



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**MUKOZAL YOLLA UYGULANAN  
MİKROPARTİKÜLER ANTİJEN TAŞIYICI  
SİSTEMLER ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR**

**Selin ÇOBAN**

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Asuman BOZKIR**

**2011- ANKARA**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MUKOZAL YOLLA UYGULANAN  
MİKROPARTİKÜLER ANTİJEN TAŞIYICI  
SİSTEMLER ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR**

**Selin ÇOBAN**

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Asuman BOZKIR**

**2011- ANKARA**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Farmasötik Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans **Programı**  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
Yüksek Lisans **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 30/09/2011

Prof. Dr. Nurten ÖZDEMİR  
Ankara Üniversitesi  
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı  
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Asuman BOZKIR  
Ankara Üniversitesi  
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL  
Ankara Üniversitesi  
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Zelihagül DEĞİM  
Gazi Üniversitesi  
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. İmran VURAL  
Hacettepe Üniversitesi  
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

**İÇİNDEKİLER**

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	xi
Simgeler ve Kısaltmalar	xiii
Şekiller	xiv
Çizelgeler	xvi
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. Aşılar	3
1.2.1. Aşıların Sınıflandırılması	5
1.2.1.1. Canlı Attenüe (Zayıflatılmış) Aşılar	5
1.2.1.2. İnaktif ve Ölü Tüm Hücre Aşıları	6
1.2.1.3. Toksoid Aşılar	6
1.2.1.4. Subunit Aşılar	7
1.2.1.5. Saf Polisakkarit Aşılar	7
1.2.1.6. Konjuge Aşılar	7
1.2.1.7. Rekombinant Aşılar	8
1.2.1.8. DNA Aşıları	8
1.2.2. Adjuvanlar	9
1.3. Mukozal Aşılama	11
1.3.1. Mukozal Bağışıklık Sistemi	13
1.3.1.1. Mikrofold (M) Hücreleri	15
1.3.1.2. Makrofajlar ve Dendritik Hücreler	15
1.3.1.3. B ve T Lenfositler	15
1.3.1.4. Antikorlar	16
1.3.2. Mukozal Adjuvanlar	17
1.3.2.1. Bakteriyel Toksinler ve Türevleri	17
1.3.2.2. CpG Motifleri	18

1.3.2.3.	Monofosforil Lipit A	18
1.3.2.4.	Saponinler	19
1.3.2.5.	Endojen Moleküller: Sitokinler ve Kemokinler	19
1.3.2.6.	Canlı Vektörler	20
1.3.3.	Partiküler Antijen Taşıyıcı Sistemler	20
1.3.3.1.	Lipit Kökenli Taşıyıcı Sistemler	21
1.3.3.1.1.	Lipozomlar	21
1.3.3.1.2.	Arkeozomlar	21
1.3.3.1.3.	Kohleatlar	22
1.3.3.1.4.	Virüs-Benzeri Partiküller ve Virozomlar	23
1.3.3.1.5.	Bağışıklığı Uyarıcı Kompleksler (ISCOM ve ISCOMATRIX)	23
1.3.3.1.6.	Proteozomlar	24
1.3.3.2.	Polimerik Taşıyıcı Sistemler	24
1.3.3.2.1.	Kitosan	25
1.3.3.2.2.	Aljinatlar	25
1.3.3.2.3.	Karbopol	26
1.3.3.2.4.	Mikro- ve Nano- Partiküller	26
1.3.4.	Mukozal Aşı Uygulama Yolları	27
1.3.4.1.	Oral Yol	28
1.3.4.2.	Pulmoner Yol	28
1.3.4.3.	Rektal ve Vajinal Yol	29
1.3.4.4.	Konjunktival Yol	29
1.3.4.5.	Nazal Yol	30
1.4.	Nazal Yolla Aşı Verilişi	30
1.4.1.	Burun Anatomisi ve Fizyolojisi	32
1.4.1.1.	Burun Boşluğu	32
1.4.1.2.	Mukus ve Mukosilyer Klerens	33
1.4.1.3.	İlaç Absorpsiyonunu Etkileyen Faktörler	34
1.4.1.3.1.	Fizyolojik Faktörler/Bariyerler	35
1.4.1.3.1.1.	Mukosilyer Klerens	35
1.4.1.3.1.2.	Enzimler	35
1.4.1.3.1.3.	Patofizyoloji	35

1.4.1.3.1.4.	Nazal Kan Akımı	36
1.4.1.3.1.5.	Burun Mukus Membranın Alanı	36
1.4.1.3.2.	Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özellikleri	36
1.4.1.3.3.	Formülasyon Özellikleri	37
1.4.1.3.3.1.	Dozaj Formu	37
1.4.1.3.3.2.	İlaç Konsantrasyonu, Doz ve Uygulama Hacmi	37
1.4.1.3.3.3.	Formülasyonun Fiziksel Formu	38
1.4.1.3.3.4.	pH	38
1.4.1.3.3.5.	Osmolarite	39
1.4.1.3.3.6.	Viskozite	39
1.4.1.3.3.7.	Absorpsiyon Artırıcılar	39
1.4.2.	Nazal Bağışıklık Sistemi	40
1.4.2.1.	Burna Bağlı Lenfoid Doku (NALT)	40
1.4.2.2.	Intranazal Bağışıklama Sonrası Bağışık Yanıtın Oluşması	41
1.5.	Nazal Yolla Bağışıklamayı Artırmak Üzere Formülasyon Yaklaşımları	42
1.5.1.	Partiküler Taşıyıcı Sistemler	43
1.5.2.	Partikül Hazırlama Yöntemleri	46
1.5.2.1.	Çözücü Ekstraksiyon/Buharlaştırma Yöntemi	47
1.5.2.2.	Faz Ayrışması (Koaservasyon) Yöntemi	48
1.5.2.3.	Püskürterek Kurutma Yöntemi	49
1.5.3.	Çalışmamızda Mikropartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler	50
1.5.3.1.	Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)	51
1.5.3.2.	Poli-ε-kaprolakton (PCL)	52
1.6.	Polimer Matrislerden Etkin Madde Salım Mekanizmaları	53
1.6.1.	Sıfır Derece Kinetik	54
1.6.2.	Birinci Derece Kinetik	55
1.6.3.	Higuchi Eşitliği	55
1.7.	Difteri	56
1.7.1.	Difteri Toksini	56
1.7.2.	Difteri Toksoidinin Hazırlanması	57

1.7.3.	Difteri Toksoidi ile Aşılama ve Beraberindeki Sorunlar	57
1.7.4.	Difteri Toksoidinin Mevcut Preparatları ve Gelecekteki Yaklaşımlar	58
<b>2.</b>	<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>60</b>
2.1.	Gereçler	60
2.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	60
2.1.2.	Kullanılan Cihazlar	62
2.2.	Yöntemler	63
2.2.1.	Difteri Toksoidi Özelliklerinin Belirlenmesi	63
2.2.1.1.	Protein Miktar Tayini	63
2.2.1.2.	Lf Değerinin Belirlenmesi	63
2.2.1.3.	Difteri Toksoidinin Spektrumu	65
2.2.1.4.	Mikrobikinoninik Asit (MikroBCA) Analiz Yöntemi Kullanılarak Difteri Toksoidinin Standart Doğru Denklemine Hesaplanması	65
2.2.1.5.	Difteri Toksoidinin Miktar Tayini için MikroBikinoninik Asit (MikroBCA) Yönteminin Validasyonu	67
2.2.1.5.1.	Doğruluk	67
2.2.1.5.2.	Keskinlik	68
2.2.1.5.3.	Özgünlük	69
2.2.1.5.4.	Gözlenebilme Sınırı (LOD)	69
2.2.1.5.5.	Alt Tayin Sınırı (LOQ)	69
2.2.1.5.6.	Doğrusallık ve Aralık	70
2.2.1.6.	Difteri Toksoidinin Saflık Tayini	70
2.2.1.7.	Difteri Toksoidinin Stabilitesi	74
2.2.2.	Mikropartiküler Yapıdaki Ön Formülasyonların Hazırlanması	74
2.2.2.1.	Poli (DL-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve Poli-ε-kaprolakton (PCL) Polimerlerini İçeren Ön Formülasyonların Hazırlanması	74

2.2.3.	Poli (DL-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve Poli-ε-kaprolakton (PCL) Polimerlerini İçeren Ön Formülasyonların Karakterizasyonu	77
2.2.3.1.	Mikropartiküler Yapıdaki Ön Formülasyonların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	78
2.2.3.2.	Mikropartiküler Yapıdaki Ön Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinlikleri ve Üretim Verimleri Tayini	78
2.2.4.	F11, F17, F23, F29, F35, F36 Kodlu Formülasyonların Difteri Toksoidi ile Hazırlanmaları	79
2.2.4.1.	Difteri Toksoidi İçeren F11, F17, F23, F29, F35, F36 Kodlu Formülasyonların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	80
2.2.4.2.	Difteri Toksoidi İçeren F11, F17, F23, F29, F35, F36 Kodlu Formülasyonların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Saptanması	80
2.2.4.3.	Difteri Toksoidi İçeren F11, F17, F23, F29, F35, F36 Kodlu Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinlikleri ve Üretim Verimleri Tayini	81
2.2.4.4.	Difteri Toksoidi İçeren Formülasyonlarda In-vitro Salım Hızı Çalışmaları	81
2.2.4.5.	Kinetik Hesaplamalar ve Sonuçların Değerlendirilmesi	82
2.2.5.	Difteri Toksoidi İçeren D1 ve D5 Kodlu Formülasyonlara Ait Ön Stabilite Çalışmaları	82
2.2.6.	Gümüş Boyama Metodu ile D1 ve D5 Kodlu Formülasyonlardan Salınan Difteri Toksoidinin Bütünlüğünün Belirlenmesi	83
2.2.7.	In vivo Çalışmalar	84
2.2.7.1.	Deney Hayvanlarının Seçimi	84
2.2.7.2.	Deney Hayvanlarının Özellikleri	84
2.2.7.3.	Formülasyonların Seçimi	84
2.2.7.4.	Uygulama Dozunun Belirlenmesi	85
2.2.7.5.	In vivo Aşılama Planı ve Deney Hayvanlarından Kan Alma	86
2.2.7.6.	Subkütan ve Intranazal Toksisite Testi	89



2.2.8.	ELISA (Enzim İlintili İmmünosorban Analizi)	89
<b>3.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>92</b>
3.1.	Difteri Toksoidi Özelliklerinin Belirlenmesine Ait Bulgular	92
3.1.1.	Difteri Toksoidinin Protein Miktar Tayinine Ait Bulgular	92
3.1.2.	Difteri Toksoidinin Lf Değerinin Belirlenmesine Ait Bulgular	92
3.1.3.	Difteri Toksoidinin UV Spektrumuna Ait Bulgular	92
3.1.4.	Difteri Toksoidinin MikroBikininik Asit (MikroBCA) Yöntemiyle Kalibrasyonuna Ait Bulgular	93
3.1.5.	Difteri Toksoidinin Miktar Tayini için MikroBikininik Asit (MikroBCA) Yönteminin Validasyonuna ait Bulgular	94
3.1.5.1.	Doğruluk	94
3.1.5.2.	Kesinlik	95
3.1.5.2.1.	Tekrarlanabilirlik	96
3.1.5.2.2.	Ara Kesinlik	97
3.1.5.3.	Özgünlük	98
3.1.5.4.	Gözlenebilme Sınırı	98
3.1.5.5.	Alt Tayin Sınırı	99
3.1.5.6.	Doğrusallık ve Aralık	99
3.1.6.	Difteri Toksoidinin Saflık Tayinine Ait Bulgular	101
3.1.7.	Difteri Toksoidinin Stabilitesine Ait Bulgular	101
3.2.	Mikropartiküler Yapıdaki Ön Formülasyonların Karakterizasyonu	102
3.2.1.	Mikropartiküler Yapıdaki Ön Formülasyonların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesine Ait Bulgular	102
3.2.2.	Mikropartiküler Yapıdaki Ön Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinlikleri ve Üretim Verimleri Tayinine İlişkin Bulgular	108
3.3.	Difteri Toksoidi İçeren Mikropartiküler Formülasyonların Karakterizasyonu	113
3.3.1.	Difteri Toksoidi İçeren Mikropartiküler Formülasyonların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesine Ait Bulgular	113

3.3.2.	Difteri Toksoidi İçeren Mikropartiküler Formülasyonların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımlarının Belirlenmesine Ait Bulgular	114
3.3.3.	Difteri Toksoidi İçeren Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinlikleri ve Üretim Verimleri Tayinine İlişkin Bulgular	117
3.3.4.	Difteri Toksoidi İçeren Formülasyonların In vitro Salım Çalışmalarına Ait Bulgular	119
3.3.5.	In vitro Salım Hızı Deneylerinin Kinetik Değerlendirilmesine Ait Bulgular	119
3.3.6.	Difteri Toksoidi İçeren D1 ve D5 Kodlu Formülasyonlara Ait Ön Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular	121
3.3.7.	Gümüş Boyama Metodu ile D1 ve D5 Kodlu Formülasyonlardan Salınan Difteri Toksoidinin Yapısal Bütünlüğünün Belirlenmesine Ait Bulgular	123
3.3.8.	Sandviç ELISA Testine Ait Bulgular	124
<b>4.</b>	<b>TARTIŞMA</b>	<b>127</b>
4.1.	Difteri Toksoidinin Özelliklerinin Belirlenmesi	127
4.2.	Ön Formülasyon Hazırlama Çalışmalarının Değerlendirilmesi	130
4.3.	Mikropartiküler Yapıdaki Ön Formülasyonların Karakterizasyonlarının Değerlendirilmesi	131
4.3.1	Ön Formülasyonların Morfolojik Özelliklerinin Değerlendirilmesi	131
4.3.2.	Ön Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinlikleri ve Üretim Verimlerinin Değerlendirilmesi	132
4.4.	F11, F17, F23, F29, F35 ve F36 Kodlu Formülasyonların Difteri Toksoidi ile Hazırlanmalarına Ait Bulgular	133
4.4.1.	Difteri Toksoidi İçeren Mikropartiküler Formülasyonların Morfolojik Özelliklerinin Değerlendirilmesi	134
4.4.2.	Difteri Toksoidi İçeren Mikropartiküler Formülasyonların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımlarının Değerlendirilmesi	134

4.4.3.	Difteri Toksoidi İçeren Mikropartiküler Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinlikleri ve Üretim Verimlerinin Değerlendirilmesi	135
4.4.4.	Difteri Toksoidi İçeren Mikropartiküler Formülasyonların In vitro Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi	135
4.4.5.	In vitro Salım Çalışmalarının Kinetik Değerlendirilmesi	136
4.4.6.	D1 ve D5 Kodlu Formülasyonların Ön Stabilitate Çalışmalarının Değerlendirilmesi	136
4.4.7.	D1 ve D5 Kodlu Formülasyonlardan Salınan Difteri Toksoidinin Yapısal Bütünlüğünün Değerlendirilmesi	137
4.5.	In vivo Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi	137
4.5.1.	Formülasyonların Seçimi ve Hazırlanmasına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	137
4.5.2.	ELISA'ya Ait Bulguların Değerlendirilmesi	137
<b>5.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>140</b>
	ÖZET	141
	SUMMARY	142
	KAYNAKLAR	143
	ÖZGEÇMİŞ	161

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, model etkin madde olarak difteri toksoidi içeren mikropartiküler formülasyonların intranasal yoldan uygulanması ile lokal ve sistemik bağışık yanıtın artırılması hedeflenmiştir. Çalışma planı; formülasyonların hazırlanması, in vitro testler ve in vivo hayvan deneylerini içermektedir.

Tez çalışmamı yöneten, zorlukların aşılmasında bilgi ve tecrübesiyle bana destek olan danışmanım Prof. Dr. Sayın Asuman Bozkır'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında bilgi ve desteğini benden esirgemeyen Dr. Ecz. Ongun Saka'ya çok teşekkür ederim.

A.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üye ve yardımcılarına,

Desteklerini her an hissettiğim, bu yola beraber çıktığımız değerli arkadaşlarım Ecz. Duygu Hınç'a, Ecz. Mert Serim'e, Uzm. Ecz. Murat Oral'a, Ecz. Sevgi Gökçek'e, Uzm. Ecz. Umut Can Öz'e,

Çalışmam süresince destekleriyle yanımda olan arkadaşlarım Uzm. Ecz. Berrin Başaran Küçüktürkmen'e, Uzm. Ecz. Gülin Amasya'ya, Uzm. Ecz. Günseli Yüksel Tilkan'a, Uzm. Ecz. Nalan Deniz Öztürk Özbilgin'e teşekkür ederim.

In vivo deneyler esnasındaki çalışmaları ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Aşı Serum Üretim ve Araştırma Müdürü Sayın Vet. Hek. İlhan Bozyiğit'e ve Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Gölbaşı Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Laboratuvar Şefi Sayın Vet. Hek. Özcan ÖZKAN'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımızda kullandığımız difteri toksoidini üreten Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Aşı Serum Üretim ve Araştırma Müdürlüğünde görevli Sayın Kimyager Mustafa Hacıömeroğlu'na teşekkürü bir borç bilirim.

Sağladıkları burs imkanı ile yüksek lisans çalışmama büyük katkısı bulunan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan ve sonsuz sabır göstererek beni her konuda destekleyen sevgili annem Nimet Çoban'a ve sevgili babam Mehmet Şefik Çoban'a tüm kalbimle sonsuz teşekkür ederim.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ASH	Antijen sunucu hücre
BALT	Bronşlara bağlı lenfoid doku
BN	Bağıl Nem
DT	Difteri Toksoidi
FDA	Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
GALT	Bağırsağa bağlı lenfoid doku
HRP	Horseradish peroksidaz
IgA	İmmünoglobulin A
IgE	İmmünoglobulin E
IgG	İmmünoglobulin G
i.n.	Intranazal
KT	Kolera toksini
LMW	Düşük molekül ağırlıklı
Lf	Flokülasyon Değeri
LT	Isıya dayanıksız enterotoksin
MALT	Mukozaya bağlı lenfoid doku
MikroBCA	MikroBikinoninik Asit
M hücreler	Mikrofold hücreler
MMW	Orta molekül ağırlıklı
NALT	Burna bağlı lenfoid doku
PBS	Fosfat tampon tuzu
PCL	Poli-ε-kaprolakton
PLGA	Poli-laktik-ko-glikolik asitleri
s.c.	Subkütan
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
SH	Standart Hata
SS	Standart Sapma
STL	Sitotoksik T hücreleri
T <sub>h</sub>	Yardımcı T hücreleri

## ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Mukozaya bağlı lenfoid dokudaki (MALT) birincil lenfoid hücreler	13
Şekil 1.2.	Mukozal bağışıklık sisteminin şematik gösterimi	14
Şekil 1.3.	İnsan burnunun anatomik yapısı	32
Şekil 1.4.	Nazal epiteldeki hücre tipleri	33
Şekil 1.5.	Nazal epitelde ilaç taşınım mekanizmaları	34
Şekil 1.6.	Nazal bağışıklık sisteminin şematik gösterimi	42
Şekil 1.7.	Partiküler sistemlerden çıkış mekanizmaları	43
Şekil 1.8.	Konvansiyonel enkapsülasyon yöntemleri	46
Şekil 1.9.	Çözücü buharlaştırma yöntemiyle tekli ve çoklu emülsiyon elde edilmesi	47
Şekil 1.10.	Koaservasyon yöntemiyle hazırlanan mikrokapsülün şematik gösterimi	49
Şekil 1.11.	Partiküler sistemin püskürterek kurutma yöntemiyle hazırlanmasına ait şematik gösterimi	50
Şekil 1.12	PLGA'nın yapısal formülü	51
Şekil 1.13.	PCL'nin yapısal formülü	52
Şekil 2.1.	Standart difteri antitoksini ile difteri toksoidi arasında gözlemlenen flokülasyon	64
Şekil 2.2.	Protein çözeltisi ve örnek tamponu karışımının kuyucuklara uygulanması	71
Şekil 2.3.	Kobayların intranazal yoldan aşılması	85
Şekil 2.4.	Sandviç ELISA yönteminin şematik gösterimi	90
Şekil 2.5.	ELISA kitine numunelerin ve reajanların uygulanması	91
Şekil 3.1.	Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS içindeki spektrumu	93
Şekil 3.2.	Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS içinde kalibrasyon grafiği	94
Şekil 3.3.	Boş mikropartiküllerin %5 SDS içeren 1M NaOH/1M HCl'deki spektrumu	98
Şekil 3.4.	Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS içinde doğrusallık grafiği	100

<b>Şekil 3.5.</b>	Difteri toksoidinin saflığını gösteren SDS-PAGE jeli	101
<b>Şekil 3.6.</b>	Mikropartiküler yapıdaki ön formülasyonlara ait optik mikroskop görüntüleri	102
<b>Şekil 3.7.</b>	Difteri toksoidi içeren mikropartikül formülasyonlarına ait optik mikroskop görüntüleri. A) D1 B) D2 C) D3 Ç) D4 D) D5 E) D6	113
<b>Şekil 3.8.</b>	Difteri toksoidi içeren mikropartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü - % hacim dağılımı grafikleri	115
<b>Şekil 3.9.</b>	D1, D2, D3, D4, D5 ve D6 kodlu formülasyonlardan difteri toksoidinin in vitro salım profilleri	119
<b>Şekil 3.10.</b>	A) 2-8°C'de ve B) 25±2°C saklanan D1 kodlu formülasyondan ekstrakte edilen difteri toksoidine ait PAGE görüntüsü	122
<b>Şekil 3.11.</b>	A) 2-8°C'de ve B) 25±2°C saklanan D5 kodlu formülasyondan ekstrakte edilen difteri toksoidine ait PAGE görüntüsü	122
<b>Şekil 3.12.</b>	A) D1 ve D5 kodlu formülasyonların in vitro salım numunelerinden PAGE analizi ile elde edilen jel görüntüsü B) D1 ve D5 kodlu formülasyonların in vitro salım numunelerinden gümüş boyama analizi ile elde edilen jel görüntüsü	123
<b>Şekil 3.13.</b>	ELISA kitine uygulanan standartların bilinen konsantrasyonlarına karşı ölçülen absorbanlarının grafiğe geçirilmesi ve 4 parametrelili lojistik eşitliğin elde edilmesi	124
<b>Şekil 3.14.</b>	20. gün ve 42. günlerde her bir gruptan alınan serumlardaki % IgG miktarı	126
<b>Şekil 3.15.</b>	21. gün uygulanan bağışıklama sonrası her bir grupta meydana gelen % IgG miktarı değişimleri	126



## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b>	Aşıların sınıflandırılması	5
<b>Çizelge 1.2.</b>	Aşı adjuvan örnekleri	10
<b>Çizelge 1.3.</b>	Nazal ilaç taşıyıcı sistemlerde araştırılan çeşitli absorpsiyon artırıcılar	40
<b>Çizelge 1.4.</b>	Mukozal yoldan verilişte partiküler formülasyon örnekleri	45
<b>Çizelge 1.5.</b>	Difteriye karşı antitoksin düzeyleri ve bağışıklık	59
<b>Çizelge 2.1.</b>	Difteri toksoidine ait Lf değerinin kontrol edilmesi	65
<b>Çizelge 2.2.</b>	SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler	72
<b>Çizelge 2.3.</b>	Poli (DL-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve Poli-ε-kaprolakton (PCL) içeren ön formülasyonlar	75
<b>Çizelge 2.4.</b>	Difteri toksoidi içeren mikropartiküler formülasyonlar	79
<b>Çizelge 2.5.</b>	In vivo çalışma grupları, aşılama zamanları ve aşılama yolları	87
<b>Çizelge 3.1.</b>	Difteri toksoidinin kalibrasyon doğrularına ait parametreler	93
<b>Çizelge 3.2.</b>	Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS içindeki doğruluk bulguları	95
<b>Çizelge 3.3.</b>	Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS ortamındaki tekrarlanabilirlik bulguları	96
<b>Çizelge 3.4.</b>	Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS ortamındaki ara kesinlik bulguları	97
<b>Çizelge 3.5.</b>	Difteri toksoidinin LOD değerleri	99
<b>Çizelge 3.6.</b>	Difteri toksoidinin LOQ değerleri	99
<b>Çizelge 3.7.</b>	Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS tamponu içerisindeki doğrusallık parametreleri	100
<b>Çizelge 3.8.</b>	2-8°C’de bekletilen difteri toksoidinin % kalan miktarı	101
<b>Çizelge 3.9.</b>	Mikropartiküler yapıdaki ön formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri ve üretim verimleri	109
<b>Çizelge 3.10.</b>	Difteri toksoidi içeren mikropartikül formülasyonlarına ait lazer kırınımı yöntemi ile bulunan geometrik ortalama çaplar	117

<b>Çizelge 3.11.</b>	Difteri toksoidi içeren formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri ve üretim verimleri	118
<b>Çizelge 3.12.</b>	Difteri toksoidi içeren formülasyonların salım hızı kinetik verileri	120
<b>Çizelge 3.13.</b>	Difteri toksoidi içeren ve 2-8°C’de saklanan formülasyonların belirli zaman aralıklarında ölçülen difteri toksoidi miktarları	121
<b>Çizelge 3.14.</b>	Difteri toksoidi içeren ve 25±2°C’de saklanan formülasyonların belirli zaman aralıklarında ölçülen difteri toksoidi miktarları	121
<b>Çizelge 3.15.</b>	Her bir gruptaki hayvanların 0., 20. ve 42. günlerdeki ortalama IgG konsantrasyonları	125

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Giriş ve Amaç

Aşıların geliştirilmesi, bağışıklamanın tıp ve halk sağlığına kazandırdığı en önemli katkılardan birisi olmuştur. Aşılanmanın amacı enfeksiyona karşı uzun süreli koruma sağlayan güçlü bir immün yanıt oluşturmaktır (Amon ve Ben-Yedidia, 2002; Aguilar ve Rodriguez, 2007). Aşılar halk sağlığını korumak için büyük önem taşır. Enfeksiyonel hastalıklardan ve neden oldukları ölümlerden korunmak için aşılanma uygun maliyetli, güvenli ve etkin bir yoldur. Aşıların bağışıklamada kullanılmasıyla her yıl yaklaşık üç milyon yaşam kurtarılmaktadır (NIH-NIAID, 2008; Matthias ve ark., 2007).

Eski dönem aşıların geliştirilmesinde olduğu gibi yeni dönem aşıların geliştirilmesinde de çeşitli faktörlerin etkileşimi önemli rol oynar. Modern biyoteknoloji sayesinde büyük önem taşıyan birçok insan patojeninin sonuçta etkili birer aşı olacağına dair iyimser görüşler mevcuttur (Katz,1997). Geleneksel yaklaşımların aşı gelişimine önemli katkıları olmasına rağmen güvenlik, yan etkiler gibi birçok nedenden ötürü alternatif yaklaşımlara ihtiyaç duyulmuştur (O'Hagan ve ark., 1997). Bu nedenle aşılanmanın temel amacı olan yüksek oranda koruyuculuk sağlayan ve en düşük oranda yan etki gösteren ideal aşıya ulaşmak hedeflenmiştir (Jiskoot ve ark., 1997).

Günümüzde kullanılan aşıların büyük bir çoğunluğu parenteral yol veya diğer invaziv yollarla uygulanmaktadır. Aşı uygulamasındaki bu invaziv yollarla sistemik immün yanıt tetiklenebilirken esas olan yeterli mukozal immün koruma sağlanamamaktadır (Shahiwala ve ark., 2007). Ayrıca düşük hasta uyuncu, yüksek maliyet gibi dezavantajlara sahip olan parenteral aşılanma uygulama açısından da birçok risk içermektedir. Bu nedenle son yıllarda hasta uyuncunu ve güvenliliğini

artırmak için farklı aşı veriliş yolları üzerinde çalışılmaktadır (Giudice ve Campbell, 2006; Neutra ve Kozlowski, 2006).

Çoğu insan patojeni, enfeksiyonu mukozal membranlarda başlatır ve mukozal bölgede çoğalırlar. Çoğalmadan sonra bazı mikroorganizmalar toksik faktörler salarak, bazıları ev sahibi dokulara penetre olarak bazıları ise sistemik veya organa özgü rahatsızlıkları meydana getirerek hastalıkları oluştururlar. Bu nedenle aşılama mukozal bağışıklık, başlangıç enfeksiyonunu önlemek için en etkili yaklaşım olarak kabul edilir (Cripps ve ark., 2001; Magistris, 2006). Parenteral yolla aşılama ile mukozal bağışıklık sistemi çok az uyarılır. Buna karşılık mukozal yolla aşılama ile hem sistemik hem de mukozal bağışıklık sistemi uyarılarak hümorale ve hücresel tipte yanıtların oluşması sağlanır (Mestecky, 1997; Illum ve Davis, 2001). Aşıların mukozal yolla verilişi, enjeksiyonla uygulamaya kıyasla birçok avantajı beraberinde getirmektedir. Mukozal bağışıklamanın en önemli avantajı, lokal ve sistemik bağışıklığı birlikte uyarabilmesidir. Mukozal yolla aşılama ile enjeksiyon bölgesinde görülen ağrı ve sızı, iğnelerin yetersiz sterilize edilmesinden veya tekrar kullanımından kaynaklanabilecek olası enfeksiyonlar, maliyet ve uygulama esnasında eğitilmiş personele ihtiyaç duyulması gibi olumsuzluklar giderilebilir (Almeida ve Alpar, 1996; O'Hagan, 1998). Nazal mukozaya, inhale antijenlerin sıklıkla karşılaştığı ilk bölüm olması nedeniyle mukozal bağışıklık yanıtın önemli bir bölümüdür. Nazal yolla aşılama hem periferale hem mukozal bağışıklama için en etkili yol olarak ortaya çıkmıştır. Nazal aşıların kolay uygulanabilir ve ucuz olmaları geniş popülasyonlara ulaşılmasını sağlayacağından gelişmekte olan ülkelerde nazal aşı uygulamaları yararlı sonuçlar verecektir (Davis, 2001; Biesterveld, 2002). Partiküler sistemler nazal yolla aşılama istenilen bağışık yanıtı elde etmek için kullanılan uygun farmasötik dozaj şekillerinden birisidir. Nazal yolla uygulama için çeşitli partiküler taşıyıcı sistemler içindeki antijen formüllerinin; mukozal enzimlerden antijeni korumak, özelleşmiş burna bağlı lenfoid dokunun (NALT) M hücreleri tarafından tercihen enkapsüle antijenin alımını sağlamak, antijen sunucu hücreler (ASH) için antijen sunum zamanını artırmak amacıyla antijenin sürekli salımını gerçekleştirmek, biyoadhezyon ile uygulama bölgesinde (nazal mukozada) retansiyon zamanında olası artışı sağlamak, ASH'lere antijen ve adjuvanın birlikte

sunumunu sağlamak, ASH'lere antijen sunumunu modifiye ederek hücre-aracılı bağışık yanıtı uyarmak gibi avantajları vardır (Sharma, 2009).

Çalışmamızda model etkin madde olarak difteri toksoidi kullanılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü, difteri için iyileştirilmiş bağışıklama stratejilerinin geliştirilmesinin öncelikli olduğunu bildirmiştir (World Health Organization (WHO) World Health Report, 1999). Hem difteri toksoidinin stabilitesinin artırılması hem de aşının mukozal bölgede kalış süresinin uzatılması amacıyla mikropartiküler formülasyonlar tercih edilmiştir. Bu şekilde nazal yolla verilen difteri toksoidinin oluşturacağı bağışık yanıtı artırmak mümkün olacaktır. Bu çalışmada, difteri toksoidi içeren, PLGA 50:50, Poli-(ε-kaprolakton) (14kDa) ve Poli-(ε-kaprolakton) (70-90kDa) polimerleri kullanılarak hazırlanan mikropartiküler sistemlerden in vitro sonuçları uygun olan formülasyonlar seçilerek in vivo araştırmalar yürütülmüştür.

## 1.2. Aşılar

Aşılar; insanlarda enfekte edici ajana ya da toksine veya bunlarla ilişkili antijene karşı spesifik ve aktif bağışıklığı uyurma özelliğine sahip antijenik maddeler içeren ürünlerdir (EP, 2005). 11. yüzyılda Çin'de çiçek hastalığı yaralarını burun içine üfleterek çiçek hastalığına karşı bağışıklık kazandırılmaya çalışılmıştır. 1796 yılında Dr. Edward Jenner inek çiçeği olan hastalarının (ineklerde görülen ve insana da geçen döküntülü, enfeksiyöz hastalık) çiçeğe karşı korunduklarını fark etmiş ve inek çiçeği olan bir hastanın cerahatini sağlıklı bir kişiye inoküle etmiştir. Daha sonra bu kişiye gönüllü olarak çiçek inokülasyonu yapıldığında, hastanın çiçeğe karşı korunduğunu göstermiştir. Dr. Edward Jenner inek çiçeğinin geçişinden sorumlu maddeye "aşı" (latince inek anlamına gelen vacca'dan geliyor) ve çiçeğe karşı uyguladığı bu işlemede "aşılama" adını vermiştir (Plotkin, 2005; Riedel, 2005).

Bulaşıcı hastalıkları önlemede aşıların kullanımı tıp dünyasında en büyük başarılarından biri olarak kabul edilebilir. Jenner ve Pasteur gibi öncüler her yıl

milyonlarca kişinin ölmesine veya hastalanmasına engel olarak aşuların küçük miktarlardaki üretimini kolaylaştırmışlardır. Biyoteknoloji alanındaki gelişmeler ve bağışık yanıtı uyarıcı ve etkileyici bileşenlerin anlaşılmasıyla aşı gelişimi ve uygulanmasında bir altın çağa girilmiştir (Glück ve Metcalfe, 2002; Levine ve Szein, 2004). Günümüzde genom dizilişini içeren genomik bilginin açığa çıkmasıyla yeni proteinlerin keşfine, bu proteinlerin fonksiyonlarının anlaşılmasına ve ilgi çekici bu moleküllerin taşınması için ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine gittikçe artan bir ilgi vardır. Yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarımında başarılı üretim, advers reaksiyonların ve yan etkilerin azaltılması, hasta uyuncunun geliştirilmesi ve yarı ömrün uzatılması gibi özellikler amaçlanarak ideal aşuya ulaşılma istenmektedir (Sinha ve Trehan, 2003). İdeal aşının sahip olması gereken özellikler aşağıda sıralanmıştır:

- Bebekler, yaşlılar ve bağışıklığı baskılanmış hastalar dahil bütün popülasyonlarda kusursuz güvenlik profili göstermeli,
- Bebekler ve yaşlılar da dahil olmak üzere yüksek düzeyde uzun süreli etki sağlamalı,
- Sadece tek doz (veya birbirine yakın aralıklarda en fazla iki doz) ile koruma sağlamalı,
- Uygulamadan sonraki iki hafta içinde korumayı başlatmalı,
- Alternatif bir yolla (oral, nazal, transkütan veya enjeksiyon içermeyen bir cihaz ile) iğnesiz ve şırınga olmadan uygulamaya olanak vermeli,
- Diğer aşularla birlikte (aynı formülasyon içinde) veya eş zamanlı (aynı anda) uygulanabilir olmalı,
- Nispeten basit ve ekonomik işlemlerle büyük ölçekli ve kalite kontrollü üretilebilir olmalı,
- Formülasyondaki üretim koşullarına yatkın olmalı (düşük ve yüksek sıcaklıklara dayanıklılık gibi) ve ayrıca zor depolama koşullarından etkilenmemeli,
- Bir organizmanın bütün varyantlarına karşı geniş koruyuculuk özelliği olmalı, (Beverley, 2002; Levine ve Szein, 2004).

### 1.2.1. Aşıların Sınıflandırılması

Birçok farklı tipteki aşı aktif bağışıklığı uyarmak için kullanılır. Çizelge 1.1’de farklı aşı tipleri gösterilmiştir.

**Çizelge 1.1.** Aşıların sınıflandırılması (Camcıoğlu, 2008)

Aşı Tipleri	Hastalık
Canlı attenüe (zayıflatılmış) aşılar	Viral; Kızamık, Kabakulak, Kızamıkçık, Suçiçeği, Sabin, Polio, Rotavirüs, Sarı humma
İnaktif ve ölü tüm hücre aşıları	Pertussis, Tifo, Kolera, İnfluenza, Salk polio, Hepatit A, Veba, Kuduz
Toksoid aşılar	Tetanoz, Difteri
Subunit aşılar	Hepatitis B, Pertussis, HPV
Saf polisakkarit aşılar	Streptococcus pneumoniae Meningokok
Konjuge aşılar	Haemophilus influenzae Tip b, Streptococcus pneumoniae Meningokok C
Rekombinant Aşılar	Klinik denemede
DNA	Klinik denemede

#### 1.2.1.1. Canlı Attenüe (Zayıflatılmış) Aşılar

Canlı attenüe (zayıflatılmış) aşılar, konakçı içinde bulaşma ve çoğalma yeteneği olan ancak hastalık oluşturmayacak şekilde şiddeti azaltılmış bakteri veya virüslerden oluşur. Bu aşılar tek bir dozdan sonra uzun süreli bağışıklık sağlamaktadır. Ayrıca hem humoral hem hücrel bağışıklığı uyarabilmeleri avantajına da sahiptirler. Ancak zayıflatılmış olan canlı organizma herhangi bir zamanda eski virulan forma dönüşüren bir mutasyon geçirebilir (patojenik reversiyon) ve bu durum hastalıkla sonuçlanabilir. Bu sebeple bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde kullanımları

önerilmez. Ayrıca bu aşılar da stabilite sorunları da görülebilir (Bellamy ve Freedman 2005; Keser ve Hatipoğlu, 2008).

