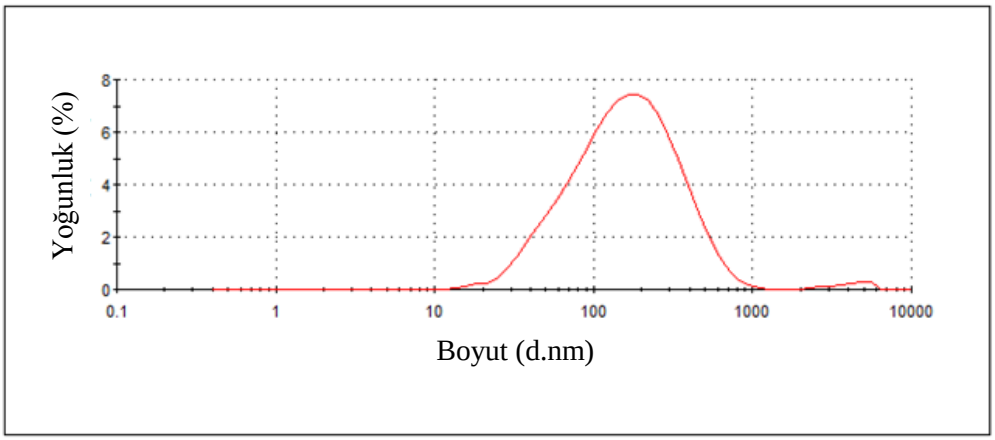
Formülasyon	2 saat sonra	1 hafta sonra	2 hafta sonra	3 hafta sonra	4 hafta sonra	12 hafta sonra	24 hafta sonra	48 hafta sonra
AKS-1				agregasyon				
AKS-2				agregasyon				
AKS-3	125,23±5,52 PDI: 0,40	129,17±3,00 PDI: 0,36	133,00±5,60 PDI:0,37	130,83±5,17 PDI:0,35	129,90±2,97 PDI:0,36	142,90±1,84 PDI:0,35	145,25±4,03 PDI:0,35	144,80±0,71 PDI:0,36
AKS-4	139,55±0,07 PDI: 0,36	134,95±4,31 PDI:0,36	136,35±6,58 PDI:0,36	136,73±2,50 PDI:0,34	137,10±3,82 PDI:0,39	134,65±7,85 PDI:0,44	134,45±7,71 PDI:0,35	140,50±0,28 PDI:0,35
AKS-5	146,75±4,03 PDI: 0,38	146,80±1,20 PDI:0,35	144,40±2,87 PDI:0,36	143,50±5,09 PDI:0,32	144,93±5,56 PDI:0,33	136,25±6,72 PDI:0,38	146,45±8,41 PDI:0,40	127,15±6,58 PDI:0,34
AKS-6	161,30±6,22 PDI: 0,34	158,05±8,41 PDI:0,36	174,80±5,23 PDI:0,38	157,10±7,50 PDI:0,35	163,85±10,54 PDI:0,44	159,45±9,12 PDI:0,41	153,10±6,65 PDI:0,40	147,30±9,90 PDI:0,39
AKS-7	177,35±10,25 PDI: 0,35	171,55±15,49 PDI:0,43	188,10±1,56 PDI:0,36	184,65±4,03 PDI:0,36	173,53±12,29 PDI:0,38	171,50±3,96 PDI:0,41	167,70±6,36 PDI:0,37	168,35±4,17 PDI:0,36
AKS-8	184,60±11,74 PDI: 0,40	182,20±14,99 PDI:0,44	195,65±8,27 PDI:0,40	193,15±6,01 PDI:0,43	180,00±9,90 PDI:0,39	185,30±2,69 PDI:0,45	169,90±9,76 PDI:0,43	154,90±3,68 PDI:0,40

* BSA yüklü amin-kitosan nanopartikülleri distile su ortamında hazırlanmıştır.

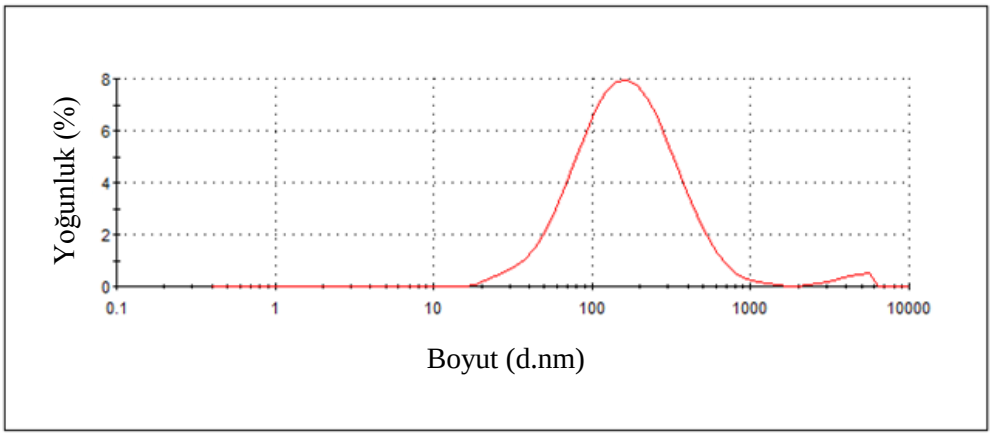
Tablo 4-22: +25±5°C de bekletilen BSA yüklü amin-kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü (nm±SS) ve büyüklük dağılımı (PDI) sonuçları

Formülasyon	2 saat sonra	1 hafta sonra	2 hafta sonra	4 hafta sonra	12 hafta sonra	24 hafta sonra
AKS-1			agregasyon			
AKS-2			agregasyon			
AKS-3	139,50±1,98 PDI: 0,35	135,93±1,95 PDI: 0,42	138,23±0,87 PDI:0,43	142,27±1,69 PDI:0,45	145,1±1,90 PDI:0,41	148,10±2,26 PDI:0,38
AKS-4	155,40±1,70 PDI: 0,32	147,25±2,62 PDI:0,36	145,55±0,64 PDI:0,36	148,50±6,93 PDI:0,39	155,65±11,74 PDI:0,42	141,07±0,83 PDI:0,37
AKS-5	171,30±4,47 PDI: 0,42	152,50±7,92 PDI:0,39	153,70±6,79 PDI:0,42	169,50±5,51 PDI:0,37	151,13±1,95 PDI:0,34	150,63±5,69 PDI:0,39
AKS-6	173,10±8,91 PDI: 0,40	162,45±0,78 PDI:0,44	157,75±2,62 PDI:0,39	153,40±5,66 PDI:0,41	151,15±6,72 PDI:0,33	129,77±4,21 PDI:0,36
AKS-7	186,55±5,44 PDI: 0,44	174,65±2,05 PDI:0,47	165,65±0,21 PDI:0,43	160,20±0 PDI:0,44	158,15±7,28 PDI:0,37	138,37±2,18 PDI:0,37
AKS-8	203,85±0,92 PDI: 0,48	194,15±7,85 PDI:0,45	176,90±2,69 PDI:0,43	170,80±11,46 PDI:0,41	168,35±13,02 PDI:0,39	125,57±1,39 PDI:0,37

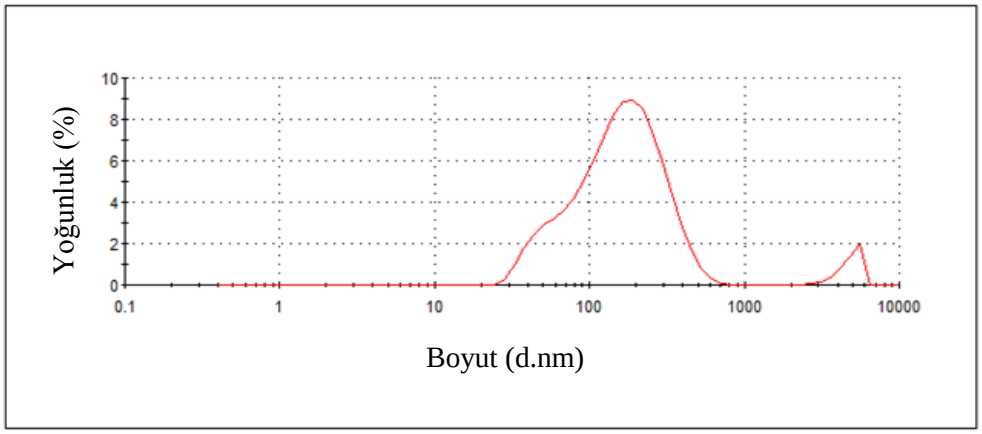
* BSA yüklü amin-kitosan nanopartikülleri distile su ortamında hazırlanmıştır.



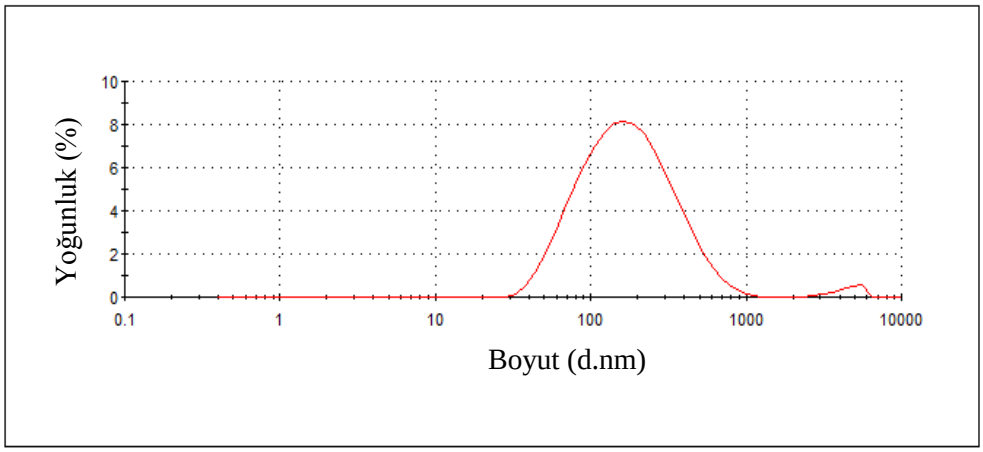
Şekil 4-9: AKS-3 formülasyonunun hazırlandıktan hemen sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı



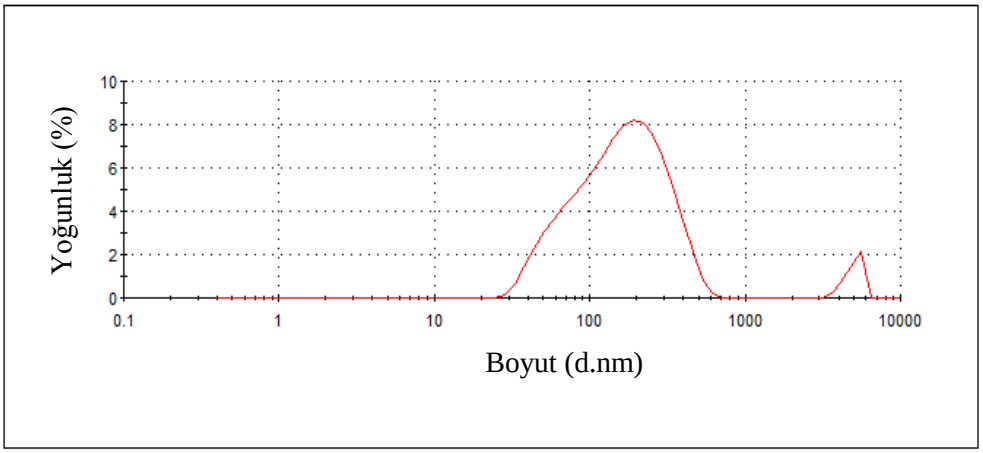
Şekil 4-10: AKS-3 formülasyonunun +4±1°C'de 1 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı



Şekil 4-11: AKS-3 formülasyonunun +4±1°C'de 3 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı



Şekil 4-12: AKS-3 formülasyonunun +4±1°C'de 6 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı



Şekil 4-13: AKS-3 formülasyonunun +4±1°C'de 12 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı

Tablo 4-23: +4±1°C'de bekletilen BSA yüklü amin-kitosan nanopartiküllerinin zeta potasiyeli (mV±SS) değerlerine ait sonuçlar

Formülasyon	2 saat sonra	1 hafta sonra	2 hafta sonra	3 hafta sonra	4 hafta sonra	12 hafta sonra	24 hafta sonra	48 hafta sonra
AKS-1				agregasyon				
AKS-2				agregasyon				
AKS-3	+31,43±4,50	+30,67±5,29	+31,50±4,45	+35,30±4,69	+31,73±4,62	+30,95±4,25	+32,05±4,67	+33,7±4,65
AKS-4	+41,17±5,40	+27,14±3,92	+40,03±5,37	+38,89±5,53	+40,47±4,94	+39,60±4,55	+39,45±4,14	+39,65±4,14
AKS-5	+42,45±5,42	+43,27±5,13	+42,60±4,73	+43,90±5,44	+43,53±5,61	+41,05±5,26	+41,15±4,81	+40,4±5,39
AKS-6	+44,17±5,70	+45,00±5,42	+44,80±4,98	+43,00±4,51	+43,37±4,43	+43,35±5,64	+44,6±4,62	+42,95±5,59
AKS-7	+47,83±7,22	+46,90±4,62	+47,87±5,05	+46,82±6,25	+46,30±4,63	+47,65±4,34	+46,65±4,45	+46,5±4,97
AKS-8	+46,97±4,58	+50,57±5,02	+50,60±4,20	+43,68±5,01	+48,17±4,86	+49,60±4,91	+47,3±4,49	+43,40±4,92

* BSA yüklü amin-kitosan nanopartikülleri distile su ortamında hazırlanmıştır.

Tablo 4-24: +25±5°C'de bekletilen BSA yüklü amin-kitosan nanopartiküllerinin zeta potasiyeli (mV±SS) değerlerine ait sonuçlar

Formülasyon	2 saat sonra	1 hafta sonra	2 hafta sonra	4 hafta sonra	12 hafta sonra	24 hafta sonra
AKS-1			agregasyon			
AKS-2			agregasyon			
AKS-3	+31,10±4,11	+30,60±4,05	+32,90±4,31	+30,70±3,49	+34,65±4,17	+36,10±4,08
AKS-4	+40,45±4,26	+40,95±4,68	+41,85±4,66	+38,40±4,06	+39,65±5,03	+39,95±5,03
AKS-5	+45,65±4,73	+46,75±4,92	+46,25±4,97	+44,40±4,69	+45,10±5,24	+42,45±8,18
AKS-6	+45,65±4,20	+46,05±4,55	+43,15±5,01	+46,20±4,95	+46,55±6,08	+42,70±5,00
AKS-7	+47,85±5,42	+48,55±7,39	+46,60±8,19	+44,60±7,75	+45,85±5,20	+42,95±8,49
AKS-8	+50,15±4,67	+48,55±3,90	+50,45±4,62	+45,10±3,73	+45,10±4,05	+42,9±4,92

* BSA yüklü amin-kitosan nanopartikülleri distile su ortamında hazırlanmıştır.

Tablo 4-25: +4±1°C de bekletilen BSA yüklü amin-tiyol-kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü (nm±SS) ve büyüklük dağılımı (PDI) sonuçları

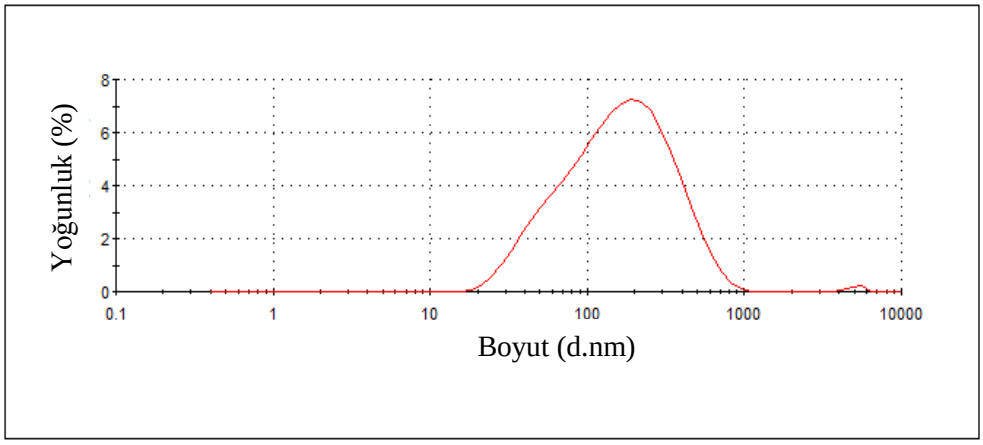
Formülasyon	2 saat sonra	1 hafta sonra	2 hafta sonra	3 hafta sonra	4 hafta sonra	12 hafta sonra	24 hafta sonra	48 hafta sonra
ATKS-1				agregasyon				
ATKS-2				agregasyon				
ATKS-3	110,03±3,27 PDI: 0,42	110,83±1,53 PDI: 0,40	110,50±2,42 PDI: 0,44	113,98±2,32 PDI: 0,40	119,23±9,60 PDI: 0,42	109,25±2,33 PDI: 0,42	112,87±3,06 PDI: 0,39	115,70±5,72 PDI: 0,39
ATKS-4	110,47±6,73 PDI: 0,40	110,67±4,11 PDI:0,40	111,97±7,26 PDI: 0,42	112,73±1,79 PDI: 0,41	119,18±11,20 PDI: 0,42	118,35±7,71 PDI: 0,40	116,75±8,70 PDI: 0,43	121,33±7,11 PDI: 0,38
ATKS-5	116,73±6,98 PDI: 0,39	111,27±5,40 PDI:0,37	117,80±7,89 PDI: 0,41	113,23±8,51 PDI: 0,41	120,23±11,34 PDI: 0,44	117,37±3,27 PDI: 0,38	115,85±11,24 PDI: 0,45	115,00±4,27 PDI: 0,39
ATKS-6	119,97±24,18 PDI: 0,45	123,67±0,25 PDI: 0,43	122,30±19,51 PDI: 0,44	122,37±5,75 PDI: 0,48	122,18±34,82 PDI: 0,46	119,85±5,30 PDI: 0,42	118,86±18,69 PDI: 0,48	129,00±3,40 PDI: 0,48
ATKS-7	128,50±2,12 PDI: 0,44	127,60±0,00 PDI: 0,40	127,10±2,83 PDI: 0,44	133,17±18,11 PDI: 0,45	132,13±17,02 PDI: 0,45	115,65±18,88 PDI: 0,43	128,12±26,75 PDI: 0,46	139,90±11,30 PDI: 0,44
ATKS-8	164,63±10,45 PDI: 0,45	129,37±19,71 PDI: 0,41	134,37±26,14 PDI: 0,43	147,40±17,68 PDI: 0,39	158,43±13,82 PDI: 0,43	135,10±4,24 PDI: 0,41	127,37±6,40 PDI: 0,40	152,55±8,75 PDI: 0,37

* BSA yüklü amin-kitosan nanopartikülleri distile su ortamında hazırlanmıştır.

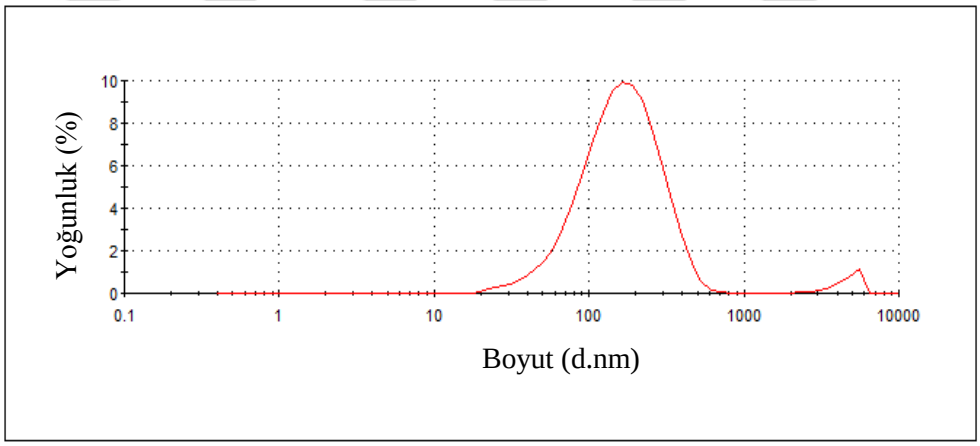
Tablo 4-26: +25±5°C de bekletilen BSA yüklü amin-tiyol-kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü (nm±SS) ve büyüklük dağılımı (PDI) sonuçları

Formülasyon	2 saat sonra	1 hafta sonra	2 hafta sonra	4 hafta sonra	12 hafta sonra	24 hafta sonra
ATKS-1			agregasyon			
ATKS-2			agregasyon			
ATKS-3	132,33±0,12 PDI: 0,28	273,43±1,05 PDI: 0,48	186,90±2,83 PDI: 0,33	197,80±1,27 PDI: 0,39	196,40±2,34 PDI: 0,39	198,77±4,66 PDI: 0,37
ATKS-4	111,43±0,65 PDI: 0,41	107,75±0,73 PDI:0,42	114,30±0,62 PDI: 0,44	114,80±2,27 PDI: 0,51	111,23±0,15 PDI: 0,45	112,43±1,40 PDI: 0,44
ATKS-5	112,17±2,48 PDI: 0,38	156,97±3,84 PDI:0,50	108,27±1,11 PDI: 0,45	179,85±5,16 PDI: 0,55	105,33±5,46 PDI: 0,44	195,05±1,63 PDI: 0,58
ATKS-6	108,87±1,43 PDI: 0,33	188,80±7,35 PDI: 0,56	100,90±15,12 PDI: 0,41	108,90±1,95 PDI: 0,41	96,77±2,01 PDI: 0,40	98,09±7,14 PDI: 0,40
ATKS-7	111,23±3,06 PDI: 0,33	107,13±1,01 PDI: 0,40	109,33±0,40 PDI: 0,40	119,50±10,32 PDI: 0,35	115,00±6,12 PDI: 0,37	111,87±1,95 PDI: 0,51
ATKS-8	113,23±3,06 PDI: 0,37	139,17±7,17 PDI: 0,35	107,45±0,49 PDI: 0,43	119,27±9,61 PDI: 0,38	141,65±0,64 PDI: 0,52	101,83±15,44 PDI: 0,38

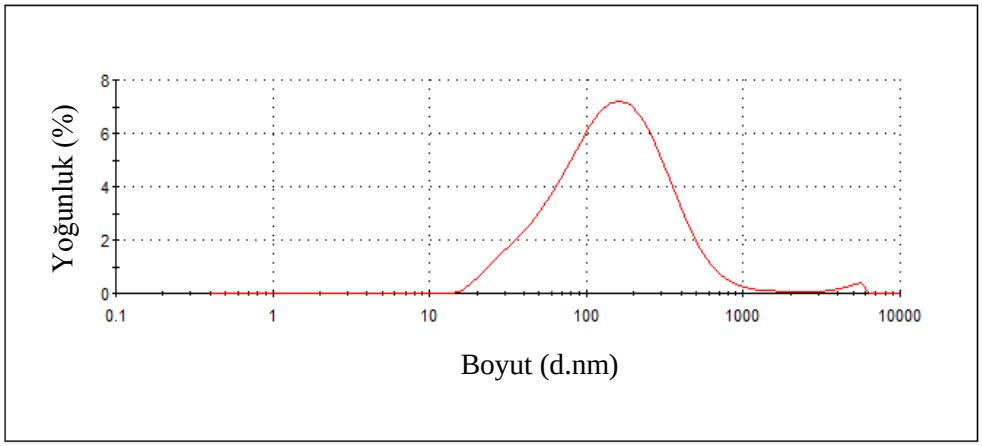
* BSA yüklü amin-kitosan nanopartikülleri distile su ortamında hazırlanmıştır.



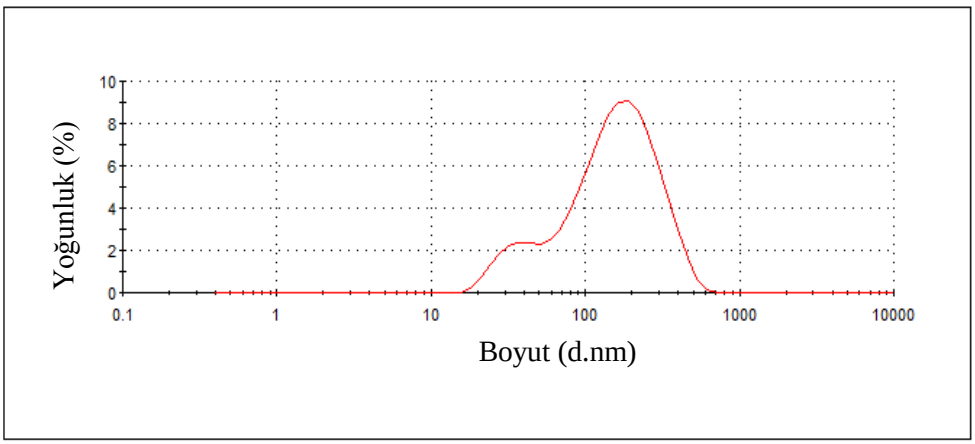
Şekil 4-14: ATKS-3 formülasyonunun hazırlandıktan hemen sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı



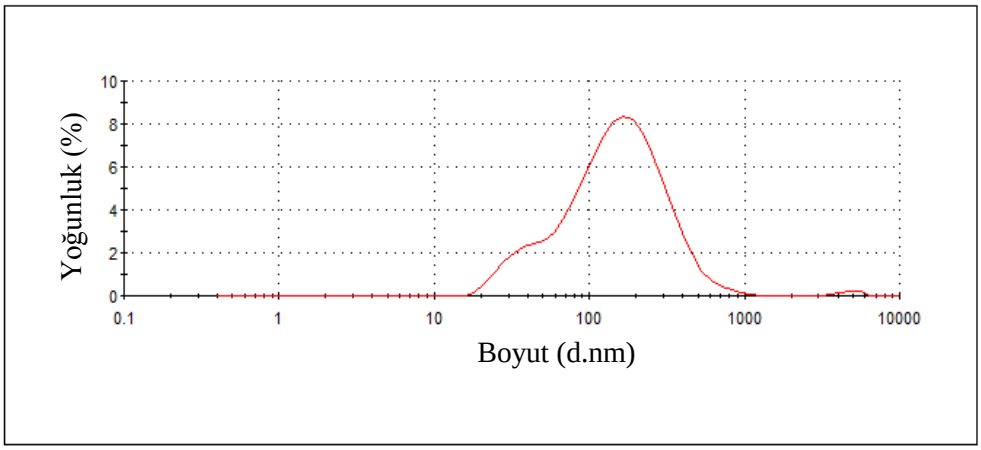
Şekil 4-15: ATKS-3 formülasyonunun +4±1°C'de 1 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı



Şekil 4-16: ATKS-3 formülasyonunun +4±1°C'de 3 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı



Şekil 4-17: ATKS-3 formülasyonunun +4±1°C'de 6 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı



Şekil 4-18: ATKS-3 formülasyonunun +4±1°C'de 12 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı

Tablo 4-27: 4±1°C'de bekletilen BSA yüklü amin-tiyol-kitosan nanopartiküllerinin zeta potasiyeli (mV±SS) değerlerine ait sonuçlar

Formülasyon	2 saat sonra	1 hafta sonra	2 hafta sonra	3 hafta sonra	4 hafta sonra	12 hafta sonra	24 hafta sonra	48 hafta sonra
ATKS-1				agregasyon				
ATKS-2				agregasyon				
ATKS-3	+34,65±5,76	+36,58±4,98	+35,73±4,44	+36,65±4,16	+32,18±4,92	+39,23±4,98	+39,13±3,07	+37,03±5,44
ATKS-4	+39,85±5,08	+41,38±4,95	+41,25±4,36	+38,63±5,25	+38,88±5,93	+41,97±4,87	+42,80±3,35	+40,43±4,72
ATKS-5	+40,25±6,36	+44,63±7,85	+41,38±5,33	+42,80±5,02	+45,87±5,06	+46,97±5,73	+45,10±3,53	+45,05±4,65
ATKS-6	+43,05±4,71	+46,10±5,19	+45,93±5,09	+45,30±5,56	+43,53±4,65	+45,03±4,39	+46,93±3,68	+42,70±4,55
ATKS-7	+39,28±6,26	+44,85±7,04	+44,95±6,76	+46,08±5,46	+38,55±4,73	+45,90±4,61	+46,37±3,63	+43,97±5,25
ATKS-8	+41,15±5,43	+44,45±7,58	+43,25±6,51	+41,90±7,49	+39,40±7,40	+48,03±4,49	+41,97±3,29	+41,35±4,92

* BSA yüklü amin-kitosan nanopartikülleri distile su ortamında hazırlanmıştır.

Tablo 4-28: +25±5°C'de bekletilen BSA yüklü amin-tiyol-kitosan nanopartiküllerinin zeta potasiyeli (mV±SS) değerlerine ait sonuçlar

Formülasyon	2 saat sonra	1 hafta sonra	2 hafta sonra	4 hafta sonra	12 hafta sonra	24 hafta sonra
ATKS-1				agregasyon		
ATKS-2				agregasyon		
ATKS-3	+26,8±3,66	+29,2±4,33	+27,7±3,97	+31,4±4,79	+34,5±3,41	+36,4±7,90
ATKS-4	+36,8±6,95	+37,8±7,50	+28,7±6,95	+35,6±5,45	+35,3±7,07	+36,8±6,41
ATKS-5	+38,9±7,38	+42,10±12,4	+24,3±5,48	+35,6±5,45	+40,5±6,81	+41,8±5,18
ATKS-6	+38,6±8,48	+40,4±6,17	+44,4±4,64	+41,2±4,86	+43,3±4,18	+44,1±3,46
ATKS-7	+39,2±7,60	+41,2±8,05	+36,7±8,60	+34,6±8,48	+40,6±6,65	+41,0±7,17
ATKS-8	+42,8±5,33	+41,8±6,13	+37,0±8,89	+38,5±6,17	+42,3±5,36	+35,4±8,07

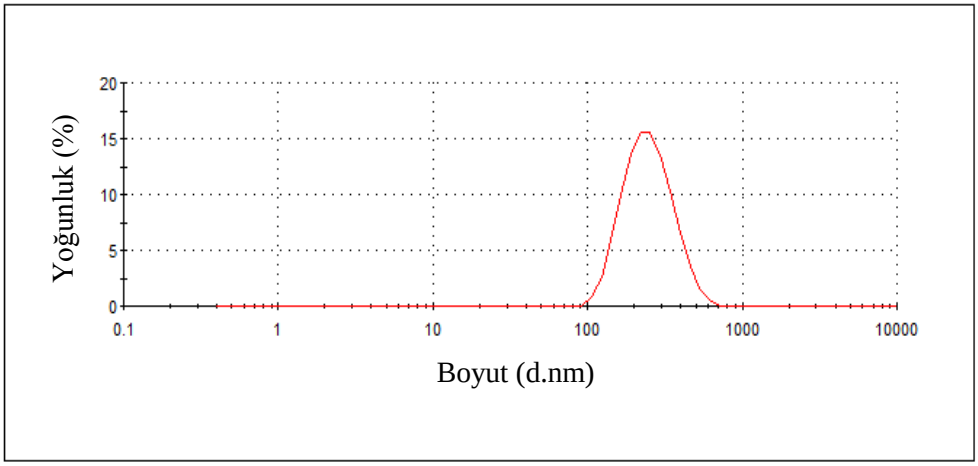
* BSA yüklü amin-kitosan nanopartikülleri distile su ortamında hazırlanmıştır.

Tablo 4-29: +4±1°C'de bekletilen PbAE-PLGA nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü (nm±SS) ve büyüklük dağılımı (PDI) sonuçları

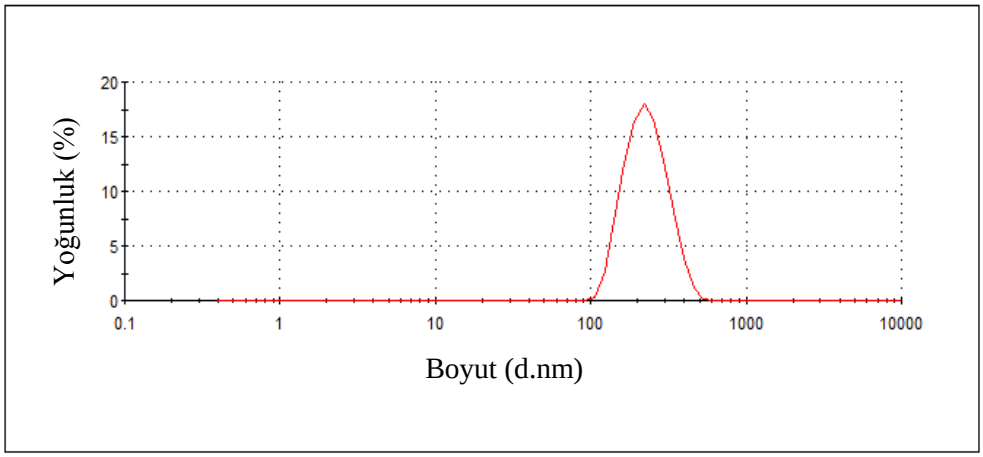
Formülasyon	Hazırlandıktan sonra	1 hafta sonra	2 hafta sonra	3 hafta sonra	4 hafta sonra	12 hafta sonra	24 hafta sonra	48 hafta sonra
PbAE-PLGA-B1	256,90±11,74 PDI: 0,22	232,80±3,25 PDI: 0,13	242,80±2,12 PDI: 0,18	250,30±0,85 PDI: 0,14	245,15±6,43 PDI: 0,19	243,20±13,00 PDI: 0,15	253,15±9,40 PDI: 0,19	254,50±6,79 PDI: 0,18
PbAE-PLGA-B2	237,75±0,64 PDI: 0,16	252,17±3,85 PDI: 0,20	232,95±0,92 PDI: 0,14	240,50±5,10 PDI: 0,14	223,75±12,52 PDI: 0,15	261,43±11,41 PDI: 0,23	236,15±2,05 PDI: 0,18	240,77±6,56 PDI: 0,15
PbAE-PLGA-1	243,93±8,88 PDI: 0,18	241,40±24,89 PDI: 0,20	239,40±3,11 PDI: 0,18	242,40±5,14 PDI: 0,16	242,20±4,67 PDI: 0,12	241,27±6,29 PDI: 0,17	250,20±12,61 PDI: 0,17	242,73±3,27 PDI: 0,15
PbAE-PLGA-2	234,77±4,49 PDI: 0,15	235,93±2,15 PDI: 0,15	239,4±0 PDI: 0,17	237,77±4,76 PDI: 0,15	228,55±19,73 PDI: 0,14	246,47±7,02 PDI: 0,19	241,70±0,99 PDI: 0,15	247,00±7,19 PDI: 0,16

Tablo 4-30: +4±1°C'de bekletilen PbAE-PLGA nanopartiküllerinin zeta potasiyeli (mV±SS) değerlerine ait sonuçlar

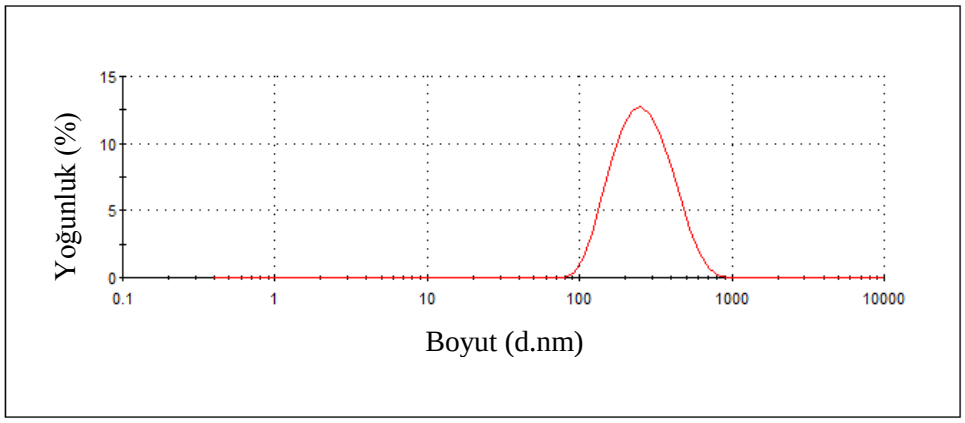
Formülasyon	Hazırlandıktan sonra	1 hafta sonra	2 hafta sonra	3 hafta sonra	4 hafta sonra	12 hafta sonra	24 hafta sonra	48 hafta sonra
PbAE-PLGA-B1	+18,60±5,22	+18,95±5,38	+17,50±4,50	+15,70±4,75	+16,90±4,54	+11,53±4,23	+10,98±3,83	+8,27±3,76
PbAE-PLGA-B2	+16,87±3,91	+16,57±4,85	+16,10±5,02	+15,14±3,95	+14,33±4,14	+12,30±3,55	+9,83±3,71	+8,48±3,64
PbAE-PLGA-1	+20,13±4,76	+17,4±5,36	+16,00±4,46	+18,37±4,78	+15,43±4,78	+14,25±4,89	+12,95±4,06	+8,12±4,33
PbAE-PLGA-2	+13,83±4,03	+12,50±4,63	+15,08±4,50	+15,92±4,47	+14,70±4,99	+12,28±4,43	+10,38±3,74	+7,95±3,96



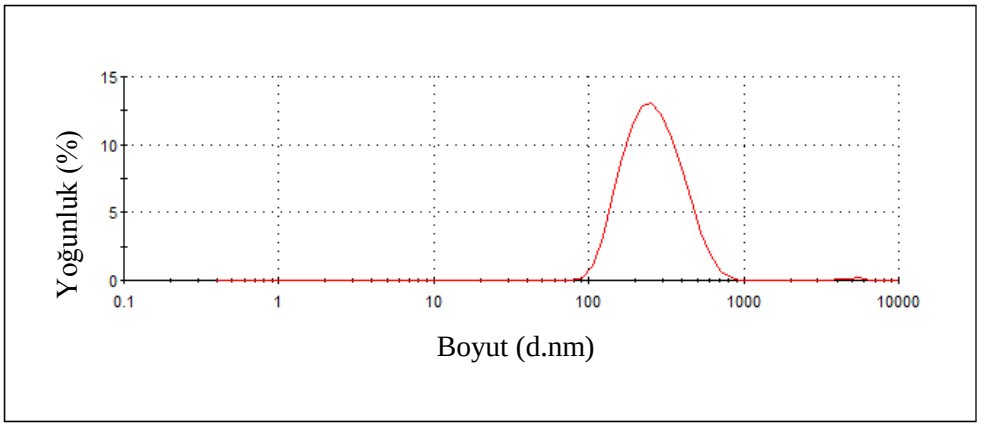
Şekil 4-19: PbAE-PLGA-2 formülasyonunun hazırlandıktan hemen sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı



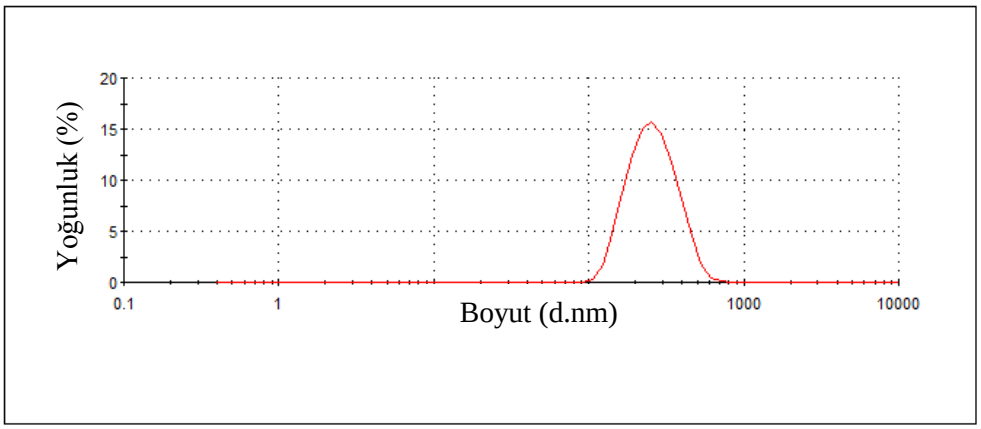
Şekil 4-20: PbAE-PLGA-2 formülasyonunun +4±1°C'de 1 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı



Şekil 4-21: PbAE-PLGA-2 formülasyonunun +4±1°C'de 3 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı



Şekil 4-22: PbAE-PLGA-2 formülasyonunun +4±1°C'de 6 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı



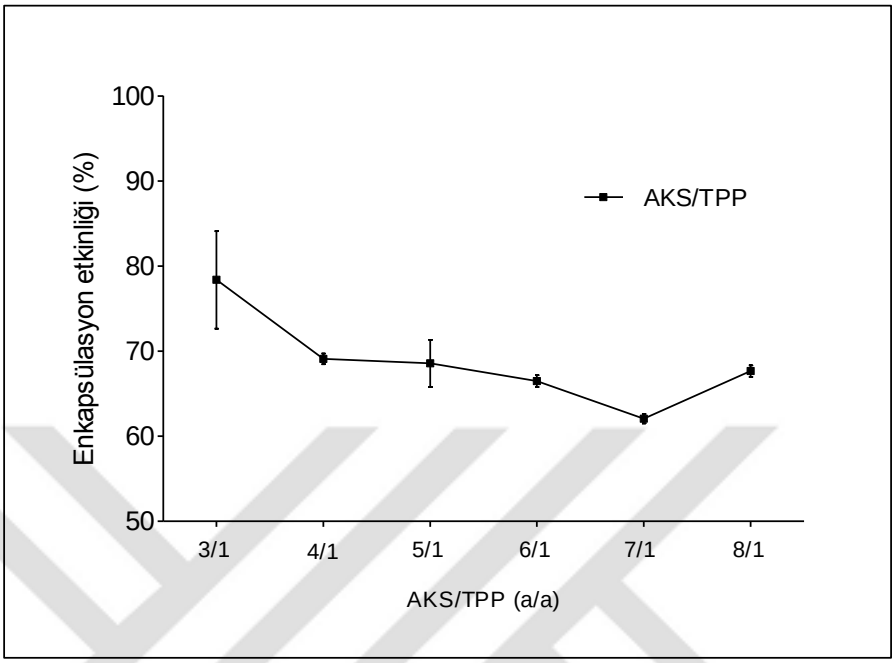
Şekil 4-23: PbAE-PLGA-2 formülasyonunun, +4±1°C'de 12 ay bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımına ait kromatogramı

4.5.3. Modifiye Kitosan Nanopartiküllerinin BSA Enkapsülasyon Etkinliğine Ait Bulgular

Yöntem 3.5.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanan protein yüklü amin-kitosan ve yöntem 3.5.2.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan amin-tiyol-kitosan nanopartiküllerinde protein enkapsülasyon etkinliği, Yöntem 3.7.1.'de anlatıldığı şekilde Denklem 3-1'e göre hesaplandı. Aminlenmiş kitosan nanopartiküllerinin BSA enkapsülasyon etkinliğine ait sonuçlar Tablo 4-31 ve Şekil 4-24'de, aminlenmiş ve tiyollenmiş kitosan nanopartiküllerinin BSA enkapsülasyon etkinliğine ait sonuçlar ise Tablo 4-32 ve Şekil 4-25'te gösterilmiştir.

Tablo 4-31: Amin-kitosan nanopartiküllerinin BSA enkapsülasyon etkinliğine ait bulgular

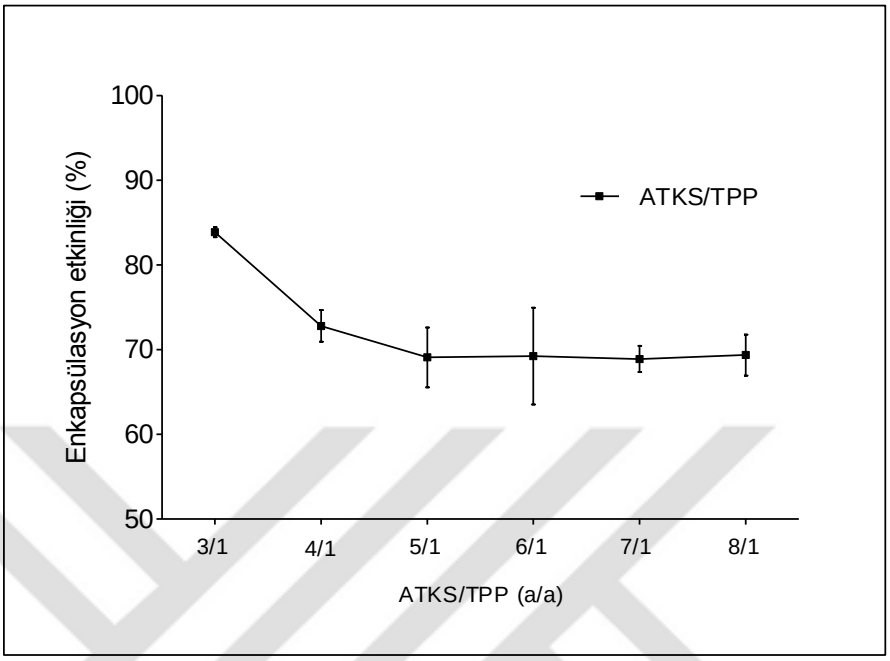
Formülasyon	Enkapsülasyon etkinliği (%)
AKS-1	agregasyon nedeniyle hesaplanmadı
AKS-2	agregasyon nedeniyle hesaplanmadı
AKS-3	78,38±5,73
AKS-4	69,10±0,62
AKS-5	68,56±2,76
AKS-6	66,49±0,71
AKS-7	62,07±0,56
AKS-8	67,66±0,68



Şekil 4-24: Amin-kitosan:TPP oranının amin-kitosan nanopartiküllerinin BSA enkapsülasyon etkinliğine etkisini gösteren grafik

Tablo 4-32: Amin-tiyol-kitosan nanopartiküllerin BSA enkapsülasyon etkinliğine ait bulgular

Formülasyon	Enkapsülasyon etkinliği (%)
ATKS-1	agregasyon nedeniyle hesaplanmadı
ATKS-2	agregasyon nedeniyle hesaplanmadı
ATKS-3	83,85±0,59
ATKS-4	72,80±1,87
ATKS-5	69,09±3,53
ATKS-6	69,25±5,71
ATKS-7	68,90±1,55
ATKS-8	69,36±2,42



Şekil 4-25: Amin-tiyol-kitosan:TPP oranının amin-tiyol-kitosan nanopartiküllerinin BSA enkapsülasyon etkinliğine etkisini gösteren grafik

4.5.4. PbAE-PLGA Nanopartiküllerin BSA Enkapsülasyon Etkinliğine Ait Bulgular

Yöntem 3.5.2.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan protein yüklü PbAE-PLGA nanopartiküllerinde protein enkapsülasyon etkinliği Yöntem 3.7.1.'de anlatıldığı şekilde Denkem 3-1'e göre hesaplandı. PbAE-PLGA nanopartiküllerde BSA enkapsülasyon etkinliğine ait sonuçlar Tablo 4-23'te gösterilmiştir.

Tablo 4-33: PbAE-PLGA nanopartiküllerinin BSA enkapsülasyon etkinliğine ait bulgular

Formülasyon	Enkapsülasyon etkinliği (%)
PbAE-PLGA-1	84,60±0,67
PbAE-PLGA-2	91,16±2,92

4.6. Nanopartiküllerin Üretim Verimine Ait Bulgular

Yöntem 3.5.3.'te anlatıldığı şekilde hazırlanan amin-kitosan ve amin-tiyol-kitosan nanopartiküllerin üretim verimine ait bulgular sırasıyla Tablo 4-34 ve Tablo 4-35 verilmiştir.

Tablo 4-34: Amin-kitosan nanopartiküllerinin üretim verimine ait bulgular (n=3)

Formülasyon	Verim (%±SS)	
	Boş NP	**BSA yüklü NP**
AKS-1	agregasyon	agregasyon
AKS-2	agregasyon	agregasyon
AKS-3	60,54±9,82	60,31±13,35
AKS-4	27,18±5,70	27,54±5,96
AKS-5	25,71±9,99	25,08±8,41
AKS-6	18,95±4,78	17,28±4,96
AKS-7	17,49±5,46	14,88±3,30
AKS-8	14,97±6,28	14,47±1,44

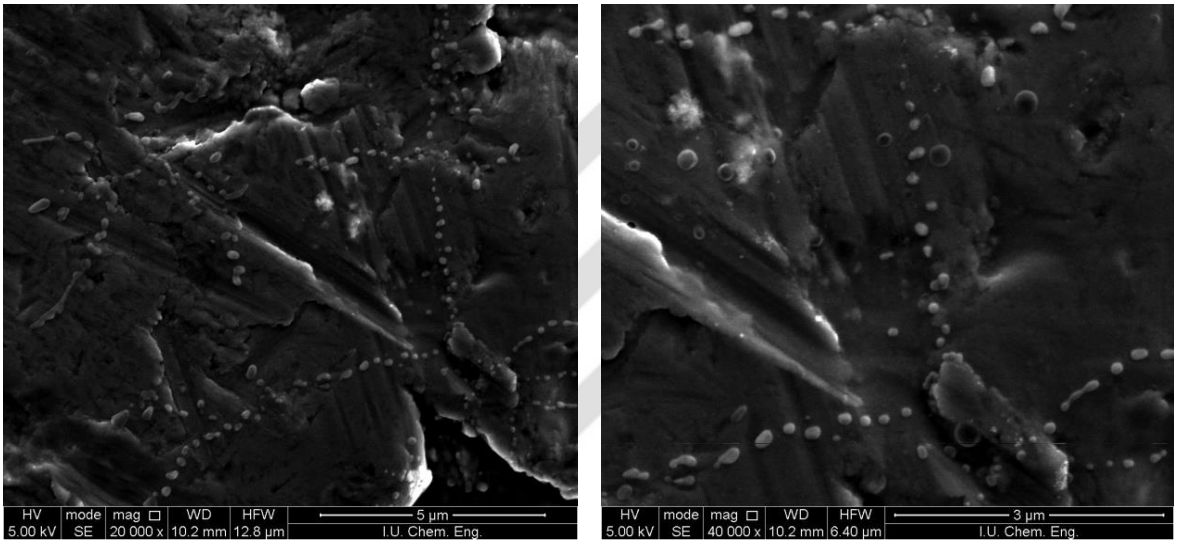
Tablo 4-35: Amin-tiyol-kitosan nanopartiküllerinin üretim verimine ait bulgular (n=3)

Formülasyon	Verim (%±SS)	
	Boş NP	**BSA yüklü NP**
ATKS-1	agregasyon	agregasyon
ATKS-2	agregasyon	agregasyon
ATKS-3	28,13±9,00	36,62±7,82
ATKS-4	18,55±0,49	18,10±1,13
ATKS-5	14,14±2,17	12,71±2,42
ATKS-6	9,72±0,59	10,38±4,22
ATKS-7	7,07±2,75	6,44±3,35
ATKS-8	6,07±0,18	7,40±0,14

4.7. Nanopartiküllerin Morfolojik Olarak İncelenmesi

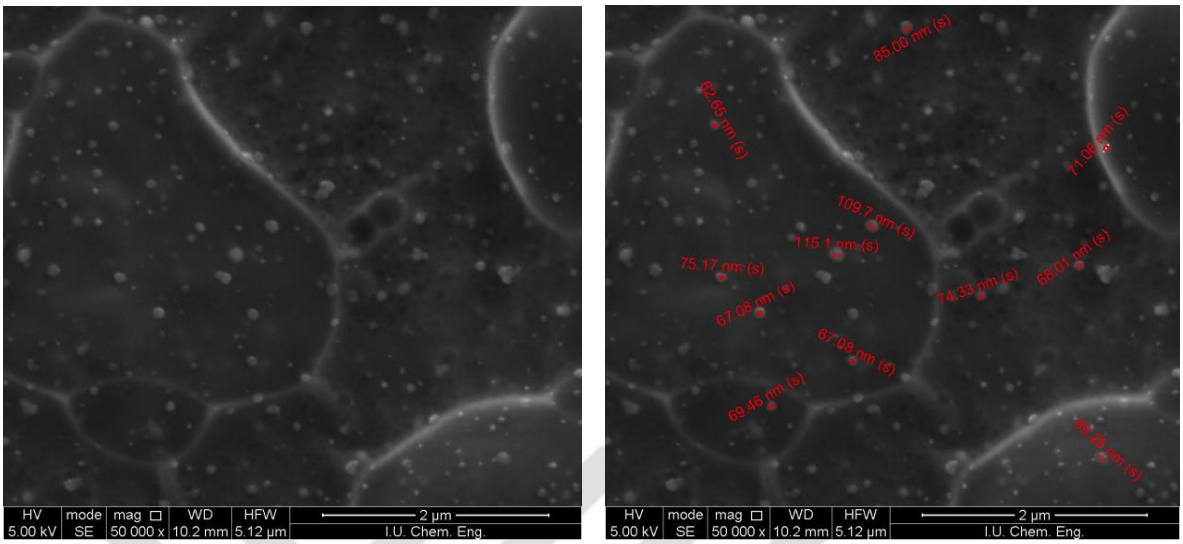
4.7.1. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Nanopartiküllerin İncelenmesi

Amin-kitosan, amin-tiyol-kitosan ve PbAE-PLGA polimerleri ile hazırlanan nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile alınmış fotoğrafları sırasıyla Şekil 4-26, Şekil 4-27 ve Şekil 4-28'de verilmiştir.

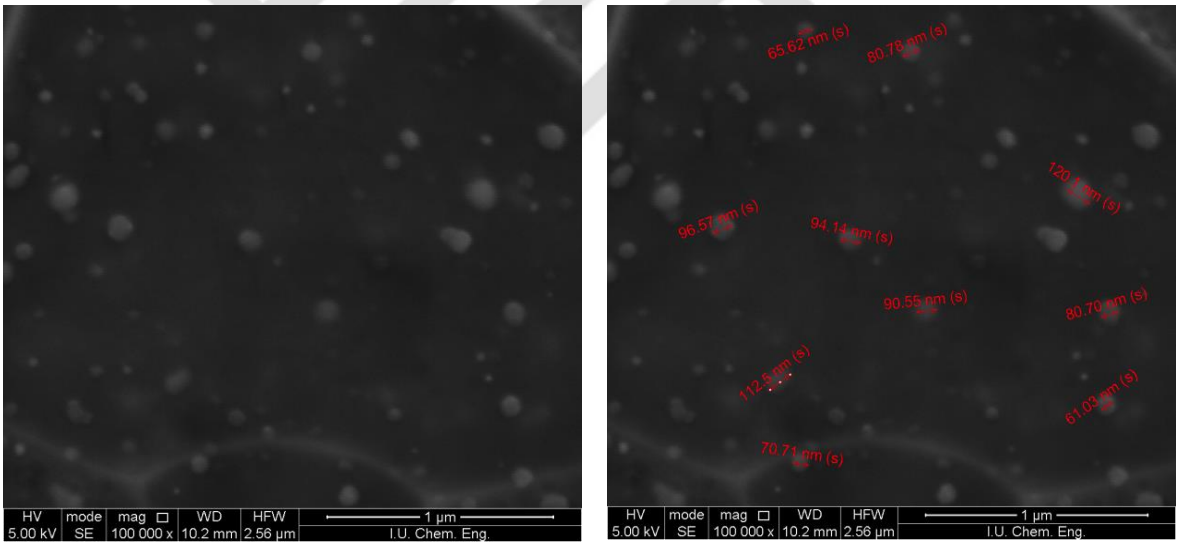


a) **b)**

Şekil 4-26: Amin-kitosan nanopartiküllerinin SEM görüntüleri; Büyütme a) x20.000, b) x40.000

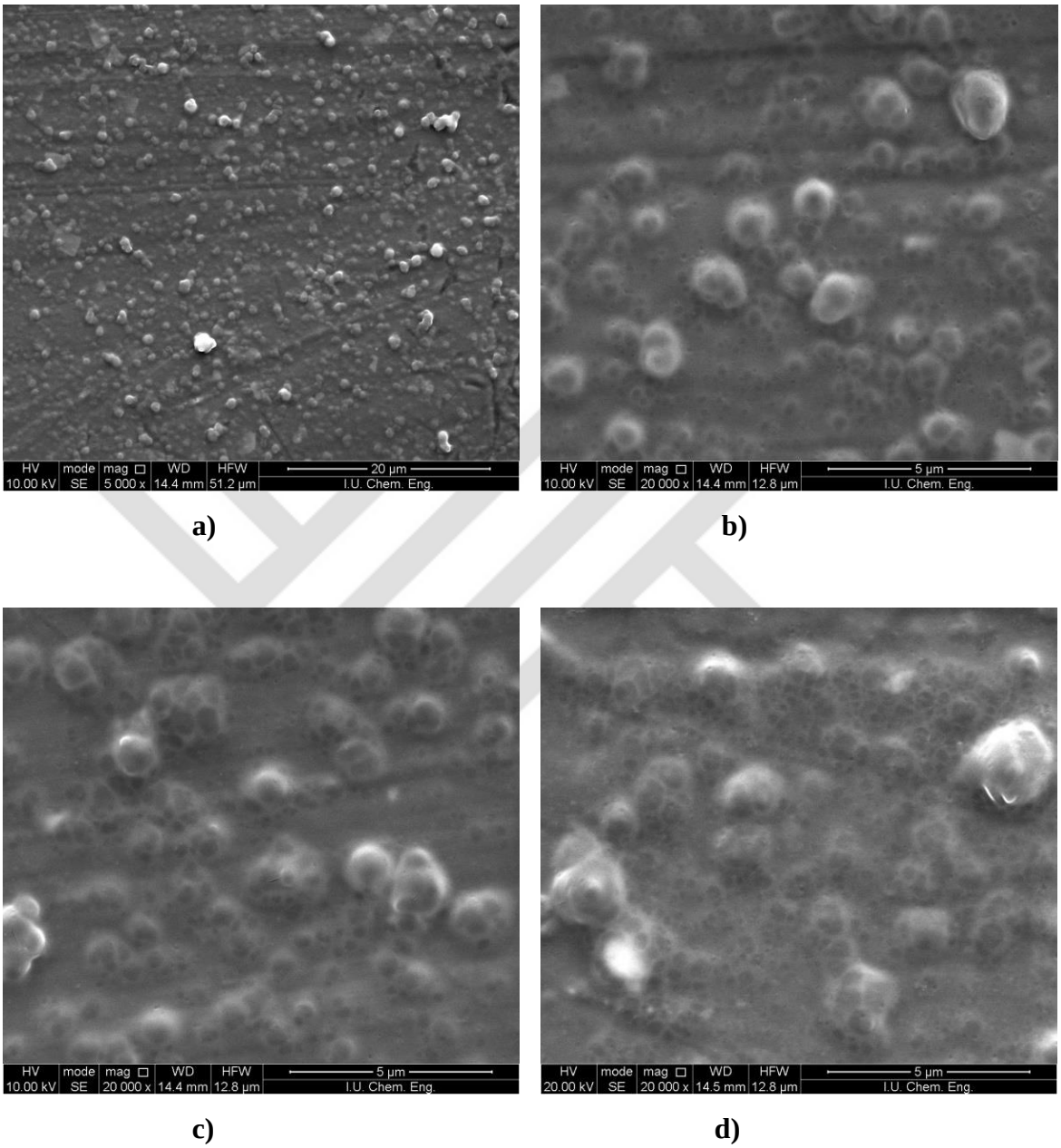


a)



b)

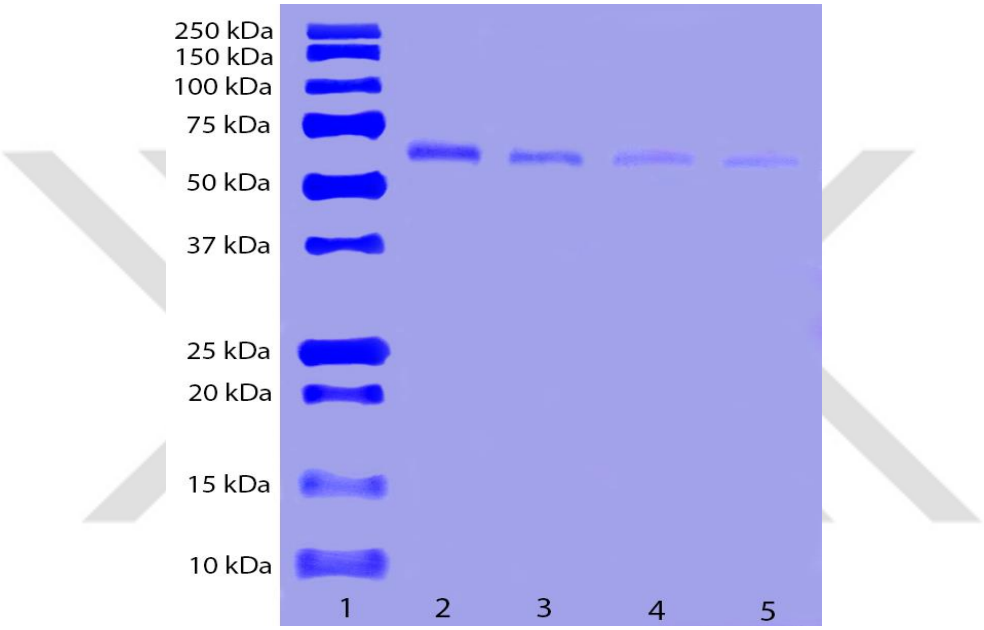
Şekil 4-27: Amin-tiyol-kitosan nanopartiküllerinin SEM görüntüleri; Büyütme a) x50.000, b) x100.0000



Şekil 4-28: PbAE-PLGA nanopartiküllerinin SEM görüntüleri; Büyütme a) x5.000, b) x20.000

4.8. Nanopartiküllere Yüklenen BSA'nın SDS Bütünlüğünün İncelenmesine Ait Bulgular

Modiye kitosan ve PbAE-PLGA nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan yöntemlerin SDS protein bütünlüğü üzerine etkisini incelemek amacıyla Yöntem 3.8.'de anlatıldığı şekilde yapılan SDS-PAGE sonuçları Şekil 4-29'de gösterilmiştir.