### **1.2.1.2. İnaktif ve Ölü Tüm Hücre Aşıları**

İnaktif ve ölü tüm hücre aşıları hastalık yapan mikroorganizmaların kimyasallar, ısı veya radyasyonla öldürülmesiyle elde edilirler. Canlı attenüe (zayıflatılmış) aşılar daha güvenli ve daha stabildirler. Ölü mikroorganizma tekrar virülen forma dönmez. İnaktif aşıların buzdolabında saklanması gerekmediğinden liyofilize toz halindeki aşının depolanması ve taşınması kolaydır. Bu durum gelişmekte olan ülkeler için önemlidir. Bu tür aşılar avantajlarına karşılık, canlı aşılar daha zayıf bir bağışık yanıt oluştururlar ve genellikle bağışık yanıtı devam ettirmek için ek doz veya rapel dozlara ihtiyaç vardır (NIH-NIAID, 2008).

### **1.2.1.3. Toksoid Aşılar**

Tetanoz, difteri, botulizm, kolera gibi hastalıklara neden olan belirli patojenler salgıladıkları ekzotoksinlerle bu hastalıklara neden olurlar. Toksinler formalin ile muamele edildiğinde etkisiz hale gelir. Toksoid aşıların virülen forma dönme ve önledikleri hastalıkları oluşturma olasılıklarının bulunmaması güvenli aşılar olduklarını gösterir. Aşı antijenleri aktif olarak çoğalamadıklarından aşılammış bireylerde yayılamazlar. Sıcaklık, nem ve ışığa daha az duyarlı olduklarından genellikle dayanıklı şekilde uzun süre kullanılabilirler. Ancak toksoid aşıları yüksek oranlarda veya çoklu dozlarda kullanılmadıkça güçlü immünolojik özellik taşımamaktadır. Bu nedenle etkili bir yanıt oluşturabilmeleri için bir adjuvana veya birkaç doza gereksinimleri vardır. Uygulama bölgesinde önce kızarıklıkla başlayan sonra sertleşmeyle devam eden ve genelde 48-72 saat içinde düzelen lokal reaksiyonlar da görülebilir (Baxter, 2007).



#### 1.2.1.4. Subunit Aşılar

Subunit aşılar patojenin antijenik biriminden oluşmaktadır. Mikroorganizmanın bütününe değil sadece immün sistemi en iyi uyaran antijenlerini içerir. Subunit aşılar patojenik forma dönememeleri, azalmış toksisiteye, tekrar üretilebilirliğe ve geliştirilmiş antijen özgünlüğüne sahip olmaları gibi birçok avantaja sahiptirler. Ancak adjuvana gereksinim duyulması ve üretilmelerinin zor olması gibi dezavantajları da mevcuttur (NIH-NIAID, 2008; Henriksen, 2010).

#### 1.2.1.5. Saf Polisakkarit Aşılar

Bazı patojenik bakterilerin virülansı özellikle antifagositik özellikteki hidrofilik polisakkarit kapsüllerine bağlıdır. Polisakkaritlerle en iyi IgM bağışık yanıtı elde edilir. Çünkü güçlü IgG yanıtı T hücrelerinin aktivasyonuna bağlıdır. Polisakkarit aşıların sadece 2,5-3 yaş sonrası için uygulanabilir olmasına rağmen insanlarda yararlı sonuçları elde edilmiştir. Ancak ciddi pnömokokal hastalıkların sıklıkla görüldüğü süt çocuklarında mevcut saf polisakkarit aşılar koruyuculuk sağlayamaz. Ayrıca çocukluk dönemi taşıyıcılığına karşı koruması olmadığından bu aşı antibiyotik dirençli suşların yaygınlığını azaltmak için kullanılamaz (Kalin, 1998; Goldsby ve ark., 2000; Cozzi ve ark., 2011).

#### 1.2.1.6. Konjuge Aşılar

Yüksek enfeksiyon riski taşıyan immünojenik bakteriyel kapsüler polisakkaritlerin aşı formülasyonlarının bulunması ihtiyacı konjuge aşıların geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. *Neisseria meningitidis* serogrup C, *Streptococcus pneumoniae* ve *Haemophilus influenzae* tip b gibi patojenler çocukluk dönemi menenjitine yol açarlar ve ortak olarak hem virülan özelliğe sahip olan hem de koruyucu antikör için hedef olan polisakkarit kapsüller içermektedirler. Ancak polisakkaritler T

hücrelerinden bağımsız immünojen olduklarından iki yaşından küçük çocuklarda immün cevabı ya hiç uyarır veya zayıf uyarır, sonuçta immün hafıza oluşturamazlar. İki yaşından küçük çocuklar T hücrelerinden bağımsız immünojeni yeterince tanıyamamakla birlikte, proteinler gibi T hücre bağımlı immünojenlere etkin cevap verebilir. Polisakkaritlerin taşıyıcı proteinlerle konjüge edilmesi polisakkaritleri T hücre bağımsız halden T hücre bağımlı immünojen haline dönüştürür. Böylece küçük çocuklarda koruyucu IgG ve immünolojik hafıza oluşumu sağlanır (Goldblatt, 2000; Keser ve Hatipoğlu, 2008).

#### **1.2.1.7. Rekombinant Aşılar**

Bir virüs, bakteri ya da protozoanın immünojenik özelliğini belirleyen bir geninin ayrılıp, sonra bir bakteri, maya ya da memeli hücrelerine rekombinant DNA tekniği ile klonlanması temeline dayanır. Bu yöntemle kullanıma giren ilk aşı hepatit B aşısıdır. Bu yolla elde edilen antijenler yeterli antikor yapımını sağlayabilmektedirler. Ancak ekzojen antijenler olarak hazırlandıklarından antijeni tanıyabilen sitotoksik T hücrelerini uyaramamaktadırlar. Dolayısıyla hücresel bağışıklık yanıtları zayıftır (Beyazova ve Aktaş, 2007).

#### **1.2.1.8. DNA Aşıları**

İmmün cevabı uyarmak üzere bütün organizma veya parçaları yerine, önemli antijenleri kodlayan genetik materyal kullanılır. Antijene ait genler vücuda uygulandığında bazı hücreler DNA'yı yakalar. Genetik materyali alan hücreler o antijen moleküllerini üretir. Üretilen antijenler hücreler tarafından salgılanır. Böylece vücudun kendi hücreleri aşı üreten fabrikalara dönüşür ve bağışıklık sistemini aktive etmek için gereken antijenler oluşur. Gen taşıyıcı sistem olarak plasmid DNA diğer sistemlere göre birçok avantaja sahiptir. Bu avantajları güçlü humoral ve hücresel bağışık yanıt oluşturmaları, hastalığa sebep olmamaları, üretimlerinin daha kolay ve

ucuz olması ve aşılamaı yeni bir teknolojik seviyeye çıkarmalarıdır (Liu, 2003; NIH-NIAID, 2008).

### 1.2.2. Adjuvanlar

“Adjuvan” terimi ilk kez 1926 yılında Ramon tarafından kullanılmıştır. Adjuvan kelimesi Latince “adjuvare”, yardım eden, gulendiren anlamında olup adjuvanlar aşı formülasyonlarıyla birlikte kullanıldığı zaman aşı antijenine karşı oluşan bağışık yanıtın uzatılmasında veya gulendirilmesinde rol oynarlar (Kurella ve ark., 2000). Aşılamanın amacı, enfeksiyona karşı uzun sureli koruma sağlayarak gul bir bağışık yanıt oluşturabilmektir. Zayıflatılmış canlı aşılardan farklı olarak, l tüm mikroorganizma ya da alt birim aşıların (rn., toksoidler) etkinliğini artırmak için formülasyonlara adjuvanlar ilave edilmektedir (Aguilar ve Rodriguez, 2007). Adjuvanların genel olarak kullanım amaçları; (i) iyice saflaştırılarak elde edilmiş veya rekombinant antijenlerin immünojenitesini artırmak (ii) bağışık yanıtın hızını ve suresini artırmak (iii) antikoru antijenle birleşme yeteneğini, özgünlüğünü ayarlamak (iv) hücrenel bağışık yanıtı uyarmak (v) mukozal bağışık yanıtın uyarılmasını artırmak (vi) aşının yenidoğanlar, yaşlılar, immün yetmezliği olan kişilerde etkinliğini artırmak (vii) primer immün yanıt elde edebilmek için gereken antijen miktarını ya da aşılama sayısını azaltmak ve bu yolla aşı maliyetini düşürmek (viii) kombine aşılarda antijenlerin yarışmasını engellemektir (Singh ve O’Hagan, 2002; Petrovsky ve ark., 2004). İdeal bir adjuvan řu özelliklere sahip olmalıdır:

- Birincil ve uzun sureli yan etkiler de dahil olmak üzere güvenilir olmalı,
- Biyolojik olarak parçalanabilir olmalı veya adjuvan etkisi bittikten sonra gecikmiş yan etki riskini azaltmak için vücuttan kolaylıkla uzaklaştırılabilir olmalı,
- Antijenle birlikte uygulandığında antijenin tek başına oluşturduğu bağışık yanıttan daha gcl veya tedavi edici özelliği daha fazla olan bağışık yanıt oluşturmalı,
- retimi kolay ve ucuz olmalı,

- Etkinlik daha az doz ve/veya düşük konsantrasyonlarda antijen kullanılarak elde edilebilir olmalı,
- Ticari ve klinik olarak kullanıldığı raf ömrü boyunca stabil kalmalı,
- Kimyasal ve biyolojik açıdan iyi tanımlanmış olmalı,
- İyi bir immünolojik hafıza veya uzun süreli bağışıklık sağlamalı,
- Mutajenik, karsinojenik veya teratojenik olmamalıdır (Edelman, 2000; Aguilar ve Rodriguez, 2007).

Günümüzde en çok kullanılan aşı adjuvanları Çizelge 1.2’de gösterilmektedir.

**Çizelge 1.2.** Aşı adjuvan örnekleri (Bozkır ve Hayta, 2004; Aguilar ve Rodriguez, 2007; Vogel ve Hem, 2008; Yurdakök ve İnce, 2008; O’Hagan ve De Gregorio, 2009)

Adjuvan tipleri	Genel örnekler	Özgün örnekler
İnorganik tuzlar	Alüminyum hidroksit Alüminyum fosfat Kalsiyum fosfat	Alhydrogel™ Rehydrigel® Adju-Phos™ Rehydraphos™
Tensoaktif bileşikler	Saponinler	QS-21
Mikrobiyal kaynaklılar (doğal veya sentetik)	Bakteriyel ekzotoksinler Endotoksin	Kolera toksini (CT)™ Monofosforil lipid-A (MPL®)
Emülsiyonlar	Freund antijeni Metabolize edilebilir emülsiyonlar	Montanide® ISA 51 MF59 (Fluad®) Montanide® ISA 720
Partiküler sistemler	Biyoparçalanabilir polimer mikropartiküller İmmünostimülatör kompleksler Virozom	Polilaktid ko-glikolik partiküller (PLG) ISCOMATRIX®  Epaxal®, Inflexal®V
İmmüno-adjuvanlar	Sitokinler	IL-2, IL-12, GM-CSF, IFN-γ
Polisakkaritler	İnülin	Mikro-partiküler inülin (MPI)
Nükleik asit temelli Adjuvanlar	Sitokin genleri, kostimülatör molekül genleri	IL-12, IL-2, IFN-γ, CD40L
Kombinasyon adjuvanları	Endotoksin + inorganik tuz Y/S emülsiyon + α-tokoferol	Fendrix® (AS04) Pandemrix® (AS03)
Toll-benzeri reseptörler	Toll-benzeri reseptör ligantları	TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 TLR9, TLR10

Az sayıda aşı adjuvanının profilaksi amacıyla insanlarda kullanımına izin verilmiştir. Bunlar arasında “Alum” olarak bilinen ve alüminyum tuzları ile hazırlanan süspansiyon 70 yıldan fazla bir süredir yaygın olarak kullanılmaktadır. Alum yakın zamana kadar Amerika Birleşik Devletleri’nde FDA (Food and Drug Administration) tarafından insanlarda kullanımına izin verilmiş tek adjuvandır. Su/yağ emülsiyonları ise (MF59 ve AS03) Avrupa’da influenza aşılarında kullanılan lisanslı adjuvanlardır. Monofosforil lipid A ve Alum’un bir kombinasyonundan oluşan AS04 Avrupa’da hepatit B virüsü ile insan papilloma virüsü aşıları için onaylanmış ve yakın zaman önce de Amerika Birleşik Devletleri’nde lisans almıştır (Mbow ve ark., 2010).

### **1.3. Mukozal Aşılama**

Gelişmekte olan teknoloji ile elde edilen sonuçlar aşılamadaki başarının sadece aşının immünojenik bileşenlerine bağlı olmadığını ayrıca taşıyıcı sisteme de bağlı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle etkili bir aşı formülasyonu veya taşıyıcı sistem ile ilgili çalışmalar modern aşı gelişimi için büyük önem taşımaktadır. Çoğu önemli viral ve bakteriyel enfeksiyonlar solunum, bağırsak, gözyaşı ya da ürogenital yol gibi mukozal membranlardan geçerek oluşur (Sharma ve ark., 2009). Bu nedenle enfeksiyon yapıcı maddelere karşı aktif bir bağışıklama sağlamak başarılı bir mukozal bağışık yanıtın oluşturulmasına bağlıdır (Saatçi ve Bozkır, 2003). Bir aşının mukozal yolla uygulanması ile etkili bir sistemik bağışık yanıt da elde edilebilir. Buna karşılık parenteral yolla uygulanan aşılar genellikle sadece invaziv patojenlerin neden oldukları sistemik hastalıkları önlemek için uygundur. Bu durum mukozal bölgede sınırlı bağışık yanıt oluşturmaları ve böylece mukozal yüzeylerdeki enfeksiyonu önlemedeki yetersizliklerinden kaynaklanmaktadır (Dietrich ve ark., 2003).

Başarılı mukozal bağışıklamanın kriterleri aşağıda özet şeklinde verilmiştir:

1. Mukozal bağışıklığın uyarılacağı bölgede antijenin etkili bir şekilde verilmesi (örn., Peyer plaklarının zarsı epitel hücresi),

2. Canlı attenüe aşı suşlarının, geliştirilmiş antijen taşıyıcı sistemlerin veya bakteriyel enterotoksinler ve sitokinler gibi mukozal immünomodülatörlerin kullanılmasıyla mukozal bağışık yanıtların artırılması,
3. Koruyucu bağışık yanıtları uyabilecek bağışıklama programı ve yolunun hem hedeflenen mukozal bölgede hem de sistemik olarak seçilmesidir (Cripps ve ark., 2001; Dietrich ve ark., 2003).

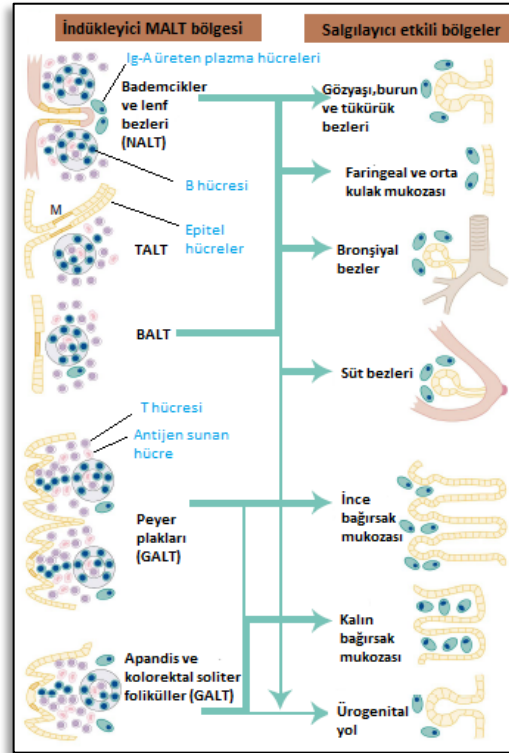
Mukozal aşılamanın parenteral yolla aşılamaaya kıyasla sahip olduğu avantajlar aşığıda sıralanmıştır:

- Mukoza patojenlerin ve mikropların ana giriş bağlantı noktalarıdır.
- Hümorale koruma büyük ölçüde mukoza dokularında üretilen antikorlar ile sağlanmaktadır. Parenteral uygulama ile sistemik dolaşıma verilen antikorlar farklı mukozal bölgelerdeki enfeksiyonu gerekli şekilde önleyemez.
- Mukozal dokular sistemik dolaşımı oldukça aşan T hücreleri, B hücreleri ve plazma hücrelerine sahiptirler.
- Mukozal dokular immünolojik hafıza dahil spesifik B hücre ve T hücre aracılı bağışık yanıtları başlatma yeteneğine sahip olan hem antijen yapan hem de antijen sunucu hücrelere sahiptirler.
- Mukozanın bir bölgesindeki aşılama çok uzaktaki diğere mukozal bölgelerde bağışıklığı uyarır. Bu durum özellikle oral veya nazal bağışıklama gibi pratik yollarla, cinsel yoldan bulaşan hastalıklara karşı koruyucu bağışıklık kazanılmasında önemlidir.
- Mukozal bağışıklama hem lokal hem sistemik bağışıklığı sağlayabilir.
- Mukozal aşı taşıyıcı sistemlerde iğne kullanılmamaktadır böylece olası şırınga kaynaklı enfeksiyon ve yan etkiler ortadan kaldırılmaktadır.
- Mukozal aşı taşıyıcı sistemlerde yan etkiler en az indirilir ve parenteral yola kıyasla uygulama kolaylığı bulunur.
- Mukozal yolla aşılama parenteral yola kıyasla daha kolaydır ve uygulama esnasında eğitimli personele ihtiyaç duyulmamaktadır.
- Serum IgG ve mukozal IgA antikorlarının yanı sıra yardımcı CD4+ T hücrelerini ve CD8+ sitotoksik T lenfositlerini içeren hücresel tipte yanıtları da uyabilmektedir.

- Steriliteye ek olarak yüksek standartta saflık da gerektiren parenteral aşılarla kıyasla mukozal aşıların üretimi daha ucuzdur (McNeela ve ark., 2001; Magistris, 2006; Sharma ve ark., 2009).

### 1.3.1. Mukozal Bağışıklık Sistemi

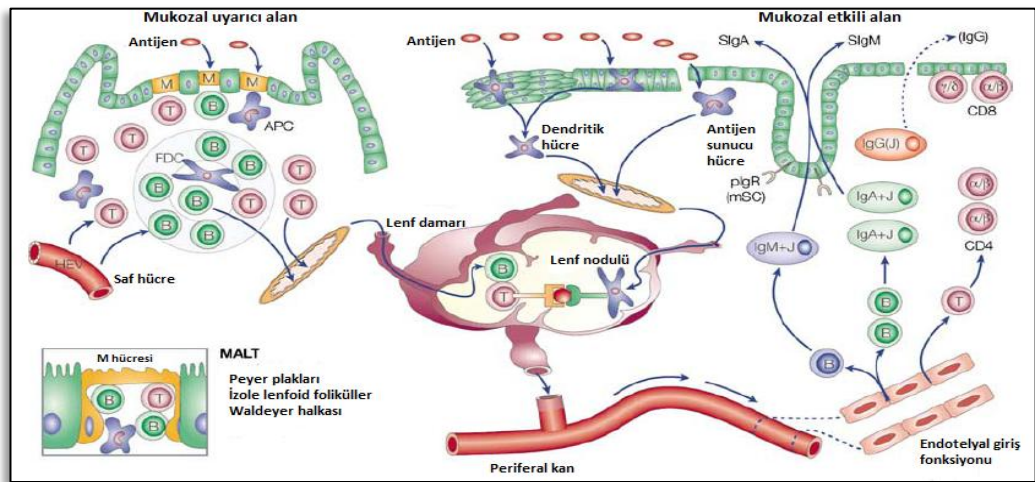
Mukozal yüzeyler memeli bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır. Vücudun mukozal yüzeyleri, yabancı antijenleri sürekli kontrol altında tutabilecek zengin immünolojik yapılara sahiptirler. Mukozaya bağlı lenfoid dokunun (MALT) önemli özelliği sistemik bağışıklık oluşturan düzeneklerden bağımsız olarak çalışabilmesidir. MALT; Peyer plakları, mezenterik lenf bezleri, apendiks, ince barsağın soliter folikülleri, tonsiller, adenoidler gibi anatomik olarak sınıflandırılmış lenfoid mikro düzeneklerden oluşur. Uyarıcı mukozal alanların başında gelen bu alanlar bağışıklık yanıtının uyarılmasında temel bölgeleri oluşturur (Şekil 1.1) (Giudice ve Campbell, 2006; Güney ve Yeğin, 2008).



Şekil 1.1. Mukozaya bağlı lenfoid dokudaki (MALT) birincil lenfoid hücreler (Brandtzaeg ve ark., 1999)

Mukozal bağışık yanıt, mukozaya bağlı lenfoid dokuda (MALT) oluşmaktadır. Bağırsağa bağlı lenfoid doku (GALT), bronşlara bağlı lenfoid doku (BALT), burna bağlı lenfoid doku (NALT) ve larinkse bağlı lenfoid doku (LALT); mukozaya bağlı lenfoid doku (MALT)'yu oluşturmaktadır. Mukozal bağışık yanıtın başlıca uyarıldığı yerler GALT ve BALT'teki organize haldeki lenfoid foliküllerdir (Ogra ve ark., 2001).

Epitel hücreler mukozal savunmanın aktif elemanlarıdır. Bu hücreler mikrobiyal bileşenleri tanıyan dedektörler gibi işlev görürler. Mukozal bağışık yanıt mukozaya bağlı lenfoid dokunun yüzeyinde bulunan mikrofild hücreler (M hücresi) de dahil olmak üzere subepitelyal dendritik hücreler, makrofajlar, immünglobulin A (IgA) salgılayan B hücreleri, CD4+ and CD8+ T hücreleri gibi antijen sunucu hücreler (ASH) tarafından mukozal uyarıcı bölgelerde başlar. Aşı uygulamasından sonra antijen ya M hücreleri aracılığıyla MALT'a taşınır ya da dendritik hücreler aracılığıyla T hücrelerine sunulur. Bu T hücreleri antikor salgılayan hücreleri oluşturan ve periferel kana hareket eden B lenfositlerinin gelişimini uyarır. Antikor salgılayan hücreler öncelikle köken aldıkları bölgeye geri dönerler. Böylece aşılamanın yapıldığı yerden çok uzaktaki diğer mukozal bölgelerde de bağışık yanıt oluşturulmuş olur (Şekil 1.2) (Chen, 2000; Giudice ve Campbell, 2006; Neutra ve Kozlowski, 2006).



**Şekil 1.2.** Mukozal bağışıklık sisteminin şematik gösterimi (Brandtzaeg ve ark., 2008)



### **1.3.1.1. Mikrofold (M) Hücreleri**

Mikrofold (M) hücreleri transepitelyal veziküler taşıma sistemiyle, epitel hücrelerin arasında bulunan lenfositlere ve epitel hücrelerin altında bulunan lenfoid dokulara antijenleri taşıyan özelleşmiş epitel hücrelerdir. Mikrovillustan yoksun olan M hücreleri pinositik etkinlikleri ile antijen ve mikroorganizmaları alttaki profesyonel antijen sunucu hücrelere (ASH) ve örgütlenmiş lenfoid dokuya, örneğin Peyer plaklarına ulaştırırlar. M hücreleri kendileri antijeni sunmazlar, yalnızca aşağıdaki lenfoid dokuya veya dendritik hücreler, makrofajlar, B hücreleri gibi ASH'lere antijeni transepitelyal taşıma sistemi işlevi görerek iletirler (Neutra ve Kozlowski, 2006; Güney ve Yeğin, 2008).

### **1.3.1.2. Makrofajlar ve Dendritik Hücreler**

Antijen sunucu hücreler (ASH) antijen ile ilk karşılaşan ve onları lenfositlere sunan hücreler olarak bağışık yanıtta ilk adımı başlatan hücrelerdir (Abbas ve ark., 2000). Makrofaj ve dendritik hücreler gibi mukozal ASH'ler kan monosit prekürsörlerinden köken almaktadırlar. Birçok makrofaj ve dendritik hücrenin alt birimleri tanımlanmış ve bağışık yanıtın düzenlenmesinde önemli görevleri olduğu gösterilmiştir. Lamina propria, Peyer plakları ve mezenterik lenf nodüllerinde endojen bakteriyel florayı tanımak ve hemen cevap verebilmek için konumlanmışlardır. Bu hücreler primer T hücresine bağımlı bağışık yanıtın oluşumunda en etkili hücrelerdir (Söker, 2005; Denning ve ark., 2007).

### **1.3.1.3. B ve T Lenfositler**

B hücreleri antikor salgılayan, kemik iliğinde olgunlaşan antijene duyarlı lenfositlerdir. B lenfositler hüморal (antikora dayalı) bağışıklıktan sorumlu hücrelerdir. B lenfositler, antijene karşı özgül reseptör olan immünoglobulin

moleküllerini sentezler ve hücre yüzeylerindeki zarda taşırlar. Antijenle temas eden B lenfositleri, ya antijene özgü çok miktarda antikor sentezleyen plazma hücrelerine ya da uzun ömürlü bellek B hücrelerine dönüşürler (Minichiello, 2002; Junqueira ve Carneiro, 2006).

T hücreleri timusta olgunlaşan antijene duyarlı lenfositlerdir. T lenfositleri hücresel tipte bağışık yanıtta sorumludur. T hücreleri timusta olgunlaştıktan sonra yüzeyinde birçok reseptör oluşur (Altaş, 1998; Minichiello, 2002). T hücrelerinin; yardımcı, sitotoksik ve bellek T hücreleri olmak üzere üç ana alt grubu vardır. Yardımcı T hücreleri ( $T_h$ ), B hücrelerinin antikor üretmesini ve sitotoksik T hücrelerinin aktifleştirilmesini sağlar. Sitotoksik T hücreleri (STL), yabancı ve virüs ile enfekte hücrelere karşı iki yolla savaşır. Birincisinde perforin adı verilen proteinler üreterek hedef hücre zarında delikler oluştururlar ve hedef hücrenin parçalanmasına yol açarlar. İkincisinde ise, programlanmış hücre ölümünü ya da apoptozisi başlatan bazı genleri uyararak hedef hücreyi öldürürler. Bellek T hücreleri, yeniden karşılaşılan antijenlere hızlı yanıt vererek sitotoksik T hücrelerinin oluşumunu uyarırlar (Junqueira ve Carneiro, 2006).

#### **1.3.1.4. Antikorlar**

Antikorlar mikropların ya yüzeyine yapışarak ya mikrobu fagosite ederek ya da mikropları aglütine ederek etkilerini gösterirler (Altaş, 1998). Mukozal antikorlar; özellikle salgısal immünoglobulin A (IgA) (yayılımcı patojenlere karşı erken savunmayı sağlar) ve serum immünoglobulin G (IgG) (sistemik enfeksiyonun önlenmesi için gereklidir) serumdan mukozal yüzeylere sızarak buralarda da işlev görürler (McNeela ve Mills, 2001). Mukozal yüzeylerdeki humoral bağışık yanıt büyük ölçüde salgısal IgA antikorları aracılığıyla gerçekleşmektedir (Holmgren ve Czerkinsky, 2005). Antijenler mukozal yüzeylerle temasa geçtiklerinde ve mukozal lenfoid dokuya taşındıklarında salgısal IgA'lar uyarılır. Antijenlerin işlem görmesi çeşitli mukozal etkili alanlarda spesifik IgA üreten hücrelerin hedeflenmesine yol

açar. Salgısal IgA'lar mukozal yüzeylerde çoğalan veya bu yolla giriş yapan patojenlerin bağlanmalarını veya kolonize olmalarını engelleyerek ve yüzeye hareket eden toksinleri nötralize ederek patojenlere karşı etkili olurlar. Ayrıca epitel hücrelerdeki IgA'lar hücre içi virüs çoğalmasını engelleyebilirler (McNeela ve Mills, 2001).

### **1.3.2. Mukozal Adjuvanlar**

Mukozal bağışıklıkla sonrasındaki elde edilen bağışık yanıtı kolaylaştırmak ve artırmak için farklı stratejiler geliştirilmiştir. Bunlar arasında kaynakları farklı olan antijenleri taşımak için mutasyona uğramış attenüe bakterilerin kullanılması (örn., *Salmonella* türleri, *Shigella* türleri), antijenlerin mikroküreler, jelatin kapsüller, lipozomların farklı formülasyonları içinde enkapsüle edilerek taşınması veya nanopartiküllerin yüzeyine adsorpsiyonları, bağışıklığı uyaran lipofilik komplekslerin kullanılması ve adjuvan özellikleri bilinen bakteriyel ürünlerin eklenmesi bulunmaktadır (Freytag ve Clements, 2005). Uygun adjuvanın seçilip uygulanmasından sonra bağışık yanıtın artırılması: (i) adsorpsiyon ve depo etkisi (ii) sitokinlerin uyarılması (iii) komplement aktivasyonu (iv) farklı hücre popülasyonlarının çalıştırılması (v) farklı ASH'lere taşınım (vi) antikorların farklı alt tiplerinin üretiminin uyarılması gibi farklı mekanizmalar ile meydana gelebilir (Petrovsky ve Aguilar, 2004).

#### **1.3.2.1. Bakteriyel Toksinler ve Türevleri**

Bugüne kadar bilinen en güçlü mukozal immünojen *Vibrio cholerae*'den elde edilen kolera toksini (KT) ve *Escherichia coli*'den elde edilen ısıya dayanıksız enterotoksin (LT) olarak tanımlanmış iki bakteriyel toksindir. Bu toksinler yabancı moleküllerle mukozal yüzeylerde aynı anda bulduklarında da bağışık yanıtı aktive edebilme özelliğine sahiptirler. Bu özelliklerinin bir sonucu olarak hayvan modellerinde her iki toksinden yaygın şekilde mukozal immünojen ve adjuvan olarak faydalanılmıştır.

Ancak KT ve LT yüksek toksisite gösterdiklerinden insanlarda kullanım için uygun değildirler. Mukozal immünojen ve adjuvan olarak kullanılabilmesi için moleküler modelleme yolu ile bu toksinlerin aktif bölgelerinde spesifik mutasyonların tasarlanması ve böylece toksik olmayan türevlerinin elde edilmesi üzerine çalışmalar yürütülmektedir (Pizza ve ark., 2001; Ryan ve ark., 2001).

### 1.3.2.2. CpG Motifleri

Bakteri DNA'sı sitozin-fosfat-guanozin (CpG) motifleri içerir ve sitozin metillenmemiştir. Ayrıca CpG, iyi karakterize edilmiş adjuvan özelliği gösteren, bağışıklık sistemini uyarabilen CpG motiflerini içeren, sentetik oligodeoksinükleotidlerden (CpG ODN'ler) oluşur (Chen, 2000; Eriksson ve Holmgren, 2002). CpG motifi bakteriyel DNA'da memeli DNA'sına göre 20 kat daha fazla bulunur. Bakteri hücrelerindeki CpG motifi memeli hücrelerindeki reseptörler tarafından hemen tanınır ve bağışıklık sistem hücreleri tarafından interferonlar salgılanır. Böylece hücresel bağışık yanıt uyarılırken allerjik cevap da baskılanır. Bu durum CpG motifi içeren DNA moleküllerinin terapötik uygulamalarda ve aşılarda adjuvan olarak kullanılabilmesinin bir göstergesidir (Yurdakök ve İnce, 2008).

### 1.3.2.3. Monofosforil Lipit A

Monofosforil lipit A (MPL), gram negatif bir bakteri olan *Salmonella minnesota*'nın lipopolisakkaritinin toksik olmayan türevidir ve yardımcı T lenfositlerinden Th1'i güçlü şekilde uyabilme özelliğine sahiptir (Reed ve ark., 2009). Lipopolisakkaritler; makrofajlar, B hücreleri ve ASH'leri uyarabilen güçlü adjuvan etkiye sahiptir. Ancak yüksek toksisite gösterdiklerinden insanlarda kullanım için uygun değildir. MPL ise lipopolisakkaritlerden çok daha az toksik olmasına rağmen adjuvan aktivesi hemen hemen aynıdır (Chen, 2000). MPL lipozomlar gibi taşıyıcı

sistemlerle formüle edildiği zaman bilinen en iyi başarıyı gösteren mukozal adjuvan olarak kullanılmaktadır (Vajdy ve ark, 2004).

#### **1.3.2.4. Saponinler**

Saponinler yabani veya kültür bitkilerinde, bazı ilkel deniz canlılarında ve bakterilerde bulunan steroid ya da triterpenoid glikozitlerdir (Rajput ve ark., 2007) Saponin içeren adjuvanlar hem hücresel hem de hümoral bağışıklığı uyarırlar. Adjuvan olarak saponin kullanılmasının avantajı adjuvan aktivitenin elde edilebilmesi için düşük dozların yeterli olmasıdır (Oda ve ark., 2000). Saponinler aynı zamanda sitotoksik CD8+ lenfosit cevabını güçlü bir şekilde artırır ve mukozal antijenlere karşı oluşan bağışık yanıtı güçlendirirler (Kensil, 1996). *Quillaja saponaria* ağacının kabuğundan elde edilen ekstrenin adjuvan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Quil A bu ekstreden elde edilen saponin fraksiyonudur ve 23 çeşitten fazla saponin içerir. QS21, Quil A'dan ters faz kromatografi yöntemi ile damıtılarak ayrılan yüksek derecede saflaştırılmış saponin fraksiyonu olup daha az toksik yapıdadır (Kensil ve ark., 2004; Rajput ve ark., 2007). Toksisitelerinin yüksek olması, hemolitik etkileri ve kararlı bir kimyasal yapı göstermemeleri nedeniyle tüm Quillaja saponinleri halen insanlarda kullanım için uygun değildir. Ancak kanser aşılı gibi yüksek toksisitenin kabul edilebileceği durumlarda, düşük dozlarda ya da diğer adjuvanlarla birlikte kullanılmaları yönünde çalışmalar devam etmektedir (Yurdakök ve İnce, 2008).

#### **1.3.2.5. Endojen Moleküller: Sitokinler ve Kemokinler**

Çoğu sitokin bağışık yanıtı değiştirme ve yeniden yönlendirme yeteneğine sahiptir. Adjuvan olarak en çok değerlendirilen sitokinler IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12 ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF)'lerdir. Bununla birlikte bu moleküllerin üretimleri pahalıdır ve hepsi doza bağlı toksisite göstermektedirler. Ayrıca protein yapısında olmaları nedeniyle stabilite problemleri vardır ve yarı

ömürleri kısadır. Bu nedenle sitokinlerin bulaşıcı hastalıklarda adjuvan olarak kullanılmaları yerine daha çok kanser tedavisinde kullanımları ön görülmektedir (Singh ve O'Hagan, 2002).

Kemokinler mukozal yüzeylerdeki bağışık yanıt oluşturan hücreler ile epitel hücreler gibi birçok hücrede üretilen kemotaktik proteinlerdir. Sitokinlere göre adjuvan olarak daha az çalışılmış olup aralarından, lenfotaktin, RANTES, MIP1 $\alpha$  ve MIP1 $\beta$ 'nin mukozal adjuvan olarak eğilim gösterdikleri saptanmıştır (Yuki ve Kiyono, 2003; Magistris, 2006).

#### **1.3.2.6. Canlı Vektörler**

Doğal enfeksiyonlar, güçlü mukozal ve sistemik bağışık yanıt oluşturlar. Canlı zayıflatılmış mikroorganizmalar, doğasında adjuvan özellikte olan organizmaları çoğaltabilme özelliklerinden dolayı etkili aşı taşıyıcı sistemlerdendir (Ryan ve ark., 2001). Bu nedenle zayıflatılmış mikroorganizmaların rekombinant suşları heterolog antijenlerin mukozal yol ile taşınması için etkili vektörler olarak geliştirilmişlerdir. Genellikle heterolog aşılama için kullanılan bakteriyel ve viral zayıflatılmış vektörler *Salmonella*, BCG ve adenovirüslerdir (Yuki ve Kiyono, 2003; Magistris, 2006). Bu vektörler ile ortalama bir dozda tek bir mukozal aşılama ile çok büyük immünojenik dozlar elde edilebilir. Bu durum uzun ömürlü güçlü bir bağışık yanıtı neden olur. Ayrıca farklı antijenler olası tek bir vektör aracılığıyla taşınabilirler ve böylece tek bir aşılama ile çeşitli hastalıklara karşı koruma sağlanabilir (Chen, 2000).

#### **1.3.3. Partiküler Antijen Taşıyıcı Sistemler**

Partiküler adjuvanlar veya antijen taşıyıcı sistemler bağışıklığı uyaran diğer adjuvanların yerine alternatif olarak düşünülmektedir (O'Hagan ve ark., 2001). Partiküler yapılar ile ASH'lere antijenin sunumu ve ikincil lenf organlarına taşınım

kolaylaştırılarak bağışık yanıtın uyarılması sağlanır (Schöll ve ark., 2005). Partiküler taşıyıcı sistemler ile ayrıca bağışık yanıtın seviyesini artırmak veya hedefleme yapmak amacıyla bağışıklığı uyaran diğer adjuvanlar da taşınabilir. Böylece kullanılan adjuvanların olası yan etkileri azaltılabileceği gibi, adjuvanın sistemik dolaşımı sınırlandırılabilir (O'Hagan ve ark., 2001).

### **1.3.3.1. Lipit Kökenli Taşıyıcı Sistemler**

Biyolojik olarak önemli molekülleri geniş bir yelpazede enkapsüle etme yeteneğine sahip olan lipit kökenli taşıyıcı sistemler bulaşıcı hastalıklara karşı aşılarda geliştirilmesinde umut vaat eden mukozal antijen taşıyıcı sistemler olarak görülmektedirler (Goyal ve ark., 2008).

#### **1.3.3.1.1. Lipozomlar**

Lipozomlar küresel çift katlı lipidlerden oluşan bir dış kabuk ile hidrofilik iç kompartmanı olan çeşitli büyüklüklerdeki veziküllerdir. Lipozomlar biyolojik olarak parçalanabilir olmaları, toksik olmamaları, immünolojik olarak etkisiz olmaları, T hücrelerini etkili şekilde uyatabilmeleri, uzun ömürlü olmaları, hücre aracılı bağışıklığı uyatabilmeleri gibi birçok avantaja sahiptirler. En önemli avantajı ise yapısal özellikleri sayesinde çeşitli maddeleri kombine halde enkapsüle edebilme yetenekleridir (Kurella ve ark., 2000; Felnerova ve ark., 2004). Ancak ev sahibi enzimlere duyarlı olmaları, saklanma süresince stabil olmamaları ve yüksek üretim maliyetleri nedeniyle kullanımları sınırlıdır (Gupta ve Siber, 1995).

#### **1.3.3.1.2. Arkeozomlar**

Arkeozomlar, Archaeobacteria'dan elde edilen polar eter lipidlerinin bir veya daha fazlasından üretilen lipozomlardır. Birçok Archaeobacteria yüksek tuz

konsantrasyonu, düşük pH değerleri veya yüksek sıcaklıkları kapsayan ortamlarda yaşayabilirler. Membran yapılarının özğün olması sonucu bahsedilen zor koşullarda hayatta kalmaları sağlanır (Khosravi-Darani ve ark., 2007). Archaeobacteria'lar fiziksel ve kimyasal stabiliteleri ve ASH'lere alınmaları gibi özellikleriyle lipozom benzeri etki gösterirler. Oksidatif strese, yüksek sıcaklığa, alkalın pH'ya, fosfolipazlara ve safra tuzlarına düşük duyarlılık gösterirler. Bağışık yanıtın Freund's adjuvanı ile benzer; konvansiyonel lipozomlarla karşılaştırıldığında ise daha üstün olduğu gözlenmiştir (Krishnan ve ark., 2000; Kersten ve Crommelin, 2003).

### **1.3.3.1.3. Kohleatlar**

Kohleatlar iç sulu faz içermeyen, sarmal yapı içinde yuvarlanmış lipit çift tabaka katmanlarının bulunduğu katı partiküllerdir (Syed ve ark., 2008). Kohleatlar uzun, çok molekülü katmanlar olmaları ve küresel yapıda olmamaları nedeniyle diğer lipozom gruplarından ayrılırlar. Fosfatidiletanolamin, negatif yüklü fosfatidilserin ve kolesterol içeren çift tabakalı bu yapı arasına yapının stabil kalması amacıyla kalsiyum iyonları eklenir.

Yuvarlanmış iki tabakalı katman sonucunda iç hacim sıfıra iner. Buna rağmen kohleatlar birçok farklı molekülü taşıyabilirler. Hidrofobik ve amfililik moleküller, çift tabaka ile tutunurken; negatif yüklü bileşenler kalsiyum iyonlarıyla, pozitif yüklü bileşenler fosfatidilserin ile tutunurlar. Proteinler, peptidler ve DNA ile formüle edilmiş kohleatlar mukozal yol veya parenteral yol ile verildiğinde etkili birer aşı olabilmektedir (Gould-Fogerite ve Mannino, 2000; Kersten ve Hirschberg, 2004; Sharma ve ark., 2009).



#### **1.3.3.1.4. Virüs-Benzeri Partiküller ve Virozomlar**

Virüs benzeri partiküller, virüslerin inert, boş kapsidleri (virüslerin çevresindeki koruyucu kılıf) olup, virüsün kendi DNA'sını veya RNA'sını içermezler. Buna karşılık virüsün yapısını korurlar ve antijenlerin eklenmesi için üzerlerinde çalışılabilir. Parenteral, mukozal ve transkütan bağışıklamada virüs benzeri partiküllerle sunulan antijenler dendritik hücreler tarafından alınır ve aktif bağışık yanıtlar oluştururlar (Aguilar ve Rodriguez, 2007).

Virozomlar viral membran proteinlerinden elde edilen, virüs benzeri partiküllerin alt grubu olan, küçük tek tabakalı veziküllerdir. Virozomlar, membranları içine gömülü hemaglutininin içerdiklerinden ASH'ler üzerinde bulunan sialik asit kalıntılarına hedeflenebilmektedirler (Schöll ve ark., 2005). ASH'ler tarafından endositozla hücre içine alınırlar. Virozom yüzeyine bağlı antijenler endozomal füzyon ile virozomdan ayrılırlar ve MHC Sınıf II reseptörlerini uyarırlar. Virozom içinde enkapsüle haldeki antijenler ise füzyon olayı sırasında sitozole taşınırlar böylece MHC Sınıf I yolağına girmiş olurlar. Bu nedenle virozomlar hem humoral hem de hücrel bağışık yanıtı uyarabilme yeteneğine sahiptirler. Oluşan bağışık yanıt hızlı ve güçlüdür. Virozomlar sadece elde edildikleri virüslere karşı bağışık yanıt oluşturmak için kullanılmaz. Aynı zamanda pek çok diğer aşı antijeni, ilaç, nükleik asit için de taşıyıcı sistemlerdir (Glück ve ark., 2005).

#### **1.3.3.1.5. Bağışıklığı Uyarıcı Kompleksler (ISCOM ve ISCOMATRIX)**

ISCOM'lar; saponin (Quil A), kolesterol, fosfolipit ve antijenin hidrofobik etkileşimle bir arada bulunduğu, 30-80 nm büyüklüğünde, kafes benzeri moleküler yapısındaki bileşiklerdir. ISCOM yapısında bulunması zorunlu olan maddeler kolesterol ve saponinlerdir. Diğer aşı adjuvanlarının aksine, ISCOM'lar aynı anda hem yüksek antikor seviyesini hem de güçlü T hücre yanıtını oluşturarak etkili bir

bağışık yanıtın meydana gelmesini sağlarlar (Cox ve ark., 2006; Shahiwala ve ark., 2007).

ISCOMATRIX, antijen içermeyen ISCOM yapısındaki adjuvandır. Bu adjuvanın ISCOM'a göre bazı avantajları mevcuttur. ISCOMATRIX ile tercih edilen ASH'ye hedefleme yapılabilir. ISCOMATRIX ile hümmoral bağışık yanıtın gücü, hızı ve etki süresi artmıştır. Ayrıca bu etkiler için gerekli antijen dozunu da düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu özellikleri nedeniyle hızlı bağışık yanıt gerektiren durumlarda ya da her bir antijen dozunun düşük olması gereken kombine aşılar için tercih edilebilecek bir adjuvandır (Pearse ve Drane, 2005).

#### **1.3.3.1.6. Proteozomlar**

Proteozomlar, *Neisseria meningitidis* dış membran proteinlerinden oluşan hidrofobik, protein yapısındaki nanopartikülleri içeren taşıyıcı sistemlerdir. Proteozomlar hem taşıyıcı sistem olmaları hem de bağışıklığı uyarıcı özelliklerinden ötürü bağışık yanıt etkili şekilde uyabilirler. Ayrıca bazı antijenlerin toksisitesini de önemli derecede azaltırlar. Proteozomlar büyük moleküllerin hidrofobik bölgeleriyle nonkovalent şekilde etkileşime girerler ve bu büyük molekülleri başarılı şekilde mukozal bağışıklık sistemine sunarlar (Fries ve ark., 2001; Treanor ve ark., 2006).

#### **1.3.3.2. Polimerik Taşıyıcı Sistemler**

Polimerik taşıyıcı sistem kavramı, proteinlerin veya antijenlerin belirli bölgelere hedeflenmesinin amaçlanmasıyla ortaya çıkmıştır. Mukozal aşı taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine yönelik bu yaklaşım özellikle mukozal çevrede proteinlerin ve antijenlerin parçalanmaya karşı korunması ve bağışıklık sistemi tarafından alınmasının artırılmak istenmesiyle zorunlu hale gelmiştir. Polimerik partiküller, mukozal epitel dokuda çözünebilir moleküllere göre çok daha yüksek etkinlikte

adsorbe edilirler ve böylece bağışık yanıtın oluşturulmak istendiği bölgede yüksek antijen konsantrasyonları sağlanır (Andrianov ve Payne, 1998).

#### **1.3.3.2.1. Kitosan**

Kitosan, kitinin deasetilasyonu ile elde edilen, D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozamin kopolimerlerinden oluşan katyonik bir polisakkarittir. Kitosan; toksik olmayan, biyogeçimli, biyoparçalanabilir, bağışıklık sistemi üzerinde adjuvan özellikler gösterebilen doğal bir polimerdir. Kitosan mukozal hücreler arasındaki sıkı bağlantılarla (tight junctionlar) etkileşmekte, böylece sıkı bağlantıların bütünlüğünü bozarak bileşiklerin parasetil yoldan taşınmasını sağlamaktadır (van der Lubben ve ark., 2001a; van der Lubben ve ark., 2001b; Issa ve ark., 2005).

Fare ve kobaylarda (guinea pig) yapılan çalışmalar kitosanın, nazal yoldan verilen influenza, boğmaca ve difteri aşılarının hem hüneral hem de hünerel tipte bağışık yanıtlarını anlamlı ölçüde artırdığını ortaya koymuştur (Read ve ark., 2005). Sayın ve ark., kitosan ve türevlerinden (polikatyonik kitosan türevi TMC, amfifilik kitosan türevi MCC) hareketle partikül boyutları 40-400 nm arasında değişen partiküler sistemler hazırlamışlar ve bu sistemlerin mukozal bağışıklamada etkili olduklarını göstermişlerdir (Sayın ve ark., 2007).

#### **1.3.3.2.2. Aljinatlar**

Aljinatlar; kahverengi deniz yosunundan izole edilen güvenli, immünojenik olmayan, yüksek mukoadhezif özellikteki, ucuz, doğal polisakkarit polimerlerdir (Tonnesen ve Karlsen, 2002; Goyal ve ark., 2008). Aljinat mikropartiküller aşılar, peptitler, hünerler ve genler gibi birçok ilaç için başarılı taşıyıcı sistemlerdendir (Dobakht ve ark., 2006). Aljinat mikropartikülleri; midedeki düşük pH'ya ve gastrointestinal sistemdeki proteolitik enzimlere direnç göstermeleri, yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip olmaları, küçük boyutlu olanlarının antijeni Peyer plaklarına ve aynı

zamanda lenfatik sisteme etkin bir şekilde iletebilmeleri gibi birçok avantaja sahiptirler (Cho ve ark., 1998).

Kim ve ark., aljinat mikrokürelere enkapsüle ettikleri rotavirüs antijenlerini oral yoldan farelere uygulamışlardır. Bunun sonucunda etkili IgA ve IgG yanıtları elde etmişlerdir (Kim ve ark., 2002).

#### **1.3.3.2.3. Karbopol**

Karbopol (karbomer), deneysel olarak mukozal yüzeylerde adezyonu artırmak için diğer taşıyıcı sistemlerle kullanılan ve gastrointestinal yolda peptitlerin ve proteinlerin enzimatik parçalanmaya karşı korunmalarını artıran, yüksek molekül ağırlığındaki çapraz bağlı poli(akrilik asit) polimeridir (Goyal ve ark., 2008). Karbomerler düşük viskoziteli asidik kolloidal dispersiyonları oluşturmak için suda disperse edilirler. Nötralize olduklarında ise yüksek viskozluktaki jelleri oluştururlar. Nötralize sulu jelleri pH 6-11 arasında daha viskozken, 3'ten daha düşük veya 12'den büyük pH'da viskozitesi azalır. Karbomerlerin genellikle toksik ve iritan olmadıkları kabul edilir (The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009).

Gerber, karbopol temelli mukoadhezif aşı taşıyıcı sistemler geliştirerek mukozal yüzeylerde aşı antijeninin güçlü mukoadhezif özellik ve yüzeye tutulma eğilimi gösterdiğini belirtmiştir (Gerber, 2004).

#### **1.3.3.2.4. Mikro- ve Nano- Partiküller**

Antijenlerin ASH'lere alımı, polimerik partiküllerle antijenlerin veya partiküler sistemde kullanılan polimer ile antijenlerin etkileşmesinin bir sonucu olarak artırılmaktadır. Biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak geçimli olan poliesterler, poli-laktik-ko-glikolikler (PLG) hem cerrahi dikiş materyallerinde hem de kontrollü salım ilaç sistemlerinde uzun yıllardır insanlarda kullanıldıklarından en

sık tercih edilen polimerik partiküler sistemlerin başında gelmektedirler (O'Hagan ve ark.,1997).

PLG partiküllerinin peptid, protein ve DNA aşıları için etkili birer taşıyıcı sistem olduğu gösterilmiştir (Tyagi ve ark., 2008). Bu formülasyonlarda antijen ya partiküler sistemin içine hapsedilir ya da yüzeye adsorbe edilir (Peek ve ark., 2008). Partiküllerden enkapsüle antijenlerin salım hızı, polimerin bileşimine ve molekül ağırlığına bağlı olan partikülün parçalanma hızıyla kontrol edilir (Chen, 2000). Partiküler veriliş sistemlerinin mukoadezif polimerlerle kaplanması ile bu tür aşılardan mukoza tarafından alıkonma süresi artırılabilir. Mukosilyer klerensi yavaşlatabilecek polimerlere örnek olarak hidrokispropil selüloz, kitosan, karbopol, hiyalüronik asit ve poliakrilik asit verilebilir (Alpar ve ark., 2005; Devrim ve ark., 2007).

Poli-laktik-ko-glikoliklerin suda çözünür olmamaları, sadece sınırlı sayıda organik çözeltilerle çözünebilir olmaları formülasyon geliştirilmesini sınırlayan özelliklerden birisidir. Bu özellikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılan hazırlama yöntemi emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemidir (O'Hagan, 1998). Bozkır ve ark., etkin madde olarak influenza virüs yüzey antijeni olan hemaglutinini kullandıkları bir çalışmada çoklu emülsiyon yapısındaki formülasyonların, emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmış nanopartiküllere kıyasla daha etkili bağışık yanıt oluşturduklarını göstermişlerdir (Bozkır ve ark., 2004).

#### **1.3.4. Mukozal Aşı Uygulama Yolları**

Oral, nazal, pulmoner, rektal, konjunktival ve vajinal mukozayı içeren tüm mukozal yollar ve yüzeyler potansiyel mukozal bölgeler olarak kabul edilmiştir (Giudice ve Campbell, 2006). Pratik açıdan değerlendirildiğinde ise her yaş ve her iki cinsiyet için de nazal ve oral yolla veriliş en uygun seçenekler olarak görülmektedirler (Simon ve ark., 2010).

#### **1.3.4.1. Oral Yol**

Diğer yollara kıyasla oral yol, hasta uyumu ve veriliş kolaylığı gibi nedenlerle en çok tercih edilen ve en çok kullanılan mukozal aşı uygulama yollarından birisidir. 1961 yılında uygulanan attenüe Sabin polio virüs aşısı, diğer canlı attenüe aşılardan oral yolla uygulamalarının geliştirilmesine ve kullanımına ön ayak olmuştur. (Giudice ve Campbell, 2006; Simon ve ark., 2010).

Peptid ve proteinlerin parçalanmaları ve metabolize olmaları sonucu stabilite sorunu yaşamaları ve yüksek molekül ağırlığındaki maddelerin bağırsak mukozasından geçişlerinin çok düşük olması gibi nedenlerle oral yol bu maddeler için uygun değildir (Reddy, 1998). Aynı zamanda gastrointestinal sistemin geniş yüzey alanından dolayı antijenlerin seyrelmesi ve dolayısıyla yüksek miktarda antijen/adjuvan formülasyonuna ihtiyaç duyulması, yüksek maliyeti beraberinde getirmektedir (Magistris, 2006). Polimerik mikropartiküllerin kullanımı oral yolla uygulanacak aşılarda geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Çeşitli polimerlerle hazırlanan mikropartiküller, enkapsüle edilmiş antijenleri gastrointestinal sistemdeki parçalanmaya karşı koruyabileceği gibi aşının mideden geçişini geciktirebilir veya hedefleme ile Peyer plaklarının lenfoid dokularındaki mukozal taraftan aşının alımını sağlayabilirler (O'Hagan, 1998).

#### **1.3.4.2. Pulmoner Yol**

Pulmoner yol ile aşı uygulanması, iğneye ihtiyaç duyulmadığı için özellikle pediyatrik ve geriyatrik popülasyonlarda toplu aşılamalarda uygun olabilecek, gelecek vaat eden mukozal aşı uygulama yollarından birisidir. Eğitilmiş personele ihtiyaç duyulmaması, ucuz olmaları, geniş yüzey alanına uygulama imkanının olması, büyük antijen hacimlerinin kullanılabilmesi ve sonuçların kolay izlenebilir olması gibi birçok avantaja sahiptir (Roth ve ark., 2003). Aşıların akciğerlerin alt loblarına ulaştırılmaları zorluğundan ötürü gelişmiş teknolojiye ihtiyaç duyulması,

antijen dağılımının kişiden kişiye oldukça fazla çeşitlilik göstermesi pulmoner uygulama yolunu sınırlayan etmenlerdir (Vajdy ve O'Hagan, 2001; Slütter ve ark., 2008).

#### **1.3.4.3. Rektal ve Vajinal Yol**

Rektal yolla bağışıklama diğer mukozal alanlar gibi yoğun çalışılmamıştır. Ancak polio virüsü, maymun bağışıklık yetmezliği virüsü ve influenza virüsü ile yürütülen çalışmalarda rektal yolla verilen antijenlerin bağırsakta ve ortak mukozal sistemdeki diğer bölgelerde spesifik antikor yanıtını etkili biçimde uyardığı görülmüştür (Ogra ve ark., 2001). Büyük peptid ve protein moleküllerinin rektal absorpsiyonu için penetrasyon artırıcılara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu penetrasyon artırıcıların rektum epitel hücre membranındaki lipid çift katmanlı yapının geçirgenliğini değiştirerek peptid ve protein moleküllerinin biyoyararlanımlarını artırdığı düşünülmektedir (Reddy, 1998).

Vajinal yol ise sistemik etki beklenen ilaçların absorpsiyonu için genellikle uygun bir yol değildir (Reddy, 1998). Kemirgenlerde, insanlarda ve primatlarda vajinal yolla bağışıklama ile servikovajinal yıkamada salgısal IgA ve IgG yanıtının ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, vajinal yolla bağışıklamanın, diğer mukozal bölgelerde bağışık yanıtın uyarılmasında etkisiz olduğu kanıtlanmıştır (Hobson ve ark., 2003).

#### **1.3.4.4 Konjunktival Yol**

Lakrimal boşaltım, gözyaşı ile dilüsyon ve protein bağlanması gibi fiziksel koruma mekanizmaları ile korneanın anatomik özelliğinden dolayı uygulanacak ilaçların bifazik çözünürlük özelliklerinin olması gibi dezavantajlar konjunktival yol ile uygulamayı sınırlamaktadır. İlaçların konjunktival yol ile sistemik taşınması çok zor

olmakla beraber olasıdır. 1931 yılının başında insülinin konjunktival yoldan topikal olarak uygulanması ile uzun süreli düşük kan glukoz seviyeleri elde edilmiştir ve subkütan yol ile uygulanan insülin dozuyla karşılaştırılabilir bulunmuştur. Bununla birlikte peptid ve proteinlerin konjunktival yol ile sistemik etkileri üzerine çalışmalar sınırlıdır. Yine de konjunktival yol, gözün ön kısmını etkileyen patolojik durumların lokal tedavisinde peptid ve proteinlerin kullanıldığı taşıyıcı sistemler için etkili bir yol olabilir (Reddy, 1998; Mircheff, 2010).

#### **1.3.4.5. Nazal Yol**

Nazal mukoza, mukozal bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır. İnhalasyonla organizmaya alınan antijenler için ilk temas noktasıdır ve böylelikle nazal aşılama ile patojenler organizmaya ilk girdikleri noktada nötralizasyona uğramaktadır. Bunun sonucu olarak hem sistemik hem de mukozal bağışık yanıt elde edilebilmektedir (Isaka ve ark., 2000; Saatçi ve Bozkır, 2003).

#### **1.4. Nazal Yolla Aşı Verilişi**

Nazal yol, hem lokal hem de uzak mukozal salgılarda antikor yanıtını son derece etkili şekilde uyarabilen mukozal ilaç veriliş yollarından birisidir (Alpar ve ark., 2005). Nazal yolla uygulanan geleneksel ilaçlar nazal alerji, nazal tıkanıklık ve nazal enfeksiyon gibi lokal hastalıkların tedavisinde kullanılırken son zamanlarda yapılan çalışmalar küçük molekül ağırlığındaki polar ilaçların, peptid ve proteinlerin sistemik taşınmasında nazal yolun diğer mukozal uygulama yollarına göre kullanılabilir olduğunu göstermiştir (Illum, 2003).

Nazal yolla aşılamanın avantajları aşağıda sıralanmaktadır.



- Gastrointestinal sistemde karşılaşılabilecek asidik ve enzimatik parçalanmadan ilaçlar korunmuş olur.
- İlaçların karaciğerde ilk geçiş etkisine uğraması önlenmektedir.
- Burun mukozası damar ağı açısından zengindir. Ayrıca çok sayıda mikrovilusa bağlı olarak geniş bir absorpsiyon alanına sahiptir.
- Hızlı emilim etkinin hemen başlamasını sağlar.
- Yüksek biyoyararlanım nedeniyle düşük etkin madde dozları yeterli olabilmektedir.
- Kolaylıkla uygulanabilir. Hastanın kendi kendine uygulamasına olanak verir.
- İğne ve şırınga kullanımı olmadığı için enfeksiyon yayılma riski yoktur.
- Geniş popülasyonların bağışıklamasında kullanılabilen kolay bir yöntemdir.
- Aşırı doz riski çok düşüktür.
- Nazal aşılar özellikle adjuvanlarla birlikte uygulandığında hem mukozal (IgA) hem de sistemik (IgG) bağışık yanıtı uyatabilmektedir.
- Ortak mukozal bağışıklık sistemi sayesinde uzak mukozal bölgelerde dahi bağışık yanıtlar oluşturabilmektedir.
- İlaçlar koku sinirleri ile beyine doğrudan iletilebilir.
- Nazal aşıların üretimi sistemik aşılarda olduğu kadar zor şartları gerektirmediğinden üretimleri daha kolay ve ucuzdur (Davis, 2001; Arora ve ark., 2002; Biesterveld, 2002; Saatçi ve Bozkır, 2003; Türker ve ark., 2004; Sharma, 2009).

Nazal yolla aşılamanın dezavantajları ise şöyledir:

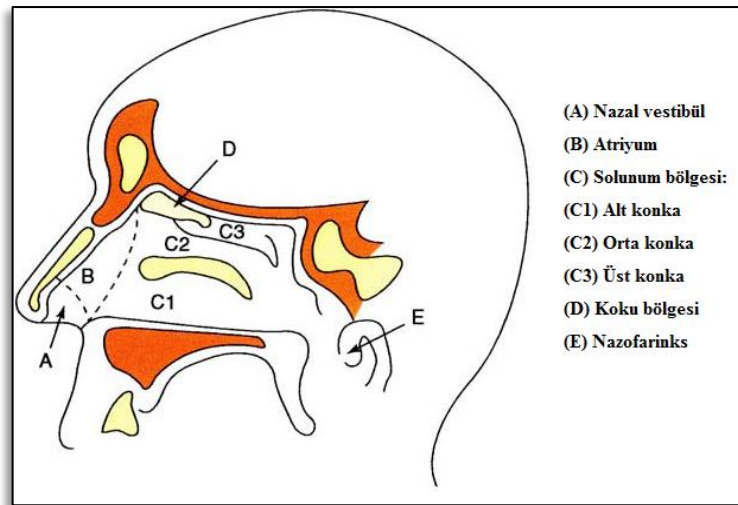
- Burun boşluğuna uygulanabilir hacim miktarı sınırlıdır (25-250µl).
- Patolojik durumlardan olumsuz etkilenebilir.
- Türler arasında büyük değişkenlik gözlenmektedir.
- Mukosiliyer klerens ve siliyer atım gibi koruma mekanizmaları nedeniyle ilaç geçirgenliği etkilenebilir.
- Burun mukozası ilaçlar yüzünden tahriş olabilir.
- Uygulama aletine gerek duyulabilir (Arora ve ark., 2002; Slütter ve ark., 2008).

### 1.4.1. Burun Anatomisi ve Fizyolojisi

Nazal yolla aşı verilmesini anlamak için öncelikle burun anatomisi ve fizyolojisi hakkında bilgi sahibi olmak gerekmektedir.

#### 1.4.1.1. Burun Boşluğu

Burun delikleri ve burun boşluğunun üçte biri burnun görünen dış yüzeyi ile çevrelenmektedir. Burun boşluğunun toplam yüzey alanı yaklaşık  $150 \text{ cm}^2$  ve toplam hacmi yaklaşık  $15 \text{ ml}$ 'dir (Mygind ve Dahl, 1998). Orta kısımda bulunan septum burun boşluğunu; birbirine bağlı olmayan, her bir parçası kendi içinde beş bölgeye ayrılan iki parçaya böler. Bu bölgeler vestibül, atriyum, solunum bölgesi, koku bölgesi ve nazofarinktir. Vestibül sadece burun delikleriyle yaklaşık  $0,6 \text{ cm}^2$ 'lik bir alanı içeren bölümdür. Atriyum, vestibül ile solunum bölgesi arasındaki ara bölgedir. Burun boşluğunun ana bölümünü kaplayan solunum bölgesi, yan duvarını alt konka, orta konka ve üst konka olmak üzere üç bölgeye ayıran üç tane kemiksi çıkıntı içerir. Koku bölgesi uzmanlaşmış tüylü koku sinirlerini içerir. Ayrıca beyin-omurilik sıvısıyla doğrudan ilişkilidir. Nazofarinks ise yutağın ilk bölümüdür ve aşağıya doğru yutağın ağıza ait bölümüne kadar devam eder (Şekil 1.3) (Illum, 2003; Ugwoke ve ark., 2005)

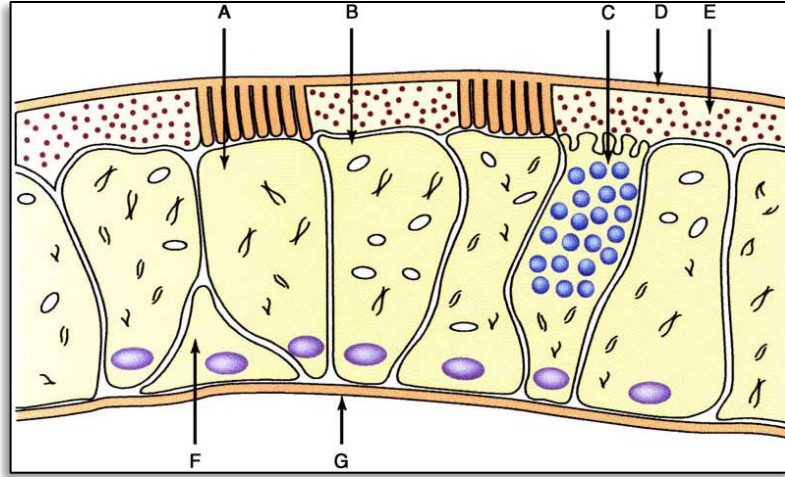


Şekil 1.3. İnsan burnunun anatomik yapısı (Ugwoke ve ark., 2005)

Burunun fizyolojik özellikleri hava akımı ile başlar. Alt solunum yoluna ortam havasının iletilmesini sağlayan burun ayrıca içinden geçen havayı filtre etme, ısıtma ve nemlendirme işlevi görür. Burun alt solunum sisteminin hassas yapısını koruyan solunumun ilk savunma hattıdır (Zhao ve ark., 2004). Burun ayrıca koku alma, duyumsama, bağışıklık sağlama, mukosilyer klerens ile koruma gibi fonksiyonlara da sahiptir (Jones, 2001).

#### 1.4.1.2. Mukus ve Mukosilyer Klerens

Vestibül bölgesinde bulunan epitel hücreleri tabakalı, pullu yapıdadır ve yağ bezleri ile keratinize olmuş haldedir. Epitel hücreleri, mikroviluslar ve büyük bir kısmı ayrıca titrekt tüyler ile kaplıdır (Şekil 1.4). Vestibül, yapısı nedeniyle su kaybına çok dirençlidir. Zararlı çevresel maddelere geçirgenliği sınırlı olduğundan bu maddelere karşı dayanıklıdır (Illum, 2003; Ugwoke ve ark., 2005).



**Şekil 1.4.** Nazal epiteldeki hücre tipleri; A- titrekt tüylü hücre, B- titrekt tüy içermeyen hücre, C- goblet hücreleri, D- jel mukus tabakası, E- sıvı tabaka, F- bazal hücre, G- basement zarı (Ugwoke ve ark., 2005)

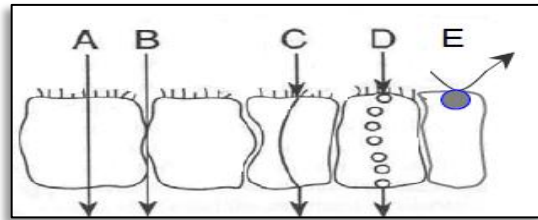
Mukus tüylerle mekanik bağlantı oluşturabilen ve tüyler tarafından taşınabilen çapraz bağlı, viskoelastik jel yapısında bir maddedir. Üzerinde en çok çalışılan mukus salgı hücresi ise goblet hücresidir. Mukus salgısı %95 su; %2 müsin; %1 tuz; %1 albumin,

immünoglobulinler, lizozim ve laktoferin gibi diğer proteinler ve %1'den az lipit içerir (Mygind ve Dahl, 1998). Normal dinlenme halindeki burun mukozasının 160 cm<sup>2</sup>'sinden her gün yaklaşık 20-40 ml mukus salgılanır. Havadaki hareketli partiküllerden etkilenebilen ve bu partiküllerin yüzeyine yapışabileceği burun boşluğu üzerinde mukus sürekli bir tabaka oluşturur (Jones, 2001).

Mukus tabakasının tüylerin düzenli hareketi ile nazofarinkse taşınmasıyla mukosilyer klerens oluşmaktadır. Mukosilyer klerens vücudun solunum ile alınan yabancı maddelere karşı korunması için geliştirilmiş spesifik olmayan fizyolojik bir solunum yolu savunma mekanizmasıdır. Mukus taşınma hızı ortalama 5 mm/dak olduğundan burundan temizlenme yarı ömrü yaklaşık 15-30 dakika kadar olmaktadır (Östh ve ark., 2002; Saatçi ve Bozkır, 2003).

#### 1.4.1.3. İlaç Absorpsiyonunu Etkileyen Faktörler

Nazal epitelden ilaç taşınımı bir veya daha fazla mekanizma ile meydana gelir. Bu mekanizmalar arasında; hücre içi pasif difüzyon, hücreler arası pasif difüzyon, taşıyıcı aracılı absorpsiyon ve sekresyon, transsitoz ile taşınım sayılabilir. Hücre dışına atılımı sağlayan proteinlerin tümör hücrelerinde çoklu ilaç direncine aracılık ettikleri bilinmekle beraber bu proteinler normal hücrelerde ve epitellerde de bileşiklerin absorpsiyonunu azaltabilir (Şekil 1.5). Fizyolojik faktörler/bariyerler, etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri ve formülasyon özellikleri nazal mukozadan ilaç absorpsiyonunu etkileyen en önemli faktörlerdir (Wadell, 2002, s.:13).



**Şekil 1.5.** Nazal epitelde ilaç taşınım mekanizmaları; A- hücre içi pasif difüzyon, B- hücreler arası pasif difüzyon, C- taşıyıcı aracılı absorpsiyon, D- transsitoz ile taşınım, E- hücre dışına atılımı sağlayan proteinler ile taşınım (Wadell, 2002, s.:14)

### **1.4.1.3.1. Fizyolojik Faktörler/Bariyerler**

#### **1.4.1.3.1.1. Mukosilyer Klerens**

Mukosilyer klerensin azaltılması, ilaç ile mukus membran arasındaki temas süresini uzatmakta, etkin madde geçirgenliğini artırmaktadır. Bazı ilaçların, hormonal değişikliklerin, formülasyon faktörlerinin, patolojik ve çevresel koşulların mukosilyer klerensi etkilediği ve ilaç absorpsiyonunu artırdığı bildirilmiştir (Schipper ve ark., 1991; Marttin ve ark., 1998).

#### **1.4.1.3.1.2. Enzimler**

İlaçların karaciğerde ilk geçiş etkisine uğraması nazal yolla uygulama ile önlenmektedir. Ancak nazal mukozada geniş yelpazede özellikle peptidler ile proteinler gibi çoğun ilacın biyoyararlanımını etkileyebilen metabolik enzimler (örn., oksidatif bir enzim olan sitokrom P-450, proteolitik enzimlerden endo-ekso peptidazlar) vardır. Ancak yine de nazal enzimlerin aktivite düzeyinin gastrointestinal yol veya karaciğerdeki enzimlere göre daha düşük olduğu görülmüştür (Wadell, 2002, s.:14-15).

#### **1.4.1.3.1.3. Patofizyoloji**

Nazal mukozanın durumu ilaç absorpsiyonunu önemli ölçüde etkiler. Soğuk algınlığı, mevsimsel rinit, nazal polipler ve kanser gibi çeşitli patofizyolojik değişiklikler farklı şekillerde nazal boşluktaki emilimi ve formülasyonun klerensini etkileyebilir. Rhinovirüs enfeksiyonunun, epitel hücrelerin kabuklanmasına ve epitel tabakasının harabiyetine yol açtığı in vitro olarak gösterilmişken, soğuk algınlığı geçiren hastaların mukozal biyopsilerinin mikroskopik çalışmalarında tüysü

hücrelerde herhangi bir anormallik gözlenmemiştir (Behl ve ark., 1998; Wadell, 2002, s.:15).

#### **1.4.1.3.1.4. Nazal Kan Akımı**

Burun mukozası damar ağı açısından zengin olduğundan geniş bir absorpsiyon alanına sahiptir. Kan akımı ve dolayısıyla ilaç absorpsiyonu kan damarlarının vazodilatasyon ve vazokonstrüksiyonuna bağlıdır. Burun mukozasındaki kan damarları alfa adrenoseptör olarak hareket eden adrenerjik sinirler ile çevrilidir. Bu reseptörlerin uyarılması ile burundaki kan akımı ve içeriğinin azaldığı gözlenmiştir. Nazal kan akımı; ortam sıcaklığı, nem, travma ve enflamasyon gibi birçok dış ve fizyolojik faktörden etkilenmektedir (Behl ve ark., 1998).

#### **1.4.1.3.1.5. Burun Mukus Membranın Alanı**

İlacın bir burun deliğine uygulanmasıyla, her iki burun deliğine uygulanması arasında absorpsiyon farkının olduğu bilinmektedir. Bu durumun nedeni, ilaca maruz kalan mukus membran alanındaki artış sonucu burnun geçirgenliğinin artmasıdır (Arora ve ark., 2002). 40 mg progesteron merhem kullanılarak yapılan bir çalışmada her iki burun deliğine yapılan uygulama ile tek bir burun deliğine yapılan uygulama sonucu, absorpsiyonlar karşılaştırılmıştır. Merhem her iki burun deliğine uygulanması ile artan biyoyararlanım gözlenmiştir (Dalton ve ark., 1987).

#### **1.4.1.3.2. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özellikleri**

Etkin maddenin molekül ağırlığı ve büyüklüğü, çözünürlüğü ve çözünme hızı, pKa ve partisyon katsayısı, kimyasal durumu (örn., ön ilaç), fiziksel durumu (örn., partikül boyutu ve morfolojisi), polimorfizm gösterip göstermediği gibi

fizikokimyasal özellikleri burundan geçiş hızını ve yolunu etkilemektedir (Behl ve ark., 1998; Türker ve ark., 2004).

#### **1.4.1.3.3. Formülasyon Özellikleri**

İlaçların başarılı nazal absorpsiyonlarını elde edebilmek için formülasyon faktörleri dikkate alınmalıdır (Wadell, 2002, s.:15).

##### **1.4.1.3.3.1. Dozaj Formu**

İlaçların nazal absorpsiyon profillerinin belirlenmesinde spesifik tipteki dozaj formlarından hangisinin buruna uygulanacağı önemlidir. Buruna uygulanan dozaj formları arasında; nazal damlalar, çözelti spreyleri, süspansiyon spreyleri, tozlar, jeller, emülsiyonlar ve merhemler, mikroküreler, lipozomlar gibi özelleşmiş sistemler sayılabilir (Behl ve ark., 1998). Nazal damlalar en basit ve en uygun dozaj formlarıdır. Ancak verilmek istenen ilacın tam miktarının kolay bir şekilde uygulanması zor olduğundan genelde aşırı doz ilaç verilmesi ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca damla uygulamasındaki bir diğer olumsuzluk da ilacın burun boşluğundan hızla temizlenmesidir. Toz spreylerin mukoza harabiyeti yapmaları nedeniyle, çözelti ve süspansiyon spreyleri tercih edilir. Jeller, postnazal ve anterior sızmayı azaltmakta, formülasyonu mukozaya lokalize etmektedir (Arora ve ark., 2002). Emülsiyonlar (Mitra ve ark., 2000), mikropartiküller (Pereswetoff-Morath, 1998), nanopartiküller (Illum, 2007), lipozomlar (Mainardes ve ark., 2006) gibi farklı dozaj formları üzerinde de çalışmalar sürdürülmektedir.