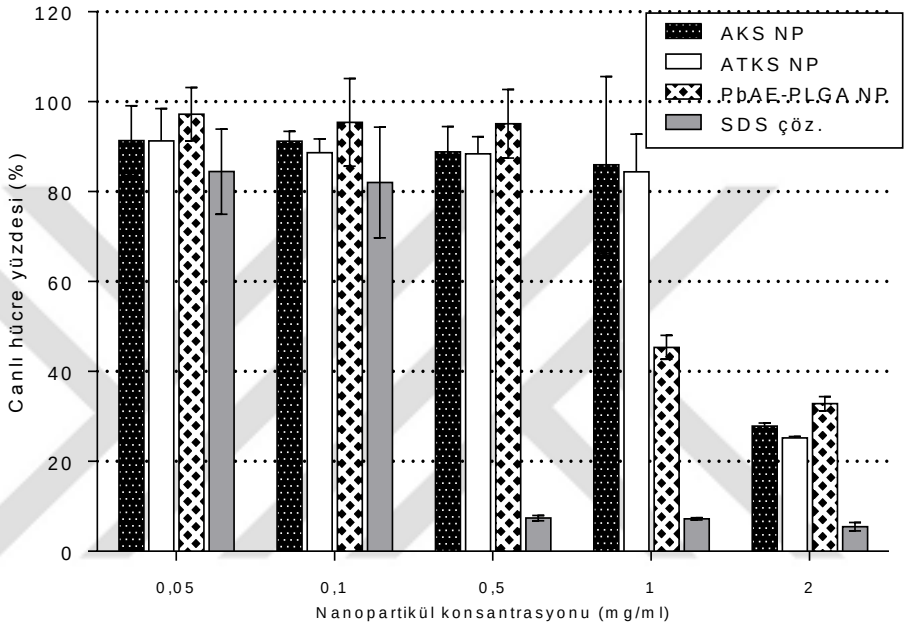
Şekil 4-29: Hazırlama yönteminin BSA yüklü nanopartikül formülasyonlarının SDS protein bütünlüğüne etkisine ait bulgular: 1. Precision Plus Protein™ Dual Color Standards marker; 2. Standart BSA çözeltisi (1 mg/mL); 3. BSA yüklü PbAE-PLGA nanopartikülleri; 4. BSA yüklü AKS nanopartikülleri; 5. BSA yüklü AKTS nanopartikülleri

4.9. Hücre Canlılık (Sitotoksisite) Çalışmaları

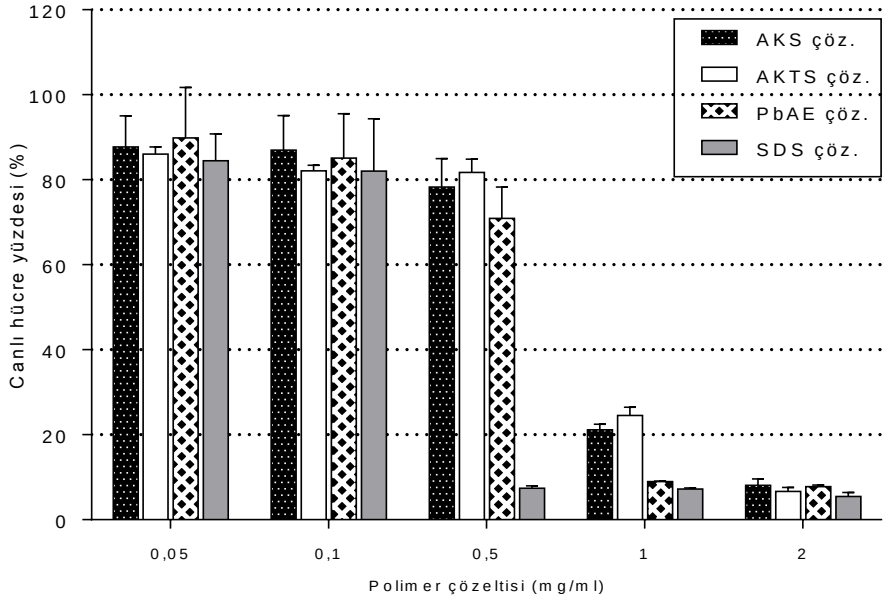
Modifiye kitosan ve PbAE polimerleri ile bu polimerler kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin *in vitro* koşullarda hücre canlılığı üzerine etkisi Calu-3 ve A549 hücre hatlarında Yöntem 3.10.'da anlatıldığı gibi incelenmiştir. Calu-3 hücreleri sıkı bağlantı noktaları ve mikrovili olan ve salgı yapan hücreler olduğundan üst solunum yolu hücreleri için iyi ve uygun bir model oluşturmaktadır (Borchard 2002). A549 hücreleri ise alveolar epitel hücrelerinin özelliklerini taşımaktadır (Hasan 2013).

4.9.1. Calu-3 Hücre Hattında MTT Testi

0-2 mg/mL konsantrasyonlarda ki nanopartikül formülasyonlarının ve polimer çözeltilerinin Calu-3 hücrelerinin yaşayabilirliğine etkisi sırayla Şekil 4-30 ve Şekil 4-31'de gösterilmiştir.



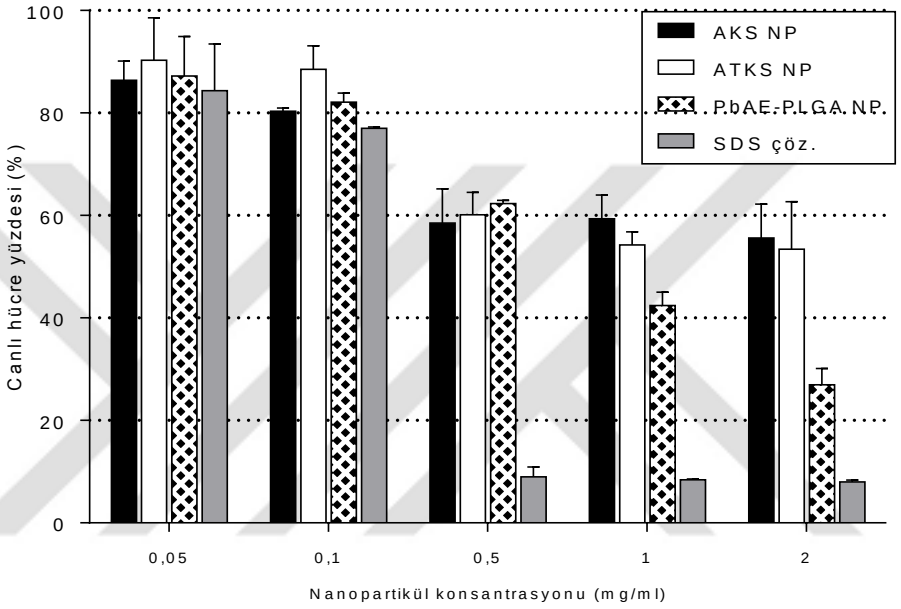
Şekil 4-30: Nanopartikül formülasyonlarının Calu-3 hücrelerinin yaşayabilirliğine etkisi



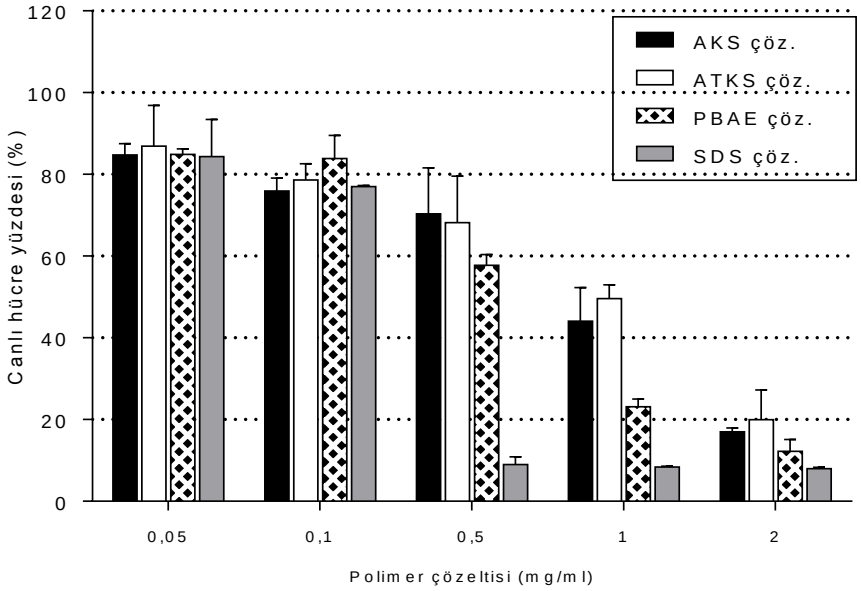
Şekil 4-31: Polimer çözeltilerinin Calu-3 hücrelerinin yaşayabilirliğine etkisi

4.9.2. A549 Hücre Hattında MTT Testi

0-2 mg/mL konsantrasyonlarda ki nanopartikül formülasyonlarının ve polimer çözeltilerinin A549 hücrelerinin yaşayabilirliğine etkisi sırayla Şekil 4-32 ve Şekil 4-33'de gösterilmiştir.



Şekil 4-32: Nanopartikül formülasyonlarının A549 hücrelerinin yaşayabilirliğine etkisi



Şekil 4-33: Polimer çözeltilerinin A549 hücrelerinin yaşayabilirliğine etkisi

4.10. İmmünizasyon Çalışmaları

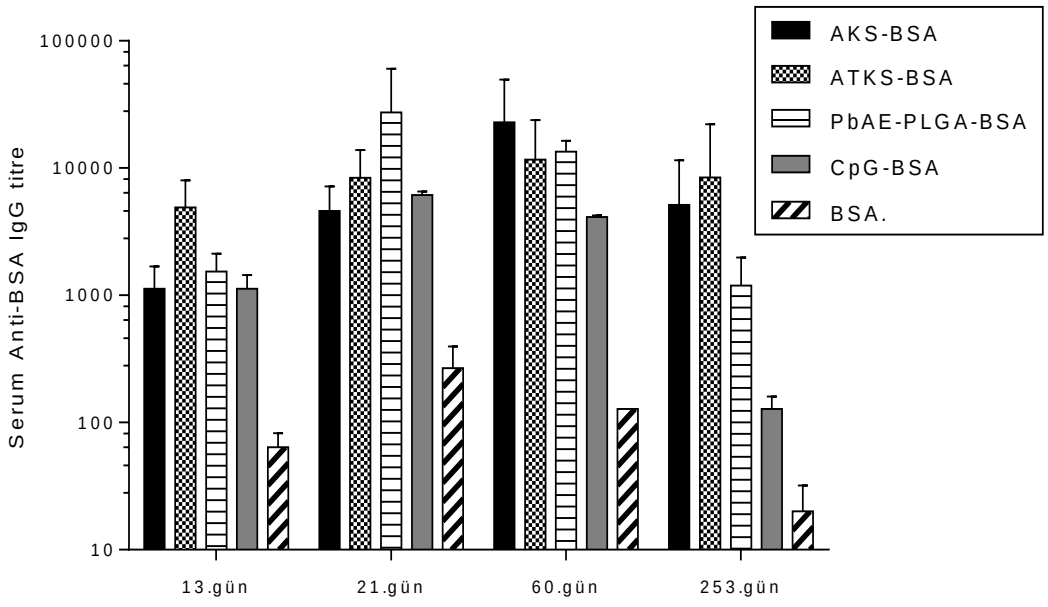
Farelere serbest BSA veya BSA yüklü nanopartiküller i.n. ve s.c. yolla Yöntem 3.11.'de belirtildiği şekilde uygulandıktan sonra oluşan immün yanıtlar incelendi.

4.10.1. Nazal ve Subkütan Yol ile İmmünizasyondan Sonra İmmün Yanıtların İncelenmesi Çalışmaları

Formülasyonların i.n. ve s.c. yol ile uygulanmasından sonra oluşan immün yanıtları incelemek için, Yöntem 3.12.1.'de anlatıldığı gibi farelerden 13., 21., 60. ve 253. günlerde kan örnekleri ve 253. günde vajinal sıvı örnekleri toplandı ve örneklerde oluşan antikor yanıtları incelendi.

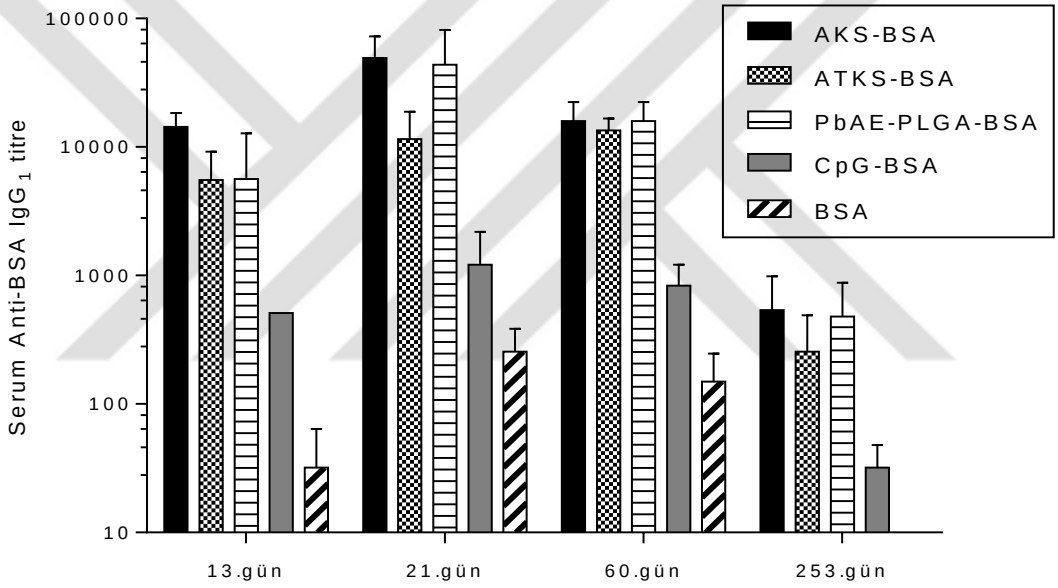
4.10.1.1. Nazal Yoldan İmmünizasyondan Sonra Antikor Yanıtlarının İncelenmesi

Nanopartikül formülasyonlarının i.n. yoldan farelere uygulanmasından sonra kuyruk veninden toplanan serumda antikor yanıtları incelendi. Formülasyonların nazal yoldan farelere uygulanmasından sonra ölçülen serum Anti-BSA IgG antikor yanıtları Şekil 4-34'te gösterilmiştir.

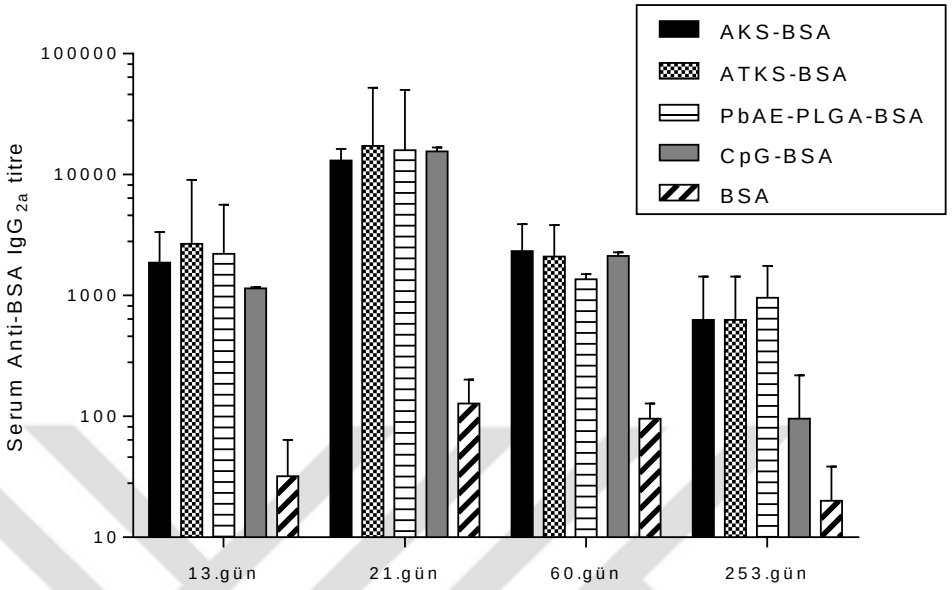


Şekil 4-34: İ.n. uygulamadan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde ölçülen serum Anti-BSA IgG titreleri

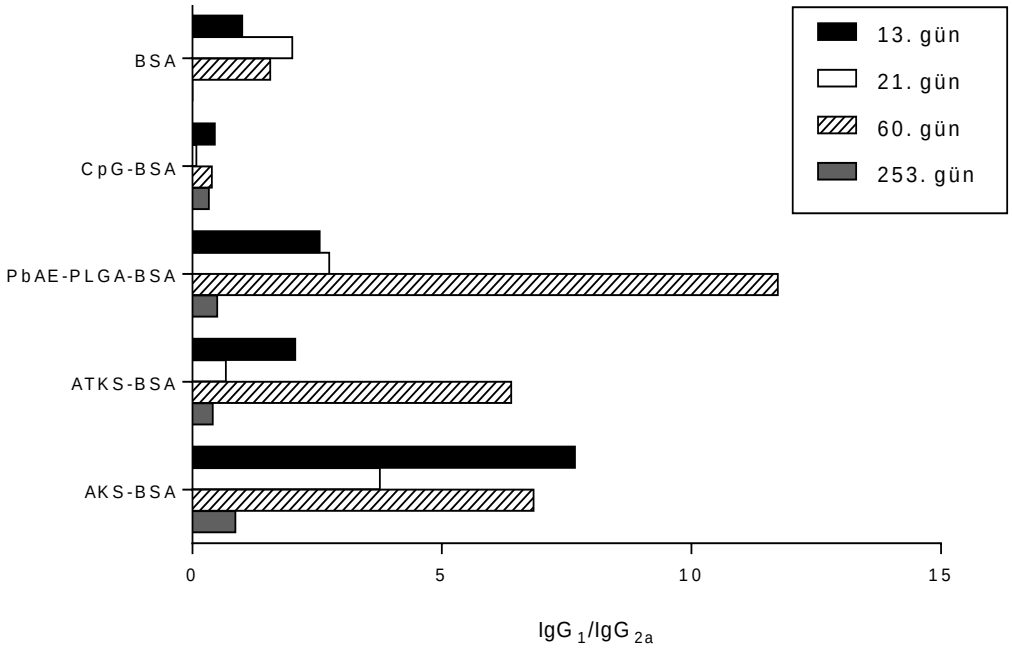
IgG antikorlarının alt grupları olan IgG_1 ve IgG_{2a} antikor yanıtları, T yardımcı lenfositlerin (Th1 ve Th2) oluşan immün yanıta etkisini belirlemektedir. IgG_{2a} antikoru Th1 immün yanıtı, IgG_1 antikoru ise Th2 immün yanıtı hakkında bilgi vermektedir. Formülasyonların i.n. yoldan farelere uygulanmasından sonra serum örneklerinde ölçülenIgG_1 antikor yanıtı Şekil 4-35'te, IgG_{2a} antikor yanıtı Şekil 4-36'da ve IgG_1/IgG_{2a} antikor oranı Şekil 4-37'de gösterilmiştir. sIgA antikor yanıtı ise Şekil 4-38'de verilmiştir.



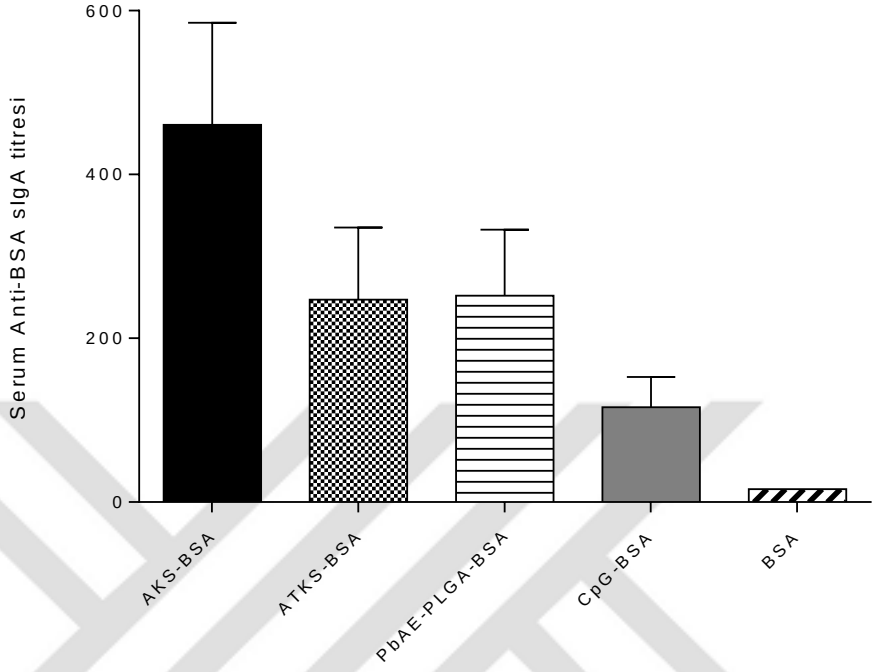
Şekil 4-35: İ.n. uygulamadan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde ölçülen serum Anti-BSA IgG_1 titreleri



Şekil 4-36: İ.n. uygulamadan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde ölçülen serum Anti-BSA IgG_{2a} titreleri



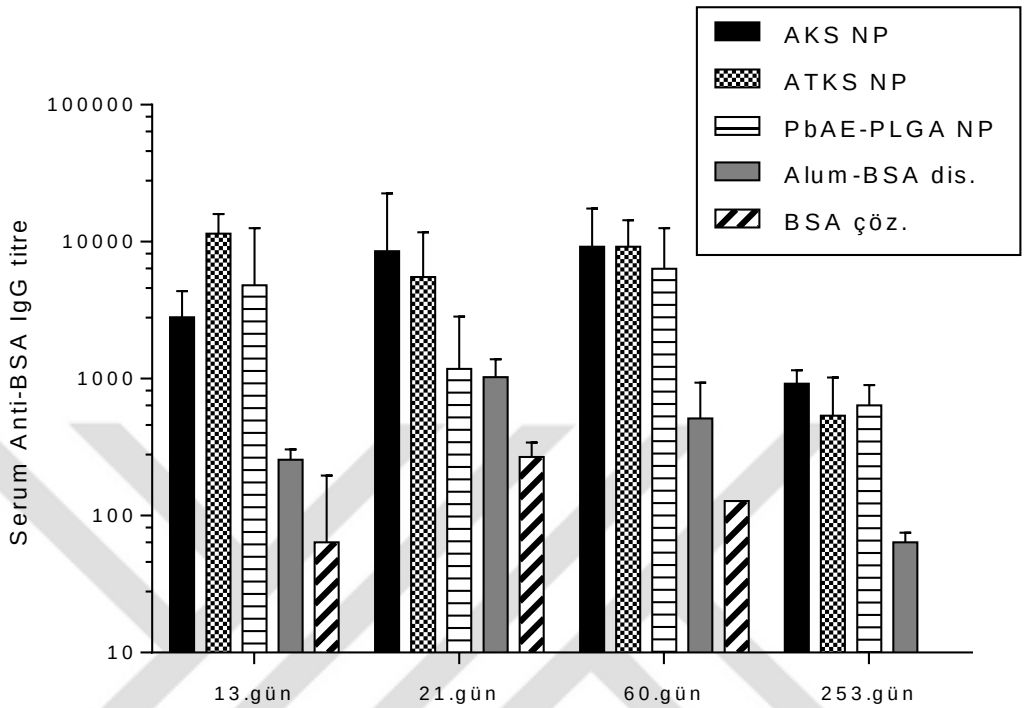
Şekil 4-37: İ.n. uygulamadan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde ölçülen serum Anti-BSA IgG_1 ve serum IgG_{2a} antikor titrelerinin oranı



Şekil 4-38: İ.n. uygulamadan sonra 253. günde vajinal yıkama çözeltisinde ölçülen sIgA antikor titreleri

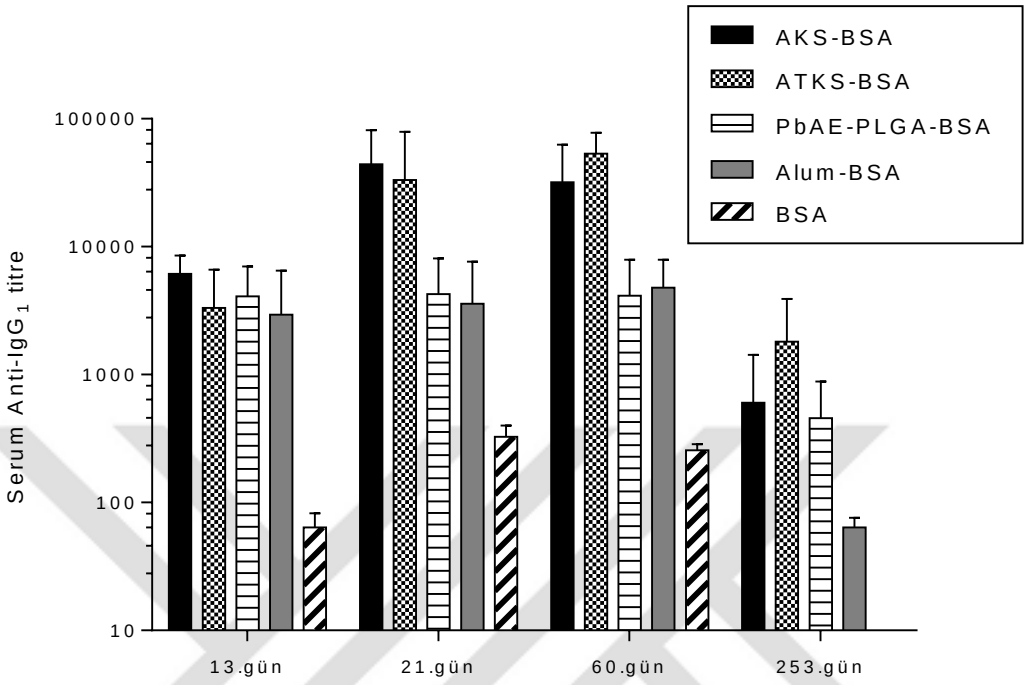
4.10.1.2. Subkütan Yol ile İmmünizasyondan Sonra Antikor Yanıtlarının İncelenmesi

Nanopartikül formülasyonlarının s.c. yoldan farelere uygulanmasından sonra kuyruk veninden toplanan serumda antikor yanıtları incelendi. Formülasyonların s.c. yoldan farelere uygulanmasından sonra ölçülen serum Anti-BSA IgG antikor yanıtları Şekil 4-39'da gösterilmiştir.

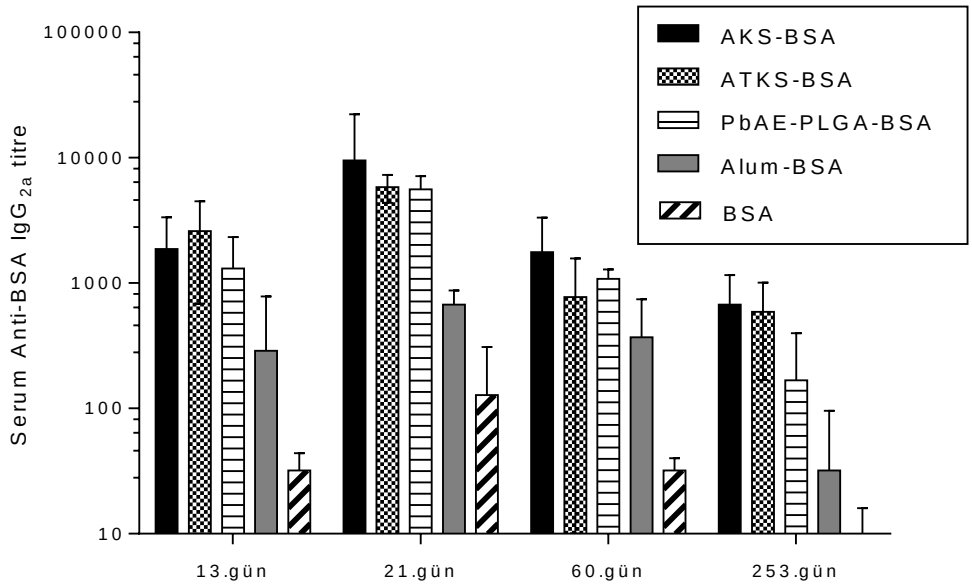


Şekil 4-39: S.c. uygulamadan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde ölçülen serum Anti-BSA IgG antikor titreleri

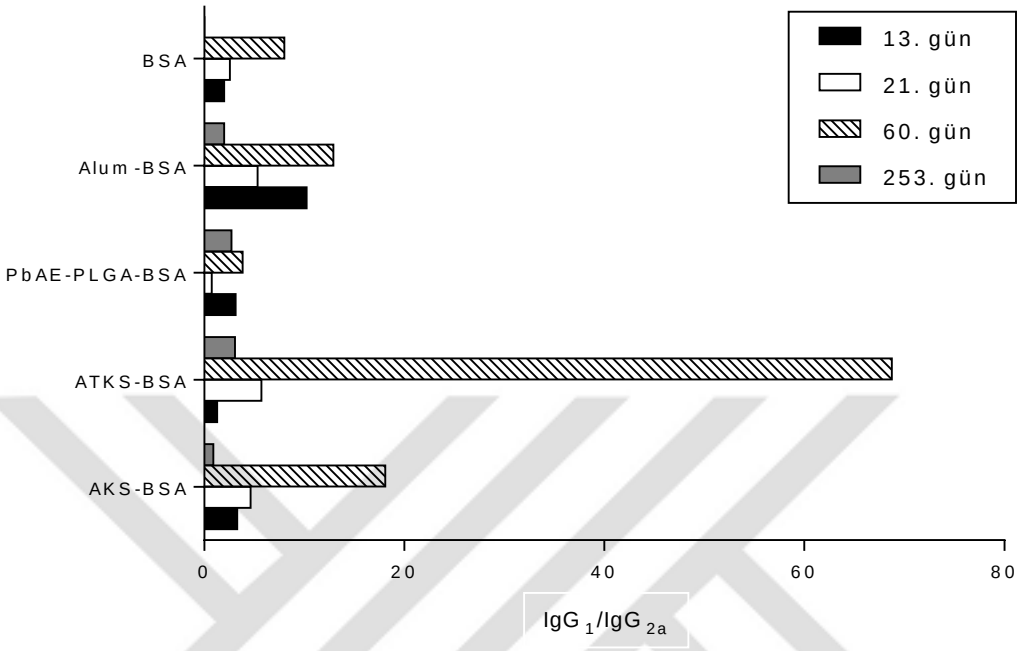
Formülasyonların s.c. yoldan farelere uygulanmasından sonra serum örneklerinde ölçülen IgG_1 antikor yanıtı Şekil 4-40'ta, IgG_{2a} antikor yanıtı Şekil 4-41'de ve IgG_1/IgG_{2a} antikor oranı Şekil 4-42'de gösterilmiştir.