##### **1.4.1.3.3.2. İlaç Konsantrasyonu, Doz ve Uygulama Hacmi**

Yapılan birçok çalışma ile ilaç konsantrasyonu ve dozunun ilacın absorpsiyonunu farklı şekillerde etkilediği gösterilmiştir (Behl ve ark., 1998). Uygulama hacmi de

ilaç absorpsiyonunu etkileyen bir diğer faktördür. Her bir burun deliğine uygulanabilecek en iyi formülasyon hacmi 25-200 µl arasındadır. Daha büyük miktarlardaki hacimleri burun boşaltır. Çözücüler, jelleşen maddeler veya viskozluk artırıcılar bu hacmi etkili bir şekilde kullanmak için önerilebilmektedir. Çözücülerin kullanılmasıyla çözünmeyen bileşiklerin sudaki çözünürlükleri artarken ilacın burundan absorpsiyonu kolaylaşmaktadır. Jelleşen maddeler ise atılımı azaltmakta ve bunun sonucu olarak ilacın mukus membranlarıyla temas süresini artırmaktadır (Behl ve ark., 1998; Arora ve ark., 2002).

#### **1.4.1.3.3.3. Formülasyonun Fiziksel Formu**

Nazal ilaç absorpsiyonu formülasyonun fiziksel formuna bağlıdır (Behl ve ark., 1998). Resta ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada alerjik rinit hastalığı olan insanlara sodyum kromoglikatın toz ve çözelti dozaj formları uygulanmış ve bu dozaj formları karşılaştırılmıştır. Toz dozaj formunun burun salgularıyla kolayca yıkanıp uzaklaştırılmamasından dolayı çözelti dozaj formuna göre daha etkili olduğu bulunmuştur (Resta ve ark., 1992).

#### **1.4.1.3.3.4. pH**

Nazal yolla uygulanan ilaçların taşınım hızı ve iyonize olabilen bileşiklerin absorpsiyonları lokal pH ile önemli ölçüde etkilenir (Washington ve ark., 2000). Burun yüzeyinin pH'sı 7,39 iken burun sıvılarının pH'ları erişkinlerde 5,5-6,5 arasında, bebek ve çocuklarda ise 5,0-6,7 arasındadır (Behl ve ark., 1998). Burnun tahriş olmasını ve bakteri üremesini önlemek, ilacın etkili bir şekilde mukozaya temasını sağlamak için nazal uygulanacak formülasyonların pH'ları 4,5-6,5 arasında tutulmalıdır (Arora ve ark., 2002).



#### **1.4.1.3.3.5. Osmolarite**

Osmolarite, sulu çözeltilerin içindeki tuzlar tarafından oluşturulan ozmotik basıncı tanımlar. Genellikle izotonik çözeltiler nazal yolla verilmiş için tercih edilmektedir (Arora ve ark., 2002). Vora ve arkadaşları yaptıkları çalışma ile nazal mukozadan ilaç absorpsiyonunun osmolariteden önemli ölçüde etkilendiğini ortaya koymuşlardır (Vora ve ark., 1993).

#### **1.4.1.3.3.6. Viskozite**

Viskozluk; bir sıvının akmaya karşı gösterdiği dirençtir. Direnç ne kadar büyük ise viskozluk o denli yüksektir (Bozkır ve ark., 2007, s.: 77-78). Formülasyonun yüksek viskozlukta olması etkin madde ile nazal mukoza arasındaki temas süresini uzatmakta, böylelikle absorpsiyon için süreyi artırmaktadır. Aynı zamanda yüksek viskozlukta formülasyonlar siliyer atım veya mukosiliyer klerens gibi normal fonksiyonları engelleyerek de ilaçların geçirgenliğini değiştirebilirler (Arora ve ark., 2002).

#### **1.4.1.3.3.7. Absorpsiyon Artırıcılar**

Düşük yayılma özelliğindeki etkin maddelerin nazal mukozadan absorpsiyon etkinlikleri absorpsiyon artırıcılar ile geliştirilebilir (Marttin ve ark., 1998). Bazı absorpsiyon artırıcılar formülasyondaki etkin maddenin çözünürlük, partiyon katsayısı gibi fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek etki gösterirler. Çoğu absorpsiyon artırıcı ise nazal mukoza yüzeyine tesir ederek etkilerini gösterirler (Türker ve ark., 2004). Absorpsiyon artırıcıların formülasyona eklenmesini sınırlayan en önemli etken nazal mukoza üzerinde oluşabilecek olası toksisitedir. Nazal absorpsiyon artırıcılar toksik ve alerjik özellikte olmamalı, irrtiyasyona neden olmamalı veya hemen geri dönüşebilecek etkiler oluşturmalıdır. Sürfaktanlar ve safra

tuzları test edilen ilk absorpsiyon artırıcılardır ve günümüzde birçok absorpsiyon artırıcı üzerine çalışmalar devam etmektedir. Çizelge 1.3’de üzerinde çalışılan absorpsiyon artırıcılar gösterilmiştir.

**Çizelge 1.3.** Nazal ilaç taşıyıcı sistemlerde araştırılan çeşitli absorpsiyon artırıcılar (Wadell, 2002, s.:16).

Absorpsiyon artırıcılar	Örnekler
Sümfaktanlar	Sodyum dodesil sülfat, fosfatidilkolin, polioksietilen-9-lauril eter
Kompleks ve şelat yapıcı ajanlar	Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA)
Siklodekstrinler ve türevleri	$\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -siklodekstrin
Fusidik asit ve türevleri	Sodyum taurodihidrofusidat (STDHF)
Safra tuzları	Sodyum glikolat, sodyum deoksikolat
Toz mikroküreler	Parçalanabilir nişasta mikroküreleri, dekstran mikroküreleri

#### 1.4.2. Nazal Bağışıklık Sistemi

Üst ve alt solunum yoluna ait bağışıklık sistemi; (i) epitel yüzeyindeki epitelyal kompartman ve altında immünokompetan hücreleri içeren birleştirici doku, (ii) burna ve bronşlara ait lenfoid dokular (NALT-burna bağlı lenfoid doku, BALT-bronşlara bağlı lenfoid doku, LALT-larinkse bağlı lenfoid doku), (iii) solunum sistemine boşaltım yapan lenf düğümleri olmak üzere 3 kısımda incelenebilir (Davis, 2001).

##### 1.4.2.1. Burna Bağlı Lenfoid Doku (NALT)

Burna bağlı lenfoid doku (NALT); dendritik hücreler, T hücreleri, B hücreleri gibi bağışık yanıtın başlatılmasından ve sürdürülmesinden sorumlu olan hücrelerin bir araya gelmesiyle oluşmuş, organize halde bulunan bir yapıdır (Jeong ve ark., 2000).

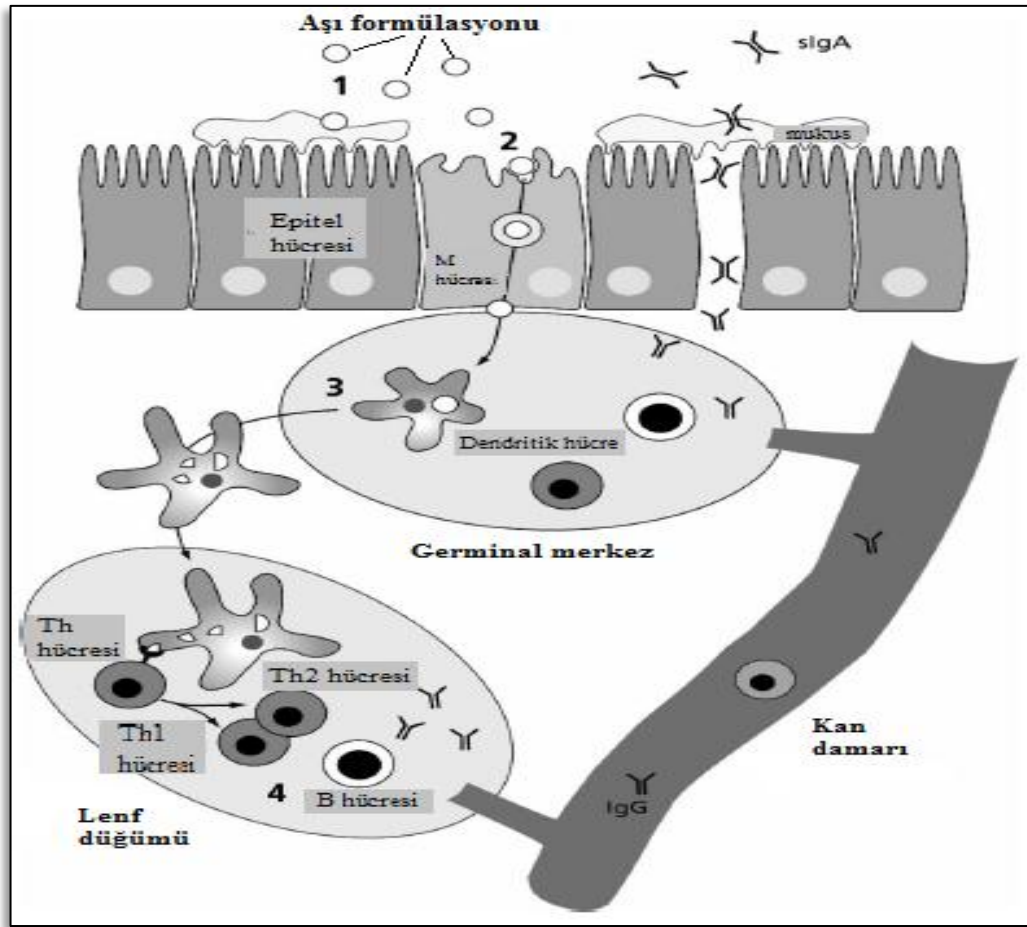
NALT çoğunlukla adenoidleri oluşturan nazofaringeal, tubal, palatin ve lingual tonsilleri içeren Waldeyer halkasından oluşmaktadır (Slütter ve ark., 2008). Bu yapılar farinkste mukozaya bağlı lenfoid dokunun temel bileşenleridir (Sharma ve ark., 2009). NALT'ta bulunan M hücreleri, hem Peyer plaklarında hem de BALT'ta yer alan M hücreleriyle aynı olup, antijenin yakalanması ve ardından antijene spesifik mukozal bağışık yanıtların ortaya çıkması gibi benzer immünolojik fonksiyonlara sahiptirler (Ogra ve ark., 2001).

#### **1.4.2.2. Intranazal Bağışıklama Sonrası Bağışık Yanıtın Oluşması**

Antijen, nazal boşluğa uygulandıktan sonra nazal epitelle ilişkili foliküllerin üzerinde bulunan M hücreleri tarafından alınır ve antijen sunucu hücrelere taşınır (Vajdy ve O'Hagan, 2001). Bunun sonucunda plazma hücrelerinde IgA oluşumunu sağlayan B hücrelerine yardımcı olan T hücrelerinin aktivasyonu gerçekleşmiş olur. Intranazal bağışıklamadan sonra hem antikora dayalı hem de hücresel tipte bağışık yanıt oluşabilir (Davis, 2001). Partiküler yapıdaki antijenler ve mikropartiküllerin M hücreleri tarafından etkili şekilde alındığı kanıtlanmıştır (Vajdy ve O'Hagan, 2001).

İntranazal bağışıklama sonrası bağışık yanıtın oluşma adımları sırasıyla Şekil 1.6'da gösterilmektedir (Slütter ve ark., 2008).

Son araştırmalarda ise ortak mukozal bağışıklık sisteminin varlığı kanıtlanmıştır. Ortak mukozal bağışıklık sistemi sayesinde uygulama yapılan mukozal bölge dışındaki diğer mukozal bölgelerde de bir bağışık yanıt oluşabilmektedir. Antijenik uyarıdan sonra B ve T hücreleri lenf düğümlerine doğru göç ederler ve sonra farklılaşarak göğüs kanalı içinden dolaşıma geçerler. Neticede değişik mukozal yüzeylere ve ekzokrin bezlere yerleşirler (Saatçi ve Bozkır, 2003).



**Şekil 1.6.** Nazal bağışıklık sisteminin şematik gösterimi; (1) Mukoadhezyon, (2) M hücreleri tarafından antijen alımı, (3) Taşıma ve daha sonra dendritik hücrelerin aktivasyonu/olgunlaşması, (4) B hücre ve T hücre yanıtlarının uyarılması (Slütter ve ark., 2008)

### 1.5. Nazal Yolla Bağışıklamayı Artırmak Üzere Formülasyon Yaklaşımları

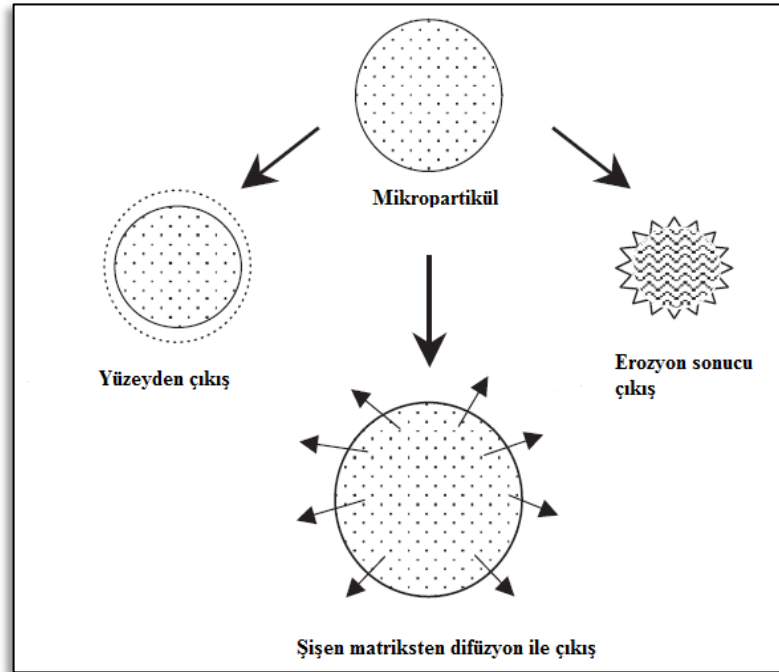
Nazal mukozanın zengin damar ağından oluşan epitel tabakasına sahip yüzey alanı içermesi nedeniyle ilaç ve aşı taşıyıcı sistemler için pek çok avantajı vardır. Ayrıca burun boşluğunda, gastrointestinal sistemde görülmesi olası enzimatik aktivite veya uç noktadaki pH'ya maruziyet gibi olumsuzluklar gözlenmemektedir (Somavarapu ve ark., 2005). Bununla birlikte çoğu peptid ve protein yapısındaki ilaçlar, basit çözeltilerle burna verildiklerinde bu ilaçların burun boşluğundaki biyoyararlanımları %1'in altında olmaktadır. Bu durumun en önemli nedeni epitel membrandan geçiş ile

mukosilyer klerens nedeniyle burun boşluğundan absorpsiyon için gerekli sürenin sınırlı olmasıdır (Soane ve ark., 1999). Bu olumsuzlukların üstesinden gelmek için biyoadhezif taşıyıcı sistemler ile partiküler sistemler geliştirilmiştir (Brayden ve Baird, 2001; Amidi ve ark., 2006).

### 1.5.1. Partiküler Taşıyıcı Sistemler

Partiküler sistemler; peptid ve protein yapısındaki ilaçların nazal mukozadan geçişlerini kolaylaştırmak, nazal boşlukta ilaçların retansiyon zamanını artırarak enzimatik aktiviteden korumak, nazal mukoza ve ilaç arasında sıkı bağlantılar kurmak, ilacın uygulandığı bölgede yüksek konsantrasyonda bulunmasını sağlamak ve epitel hücreler arasındaki tight junctionları açmak gibi birçok avantaj sunmaktadır (Ozsoy ve ark., 2009).

İlaçlar partiküler sistemlerden ya partikül yüzeyinden salınarak ya şişen polimer matriksten difüzyon ile ya da polimerlerin erozyonu sonucu açığa çıkmaktadırlar (Şekil 1.7) (Agnihotri ve ark., 2004).



Şekil 1.7. Partiküler sistemlerden çıkış mekanizmaları (Agnihotri ve ark., 2004)

Nazal ve sistemik etkileri istenen makromoleküllerin, hazırlanan nano- ve mikro-partiküler taşıyıcı sistemleri için genellikle parçalanabilir nişasta, dekstran, kitosan, mikrokristalin selüloz, hidroksipropil selüloz, hidroksipropil metil selüloz, karbomer ve balmumu benzeri mısır nişastasası ve jelatin polimerleri kullanılmaktadır (Ozsoy ve ark., 2009).

Nazal yolla uygulanan antijenler için özellikle kullanılan polimerler arasında FDA tarafından uygunluk almış poli (laktik asit) (PLA) ve poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) polimerleri bulunmaktadır. Bu polimerler mükemmel toksikolojik profilleri nedeniyle antijenik yapıdaki ilaçların nazal yolla uygulamaları için yaygın çalışılan polimerlerdendir. Biyolojik olarak parçalanabilir polimerlerle hazırlanan partiküler sistemlerin; antijenlerin seçici hedeflendirilmesi yoluyla bağışık yanıtın optimize edilmesi, kanıtlanmış güvenlik profiline sahip olmaları ve uzun periyotlarla antijenin kontrollü salımına olanak vermeleriyle rapel dozlara ihtiyacın ortadan kaldırılması gibi pek çok avantajı mevcuttur (Ozsoy ve ark., 2009; Rajapaksa ve Lo, 2010).

Mukozal yoldan verilişte partiküler formülasyonlara ait örnekler Çizelge 1.4'te sunulmaktadır.

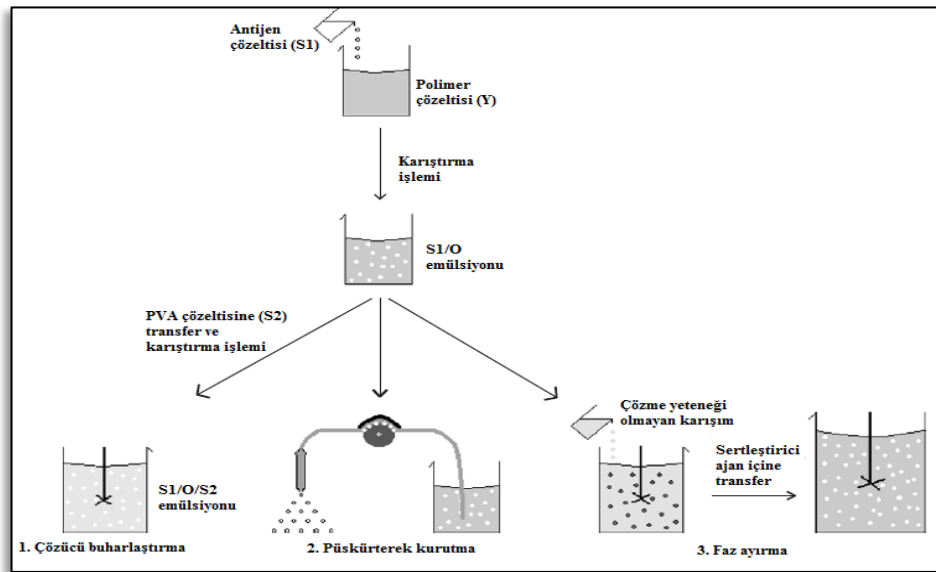
**Çizelge 1.4.** Mukozal yoldan verilişte partiküler formülasyon örnekleri

<b>Taşıyıcı sistem</b>	<b>Etkin Madde</b>	<b>Uygulama Yolu</b>	<b>İnsan/Hayvan Modeli</b>	<b>Sonuç</b>	<b>Kaynak</b>
Lipozom	Tetanoz toksoidi	Nazal	Tavşan	Intranazal uygulama mukozal bağışıklığı uyarmada etkili bir yol olarak bulunmuştur.	Tafaghodi ve ark., 2006
Çoklu emülsiyon	Kolera toksini	Nazal	Fare	Mukozal membranlarda ve sistemik dolaşımında hem kalitatif ve hem kantitatif olarak yüksek titrelerde antikor saptanmıştır.	Tomasi ve ark., 1997
Mikro- ve nanopartiküler sistem	Toksoplazma gondii tachyzoiteleri	Nazal	Koyun	Antikor seviyelerinde artış ile yüksek mukozal ve sistemik bağışıklık sağlanmıştır.	Stanley ve ark., 2004
Aljinat kaplı kitosan nanopartikülleri	Ovalbumin	Oral	Sıçan	Peyer plakları tarafından alımı artırılan nanopartiküllerin yüksek derecede koruma sağladığı görülmüştür.	Borges ve ark., 2006
Katyonik nanopartikül	Plazmid DNA	Nazal	Fare	Plazmid DNA kaplı nanopartiküller ile serum IgA ve IgG seviyelerinde önemli artışlar tespit edilmiştir.	Cui ve Mumper, 2002

### 1.5.2. Partikül Hazırlama Yöntemleri

Uygun enkapsülasyon işleminin seçilmesi formülasyon için istenen gereksinimlerin karşılanması açısından çok önemlidir. Enkapsülasyon işlemi esnasında ilaçların kimyasal stabiliteleri ve biyolojik aktiviteleri korunmalı, enkapsülasyon etkinliği ile üretim veriminin seri üretim için yeterince yüksek olması sağlanmalıdır. Üretilen partiküllerin, tasarlanan kullanım yoluna verilebilecek uygunluktaki partikül büyüklüğünde olmaları gerekmektedir. İlaçların çözünme hızı profilleri ise başlangıçta önemli derecede çıkışın olmadığı, tekrarlanabilir bir profile sahip olmalıdır. Partiküller ile hazırlanacak süspansiyonların homojen olabilmeleri için elde edilen partiküllerin serbest akış özelliği göstermesi gereklidir (Park ve ark., 2005).

Antijen yapısındaki ilaçların enkapsülasyon işlemi için kullanılan başlıca yöntemler; çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi, faz ayrışması (koaservasyon) yöntemi ve püskürterek kurutma yöntemidir (Yeo ve ark., 2001; Freitas ve ark., 2005; Xie ve ark., 2008; Bansode ve ark., 2010). Bu yöntemlerin her birinin, sulu antijen çözeltisinin organik polimer çözeltisinde emülsifiye edilmesiyle oluşturulan su/yağ dispersiyonuna ait ilk basamakları benzerdir (Şekil 1.8) (Tamber ve ark., 2005).

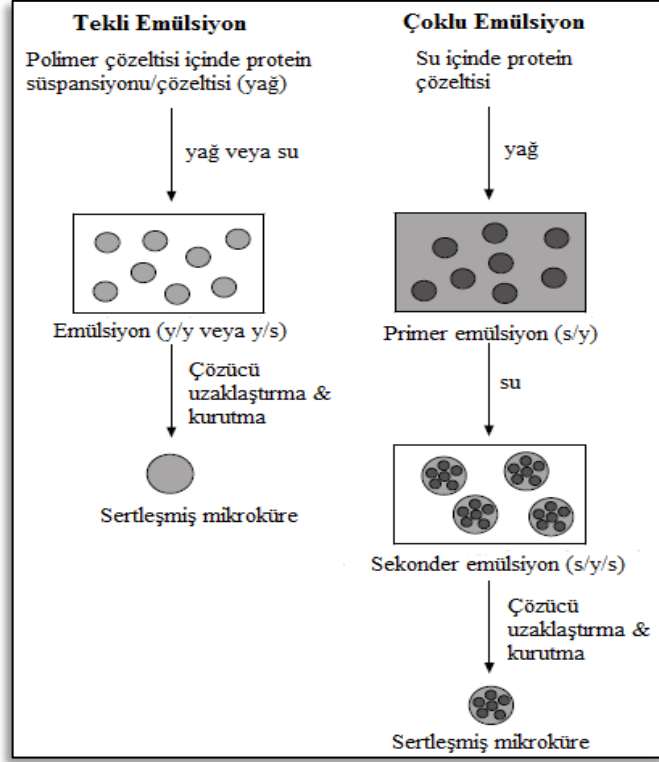


Şekil 1.8. Konvansiyonel enkapsülasyon yöntemleri (Tamber ve ark., 2005)



### 1.5.2.1. Çözücü Ekstraksiyon/Buharlaştırma Yöntemi

Çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi, çeşitli etkin maddelerin özellikle hidrofobik yapıda olanların enkapsülasyon işlemi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Peptit ve protein yapısındaki ilaçların enkapsülasyon işlemi için yağ/su (y/s), su/yağ (s/y) ve su/yağ/su (s/y/s) emülsifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Partiküler sistemlerin hazırlanması sırasında üretilen emülsiyonların sayısına bağlı olarak çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi tekli emülsiyon veya çoklu emülsiyon olmak üzere ikiye ayrılabilir (Şekil 1.9) (Yeo ve ark., 2001).



**Şekil 1.9.** Çözücü buharlaştırma yöntemiyle tekli ve çoklu emülsiyon elde edilmesi (Yeo ve ark., 2001)

Çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi ile partiküler sistemlerin hazırlanması dört ana basamağı içerir:

- Matris materyalini içeren organik bir çözücünün içinde etkin madde bileşeninin çözülmesi veya dispersiyonu,

- ii. Elde edilen organik faz ile karışmayan sürekli bir faz (genellikle sulu faz) arasında emülsifikasyon;
- iii. İsteğe bağlı olarak çözücü buharlaştırmanın eşlik ettiği, çözücünün dispers fazdan sürekli faz aracılığıyla ekstraksiyonu;
- iv. Mikrokürelerin toplanması ve kurutulması (Freitas ve ark., 2005).

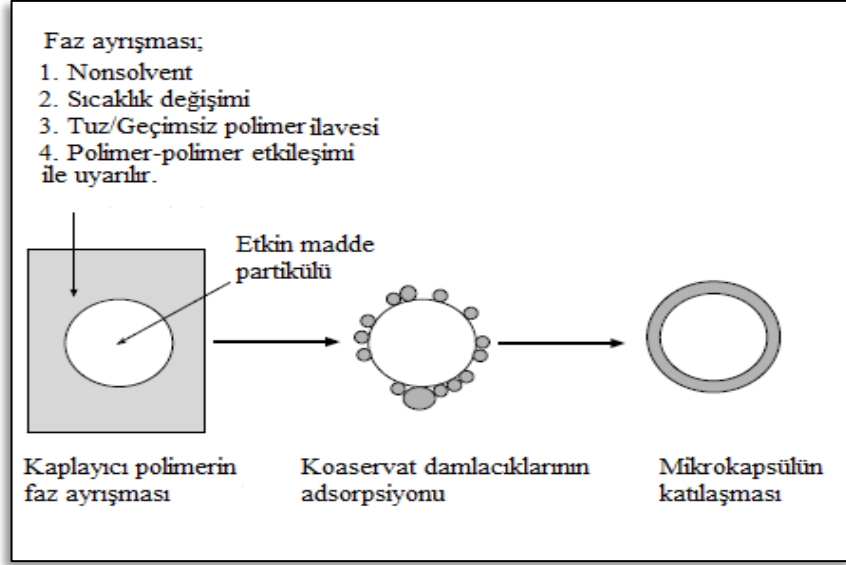
Çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi ile amin bazlı etkin maddeler (Maulding ve ark., 1986), proteinler (Conway ve Alpar, 1996), peptidler (Herrmann ve Bodmeier, 1995) ve aşılarda (Stureson ve ark., 1996) gibi suda çözünürlüğü çok iyi olan bileşiklerin enkapsüle edilebilmeleri sağlanmıştır.

#### **1.5.2.2. Faz Ayrışması (Koaservasyon) Yöntemi**

Faz ayrışması (koaservasyon) yöntemi organik çözücüdeki polimer çözeltisine üçüncü bir bileşiğin ilavesiyle polimerin çözünürlüğünün azaltılmasına dayanır. Koaservasyon yöntemi ile belirli bir noktada koaservat içeren polimer fazı ile polimer içine ilave edilen süpernatant fazı olmak üzere iki farklı faz elde edilmektedir. Polimer çözeltisi içinde çözülen veya disperse edilen etkin madde koaservat ile kaplanmaktadır. Koaservasyon işlemi üç adımdan oluşmaktadır (Jain, 2000):

- i. Kaplayıcı polimer çözeltisinin faz ayrışması,
- ii. Etkin madde partiküllerine koaservatın adsorpsiyonu,
- iii. Mikropartiküllerin katılaşması (Şekil 1.10) (Yeo ve ark., 2001).

Koaservasyon işlemi; faz ayrışmasını tetikleyen nonsolvent ilavesi, sıcaklık değişimi, geçimsiz polimer veya tuz eklenmesi ile polimer-polimer etkileşimi (kompleks koaservasyon) gibi tekniklere göre sınıflandırılabilir (Yeo ve ark., 2001).



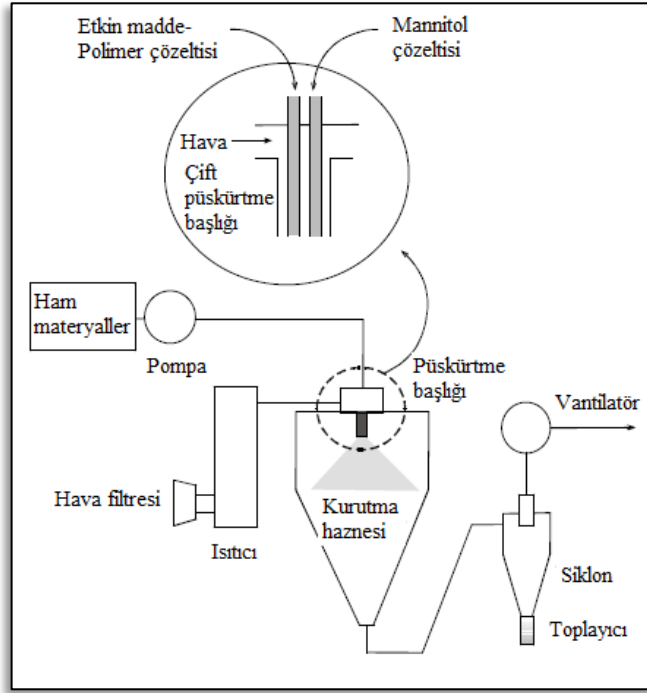
**Şekil 1.10.** Koaservasyon yöntemiyle hazırlanan mikrokapsülün şematik gösterimi (Yeo ve ark., 2001)

### 1.5.2.3. Püskürterek Kurutma Yöntemi

Diğer yöntemlere göre püskürterek kurutma yöntemi birçok avantaja sahiptir. Koaservasyon yönteminde üretilen partiküller toplanma eğiliminde olduklarından seri üretimleri zordur. Ayrıca koaservasyon yönteminde büyük miktarlarda organik çözücüye ihtiyaç duyulduğundan elde edilen final partiküllerden organik çözücü kalıntısını uzaklaştırmak güçtür. Öte yandan çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yönteminde birçok basamak olması, sıcaklık kontrolünün ve iç sulu fazın (s/y) vizkositesinin kontrolünün zor olması, yüksek konsantrasyondaki hidrofobik etkin maddelerin enkapsülasyonlarının güç olması gibi dezavantajlar mevcuttur. Püskürterek kurutma yöntemi ise diğer yöntemlere göre nispeten daha hafif koşullar gerektiren, partikül büyüklüğünün kontrol edilebildiği, polimer ve etkin maddenin çözünürlüğüne daha az bağlı olan, tekrarlanabilir, hızlı, kullanışlı ve büyük ölçekli üretim için uygun bir yöntemdir (Jain, 2000; Park ve ark., 2005).

Püskürterek kurutma yöntemi için hidrofilik veya hidrofobik polimer uygun bir çözücü içinde çözülür. Etkin madde bu çözücünün içinde çözülebildiği veya

süspende edilebildiği gibi polimer çözeltisi içinde de emülsifiye edilebilir. Karışım bir püskürtme başlığı ile cihaz içine püskürtülür ve daha sonra alttaki toplayıcı içinde çöktürülmüş katı partiküller alınır. Bu konvansiyonel metotla üretilen partiküller hem toplanma eğilimi gösterdiklerinden hem de cihazın duvarlarına yapıştıklarından çift püskürtme başlığı taşıyan ve antiadherent olarak mannitol çözeltisinin kullanıldığı sistemler geliştirilmiştir (Şekil 1.11) (Yeo ve ark., 2001).



**Şekil 1.11.** Partiküler sistemin püskürterek kurutma yöntemiyle hazırlanmasına ait şematik gösterimi (Yeo ve ark., 2001)

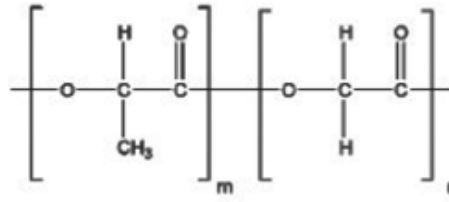
### 1.5.3. Çalışmamızda Mikropartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Alifatik poliesterler, taşıdıkları biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir olma özellikleri nedeniyle ilaç taşıyıcı sistem olarak geniş çaplı kullanıma sahiptirler. Bu sınıf polimerlerin parçalanması kendi yapılarında bulunan ester bağlarının sulu ortamda kopmasıyla meydana gelmektedir. Enzimatik aktivitenin parçalanmadaki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır (Park ve ark., 2005).

### 1.5.3.1. Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)

Polilaktik asit (PLA) polimeri optik olarak aktif stereoregüler form L-PLA ile optik olarak aktif olmayan rasemik form D,L-PLA formunda bulunabilir. D,L-PLA polimerinin amorf halde bulunması ve bu nedenle etkin maddenin polimer matriks içinde daha homojen dağılımının elde edilebilmesinden dolayı kullanımda bu polimer daha çok tercih edilmektedir.

Poliglikolik asit (PGA) polimeri ise PLA'daki metil yan gruplarını içermemesi nedeniyle yüksek derecede kristal yapıdadır. Laktik asit glikolik asite göre çok daha fazla hidrofobik özellikte olmasından dolayı laktid zengini PLGA kopolimerleri daha az hidrofilik, daha az su çekebilen ve daha yavaş parçalanabilen özelliindedir (Jain, 2000).



**Şekil 1.12.** PLGA'nın yapısal formülü (The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009)

PLGA polimeri hidrolize uğradığı zaman, sonunda karbondioksite ve suya dönüşecek olan laktik asit ve glikolik asit monomerik asitlerine parçalanır. PLGA polimerinin parçalanma hızı enkapsüle haldeki etkin maddenin salım hızını belirlemek için kritik önem taşır ve parçalanma hızı polimerin kristallik derecesi, hidrofobisitesi ve molekül ağırlığına bağlıdır. Yapılan son çalışmalarla, PLGA kopolimerlerinin özellikle polimerin hidrofobisitesine ve asidik parçalanma ürünlerinin varlığına bağlı olarak stabiliteyi ve etkin maddelerin (örn., peptid ve proteinler) biyolojik aktivitelerini önemli derecede etkilediği gösterilmiştir (Park ve ark., 2005).

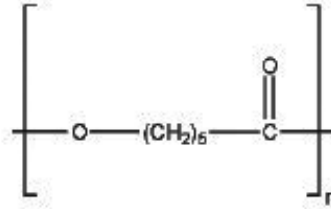
Çalışmamızda Boehringer Ingelheim firmasından temin edilen 50:50 laktik asit:glikolik asit kopolimer oranına sahip PLGA kullanılmıştır.

### 1.5.3.2. Poli-ε-kaprolakton (PCL)

Poli-ε-kaprolakton (PCL) polimeri biyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir ve çok düşük camsı geçiş sıcaklığına sahip yarı kristal yapıda olan bir polimerdir. PCL polimeri yavaş parçalanması nedeniyle uzun süreli salım istenen sistemler için idealdir.

PCL'nin kristal yapısına bağlı olan camsı geçiş sıcaklığı  $-60^{\circ}\text{C}$  iken erime noktası  $59-64^{\circ}\text{C}$ 'dir. PCL polimeri, etkin maddenin partiküler sistemden çıkış hızını ayarlayabilmek için selüloz propiyonat, selüloz asetat butirat, polilaktik asit ve polilaktik asit-ko-glikolik asit gibi polimerlerle kombine halde kullanılabilir.

PCL polimerleri, küçük etkin madde molekülleri için yüksek oranda geçirgenlik göstermesi, bir yıldan uzun süreler için etkin madde salımına olanak vermesi, diğer polimerlerle karışıma yatkın olması, diğer polimerlere göre ucuz olması gibi birçok avantaja sahiptir (Youan ve ark., 1999; Sinha ve ark., 2004).



**Şekil 1.13.** PCL'nin yapısal formülü (The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009)

PCL polimerinin parçalanma hızı polilaktik asit ve poliglikolik asit gibi polimerlerle oluşturduğu kopolimerlerin oluşumu ile artabilir. PCL polimerinin parçalanması iki aşamada olmaktadır. Birinci aşamada ester bağlarının toplu hidrolizi yoluyla 5000 molekül ağırlığı kadar bir azalma meydana gelir. İkinci aşamada ise sürekli zincir bölünmeleri ile ağırlık kaybının başlaması söz konusudur (Sinha ve ark., 2004; Park ve ark., 2005).