Şekil 4-40: S.c. uygulamadan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde ölçülen serum Anti-BSA IgG_1 antikor titreleri



Şekil 4-41: S.c. uygulamadan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde ölçülen serum Anti-BSA IgG_{2a} antikor titreleri



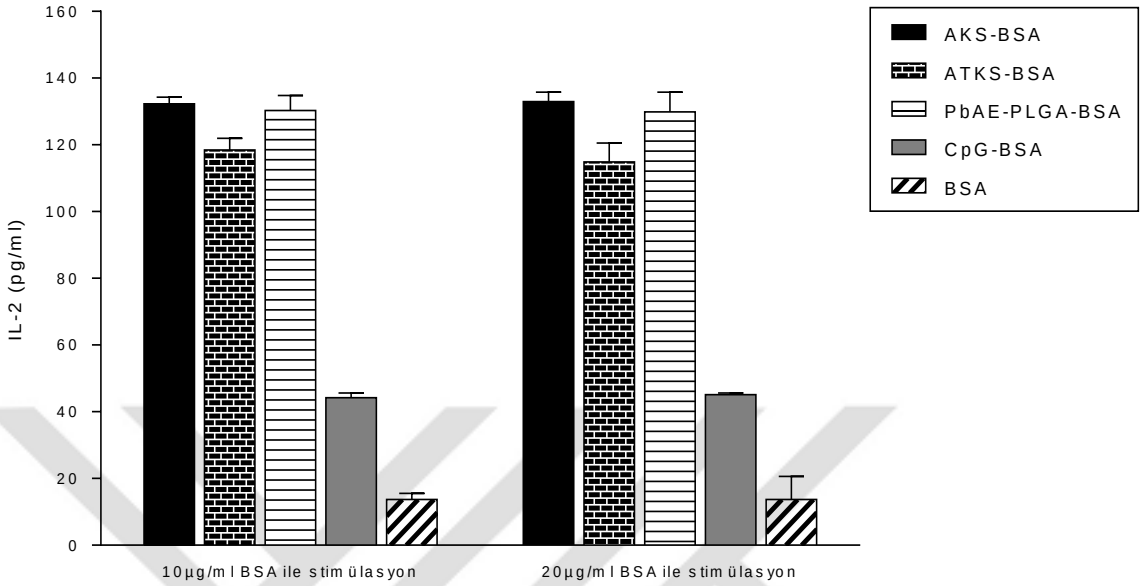
Şekil 4-42: S.c. uygulamadan sonra 13., 21., 60. ve 253. günlerde ölçülen serum Anti-BSA IgG_1 ve serum Anti-BSA IgG_{2a} antikor titrelerinin oranı

4.10.2. Nazal ve Subkütan Yol ile İmmünizasyondan Sonra *İn vitro* Ortamda Dalak Hücrelerinin Yeniden Uyarılması Sonucu Salgılanan Antijene Spesifik Sitokinlerin Analizi

4.10.2.1. Nazal Yol ile İmmünizasyondan Sonra *İn vitro* Ortamda Dalak Hücrelerinin Yeniden Uyarılması ile Salgılanan Antijene Spesifik Sitokinlerin Analizi

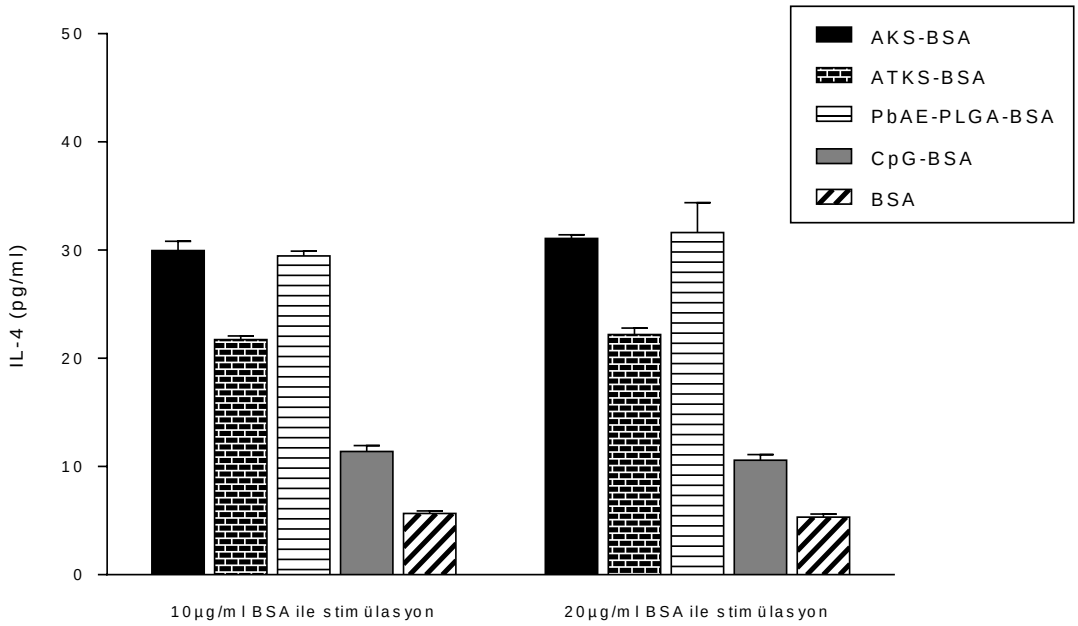
Hazırlanan formülasyonların hangi tip immün yanıta (hümoral veya hücresel) sebep olduğunu araştırmak için i.n. yolla immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücreleri model antijen (BSA) ile yeniden uyarılmış ve salgılanan antijene spesifik sitokin seviyeleri ölçülmüştür.

İ.n. yol ile immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması sonucu salgılanan IL-2 seviyelerine ait bulgular Şekil 4-43'te gösterilmiştir.



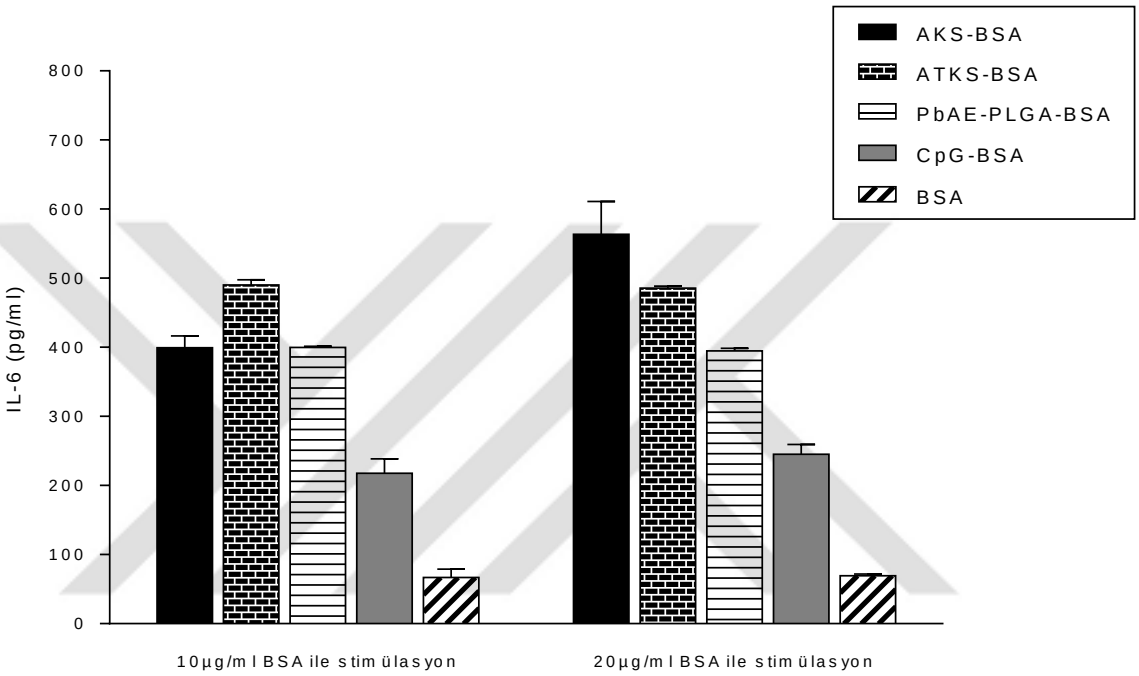
Şekil 4-43: İ.n. yoldan immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen IL-2 seviyeleri

İ.n. yol ile immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması sonucu salgılanan IL-4 seviyelerine ait bulgular Şekil 4-44'te gösterilmiştir.



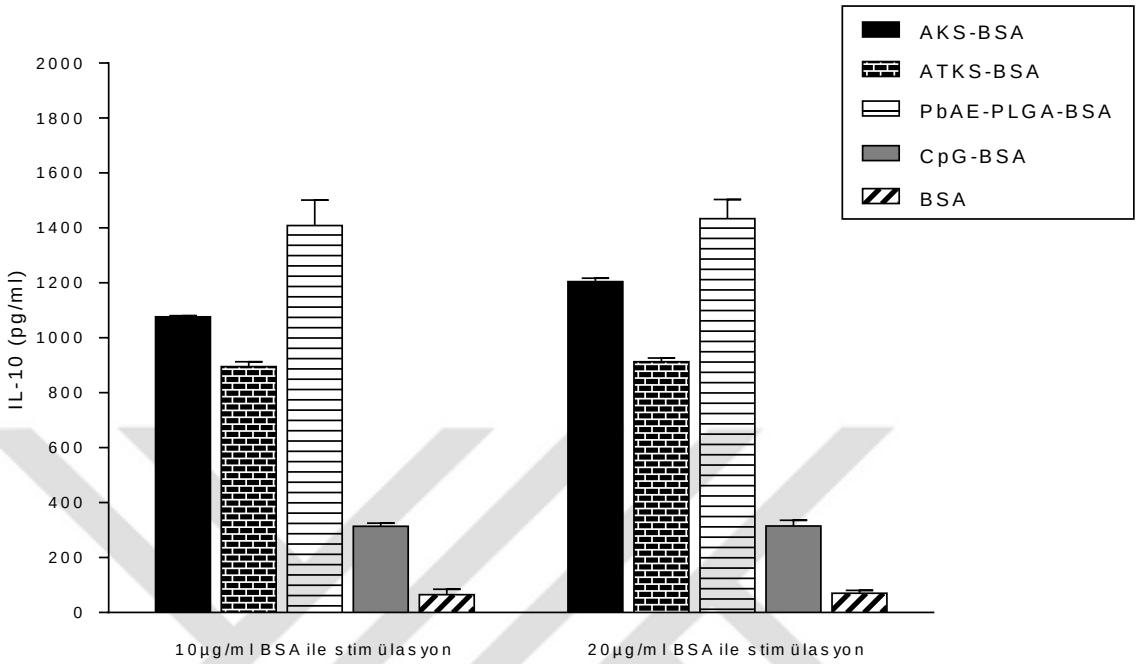
Şekil 4-44: İ.n. yoldan immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen IL-4 seviyeleri

İ.n. yol ile immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması sonucu ölçülen IL-6 seviyelerine ait bulgular Şekil 4-45'te gösterilmiştir.



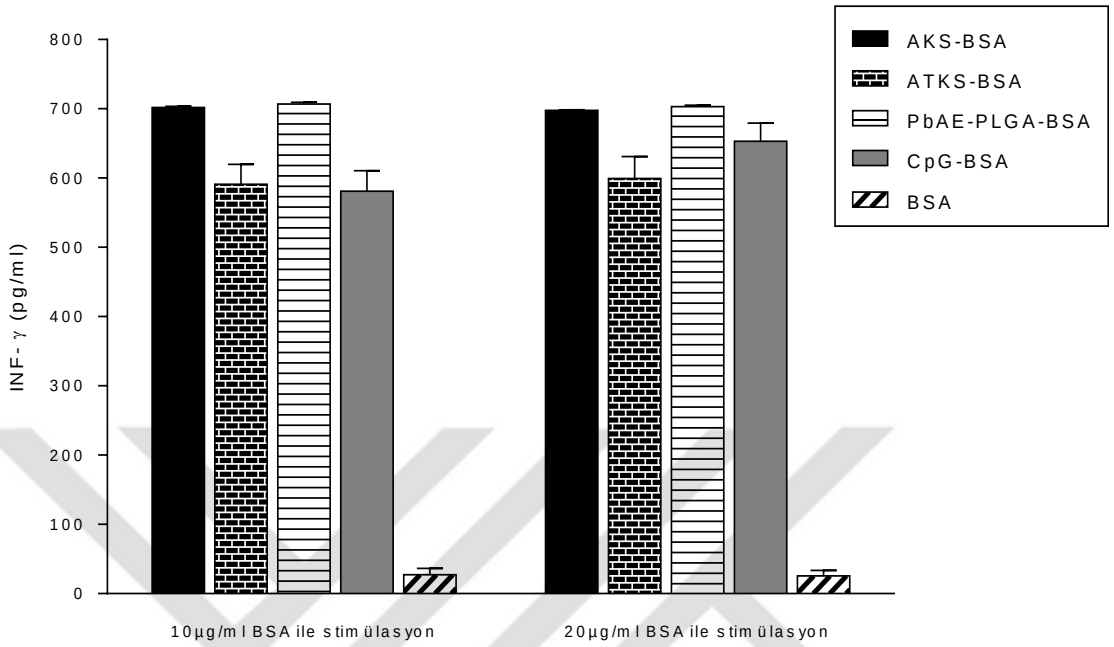
Şekil 4-45: İ.n. yoldan immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen IL-6 seviyeleri

İ.n. yol ile immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması sonucu ölçülen IL-10 seviyelerine ait bulgular Şekil 4-46'de gösterilmiştir.



Şekil 4-46: İ.n. yoldan immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen IL-10 seviyeleri

İ.n. yol ile immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması sonucu ölçülen INF-ɣ seviyelerine ait bulgular Şekil 4-47'de gösterilmiştir.

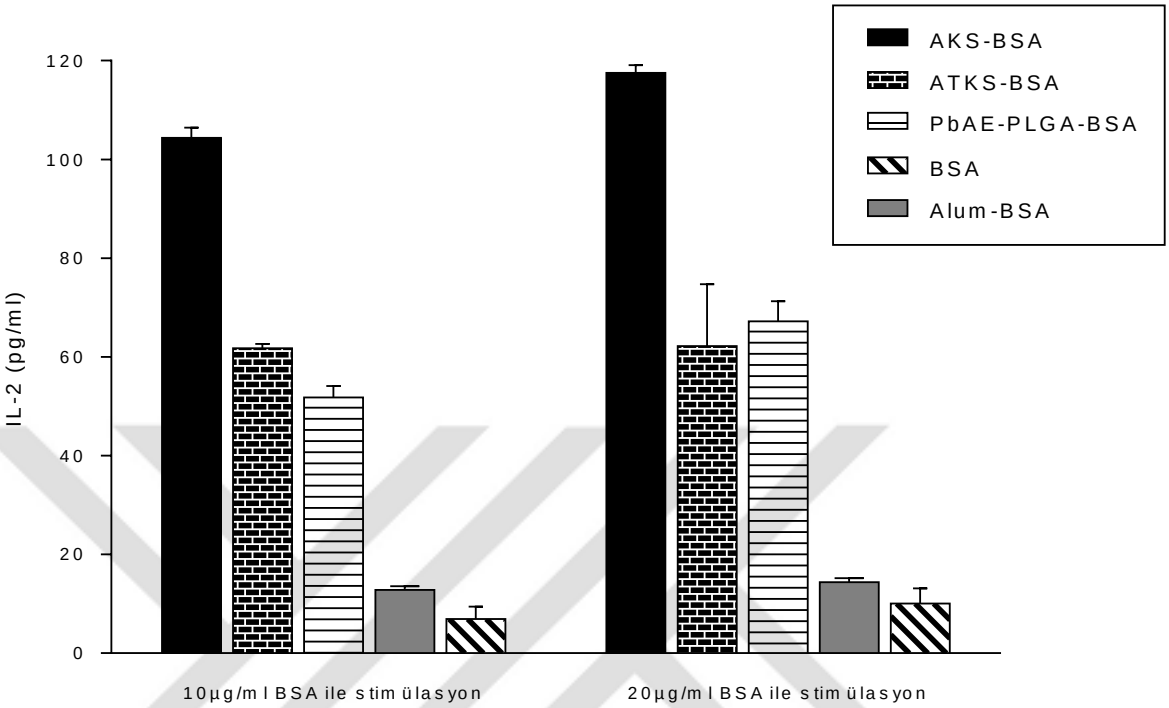


Şekil 4-47: İ.n. yoldan immünizasyondan sonra in vitro ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen INF-ɣ seviyeleri

4.10.2.2. Subkütan Yol ile İmmünizasyondan Sonra *İn vitro* Ortamda Dalak Hücrelerinin Yeniden Uyarılması sonucu Salgılanan Antijene Spesifik Sitokinlerin Analizi

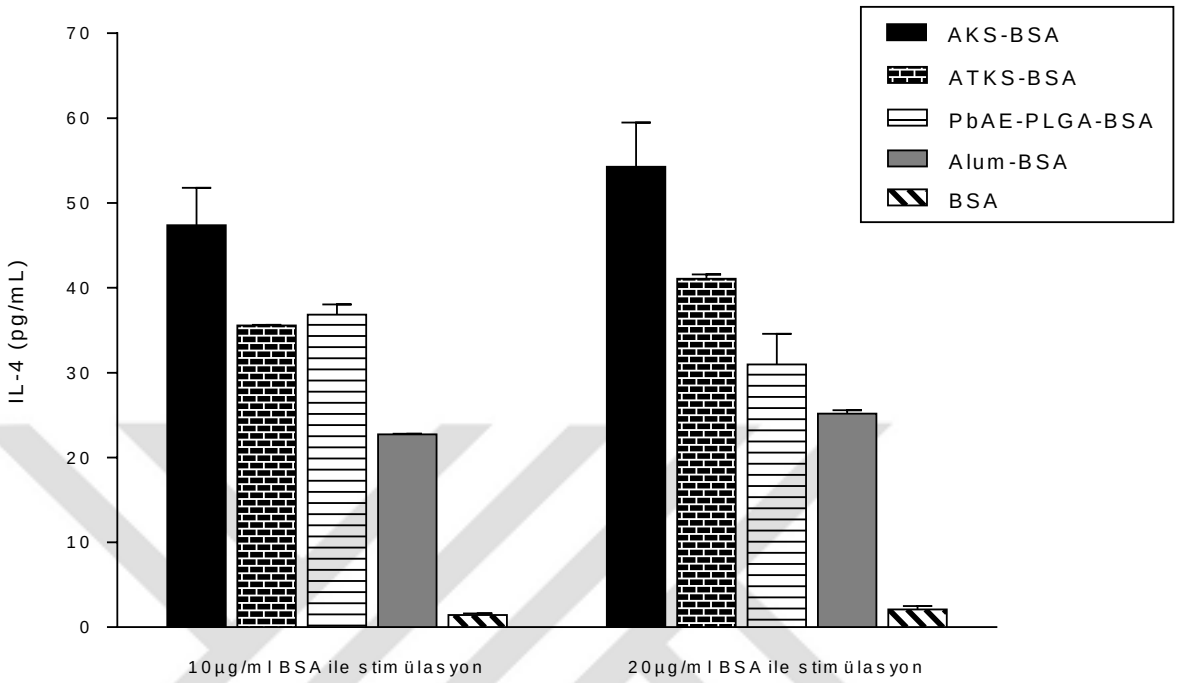
Hazırlanan formülasyonların hangi tip immün yanıta (hümoral veya hücresel) sebep olduğunu araştırmak için s.c. yol ile immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücreleri model antijen (BSA) ile yeniden uyarılmış ve salgılanan antijene spesifik sitokin seviyeleri ölçülmüştür.

S.c. yol ile immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması sonucu salgılanan IL-2 seviyelerine ait bulgular Şekil 4-48'de gösterilmiştir.



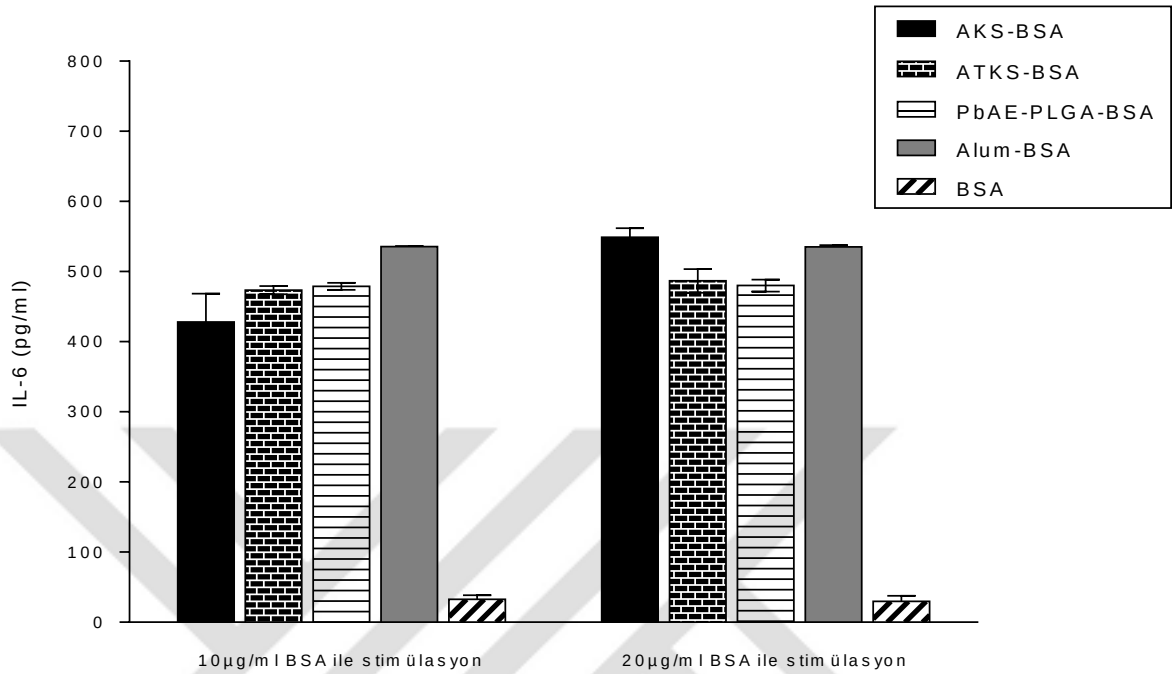
Şekil 4-48: S.c. yol ile immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen IL-2 seviyeleri

S.c. yol ile immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması sonucu ölçülen IL-4 seviyelerine ait bulgular Şekil 4-49'de gösterilmiştir.



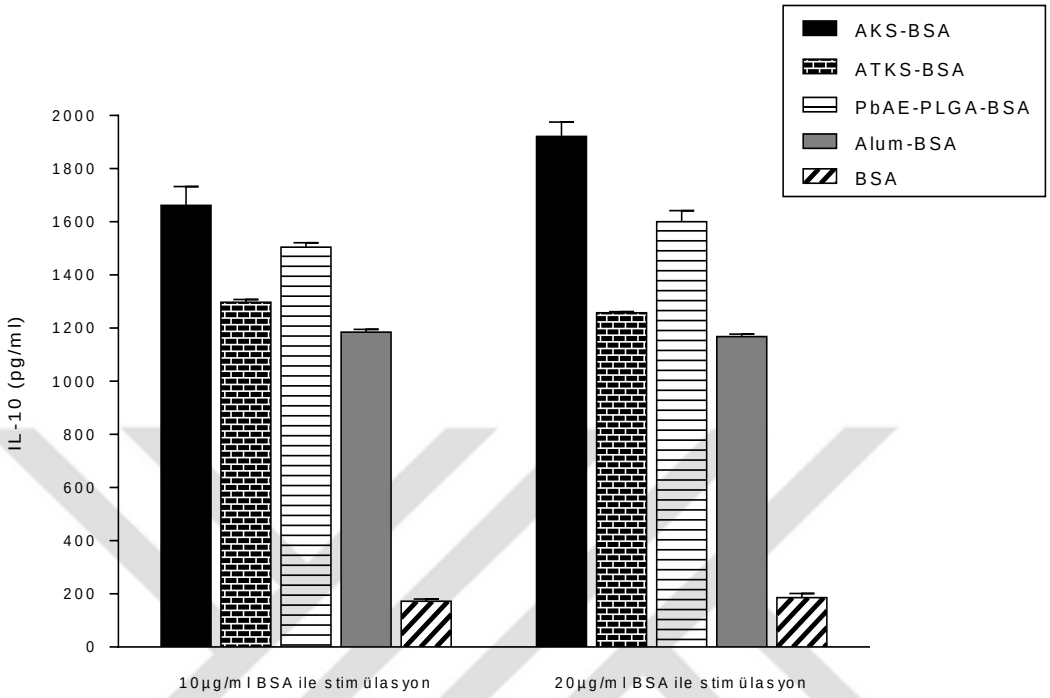
Şekil 4-49: S.c. yol ile immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen IL-4 seviyeleri

S.c. yol ile immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması sonucu ölçülen IL-6 seviyelerine ait bulgular Şekil 4-50'de gösterilmiştir.



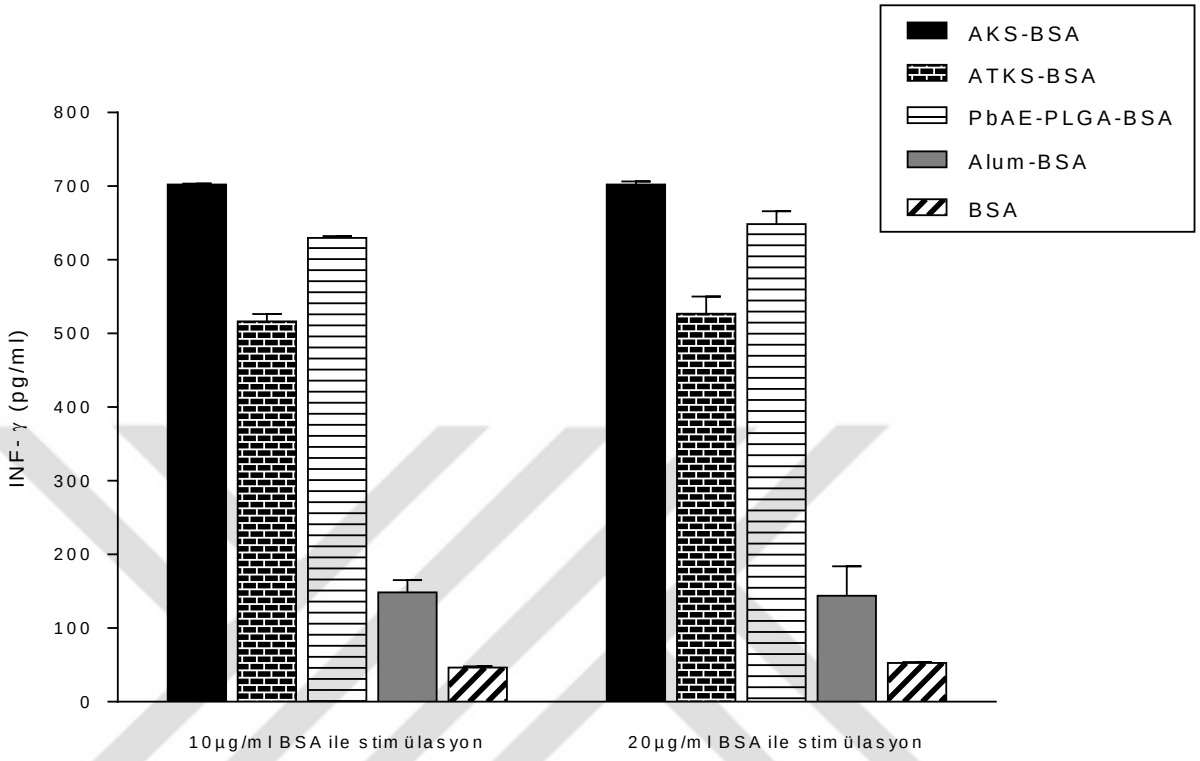
Şekil 4-50: S.c. yoldan immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen IL-6 seviyeleri

S.c. yol ile immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması sonucu ölçülen IL-10 seviyelerine ait bulgular Şekil 4-51'de gösterilmiştir.



Şekil 4-51: S.c. yoldan immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen IL-10 seviyeleri

S.c. yol ile immünizasyondan sonra *in vitro* ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması sonucu ölçülen INF-ɣ seviyelerine ait bulgular Şekil 4-52'de gösterilmiştir.



Şekil 4-52: S.c. yoldan immünizasyondan sonra in vitro ortamda dalak hücrelerinin yeniden uyarılması ile ölçülen INF-ɣ seviyeleri

5. TARTIŞMA

Mukozal yol ile uygulanan aşılar sistemik immün yanıtın yanında mukozal immün yanıt da oluşturmaktadır. Hem sistemik hem de mukozal bağışıklama için etkin bir bölge olan nazal mukozanın damar ağı açısından zengin ve geniş bir absorpsiyon alanına sahip olması, geçirgenliğinin fazla olması, aşıların bu bölgeye kolayca uygulanabilmesi ve uygulama için iğne gerektirmemesi, geniş kitlelerin kolayca aşılanabilmesine olanak sağlaması nedeniyle nazal yolu üstün kılmaktadır. Ancak, nazal yol ile uygulanan aşılar ile oluşan immün yanıtlar genelde zayıftır. Bu yüzden, nazal yol ile uygulanan aşı formülasyonlarında antijenin nazal mukozadan geçişini ve oluşturduğu immün yanıtı arttırmak, antijeni enzimatik degredasyondan ve mukosilier klirensten korumak amacıyla çeşitli adjuvanlar veya aşı taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir (Davis 2001).

Nazal yol ile uygulanan polimerik aşı taşıyıcı sistemlerin partikül boyutu, yükü ve yüzey özellikleri ayarlanarak immün yanıt optimize edilebilmektedir (Saatçi ve Bozkır 2003; Özsoy ve ark. 2009; Lawson ve ark. 2011). Partiküler sistemler kullanılan antijen için bir taşıyıcı görevi görmekle birlikte, kullanılan polimerin özelliğine bağlı immün uyarıcı özellikte göstermektedir (Ugwoke ve ark. 2005). Mikro/nanopartikül formülasyonlarını hazırlamak için en çok araştırılan polimerler, Amerikan İlaç ve Gıda Teşkilatı (FDA) tarafından da onaylanmış biyouyumlu, biyoparçalanabilir, uzun süreli antijen salımına imkan veren alifatik poliester yapısındaki poli(laktik-*ko*-glikolik asid) (PLGA) ve poli(laktik asid) (PLA) polimerleridir (Li ve McCarthy 1999; Tamber ve ark. 2005). Bu polimerlere alternatif olarak, mukozal aşı formülasyonlarının hazırlanmasında en çok araştırılan polimerlerden biri de pozitif yüklü kitosan polimeridir. Kitosan polimerinin biyouyumlu ve biyoparçalanabilir olması, düşük toksisite göstermesi ve vücuttan kolay uzaklaştırılabilmesi, ayrıca mukoadezif özelliğinden dolayı formülasyonların mukozada kalış süresini uzatması, hücrelerarası sıkı bağlantı noktalarını açıp paraselüller transportu kolaylaştırması ve böylece makromoleküllerin mukozal absorpsiyonunu arttırması, nazal yol ile uygulanan aşılarda bu polimerin kullanımını arttırmaktadır (Illum ve ark. 2001; Şenel ve McClureb 2004; Baldrick 2010; Sonaje ve ark. 2011; Garcia-Fuentes ve Alonso 2012). Poli(β-amino ester) (PbAE) polimeri ise, sentetik, pH'ya hassas, hidroliz yoluyla

parçalanabilen, biyouyumlu katyonik polimerdir. PbAE polimerinin kullanımı ile şimdiye kadar yapılan gen transfeksiyon çalışmalarında, kanser ilaçların hedeflendirilmesinde ve hücre içi alım çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edilmiştir. PbAE polimerleri kullanılarak hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemler, polinükleotid, protein, peptid, antijen ve ilaçların hücre içine hedeflendirilmesinde kullanılabilmektedir (Little ve ark. 2004; Shenoy ve ark.2005).