Çalışmamızda Sigma firmasından temin edilen poli-ε-kaprolakton (Ma: 14kDa) ile poli-ε-kaprolakton (Ma: 70-90kDa) polimerleri kullanılmıştır.

### 1.6. Polimer Matrislerden Etkin Madde Salım Mekanizmaları

Hazırlanan formülasyonların uygun çözünme hızı yöntemleriyle test edilmesi sonucunda elde edilen veriler çeşitli kinetiklere uygunlukları yönünden incelenmektedir. Elde edilen kinetik parametreler formülasyonların birbirleri ile karşılaştırılmaları ve davranışlarının açıklanabilmesi için kullanılmaktadır.

Matris tipi preparatlardan etkin madde salımı genellikle difüzyon mekanizmasıyla olmaktadır. Fick kuralları ile açıklanan difüzyon olayında esas, etkin madde partiküllerinin çok yoğun ortamdan az yoğun ortama geçişidir. İki taraf arasındaki konsantrasyon farkı sıfır olunca difüzyon işlemi tamamlanmış olmaktadır. Fick'e göre maddenin difüze olma hızı aşağıdaki eşitlikle ifade edilmiştir. Bu eşitlik Fick'in difüzyon ile ilgili 1. kuralı olarak bilinmektedir.

**Denklem 1.1.**  $dQ/dt = - D A dc/dx$

$dQ/dt$  :Etkin maddenin difüze olma hızı (mg/s)

$D$  :Etkin maddenin difüzyon katsayısı ( $cm^2/s$ )

$A$  :Etkin maddenin difüze olduğu yüzeyin kesit alanı ( $cm^2$ )

$dc/dx$  :Etkin maddenin difüze olduğu kalınlığa göre konsantrasyon farkı ( $mg/cm^2$ )

Denklemden  $D$  ile gösterilen difüzyon katsayısı Stokes-Einstein eşitliği ile belirlenmektedir.

**Denklem 1.2.**  $D = RT/6\pi\eta N$

Denklemden;

$D$  :Difüzyon katsayısı ( $cm^2/s$ )

$N$  :Avogadro sayısı

$r$  :Difüze olan partikülün yarıçapı

$T$  :Mutlak sıcaklık ( $^{\circ}K$ )

- $\eta$  :Ortamın viskozluğu (cps)  
 R :Molar gaz sabiti (1,987 cal.mol<sup>-1</sup>.derece<sup>-1</sup>)

Denklemden görüldüğü gibi difüzyon katsayısı, maddenin partikül büyüklüğü ve ortamın viskozluğu ile ters, sıcaklık ile doğru orantılıdır.

Herhangi bir t anında difüze olan madde miktarını bulmak için Fick 1 denkleminin integrali alınır aşağıdaki denklem elde edilir.

**Denklem 1.3.**  $Q = D/XA(C_1 - C_2)t$

Denklemden;

- Q : Birim yüzeyden difüze olan yığılmalı etkin madde miktarı (mg/cm<sup>2</sup>)  
 C<sub>1</sub> : Etkin maddenin difüzyona başladığı yerdeki konsantrasyonu (mg/ml)  
 C<sub>2</sub> : Etkin maddenin çözünme ortamındaki konsantrasyonu (mg/ml)  
 X : Etkin maddenin kat ettiği uzaklık (cm)  
 D : Etkin maddenin difüzyon katsayısı (cm<sup>2</sup>/s)  
 A : Difüzyonun olduğu kesitin yüzey alanı (cm<sup>2</sup>) (Esirgen, 2007).

### 1.6.1. Sıfır Derece Kinetik

Sıfır derece hız ifadesi aşağıdaki eşitlikle verilmektedir.

**Denklem 1.4.**  $C = C_0 - k_0t$

- C : t anında çözünmeden kalan etkin madde miktarı  
 C<sub>0</sub> : Başlangıçtaki etkin madde miktarı  
 k<sub>0</sub> : Sıfır derece çözünme hız sabiti  
 t : Zaman



Sıfır derece kinetikte t'ye karşı C değerleri grafiğe geçirildiğinde eğimi  $k_0$  olan bir doğru elde edilmektedir. Bu kinetiğe göre dozaj formundan her bir zaman aralığında çözeltiye geçen etkin madde miktarı sabit olmaktadır. Salım hızının değiştirildiği pek çok dozaj formunda özellikle kontrollü salım / uzatılmış salım yapan formlarda asıl olarak bu tip çözünme kinetiğine uyum sağlanması hedeflenmektedir (Bozkır ve ark., 2007).

### 1.6.2. Birinci Derece Kinetik

Bu kinetiğe göre hız ifadesi aşağıdaki eşitlikle verilmektedir.

**Denklem 1.5.**  $\ln C = \ln C_0 - k_1 t$

- C : t anında çözünmeden kalan etkin madde miktarı  
 C<sub>0</sub> : Başlangıçtaki etkin madde miktarı  
 k<sub>1</sub> : Birinci derece çözünme hız sabiti  
 t : Zaman

Birinci derece kinetikte t'ye karşı lnC değerleri grafiğe geçirildiğinde eğimi  $k_1$  olan bir doğru elde edilmektedir. Birinci derece kinetikte her zaman aralığında dozaj formunun içinde kalan etkin madde miktarı ile orantılı etkin madde salımı olur. Klasik dozaj formlarının çoğu bu çözünme mekanizmasını göstermekte ve uzatılmış salım yapan formülasyonlar da bu tip çözünme kinetiğine uyum sağlamaktadır (Costa ve Lobo, 2003; Bozkır ve ark., 2007).

### 1.6.3. Higuchi Eşitliği

Farmasötik matrislerden ilaç salımını tanımlamak üzere en yaygın kullanılan modeldir. Etkin madde salımı değiştirilmiş dozaj formlarının çoğu bir matris sistemi şeklindedir. Eşitlik aşağıdaki şekilde uygulanmaktadır.

**Denklem 1.6.**  $Q = k_h t^{1/2}$

Q : t zamanında salınan etkin madde miktarı

$k_h$  : Higuchi salım hız sabiti

t : Zaman

Denklemden de görüldüğü gibi herhangi bir t anında salınan etkin madde miktarı zamanın karekökü ile orantılıdır (Costa ve Lobo, 2003; Bozkır ve ark., 2007).

## 1.7. Difteri

Difteri, *Corynebacterium diphtheriae* tarafından üretilen toksin nedeniyle klinik belirtilere neden olan bakteriyel bir hastalıktır (Isaka ve ark., 2000). *Corynebacterium diphtheriae* basili 1883 yılında Klebs ve 1884 yılında Loeffler tarafından tanımlanmış aynı zamanda patojenisitesinden bahsedilmiştir (Nandi ve ark., 2003). *Corynebacterium diphtheriae* düzensiz boyanan, sporsuz, hareketsiz, gram pozitif bir basildir (Weisberg, 2007). Bu hastalık, enfeksiyon bölgesinde bakterinin tipik kolonizasyonu ve pseudomembran oluşturması yanında ürettiği potent bir toksin, difteri toksini ile tipik sistemik toksemi karakterindedir (Özcengiz ve ark., 1998). Difteriye karşı tam bağışıklama için birden fazla doz gerekmektedir. Ancak çok dozlu aşılama programları artan maliyet ve düşük hasta uyuncu gibi dezavantajlar taşımaktadır (Diwan ve ark., 1997).

### 1.7.1. Difteri Toksini

*Corynebacterium diphtheriae* basili tarafından üretilen karakteristik ekzotoksin, hem basilin inokülasyon yerinde hem de kan dolaşımında absorbe edilir ve hücrel hasara neden olarak normal protein sentezini önler ve ölüme yol açar (Nandi ve ark., 2003). Bu nedenle bu hastalığı önlemek için toksini nötralize eden, difteri toksoidi ile

aşılama ile uyarılan antikorların varlığı çok önemlidir (Isaka ve ark., 2000). Difteri toksini tek zincir (58,3 kDa) halinde bulunabileceği gibi birbirlerine disülfid bağlarıyla bağlı A (21,0 kDa) ve B (37,3 kDa) fragmanları şeklinde de bulunabilir (Johansen ve ark., 1998; Metz ve ark., 2007).

### **1.7.2. Difteri Toksoidinin Hazırlanması**

Toksoid; antitoksin oluşturabilme özelliği olup, toksik olmayan bir yapıya sahip, modifiye bakteri toksinleridir (Tabak, 1998). Difteri toksoidi (DT) en başarılı aşılardan biri olmuştur ve çoğu ülkede difteri hastalığını yok etmiştir. Difteri toksoidi difteri toksininden formaldehit muamelesiyle elde edilir. Elde edilen toksoid, toksik olmamakla beraber immünojenik özelliğini de korumaktadır. Difteri toksoidinin kalitesi esas olarak detoksifikasyon işlemine bağlıdır. Bu işlemde formaldehit konsantrasyonu, tepkime süresi, sıcaklık ve matriksin bileşimi en önemli işlem parametreleridir. Difteri toksoid aşısının aktivite ve güvenilirlik testlerini içeren rutin kalite testleri otorite tarafından tayin edilmelidir (Metz ve ark., 2003).

### **1.7.3. Difteri Toksoidi ile Aşılama ve Beraberindeki Sorunlar**

Yüksek endemik özellik gösteren difteri hastalığı aşılamadan önce önemli bir sağlık sorunu olarak bulunuyordu. Difteri toksoid aşısı 1940 ve 1950'li yıllarda Batı Avrupa'da rutin aşılama programlarına dahil edilmiştir ve 1950 ila 1960'larda çocukluk dönemi aşılama programlarının içine sokulmuştur (Cameron ve ark., 2007). Bununla birlikte Avrupa nüfusunun büyük bir oranında difteri antitoksin titresinin 0,01 IU/ml koruma düzeyinin altında olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle bazı Avrupa ülkelerinde 1980 ve 1990'larda difteri hastalığı tekrar canlanmıştır (McNeela ve ark., 2001). Ayrıca son on yılda bazı ülkelerde difteriyle ilgili salgın hastalık raporlarının tekrar gündeme gelmesi endişe yaratmıştır. Difterinin sıklık pikinin çocuklardan orta yaş grubuna doğru eğilimde olduğu görülmüştür. Aşının uzun süreli immünolojik hafıza oluşturma yeteneğinin zayıf olması nedeniyle aralıklı olarak rapel dozların

uygulanması gerekmektedir. Kalıcı immünolojik hafıza oluşumunun sağlanamamasının solunum yolundaki lokal salgısal bağışıklığın uyarılamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca difteri toksoid aşısında kullanılan Alum adjuvanı ile IgE ile ilişkili yan etkilerin bağlantılı olduğunun anlaşılmasıyla da alternatif adjuvanların araştırılması ihtiyacı doğmuştur (Aguila ve ark., 2006).

Difteri hastalığını geçiren bireylerde dolaşan antitoksin düzeyleri hakkında gözlemler ve bir takım araştırmalar takip eden sayfalarda verilen, difteriye karşı antitoksin düzeyleri üzerine yaygın olarak kabul edilmiş yorumlar ile sonuçlanmıştır (Çizelge 1.5).

**Çizelge 1.5.** Difteriye karşı antitoksin düzeyleri ve bağışıklık (WHO The Immünological Basis for İmmünization Series/Module 2: Diphtheria, 2003; WHO Weekly epidemiological record, 2006)

<b>Antitoksin düzeyi</b>	<b>Yorum</b>
<0.01 IU/ml	Birey DUYARLI
0.01 IU/ml	En düşük düzey dolaşan antitoksin; KISMEN koruma sağlar.
0.01-0.09 IU/ml	Bu düzeyde antitoksin KISMEN koruma sağlar.
0.1 IU/ml	KORUYUCU antitoksin düzeyi
≥1.0 IU/ml	UZUN DÖNEM KORUYUCU antitoksin düzeyi

#### **1.7.4. Difteri Toksoidinin Mevcut Preparatları ve Gelecekteki Yaklaşımlar**

Difteri, tetanoz ve boğmaca için kullanılan geleneksel aşılar intramüsküler enjeksiyonla parenteral yolla uygulanmaktadır. Ancak mukozal yolla bağışıklama hem sistemik hem mukozal bağışıklığı uyardığından parenteral yola alternatif olarak düşünülmektedir. Ayrıca parenteral yola göre daha kolay veriliş yolu olan mukozal yolla aşılarda uygulanmasıyla yan etkiler en aza indirilmektedir. Bu nedenle mukozal

başıklama, difteride olduğu gibi aşılamanın belirli aralıklarla uygulanmasının gerekli olduğu durumlarda dikkate değer öneme sahiptir (McNeela ve ark., 2001).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereçler

#### 2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

2-merkapt etanol	Sigma
Akrilamid	Sigma
Amonyum sülfat	Merck
Amonyum persülfat	Sigma
Asetik asit	Merck
Bakır (II) sülfat pentahidrat	Riedel-de Haén
Bikininik asit (BCA)	Fluka
Bromfenol mavisi (pH 3-4,6)	Merck
Coomassie Brilliant Blue G (CBBG-250)	Sigma Aldrich
D(-) Mannitol	Merck
Difteri standardı	Japon Lot
Difteri toksoidi (1900 µg/ml, 1300 Lf/ml)	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı
Diklorometan (%99,8)	Sigma Aldrich
Disodyum hidrojen fosfat	Merck
Etanol (Absolut)	Riedel-de Haén
Formaldehid	Sigma Aldrich
Gliserol	Aklar Kimya
Glisin	Sigma
Glutaraldehit (%25)	Sigma Aldrich
Gümüş nitrat	Sigma Aldrich
Hidroklorik asit (%37)	Merck
İzopropanol	Merck
Mannitol (Parlitol 50C)	Roquette-Pharma
Metanol (%99,9)	Sigma Aldrich
N,N' metil-bis-akrilamid	Sigma
N-N'-N'-N' tetrametil etilendiamin (TEMED)	Sigma
Ovalbumin	Sigma

Pluronic F68 (Ort. M.A.: 8400)	Sigma
Pluronic F127 (Ort. M.A.: 12500)	Sigma
Poli-laktik-ko-glikolik asitleri (PLGA)	Boehringer Ingelheim
Polivinilalkol (87-89% hidrolize, Ma 13.000-23.000)	Sigma
Poli-(ε-kaprolakton) (M.A. 14 kDa)	Sigma
Poli-(ε- kaprolakton) (M.A. 70-90 kDa)	Sigma
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck
Sitrik asit monohidrat	Merck
Sodyum asetat·3H <sub>2</sub> O	Merck
Sodyum azid	Merck
Sodyum dodesil sülfat	Merck
Sodyum hidrojen karbonat	Merck
Sodyum hidroksit	Kimetsan
Sodyum karbonat monohidrat	Merck
Sodyum klorür	Merck
Sodyum tartarat dihidrat	Sigma
Trizma baz (Tris)	Sigma

**Guinea Pig IgG Elisa Kiti:**

Immünology Consultants Laboratory

- Sulandırıcı konsantrat
- Yıkama çözeltisi konsantratu
- Enzim-antikor konjugatu
- Kromojen-substrat çözeltisi
- Durdurma çözeltisi
- Guinea pig IgG standartları

### 2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Cam malzeme	İldam
Çalkalayıcı su banyosu	Memmert
Çoklu manyetik karıştırıcı	IKA Werke RT10 power
Derin dondurucu	Heto
Dikey elektroforez sistemi	Thermo EC 120
Elektrikli terazi	Sartorius BL 210S
Etüv	Heraus
Filtre 0,45 µm	Sartorius
Homojenizatör	T25 Basic Ika® Labortechnik
Isıtıcılı su banyosu	Hake E 12
Karbondioksitli inkübatör	Sanyo
Liyofilizatör	Holten Model 1.2
Manyetik karıştırıcı	RT 10 Power Ika® -Werke
Mekanik karıştırıcı	Ika® Eurostar
Mikropipet (1-10 µl)	Rainin
Mikropipet (10-100 µl)	Rainin
Mikropipet (100-1000 µl)	Biohit
Mikropipet ucu	Greiner Bio-One
Mikroplak (96 kuyucuklu)	Biofil
Mikroplak okuyucusu	MDS Spektra Max 190
Molekül ağırlığı belirteci (10-250kDa)	The Thermo Scientific
Optik mikroskop	Leica DM 4000B
Partikül büyüklüğü ölçüm cihazı	Sympatec laser diffraction particle sizer
pH metre	SenTix 82
Santrifüj	Sigma
Sonikatör	Bandelin
Spektrofotometre	Pharmacia Biotech Ultrospec 3000
Su banyosu	Nüve BM 101
Vorteks karıştırıcı	Ika® Vortex Genius 3
Grafik programı	GraphPad Instant 3,0
İstatistik programı	SPSS 11,5 for Windows



## 2.2. Yöntemler

### 2.2.1. Difteri Toksoidinin Özelliklerinin Belirlenmesi

#### 2.2.1.1. Protein Miktar Tayini

Schleif ve Wensink tarafından geliştirilen bir denklem ile 280 nm ve 260 nm'de ölçülen absorbans değerleriyle protein miktar tayini hesaplanabilmektedir. 280 nm'deki absorbans değerleri protein miktarını kabaca vermektedir. Ancak nükleik asitlerin 260 nm'de maksimum absorbans vermesi nedeniyle nükleik asit artıkları ile kontamine olmuş ekstrenin gerçek protein miktarını hesaplamada doğru sonuç veren bir yöntemdir (Stoscheck, 1990).

**Denklem 2.1.**  $C = 1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260}$

C= Protein konsantrasyonu (mg/ml)

$A_{280}$ = 280 nm'deki absorbans

$A_{260}$ = 260 nm'deki absorbans

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı'ndan temin edilen difteri toksoidinin protein miktar tayini için Schleif ve Wensink tarafından geliştirilen Denklem 2.1'de verilen formül kullanılmış ve 280 nm ila 260 nm'de ölçülen absorbanslar ölçülerek protein miktarı hesaplanmıştır.

#### 2.2.1.2. Lf Değerinin Belirlenmesi

Toksin konsantrasyonu çoğunlukla flokülasyon değeri (Lf birimler) olarak ifade edilir (Collier, 1975). 1 ünite standart antitoksini floküle eden toksoid miktarı 1

Lf'dir. Tüm aşı üreticileri, toksoidlerin Lf değerlerini belirlemede, orijinal Ramon flokülasyon testini kullanır (Wharton ve Vitek, 2004; Preneta-Blanc ve ark., 2008). Bu yöntem birçok farklı antikor içeren standart antitoksin içindeki toksine spesifik bağlanabilen antikor ile toksininin kompleks oluşturması ve bu kompleks ile oluşan flokülasyonun gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Kompleksin oluşup flokülasyonun ilk görüldüğü tüp örnekteki antijen miktarı ile standarttaki antikor miktarının eşit olduğu tüptür. Genellikle bu tüpün Lf değeri örneğin Lf değeri olarak kabul edilir (Eaton, 1936; Lyng, 1990).

Difteri toksoidinin Lf değerinin kontrol edilmesi için öncelikle difteri toksoidi serum fizyolojik ile 1:9 oranında seyreltilmiştir. Difteri toksoidinin önceden bilinen 1300 Lf/ml değerinin bu seyreltme ile 130 Lf/ml olması beklenmiştir. Bu amaçla 130 Lf/ml değerini kapsayan bir çizelge hazırlanmıştır (Çizelge 2.1). Farmakope gereklilikleri uyarınca mililitresinde 100 Lf içeren standart antitoksin kullanılmıştır. Bu çalışma standardı gittikçe artan konsantrasyonlarda flokülasyon tüplerine (7 cm × 1 cm) konulmuş ve sabit hacme ulaşmak için 1 ml'ye serum fizyolojik ile tamamlanmıştır. Her bir tüpe seyreltilmiş difteri toksoidinden 0,5 µl ilave edilmiş ve tüpler 50°C'deki su banyosuna alınarak belirli aralıklarla flokülasyonun oluşup oluşmadığı kontrol edilmek koşuluyla bekletilmiştir. Flokülasyonun oluştuğu ilk tüp, antijen miktarına en yakın antitoksin miktarını içeren tüptür (Şekil 2.1). Birçok durumda bu tüpün Lf içeriği, örneğin Lf değeri olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda difteri toksoidi serum fizyolojik ile seyreltildiğinden ilk flokülasyonun gözlemlendiği tüpün Lf değeri 11 ile çarpılmıştır (WHO, 1997a).



**Şekil 2.1.** Standart difteri antitoksini ile difteri toksoidi arasında gözlemlenen flokülasyon

Çizelge 2.1. Difteri toksoidine ait Lf değerinin kontrol edilmesi

Tüp Numarası	Antitoksin Miktarı (Lf/ml)	½ Oranında Çalışılan Antitoksin Miktarı(Lf/ml)	Antitoksin Miktarı(ml)	Serum fizyolojik miktarı(ml)	Difteri Toksoidi (ml)
1	40	20	0,20	0,80	0,5
2	50	25	0,25	0,75	0,5
3	60	30	0,30	0,70	0,5
4	70	35	0,35	0,65	0,5
5	80	40	0,40	0,60	0,5
6	90	45	0,45	0,55	0,5
7	100	50	0,50	0,50	0,5
8	110	55	0,55	0,45	0,5
9	120	60	0,60	0,40	0,5
10	130	65	0,65	0,35	0,5
11	140	70	0,70	0,30	0,5
12	150	75	0,75	0,25	0,5
13	160	80	0,80	0,20	0,5

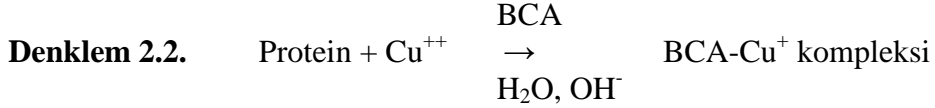
### 2.2.1.3. Difteri Toksoidinin Spektrumu

pH 7,4 PBS içinde hazırlanmış difteri toksoidinin konsantrasyonu bilinen çözeltilerinin mikrobikininik asit (mikroBCA) yöntemi ile 350-750 nm aralığında okunan absorbansları ile mikropalak okuyucusunda spektrumları çizilmiş ve difteri toksoidinin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu ( $\lambda_{maks}$ ) tespit edilmiştir.

### 2.2.1.4. Mikrobikininik Asit (MikroBCA) Analiz Yöntemi Kullanılarak Difteri Toksoidinin Standart Doğru Denkleminin Hesaplanması

Bikininik asit yöntemi, peptid ve protein yapısındaki maddelerin miktar tayininde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Yöntem  $Cu^{++}$  iyonlarının, proteinin peptid bağı ile etkileşime girmesi ve  $Cu^+$  iyonlarına indirgenmesi ve  $Cu^+$  iyonunun bikininik asit ile renkli kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır (USP 30, 2007). Bikininik asidin sodyum tuzunun, alkali ortamda bakır iyonu ( $Cu^+$ ) ile koyu mor renkte

kompleks oluşturma yeteneğine sahip, stabil ve suda çözünebilen bir madde olması nedeniyle sulu protein çözeltisi spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Çok düşük miktarların tayininde daha duyarlı olan mikrobikininik asit (mikroBCA) yöntemi tercih edilmektedir. BCA yöntemi ile 100-1200 µg/ml'ye kadar hassaslıkta ölçüm yapılırken, mikroBCA yöntemi ile 0,5-250 µg/ml'ye kadar duyarlılıkta toplam protein miktar tayini yapılabilmektedir (Smith ve ark., 1985; Walker, 2002a).



Reajan A+B:

Sodyum karbonat monohidrat-----1 g  
Sodyum Tartarat-----0,2 g  
BCA-----0,5 g

Sodyum karbonat monohidrat ve sodyum tartarat 15-20 ml distile suda çözülür. Üzerine BCA ilave edilir ve 40 °C'de yarım saat karıştırılır. 25 ml'ye distile su ile tamamlanır. Bu çözelti renkli cam şişelerde oda sıcaklığında saklanır.

Reajan C:

Bakır sülfat (5×H<sub>2</sub>O)-----4 g  
Distile su-----ym-----100 mL

Kalibrasyon denklemini elde edebilmek için difteri toksoidinin pH 7,4 tamponu içindeki konsantrasyonu bilinen bir seri çözeltisi hazırlanmış ve mikropalak okuyucusunda absorbansları ölçülmüştür. Bu yöntem için öncelikle difteri toksoidinin stok antijen çözeltisinden (190 µg/ml) hareketle seyreltmeler yapılarak 6-42 µg/ml arasında yedi dilüsyonu hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlar 150'şer µl olacak şekilde mikropalaktaki kuyucuklara üç paralel olacak şekilde uygulanmıştır. Ardından her bir kuyucuğa Reajan A+B ile Reajan C (50:1) karışımından yine 150 µl ilave edilmiştir. Daha sonra bu mikropalak 60°C'lik etüvde 1 saat 20 dakika inkübe edilmiş ve ardından yarım saat oda sıcaklığında soğuması için beklenmiştir.

Mikroplak okuyucusunda (Molecular Devices, Spectra Max 190) 560 nm'de dilüsyonların absorbanları ölçülmüştür. Elde edilen absorbanlar konsantrasyona karşı grafiğe geçirilip kalibrasyon denklemi hesaplanmıştır. Bu denklemden faydalanarak örneklerin içerdiği toplam protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

#### **2.2.1.5. Difteri Toksoidinin Miktar Tayini için MikroBikinoninik Asit (MikroBCA) Yönteminin Validasyonu**

Analitik bir yöntemin validasyonu, amaçlanan analitik uygulamaların istenen koşullara uygunluğunun laboratuvar çalışmalarıyla belirlendiği bir işlemdir. Analitik parametreler ile performans karakteristikleri tanımlanır. Miktar tayinlerinin validasyonunda kullanılan analitik parametreler şunlardır (ICH Q2(R1)):

1. Doğruluk
2. Kesinlik
3. Özgünlük
4. Gözlenebilme sınırı
5. Alt tayin sınırı
6. Doğrusallık
7. Aralık

##### **2.2.1.5.1. Doğruluk**

Bir analitik yöntemin doğruluğu, o yöntem ile elde edilen deneysel verilerin gerçek değerlere yakınlığıdır. Doğruluk, analitik yöntemin hatasızlığının bir ölçüsüdür. Doğruluk, belirli miktarda analitin bilinen miktar tayini yöntemi ile % geri kazanım değerleri bulunarak hesaplanır.

Doğruluğun tespiti için üç farklı konsantrasyondaki difteri toksoidi çözeltisinin absorbans değerleri 6 kez ölçülmüş ve bu şekilde saptanan konsantrasyon verilerinin, bilinen teorik konsantrasyon verilerinden % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. % geri kazanım değerlerinin ortalaması alınarak bu dağılımın standart sapması ve % bağıl standart sapması (varyasyon katsayısı) belirlenmiştir. Bu şekilde elde edilen % bağıl standart sapma değerinin %2'den küçük olması gerekmektedir. Böylece yöntemin doğruluğu tayin edilmiş olur (ICH Q2(R1)).

#### **2.2.1.5.2. Kesinlik**

Bir analitik yöntemin kesinliği, aynı homojen örnekten çoklu örneklemeyle elde edilen ölçüm serileri arasındaki yakınlığı ifade eder. Kesinlik, normal işlem koşulları altında, yöntemin tekrarlanabilirliğinin, ara kesinliğinin ve tekrar üretilebilirliğin ölçümüdür (ICH Q2(R1)).

##### **1. Tekrarlanabilirlik**

Tekrarlanabilirlik, kısa zaman aralıklarında aynı işlem koşulları altındaki kesinliği ifade eder. Belirli aralığı kapsayan en az üç konsantrasyon noktasında en az üçer kez ya da test konsantrasyonunun %100'ünde en az altı ölçümle belirlenir. Sonuçlar, hesaplanan konsantrasyonların ortalaması, standart sapması ve % bağıl standart sapması olarak verilir (ICH Q2(R1)).

##### **2. Ara Kesinlik**

Ara kesinlik; farklı günler, farklı analistler, farklı donanım gibi laboratuvar varyasyonlarının incelenmesini ifade eder. Bu etkilerin her birinin incelenmesinin gerekli olmadığı belirtilmiştir (ICH Q2(R1)).

### 3. Tekrar Üretilirlik

Tekrar üretilirlik, laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade eder (işbirliği ile yapılan çalışmalar, genelde yöntemin standardizasyonu için uygulanır) (ICH Q2(R1)).

#### 2.2.1.5.3. Özgünlük

Özgünlük, numunedeki diğer bileşenler varlığında, analitin miktar tayini için yöntemin uygunluğudur (ICH Q2(R1)).

#### 2.2.1.5.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD)

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

**Denklem 2.3.**  $LOD=3,3 \cdot \sigma/S$

$\sigma$ : Regresyon doğrularının y keşişim değerlerinin standart sapması

S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

#### 2.2.1.5.5. Alt Tayin Sınırı (LOQ)

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

**Denklem 2.4.**  $LOQ=10 \cdot \sigma/S$

$\sigma$ : Regresyon doğrularının y kesişim değerlerinin standart sapması

S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

#### **2.2.1.5.6. Doğrusallık ve Aralık**

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, verilen bir aralıkta örnek içindeki analitin konsantrasyonu ile doğrudan orantılı olan test sonuçlarının elde edilebilmesidir. Eğer doğrusal bir ilişki varsa, test sonuçları en küçük kareler yöntemiyle regresyon doğrusunun hesaplanması gibi uygun istatistiksel metotlarla değerlendirilmelidir. Korelasyon katsayısı, kesişim, regresyon doğrusunun eğimi ve artık kareler toplamı hesaplanmalıdır. Ek olarak, regresyon doğrusundan gerçek veri noktalarının sapma analizi doğrusallığı hesaplamak için yararlı olabilir. Doğrusallığın saptanmasında en az 5 konsantrasyon gereklidir (ICH Q2(R1)).

Bir analitik yöntemin aralığı, örnek içindeki analit için analitik yöntemin uygun kesinlik, doğruluk ve doğrusallığa sahip olduğunun gösterildiği en düşük ve en yüksek konsantrasyonları arasındaki aralıktır (ICH Q2(R1)).

#### **2.2.1.6. Difteri Toksoidinin Safılık Tayini**

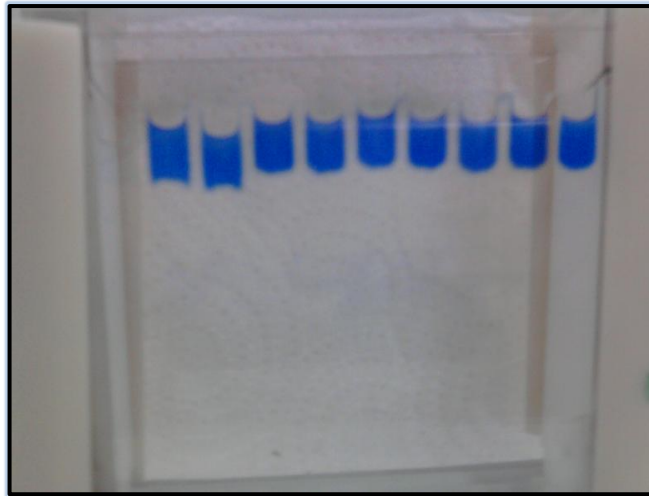
Sulu bir çözelti içinde, süspansiyon ya da çözünmüş küçük elektrik yüklü parçacıkların, uygulanan elektrik alanının etkisi ile göç etmesi sürecine “elektroforez” denir (Kaya, 2002). Elektroforez, kompleks protein karışımlarını (örn., hücreler, alt birim fraksiyonları) ayırmak, alt birim bileşiklerini incelemek ve proteinlerin homojenliğinin doğrulamak için kullanılır (Gallagher, 2007). Elektroforez yöntemi elektrik alanına yerleştirilen yüklü iyon veya grupların elektrotlara doğru göç etmesi esasına dayanır (Subhashini ve Ravindranath, 1981). Poliakrilamid jel



elektroforezinde de proteinler poliakrilamid jel matrisindeki gözeneklerden elektriksel alanın etkisiyle göç ederler (Chakavarti ve Chakavarti, 2008). Akrilamid konsantrasyonu arttıkça gözenek büyüklüğü azalır. Proteinin göç hızını gözenek büyüklüğü, protein yükü, protein boyutu ve protein şekli belirler (Gallagher, 2007).

Öncelikle jelin döküleceği cam sandviç hazırlanıp uygulama tarağı yerleştirilmiştir. Uygulama tarağının 1 cm altı cam kalemle işaretlenerek bu noktaya kadar önceden hazırlanmış olan %7,5'lik ayırma jeli dökülmüştür. Ardından jelin üzerine izopropanol ilave edilmiş ve böylece hem havayla teması hem de hava kabarcıklarının oluşumu önlenmiştir. Jelin bu şekilde yaklaşık 15 dakika bekletilerek donması sağlanmış ve bu süre sonunda izopropanol ortamdan süzgeç kağıdı ile uzaklaştırılmıştır. Bir sonraki aşamada %5'lik yükleme jeli hazırlanmış ve plakalar arasına dökülüp taraklar yerleştirilmiştir. Dökülen yükleme jeli 10 dakika içinde donmuş ve taraklar çıkartılmıştır.

Kuyucuklara uygulanacak örnekler için difteri toksoidinin stok çözeltisinden farklı dilüsyonlarda pH 7,4 PBS içinde çözeltiler hazırlanmıştır. Protein çözeltilerine (20  $\mu$ l) örnek tamponu (5  $\mu$ l) ilave edilmiş ve 100°C'de 10 dakika bekletilmişlerdir. Denatürasyon işleminden sonra her bir bant için 20  $\mu$ l örnek, mikropipet yardımıyla kuyucuklara uygulanmıştır (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** Protein çözeltisi ve örnek tamponu karışımının kuyucuklara uygulanması

Örnekler jele uygulandıktan sonra cam plaklar içindeki jel, mini dikey jel sistemine yerleştirilmiştir. İç ve dış rezervuarlar tampon çözeltisi ile gerekli yerlere kadar doldurulmuştur. Bu işlemlerin ardından 60 voltluk sabit gerilim uygulanarak elektroforez işlemi başlatılmıştır. Sürüklenme işlemi yaklaşık üç saat sürdürülmüş ve bromfenol mavisine ait bandın alt sınırın 1 cm üzerinde durduğu gözlemlendiğinde güç kaynağı kapatılmıştır. Jel, cam plaklar arasından dikkatlice çıkartılarak diğer işlemlere devam edilmiştir. Jel, bir saat fiksasyon, iki saat sensitizasyon çözeltisiyle çalkalandıktan sonra boyama çözeltisinde bir gece bekletilmiştir. Bir sonraki gün jel, bir saat boya giderici I çözeltisinde, arka plan temiz olana kadar da boya giderici II çözeltisinde bekletilmiştir. Boyanın uzaklaştırılmasının ardından jelin fotoğrafı çekilmiş ve %5 h/h'lik asetik asit çözeltisinde aylarca saklanmıştır. Çalışmamızda denatüre edici koşullar altında kesintili sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), difteri toksoidinin yapısını ve fragmanlarını tayin etmek için uygulanmıştır (Bollag ve ark., 1996). SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler Çizelge 2.2'de listelenmiştir.

**Çizelge 2.2.** SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler

Ayırma Jeli Tamponu 1,5 M Tris-HCl (pH:8,8)	Tris	18,2 g
	Distile su	100 ml
	18,2 g Tris 90 ml suda çözülerek pH HCl ile 8,8'e ayarlandıktan sonra distile su ile 100ml'ye tamamlanır. +4°C'de saklanır.	
Yükleme Jeli Tamponu 1 M Tris-HCl (pH: 6,8)	Tris	12,1 g
	Distile su	100 ml
	12,1 g Tris 90 ml suda çözülerek pH HCl ile 6,8'e ayarlandıktan sonra distile su ile 100ml'ye tamamlanır. +4°C'de saklanır.	
Akrilamid Çözeltisi (%30)	Akrilamid	29 g
	N,N'-metil-bis-akrilamid	1 g
	100 ml'ye distile su ile tamamlanır.	
%1 bromfenol mavisini	Bromfenol mavisini	0,05 g
	0,05 gram bromfenol mavisini tartılır ve 5 ml distile suda çözülür. Bir gece boyunca karıştırılır. 0,45µm membran filtreden süzülür.	