Yapılan tez çalışmasında, aşı taşıyıcı nanopartiküler sistemlerin geliştirilmesinde kullanılması amacıyla, modifiye kitosan türevleri (aminlenmiş kitosan ve aminlenmiş ve tiyollenmiş) ve poli(β-amino ester) polimerleri sentezlenmiştir. Kitosan polimerine amin grubunun bağlanması ve yeni sentezlenen katyonik yapıdaki poli(β-amino ester) kullanımı ile, nazal mukozada glikoproteinlerin yapısında bulunan negatif yüklü sialik asid ile etkileşecek katyonik amin gruplarının sayısı arttırılmış ve bu durumun geliştirilen nanopartiküler sistemlerin antijenin mukozada kalış süresini, hücresel alımını ve buna bağlı olarak oluşturacağı immün yanıtı arttıracağı düşünülmüştür. Kitosan polimerine ayrıca amin grubunun yanında tiyol grubu da ilave edilmiş ve tiyol grubunun mukus ile kovalent bağ ile bağlanarak hazırlanan nanopartiküllerin daha yüksek biyoadezyon göstereceği ve bunun da bu polmer ile hazırlanan nanopartiküllerin mukozada ki kalış süresini arttıracağı öngörülmüştür.

Sentezlenen polimerlerin yapısı FT-IR ve ^{1}H-NMR çalışmaları ile incelenmiştir. Kitosan polimeri üzerinde yapılan modifikasyonlar FT-IR ve ^{1}H-NMR çalışmaları ile doğrulanmıştır. Kitosan, aminlenmiş kitosan (amin-kitosan) ve aminlenmiş ve tiyollenmiş kitosan (amin-tiyol-kitosan) polimerlerine ait FT-IR spektrumları Şekil 4-1'de verilmiştir. Aminlenmiş kitosan polimerine ait FT-IR spektrumunda, maksimumları 1380 cm^{-1} ve 1320 cm^{-1} de olmak üzere yaklaşık 1400-1300 cm^{-1} aralığında görülen kitosan molekülündeki metilol gruplarının bükülme titreşimlerine ait absorpsiyon piklerinin yok olması veya şiddetlerinin çok azalarak geniş bir omuz haline gelmiş olması, buna karşın maksimumları 1570 cm^{-1} ve 1404 cm^{-1} de olan, sırasıyla amin bileşiğindeki sekonder amin yapısındaki -NH bağının deformasyon titreşimine ait ve oluşan alifatik eter yapısındaki -CH_2OCH_2- bağlarının gerilme titreşimlerine ait yeni absorpsiyon piklerinin ortaya çıkması, aminleme reaksiyonunun kitosan molekülündeki metilol grupları ile amin bileşiğindeki metilol

grupları arasında gerçekleştiğini göstermektedir. FT-IR analizinden elde edilen sonuçlar kitosan polimeri üzerinde yapılan modifikasyonları doğrulamıştır.

Aminlenmiş ve tiyollenmiş kitosan polimerine ait FT-IR spektrumunda (Şekil 4-1), 1716 cm^{-1} dalga boyunda görülen küçük bandın oluşan amid yapısındaki C=O bağının gerilme titreşimine ait, maksimumları 1558 cm^{-1}, 1538 cm^{-1} ve 1523 cm^{-1} de olan yaklaşık 1570-1500 cm^{-1} aralığındaki küçük piklerin oluşan amid yapısındaki -C-N bağlarının gerilme titreşimlerine ait, maksimumu 1416 cm^{-1} deki ufak omuzun -CH_2SH grubundaki -CH_2 bağının deformasyon titreşimine ait, maksimumları 1381 cm^{-1}, 1310 cm^{-1} ve 1250 cm^{-1} de olan orta şiddetteki piklerin oluşan amid yapısındaki -CN ve -NH bağlarının gerilme ve bükülme titreşimlerine ait ve maksimumu 899 cm^{-1} deki ufak pikin -CH_2SH grubundaki serbest -SH bağının deformasyon titreşimine ait yeni absorpsiyon pikleri görülmektedir. Bu piklerin yanında, tiyoglikolik asit (TGA) molekülündeki serbest -SH gruplarını içeren -CH_2SH grubundaki -CH_2 bağının asimetrik gerilme titreşimine ait 2945-2855 cm^{-1} dalga boyunda görülmesi beklenen pik, FT-IR spektrumunda 2926 cm^{-1} de görülmüş ve pikin şiddetinde artış meydana gelmiştir. Benzer şekilde, oluşan amid yapısındaki -C=O bağının gerilme titreşimine ait 1631 cm^{-1} de görülen pikin, kitosan polimerine ait spektrumda bulunan ve moleküldeki serbest -OH gruplarının deformasyon titreşimine ait pikin şiddeti artmış ve yine -CH_2SH grubundaki serbest -SH bağının deformasyon titreşiminden ileri gelen 1250 cm^{-1} deki absorpsiyon pikinin, oluşan amid yapısındaki -CN ve -NH bağlarının gerilme ve bükülme titreşimlerine ait pik ile girişim yaptığı görülmüştür. Bu sonuçlar, TGA molekülündeki -COOH grupları ile amin-kitosan polimerinin amin grupları arasında amid yapısının oluşmasına bağlı olarak amin-kitosan arasındaki reaksiyonun gerçekleştiğini göstermektedir. FT-IR analizleri, amin-kitosan ve amin-tiyol-kitosan polimerleri üzerinde yapılan modifikasyonları doğrulamıştır. Elde edilen sonuçlar literatürde kayıtlı sonuçlar ile uyumludur (Peniche ve ark. 1999; Anitha ve ark. 2011).

Kitosan, amin-kitosan ve amin-tiyol-kitosan polimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları sırasıyla Şekil 4-3, Şekil 4-4 ve Şekil 4-5'te verilmiştir. Kitosan polimerine ait spektrumda (Şekil 4-3), kitosanın yapısında bulunan -CH_2OH gruplarının metilen (-CH_2-) protonlarının ve hidroksil (-OH) protonlarının sinyalleri 0.854 ppm, 1.236 ppm ve 1.467 ppm'de görülmektedir. Benzer şekilde, -CH_2OH gruplarının hidroksil (-OH) protonlarının sinyalleri 1.897 ppm, 1.979 ppm, 2.164 ppm, 2.362 ppm, 2.636 ppm ve 5.323 ppm'de görülmektedir.

Bunlara ilaveten, kitosan yapısındaki tekrarlı birimlerdeki -CH_2-, -NH_2 ve -CH- gruplarının protonlarına ait sinyaller ise 0.854 ppm, 1.897 ppm, 1.979 ppm, 2.087 ppm, 2.164 ppm ve 2.636 ppm'de bulunmaktadır.

Kitosanın yapısına N-(2-hidroksietil) etilendiamin bileşiği eklenerek sentezlenmiş amin-kitosan bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumunda (Şekil 4-4), kitosan spektrumunda bulunan -CH_2OH gruplarının hidroksil (-OH) protonlarına ait 1.467 ppm, 1.979 ppm ve 2.164 ppm'de görülen sinyaller kaybolmuş ve 1.234 ppm'deki sinyalin ise şiddeti azalmıştır. Buna karşın, amin-kitosan polimerinin spekrumunda, 1.146 ppm, 1.132 ppm, 1.899 ppm ve 2.025 ppm'de -CH_2-CH_2-NH-CH_2- yapısındaki metilen (-CH_2-) protonlarına ait, 1.768 ppm'de -CH_2-O-CH_2-CH_2- yapısındaki metilen (-CH_2-) protonlarına ait, yaklaşık 2.6-2.9 ppm arasındaki bölgede üç adet yarılmış halde -CH_2-CH_2-NH-CH_2- ve -CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH_2 yapılarındaki metilen (-CH_2-) protonlarına ait ve yaklaşık 3.2-3.6 ppm bölgesinde ise DMSO daki su piki ile girişimli olarak başlıca 3.457 ppm, 3.468 ppm ve 3.479 pmm'de üçe ayrılmış halde bulunan –CH_2-O-CH_2-CH_2- yapısındaki metilen (-CH_2-) protonlarına ait yeni sinyallerin ortaya çıktığı görülmektedir. Bu durum, kitosan ile amin bileşiği arasındaki modifikasyon reaksiyonunun, Şekil 3-2'de görülen reaksiyondaki gibi amin bileşiğinin -OH grubu ile kitosandaki serbest -CH_2OH gruplarındaki -OH grupları arasında eter bağı oluşturacak şekilde gerçekleştiğini doğrulamaktadır.

Amilenmiş kitosan polimerinin tiyoglikolik asit (merkapto asetik asit) bileşiği ile tiyollenmesi modifikasyonundan elde edilen amin-tiyol-kitosan polimerinin ^{1}H-NMR spektrumu Şekil 4-5'te gösterilmiştir. Bu spektrumda, kitosan ve amin-kitosan polimerlerinin spektrumlarında bulunmayan yeni sinyaller ortaya çıkmıştır.

Bu yeni sinyaller; alifatik tiyol bileşiklerindeki -SH gruplarının protonlarına ait olarak 0.920 ppm, 1.050 pmm, 1.299 ppm, 1.909 ppm ve 3.529 ppm'de, amid (-C=O-NH-CH_2-CH_2-) yapısındaki -NH- protonlarına ve yine amid yapısındaki (-CH_2-C=O-NH-) karbonil grubuna (C=O) komşu metilen (-CH_2-) protonlarına ait olarak 2.153 ppm, 2.430 ppm, 2.958 ppm, 3.780 ppm ve 3.893 ppm, 5.018 ppm, 5.133 ppm, 5.518 ppm ve 8.623 ppm'de ortaya çıkmıştır. Bu durum, aminlenmiş kitosan ile tiyoglikolik asit bileşiği arasındaki modifikasyon reaksiyonunun, Şekil 3-3'te görüldüğü gibi, tiyol bileşiğinin -COOH grubu ile aminlenmiş kitosan bileşiğindeki serbest -NH_2 grupları arasında amid bağı

oluşarak gerçekleştiğini doğrulamaktadır ve literatürde kayıtlı sonuçlar ile benzerdir (Asahi Research Center 2013).

Çalışma kapsamında, doğal kaynaklı modifiye kitosan polimerlerinin dışında, pozitif yüklü poli(β-amino ester) polimeri de sentezlenmiş ve yapısı FT-IR ve ^{1}H-NMR çalışmaları ile ispatlanmıştır. Şekil 4-2'de verilen PbAE polimerinin FT-IR spektrumunda, 1680-1600 cm^{-1} aralığında maksimumu yaklaşık 1620 cm^{-1} de olması gereken diakrilat bileşiğinin yapısında bulunan vinil grubundaki C=C bağının gerilme titreşimine ait büyük keskin pikin görülmemesi, bunun yanında sentezlenen ester yapısının sekonder amin yapısında olması nedeniyle spektrumdaki 3100-3500 cm^{-1} aralığında sekonder amin grubundaki (CH_2-NH-CH_2) bağının gerilme titreşiminden ileri gelen geniş ve yayvan pikin de omuz şeklinde görülmesi, diakrilat bileşiği ile etilendiamin bileşiği arasındaki reaksiyonun gerçekleştiğini ve ester yapısındaki PbAE polimerinin sentezlendiği gösterilmektedir.

PbAE polimerin ^{1}H-NMR spektrumu Şekil 4-6'da gösterilmiştir. Bisfenol A bileşiğine ait ünitelerde yer alan (-CH-) protonlarına ait kimyasal kayma değerleri sırasıyla yaklaşık 7.08 ppm ve 6.81 ppm'de görülmektedir. PEG yapısındaki metilen (-CH_2-) gruplarının protonlarına ait kayma değerleri 4.3 ppm ve 4.118 ppm'de, diamin ünitelerinin (-$NHCH_2$-) protonlarına ait kayma değerleri ise 2.7 ppm ve 1.5 ppm'de görülmektedir (Akinc ve ark. 2003; Silva ve ark. 2010; Huang ve ark. 2015). Ayrıca PbAE polimerinin spektrumunda, bisfenol A etoksilat diakrilatın yapısında bulunan (-CH_2=CH-) protonlarına ait 6.21 ppm, 6.05 ppm ve 5.82 ppm'de ki spesifik kayma değerlerinin kaybolduğu görülmektedir (Weng ve ark. 2012). Bu sonuçlar, PbAE polimerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.

Çalışma kapsamında sentezlenen modifiye kitosan polimerleri ve PbAE polimeri ile ticari PLGA polimeri kullanılarak, nazal yol ile uygulanan antijen taşımak amacıyla amin-kitosan nanopartikülleri, amin-tiyol-kitosan nanopartikülleri ve PbAE-PLGA nanopartikülleri hazırlanmıştır.

Kitosan nanopartiküllerinin hazırlanmasında en yaygın kullanılan yöntem, kitosanın tripolifosfat (TPP) ile iyonik jelasyonuna dayanmaktadır. Bu yöntem ile farklı boyutlarda nanopartiküllerin hazırlanması mümkündür (Gana ve ark. 2005; Liang ve ark. 2011). Asidik ortamda, kitosan molekülünde bulunan -NH_2 grupları -NH_3^+ şeklinde protonize

olmakta ve TPP gibi polianyonlar ile kompleks oluşumuna bağlı olarak partiküller oluşturmaktadır (Lee ve ark. 2001). İyonik jelasyon yönteminde, homojenizasyon veya sonikasyon gibi makromoleküllerin biyolojik etkilerinin yok olmasına neden olabilecek etkenler bulunmadığından, güvenilir bir nanopartikül hazırlama yöntemidir (Piñón-Segundo ve ark. 2012). İyonotropik jelasyon yöntemi ile hazırlanan amin-kitosan:TPP ve amin-tiyol-kitosan:TPP nanopartiküllerinin hazırlama ortamının, partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyele etkisini incelemek amacıyla önformülasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda nanopartiküller, farklı polimer:TPP oranlarında (1:1-5:1 a/a) ve farklı çözücü ortamında (distile su, %0,9 NaCl çözeltisi ve fosfat tamponu (pH 7,4) hazırlanmış ve hazırlama ortamının partikülün fiziksel stabilitesine etkisini incelemek için 1 ay boyunca 4±1°C'de bekletilmiştir. Elde edilen bulgular incelendiğinde, hem polimer:TPP oranının hem de nanopartikül hazırlama ortamının, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımını etkilediği görülmüştür (amin-kitosan:TPP NP'ler Tablo 4-13, Tablo 4-14 ve Tablo 4-15; amin-tiyol-kitosan:TPP NP'ler Tablo 4-16, Tablo 4-17 ve Tablo 4-18). Amin-kitosan:TPP oranı 1:1 (AKS-B1) ve 2:1 (AKS-B2) olan ve distile su içinde hazırlanan formülasyonlar bir hafta sonra, %0,9 NaCl ve fosfat tamponunda (pH 7,4) hazırlanan formülasyonlar ise hemen agrege olmuştur. Yine, fosfat tamponunda (pH 7,4) ve 3:1 polimer oranında hazırlanmış amin-kitosan:TPP (AKS-B3) nanopartikülleri hazırlandıktan hemen sonra agregasyon göstermiştir. 4:1 polimer oranında hazırlanan AKS-B4 ve 5:1 polimer oranında hazırlanan AKS-B5 nanopartikül formlasyonları daha stabildir. En küçük partikül büyüklüğüne sahip nanopartikül formülasyonları, distile su içinde 4:1 polimer oranında hazırlanmış AKS-B4 (137,7±5,80 nm), %0,9 NaCl ortamında 3:1 polimer oranında hazırlanmış AKS-B3 (97,94±2,73 nm) ve fosfat tamponu (pH 7,4) içinde 4:1 polimer oranında ortamında hazırlanmış AKS-B4 (103,45±0,35 nm) formülasyonlarıdır.

Amin-tiyol-kitosan polimeri ile hazırlanan nanopartiküllerde (ATKS) ise, distile su ortamında 3:1 polimer oranında hazırlanan ATKS-B3 formülasyonu (106,10±1,21 nm), %0,9 NaCl içinde 5:1 polimer oranında hazırlanan ATKS-B5 (88,48±0,81 nm) ve fosfat tamponunda (pH 7,4) 5:1 polimer oranında hazırlanan ATKS-B5 formülasyonu (91,97±1,02 nm) en küçük partikül büyüklüğüne sahip formülasyonlardır. ATKS nanopartiküllerinden distile su ortamında hazırlanan ATKS-B1 (polimer oranı 1:1) ve ATKS-B2 (polimer oranı 2:1) formülasyonlarında partiküller hazırlandıktan hemen sonra

agregasyona uğramıştır. %0,9 NaCl ortamında hazırlanan ATKS-B1 (polimer oranı 1:1) formülasyonu hazırlandıktan hemen sonra, ATKS-B2 (polimer oranı 2:1) formülasyonunda ise bir hafta sonra partikül boyutunda artış görülmüştür. Fosfat tamponu ortamında hazırlanan ATKS-B1 (polimer oranı 1:1) ve ATKS-B2 (polimer oranı 2:1) formülasyonları da hazırlandıktan hemen sonra agrege olurken, ATKS-B3 (polimer oranı 3:1) formülasyonu bir hafta sonra agregasyona uğramıştır. Distile su ortamında ATKS-B3 (polimer oranı 3:1), ATKS-B4 (polimer oranı 4:1) ve ATKS-B5 (polimer oranı 5:1) formülasyonların, %0,9 NaCl ve fosfat tamponu (pH 7,4) ortamında ATKS-B4 (polimer oranı 4:1) ve ATKS-B5 (polimer oranı 5:1) formülasyonların dört hafta sonunda diğer formülasyonlara kıyasla daha stabil olduğu görülmüştür.

López-León ve ark. (2005), kitosan-TPP nanopartiküllerinin fizikokimyasal özelliklerini incelemiş ve hazırlama ortamının pH'sının asitten baziğe değişmesinin partiküllerin elektriksel itme kuvvetlerinin azalmasına neden olduğunu ve bu nedenle kitosan–TPP partiküllerinin izoelektrik noktaya yakın pH'larda stabil olmadığını göstermiştir. Ayrıca, hazırlama ortamının iyonik gücündeki değişikliklerin partikül yapısında önemli değişikliklere neden olduğu ve potasyum klorürün düşük ve orta konsantrasyonlarda hazırlama ortamına ilave edilmesinin kitosan-TPP arasındaki iyonik bağları zayıflattığı ve bunun da partiküllerin şişip hızla dağılmasına neden olduğunu göstermiştir. Huang ve Lapitsky (2011) çalışmalarında, sodyum klorür ilavesinin kitosan:TPP arasındaki iyonik bağlara etkisini incelemiş ve hazırlama esnasında orta konsantrasyonda sodyum klorür (150 mM) ilavesinin kolloidal sistemin stabilitesini artırdığını, yüksek iyonik güçlerin varlığında (500 mM NaCl) ise kitosan:TPP arasındaki bağların zayıflaması ile mikrojel oluşmadığını göstermiştir. Literatürde kayıtlı diğer çalışmalarda da, kolloidal sistemlerin stabilitesinin partiküllerin elektriksel durumuna ve ortamın iyonik gücüne bağlı olduğu gösterilmiştir (Dautzenberg 2001; Ortega-Vinuesa ve Bastos-González 2001).

Fosfat tamponunda (pH 7,4) hazırlanan hem amin-kitosan hem de amin-tiyol-kitosan partiküllerde daha yüksek oranda agregasyon görülmüştür. Kitosanın pKa değeri nötrale yakın olduğundan, hafif bazik pH'larda partiküller tamamen yüksüz hale geçerek kendiliğinden agrege olmaktadır. Agregasyon, polimerin yükünde meydana gelen değişikliklerden kaynaklanmakta ve partiküllerin kolloidal stabilitesinin kaybedilmesine

neden olmaktadır. Bu yüzden, ortamdaki elektriksel yüklerin incelenmesi agregasyon olaylarının değerlendirilmesi ve anlaşılması için önemlidir (López-León ve ark. 2005). Yapılan bir diğer çalışmada, partikül hazırlama ortamının ve partikül hazırlandıktan hemen sonraki partikül boyutunun formülasyonların stabilitesi üzerine etkisi incelenmiş. Partiküllerin hazırlandıktan hemen sonraki partikül boyutunun formülasyonların stabilitesini etkilediği ve fosfat tamponunda +25±5°C'de 10 gün boyunca bekletilen büyük partiküllerin boyutu azalırken, daha küçük partiküllerin boyutu arttığı görülmüştür. Bu durumun, kitosan moleküllerinde görülen protonasyon veya deprotonasyon olaylarına bağlı olduğu düşünülmektedir (Tsai ve ark. 2011).

Optimizasyon çalışmaları sonucunda nanopartikülleri hazırlamak için en ideal ortamın distile su olduğu görülmüş ve bundan sonraki çalışmalarda kullanılacak nanopartiküllerin hazırlanmasında hazırlama ortamı olarak distile su seçilmiştir.

Modifiye kitosan polimeri ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına zayıf bir model antijen olan sığır serum albümin proteini (BSA) yüklenmiş ve formülasyonların +4±1°C ve +25±5°C'de stabilitesi araştırılmıştır. İyonik jelasyon yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllere makromolekül veya ilaç yüklendiğinde, yüklenen maddenin iyonik grupları ile nanopartikülün jel ağı arasındaki bir etkileşim olduğu ve bu durumun partiküllerin fiziksel stabilitesini arttırdığı literatürde kayıtlıdır (López-León ve ark. 2005). BSA yüklenmiş nanopartikül formülasyonları ile yapılan optimizasyon çalışmalarında, distile su ortamında hazırlanan modifiye kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğünün, yüzey yükünün, stabilitesinin ve BSA enkapsülasyon etkinliğinin, nanopartiküllerdeki polimer:TPP oranından önemli derecede etkilendiği görülmüştür. Hazırlanan tüm BSA yüklü modifiye kitosan nanopartiküllerinin pozitif yüklü olduğu tespit edilmiştir. Nanopartiküllerin polimer:TPP oranındaki artış ile partiküllerin zeta potansiyelleri de artış göstermiştir (amin-kitosan:TPP NP'ler Tablo 4-23 ve Tablo 4-24; amin-tiyol-kitosan:TPP NP'ler Tablo 4-27 ve Tablo 4-28). Hazırlamadan hemen sonra amin-kitosan:TPP nanopartiküllerinin zeta potansiyel değeri +31,10 – +50,15 mV arasında değişirken, amin-tiyol-kitosan:TPP nanopartiküllerine ait değerler +26,8 – +43,05 mV arasında değişmektedir. Pozitif yük, kitosan polimerinin yapısında pozitif amin gruplarından ve polimerin çözündüğü ortamın zayıf asidik özelliğinden kaynaklanmaktadır. Literatürde de belirtildiği gibi (Janes ve Alonso 2003; Fan ve ark. 2012),

formülasyonlardaki negatif yüklü TPP konsantrasyonun artışına bağlı modifiye kitosan:TPP nanopartiküllerinin zeta potansiyelinde azalma görülmüştür. Modifiye kitosan polimeri ile hazırlanan tüm BSA yüklü nanopartikül formülasyonları 1:1 ve 2:1 polimer:TPP oranında agregasyon gösterirken, bu oran arttığında partikül boyutunun küçüldüğü görülmüştür. AKS-3, AKS-4, AKS-5, AKS-6, AKS-7 ve AKS-8 formülasyonlar arasında amin-kitosan:TPP partiküllerin ortalama partikül çapı 125,23 – 184,60 nm arasında iken ATKS-3, ATKS-4, ATKS-5, ATKS-6, ATKS-7 ve ATKS-8 formülasyonlar arasında amin-tiyol-kitosan:TPP partiküllerin ortalama partikül çapı 110,03 – 164,63 nm arasında olduğu bulunmuştur (amin-kitosan:TPP NP'ler Tablo 4-21; amin-tiyol-kitosan:TPP NP'ler Tablo 4-25). Polimer:TPP oranının 3:1 olduğu amin-kitosan:TPP (AKS-3: 125,23 nm) ve amin-tiyol-kitosan:TPP (ATKS-3: 110,03 nm) nanopartiküllerinin kendi grupları içinde en küçük partikül büyüklüğüne sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca, polimer:TPP oranının 3:1 olduğu formülasyonlar +4±1°C'de (amin-kitosan:TPP NP'ler Tablo 4-21; amin-tiyol-kitosan:TPP NP'ler Tablo 4-25) ve oda sıcaklığında (+25±5°C) (amin-kitosan:TPP NP'ler Tablo 4-22; amin-tiyol-kitosan:TPP NP'ler 4-26) 1 sene boyunca saklandığında, partikül büyüklüklerinde ve zeta potansiyellerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik görülmemiş ($p>0,05$) ve tüm formülasyonlar içinde en iyi fiziksel stabiliteyi göstermiştir. Diğer formülasyonlarda zamana bağlı partikül büyüklüğünde artış görülmesi, zeta potansiyellerinde görülen azalma ile açıklanabilir. Zamanla zeta potansiyelin azalması ile partiküllerin yüzey enerjilerinde artış görülmekte ve partiküller arası kohezyon kuvvetlerinin artışına bağlı olarak agregasyon gelişmektedir. Amin-kitosan:TPP ve amin-tiyol-kitosan:TPP partiküllerinin büyüklük dağılımı (polidispersite indeksi) sırasıyla 0,34 – 0,40 ve 0,39 – 0,45 aralıklarında değişmektedir. Polidispersite indeksinin 0,1 den büyük ve partikül dağılımının bimodal olması, kitosan polimerinin yüksek molekül ağırlığı ve molekül ağırlığı dağılımının da geniş aralıkta olmasından kaynaklanmaktadır (Rampino ve ark. 2013).

Amin-kitosan:TPP ve amin-tiyol-kitosan:TPP nanopartiküllerinin verimleri sırasıyla %14,97 – 60,54 ve %14,47 – 60,31 arasında değişmektedir (Tablo 4-34 ve Tablo 4-35). Her iki nanopartikül formülasyonu için en yüksek verim, 3:1 polimer:TPP oranında hazırlanan nanopartiküller ile elde edilmiştir (AKS-3 nanopartikülleri %60,54; ATKS-3 nanopartikülleri %60,31).

Modifiye kitosan polimeri ile hazırlanan formülasyonlara BSA'nın etkin bir şekilde yüklendiği, enkapsülasyon etkinliğinin polimer:TPP oranına bağlı olarak amin-kitosan:TPP partikülleri için %62,07 ile %78,38 arasında (Tablo 4-31), amin-tiyol-kitosan:TPP partikülleri için %68,90 ile %83,85 arasında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 4-32). En yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip formülasyon, hem amin-kitosan hemde amin-tiyol-kitosan polimerleri kullanıldığında polimer:TPP oranının 3:1 olduğu formülasyonlardır (AKS-3 için %78,38 ve ATKS-3 için % 83,85). Optimizasyon çalışmaları sonucunda, partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı, zeta potansiyeli, üretim verimi ve yükleme kapasitesi en uygun olan amin-kitosan:TPP (AKS-3) ve amin-tiyol-kitosan:TPP (ATKS-3) nanopartiküllerinin Calu-3 ve A549 hücre hatlarında *in vitro* toksisiteleri, nanopartiküllerden salınan BSA'ın SDS-PAGE yapı bütünlüğü, morfolojik özellikleri incelenmiş ve daha sonra Balb/c farelere nazal yol ile uygulanarak immünojenik özellikleri araştırılmıştır.

PLGA polimeri kullanılarak çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile nanopartikül formülasyonları hazılanmaktadır (Singh ve ark. 1997; Shi ve ark. 2002). Bu çalışmada, modifiye kitosan nanopartikülleri dışında, PLGA ile katyonik PbAE polimerleri bir arada kullanılarak nanopartikül formülasyonları hazırlanmış ve BSA yüklendikten sonra aşı taşıyıcı sistem olarak etkinliği incelenmiştir. PbAE ve PLGA polimerleri ile yapılan optimizasyon çalışmalarında, emülsiyon karıştırma hızının ve süresinin nanopartikül partikül büyüklüğünü etkilediğini görülmüştür. Örneğin, karıştırma hızı 9 500 devir/dk'dan 11 000 devir/dk'ya çıkarılması ile nanopartiküllerin büyüklüğü 256,90 nm de 246,40 nm ye düşmüştür ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$) (Tablo 4-19). Farklı molekül ağırlığına sahip PLGA polmerleri kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüklerinde de anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($p>0,05$). RG502 polimeri ile hazırlanan BSA yüklü PbAE-PLGA nanopartiküllerin boyutu 243,93±8,88 nm iken, RG503 polimeri ile hazırlanan partiküllerin boyutu 234,77±4,49 nm olarak ölçülmüştür. Ayrıca, partiküllerin büyüklük dağılımı tek fazlı ve polidispersite indeksleri de 0,15 – 0,22 arasında bulunmuştur (Tablo 4-29). Yapılan başka çalışmalarda PLGA polimeri ile hazırlanan nanopartiküller negatif zeta potansiyel değerine sahipken (Slütter ve ark. 2010), tez kapsamında geliştirilen ve formülasyonlara katyonik PbAE polimerinin ilavesi ile hazırlanan PbAE-PLGA nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerleri pozitif olarak

ölçülmüştür (+13,83±4,03 – +20,13±4,76 mV) (Tablo 4-30). Hazırlanan partiküllerin (+4±1°C)'de fiziksel stabiliteleri 1 yıl boyunca takip edilmiş ve bu süre zarfında partikül büyüklükleri, büyüklük dağılımları ve zeta potansiyellerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir (Tablo 4-29 ve Tablo 4-30). BSA yüklü PbAE-PLGA nanopartiküllerinin, hazırlandıktan sonra ve +4±1°C'de 1 ay, 3 ay, 6 ay ve 12 bekletildikten sonra ölçülen partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı değerlerine ait grafikler sırasıyla Şekil 4-19, Şekil 4-20, Şekil 4-21, Şekil 4-22 ve Şekil 4-23'te verilmiştir. PbAE-PLGA nanopartiküllerinin BSA yükleme kapasitesi incelenmiş ve yüksek molekül ağırlığına sahip RG503 polimeri (Mw: 24 000 – 38 000 kDa) ile hazırlanan nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliğinin (%91,16) daha düşük molekül ağırlığına sahip RG502 polimeri (Mw: 7 000 – 17 000 kDa) ile hazırlanan nanopartiküllerinkinden (%84,60) daha yüksek olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, Ravi ve arkadaşları (2008) da çalışmalarında nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimerin molekül ağırlığının artışına bağlı olarak ilaç yükleme kapasitelerinin de arttığını göstermiştir. Optimizasyon çalışmaları sonunda, PbAE-PLGA-2 nanopartikül formülasyonunun Calu-3 ve A549 hücre hatlarında *in vitro* toksisitesi, nanopartiküllerden salınan BSA'ın SDS-PAGE yapısal bütünlüğü, morfolojik özellikleri ile nazal yolla uygulandıktan sonra Balb/c farelerde mukozal ve sistemik immüniteye etkileri incelenmiştir.

BSA yüklü amin-kitosan:TPP, amin-tiyol-kitosan ve PbAE-PLGA nanopartiküllerinde enkapsüle edilmiş BSA'nın bütünlüğü üzerine hazırlama yöntemlerinin etkisini belirlemek amacıyla sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır. Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan çift emülsiyon çözücü uçurma yönteminde kullanılan organik çözücüler ve yüksek devirde karıştırma işlemleri, protein yapısındaki maddelerin bozulmasına sebep olabilmektedir. Ancak iyi optimize edilen formülasyon parametreleri ile enkapsüle edilen proteinin yapısal bütünlüğü hazırlama esnasında korunabilmektedir (Rajapaksa ve ark. 2010). SDS-PAGE analizinde, AKS-3, ATKS-3 ve PbAE-PLGA-2 nanopartiküllerden *in vitro* ortamda salınan BSA'nın molekül ağırlığında herhangi bir değişikliğin olmaması, hazırlama yönteminin BSA'nın bütünlüğü üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını göstermiş ve BSA antijeninin yapısal bütünlüğü ispatlanmıştır (Şekil 4-29).

Liyofilizasyon yöntemi ile kurutulan nanopartikül formülasyonlarının morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. SEM fotoğrafları partikül şeklinin karakterizasyonu yanında partikül boyutu hakkında da bilgi vermektedir. Amin-kitosan:TPP (AKS-3), amin-tiyol-kitosan:TPP (ATKS-3) ve PbAE-PLGA-2 nanopartiküllerine ait SEM fotoğrafları Şekil 4-26 – Şekil 4-28 arasında verilmiştir. Partiküllere ait SEM fotoğrafları incelendiğinde, bütün partikül formülasyonlarının küresel şekilde ve düz yüzeye sahip olduğu görülmüştür. Nanopartiküller SEM analizinden önce liyofilizasyon işlemi ile kurutulduğundan, fotoğraflarda küresel olmayan ve agregasyona bağlı oluşan daha büyük boyutlu bazı yapılara da rastlanmıştır. Literatürde liyofilizasyon işleminin nanopartiküllerin agregasyonuna önemli etkisi olduğu kayıtlıdır (Abdelwahed ve ark. 2006).

Çalışmamızda, sentezlediğimiz polimerlerin ve hazırladığımız nanopartiküllerin güvenle kullanılıp kullanılamayacağını test etmek amacıyla Calu-3 ve A549 hücreleri kullanılarak 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) ile sitotoksisite çalışmaları yürütülmüş ve yeni sentezlenen polimerlerin ve bu polimerleri kullanarak hazırlanmış nanopartiküllerin hücre canlılığına etkisi incelenmiştir. Hücre toksisitesinin hücre tipine göre değiştiğini gösteren çok sayıda literatür bulunmaktadır (Mueller ve ark. 2004; Kean ve ark. 2005). Bu yüzden, çalışmamızda partiküllerin ve polimerlerin sitotoksisitesi iki farklı hücre tipinde değerlendirilmiştir. Nanopartikül formülasyonlarının ve polimer çözeltilerinin Calu-3 hücrelerine toksisiteleri sırasıyla %97,23 - 25,21 ve %89,83 - 6,65 arasında değişirken (Şekil 4-30 ve Şekil 4-31), A549 hücrelerinde sırasıyla %90,31 – 55,58 ve % 86,88 – 19,94 arasında değiştiği görülmüştür (Şekil 4-32 ve Şekil 4-33). Hücre hatlarında görülen farklı sitotoksisite seviyeleri hücre özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Polimer çözeltisinin ve nanopartikül formülasyonlarının konsantrasyonunun artışına bağlı olarak her iki hücre grubunda da sitotoksisitenin artış gösterdiği görülmüştür. Ancak, özellikle katyonik polimer çözeltilerinin hem Calu-3 hem de A549 hücre hatlarında gösterdiği sitotoksisite, aynı polimerler ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında önemli derecede azalmıştır. Bunun nedeni, polimerlerin yapısında serbest halde bulunan ve toksisite sebebi olan pozitif yüklü grup sayısının, partiküllerin oluşumu esnasında azalmasıdır. Calu-3 ve A549 hücre hatlarında yapılan sitotoksisite çalışmalarında, nanopartikül formülasyonlarının 2 mg/mL

konsantrasyona kadar hücre toksisitesi üzerine etkisi düşük bulunmuştur. Tez kapsamında sentezlenen polimerlerin ve bu polimerler ile hazırlanan nanopartiküllerin her iki hücre grubuna toksisiteleri negatif kontrol olarak kullanılan aynı konsantrasyonlardaki SDS çözeltisinden anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Nafee ve ark. (2009) çalışmalarında ortamın pH'sı partiküllerin toksisitesi üzerine önemini göstermiştir. Toksisite, partiküllerin pozitif yüzey yükünden kaynaklanmakta ve pH'a bağlıdır. MTT testi sonuçları, modifiye kitosan:TPP ve PbAE-PLGA nanopartikül formülasyonlarının toksisitelerinin düşük olduğunu ve *in vivo* çalışmalarda kullanımlarının uygun olacağını göstermiştir. Grenha ve ark. (2007), Calu-3 ve A549 hücre hatlarında yaptıkları çalışmada, kitosan nanopartiküllerinin biyouyumlu ve pulmoner yoldan kullanıma da uygun olduğunu göstermiştir. Başka çalışmalarda da, PLGA nanopartiküllerinin 5 mg/mL konsantrasyonuna kadar A549 hücreler üzerine düşük toksisite gösterdiği ispatlanmıştır (Tahara ve ark. 2010).

Fizikokimyasal ve hücresel çalışmalardan sonra, optimum özelliklere sahip BSA yüklü nanopartikül formülasyonları Balb/c farelere i.n. ve s.c. yoldan uygulanmış ve nanopartikül formülasyonlarının sistemik ve mukozal immüniteye etkisi incelenmiştir. Geliştirilen nanopartikül formülasyonlarının immün yanıtları, yüksek adjuvan aktiviteye sahip CpG ODN ve Alum ile karşılaştırılmıştır. Farelerde uygulanan immünizasyon protokolü Tablo 3-5 ve Şekil 3-8'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

BSA yüklü nanopartikül formülasyonlarının, CpG ODN-BSA karışımının ve tek başına BSA antijeninin i.n. yolla uygulanmasından sonra ölçülen serum IgG antikor titreleri Şekil 4-34'te verilmiştir. Tüm nanopartikül formülasyonlarının i.n. yolla uygulanmasından sonra oluşan serum IgG seviyelerinin, tek başına BSA ve CpG ODN-BSA uygulanmasından sonra elde edilen değerlerden anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Formülasyonların 14. günde aynı yol ile ikinci kez uygulanmasından sonra özellikle BSA yüklü PbAE-PLGA-2 (PbAE-PLGA-BSA) formülasyonun oluşturduğu serum IgG antikor titrelerinde ilk uygulamaya göre 18 kat artış gözlenmiştir ($p<0,05$). 60. günde BSA yüklü AKS-3 (AKS-BSA) formülasyonun oluşturduğu IgG titreleri en yüksek iken ($p<0,05$), BSA yüklü ATKS-3 (ATKS-BSA) ve PbAE-PLGA-BSA formülasyonlarının oluşturduğu IgG titreleri ile kıyaslanabilir olduğu görülmüştür ($p>0,05$). 253. günde çözelti halinde uygulanan CpG ODN-BSA ve tek başına BSA'nın oluşturduğu IgG titreleri oldukça düşük bulunurken, BSA çözeltisinin oluşturduğu serum IgG titrelerine

göre AKS-BSA nanopartikülleri 256 kat, ATKS-BSA nanopartikülleri 422 kat, ve PbAE-PLGA-BSA nanopartikülleri 60 kat yüksek serum IgG antikor titreleri göstermiştir.

13., 21., 60. ve 253. günlerde IgG antikorunun alt grupları olan serum IgG_1 ve IgG_{2a} antikor seviyeleri tespit edilmiş ve bunlara ait sonuçlar sırasıyla Şekil 4-35 ve Şekil 4-36'da verilmiştir. Nazal yol ile ilk immünizasyondan sonra, en yüksek seviyede nanopartikül formülasyonları olmak üzere, bütün formülasyonların serum IgG_1 antikoru oluşturduğu görülmüştür. 14. günde aynı yol ile formülasyonların ikinci kez uygulanmasından bir hafta sonra serum IgG_1 antikorları tüm formülasyonlar için en yüksek seviyelerine ulaşmıştır. 60. günde tüm nanopartikül formülasyonların, tek başına uygulanan BSA ve CpG ODN-BSA karışımının oluşturduğu IgG_1 antikor titrelerinde hafif bir azalma görülmüştür. 253. günde BSA çözeltisi uygulanan hayvanlarda serum IgG_1 antikor titresi görülmezken, önemli bir mukozal adjuvan olan CpG ODN-BSA ile karşılaştırıldığında, AKS-BSA, ATKS-BSA ve PbAE-PLGA-BSA formülasyonlarının sırasıyla 16,8 kat, 8 kat, 15 kat daha yüksek serum IgG_1 antikor titresi verdiği görülmüştür. İ.n. yoldan uygulandığında, hem ilk hemde ikinci immünizasyondan sonra tüm nanopartikül formülasyonlarının oluşturduğu serum IgG_{2a} antikor seviyelerinin BSA çözeltisinin oluşturduğu titrelerden anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. AKS-BSA, ATKS-BSA ve PbAE-PLGA-BSA nanopartikül formülasyonlarının oluşturduğu serum IgG_{2a} hümoral immün yanıtlarının birbirleri ile ve CpG ODN-BSA formülasyonun oluşturduğu IgG_{2a} seviyeleri ile karşılaştırılabilir olduğu görülmüştür. Ancak, 253. günde, nanopartikül formülasyonlarının CpG ODN-BSA çözeltisinden anlamlı derecede yüksek serum IgG_{2a} antikor seviyeleri gösterdiği görülmüştür. İ.n. yoldan uygulanan formülasyonların Th_1 ve Th_2 immün cevaplarını değerlendirmek amacıyla IgG_1/IgG_{2a} oranları hesaplanmış ve bunlara ait sonuçlar Şekil 4-37'de verilmiştir. Formülasyonların tümünün hem Th_1 hem de Th_2 immün yanıtı oluşturduğu görülmüştür. İ.n. yoldan uygulanan ATKS-BSA ve PbAE-PLGA-BSA nanopartikül formülasyonlarının oluşturduğu IgG_1/IgG_{2a} oranında 60. günde artış görülürken (ATKS-BSA formülasyonu 6,39 ve PbAE-PLGA-BSA formülasyonu 11,73), AKS-BSA formülasyonunda en yüksek oran 13. günde görülmüştür (7,67). Elde edilen sonuçlar tüm nanopartikül formülasyonlarının hücresel ve hümoral immün yanıt oluşturuğu göstermiştir. CpG ODN-BSA için elde edilen sonuçlar, bu adjuvanın hem

hümoral hem de hücresel immün yanıt oluşturduğunu göstermiştir. Çalışmada elde edilen bulgular literatürde kayıtlı sonuçlarla uyumludur (Tafaghodi ve ark. 2006; Uto ve ark. 2007; Slütter ve Jiskoot 2010). Partiküler aşı taşıyıcı sistemler antijeni yavaş salayarak ortamda daha uzun süre antijenin bulunmasını sağlamakta ve immün yanıtı ve gücünü arttırmaktadır. Bu yüzden, nanopartikül formülasyonları için elde edilen antikor seviyeleri daha yüksek bulunmuştur (Rice-Ficht ve ark. 2010).

Salgısal IgA (sIgA) antikoru mukozal yüzeylerden salgılanan en önemli antikordur. sIgA, patojenlerin mukozal yüzeylere yapışmasını ve patojenlerin vücuda girmesini engellemektedir (Almeida ve Alpar 1996). İ.n. uygulamadan sonra mukozal yüzeylerde sIgA antikor cevaplarının uyarılmasıyla influenzaya karşı koruyucu etki oluşturulduğu klinik çalışmalar ile gösterilmiştir (Morokutti ve ark. 2014). Ayrıca, kitosan partiküllerin i.n. yolla uygulanmasından sonra şarbon'a karşı vajinal mukozada yüksek sIgA titreleri elde edilmiştir (Bento ve ark. 2015). 253. gün sonunda farelerden alınan vajinal yıkama çözeltilerinde sIgA seviyeleri incelenmiştir ve bunlara ait sonuçlar Şekil 4-38'de gösterilmiştir. BSA'ın nanopartikül formülasyonlarında enkapsüle edilmesi ile, vajinal sıvıda sIgA antikor seviyelerinin önemli derecede arttığı gözlenmiştir. AKS-BSA formülasyonu uygulanan farelerde en yüksek vajinal sIgA antikor titresi elde edilirken, ATKS-BSA ve PbAE-PLGA-BSA formülasyonların oluşturduğu vajinal sIgA antikor seviyelerinin de karşılaştırılabilir seviyede olduğu görülmüştür. Uygulama bölgesi olan nazal mukozaya uzak mukozal yüzeylerde (vajinal mukoza) antikor cevapların oluşması, NALT tarafından nanopartikül formülasyonların etkin bir şekilde alındığını ve ortak mukozal yanıtların uyarıldığını göstermektedir. Literatürde kayıtlı çalışmalar, antijenlerin i.n. yoldan uygunlanmasının, ağız, solunum, intestinal ve vajinal bölgeler gibi uzak mukozal yüzeylerde ve periferal lenf düğümlerinde sIgA antikor üretimini uyardığını göstermiştir (Kiyono ve Fukuyama 2004; Bienenstock ve McDermott 2005).

İlk s.c. immünizasyondan sonra, nanopartikül formülasyonlarının iki hafta sonunda oluşturduğu serum IgG antikor titrelerinin, tek başına BSA çözeltisinin oluşturduğu antikor titresinden anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). AKS-BSA, ATKS-BSA ve PbAE-PLGA-BSA formülasyonları, tek başına BSA çözeltisinden sırasıyla 44 kat, 179,2 kat ve 75 kat daha yüksek serum IgG antikor titresi verimştir. ATKS-BSA formülasyonu en

yüksek serum IgG antikor titresi vermesine rağmen, AKS-BSA ve PbAE-PLGA-BSA nanopartiküllerinin oluşturduğu serum IgG antikor seviyelerinden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığının olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Nanopartikül formülasyonlarınınki hafta sonunda, önemli bir adjuvan olan Alum-BSA formülasyonundan daha yüksek bir serum IgG antikor cevabı oluşturduğu gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4-39). İkinci immünizasyondan sonra, 21. günde uygulanan tüm formülasyonların oluşturduğu serum IgG antikor seviyelerinde artış görülmüştür. En yüksek IgG seviyeleri AKS-BSA formülasyonu ile elde edilirken, ATKS-BSA formülasyonun oluşturduğu serum IgG seviyeleri ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). 60. günde nanopartikül formülasyonlarının oluşturduğu serum IgG antikor seviyelerinde artış gözlenirken, tek başına BSA ve Alum-BSA uygulanması sonucu oluşan serum IgG seviyelerinde azalma görülmüştür. PbAE-PLGA-BSA formülasyonun oluşturduğu serum IgG seviyeleri ise, 21. günde elde edilen antikor seviyelerine göre, 5,4 kat artmıştır. 253. günde tek başına BSA çözeltisi uygulanan hayvanlarda serum IgG antikoru gözlenmezken, AKS-BSA, ATKS-BSA ve PbAE-PLGA-BSA formülasyonları için serumda tespit edilen IgG antikor titreleri, Alum-BSA formülasyonunu ile elde edilen değerden sırasıyla 14,4 kat, 8,4 kat ve 10 kat daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

IgG antikor seviyelerinin analizi yanında, IgG antikorların alt grupları olan ve sırasıyla Th_2 immün yanıtı ve Th_1 immün yanıtı gösteren IgG_1 ve IgG_{2a} antikorların seviyeleri analiz edilmiştir. 13., 21., 60. ve 253. günde s.c. yoldan formülasyonların uygulandığı farelerde nanopartikül formülasyonlarının oluşturduğu serum IgG_1 ve IgG_{2a} antikor seviyelerinin, BSA çözeltisi ile elde edilen antikor titrelerinden anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). 13. günde nanopartikül formülasyonlarının serum IgG_1 antikor seviyelerinin, Alum-BSA formülasyonununki ile karşılaştırıldığında, anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). AKS-BSA ve ATKS-BSA formülasyonlarının oluşturduğu IgG_1 titreleri 21. ve 60. günlerde anlamlı artış gösterirken ($p<0,05$), PbAE-PLGA-BSA formülasyonu için bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Yine de oluşan serum IgG_1 cevabı tek başına BSA formülasyonu ile elde edilene göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). S.c. uygulamadan sonra tespit edilen serum IgG_1 antikor titreleri Şekil 4-40'ta gösterilmiştir. 253.günde

nanopartikül formülasyonlarının oluşturduğu IgG_1 titrelerinin, Alum-BSA formülasyonu ile karşılaştırıldığında, AKS-BSA formülasyonu için 9,4 kat ($p<0,05$), ATKS-BSA formülasyonu için 28,2 kat ($p<0,05$) ve PbAE-PLGA-BSA formülasyonu için 7,2 kat ($p<0,05$) yüksek olduğu bulunmuştur. Tek başına BSA çözeltisi uygulanan farelerde ise 253. günde serum IgG_1antikor cevabı alınmamıştır. BSA içeren nanopartikül formülasyonlarının farelere s.c. yoldan uygulanmasını takiben elde edilen serum IgG_{2a} antikor titrelerine ait sonuçlar Şekil 4-41'de gösterilmiştir. Bütün formülasyonlar için en yüksek serum IgG_{2a} antikor titreleri 21. günde elde edilmiştir. AKS-BSA, ATKS-BSA ve PbAE-PLGA-BSA formülasyonlarının s.c.uygulamadan sonra oluşturdukları serum IgG_{2a} antikor titreleri, 253. gününe kadar Alum-BSA ve tek başına BSA formülasyonuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). IgG_1/IgG_{2a} oranı 60. günde tüm formülasyonlar için artış gösterirken, bu oran AKS-BSA için 18,1, ATKS-BSA için 68,8, PbAE-PLGA-BSA için 3,8 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar nanopartikül formülasyonların hem Th_1 hemde Th_2 immün yanıtlarını uyardığını göstermektedir. Sloat ve ark. (2010) çalışmalarında, nanopartiküllere BSA konjuge etmiş ve farelere s.c. yol ile uygulandıktan sonra immün cevabı incelemişlerdir. Farelerde yapılan çalışmalarda, nanopartikül formülasyonlarının, alum adjuvanı içeren formülasyonlardan daha güçlü immün yanıt oluşturduğu gözlenmiştir. Ayrıca, alum ile kıyaslandığında, nanopartikül formülasyonlarının immün yanıtı daha erken uyardığı tespit edilmiştir. Bunun nedeni, nanopartiküllerin antijen sunan hücrelerden (ASH) antijen alımını kolaylaştırması, antijeni lokal lenf düğümlerine taşıması ve ASH'leri aktive etmesidir (Pichyangkul ve ark. 2004; Rice-Ficht ve ark. 2010).

Nanopartikül formülasyonlarının immün yanıtlar üzerine etkilerini daha detaylı incelemek ve farklı immün yanıtların uyarılmasında T yardımcı hücrelerin rolünü belirlemek amacıyla, immünizasyon çalışmasında kullanılan hayvanların dalakları toplanmış ve primer dalak hücreleri izole edilmiştir. T ve B hücrelerinin yanısıra dalakta antijen sunan hücreler de bulunduğundan, dalak hücrelerinin anijen ile uyarılması ile hafıza bağışıklığının değerlendirmesi için uygun bir model oluşturmaktadır (Eyles ve ark. 2003). Dalak hücrelerinin *in vitro* ortamda antijen ile yeniden uyarılmasından sonra hafıza hücreleri tarafından salgılanan sitokin (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 ve INF-ɣ) seviyeleri incelenmiştir. İ.n. yol ile uygulanan formülasyonlara ait sitokin sonuçları Şekil 4-43 – 4-47

de, s.c. yol ile uygulanan formülasyonlar için ise Şekil 4-48 – 4-52'de gösterilmiştir. Dalak hücrelerinin tekrar uyarılması için iki farklı konsantrasyonda (10 µg/mL ve 20 µg/mL) BSA antijeni kullanılmış ve sitokin miktarları tayin edilmiştir. 20 µg/mL konsantrasyondaki antijen ile uyarılan hücrelerin sitokin seviyeleri daha yüksek olmasına rağmen, iki konsantrasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). İ.n. ve s.c. yol ile immünizasyon sonunda nanopartikül formülasyonları ile elde edilen IL-2 seviyeleri, CpG ODN-BSA, Alum-BSA ve BSA çözeltisi ile elde edilen değerlerden yüksek bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4-43 ve Şekil 4-48). İ.n. yoldan uygulanan bütün BSA yüklü nanopartiküllerin IL-2 seviyelerinde herhangi bir anlamlı fark gözlenmezken ($p>0,05$), s.c. yol ile uygulanan AKS-BSA nanopartikülleri ile en yüksek IL-2 seviyelerine ulaşılmıştır ($p<0,05$). INF-ɣ seviyelerinin i.n immünizasyondan sonra BSA çözeltisine göre belirgin olarak arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). İ.n. yolla uygulanan CpG ODN-BSA formülasyonu ile elde edilen INF-ɣ seviyesi, aynı yolla uygulanan nanopartikül formülasyonlarının değerlerine yakın olmasına rağmen, s.c. yolla uygulanan AKS-BSA, ATKS-BSA ve PbAE-PLGA-BSA nanopartikül formülasyonlarının oluşturduğu INF-ɣ seviyeleri, s.c. yoldan uygulanan Alum-BSA formülasyonundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). IL-2 ve INF-ɣ sitokinleri Th_1 hücreleri tarafından salgılanmakta ve B hücrelerinden IgG_{2a} antikorlarının üretimini uyarmaktadır (Romagnani 1994). Elde edilen sonuçlar nanopartikül formülasyonlarının hücresel immün yanıt oluşturduğunu göstermektedir. Th_1 hücrelerinin aktivasyonu özellikle viral enfeksiyonlarına karşı immünizasyon sağlanmasında önemlidir (Whitmire 2011). *In vivo* çalışmalar sonucunda elde edilen IL-2 ve INF-ɣ seviyeleri, s.c. yol ile kıyaslandığında, i.n. yol ile immünizasyonun daha güçlü Th_1 hücresel immün yanıtı oluşturduğunu göstermiştir.

Bunların dışında, i.n. yoldan uygulanan nanopartikül formülasyonları ile, hücresel immün cevabı arttıran bir adjuvan olan CpG ODN-BSA çözeltisinden ve tek başına uygulanan BSA çözeltisinden daha yüksek IL-4, IL-6 ve IL-10 seviyelerine ulaşılmıştır (Şekil 4-44 – 4-46). IL-4, IL-6 ve IL-10 sitokinleri Th_2 hücreleri tarafından salgılanmakta ve B hücrelerinden IgG_1 antikorlarının üretimini uyarmaktadır. Bu sitokinlerin seviyeleri s.c. yoldan uygulanan nanopartikül formülasyonları ve Alum-BSA için yüksek bulunmuştur. İ.n. yol ile uygulanan formülasyonlar arasında en yüksek IL-4 seviyeleri

AKS-BSA ve PbAE-PLGA-BSA nanopartikülleri ile elde edilirken ($p<0,05$), s.c. yol ile uygulananlar arasında en yüksek değere AKS-BSA formülasyonu ulaşmıştır ($p<0,05$). İ.n. yol ile uygulanan AKS-BSA formülasyonu ile hücrelerin 20 µg/mL konsantrasyondaki antijen ile uyarılmasından sonra elde edilen IL-6 seviyeleri diğer formülasyonlardan yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Sitokin analizi sonuçları, tez kapsamında geliştirilen tüm nanopartikül formülasyonlarının hem hücresel hem de hümoral immün yanıt oluşturduğunu göstermiştir.

İn vivo çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular, 2. dozdan sonra immün yanıtların önemli derecede arttığını göstermiştir. Gupta ve ark. (2011), kitosan-poli-(ε-kaprolakton) nanopartiküllerinin influenzaya karşı oluşturduğu immün yanıtları incelemiş ve 2. dozdan sonra immün yanıtların arttığını göstermiştir. İ.n. yoldan uygulanan formülasyonların serum IgG_{2a} seviyelerinin 2. dozdan sonra önemli derecede artması, IgG_{2a} antikor düzeylerin oluşması için daha uzun süre veya birden çok doz gerektirdiğini göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, ayrıca, nazal yolu ile aşılamanın avantajlarını, modifiye kitosan ve PbAE polimerlerinin aşı taşıyıcı sistemi olarak kullanımının güvenli olduğunu göstermiştir. Kitosan polimeri, parasellüler yolakları etkileyerek taşıyıcı sistemlerin hücresel alımını arttırmaktadır. İ.n. uygulamadan sonra immün yanıtların oluşması, nanopartiküllerin NALT tarafından etkin bir şekilde alındığını göstermektedir.

Mukoadezif partiküler sistemler nazal bölgede antijenlerin kalış süresini uzatarak daha güçlü immün yanıtların oluşmasını sağlamaktadır. Nanopartiküllerin pozitif zeta potansiyele sahip olması, mukus glikoproteinlerindeki negatif yüklü sialik asit grupları ile elektrostatik etkileşimi ve mukoadezyonu arttırmaktadır (Soane ve ark. 1999). Katyonik yapıda PbAE polimerinin PLGA ile nanopartikül halinde formüle edilmesi, partiküllerin yüzey yükünü pozitife çevirmektedir. Bunun sonucunda PbAE-PLGA nanopartiküllerinin mukozal yüzeylerle etkileşimi de artmaktadır. Yapılan çalışmalar, nanopartiküllerin, kitosan veya tiyollenmiş kitosan ile kaplanmasının, mukus ile kovalent etkileşimi arttırdığını göstermiştir. Nanopartikül yüzeyinde yüksek konsantrasyonda tiyol gruplarının bulunması, mukusta glikoproteinlerindeki sistein grupları ile kovalent bağ oluşumuna neden olmakta ve mukoadezyonu arttırmaktadır (Bravo-Osuna ve ark. 2007).

Nazal yol ile immünizasyonun üstünlüğü literatürde kayıtlı çalışmalar ile gösterilmiştir. İ.n. yoldan uygulanan BSA yüklü nanopartiküllerin, oral yol ile karşılaştırıldığında, daha yüksek serum IgG antikor titreleri oluşturduğu gösterilmiştir (Gutierro ve ark. 2002).

Sonuç olarak, bu çalışmada biyouyumlu ve biyoparçalanabilir aminlenmiş kitosan, aminlenmiş ve tiyollenmiş kitosan ve poli(β-amino) ester polimerleri sentezlenmiştir. Bu polimerler ile modifiye kitosan:TPP ve PbAE-PLGA nanopartikülleri hazırlanmıştır. Tez kapsamında yürütülen çalışmalar ile, hazırlanan partiküler sistemlerin nazal yol ile uygulanan antijenler için uygun partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı, fiziksel stabilite, zeta potansiyel, ve adjuvan özelliklerine sahip olduğu gösterilmiştir. Geliştirilen nanopartiküler sistemlerin nazal yoldan uygulandığında immün yanıtı arttırdığı ve nazal aşı taşıyıcı sistem olarak kullanımlarının umut vaad ettiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abbas, A., Lichtman, A. ve Pillai, S. (2012). Introduction to the immune system. İçinde. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System.* Elsevier: Philadelphia, 1–22.

Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S. ve Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews, **58,*** 1688–1713.

Agrawal, B., Krantz, M.J., Reddish, M.A. ve Longenecker, B.M. (1998). Cancer-associated MUC1 mucin inhibits human T-cell proliferation, which is reversible by IL-2. *Nature Medicine, **4,*** 43–49.

Aguado, M.T. (1993). Future approaches to vaccine development: single-dose vaccines using controlled-release delivery systems. *Vaccine, **11(5)***, 596-7.

Akinc, A. Anderson, D.G., Lynn, D.M. ve Langer, R. (2003). Synthesis of poly (β-amino ester)s optimized for highly effective gene delivery. *Bioconjugate Chemistry, **14***, 979−988.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Martin, R., Roberts, K. ve Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. (4th ed.) New York: Garland Science.

Allen, T.M. ve Cullis, P.R. (2013). Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews, **65,*** 36-48.

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

Alpar, H.O., Eyles, J.E., Williamson, E.D. ve Somavarapu S. (2001). Intranasal vaccination against plague, tetanus and diphtheria. *Advanced Drug Delivery Reviews, **51(1-3)***, 173-201.

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

Ambrosch, F., Wiedermann, G., Jonas, S., Althaus, B., Finkel, B., Gluck, R., ve ark. (1997). Immunogenicity and protectivity of a new liposomal hepatitis A vaccine. *Vaccine, **15,*** 1209–1213.

Amidi, M., Mastrobattista, E., Jiskoot, W. ve Hennink W.E. (2010). Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Advanced Drug Delivery Reviews*, ***62(1)***, 59-82.

Amidi, M., Pellikaan, H.C., Hirschberg, H., de Boer, A.H., Crommelin, D.J., Hennink, W.E. ve ark. (2007). Diphtheria toxoid-containing microparticulate powder formulations for pulmonary vaccination: preparation, characterization and evaluation in guinea pigs. *Vaccine, **25(37-38)***, 6818-29.

Amidi, M., Romeijn, S.G., Borchard, G., Junginger, H.E., Hennink, W.E. ve Jiskoot, W. (2006). Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *Journal of Controlled Release, **111(1-2)***, 107-16.

Anitha, A., Deepa, N., Chennazhi, K.P., Nair, S.V., Tamura, H. ve Jayakumar, R. (2011). Development of mucoadhesive thiolated chitosan nanoparticles for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers, **83(1),*** 66–73.

Asahi Research Center Co.Ltd. (2013). *Handbook of Proton-NMR Spectra and Data: Index*. Elsevier.

Ashwell, J.D., DeFranco, A.L., Paul, W.E. ve Schwartz, R.H. (1985). Can resting B cells present antigen to T cells? *Federation proceedings, **44,*** 2475-9.

Audibert, F., Parant, M., Damais, C., Lefrancier, P., Derrien, M., Choay, J. ve ark. (1980). Dissociation of immunostimulant activities of muramyl dipeptide (MDP) by linking amino-acids or peptides to the glutaminyl residue. *Biochemical and Biophysical Research Communications, **96,*** 915– 923.