**Çizelge 2.2. Devam SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler**

%10 a/h'lik SDS	Sodyum dodesil sülfat (SDS)	10 g
	10 gram SDS tartılır ve üzerine 90 ml distile su eklenir. 68°C'ye ısıtılır ve karıştırılır. 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.	
%50 (h/h) gliserol	Gliserol	5 ml
	5 ml gliserol 10 ml'ye distile su ile tamamlanır.	
%10 (a/h) Amonyum persülfat (APS)	Amonyum persülfat	0,5 g
	0,5 gram amonyum persülfat tartılır ve 5 ml distile suda çözülür.	
Örnek Tamponu	1 M Tris-HCl (pH: 6,8)	0,6 ml
	%50 (a/h) Gliserol	5 ml
	%1 (a/h) Bromfenol mavisi	2 ml
	2-merkapt etanol	0,5 ml
	Distile su	0,9 ml
Elektroforez Tamponu	Tris	3 g
	Glisin	14,4 g
	SDS	1 g
3 g Tris, 14,4 g glisin ve 1 g SDS tartılır. 1000 ml'ye distile su ile tamamlanır.		
Yükleme Jeli (%5)	%30 Akrilamid çözeltisi	0,83 ml
	1 M Tris-HCl (pH: 6,8)	0,63 ml
	%10 (a/h) APS	0,05 ml
	Distile su	3,40 ml
	%10 a/h'lik SDS	0,05 ml
	TEMED (Polimerizasyonu başlattığı için en son ilave edilmelidir.)	0,003 ml
Ayırma Jeli (%7,5)	%30 Akrilamid çözeltisi	2,5 ml
	1,5 M Tris-HCl (pH: 8,8)	2,5 ml
	%10 (a/h) SDS	0,1 ml
	%10 (a/h) APS	0,1 ml
	Distile su	4,8 ml
	TEMED (Polimerizasyonu başlattığı için en son ilave edilmelidir.)	0,01 ml
Fiksasyon Çözeltisi	Etanol	40 ml
	Metanol	10 ml
	Distile su	40 ml
	Asetik asit	10 ml
Sensitizasyon Çözeltisi	Amonyum sülfat	10 ml
	Distile su	89 ml
	Asetik asit	1 ml

**Çizelge 2.2. Devam SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler**

Boyama Çözeltisi	Coomassie Brilliant Blue R250 Metanol Glasiyal asetik asit Distile su	0,5 g 45 ml 5 ml 50 ml
Boya Giderici Çözelti 1	Etanol Asetik asit Distile su	40 ml 5 ml 55 ml
Boya Giderici Çözelti 2	Etanol Asetik asit Distile su	30 ml 3 ml 67 ml

### 2.2.1.7. Difteri Toksoidinin Stabilitesi

Difteri toksoidi buzdolabında (2-8°C) altı ay süreyle saklanmıştır. 0., 1., 3. ve 6. aylarda alınan numunelerde miktar tayini parametreleri incelenmiştir.

### 2.2.2. Mikropartiküler Yapıdaki Ön Formülasyonların Hazırlanması

Ön formülasyon çalışmalarında iyi bir mikropartiküler formülasyon geliştirmek için farklı parametreler denenmiş ve bu parametrelerin formülasyonların karakterizasyonunu nasıl etkilediği üzerine çalışmalar yürütülmüştür. Ön formülasyon çalışmalarında difteri toksoidi kullanılmamıştır.

#### 2.2.2.1. Poli (DL-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve Poli-ε-kaprolakton (PCL) Polimerlerini İçeren Ön Formülasyonların Hazırlanması

İstenilen partikül büyüklüğünde ve enkapsülasyon etkinliğinde partiküler sistem elde edebilmek için antijen miktarı, primer emülsiyon oluşturulmasında kullanılan karıştırıcı (yüksek hızlı homojenizatör veya sonikatör) ve kullanılan polimerlerin cinsi veya farklı molekül ağırlığında polimer kullanılması gibi parametreler değiştirilmiştir. Hazırlanan ön formülasyonlar Çizelge 2.3’de verilmiştir.

Formülasyonlar çoklu emülsiyon/çözücü buharlaştırma (s/y/s) yöntemi ile hazırlanmıştır (Benoit ve ark., 1999; Youan ve ark., 1999; Murillo ve ark., 2001; Singh ve ark., 2006; Mukerjee ve ark., 2007). Öncelikle hesaplı miktarda kullanılan polimer karışımı organik çözücüde çözülmüştür. Mikropartiküllerin hazırlanmasında poli-laktik-ko-glikolik asit (PLGA) ile farklı molekül ağırlığına sahip poli-( $\epsilon$ -kaprolakton) polimer olarak kullanılmıştır. Organik çözücü olarak ise diklorometan kullanılmıştır. Antijeni içeren su fazından 250  $\mu$ l; 2,5 ml polimerin organik çözücüdeki çözeltisi (PLGA veya PCL) içine eklenmiş ve yüksek hızlı homojenizatör ile 8000 rpm'de 5 dakika veya sonikatör içinde 50-70 watt'da 60 sn'ye boyunca homojenize edilmiştir. Böylece primer su/yağ (s/y) tipi emülsiyon oluşturulmuştur. Bazı formülasyonlarda iç sulu faza yardımcı madde olarak Pluronic F-68 veya Pluronic F-127 iç sulu fazın belirli yüzdelinde eklenmiştir. Elde edilen s/y emülsiyonu %5 polivinil alkol (PVA) çözeltisine ilave edilerek yüksek hızlı homojenizatör ile 8000 rpm'de 5 dakika boyunca tekrar homojenize edilmiş ve final su/yağ/su (s/y/s) tipi çoklu emülsiyon oluşumu sağlanmıştır. Organik çözücünün buharlaşması için s/y/s tipi emülsiyon mekanik karıştırıcıda 600 rpm'de bir gece karışıma bırakılmıştır. Oluşan mikropartiküller 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek ayrılmış, ultra saf su ile iki kere yıkanmıştır. Mikropartiküllerin ultra saf su içindeki dispersiyonu -40 °C'de dondurulduktan sonra -90 °C'de 0,05 mmHg'de bir gün boyunca liyofilize edilmiştir. Toz olarak elde edilen mikropartiküller nem geçirmeyen ortamda +4 °C'de muhafaza edilerek saklanmıştır (Baras ve ark., 1999).

**Çizelge 2.3.** Poli (DL-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve Poli- $\epsilon$ -kaprolakton (PCL) içeren ön formülasyonlar

Formül Kodu:	Polimer tipi	Antijen miktarı (mg)	Primer emülsiyon oluşturmak için kullanılan karıştırıcı	Eklenen Pluronic tipi	Eklenen Pluronic miktarı
F1	PLGA	4	Homojenizatör	-	-
F2	PLGA	10	Homojenizatör	-	-

**Çizelge 2.3. Devam Poli (DL-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve Poli-ε-kaprolakton (PCL) içeren ön formülasyonlar**

<b>Formül Kodu:</b>	<b>Polimer tipi</b>	<b>Antijen miktarı (mg)</b>	<b>Primer emülsiyon oluşturmak için kullanılan karıştırıcı</b>	<b>Eklenen Pluronic tipi</b>	<b>Eklenen Pluronic miktarı</b>
F3	PLGA	20	Homojenizatör	-	-
F4	PLGA	4	Sonikatör	-	-
F5	PLGA	10	Sonikatör	-	-
F6	PLGA	20	Sonikatör	-	-
F7	PCL (14kDa)	4	Homojenizatör	-	-
F8	PCL (14kDa)	10	Homojenizatör	-	-
F9	PCL (14kDa)	4	Sonikatör	-	-
F10	PCL (14kDa)	10	Sonikatör	-	-
F11	PLGA	10	Sonikatör	Pluronic F-68	%1
F12	PLGA	10	Sonikatör	Pluronic F-68	%6
F13	PLGA	10	Sonikatör	Pluronic F-68	%15
F14	PLGA	10	Sonikatör	Pluronic F-127	%1
F15	PLGA	10	Sonikatör	Pluronic F-127	%6
F16	PLGA	10	Sonikatör	Pluronic F-127	%15
F17	PLGA	10	Homojenizatör	Pluronic F-68	%1
F18	PLGA	10	Homojenizatör	Pluronic F-68	%6
F19	PLGA	10	Homojenizatör	Pluronic F-68	%15
F20	PLGA	10	Homojenizatör	Pluronic F-127	%1
F21	PLGA	10	Homojenizatör	Pluronic F-127	%6
F22	PLGA	10	Homojenizatör	Pluronic F-127	%15

**Çizelge 2.3. Devam Poli (DL-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve Poli-ε-kaprolakton (PCL) içeren ön formülasyonlar**

Formül Kodu:	Polimer tipi	Antijen miktarı (mg)	Primer emülsiyon oluşturmak için kullanılan karıştırıcı	Eklenen Pluronic tipi	Eklenen Pluronic miktarı
F23	PCL (14kDa)	10	Sonikatör	Pluronic F-68	% 1
F24	PCL (14kDa)	10	Sonikatör	Pluronic F-68	% 6
F25	PCL (14kDa)	10	Sonikatör	Pluronic F-68	% 15
F26	PCL (14kDa)	10	Sonikatör	Pluronic F-127	% 1
F27	PCL (14kDa)	10	Sonikatör	Pluronic F-127	% 6
F28	PCL (14kDa)	10	Sonikatör	Pluronic F-127	% 15
F29	PCL (14kDa)	10	Homojenizatör	Pluronic F-68	% 1
F30	PCL (14kDa)	10	Homojenizatör	Pluronic F-68	% 6
F31	PCL (14kDa)	10	Homojenizatör	Pluronic F-68	% 15
F32	PCL (14kDa)	10	Homojenizatör	Pluronic F-127	% 1
F33	PCL (14kDa)	10	Homojenizatör	Pluronic F-127	% 6
F34	PCL (14kDa)	10	Homojenizatör	Pluronic F-127	% 15
F35	PCL (70-90 kDa)	10	Homojenizatör	-	-
F36	PCL (70-90 kDa)	10	Sonikatör	-	-

### 2.2.3. Poli (DL-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve Poli-ε-kaprolakton (PCL) Polimerlerini İçeren Ön Formülasyonların Karakterizasyonu

Ön formülasyonların karakterizasyonu için mikropartiküler formülasyonların morfolojisi, enkapsülasyon etkinliği ve üretim verimi incelenmiştir.

### 2.2.3.1. Mikropartiküler Yapıdaki Ön Formülasyonların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Mikropartiküler yapıdaki ön formülasyonların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için optik mikroskop kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir. Mikropartiküller lam üzerinde distile su ile disperse edilmiş ve dijital ortamda fotoğrafları çekilmiştir.

### 2.2.3.2. Mikropartiküler Yapıdaki Ön Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinlikleri ve Üretim Verimleri Tayini

Mikropartiküler yapıdaki ön formülasyonların enkapsülasyon etkinliklerini tayin etmek için dijestiyon metodu kullanılmıştır (Slobbe ve ark., 2003; Ciombor ve ark., 2006; McConnell ve ark.,2008). Belirli miktarda tartılan mikropartiküller, %5 SDS içeren 1 M NaOH çözeltisi ile magnetik karıştırıcıda karıştırılarak tamamen çözünmesi sağlanmıştır. 1 M HCl çözeltisi eklenerek ile nötralizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Çapan ve ark., 2003). Nötralize edilen çözelti 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz alınarak mikroBCA analiz yöntemi ile miktar tayini yapılmıştır. Kontrol amacıyla aynı işlem antijen içermeyen boş mikropartiküllere de uygulanmıştır. Denklem 2.5 ve Denklem 2.6'da sırasıyla enkapsülasyon etkinliği ve üretim veriminin hesaplanmasına ait formüller sunulmaktadır.

#### Denklem 2.5.

$$\% \text{ Enkapsülasyon etkinliği } i = \frac{a}{b} \times 100$$

a: Mikropartiküllere yüklenebilen toplam etkin madde miktarı

b: Formülasyonda kullanılan toplam etkin madde miktarı



**Denklemler 2.6.**

$$\% \text{ Üretim verimi} = \frac{a}{b} \times 100$$

a: Elde edilen mikropartikül miktarı

b: Formülasyonda kullanılan polimerik materyal, etkin madde ve yardımcı maddelerin toplam miktarı

#### 2.2.4. F11, F17, F23, F29, F35, F36 Kodlu Formülasyonların Difteri Toksoidi ile Hazırlanmaları

Ön formülasyon çalışmalarında model antijen olarak ovalbumin kullanılmıştır. Ovalbumin ile ileriki çalışmalarda mikropartikül hazırlanmasında kullanılmak istenen polimerler çalışılmış ve mikropartikül hazırlanmasında en uygun üretim parametreleri belirlenmiştir. Bu parametreler kullanılarak daha sonra difteri toksoidi içeren mikropartiküller Bölüm 2.2.2.1.'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Difteri toksoidi ile hazırlanan formülasyonların morfolojisi, partikül büyüklüğü ve dağılımı, enkapsülasyon etkinliği ve üretim verimi, invitro salımları incelenmiştir. Hazırlanan formülasyonlar Çizelge 2.4'te verilmiştir.

**Çizelge 2.4.** Difteri toksoidi içeren mikropartiküler formülasyonlar

Formül Kodu:	Polimer tipi	Antijen miktarı (mg)	Primer emülsiyon oluşturmak için kullanılan karıştırıcı	Eklenen Pluronic tipi	Eklenen Pluronic miktarı	Kriyo protektan İlavesi (1000'de 1 oranında mannitol)
D1	PLGA	75,8 (144µg protein)	Homojenizatör	F-68	%1	+
D2	PLGA	75,8 (144µg protein)	Sonikatör	F-68	%1	+

**Çizelge 2.4. Devam** Difteri toksoidi içeren mikropartiküler formülasyonlar

Formül Kodu:	Polimer tipi	Antijen miktarı (mg)	Primer emülsiyon oluşturmak için kullanılan karıştırıcı	Eklenen Pluronic tipi	Eklenen Pluronic miktarı	Kriyo protektan İlavesi (1000'de 1 oranında mannitol)
D3	PCL (70-90kDa)	75,8 (144µg protein)	Homojenizatör	F-68	%1	+
D4	PCL (70-90kDa)	75,8 (144µg protein)	Sonikatör	F-68	%1	+
D5	PCL (14kDa)	75,8 (144µg protein)	Homojenizatör	F-68	%1	+
D6	PCL (14kDa)	75,8 (144µg protein)	Sonikatör	F-68	%1	+

#### 2.2.4.1. Difteri Toksoidi İçeren F11, F17, F23, F29, F35, F36 Kodlu Formülasyonların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Bölüm 2.2.3.1'de anlatıldığı şekilde difteri toksoidi içeren formülasyonların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için optik mikroskop kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir.

#### 2.2.4.2. Difteri Toksoidi İçeren F11, F17, F23, F29, F35, F36 Kodlu Formülasyonların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Saptanması

Difteri toksoidi içeren formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımının saptanması için lazer kırınımı yöntemi kullanılmıştır (Alpar ve ark., 2001; Atuah ve ark., 2003; Howard ve ark., 2004; Amidi ve ark., 2007).

Partikül büyüklüğü ve dağılımı, lazer kırınımı granülometresi (Sympatec Laser Diffraction particle sizer) kullanılarak belirlenmiştir. Mikropartikül hazırlanmasında kullandığımız polimer suda çözünür yapıda olmadığı için mikropartiküller su içinde disperse edilmiş ve ölçümler gerçekleştirilmiştir.

#### **2.2.4.3. Difteri Toksoidi İçeren F11, F17, F23, F29, F35, F36 Kodlu Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinlikleri ve Üretim Verimleri Tayini**

Bölüm 2.2.3.2’de anlatıldığı şekilde difteri toksoidi içeren formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri ve üretim verimleri hesaplanmıştır.

#### **2.2.4.4. Difteri Toksoidi İçeren Formülasyonlarda In-vitro Salım Hızı Çalışmaları**

In-vitro salım hızı çalışmaları için membran içermeyen bir çözünme yöntemi kullanılmıştır (Florindo ve ark., 2009).

Çözünme ortamı olarak % 0,02 (a/h) oranında sodyum azid içeren pH 7,4 PBS tamponu kullanılmıştır. Difteri toksoidi içeren mikropartiküller hesaplı miktarda tartılmış ve eppendorf tüplere konulmuştur. Daha sonra üzerlerine 1000’er µl çözünme ortamı (PBS, pH 7,4) eklenmiştir. Eppendorf tüpler, sıcaklığı 37 °C’ye ve hızı 100 rpm’e ayarlı çalkalayıcı su banyosuna yerleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında eppendorf tüpler 7500 rpm’de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiş ve üst faz alınmıştır. Sink koşulunu sağlamak amacıyla alınan üst faz kadar yerine taze tampon ilave edilmiştir. Alınan örneklerin mikroBCA miktar tayini yöntemiyle absorbansları 560 nm’de okunmuştur. Belirlenen absorbans değerleri, difteri toksoidinin pH 7,4 PBS içindeki kalibrasyon denklemine konularak her bir zaman aralığında açığa çıkan difteri toksoidi konsantrasyonları hesaplanmıştır. Her bir

deney için 3 paralel olarak yapılan okumalar sonucunda difteri toksoidinin % açığa çıkan miktarlarına göre salım profilleri çizilmiştir.

#### **2.2.4.5. Kinetik Hesaplamalar ve Sonuçların Değerlendirilmesi**

Bölüm 2.2.4.4.'de anlatıldığı şekilde elde edilen in vitro salım hızı verileri Bölüm 1.6'da yer alan kinetik modeller ve doğru denklemlerinden hareketle SPSS bilgisayar programı kullanılarak sıfır derece, birinci derece, Higuchi kinetiklerine ait parametreler ile incelenmiştir.

#### **2.2.5. Difteri Toksoidi İçeren D1 ve D5 Kodlu Formülasyonlara Ait Ön Stabilite Çalışmaları**

Difteri toksoidi içeren formülasyonlar üzerinde yapılan morfoloji, partikül büyüklüğü ve dağılımı, enkapsülasyon etkinliği ve üretim verimi ile in vitro salım çalışmaları sonucunda D1 ve D5 kodlu formülasyonlar ile in vivo çalışmaların yürütülmesi gerektiğine karar verilmiştir.

Ön stabilite çalışmaları için difteri toksoidi içeren D1 ve D5 kodlu formülasyonlar 3 ay süreyle 2-8°C'de buzdolabında ve 25±2°C, %60 bağıl nemdeki iklim dolabında bekletilmiştir. Difteri toksoidinin formülasyon içindeki miktar tayinleri Bölüm 2.2.1.4'te anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır. Protein bütünlüğünün korunup korunmadığının anlaşılması amacıyla ise Bölüm 2.2.1.6'da anlatıldığı şekilde fakat denatüre edici olmayan koşullar altında PAGE analizi yapılmıştır.

### **2.2.6. Gümüş Boyama Metodu ile D1 ve D5 Kodlu Formülasyonlardan Salınan Difteri Toksoidinin Bütünlüğünün Belirlenmesi**

Difteri toksoidinin bütünlük tayini için in vitro salım ile elde edilen numunelerde Merrill ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve PAGE analizinden 100 kat daha hassas olan gümüş boyama metodu kullanılmıştır. Bu metodla 10-100ng gibi çok küçük miktarlarda protein içeren bantlar görülebilmektedir (Garfin, 1990).

Bu metod için öncelikle Bölüm 2.2.1.6'da anlatıldığı şekilde ayırma jeli ve yükleme jeli mini dikey jel sistemine uygulanır ve yükleme jeline numuneler uygulandıktan sonra tampon çözeltisi ile iç ve dış rezervuar doldurularak sabit volt altında proteinlerin yürütülmesi işlemi gerçekleştirilir. Yürütme işlemi sona erdikten sonra cam plaklar arasından dikkatlice çıkartılan jele takip eden işlem adımları uygulanır:

- 7 dk 200 ml %7'lik asetik asit ile,
- 200 ml %50 metanol + 240 µl %50'lik glutaraldehit karışımı ile (2 kez 20'şer dk),
- 200 ml su ile (2 kez 10'ar dk),
- 15 dk (0,8 g AgNO<sub>3</sub> + 4 ml su) + (21 ml su + 250 µl %30'luk NaOH + 1,4 ml 14,8 M Amonyum hidroksit) karışımı ile,
- 200 ml su ile (2 kez 5'er dk),
- 2-15 dk 200 ml su + 1 ml %1'lik sitrik asit + 100 µl %37'lik formaldehit karışımı ile,
- 200 ml su ile (3 kez 1'er dk) muamele edilir (Coachman ve ark., 2002).

## **2.2.7. In vivo Çalışmalar**

### **2.2.7.1. Deney Hayvanlarının Seçimi**

Fare, kobay (guinea pig) ve sıçanlar in vivo aşılama yaygın olarak kullanılmaktadır. Bağışıklama programımızda burundan aşılama bulunduğu ve hayvanlardan toplam üç kez kan alınacağı için çalışmamız için en uygun deney hayvanı kobay (guinea pig) seçilmiştir. Bu amaçla Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Bilim Kurulu ve Etik Kurulu'ndan onay alınmış ve çalışmalar yerel etik kurul ilkeleri çerçevesinde Gölbaşı Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi laboratuvarı deney hayvanları ünitesinde yürütülmüştür (01.06.2011/14886).

### **2.2.7.2. Deney Hayvanlarının Özellikleri**

In vivo çalışmalar için ağırlıkları 300 gram ile 350 gram arasında değişen 7-8 haftalık 54 adet erkek Albino kobay (guinea pig) kullanılmıştır. Kobayların barındırıldıkları ortamda sıcaklık  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  (%50-60 nem) olup havalandırma sistemi mevcuttur. Kobaylar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık periyodunda saklanmıştır. Hayvanların kafes bakımları yapılmış, günlük olarak su ihtiyaçları karşılanmış ve kobaylara *ad libitum* diyeti uygulanmıştır.

### **2.2.7.3. Formülasyonların Seçimi**

D1, D2, D3, D4, D5 ve D6 kodlu formülasyonların morfolojisi, partikül büyüklüğü ve dağılımı, enkapsülasyon etkinliği ve üretim verimi, invitro salım sonuçları dikkate alınarak in vivo çalışmalarda D1 ve D5 kodlu formülasyonların uygulanmasına karar verilmiştir. Kontrol grubu olarak PBS (pH 7,4) içinde difteri toksoidi tercih edilmiştir.

#### 2.2.7.4. Uygulama Dozunun Belirlenmesi

Difteri toksoidi içeren formülasyonların birçoğu ilk aşılama ve ilk rapel doz uygulamasında pediyatrik popülasyon için 25-30 Lf iken erişkinler için 2 Lf ve üzeri difteri toksoidi içermektedir (Ciofi degli Atti ve ark., 2002).

Örnekler doğrultusunda intranazal aşılama için 25 Lf/50 µl (25 µl/burun deliği) formülasyon anestezi yapılmadan erkek kobayların burun deliklerine mikropipet yardımıyla uygulanmıştır (Şekil 2.3) (Alpar ve ark., 2005). Her iki burun deliğine uygulama yapılarak membran alanının ve böylece formülasyonların absorpsiyonlarının artırılması amaçlanmıştır. Aşının kobayların burun içine verilmesinden sonra kayıpların oluşmaması için hayvanlar yaklaşık iki dakika sabit tutulmuştur. Subkütan aşılama için ise 25 Lf/500 µl formülasyon anestezi yapılmadan erkek kobaylara enjekte edilmiştir.



Şekil 2.3. Kobayların intranazal yoldan aşılması

### 2.2.7.5. In vivo Aşılama Planı ve Deneş Hayvanlarından Kan Alma

In vivo çalışmalarda difteri toksoidi içeren formülasyonlar, dokuz farklı grup (n=6) erkek kobaya belirli günlerde ve belirli yollarla uygulanmıştır (izelge 2.5).

Deneş hayvanlarının önceden difteri toksoidi ile karşılaşıp karşılaşmadıkları hakkında bilgi sahibi olabilmek için her bir hayvandan bir hafta önce kan örnekleri alınmıştır. Birinci aşılamadan bir hafta önce yapılan bu işlem ile deneş hayvanlarının stres koşullarına maruziyetleri nlenmiş ve bağışıklama sonrasında en iyi yanıtın elde edilmesi amaçlanmıştır.

Kobayların bağışık yanıtlarındaki değişiklikleri belirleyebilmek için sırasıyla IgA ve IgG antikor oluşumunun gerçekleştiği 20. ve 42. günlerde kobayların kalplerinden 1'er ml kan örnekleri alınmıştır (Sayın ve ark., 2008). Kan alım işlemi esnasında kobaylara ketamin (35mg/kg) ve ksilazin (5mg/kg) ile kimyasal anestezi uygulanmıştır. Alınan kan örnekleri steril kan tüplerinde 1 saat oda sıcaklığında, 1 saat buzdolabında (2-8°C) bekletildikten sonra 10,000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası st kısımda toplanan serum örnekleri eppendorflara alınarak analiz edilene kadar -20°C'de saklanmıştır. Toplanan serumlardaki bağışık yanıtlar Elisa kit (total IgG guinea pig) ile değerlendirilmiştir.

Aşılanmış kobaylar ileriki dönemlerde farklı çalışmalar için kullanılmayacaklarından deneş protokolü tamamlandıktan sonra kobaylara tenazi (eter) yapılmış ve tıbbi atık prosedürüne uygun olarak uzaklaştırılmışlardır.



**Çizelge 2.5.** In vivo çalışma grupları, aşılama zamanları ve aşılama yolları

Deney ve kontrol grupları	Grup başına hayvan adeti	Bağışıklama yolu	Bağışıklama sayısı	Doz		
				I. Bağışıklama 0.gün	II. Bağışıklama 7.gün	III. Bağışıklama 21.gün
<b>1. grup</b> PBS içinde DT (Kontrol Grubu)	6	i.n.	3	25 Lf/50 µL (i.n.)	25 Lf/50 µL (i.n.)	25 Lf/50 µL (i.n.)
<b>2. grup</b> DT içermeyen boş D1 formülü	6	i.n.	3	50 µL (i.n.)	50 µL (i.n.)	50 µL (i.n.)
<b>3. grup</b> DT içermeyen boş D5 formülü	6	i.n.	3	50 µL (i.n.)	50 µL (i.n.)	50 µL (i.n.)
<b>4. grup</b> DT içeren Formül D1	6	i.n.	3	25 Lf/50 µL (i.n.)	25 Lf/50 µL (i.n.)	25 Lf/50 µL (i.n.)
<b>5. grup</b> DT içeren Formül D5	6	i.n.	3	25 Lf/50 µL (i.n.)	25 Lf/50 µL (i.n.)	25 Lf/50 µL (i.n.)

**Çizelge 2.5.** In vivo çalışma grupları, aşılama zamanları ve aşılama yolları

Deney ve kontrol grupları	Grup başına hayvan adeti	Bağışıklama yolu	Bağışıklama sayısı	Doz		
				I. Bağışıklama 0.gün	II. Bağışıklama 7.gün	III. Bağışıklama 21.gün
<b>6. grup</b> DT içeren Formül D1	6	s.c. + i.n.	2	25 Lf/500 µL  (s.c.)	-	25 Lf/50 µL  (i.n.)
<b>7. grup</b> DT içeren Formül D5	6	s.c. + i.n.	2	25 Lf/500 µL  (s.c.)	-	25 Lf/50 µL  (i.n.)
<b>8. grup</b> PBS içinde DT (Kontrol Grubu)	6	s.c. + i.n.	2	25 Lf/500 µL  (s.c.)	-	25 Lf/50 µL  (i.n.)

### **2.2.7.6. Subkütan ve Intranazal Toksikite Testi**

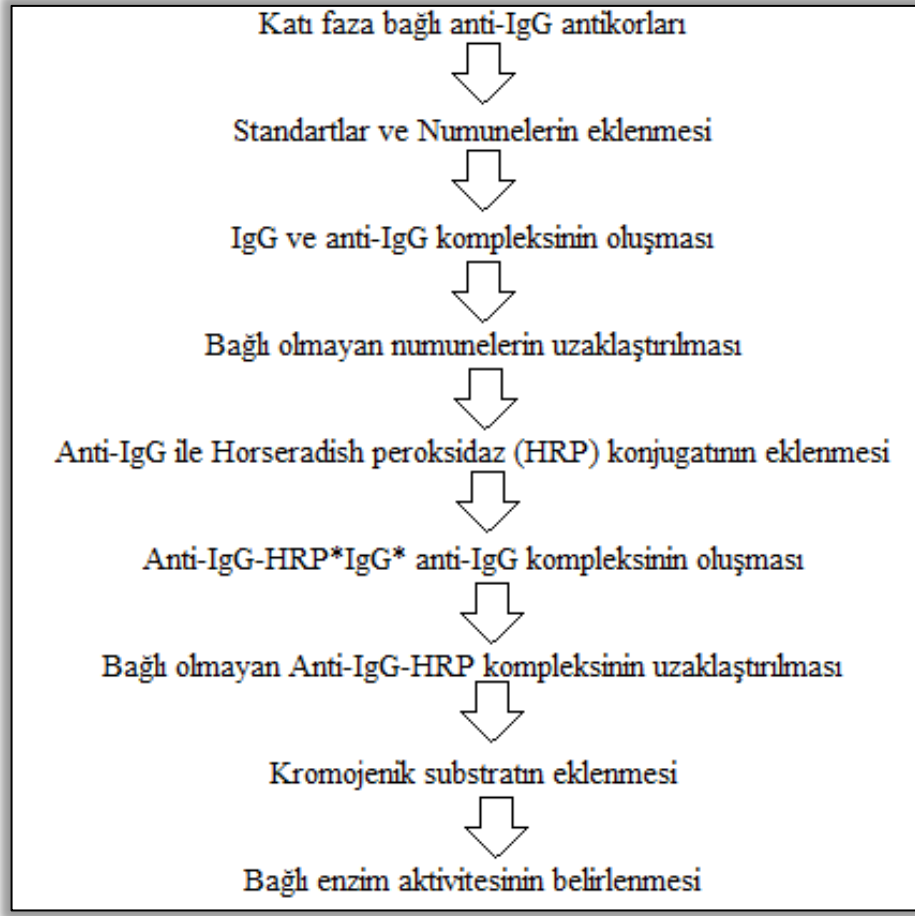
Bu test intranazal veya subkütan uygulanan aşilar için yapılmıştır. Bütün kobaylarda, 42 gün boyunca enjeksiyon ve burun bölgesinde enflamasyon, ödem ya da farklı yan etkiler oluşup oluşmadığı gözlemlenmiştir.

### **2.2.8. ELISA (Enzim İliintili İmmünosorban Analizi)**

ELISA testi antikor moleküllerinin miktarlarının belirlenmesi için kullanılan antikora spesifik, basit ve duyarlı bir yöntemdir (Jordan, 2002).

Antitoksin titrasyonunun belirlenmesinde kullanılacak ELISA yöntemi, sonunda uygun enzimle konjugat oluşturacak analitlerin ve spesifik immünolojik reajanların katı yüzeylere başarılı bağlanmalarına bağlıdır. Kromojenik substrat; kaplanmış yüzeyle temas ettiği zaman, bağlı enzim miktarıyla orantılı olacak şekilde renkli madde serbest bırakılır (WHO, 1997b).

Guinea pig'lerden elde edilen serumlar Elisa kit (total IgG guinea pig) ile değerlendirilmiştir. Bu testte IgG taşıyan numuneler polistiren mikropalak duvarlarının yüzeyine adsorbe edilmiş anti-IgG ile reaksiyona girer. Bağlanmamış proteinler uzaklaştırıldıktan sonra, anti-IgG antikorları ile konjugat oluşturmuş olan horseradish peroksidaz (HRP) eklenir. Bu enzim etiketli antikorlar önceden bağlı IgG'ler ile kompleks oluşturur. Tekrar yıkama işleminden sonra, kromojenik substrat, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin ortama eklenir. Bağlı enzimin miktarı doğrudan numunedeki IgG konsantrasyonuyla değiştiğinden 450 nm'deki absorbans numunedeki IgG konsantrasyonunun bir ölçüsüdür. Numunelerdeki IgG miktarı standartlardan elde edilen standart eğriden hesaplanabilmektedir. Çift antikor sandviç ELISA yönteminin prensibi Şekil 2.4'te gösterilmiştir.

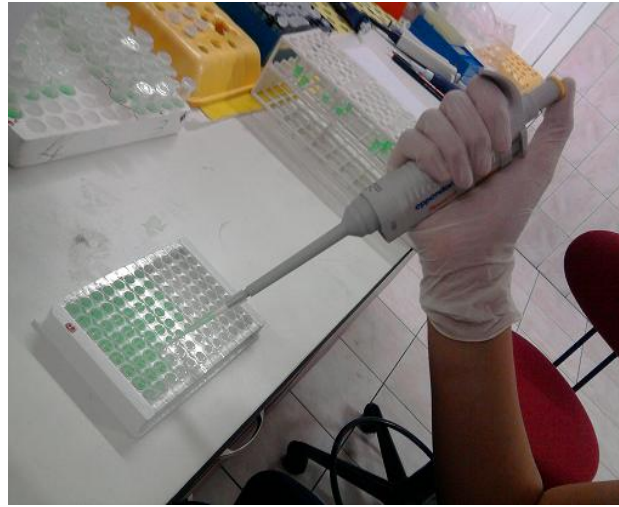
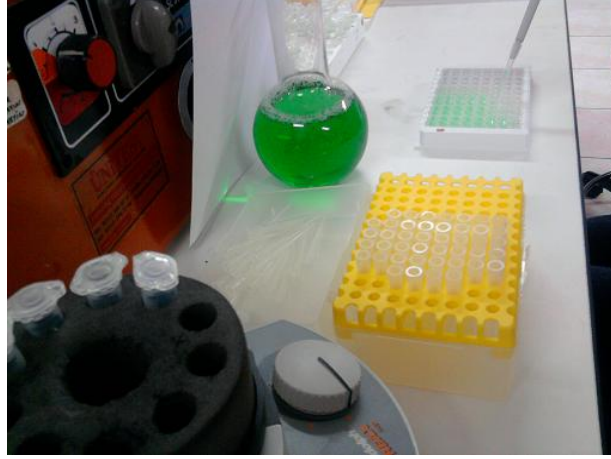


**Şekil 2.4.** Sandviç ELISA yönteminin şematik gösterimi

Analize başlamadan önce rejanlar ve analiz edilecek kobay serumları oda sıcaklığına getirilmiştir. Standardın sulandırıcı konsantrat ile 6,25-400 ng/ml arasında yedi dilüsyonu hazırlanmıştır. Aynı şekilde bütün serumlar sulandırıcı konsantrat ile 1/100000 oranında seyreltilmiştir. Standartlardan ve numunelerden 100'er µl her bir kuyucuğa ilave edilmiştir. Kör olarak kullanılacak kuyucuklara ise 100'er µl standart sulandırıcı konsantrattan ilave edilmiştir. Daha sonra plağın üzeri kapatılarak oda sıcaklığında 20±2 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda kuyucuklardaki sıvıların boşaltılması sağlanmıştır. Her bir kuyucuk yıkama çözeltisi ile 4 kez yıkanmıştır. Kalan sıvıyı uzaklaştırmak amacıyla plak süzgeç kağıdı üzerine ters çevrilmiş, hafifçe vurularak kuruması sağlanmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa 100'er µl enzim-antikor konjugatı ilave edilmiş ve yine plağın üzeri kapatılarak oda sıcaklığında 20±2 dakika bekletilmiştir (Şekil 2.5). Tekrar kuyucuklardaki sıvılar

uzaklaştırılmış ve 4 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kuyucuklardaki yıkama çözeltisi tamamen uzaklaştırıldıktan sonra kromojen (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin)-substrat çözeltisinden her bir kuyucuğa 100'er µl ilave edilmiştir. Kuyucuklardaki sıvının rengi maviye döndükten sonra plak karanlık bir odada 10 dakika bekletilmiştir. 10 dakika sonunda her bir kuyucuğa 100'er µl durdurma çözeltisi ilave edilmiş ve kuyucuklardaki sıvının renginin maviden sarıya dönmesi tamamlandıktan sonra numunelerin köre karşı 450 nm'de absorbanları okunmuştur.

In vivo çalışma sonuçları T testi ve Fisher testi ile değerlendirilmiş, gruplar arasında farklılık olup olmadığı tespit edilmiştir.  $p < 0,05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir.



Şekil 2.5. ELISA kitine numunelerin ve reajanların uygulanması

### **3. BULGULAR**

#### **3.1. Difteri Toksoidi Özelliklerinin Belirlenmesine Ait Bulgular**

##### **3.1.1. Difteri Toksoidinin Protein Miktar Tayinine Ait Bulgular**

Bölüm 2.2.1.1’de anlatıldığı şekilde difteri toksoidinin protein miktar tayini belirlenmiştir. Spektrofotometrik ölçümde öncelikle 100 µl difteri toksini 1000 µl saf su ile seyreltilmiştir. Absorbans 280 nm’de 0,423 bulunmuşken 260 nm’de 0,634 bulunmuştur. Elde edilen değerler Schleif ve Wensink tarafından geliştirilen denklemde yerine konulmuş ve bulunan değer seyreltme faktörü ile çarpılmıştır. Protein miktarı 1900 µg/ml olarak bulunmuştur.