Baca-Estrada, M.E., Foldvari, M.M., Snider, M.M., Harding, K.K., Kournikakis, B.B., Babiuk, L.A. ve ark. (2000). Intranasal immunization with liposome-formulated Yersinia pestis vaccine enhances mucosal immune responses. *Vaccine, **18(21)***, 2203-11.

Balazs, A.B., Chen, J., Hong, C.M., Rao, D.S. ve Yang L, Baltimore, D. (2012). Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature*, **481**, 81–84.

Baldrick, P. (2010). The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory Toxicology and Pharmacology, **56(3)***, 290-9.

Baldridge, J.R. ve Crane R.T. (1999). Monophosphoryl lipid A (MPL) formulations for the next generation of vaccines. *Methods, **19,*** 103–107.

Bento, D., Staats, H.F. ve Borges, O. (2015). Effect of particulate adjuvant on the anthrax protective antigen dose required for effective nasal vaccination. *Vaccine, **33(31)***, 3609–13.

Ben-Yehuda, A., Joseph, A., Barenholz, Y., Zeira, E., Even-Chen, S., Louria-Hayon, I. ve ark. (2003). Immunogenicity and safety of a novel IL-2-supplemented liposomal influenza vaccine (INFLUSOME-VAC) in nursing-home residents. *Vaccine, **21,*** 3169-78.

Berencsi, K., Gyulai, Z., Gönczöl, E., Pincus, S., Cox, W.I., Michelson, S. ve ark. (2001). A canarypox vector-expressing cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 induces long-lasting cytotoxic T cell responses in human CMV-seronegative subjects. *The Journal of Infectious Diseases, **183,*** 1171–1179.

Berger, A. (1998). Science commentary: Why conjugate vaccines protect longer. *The BMJ. **316,*** 1571.

Bevan, M.J. (2004). Helping the CD8(+) T-cell response. *Nature Reviews Immunology, **4,*** 595–602.

Bienenstock, J. ve McDermott, M.R. (2005). Bronchus- and nasal-associated lymphoid tissues. *Immunological Reviews, **206,*** 22-31.

Bojang, K.A., Olodude, F., Margaret, Pindera., Ofori-Anyinamb, O., Vigneron L., Fitzpatrickbet S. ve ark. (2005). Safety and immunogenicty of RTS,S/AS02 A candidate malaria vaccine in Gambian children. *Vaccine, **23,*** 4148–4157.

Borchard, G. (2002). Calu-3 cells, a valid model for the airway epithelium, *Stp Pharma Sciences, **12 (4)***, 205-211.

Bos, J.D. ve Kapsenberg, M.L. (1993). The skin immune system. Its cellular constituents and their interactions. *Immunology Today, **14,*** 75–8.

Boyle, J., Eastman, D., Millar, C., Camuglia, S., Cox, J., Pearse, M. ve ark. (2007). The utility of ISCOMATRIX adjuvant for dose reduction of antigen for vaccines requiring antibody responses. *Vaccine, **25,*** 2541–2544.

Brandtzaeg, P., Baekkevold, E.S., Farstad, I.N., Jahnsen, F.L., Johansen, F.E., Nilsen, E.M. ve ark. (1999). Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunology Today, **20,*** 141–151.

Bravo-Osuna, I., Vauthier, C., Farabollini, A., Palmieri, G.F. ve Ponchel G. (2007). Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *Biomaterials, **28(13)***, 2233-43.

Brayden D.J., Jepson, M.A. ve Baird, A.W. (2005). Intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. *Drug Discovery Today, **10,*** 1145–1157.

Buchmann, P., Dembek, C., Kuklick, L., Jäger, C., Tedjokusumo, R., von Freyend, M.J., ve ark. (2013). A novel therapeutic hepatitis B vaccine induces cellular and humoral immune responses and breaks tolerance in hepatitis B virus (HBV) transgenic mice. *Vaccine, **31,*** 1197-203.

Burgess, M.A. ve McIntyre, P.B. (1999). Vaccines and the cold chain:is it too hot. . . or too cold? *The Medical Journal of Australia, **171,*** 82.

Butts, C., Maksymiuk, A., Goss, G., Soulières, D., Marshall, E. Cormier, Y. ve ark. (2011). Updated survival analysis in patients with stage IIIB or IV non-small-cell lung cancer receiving BLP25 liposome vaccine (L-BLP25): phase IIB randomized, multicenter, open-label trial. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 137,* 1337-1342.

Butts, C., Murray, N., Maksymiuk, A., Goss, G., Marshall, E., Soulieres, D. ve ark. (2005). Randomized Phase IIB Trial of BLP25 Liposome Vaccine in Stage IIIB and IV Non–Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology, 23,* 6674–6681.

Cardona, PJ. (2006). RUTI: a new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb), **86***, 273–289.

Casella, C.R. ve Mitchell, T.C. (2008). Putting endotoxin to work for us:monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. *Cellular and Molecular Life Sciences, **65,*** 3231–3240.

Casimiro, D.R., Wang, F., Schleif, W.A., Liang, X., Zhang, Z.Q., Tobery, T.W. ve ark. (2005). Attenuation of simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection by prophylactic immunization with dna and recombinant adenoviral vaccine vectors expressing Gag. *Journal of Virology, **79,*** 15547-55.

Chadwick, S., Kriegel, C. ve Amiji, M. (2010). Nanotechnology solutions for mucosal immunization. *Advanced Drug Delivery Reviews, **62,*** 394-407.

Cheever, M.A. ve Higano, C.S. (2011). PROVENGE (Sipuleucel-T) in Prostate Cancer: The First FDA-Approved Therapeutic Cancer Vaccine. *Clinical Cancer Research, **17,*** 3520-3526.

Chen, J., Huang, S.W., Liu, M. ve Zhuo, R.X. (2007). Synthesis and degradation of poly(beta-aminoester) with pendant primary amine. *Polymer, **48***, 675-681.

Childers, N.K., Miller, K.L., Tong, G., Llarena, J.C., Greenway, T., Ulrich, J.T. ve ark. (2000). Adjuvant activity of monophosphoryl lipid A for nasal and oral immunization with soluble or liposome-associated antigen. *Infection and Immunity, **68,*** 5509–5516.

Childers, N.K., Tong, G., Li, F., Dasanayake, A.P., Kirk, K. ve Michalek, S.M. (2002). Humans immunized with Streptococcus mutans antigens by mucosal routes. *Journal of Dental Research, **81,*** 48–52.

Clem, A.S. (2011. Fundamentals of vaccine immunology. *Journal of Global Infectious Diseases, **(3),*** 73–8.

Clements, C.J. ve Griffiths, E. (2002) The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants. *Vaccine, **20,*** S24–S33.

Coffman, R.L., Sher, A., ve Seder, R.A. (2010). Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity, **33,*** 492-503.

Corr, S.C., Gahan, C.C. ve Hill, C. (2008). M-cells: origin,morphologyand role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology, **52***, 2–12.

Couvreur, P., Fattal, E. ve Andremont, A. (1991). Liposomes and Nanoparticles in the Treatment of Intracellular Bacterial Infections. *Pharmaceutical Research, **8,*** 1079-1086.

Cox, J.C., Sjölander, A., ve Barr, I.G (1998). ISCOMs and other saponin based adjuvants. *Advanced Drug Delivery Reviews, **32,*** 247-271.

Cryan, S.A. (2005). Carrier-based strategies for targeting protein and peptide drugs to the lungs. *AAPS Journal, **7(1)***, E20-41.

Csaba, N., Sánchez, A. ve Alonso, M.J. (2006). PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanostructures as carriers for nasal gene delivery. *Journal of Controlled Release, **113(2),*** 164-72.

Cusi, M.G., Zurbriggen, R., Valassina, M., Bianchi, S., Durrer, P., Valensin, P.E. ve ark. (2000). Intranasal immunization with mumps virus DNA vaccine delivered by influenza virosomes elicits mucosal and systemic immunity. *Virology, **277(1),*** 111-8.

Dautzenberg, H. (2001). Polyelectrolyte complex formation in highly aggregating systems: Methodical aspects and general tendencies. İçinde T. Radeva (Ed.), *Physical chemistry of polyelectrolytes, Surfactant Science Series*, New York: Dekker; 743-792.

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

De Bruijn, I.A., Nauta, J., Gerez, L. ve Palache, A.M. (2004). Virosomal influenza vaccine: a safe and effective influenza vaccine with high efficacy in elderly and subjects with low pre-vaccination antibody titers. *Virus Research, **103,*** 139–45.

Dean, H.J. (2006) Alternative routes of influenza vaccine delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery, **3(5)***, 557-561.

De Magistris, M.T. (2006). Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics. *Advanced Drug Delivery Reviews, **58(1),*** 52-67.

De Miguel, I., Imbertie, L., Rieumajou, V., Major, M., Kravtzoff, R. ve Betbeder, D. (2000). Proofs of the structure of lipid coated nanoparticles (SMBV) used as drug carriers. *Pharmaceutical Research, **17(7)***, 817-24.

Dekali, S., Gamez, C., Kortulewski, T., Blazy, K., Rat, P. ve Lacroix, G. (2014). Assessment of an *in vitro* model of pulmonary barrier to study the translocation of nanoparticles. *Toxicology Reports, **1***, 157–171.

Del Giudice G. ve Rappuoli R. (1999). Genetically derived toxoids for use as vaccines and adjuvants. *Vaccine, **17***, S44-52.

Denfeld, R.W. ve Simon, J.C. (2000). The Langerhans cell: antigen processing:antigen presentation. İçinde A.F. Kydonieus, J.J. Wille (Eds.) *Biochemical Modulation of Skin Reactions: Transdermals, Topicals, Cosmetics.* Boca Raton, FL: CRC Press; 107–23.

Douce, G., Fontana, M., Pizza, M. ve ark. (1997). Intranasal immunogenicity and adjuvanticity of site-directed mutant derivatives of cholera toxin. *Infection and Immunity, **65,*** 2821-8.

Edelman, R. (2000). An Overview of Adjuvant Use. İçinde D.T. O'Hagan (Ed.), *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols*, Humana Press; 1-27.

Edelman, R. (2002). The development and use of vaccine adjuvants. *Molecular Biotechnology, **21,*** 129–148.

Eriksson, K., Kilander, A., Hagberg, L., Norkrans, G., Holmgren, J. ve Czerkinsky, C. (1998). Induction and expression of intestinal humoral immunity in HIV-infected individuals: prospects for vaccination against secondary enteric infections. *Pathobiology, **66,*** 176–82.

Etchart, N., Hennino, A., Friede, M., Dahel, K., Dupouy, M., Goujon-Henry, C., ve ark. (2007). Safety and efficacy of transcutaneous vaccination using a patch with the live-attenuated measles vaccine in humans. *Vaccine, **25,*** 6891-9.

Eyles, J.E, Bramwell, V.W., Singh, J., Williamson, E.D. ve Alpar, H.O. (2003). Stimulation of spleen cells in vitro by nanospheric particles containing antigen, *Journal of Controlled Release, **86(1),*** 25-32.

Fan, W., Yan, W., Xu, Z. ve Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **(90)***, 21–27.

FDA, Complete List of Vaccines Licensed for Immunization and Distribution in the US, http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm093833.htm güncelleme tarihi 09.04.2014.

Fifis, T., Gamvrellis, A., Crimeen-Irwin, B., Pietersz, G.A., Li, J., Mottram, P.L. ve ark. (2004) Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *Journal of Immunology, **173(5),*** 3148-54.

Foged, C., Birger, 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.

Fooks, A.R. (2000). Development of oral vaccines for human use. *Current Opinion in Molecular Therapeutics, **2(1)***, 80-6.

Foster, K.A., Avery, M.L., Yazdanian, M. ve Audus, K.L. (2000). Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics, **208(1-2)***, 1-11.

Fournillier, A., Frelin, L., Jacquier, E., Ahlén, G., Brass, A., Gerossier, E., ve ark. (2013). A heterologous prime/boost vaccination strategy enhances the immunogenicity of therapeutic vaccines for hepatitis C virus. *The Journal of Infectious Diseases, **208,*** 1008-19.

Fraillery, D., Zosso, N. ve Nardelli-Haefliger D. (2009). Rectal and vaginal immunization of mice with human papillomavirus L1 virus-like particles. *Vaccine, **27(17)***, 2326-34.

Franz, T.J. ve Lehman, P.A. (2000). The skin as a barrier: structure and function. İçinde A.F. Kydonieus ve J.J. Wille (Eds.), *Biochemical Modulation of Skin Reactions: Transdermals, Topicals, Cosmetics.* Boca Raton, FL:CRC Press; 15–33.

Frasch, C.E. ve Bash, M.C. (2000). Neisseria meningitidis Vaccines. İçinde. Madame Curie Bioscience Database [Internet] Austin (TX):Landes Bioscience, Erişim: 22.08.2015, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6030/.

Friedman, H. ve G. Warren. (1984). Muramyl dipeptide-induced enhancement of phagocytosis of antibiotic pretreated Escherichia coli by macrophages. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, **176***, 366-70.

Fries, L.F., Montemarano, A.D., Mallett, C.P., Taylor, D.N., Hale, T.L., Lowell, G.H. (2001). Safety and immunogenicity of a proteosome-Shigella flexneri 2a lipopolysaccharide vaccine administered intranasally to healthy adults. *Infection and Immunity, **69(7)***, 4545-53.

Frost, L., Johansen, P., Pedersen, S., Veien, N., Østergaard P.A. ve Nielsen, M.H. (1985). Persistent subcutaneous nodules in children hyposensitized with aluminium-containing allergen extracts. *Allergy, **40,*** 368-72.

Fukushima, A., Yoo, Y.C., Yoshimatsu, K., Matsuzawa, K., Tamura, M., Tono-oka, S. ve ark. (1996). Effect of MDP-Lys(L18) as a mucosal immunoadjuvant on protection of mucosal infections by Sendai virus and rotavirus. *Vaccine, **14,*** 485-491.

Galli, G., Hancock, K., Hoschler, K., DeVos, J., Praus, M., Bardelli, M. ve ark. (2009b) Fast rise of broadly cross-reactive antibodies after boosting long-lived human memory B cells primed by an MF59 adjuvanted prepandemic vaccine. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, **106,*** 7962–7967.

Galli, G., Medini, D., Borgogni, E., Zedda, L., Bardelli, M., Malzone, C. ve ark. (2009a). Adjuvanted H5N1 vaccine induces early CD4+ T cell response that predicts long-term persistence of protective antibody levels. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, **106,*** 3877–3882.

Gallorini, S., Taccone, M., Bonci, A., Nardelli, F., Casini, D., Bonificio, A. ve ark. (2014). Sublingual immunization with a subunit influenza vaccine elicits comparable systemic immune response as intramuscular immunization, but also induces local IgA and TH17 responses. *Vaccine, **32(20),*** 2382-8.

Gana, Q., Wang, T., Cochrane, C. ve McCarron, P. (2005). Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **44(2–3),*** 65–73.

Garcia-Fuentes, M. ve Alonso, M.J. (2012). Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand? *Journal of Controlled Release, **161(2***), 496-504.

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

Glenn, G.M., Kenney, R.T., Hammond, S.A. ve Ellingsworth, L.R. (2003). Transcutaneous immunization and immunostimulant strategies. *Immunology and Allergy Clinics of North America, **23,*** 787-813.

Glenn, G.M., Taylor, D.N., Li, X., Frankel, S., Montemarano, A. ve Alving, C.R. (2000). Transcutaneous immunization: a human vaccine delivery strategy using a patch. *Nature Medicine, **6,*** 1403-6.

Glück, R., Mischler, R., Durrer, P., Fürer, E., Lang, A.B., Herzog C. ve ark. (2000). Safety and Immunogenicity of Intranasally Administered Inactivated Trivalent Virosome-Formulated Influenza Vaccine Containing Eschevichia coli Heat-Labile Toxin as a Mucosal Adjuvant. *The Journal of Infectious Diseases*, ***181,*** 1129-1132.

Glück, R., Moser, C. ve Metcalfe, IC. (2004). Influenza virosomes as an efficient system for adjuvanted vaccine delivery. *Expert Opinion on Biological Therapy, **4,*** 1139-45.

Goldblatt, D. (2000). Conjugate vaccines. *Clinical and Experimental Immunology, **119(1)***, 1–3.

Goto, N., Kato, H., Maeyama, J., Shibano, M., Saito, T., Yamaguchi, J. ve ark. (1997). Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine, **15,*** 1364-71.

Gregory, A.E., Titball, R. ve Williamson, D. (2013). Vaccine delivery using nanoparticles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, **3,*** 13.

Grenha, A., Grainger, C.I., Dailey, L.A., Seijo, B., Martin, G.P., Remuñán-López, C., ve ark. (2007). Chitosan nanoparticles are compatible with respiratory epithelial cells in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, ***31(2)***, 73-84.

Gupta, N.K., Tomar, P., Sharma, V. ve Dixit, V.K. (2011). Development and characterization of chitosan coated poly-(ε-caprolactone) nanoparticulate system for effective immunization against influenza. *Vaccine, **29(48)***, 9026-37.

Gupta, P.N., Khatri, K., Goyal, A.K., Mishra, N. ve Vyas, S.P. (2007). M-cell targeted biodegradable PLGA nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. *Journal of Drug Targeting, **15,*** 701-13.

Gutierro, I., Hernández, R.M., Igartua, M., Gascón, A.R. ve Pedraz, J.L. (2002). Influence of dose and immunization route on the serum Ig G antibody response to BSA loaded PLGA microspheres. *Vaccine, **20(17–18)***, 2181–2190.

Halperin, S.A., Dobson, S., McNeil, S., Langley, J.M., Smith, B., McCall-Sani, R. ve ark. (2006). Comparison of the safety and immunogenicity of hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide and a licensed hepatitis B vaccine in healthy young adults. *Vaccine, **24,*** 20–26.

Halperin, S.A., Smith, B., Clarke, K., Treanor, J., Mabrouk, T. ve Germain, M. (2005). Phase I, randomized, controlled trial to study the reactogenicity and immunogenicity of a nasal, inactivated trivalent influenza virus vaccine in healthy adults. *Human Vaccines, **1(1)***, 37-42.

Hanke, T., Goonetilleke, N., McMichael, A.J. ve Dorrell, L. (2007). Clinical experience with plasmid DNA- and modified vaccinia virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 clade A vaccine focusing on T-cell induction. *Journal of General Virology, **88,*** 1-12.

Hansson, M., Nygren, P.A. ve Ståhl, S. (2000). Design and production of recombinant subunit vaccines. *Biotechnology and Applied Biochemistry, **32,*** 95–107.

Harandi, A.M. ve Holmgren, J. (2004). CpG DNA as a potent inducer of mucosal immunity: implications for immunoprophylaxis and immunotherapy of mucosal infections. *Current Opinion in Investigational Drugs, **5,*** 141–145.

Harandi, A.M., Medaglini, D. ve Shattock, R.J. (2010). Vaccine adjuvants: a priority for vaccine research. *Vaccine, **28(12),*** 2363-6.

Harrop, R., John, J. ve Carroll, M.W. (2006). Recombinant viral vectors: cancer vaccines, *Advanced Drug Delivery Reviews, **58,*** 931–947.

Hasan, B. (2013). Göğüs Hastalıklarında In Vitro Araştırma Yöntemleri. *Turkish Thoracic Journal, **14(2)***, 20-6.

Heath, A.W. (1995). Cytokines as immunologic adjuvants. İçinde M. F.Powell ve M. J. Newman, (eds.), *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, New York:Plenum Press; 645–658.

Herzog, C., Metcalfe, I.C. ve Schaad, U.B. (2002). Virosome influenza vaccine in children. *Vaccine, **20,*** B24–8.

Higgins, D., Marshall, J.D., Traquina, P., Nest, G.V. ve Livingston, B.D. (2007) Immunostimulatory DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Review of Vaccines, **6,*** 747–759.

Hill, D.R. ve ark. (2006). Oral cholera vaccines: use in clinical practice. *The Lancet Infectious Diseases, **6,*** 361–373.

Hoebe, K., Janssen, E. ve Beutler, B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nature Immunology, **5(10)***, 971–4.

Holmgren, J. ve Czerkinsky, C. (2005). Mucosal immunity and vaccines, *Nature Medicine, **11,*** S45 – S53.

Huang, J.Y., Gao, Y., Cutlar, L., O'Keeffe-Ahern, J., Zhao, T., Lin, G.H. ve ark. (2015). Tailoring Hyperbranched Poly(β-Amino Ester)s: a Synthetic Platform for Epidermal Gene. Therapy. Electronic Supplementary Material (ESI) for *Chemical Communications*. http://www.rsc.org/suppdata/c5/cc/c5cc02193f/c5cc02193f1.pdf

Huang, Y. ve Lapitsky, Y. (2011). Monovalent salt enhances colloidal stability during the formation of chitosan/tripolyphosphate microgels. *Langmuir, **27(17)***, 10392-9.

Huckriede, A., Bungener, L., Stegmann, T., Daemen, T., Medema, J., Palache, A.M. ve ark. (2005). The virosome concept for influenza vaccines. *Vaccine, **23,*** S26-38.

Huckriede, A., Bungener, L., ter Veer, W., Holtrop, M., Daemen, T., Palache, A.M. ve ark. (2003) Influenza virosomes: combining optimal presentation of hemagglutinin with immunopotentiating activity. *Vaccine, **21,*** 925-31.

Hutchings, A. B., Helander, A., Silvey, K. J., Lucas, W. T. ve Neutra, M. R. (2004). Secretory IgA antibodies against the σ1 outer capsid protein of reovirus type 1 Lang prevent infection of mouse Peyer's patches. *Journal of Virology, **78,*** 947–957.

ICH Harmonised Tripartite Guideline 1995.

Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A.N. ve Davis S.S. (2001). Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews, **51(1-3)***, 81-96.

Indermun, S., Luttge, R., Choonara, Y.E., Kumar, P., du Toit, L.C., Modi, G., Pillay V. (2014). Current advances in the fabrication of microneedles for transdermal delivery. *Journal of Controlled Release, **185,*** 130–138.

Jaffar, Z., Ferrini, M.E., Herritt, L.A. ve Roberts, K. (2009). Cutting edge: lung mucosal Th17-mediated responses induce polymeric Ig receptor expression by the airway epithelium and elevate secretory IgA levels. *The Journal of Immunology, **182(8)***, 4507–11.

Jaganathan, K.S. ve Vyas, S.P. (2006). Strong systemic and mucosal immune responses to surface-modified PLGA microspheres containing recombinant hepatitis B antigen administered intranasally. *Vaccine, **24(19)***, 4201-11.

Jain, S., Khomane, K., Jain, A.K. ve Dani, P. (2011). Nanocarriers for transmucosal vaccine delivery. *Current Nanoscience, **7***, 160-177.

Jain, V., Vyas, S.P. ve Kohli, D.V. (2009). Well-defined and potent liposomal hepatitis B vaccines adjuvanted with lipophilic MDP derivatives. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, **5,*** 334-44.

Janes, K.A. ve Alonso, M.J. (2003). Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: Preparation and characterization. *Journal of Applied Polymer Science, **88(12)***, 2769–2776.

Janes, K.A., Calvo, P. ve Alonso, M.J. (2001). Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Advanced Drug Delivery Reviews, **47(1)***, 83-97.

Janeway, C.A. Jr., Travers, P., Walport, M. ve ark. (2001). Principles of innate and adaptive immunity. İçinde *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. (5th ed.) New York: Garland Science, Erişim 20.08.2015, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27090/

Jani, P., Halbert, G.W., Langridge, J. ve Florence, A.T. (1990). Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: Quantitation and particle size dependency. *The Journal of pharmacy and pharmacology, **42,*** 821–826.

Jiskoot, W. ve Kersten, G. (2011). Vaccines. İçinde F.P. Nijkamp ve M.J. Parnham (Eds.) *Principles of Immunopharmacology*. (3rd ed.). Basel:Birkhäuser; 255-270.

Johansson, E.L., Wassén, L., Holmgren, J., Jertborn, M. ve Rudin A. (2001). Nasal and vaginal vaccinations have differential effects on antibody responses in vaginal and cervical secretions in humans. *Infection and Immunity, **69***, 7481-6.

Johnson, P.R., Schnepp, B.C., Zhang, J., Connell, M.J., Greene, S.M., Yuste E. ve ark. (2009). Vector-mediated gene transfer engenders long-lived neutralizing activity and protection against SIV infection in monkeys. *Nature Medicine*, ***15***, 901–906.

Kammona, O. ve Kiparissides, C. (2012). Recent advances in nanocarrier-based mucosal delivery of biomolecules. *Journal of Controlled Release, **161,*** 781-94.

Kang, C. ve Andrea, C. (2010). Vaccination Strategies to Promote Mucosal Antibody Responses. *Immunity, **33***, 479–491.

Katsenelson, N., Kanswal, S., Puig, M., Mostowski, H., Verthelyi, D. ve Akkoyunlu, M. (2007). Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF- and APRIL-mediated immunoglobulin secretion. *European Journal of Immunology, **37***, 1785–95.

Keam, S.J. ve Harper, D.M. (2008). Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted, adsorbed). *Drugs, **68,*** 359–372.

Kean, T., Roth, S. ve Thanou, M. (2005). Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: Cytotoxicity and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release, **(103)3,*** 643-653.

Keitel, W., Couch, R., Bond, N., Adair, S., Van Nest, G. ve Dekker, C. (1993). Pilot evaluation of influenza virus vaccine (IVV) combined with adjuvant. *Vaccine, **11,*** 909-913.

Kersten, G.F. ve Crommelin, D.J. (2003). Liposomes and ISCOMs. *Vaccine, **21(9-10)***, 915-20.

Khader, S.A., Gaffen, S.L. ve J.K.K., (2009). Th17 cells at the cross roads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunology, **2***, 403–411.

Khatri, K., Goyal, A.K., Gupta, P.N., Mishra, N. ve Vyas, S.P. (2008). Plasmid DNA loaded chitosan nanoparticles for nasal mucosal immunization against hepatitis B. *International Journal of Pharmaceutics, **354(1-2)***, 235-41.

Khurana. S., Chearwae, W., Castellino, F., Manischewitz, J., King, L.R., Honorkiewicz, A. (2010). Vaccines with MF59 adjuvant expand the antibody repertoire to target protective sites of pandemic avian H5N1 influenza virus. *Science Translational Medicine, 2,* 15ra15.

Kiyono, H. ve Fukuyama, S. (2004). NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nature Reviews Immunology, **4(9),*** 699-710.

Koping-Hoggard, M., Sanchez, A. ve Alonso, M.J. (2005). Nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery. *Expert Review of Vaccines, **4,*** 185–196.

Kozlowski, P.A., Cu-Uvin, S., Neutra, M. R. ve Flanigan, T. P. (1997). Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. *Infection and Immunity, **65,*** 1387–1394.

Kozlowski, P.A., Cu-Uvin, S., Neutra, M.R. ve Flanigan, T.P. (1999). Mucosal vaccination strategies for women. *The Journal of Infectious Diseases,**179***, S493-8.

Kozlowski, P.A., Williams, S.B., Lynch, R.M., Flanigan, T.P., Patterson, R.R., Cu-Uvin, S. ve ark. (2002). Differential induction of mucosal and systemic antibody responses in women after nasal, rectal, or vaginal immunization: influence of the menstrual cycle. *The Journal of Immunology, **169,*** 566–574.

Kunisawa, J., Okudaira, A., Tsutusmi, Y., Takahashi, I., Nakanishi, T., Kiyono, H. ve ark. (2000). Characterization of mucoadhesive microspheres for the induction of mucosal and systemic immune responses. *Vaccine, **19(4-5)***, 589-94.

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.

Lamm, M.E. (1997). Interactions of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annual Review of Microbiology*, ***51,*** 311–340.

Landry, S. ve Heilman, C. (2005). Future directions in vaccines: the payoffs of basic research. *Health Aff (Millwood)*, ***24,*** 758-69.

Lawson, L.B., Norton, E.B. ve Clements, J.D. (2011). Defending the mucosa: adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. *Current Opinion in Immunology*, ***23,*** 414-20.

Lee, H.K., Park, J.H. ve Kwon, K.C. (1997). Double-walled microparticles for single shot vaccine. *Journal of Controlled Release,* **44(2)**, 283-293.

Lee, S.T., Mi, F.L., Shen, Y.J. ve Shyu S.S. (2001). Equilibrium and kinetic studies of copper(II) ion uptake by chitosan-tripolyphosphate chelating resin. *Polymer*, ***42***, 1879–92.

Leroux-Roels, I., Roman, F., Forgus, S., Maes, C., De Boever, F., Drame, M. ve ark. (2010). Priming with AS03 A-adjuvanted H5N1 influenza vaccine improves the kinetics, magnitude and durability of the immune response after a heterologous booster vaccination: An open non-randomised extension of a double-blind randomised primary study. *Vaccine,* ***28,*** 849–857.

Levine, M.M. (2000). Immunization against bacterial diseases of the intestine. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, ***31,*** 336–355.

Lewis, D.J.M., Huo, Z., Barnett, S., Kromann, I., Giemza R, Galiza, E. ve ark. (2009) Transient Facial Nerve Paralysis (Bell's Palsy) following Intranasal Delivery of a Genetically Detoxified Mutant of Escherichia coli Heat Labile Toxin. *PLoS ONE,* ***4,*** e6999.

Li Wan Po, A., Rogers, E., Shepphard, M. ve Scott, E.M. (1995). Delivery systems for non-parenteral vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews,* ***18,*** 101–109.

Li, S. ve McCarthy, S. (1999). Further investigations on the hydrolytic degradation of poly (DL-lactide). *Biomaterials*, ***20(1)***, 35-44.

Liang, J., Li, F., Fang, Y., Yang, W., An, X., Zhao, L., ve ark. (2011). Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of chitosan-coated tea polyphenols nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, ***82(2)***, 297-301.

Lin, Y., Slight, S.R. ve Khader, S.A. (2010). Th17 cytokines and vaccine-induced immunity. *Seminars in Immunopathology*, ***32***, *79*–90.

Little, S.R., Lynn, D.M., Ge Q., Anderson, D.G., Puram, S.V., Chen J., ve ark. (2004). Poly-beta amino ester-containing microparticles enhance the activity of nonviral genetic vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA, **101(26)***, 9534-9.

López-León, T., Carvalho, E.L.S., Seijo, B., Ortega-Vinuesa, J.L. ve Bastos-González, D. (2005). Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *Journal of Colloid and Interface Science, **283***, 344–351.

Lycke N. (2012). Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations *Nature Reviews Immunology, **12,*** 592-605.

Lynn, D.M., Anderson, D.G., Putnam, D. ve Langer R. (2001). Accelerated discovery of synthetic transfection vectors: parallel synthesis and screening of a degradable polymer library. *Journal of the American Chemical Society, **123(33)***, 8155-6.

Macdonald, C., Shao, D., Oli, A. ve Agu, R.U. (2013). Characterization of Calu-3 cell monolayers as a model of bronchial epithelial transport: organic cation interaction studies. *Journal of Drug Targeting, **21(1)***, 97-106.

Mäkelä, P.H. (2000) Vaccines, coming of age after 200 years. *FEMS Microbiology Reviews, **24,*** 9-20.

Maraskovsky, E., Schnurr, M., Wilson, N.S., Robson, N.C., Boyle, J., ve Drane, D. (2009). Development of prophylactic and therapeutic vaccines using the ISCOMATRIX adjuvant. *Immunology and Cell Biology, **87,*** 371–376.

Margolin, K. ve Lee, S. (2011). Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers, **3,*** 3856-93.

Martin, C., Somavarapu, S. ve Alpar, H.O. (2005). Mucosal delivery of diphtheria toxoid using polymer-coated-bioadhesive liposomes as vaccine carriers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology. **(15)4***, 301–306.

Martinez, G.J.M., Csaba, N., Fischer, S., Sichelstiel, A., Kundig, T.M., Gander, B. ve ark. (2008). Surface coating of PLGA microparticles with protamine enhances their immunological performance through facilitated phagocytosis. *Journal of Controlled Release, **130,*** 161-167.

Matthias, D.M., Robertson, J., Garrison, M.M., Newland, S. ve Nelson, C. (2007). Freezing temperatures in the vaccine cold chain: A systematic literature review. *Vaccine, **25,*** 3980-6.

McAleer, J.P., Zammit, D.J., Lefrançois L., Rossi, R.J., Vella, A.T. (2007). The lipopolysaccharide adjuvant effect on T cells relies on nonoverlapping contributions from the MyD88 pathway and CD11c+ cells. *Journal of Immunology, **179,*** 6524-35.

McConkey, S.J., Reece, W.H., Moorthy, V.S., Webster, D., Dunachie, S., Butcher, G. ve ark. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nature Medicine,* **9,** 729–735.

Melero, I., Gaudernack, G., Gerritsen, W., Huber, C., Parmiani, G., Scholl, S., ve ark. (2014). Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nature Reviews Clinical Oncology, **11,*** 509–524.

Mermel, L. ve Sutter, R.W. (1993). Vaccine-Associated Paralytic Poliomyelitis. *The New England Journal of Medicine, **329,*** 810-811.

Merser, C.P., Sinay, P. ve Adam A. (1975). Total synthesis and adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochemical and Biophysical Research Communication, **66,*** 1316–1322.

Michalek, S.M., Morisaki, I., Gregory, R.L., Kiyono, H., Hamada S. ve McGhee, J.R. (1983) Oral adjuvants enhance IgA responses to Streptococcus mutans. *Molecular Immunology, **20,*** 1009-18.

Moore, A.C. ve Hill, A.V. (2004). Progress in DNA-based heterologous prime-boostimmunization strategies for malaria, *Immunological Reviews, **199,*** 126–143.

Moorthy, V.S., McConkey, S., Roberts, M., Gothard, P., Arulanantham, N., Degano, P. ve ark. (2003). Safety of DNA and modified vaccinia virus Ankara vaccines against liver-stage *P. Falciparum* malaria in non-immune volunteers. *Vaccine, **21,*** 1995–2002.

Morein, B., Sundquist, B., Hoglund, S., Dalsgaard, K., Osterhaus, A. (1984). Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature, **308,*** 457–460.

Morokutti, A., Muster, T. ve Ferko, B. (2014). Intranasal vaccination with a replication-deficient influenza virus induces heterosubtypic neutralising mucosal IgA antibodies in humans. *Vaccine, **32(17)***, 1897–1900.

Moschos, S.A., Bramwell, V.W., Somavarapu, S. ve Alpar, H.O. (2004). Adjuvant synergy: the effects of nasal coadministration of adjuvants. *Immunology and Cell Biology, **82,*** 628-37.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods, **65***, 55–63.

Mottram, P.L., Leong, D., Crimeen-Irwin, B., Gloster, S., Xiang, S.D., Meanger, J. ve ark. (2007). Type 1 and 2 immunity following vaccination is influenced by nanoparticle size: formulation of a model vaccine for respiratory syncytial virus. *Molecular Pharmaceutics, **4(1),*** 73-84.

Moylett, E.H. ve Hanson, I.C. (2003). 29. Immunization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, **111,*** S754–S765.

Mueller, H., Kassack, M.U., Wiese, M. (2004). Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *Journal of Biomolecular Screening, **9(6)***, 506-515.

Nafee, N., Schneider, M., Schaefer, U.F. ve Lehr, C.M. (2009). Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile. *International Journal of Pharmaceutics, **381(2)***, 130–139.

Nagamoto, T., Hattori, Y., Takayama, K. ve Maitani, Y. (2004). Novel chitosan particles and chitosan-coated emulsions inducing immune response via intranasal vaccine delivery. *Pharmaceutical Research, **21(4)***, 671-4.

Nagao, S., Tanaka, A., Yamamoto, Y., Koga, T., Onoue, K., Shiba, T. ve ark. (1979) Inhibition of macrophage migration by muramyl dipeptide. *Infection and Immunity, **24,*** 308-312.

Nakase, H., Okazaki, K., Tabata, Y., Uchida, K., Uose, S., Ohana, M. ve ark. (2001). Rectal immunization with antigen-containing microspheres induces stronger Th2 responses than oral immunization: a new method for vaccination. *Vaccine, **20,*** 377-84.

Neutra, M. R. ve Kraehenbuhl J. P. (2005). Cellular and molecular basis for antigen transport across epithelial barriers. İçinde Ogra, P.L. ve ark. (Eds.), *Mucosal Immunology*. (3rd). San Diego: Academic Press; 111-130.

Neutra, M.R. ve Kozlowski, P.A. (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge, *Nature Reviews Immunology, **6,*** 148-158.

Newman, M.J. ve Powell, M.F. (1995). Immunological and formulation design considerations for subunit vaccines. İçinde. M.F. Powell ve M.J. Newman (Ed.), *Vaccine Design, the Subunit and Adjuvant Approach,* 1–28. New York: Plenum Press; 1–28.

Nossal, G.J. (2000). The Global Alliance for Vaccines and Immunization--a millennial challenge. *Nature Immunology, **1,*** 5-8.

O'Hagan, D.T. ve De Gregorio, E. (2009). The path to a successful vaccine adjuvant – 'The long and winding road'. *Drug Discovery Today, **14,*** 541-51.

O'Hagan, D.T., Ott, G.S., De Gregorio, E. ve Seubert, A. (2012). The mechanism of action of MF59 – An innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine, **30,*** 4341–4348.

Ogra, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienenstock, J. ve McGhee. J.R. (Eds.). (1999). Mucosal immunology. (2nd ed.). San Diego: Academic Press.

O'Hagan, D.T. (2001). Recent developments in vaccine delivery systems. *Current Drug Targets - Infectious Disorders, **1,*** 273-86.

Ortega-Vinuesa, J.L. ve Bastos-González, D. (2001). A review of factors affecting the performances of latex agglutination tests. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, **12(4)***, 379-408.

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

Partidos, C.D. (2000). Intranasal vaccines: forthcoming challenges. *Pharmaceutical Science & Technology Today, **3,*** 273–281.

Pashine, A., Valiante, N.M. ve Ulmer, J.B. (2005). Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nature Medicine, **11,*** 63–68.

Patil, S.D., Rhodes, D.G. ve Burgess, D.J. (2005). DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *The AAPS Journal, **7,*** E61-77.

Pearse, M.J. ve Drane, D. (2005). ISCOMATRIX® adjuvant for antigen delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews, 57,* 465–474.

Peeters, B., Tonnis, W.F., Murugappan, S., Rottier, P., Koch, G., Frijlink, H.W. ve ark. (2014). Pulmonary immunization of chickens using non-adjuvanted spray-freeze dried whole inactivated virus vaccine completely protects against highly pathogenic H5N1 avian influenza virus. *Vaccine, **32(48),*** 6445-50.

Peniche H. ve Peniche C. (2007). Chitosan nanoparticles: a contribution to nanomedicine. *Polymer International, **60***, 883-889.

Peniche, C., Argüelles-Monal, W., Davidenko, N., Sastre, R., Gallardo, A. ve San Román, J. (1999). Self-curing membranes of chitosan/PAA IPNs obtained by radical polymerization: preparation, characterization and interpolymer complexation. *Biomaterials, **20(20),*** 1869-78.

Perugini, P., Simeoni, S., Scalia, S., Genta, I., Modena, T., Conti, B. ve ark. (2002). Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. *International Journal of Pharmaceutics, **246(1–2)***, 37–45.

Pichyangkul, S., Gettayacamin, M., Miller, R.S., Lyon, J.A., Angov, E., Tongtawe, P. ve ark. (2004). Pre-clinical evaluation of the malaria vaccine candidate P. falciparum MSP1(42) formulated with novel adjuvants or with alum. *Vaccine, **22,*** 3831–3840.

Piñón-Segundo, E., Nava-Arzaluz, M.G. ve Lechuga-Ballesteros D. (2012). Pharmaceutical polymeric nanoparticles prepared by the double emulsion- solvent evaporation technique. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation, **6(3)***, 224-35.

Pirofski, L. ve Casadevall, A. (1998). Use of Licensed Vaccines for Active Immunization of the Immunocompromised Host. *Clinical Microbiology Reviews,**11,*** 1-26.

Plante, M., Jones, T., Allard, F., Torossian, K., Gauthier, J., St-Felix, N. ve ark. (2002). Nasal immunization with subunit proteosome influenza vaccines induces serum HAI, mucosal IgA and protection against influenza challenge. *Vaccine*, ***20,*** 218–225.

Plotkin, S.A. (2005). Vaccines: past, present and future. *Nature Medicine*, ***11,*** S5 - S11.

Plotkin, S.A. (2010). Correlates of protection induced by vaccination. *Clinical and Vaccine Immunology*, ***17,*** 1055–1065.

Plotkin, S.L. ve Plotkin, S.A., (2013). A short history of vaccination. İçinde S.A. Plotkin, W.A. Orenstein, P.A. Offit. (Eds.). *Vaccines.* (6th.). Philadelphia: Elsevier-Saunders; 1–13.

Podda A. (2001). The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: Experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine, **19,*** 2673–2680.

Poland, G. (2011). Vaccines against Lyme disease: What happened and what lessons can we learn? *Clinical Infectious Diseases*, ***52***, s253-8.

Puga, I., Cols, M. ve Cerutti, A. (2010). Innate signals in mucosal immunoglobulin class switching. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, ***126***, 889–95.

Quan, Gan. ve Tao, Wang. (2007). Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **59,*** 24–34.

Qureshi, N., Takayama, K. ve Ribi, E. (1982). Purification and structural determination of nontoxic lipid A obtained from the lipopolysaccharide of Salmonella typhimurium. *Journal of Biological Chemistry, **257,*** 11808–11815.

Rafati, H., Coombes, A.G.A., Adler, J., Holland, J. ve Davis S.S. (1997). Protein-loaded poly(dl-lactide-co-glycolide) microparticles for oral administration: formulation, structural and release characteristics. *Journal of Controlled Release, **43,*** 89–102.

Raghuvanshi, R.S., Katare, Y.K., Lalwani, K., Ali, M.M., Singh, O. ve Panda, A.K. (2002). Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. *International Journal of Pharmaceutics. **245,*** 109–121.

Rajapaksa, T.E., Stover-Hamer, M., Fernandez, X., Eckelhoefer, H.A. ve Lo, D.D. (2010). Claudin 4-targeted protein incorporated into PLGA nanoparticles can mediate M cell targeted delivery. *Journal of Controlled Release, **142(2)***, 196–205.

Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B. ve Cesàro, A. (2013). Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics, **455***, 219–228.

Ranchin, B., Fabien, N., Cochat, P., Pouteil-noble, C., Trolliet, P., Durieu, I. ve ark. (2009). Interleukin 17 acts in synergy with B cell – activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nature Immunology, **10***, 778–85.

Rappuoli R. (2007). Bridging the knowledge gaps in vaccine design. *Nature Biotechnology, **25***, 1361-1366.

Ravi, S., Peh, K.K., Darwis, Y., Murthy, B.K., Raghu Raj Singh, T. ve Mallikarjun, C. (2008). Development and Characterization of Polymeric Microspheres for Controlled Release Protein Loaded Drug Delivery System. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, **70(3)***, 303–309.

Reed, S.G., Bertholet, S., Coler, R.N. ve Friede, M. (2009). New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology, **30,*** 23-32.

Rice-Ficht, A.C., Arenas-Gamboa, A.M., Kahl-McDonagh, M.M. ve Ficht, T.A. (2010). Polymeric particles in vaccine delivery. *Current Opinion in Microbiology, **13(1),*** 106-12.

Riedel, S. (2005). Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proceedings (Baylor University. Medical Center), **18,*** 21–25.

Rimmelzwaan, G.F., Nieuwkoop, N., Brandenburg, A., Sutter, G., Beyer, W.E., Maher, D. ve ark. (2000). A randomized, double blind study in young healthy adults comparing cell mediated and humoral immune responses induced by influenza ISCOM vaccines and conventional vaccines. *Vaccine,**19,*** 1180-7.

Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Benink, H.A., Tracy, J., Worzella, M.S. ve ark. (2004). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Rodríguez-Pinto, D. (2005). B cells as antigen presenting cells. *Cellular Immunology, **238,*** 67–75.

Romagnani, S. (1994). Lymphokine Production by Human T Cells in Disease States. *Annual Review of Immunology, **12,*** 227-257.

Romoren, K., Thu, B.J., Bols, N.C. ve Evensen, O. (2004). Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in salmonid cell lines of hepatocyte and macrophage origin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, **1663,*** 127–134.

Ruedl, C., Rieser, C., Kofler, N., Wick, G. ve Wolf H. (1996). Humoral and cellular immune responses in the murine respiratory tract following oral immunization with cholera toxin or Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Vaccine, **14(8)***, 792-8.

Ryan E.J., McNeela E., Pizza M., Rappuoli R., O'Neill L. ve Mills, K.H.G. (2000). Modulation of Innate and Acquired Immune Responses by Escherichia coli Heat-Labile

Toxin: Distinct Pro- and Anti-Inflammatory Effects of the Nontoxic AB Complex and the Enzyme Activity. *The Journal of Immunology, **165,*** 5750–5759.

Ryan, E.T. ve Calderwood, S.B. (2000). Cholera vaccines. *Clinical Infectious Diseases, **31,*** 561–565.

Saatçi, F. ve Bozkır, A. (2003). Aşıların nazal yoldan uygulanışı. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, **32,*** 175-193.

Salgaller, M.L. ve Lodge. P.A. (1998). Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer. *Journal of Surgical Oncology, **68,*** 122–138.

Salmond, R.J. ve ark. (2002). Immune modulation by the cholera-like enterotoxins. *Expert Reviews in Molecular Medicine, **4,*** 1–16.

Santosuosso, M., McCormick, S. ve Xing, Z. (2005). Adenoviral vectors for mucosal vaccination against infectious diseases. *Viral Immunology, **18,*** 283–91.

Sasaki, S., Tsuji, T., Hamajima, K., Fukushima, J., Ishii, N., Kaneko, T. ve ark. (1997). Monophosphoryl lipid A enhances both humoral and cell-mediated immune responses to DNA vaccination against human immunodeficiency virus type 1. *Infection and Immunity, **65,*** 3520–528.

Sayin, B., Somavarapu, S., Li, X.W., Thanou, M., Sesardic, D., Alpar, H.O. ve ark. (2008). Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC) and N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles for non-invasive vaccine delivery. *International Journal of Pharmaceutics, **363(1-2)***, 139-48.

Schwarz, T.F., Horacek, T., Knuf, M., Damman, H.G., Roman, F., Drame, M. ve ark. (2009). Single dose vaccination with AS03-adjuvanted H5N1 vaccines in a randomized trial induces strong and broad immune responsiveness to booster vaccination in adults. *Vaccine, **27,*** 6284–6290.

Sendi, P., Locher, R., Bucheli, B. ve Battegay, M. (2004). Intranasal Influenza Vaccine in a Working Population. *Clinical Infectious Diseases, **38(7)***, 974-980.

Senel, S. ve McClure, S.J. (2004). Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews, **56(10)***, 1467-80.

Shafique, M., Meijerhof, T., Wilschut, J. ve de Haan, A. (2013) Evaluation of an intranasal virosomal vaccine against respiratory syncytial virus in mice: effect of TLR2 and NOD2 ligands on induction of systemic and mucosal immune responses. *PLoS One, **8,*** e61287.

Shattock, R.J., Haynes, B.F., Pulendran, B., Flores, J. ve Esparza, J. (2008). Improving defences at the portal of HIV entry: mucosal and innate immunity. *PLoS Medicine, **5,*** e81.

Shen, H., Goldberg, E. ve Saltzman, W.M. (2003). Gene expression and mucosal immune responses after vaginal DNA immunization in mice using a controlled delivery matrix. *Journal of Controlled Release, **86(2-3)***, 339-48.

Shenoy, D., Little, S., Langer, R. ve Amiji M. (2005a). Poly(Ethylene Oxide)-Modified Poly(β-Amino Ester) Nanoparticles as a pH-Sensitive System for Tumor-Targeted Delivery of Hydrophobic Drugs: Part I. In Vitro Evaluations. *Molecular Pharmaceutics, **2(5)***, 357-66.

Shenoy, D., Little, S., Langer, R. ve Amiji, M. (2005b). Poly(Ethylene Oxide)-Modified Poly(beta-Amino Ester) Nanoparticles as a pH-Sensitive System for Tumor-Targeted Delivery of Hydrophobic Drugs: Part 2. In Vivo Distribution and Tumor Localization Studies. *Pharmaceutical Research, **22(12)***, 2107-14.

Shi, L., Caulfield, M.J., Chern, R.T., Wilson, R.A., Sanyal, G. ve Volkin D.B. (2002). Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-shot hepatitis B vaccine formulated with PLGA microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences, **91(4)***, 1019-35.

Shi, Z., Zeng, M., Yang, G., Siegel, F., Cain, L.J., van Kampen, K.R. ve ark. (2001). Protection against tetanus by needle-free inoculation of adenovirus-vectored nasal and epicutaneous vaccines. *Journal of Virology, **75,*** 11474–11482.

Shim, B.S., Choi, Y., Cheon, I. S. ve Song, M. K. (2013). Sublingual Delivery of Vaccines for the Induction of Mucosal Immunity. *Immune Network, **13(3)***, 81–85.

Silva, H., Barra, C.V., Rocha, F.V., Frézard, F., Lopes, M.T.P. ve Fontes, A.P.S. (2010). Novel platinum (II) complexes of long chain aliphatic diamine ligands with oxalato as the leaving group. Comparative cytotoxic activity relative to chloride precursors. *Journal of the Brazilian Chemical Society, **21(10)***, 1961-1967.

Silva, S. M.L., Braga, C.R.C., Fook, M.V.L., Raposo, C.M.O., Carvalho, L.H. ve Canedo, E.L. (2012). Application of Infrared Spectroscopy to Analysis of Chitosan/Clay Nanocomposites, Infrared Spectroscopy. İçinde T. Theophile (Ed.), Materials Science, Engineering and Technology. InTech: 43-62.

Simmons, C.P., Ghaem-Magami, M., Petrovska, L., Lopes, L., Chain, B.M., Williams, N.A. ve ark. (2001). Immunomodulation using bacterial enterotoxins. *Scandinavian Journal of Immunology, **53,*** 218-26.

Simon, J.K., Levine, M.M., Weniger, B.G. ve Restrepo, A.M.H. (2009). Mucosal Immunization and Needle-Free Injection Devices. İçinde M.M. Levine (Ed.). *New Generation Vaccines*. (4th Ed.). London: Informa Healthcare; 405-414.

Singh M. ve O'Hagan D. (2002). Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharmaceutical Research, **19(6)***, 715-28.

Singh, J., Pandit, S., Bramwell, V.W. ve Alpar, H.O. (2006). Diphtheria toxoid loaded poly-([epsilon]-caprolactone) nanoparticles as mucosal vaccine delivery systems. *Methods*, ***38,*** 96–105.

Singh, M., Briones, M., Ott, G. ve O'Hagan, D. (2000). Cationic microparticles: A potent delivery system for DNA vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, ***97,*** 811–816.

Singh, M., Li, X.M., McGee, J.P., Zamb, T., Koff, W., Wang, C.Y. ve ark. (1997). Controlled release microparticles as a single dose hepatitis B vaccine: evaluation of immunogenicity in mice. *Vaccine*, ***15(5)***, 475-81.

Sjölander, A., Drane, D., Maraskovsky, E., Scheerlinck, J.P., Suhrbier, A., Tennent, J. ve ark. (2001). Immune responses to ISCOM formulations in animal and primate models. *Vaccine,* ***19,*** 2661-5.

Sloat, B.R. ve Cui, Z. (2006). Strong mucosal and systemic immunities induced by nasal immunization with anthrax protective antigen protein incorporated in liposome-protamine-DNA particles. *Pharmaceutical Research,* ***23(2)***, 262-9.

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,* ***41(1)***, 93-100.

Slütter, B. ve Jiskoot, W. (2010). Dual role of CpG as immune modulator and physical crosslinker in ovalbumin loaded N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles for nasal vaccination, *Journal of Controlled Release,* ***148(1)***, 117–121.

Slütter, B., Bal, S., Keijzer, C., Mallants, R., Hagenaars, N., Que, I. ve ark. (2010). Nasal vaccination with N-trimethyl chitosan and PLGA based nanoparticles: nanoparticle characteristics determine quality and strength of the antibody response in mice against the encapsulated antigen. *Vaccine,* ***28(38),*** 6282-91.

Slütter, B., Plapied, L., Fievez, V., Sande, M.A., des Rieux, A., Schneider, Y.J. ve ark. (2009). Mechanistic study of the adjuvant effect of biodegradable nanoparticles in mucosal vaccination, *Journal of Controlled Release,* ***138,*** 113-121.

Soane, R.J., Frier, M., Perkins, A.C., Jones, N.S., Davis, S.S. ve Illum, L. (1999). Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans. *International Journal of Pharmaceutics,* ***178(1)***, 55-65.

Sood, A. ve Panchagnula, R. (2001). Peroral route: An opportunity for protein and peptide drug delivery. *Chemical Reviews,* ***101,*** 3275-3303.

Steere, A.C., Sikand, V.K., Meurice, F., Parenti, D.L., Fikrig, E., Schoen, R.T. ve ark. (1998). Vaccination against Lyme disease with recombinant Borella burgdorferi outer-

surface lipoprotein A WITH ADJUVANT. *The New England Journal of Medicine, **339***, 209–215.

Tafaghodi, M., Jaafari, M.R. ve Sajadi Tabassi, S.A. (2006). Nasal immunization studies using liposomes loaded with tetanus toxoid and CpG-ODN. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **64(2)***, 138-45.

Tahara, K., Yamamoto, H. ve Kawashima, Y. (2010). Cellular uptake mechanism and intracellular distributions of polysorbate 80-modified poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for gene delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, ***75(2)***, 218-224.

Tamber, H., Johansen, P., Merkle, H.P. ve Gander B. (2005). Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews, **57(3)***, 357-76.

Tertilt, C., Joh, J., Krause, A., Chou, P., Schneeweiss, K., Crystal, R.G. ve ark. (2009). Expression of B-cell activating factor enhances protective immunity of a vaccine against *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity, **77***, 3044–55.

Thiele, L., Merkle, H.P. ve Walter, E. (2003). Phagocytosis and phagosomal fate of surface-modified microparticles in dendritic cells and macrophages. *Pharmaceutical Research, **20(2),*** 221-8.

Tighe, H., Takabayashi, K., Schwartz, D., Van Nest, G., Tuck, S., Eiden, J.J. ve ark. (2000). Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, **106,*** 124-34.

Tiyaboonchai, W., Woiszwillo, J. ve Middaugh, C.R. (2003). Formulation and characterization of DNApolyethylenimine-dextran sulfate nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, **19,*** 191–202.

Treanor, J., Nolan, C., O'Brien, D., Burt, D., Lowell, G., Linden, J. ve ark. (2006). Intranasal administration of a proteosome-influenza vaccine is well-tolerated and induces serum and nasal secretion influenza antibodies in healthy human subjects. *Vaccine, **24(3),*** 254-62.

Tsai, M.L., Chen R.H., Bai, S.W. ve Chen, W.Y. (2001). The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. *Carbohydrate Polymers*, ***84 (2)***, 756–761.

Ugwoke, M.I., Agu, R.U., Verbeke, N. ve Kinget R. (2005). Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews, **57,*** 1640-65.

Ulrich, Glück., Jan-Olaf, Gebbers. ve Reinhard, Glück. (1999). Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without *Escherichia coli* heat-labile toxin in adult volunteers. *Journal of Virology, **73,*** 7780-6.

Ulrich, J. T. ve Myers, K.R. (1995). Monophosphoryl lipid A as an adjuvant: Past experiences and new directions. *Pharmaceutical Biotechnology, **6,*** 495–524.

Uto, T., Wang, X., Sato, K., Haraguchi, M., Akagi, T., Akashi, M. ve ark. (2007). Targeting of Antigen to Dendritic Cells with Poly(γ-Glutamic Acid) Nanoparticles Induces Antigen-Specific Humoral and Cellular Immunity. *The Journal of Immunology, **178(5),*** 2979-2986.

Vajdy, M. ve O'Hagan, D.T. (2001). Microparticles for intranasal immunization. *Advanced Drug Delivery Reviews, **51,*** 127–141.

Valenzuela, P., Medina A., Rutter, U.J., Ammerer G. ve Hall, B.D. (1982). Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature, **298,*** 347 – 350.

Van Damme, P., Oosterhuis-Kafeja, F., Van der Wielen, M., Almagor, A., Sharon O., Levin, Y. (2009). Safety and efficacy of a novel microneedle device for dose sparing intradermal influenza vaccination in healthy adults. *Vaccine, **27,*** 454–459.

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

van der Lubben, I.M., Verhoef, J.C., van Aelst, A.C., Borchard, G. ve Junginger, H.E. (2001b). Chitosan microparticles for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary in vivo uptake studies in murine Peyer's patches. *Biomaterials, **22,*** 687–69.

van der Lubben, IM., Verhoef, J.C., Borchard, G. ve Junginger, H.E. (2001a). Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, **3***, 201-7.

Van Kampen, K.R., Shi, Z., Gao, P., Zhang, J., Foster, K.W., Chen, D.T. ve ark. (2005). Safety and immunogenicity of adenovirus-vectored nasal and epicutaneous influenza vaccines in humans. *Vaccine, **23,*** 1029–1036.

van Overtvelt, L., Razafindratsita, A., St-Lu, N., Didierlaurent, A., Batard, T., Lombardi ve ark. (2006). Sublingual vaccines based on wild-type recombinant allergens. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology, **38***, 247-249.

Vila, A., Gill, H., McCallion, O. ve Alonso, M.J. (2004b). Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: Effect of particle size and PEG coating density. *Journal of Controlled Release, **98,*** 231–244.

Vila, A., Sánchez, A., Evora, C., Soriano, I., McCallion, O. ve Alonso, M.J. (2005). PLA-PEG particles as nasal protein carriers: the influence of the particle size. *International Journal of Pharmaceutics,* ***292(1-2),*** 43-52.

Vila, A., Sánchez, A., Janes, K., Behrens, I., Kissel, T., Vila Jato, J.L. ve ark. (2004a). Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* ***57(1)***, 123-31.

Vila, A., Sánchez, A., Pérez, C. ve Alonso, M.J. (2002). PLA-PEG nanospheres: new carriers for transmucosal delivery of proteins and plasmid DNA. *Polymers for Advanced Technologies,* ***13(10-12)***, 851–858.

Vogel, F.R. ve Powell, M.F. (1995). A compendium of vaccine adjuvants and excipients. İçinde. M.F. Powell ve M.J. Newman (eds.), *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach.* New York:Plenum Press; 141–228.

von Hoegen P. (2001). Synthetic biomimetic supra molecular Biovector (SMBV) particles for nasal vaccine delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews,* **51(1-3)**, 113-25.

Wack, A. ve Rappuoli, R. (2005). Vaccinology at the beginning of the 21st century. *Current Opinion in Immunology,* ***17,*** 411–418.

Weng, Y., Leah, H., Guo, X., Chong, V.J., Gregory, R.L. ve Xie, D. (2012). A novel antibacterial resin composite for improved dental restoratives. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine,* ***23***, 1553–1561.

Wershil, B.K. ve Furuta, G.T. (2008). 4. Gastrointestinal mucosal immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology,* ***121,*** S380–S383.

Wheeler, A. W., Marshall, J. S. ve Ulrich, J. T. (2001). A Th1-inducing adjuvant, enhances antibody profiles in experimental animals suggesting it has the potential to improve the efficacy of allergy vaccines. *International Archives of Allergy and Immunology,* ***126,*** 135–139.

Whitmire, J.K. (2011). Induction and function of virus-specific CD4+ T cell responses. *Virology,* ***411(2),*** 216–228.

Wu, H.Y. ve Russell, M.W. (1998). Induction of mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine,* ***16,*** 286–292.

Wyatt, T., Whaley, K.J., Cone, R.A. ve Saltzman, W.M. (1998). Antigen-releasing polymer rings and microspheres stimulate mucosal immunity in the vagina. *Journal of Controlled Release,* ***50(1-3)***, 93–102.

Xiang, S.D., Scholzen, A., Minigo, G., David, C., Apostolopoulos, V., Mottram, P.L. ve Plebanski, M. (2006). Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? *Methods*, ***40,***1–9.

Xu, W., Shen, Y., Jiang, Z., Wang, Y., Chu, Y. ve Xiong, S. (2004). Intranasal delivery of chitosan-DNA vaccine generates mucosal SIgA and anti-CVB3 protection.*Vaccine,* ***22,*** 3603–3612.

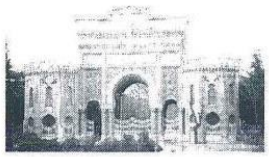
Xu-Amano, J., Kiyono, H., Jackson, R.J. ve ark. (1993). Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *The Journal of Experimental Medicine,* ***178,*** 1309-20.

Zhong, Z., Wei, X., Qi, B., Xiao, W., Yang, Li., Wei, Y. ve ark. (2010). A novel liposomal vaccine improves humoral immunity and prevents tumor pulmonary metastasis in mice. *International Journal of Pharmaceutics,* ***399,*** 156–162.

Zimmerman, D.H., Taylor, P., Bendele, A., Carambula, R., Duzant, Y., Lowe, V., ve ark. (2010). CEL-2000: A therapeutic vaccine for rheumatoid arthritis arrests disease development and alters serum cytokine/chemokine patterns in the bovine collagen type II induced arthritis in the DBA mouse model. *International Immunopharmacology,* ***10,*** 412-21.

Zurbriggen, R., Metcalfe, I.C., Glück, R., Viret, J.F. ve Moser, C. (2003). Nonclinical safety evaluation of Escherichia coli heat-labile toxin mucosal adjuvant as a component of a nasal influenza vaccine. *Expert Review of Vaccines,* ***2,*** 295–304.

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2012/ 162

29/11/2012

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

Karar No :2012/ 162

Başvuru :22.11.2012

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen Eczacı Genada SİNANİ'ye ait "Nazal Yol İle Uygulanan Aşı Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Fare
	Cinsiyeti	Dişi
	Sayısı	84
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