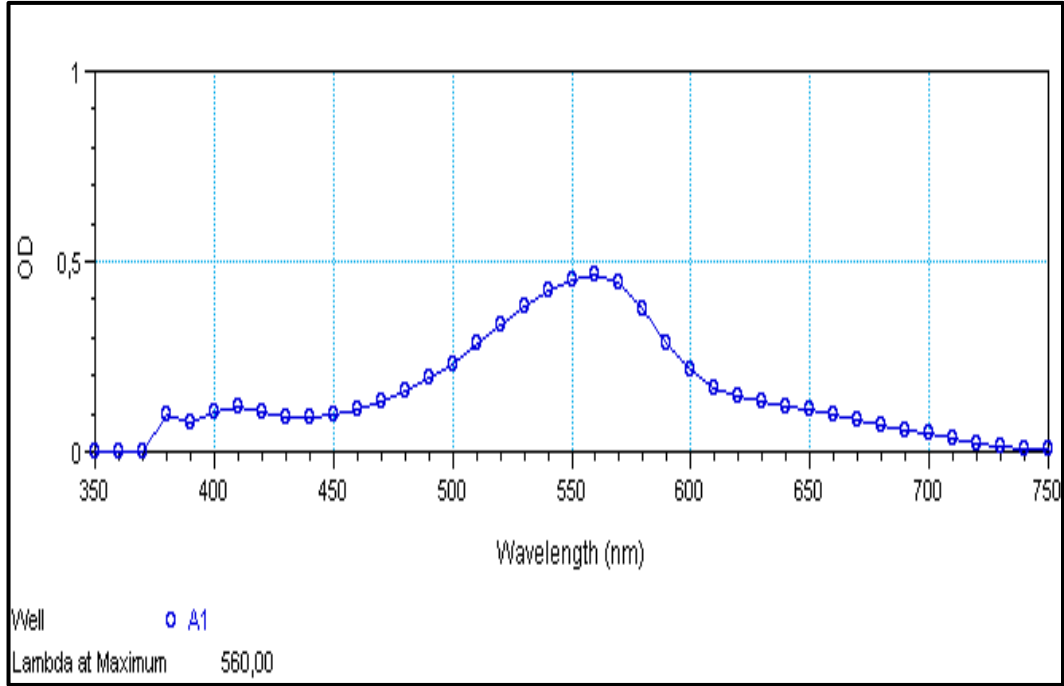
##### **3.1.2. Difteri Toksoidinin Lf Değerinin Belirlenmesine Ait Bulgular**

Bölüm 2.2.1.2’de anlatıldığı şekilde difteri toksoidinin Lf değeri hesaplanmıştır. Flokülasyonun ilk ve en çok gözlemlendiği tüp 3 numaralı tüp olmuştur. Çalışmamızda antitoksin içeren standart ile 1/2 oranında çalışıldığından 3 nolu tüpün Lf değeri ilk olarak 2 ile çarpılmıştır. Daha sonra elde edilen değer difteri toksoidinin serum fizyolojik ile seyreltilmesi nedeniyle 11 ile çarpılmış ve son olarak da tüplere 0,5 ml difteri toksoidinin ilave edildiğinden dolayı bulunan değer 2 ile çarpılmıştır. Sonuç olarak, Ramon flokülasyon testine göre ileriki çalışmalarda kullanılacak olan difteri toksoidinin Lf değeri 1320 Lf/ml olarak belirlenmiştir.

##### **3.1.3. Difteri Toksoidinin UV Spektrumuna Ait Bulgular**

Bölüm 2.2.1.3’de anlatıldığı şekilde mikroplak okuyucusundan alınan difteri toksoidine ait spektrumlar Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

Difteri toksoidinin formülasyonlardaki miktarının ve formülasyonlardan in vitro salımının incelenebilmesi için çalışmamızda pH 7,4 PBS tamponu kullanılmıştır. Difteri toksoidinin bu ortamlar içindeki  $\lambda_{\max}$  değeri, mikropalak okuyucusundan alınan spektrumlardan yararlanılarak 560 nm bulunmuştur.



**Şekil 3.1.** Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS içindeki spektrumu

#### 3.1.4. Difteri Toksoidinin MikroBikinonik Asit (MikroBCA) Yöntemiyle Kalibrasyonuna Ait Bulgular

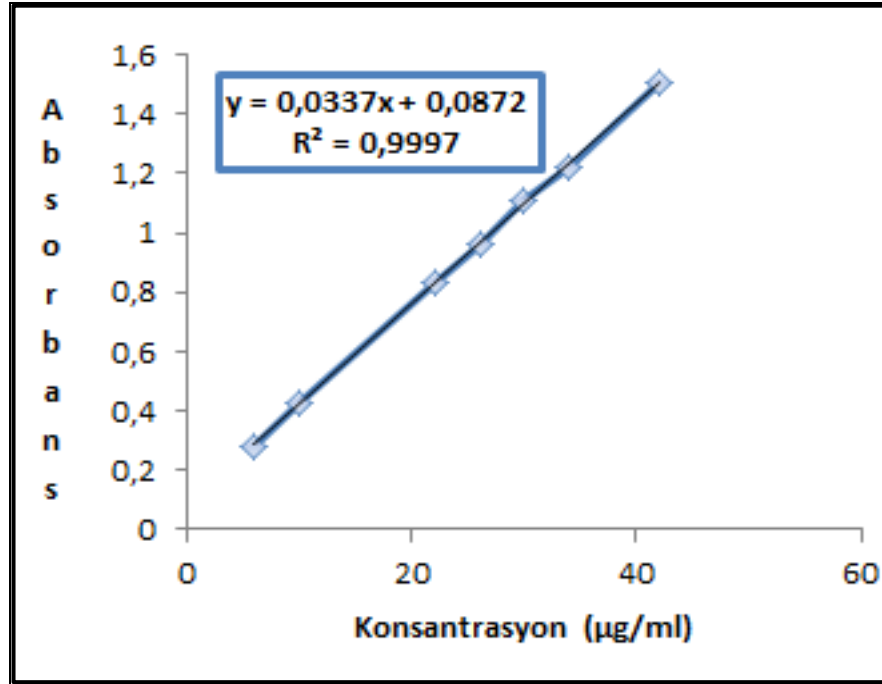
Bölüm 2.2.1.4'te anlatıldığı şekilde difteri toksoidinin PBS (pH 7,4) tamponu içinde yapılan ölçümler sonucu elde edilen kalibrasyon parametreleri ve kalibrasyon doğrusu sırasıyla Çizelge 3.1 ve Şekil 3.2'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Difteri toksoidinin kalibrasyon doğrularına ait parametreler

Ortam	Eğim $\pm$ SH*	Kesişim $\pm$ SH*	$r^2$
PBS (pH 7,4)	0,0337 $\pm$ 0,0001	0,0872 $\pm$ 0,0014	0,9997

\*SH: Standart Hata

Kalibrasyon doğrusuna ait  $r^2$  değerinin 1'e yakın ve standart hata değerlerinin düşük olması, okunan absorbanslardan belirlenen konsantrasyon değerlerinin güvenilir sonuçlarda olacağını göstermektedir (Çizelge 3.1).



Şekil 3.2. Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS içinde kalibrasyon grafiği

### 3.1.5. Difteri Toksoidinin Miktar Tayini için MikroBikinonik Asit (MikroBCA) Yönteminin Validasyonuna ait Bulgular

#### 3.1.5.1. Doğruluk

Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS çözeltisindeki miktar tayini yönteminin doğruluğunun belirlenmesi için üç farklı konsantrasyon noktasının altışar kez okunması ile elde edilen absorbans değerlerinden yola çıkılarak hesaplanan pratik konsantrasyon, % geri kazanım ve % geri kazanım değerlerinin ortalama, standart sapma ve % bağıl standart sapma değerleri hesaplanmış ve Çizelge 3.2'de bu değerler verilmiştir.



**Çizelge 3.2.** Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS içindeki doğruluk bulguları

Çözünme Ortamı: pH 7,4 Fosfat Tamponu					
Teorik Konsantrasyon: 6 µg/ml		Teorik Konsantrasyon: 10 µg/ml		Teorik Konsantrasyon: 22 µg/ml	
Pratik Konsantrasyon	%Geri Kazanım	Pratik Konsantrasyon	%Geri Kazanım	Pratik Konsantrasyon	%Geri Kazanım
5,840	97,33	10,083	100,830	21,893	99,514
5,869	97,82	10,053	100,530	21,804	99,109
5,810	96,83	10,024	100,240	21,834	99,245
5,751	95,85	9,964	99,640	21,982	99,918
5,780	96,33	10,113	101,130	22,101	100,459
5,751	95,85	10,231	102,310	22,368	101,673
Ort. % Geri Kazanım	96,67	Ort. % Geri Kazanım	100,780	Ort. % Geri Kazanım	99,986
± SS*	0,805	± SS*	0,908	± SS*	0,961
%Bağlı Standart Sapma	0,833	%Bağlı Standart Sapma	0,9	%Bağlı Standart Sapma	0,961

Elde edilen veriler % bağıl standart sapma değerlerinin %2'den küçük olma şartına göre yorumlanmış ve doğruluk tespit edilmiştir.

### 3.1.5.2. Kesinlik

Difteri toksoidinin PBS (pH 7,4) içindeki kalibrasyonunun kesinliğinin tayin edilmesinde tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik parametreleri incelenmiştir.

### 3.1.5.2.1. Tekrarlanabilirlik

Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS çözeltisindeki miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirliği belirlenmek için üç farklı konsantrasyonda altışar kez yapılan ölçümlere ait ortalama, standart sapma ve % bağıl standart sapma değerleri hesaplanmış ve Çizelge 3.3'te bu değerler gösterilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS ortamındaki tekrarlanabilirlik bulguları

Çözünme Ortamı: pH 7,4 Fosfat Tamponu					
Teorik Konsantrasyon: 6 µg/ml		Teorik Konsantrasyon: 10 µg/ml		Teorik Konsantrasyon: 22 µg/ml	
Absorbans	Kons.*	Absorbans	Kons.*	Absorbans	Kons.*
0,284	5,840	0,427	10,083	0,825	21,893
0,285	5,869	0,426	10,053	0,822	21,804
0,283	5,810	0,425	10,024	0,823	21,834
0,281	5,751	0,423	9,964	0,828	21,982
0,282	5,780	0,428	10,113	0,832	22,101
0,281	5,751	0,432	10,231	0,841	22,368
Ortalama	5,800	Ortalama	10,078	Ortalama	21,997
± SS*	0,048	± SS*	0,091	± SS*	0,211
%Bağıl Standart Sapma	0,83	%Bağıl Standart Sapma	0,9	%Bağıl Standart Sapma	0,959

Tekrarlanabilirlik için Çizelge 3.3'te gösterilen veriler % bağıl standart sapma değerlerinin %2'den küçük olma şartına göre yorumlanmış ve uygun oldukları tespit edilmiştir.

### 3.1.5.2.2. Ara Kesinlik

Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS çözeltisindeki miktar tayini yönteminin ara kesinliğini belirlemek için üç farklı konsantrasyonda iki farklı analist ile altışar kez yapılan ölçümlere ait ortalama, standart sapma ve % bağıl standart sapma değerleri hesaplanmış ve Çizelge 3.4’te bu değerler verilmiştir.

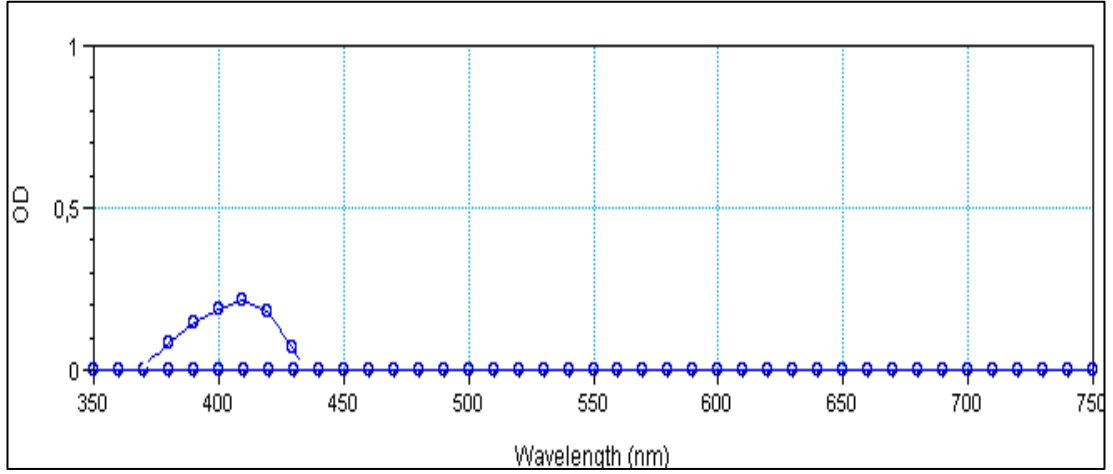
**Çizelge 3.4.** Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS ortamındaki ara kesinlik bulguları

Çözünme Ortamı: pH 7,4 Fosfat Tamponu						
Teorik Konsantrasyon: 6 µg/ml		Teorik Konsantrasyon: 10 µg/ml		Teorik Konsantrasyon: 22 µg/ml		
I. Analist (µg/ml)	II. Analist (µg/ml)	I. Analist (µg/ml)	II. Analist (µg/ml)	I. Analist (µg/ml)	II. Analist (µg/ml)	
5,751	5,788	9,982	10,143	22,105	22,041	
5,905	5,870	9,920	10,079	22,097	21,947	
5,790	5,943	10,12	10,024	21,852	21,843	
6,015	5,987	10,095	9,964	21,948	22,106	
5,920	5,810	9,996	9,850	22,256	22,523	
5,780	5,890	10,140	9,964	21,893	21,668	
Ortalama	5,860	5,881	10,042	10,004	22,025	22,021
± SS*	0,103	0,076	0,088	0,102	0,154	0,290
%Bağıl Standart Sapma	1,76	1,29	0,88	1,02	0,7	1,318

Ara kesinlik için Çizelge 3.4’te gösterilen veriler % bağıl standart sapma değerlerinin %2’den küçük olma şartına göre yorumlanmış ve uygun oldukları tespit edilmiştir. Ara kesinlikte elde edilen bulgulara SPSS istatistik programı kullanılarak ortalamalar arası farkın önem testi uygulandığında, ortalamalar arası farkın önemli olmadığı tespit edilmiştir ( $p>0,05$ ).

### 3.1.5.3. Özgünlük

Formülasyonlarda yer alan tüm maddelerin formülasyonda kullanılan miktarları üzerinden ayrı ayrı çözeltileri ile difteri toksoidi içermeyen boş mikropartiküler formülasyonlar hazırlanmıştır. Yardımcı maddelere ait çözeltiler ile %5 SDS içeren 1M NaOH / 1M HCl ile muamele edilen boş mikropartiküllerin 350-750 nm aralığında spektrumları alınmıştır (Şekil 3.3). Difteri toksoidinin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu olan 560 nm’de pik verip vermediklerine bakılmıştır. Kullanılan maddelerden hiçbiri bu aralıkta belirgin pik vermemiş olup böylece bu yöntemin difteri toksoidi miktarını tam olarak belirleyebildiği saptanmıştır.



Şekil 3.3. Boş mikropartiküllerin %5 SDS içeren 1M NaOH/1M HCl'deki spektrumu

### 3.1.5.4. Gözlenebilme Sınırı

Difteri toksoidinin stok çözeltisinden (190 µg/ml) hareketle seyreltmeler yapılarak yedi farklı dilüsyonu hazırlanmış ve üç paralel olacak şekilde mikroplağa uygulanmıştır. Hesaplanan absorbanslar konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrularının eğim ve kesişim değerlerinden Bölüm 2.2.1.5.4'te gösterildiği şekilde hesaplanan LOD değerleri Çizelge 3.5'te verilmiştir.

**Çizelge 3.5.** Difteri toksoidinin LOD değerleri

Çözünme Ortamı	LOD
pH 7,4 PBS	0,362 µg/ml

**3.1.5.5. Alt Tayin Sınırı**

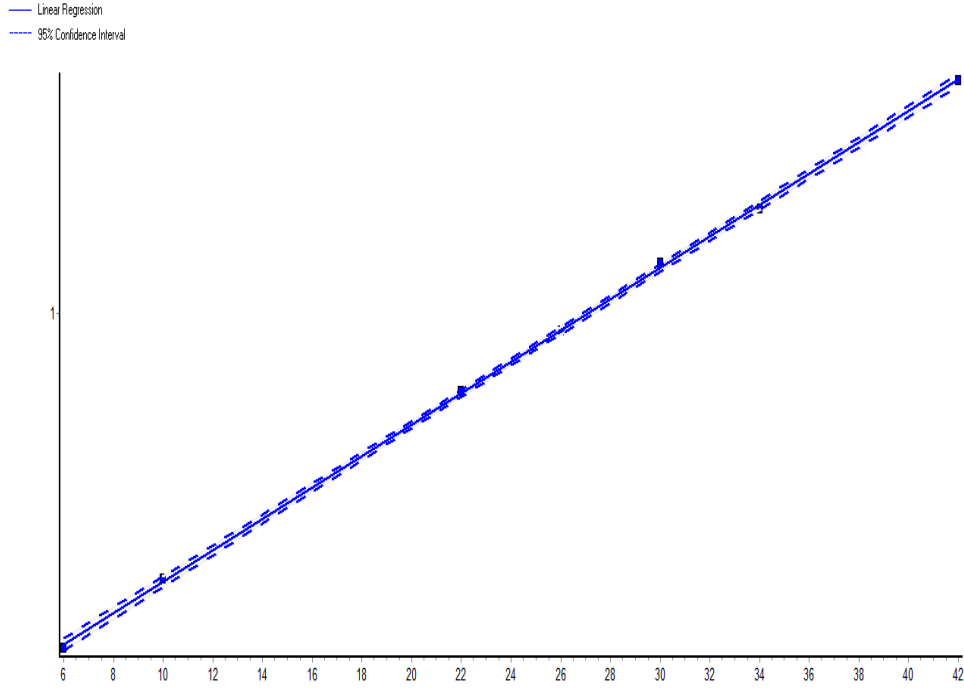
Difteri toksoidinin stok çözeltisinden (190 µg/ml) hareketle seyreltmeler yapılarak yedi farklı dilüsyonu hazırlanmış ve üç paralel olacak şekilde mikroplağa uygulanmıştır. Hesaplanan absorbanslar konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrularının eğim ve kesişim değerlerinden Bölüm 2.2.1.5.5'te gösterildiği şekilde hesaplanan LOQ değerleri Çizelge 3.6'da verilmiştir.

**Çizelge 3.6.** Difteri toksoidinin LOQ değerleri

Çözünme Ortamı	LOQ
pH 7,4 PBS	1,1 µg/ml

**3.1.5.6. Doğrusallık ve Aralık**

Difteri toksoidinin devamlı okunabileceği minimum ve maksimum konsantrasyonları arasından yedi nokta seçilmiş, PBS (pH 7,4) içinde 190 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan difteri toksoidinin stok çözeltilerinden hareketle 6 µg/ml ve 42 µg/ml arasındaki konsantrasyonlara seyreltmeler yapılmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerin absorbans değerleri 560 nm dalga boyunda okunmuştur. Bu verilerden hesaplanmış doğrusallık ve doğrusallık aralığına ait doğrular Şekil 3.4'te, bu doğrulara ait parametreler ise Çizelge 3.7'de verilmiştir. Hazırlanan konsantrasyonlara karşılık gelen alan değerleri kullanılarak "GraphPad InStat istatistik programı" yardımıyla elde edilen doğrunun %95 olasılıklı güven sınırları gösterilmiştir.



**Şekil 3.4.** Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS içinde doğrusallık grafiği

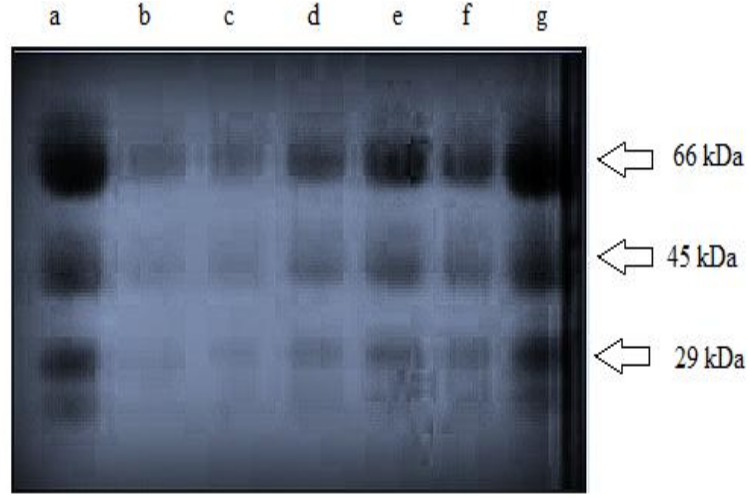
**Çizelge 3.7.** Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS tamponu içerisindeki doğrusallık parametreleri

Eğim (m)	0,03372
Eğimin Standart Hatası	0,000242
Eğimin %95 Olasılıklı Güven Aralığı	0,03310-0,03434
Korelasyon Katsayısı (r)	0,9999
Regresyon Katsayısı ( $r^2$ )	0,9997
Kesişim (n)	0,08715
Kesişimin Standart Hatası	0,006542
Kesişimin %95 Olasılıklı Güven Aralığı	0,07033-0,1040
Regresyon Doğrusundan Sapmaların Standart Hatası (Sy.x)	0,007604
Lineer regresyon kareler toplamı	1,123
Doğrusallıktan sapmaların kareler toplamı	$2,891 \times 10^{-4}$
Ortalamanın Artık Kareler Toplamı (RMS)	$5,783 \times 10^{-5}$

Doğrusallık deneyi sonucunda elde edilen doğruya ait  $r^2$  değerlerinin yüksek, regresyon doğrusundan sapmanın standart hatasının düşük oluşu, elde edilen verilerin güvenilirliğini göstermektedir.

### 3.1.6. Difteri Toksoidinin Saflık Tayinine Ait Bulgular

Bölüm 2.2.1.6'da anlatıldığı şekilde denatüre edici koşullar altında SDS-PAGE çalışmaları yürütülmüş ve difteri toksoidine ait tek zincir 66 kDa, A fragmanı 29 kDa, B fragmanı 45 kDa dolaylarında görülmüştür (Şekil 3.5). Bu bantların dışında farklı bantların gözlenmemesi safsızlıkların bulunmadığına işaret etmektedir.



**Şekil 3.5.** Difteri toksoidinin saflığını gösteren SDS-PAGE jeli; a: 1 µg/ml, b: 0,05 µg/ml, c: 0,1 µg/ml, d: 0,2 µg/ml, e: 0,4 µg/ml, f: 0,3 µg/ml, g: 0,5 µg/ml

### 3.1.7. Difteri Toksoidinin Stabilitesine Ait Bulgular

Stabilite çalışması kapsamında difteri toksoidinin miktar tayini Bölüm 2.2.1.4'te anlatıldığı şekilde mikroBCA yöntemiyle yürütülmüştür. Elde edilen bulgular Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.8.** 2-8°C'de bekletilen difteri toksoidinin % kalan miktarı (n=3, Ortalama ± SH)

Aylar	Başlangıç	I. ay	III. ay	VI. ay
Kalan difteri toksoidi miktarı (%)	99,85	99,78	99,44	98,63
2-8°C (Buzdolabı) ± SH*	± 0,27	± 0,18	± 0,33	± 0,24

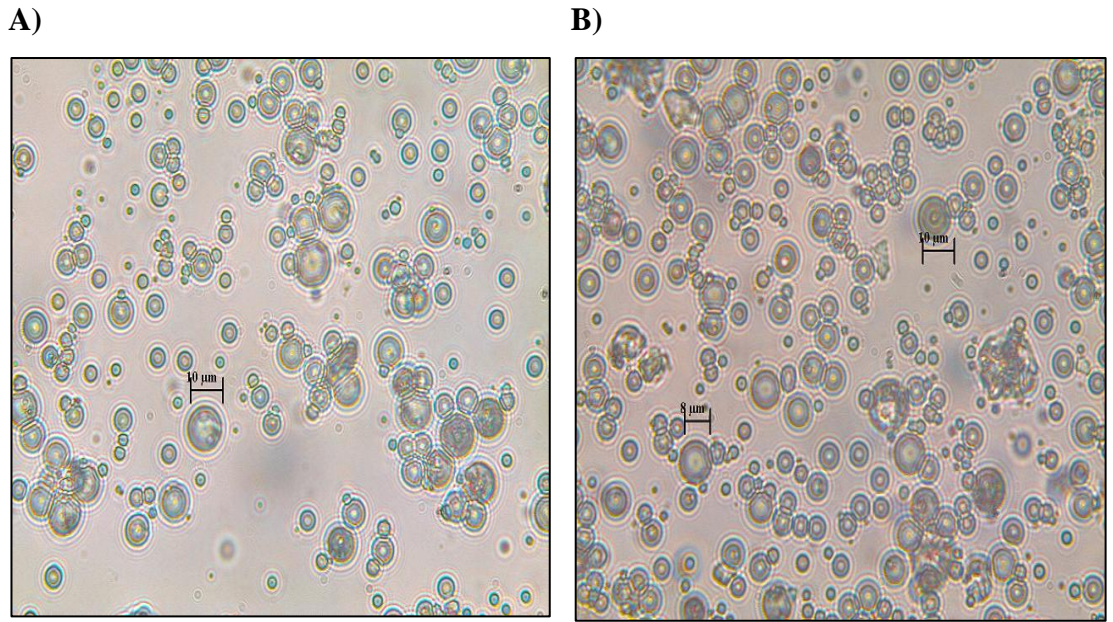
\*SH: Standart Hata

### 3.2. Mikropartiküler Yapıdaki Ön Formülasyonların Karakterizasyonu

Ön formülasyonların karakterizasyonlarında morfoloji, enkapsülasyon etkinliği ve üretim verimi incelenmiştir. Bu parametrelere ait sonuçlar ilerleyen bölümlerde sunulmaktadır.

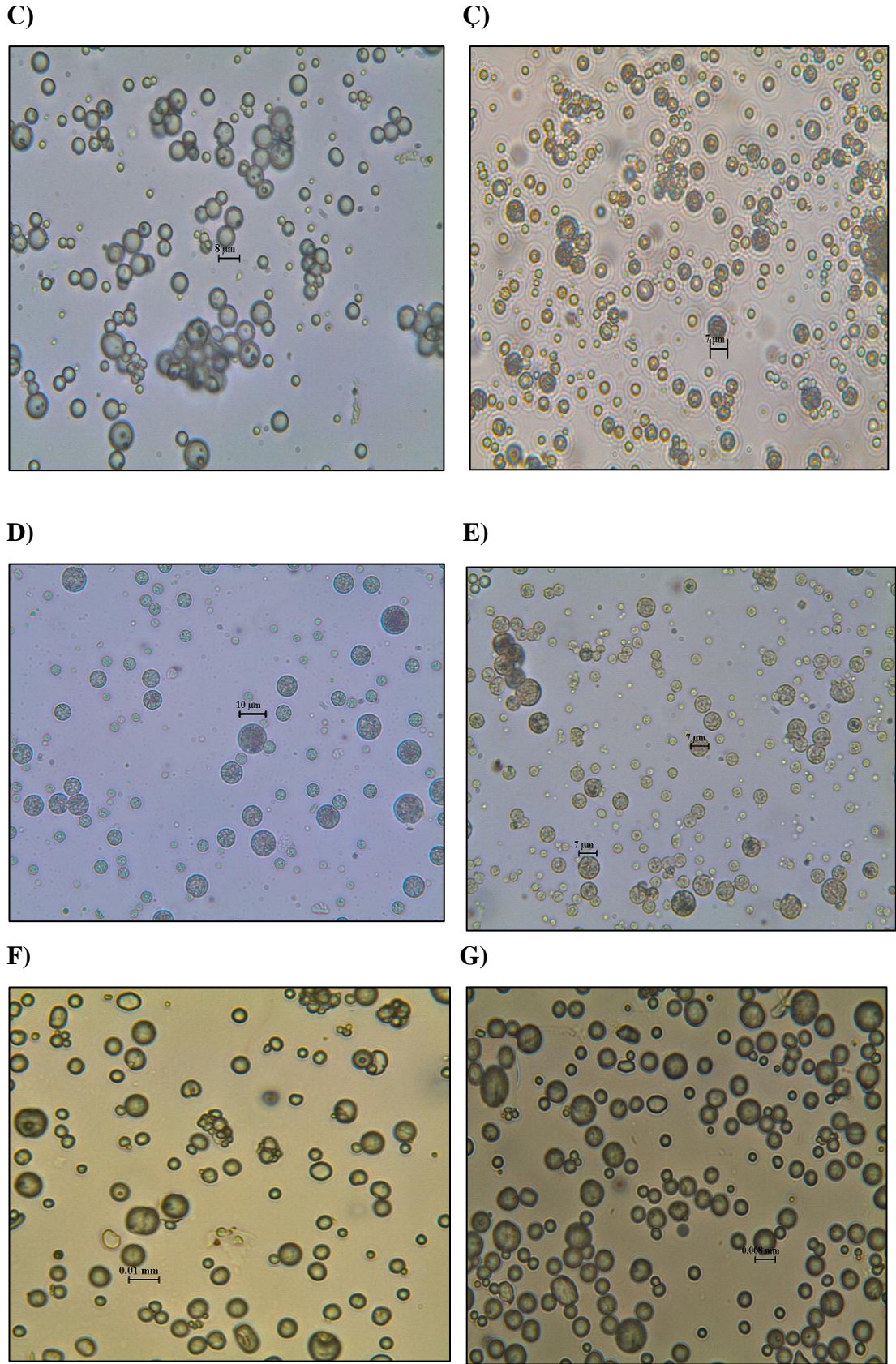
#### 3.2.1. Mikropartiküler Yapıdaki Ön Formülasyonların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

Bölüm 2.2.3.1’de anlatıldığı şekilde mikropartiküler yapıdaki ön formülasyonların optik mikroskopta dijital fotoğrafları çekilmiştir. Mikropartikül formülasyonlarına ait mikroskop ile çekilen fotoğraflar Şekil 3.6’da yer almaktadır.



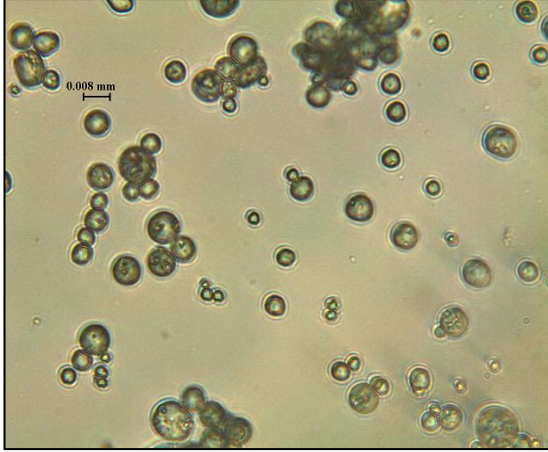
**Şekil 3.6.** Mikropartiküler yapıdaki ön formülasyonlara ait optik mikroskop görüntüleri. A) F1 B) F2



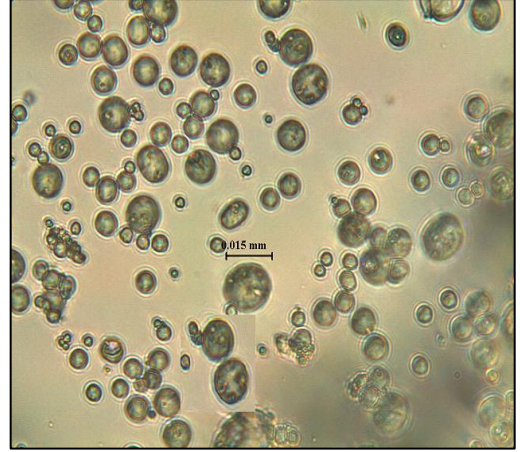


**Şekil 3.6. Devam** Mikropartiküler yapıdaki ön formülasyonlara ait optik mikroskop görüntüleri. C) F3 Ç) F4 D) F5 E) F6 F) F7 G) F8

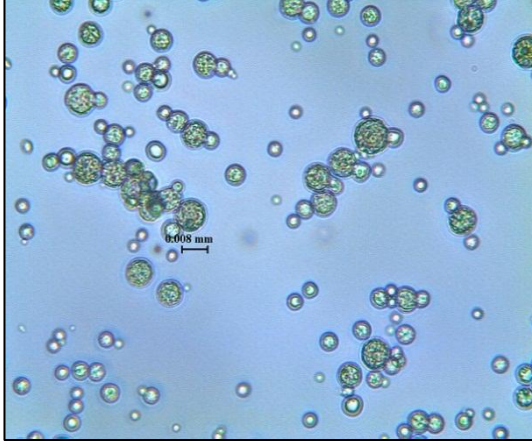
Ğ)



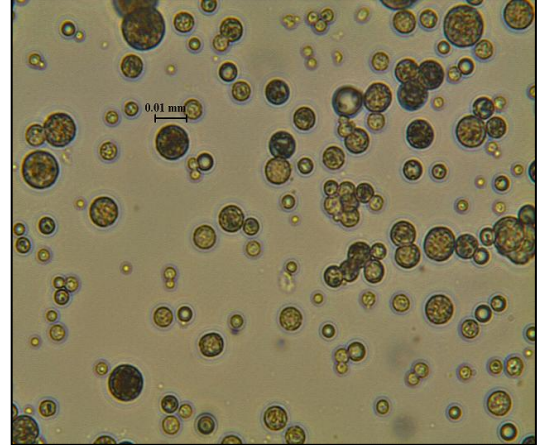
H)



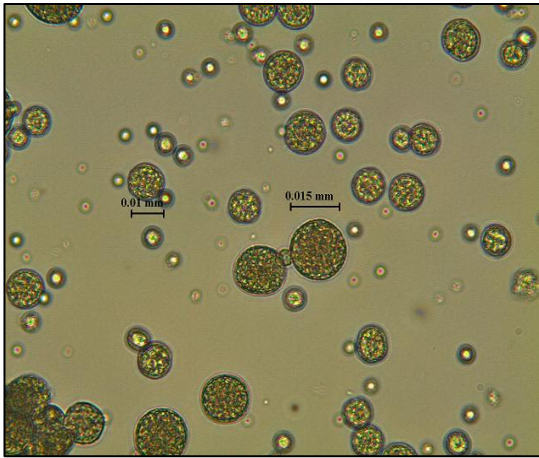
D)



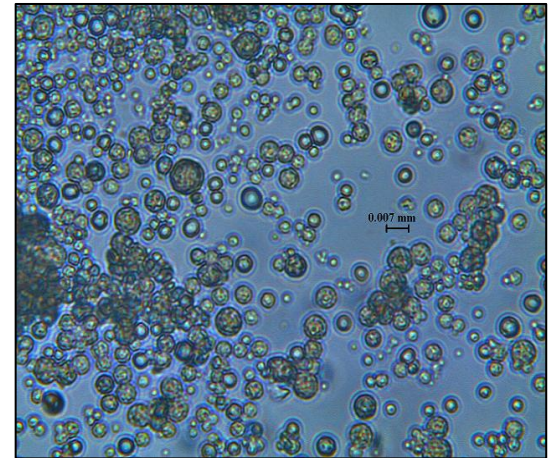
İ)



J)

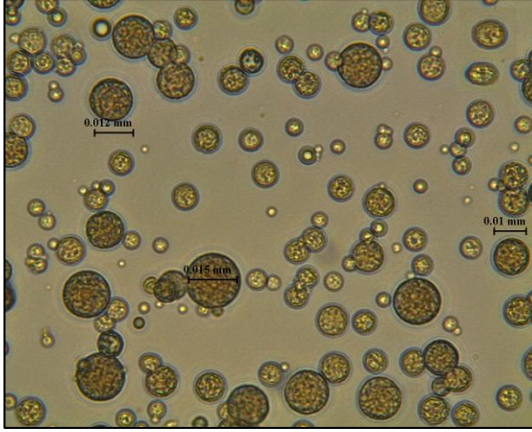


K)

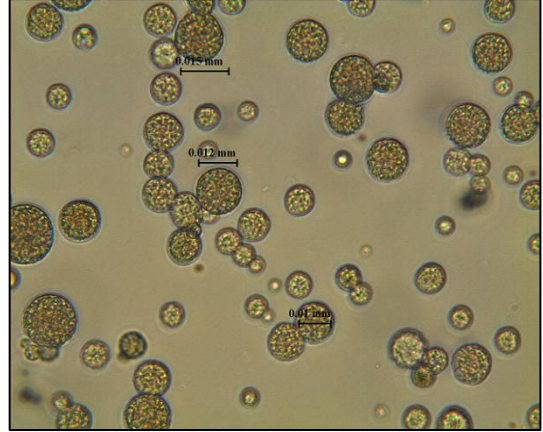


**Şekil 3.6. Devam** Mikropartiküler yapıdaki ön formülasyonlara ait optik mikroskop görüntüleri. Ğ) F9 H) F10 İ) F11 İ) F12 J) F13 K) F14

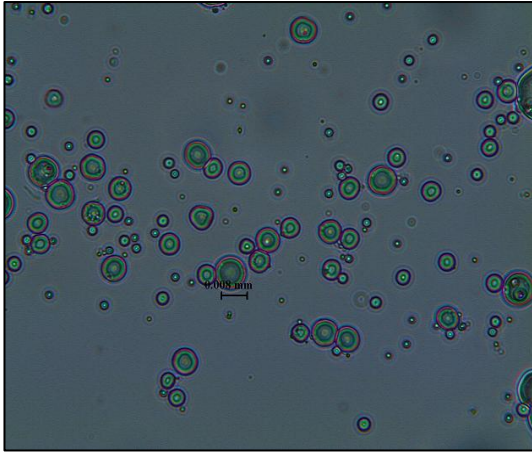
L)



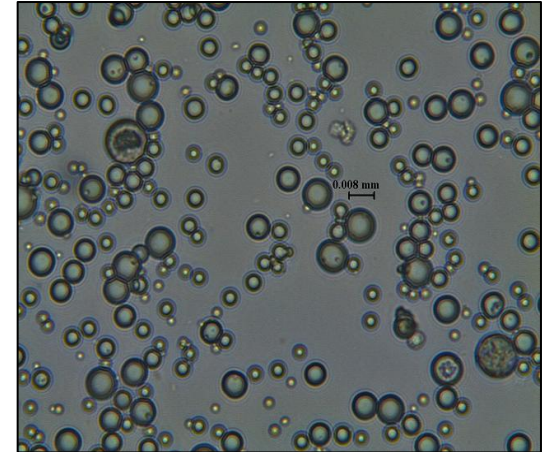
M)



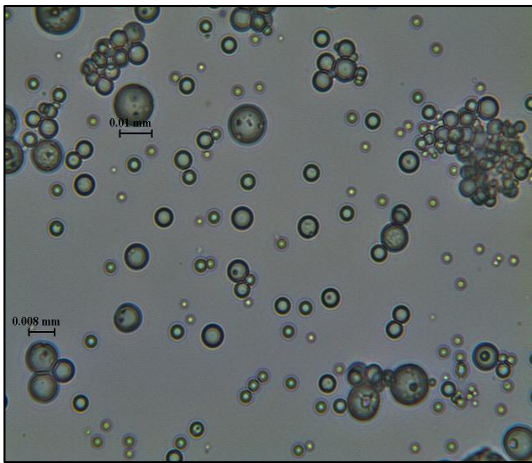
N)



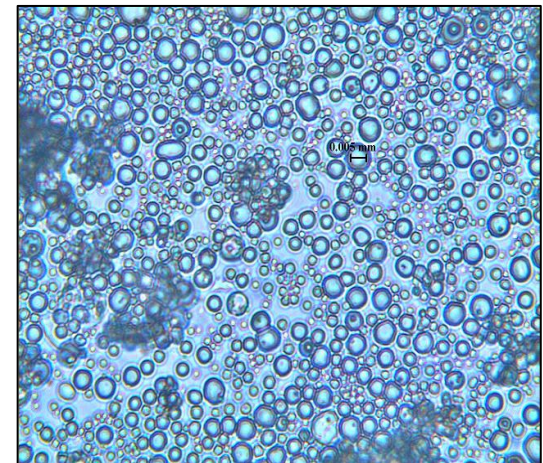
O)



Ö)

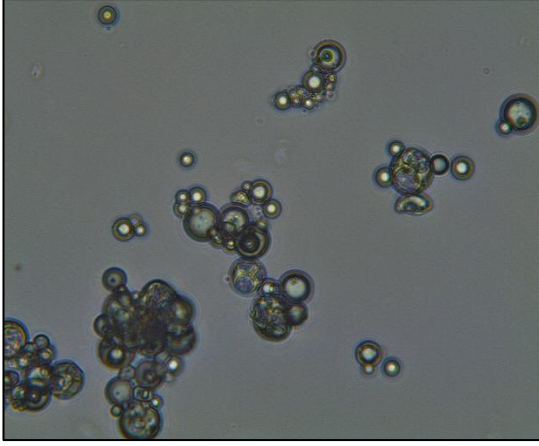


P)



**Şekil 3.6. Devam** Mikropartiküler yapıdaki ön formülasyonlara ait optik mikroskop görüntüleri. L) F15 M) F16 N) F17 O) F18 Ö) F19 P) F20

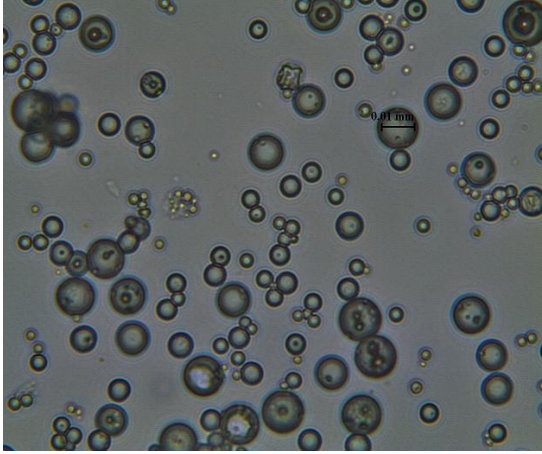
R)



S)



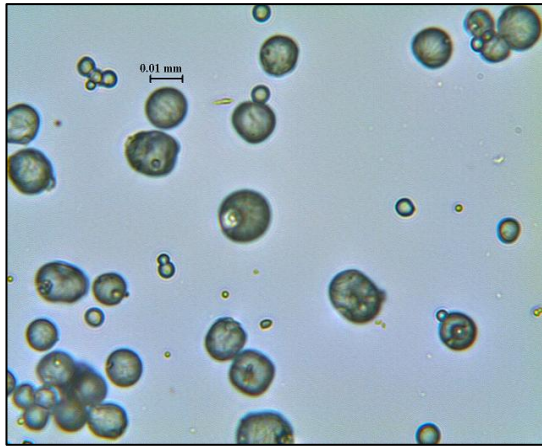
Ş)



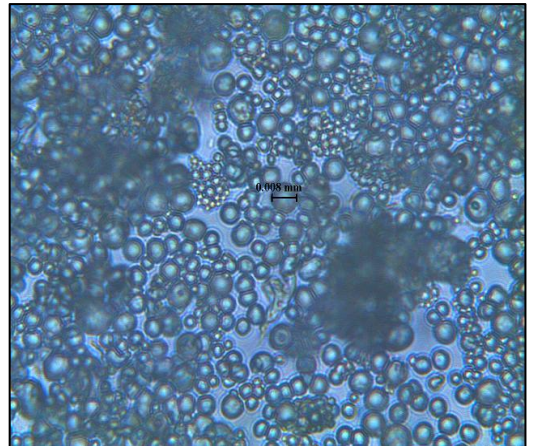
T)



U)

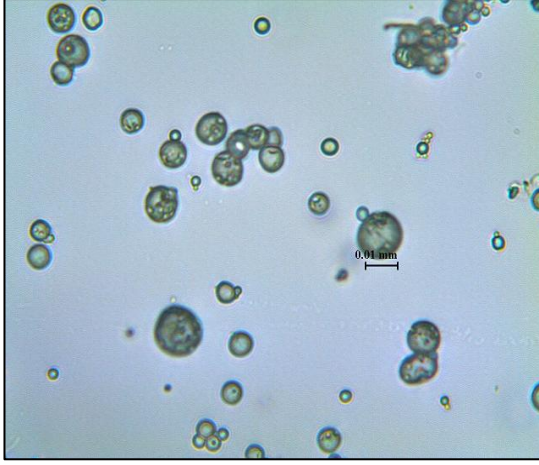


Ü)



**Şekil 3.6. Devam** Mikropartiküler yapıdaki ön formülasyonlara ait optik mikroskop görüntüleri. R) F21 S) F22 Ş) F23 T) F24 U) F25 Ü) F26

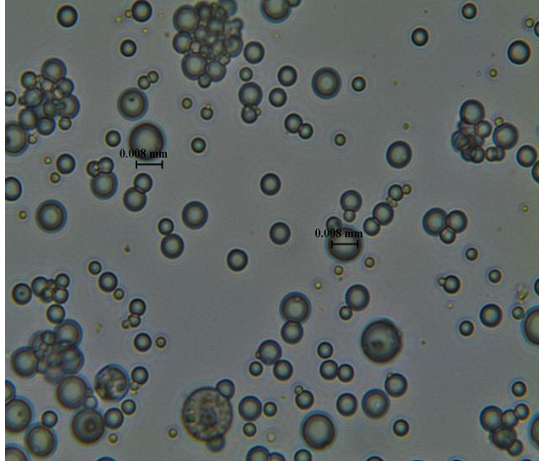
V)



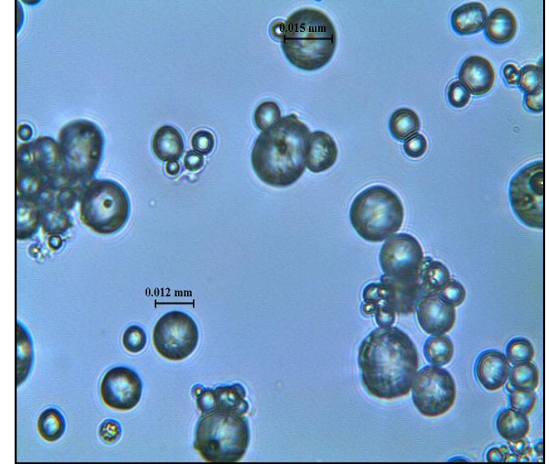
Y)



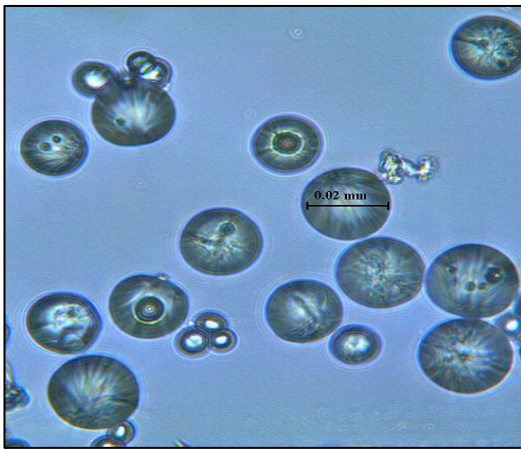
Z)



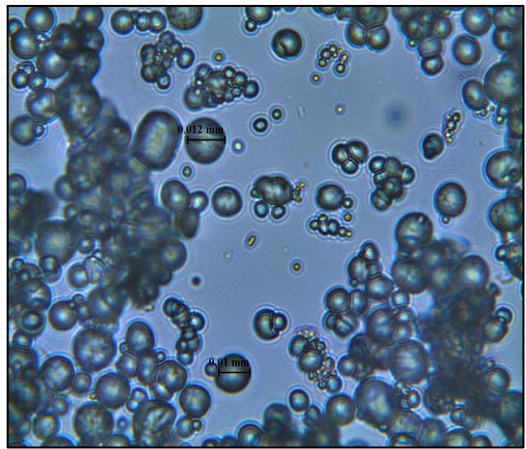
Za)



Zb)

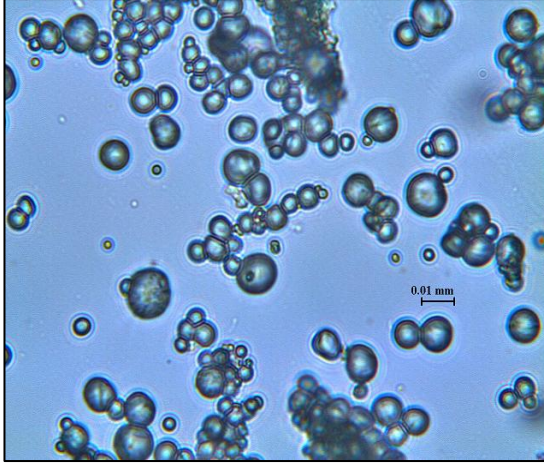


Zc)

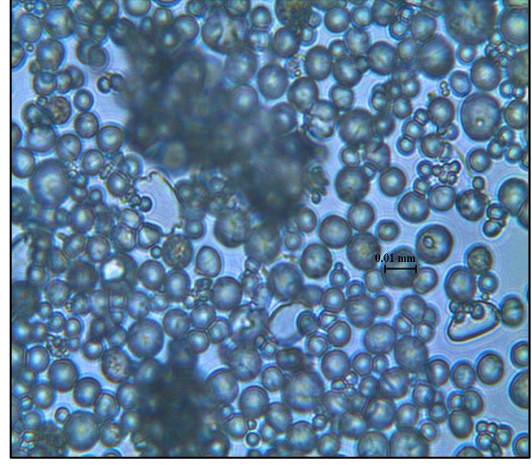


**Şekil 3.6. Devam** Mikropartiküler yapıdaki ön formülasyonlara ait optik mikroskop görüntüleri. V) F27 Y) F28 Z) F29 Za) F30 Zb) F31 Zc) F32

Zç)



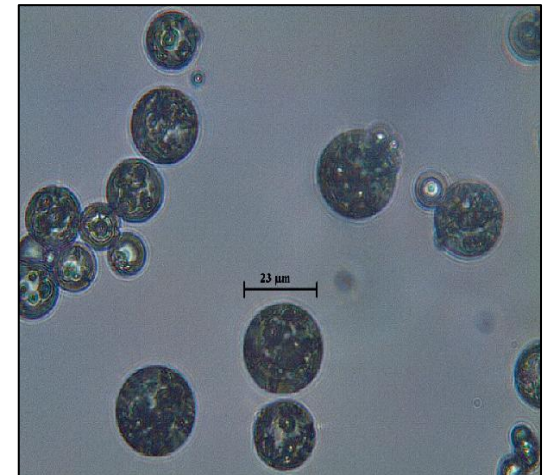
Zd)



Ze)



Zf)



**Şekil 3.6. Devam** Mikropartiküler yapıdaki ön formülasyonlara ait optik mikroskop görüntüleri. Zç) F33 Zd) F34 Ze) F35 Zf) F36

### 3.2.2. Mikropartiküler Yapıdaki Ön Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinlikleri ve Üretim Verimleri Tayinine İlişkin Bulgular

Bölüm 2.2.3.2’de anlatıldığı şekilde mikropartiküler yapıdaki ön formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri ve üretim verimleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.9’da sunulmaktadır.

**Çizelge 3.9.** Mikropartiküler yapıdaki ön formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri ve üretim verimleri (n=3)

Formül Kodu:	Polimer tipi	Antijen miktarı (mg)	Primer emülsiyon oluşturmak için kullanılan karıştırıcı	Eklenen Pluronic tipi	Eklenen Pluronic miktarı	Enkapsülasyon etkinliği (%) ± SS*	Üretim Verimi (%)
F1	PLGA	4	Homojenizatör	-	-	22,8 ± 1,45	77
F2	PLGA	10	Homojenizatör	-	-	36 ± 1,00	73,3
F3	PLGA	20	Homojenizatör	-	-	23,6 ± 0,96	72
F4	PLGA	4	Sonikatör	-	-	61,3 ± 1,21	86
F5	PLGA	10	Sonikatör	-	-	54 ± 0,68	61
F6	PLGA	20	Sonikatör	-	-	44,7 ± 1,68	84
F7	PCL (14kDa)	4	Homojenizatör	-	-	22,7 ± 2,28	96,3
F8	PCL (14kDa)	10	Homojenizatör	-	-	27,8 ± 0,73	83,3
F9	PCL (14kDa)	4	Sonikatör	-	-	35,5 ± 1,92	99

SS: Standart Sapma

**Çizelge 3.9. Devam** Mikropartiküler yapıdaki ön formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri ve üretim verimleri (n=3)

Formül Kodu	Polimer tipi	Antijen miktarı (mg)	Primer emülsiyon oluşturmak için kullanılan karıştırıcı	Eklenen Pluronic tipi	Eklenen Pluronic miktarı	Enkapsülasyon etkinliği (%) ± SS*	Üretim Verimi (%)
F10	PCL (14kDa)	10	Sonikatör	-	-	29,6 ± 1,53	85
F11	PLGA	10	Sonikatör	Pluronic F-68	%1	58,1 ± 0,44	78,8
F12	PLGA	10	Sonikatör	Pluronic F-68	%6	58,6 ± 0,30	76
F13	PLGA	10	Sonikatör	Pluronic F-68	%15	57,3 ± 1,20	70
F14	PLGA	10	Sonikatör	Pluronic F-127	%1	65,8 ± 1,00	80
F15	PLGA	10	Sonikatör	Pluronic F-127	%6	55,6 ± 1,67	79,3
F16	PLGA	10	Sonikatör	Pluronic F-127	%15	53,2 ± 1,03	72,1
F17	PLGA	10	Homojenizatör	Pluronic F-68	%1	42 ± 1,57	70,6
F18	PLGA	10	Homojenizatör	Pluronic F-68	%6	46,4 ± 1,19	61,3
F19	PLGA	10	Homojenizatör	Pluronic F-68	%15	40,5 ± 0,98	56,8
F20	PLGA	10	Homojenizatör	Pluronic F-127	%1	40 ± 1,62	75

SS: Standart Sapma



**Çizelge 3.9. Devam** Mikropartiküler yapıdaki ön formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri ve üretim verimleri (n=3)

Formül Kodu	Polimer tipi	Antijen miktarı (mg)	Primer emülsiyon oluşturmak için kullanılan karıştırıcı	Eklenen Pluronic tipi	Eklenen Pluronic miktarı	Enkapsülasyon etkinliği (%) ± SS*	Üretim Verimi (%)
F21	PLGA	10	Homojenizatör	Pluronic F-127	%6	47,8 ± 0,68	72
F22	PLGA	10	Homojenizatör	Pluronic F-127	%15	37,6 ± 0,97	63,1
F23	PCL (14kDa)	10	Sonikatör	Pluronic F-68	%1	30,3 ± 1,13	72,8
F24	PCL (14kDa)	10	Sonikatör	Pluronic F-68	%6	11,4 ± 1,54	78,3
F25	PCL (14kDa)	10	Sonikatör	Pluronic F-68	%15	13,1 ± 2,48	64,3
F26	PCL (14kDa)	10	Sonikatör	Pluronic F-127	%1	16,3 ± 1,87	75
F27	PCL (14kDa)	10	Sonikatör	Pluronic F-127	%6	12,1 ± 0,76	74,2
F28	PCL (14kDa)	10	Sonikatör	Pluronic F-127	%15	11,4 ± 1,37	67,4
F29	PCL (14kDa)	10	Homojenizatör	Pluronic F-68	%1	35,8 ± 1,54	75,4
F30	PCL (14kDa)	10	Homojenizatör	Pluronic F-68	%6	25,5 ± 2,09	66,2

SS: Standart Sapma

**Çizelge 3.9. Devam** Mikropartiküler yapıdaki ön formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri ve üretim verimleri

Formül Kodu	Polimer tipi	Antijen miktarı (mg)	Primer emülsiyon oluşturmak için kullanılan karıştırıcı	Eklenen Pluronic tipi	Eklenen Pluronic miktarı	Enkapsülasyon etkinliği (%) ± SS*	Üretim Verimi (%)
F31	PCL (14kDa)	10	Homojenizatör	Pluronic F-68	%15	21,6 ± 0,77	60,5
F32	PCL (14kDa)	10	Homojenizatör	Pluronic F-127	%1	13 ± 2,53	77
F33	PCL (14kDa)	10	Homojenizatör	Pluronic F-127	%6	7,8 ± 1,47	73
F34	PCL (14kDa)	10	Homojenizatör	Pluronic F-127	%15	16,3 ± 1,32	64
F35	PCL (70-90 kDa)	10	Homojenizatör	Pluronic F-68	%1	40,5 ± 1,55	74,6
F36	PCL (70-90 kDa)	10	Sonikatör	Pluronic F-68	%1	48,7 ± 0,97	70,8

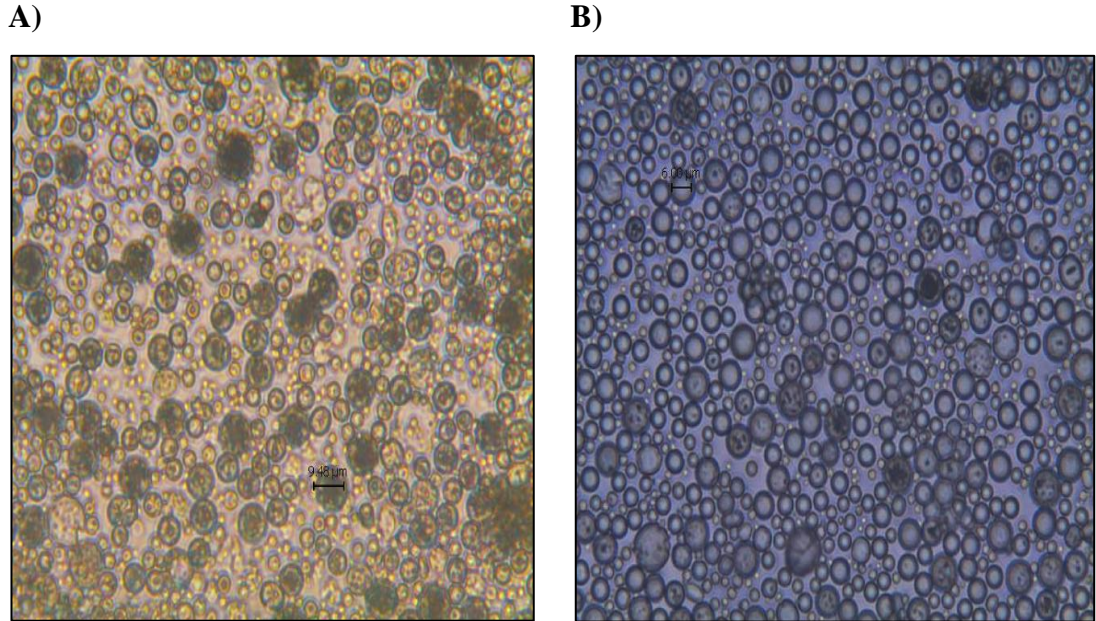
SS: Standart Sapma

### 3.3. Difteri Toksoidi İçeren Mikropartiküler Formülasyonların Karakterizasyonu

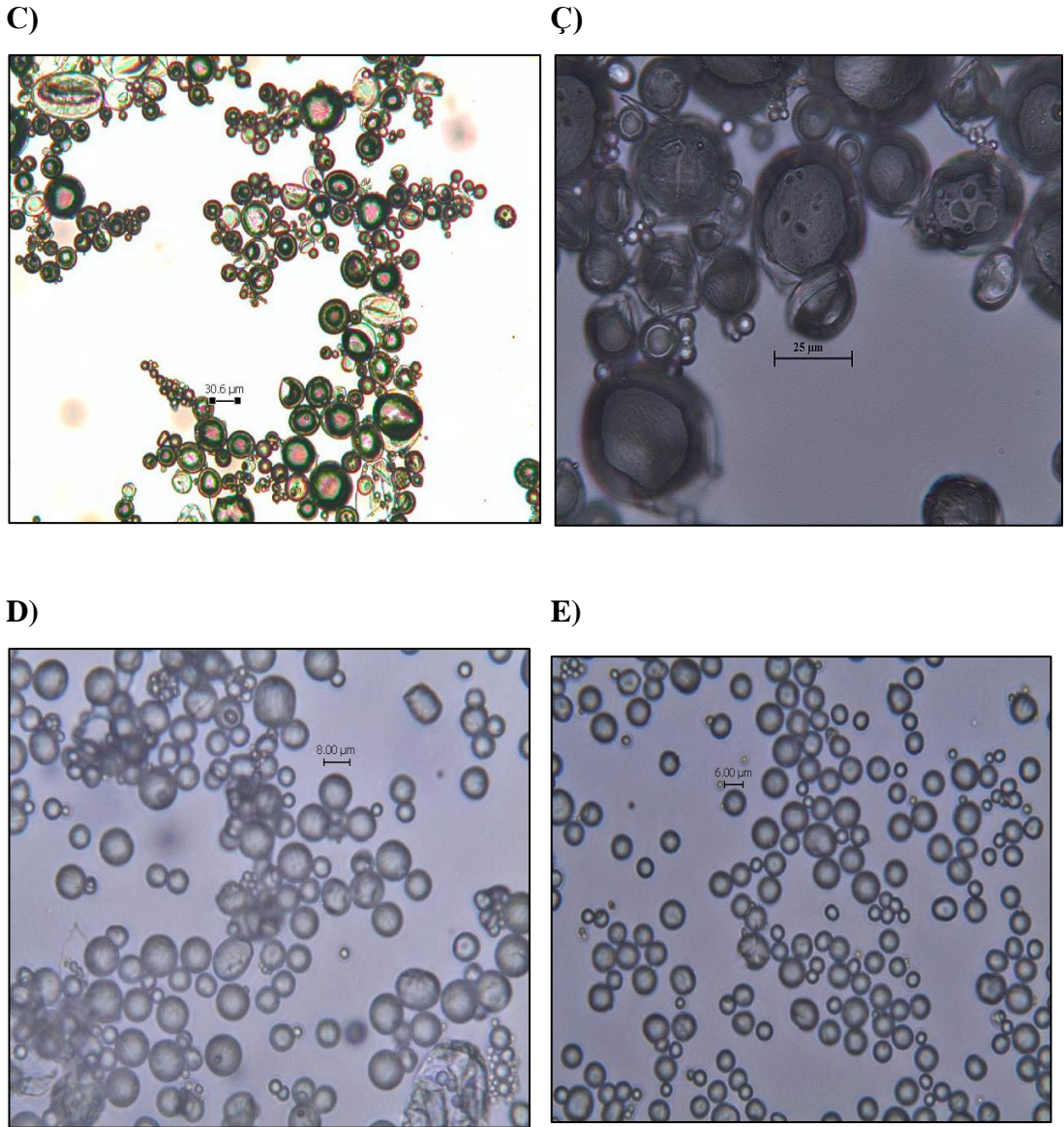
Çizelge 3.9’da koyu renk ile gösterilen formülasyonların optimal formülasyonlar olduğuna karar verilmiş ve çalışmalara bu formülasyonlarla devam edilmiştir. Çizelge 2.4’te sunulan difteri toksoidi içeren mikropartiküler formülasyonların karakterizasyonları için morfoloji, partikül büyüklüğü ve dağılımı, enkapsülasyon etkinliği ve üretim verimi, invitro salım parametreleri incelenmiştir. Bu parametrelere ait sonuçlar ilerleyen bölümlerde sunulmaktadır.

#### 3.3.1. Difteri Toksoidi İçeren Mikropartiküler Formülasyonların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

Difteri toksoidi içeren mikropartikül formülasyonlarına ait optik mikroskop ile çekilen fotoğraflar Şekil 3.7’de yer almaktadır.



**Şekil 3.7.** Difteri toksoidi içeren mikropartikül formülasyonlarına ait optik mikroskop görüntüleri. A) D1 B) D2 C) D3 Ç) D4 D) D5 E) D6

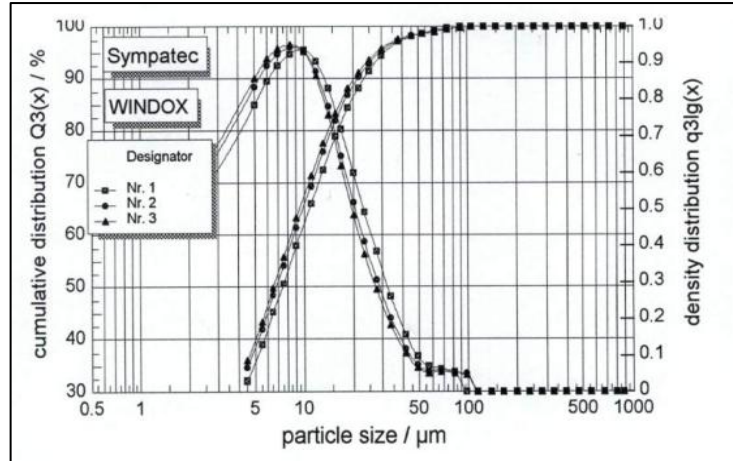


Şekil 3.7. Devam

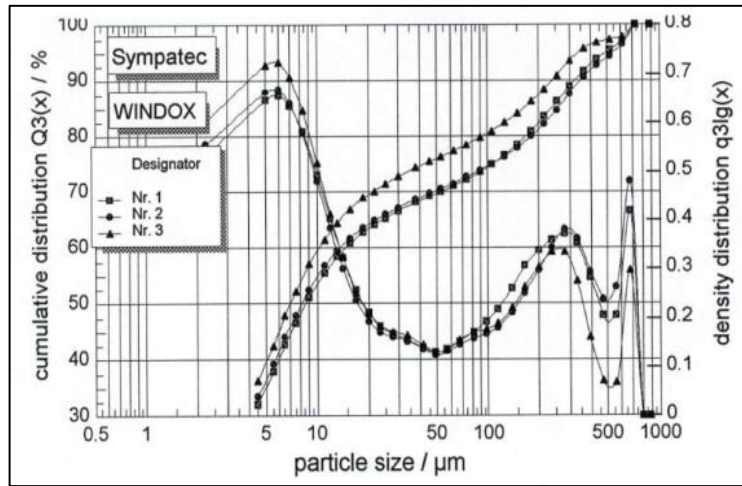
### 3.3.2. Difteri Toksoidi İçeren Mikropartiküler Formülasyonların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımlarının Belirlenmesine Ait Bulgular

Bölüm 2.2.3.2’de anlatıldığı şekilde mikropartikülerin geometrik ortalama çapları lazer kırınımı granülometresi kullanılarak hesaplanmıştır. Mikropartiküllerin partikül büyüklüğü - % hacim dağılımı grafikleri Şekil 3.8’de, geometrik ortalama çap değerleri ise Çizelge 3.10’da sunulmaktadır.

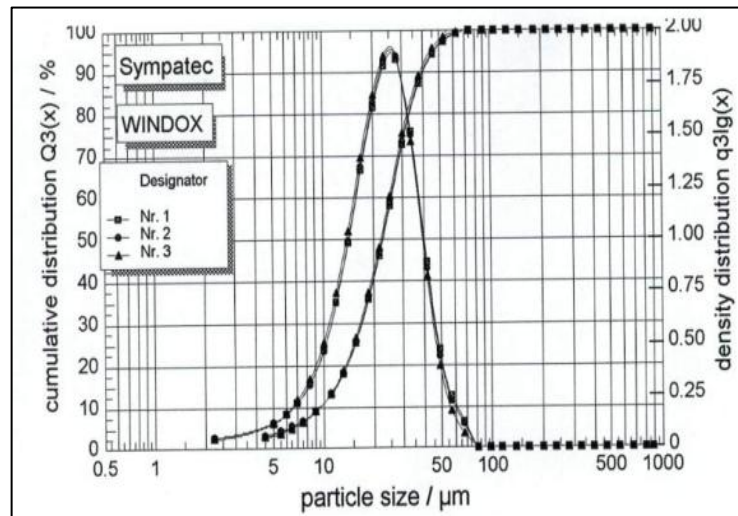
A)



B)

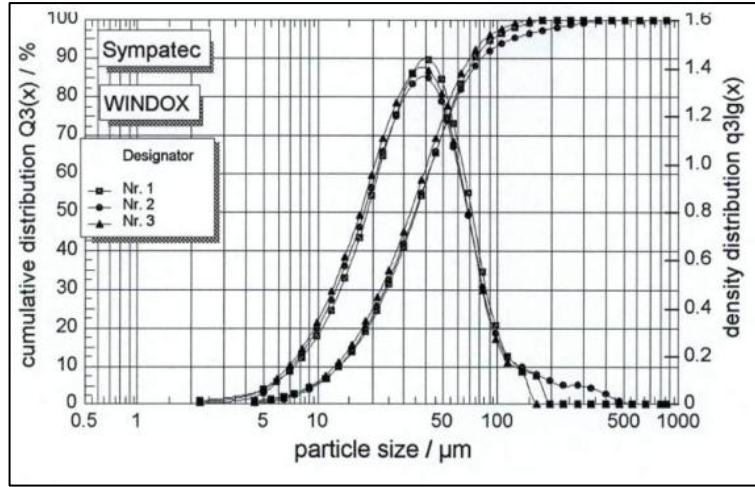


C)

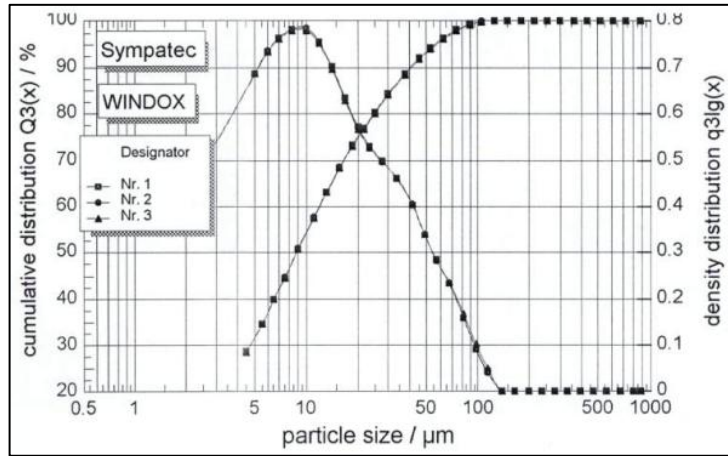


**Şekil 3.8.** Difteri toksoidi içeren mikropartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü - % hacim dağılımı grafikleri. A) D1 B) D2 C) D3 Ç) D4 D) D5 E) D6

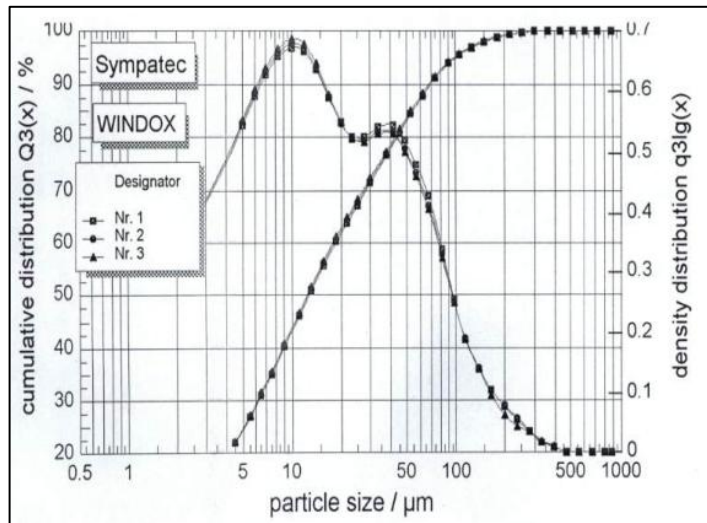
C)



D)



E)



Şekil 3.8. Devam

**Çizelge 3.10.** Difteri toksoidi içeren mikropartikül formülasyonlarına ait lazer kırınımı yöntemi ile bulunan geometrik ortalama çaplar (n=3)

<b>Formül Kodu</b>	<b>Geometrik ortalama çap (<math>\mu\text{m}</math>) <math>\pm</math> SS*</b>
D1	6,93 $\pm$ 0,45
D2	7,98 $\pm$ 0,83
D3	22,47 $\pm$ 0,31
D4	34,4 $\pm$ 1,22
D5	8,88 $\pm$ 0,02
D6	12,6 $\pm$ 0,19

SS: Standart Sapma

### **3.3.3. Difteri Toksoidi İçeren Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinlikleri ve Üretim Verimleri Tayinine İlişkin Bulgular**

Çizelge 3.11’de difteri toksoidi içeren formülasyonlara ait enkapsülasyon etkinlikleri ve üretim verimleri sunulmaktadır.

**Çizelge 3.11.** Difteri toksoidi içeren formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri ve üretim verimleri

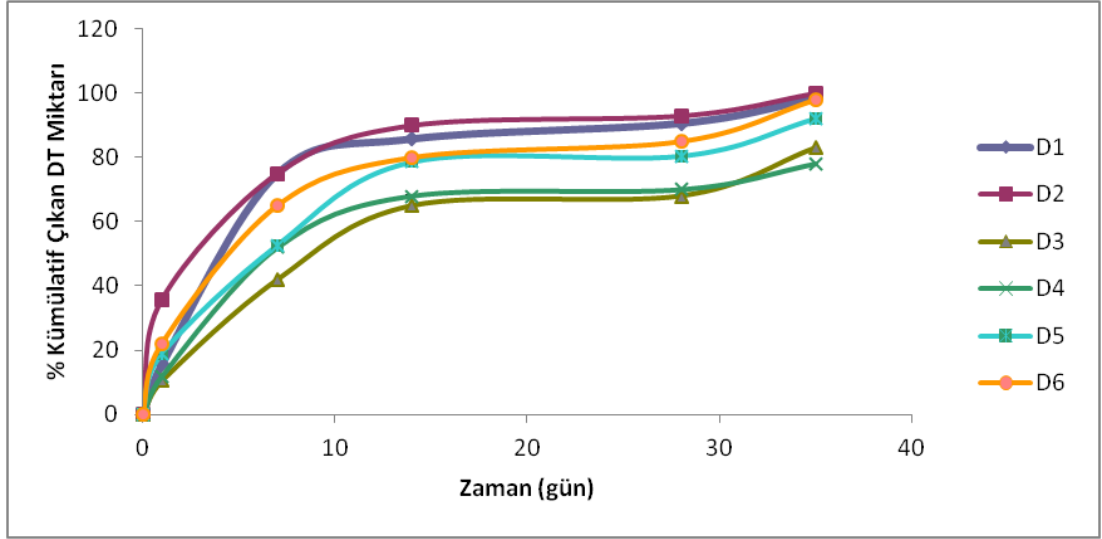
Formül Kodu	Polimer tipi	Antijen miktarı (mg)	Primer emülsiyon oluşturmak için kullanılan karıştırıcı	Eklenen Pluronic tipi	Eklenen Pluronic miktarı	Kriyo protektan İlavesi (1000'de 1 oranında mannitol)	Enkapsülasyon etkinliği (%) ± SS*	Üretim Verimi (%)
D1	PLGA	75,8 (144 µg protein)	Homojenizatör	F-68	%1	+	60,6 ± 0,39	88,38
D2	PLGA	75,8 (144 µg protein)	Sonikatör	F-68	%1	+	53,7 ± 1,53	87,23
D3	PCL (70-90 kDa)	75,8 (144 µg protein)	Homojenizatör	F-68	%1	+	46,8 ± 1,97	73,57
D4	PCL (70-90 kDa)	75,8 (144 µg protein)	Sonikatör	F-68	%1	+	52,6 ± 1,08	74
D5	PCL (14 kDa)	75,8 (144 µg protein)	Homojenizatör	F-68	%1	+	55,7 ± 0,86	88,3
D6	PCL (14 kDa)	75,8 (144 µg protein)	Sonikatör	F-68	%1	+	45,9 ± 1,68	88,96

SS: Standart Sapma



### 3.3.4. Difteri Toksoidi İçeren Formülasyonların In vitro Salım Çalışmalarına Ait Bulgular

Bölüm 2.2.4.4’te anlatıldığı şekilde membran içermeyen yöntemin kullanıldığı in vitro salım çalışmaları sonucunda difteri toksoidinin formülasyonlardan zamana karşı salım profili Şekil 3.9’da görülmektedir.



**Şekil 3.9.** D1, D2, D3, D4, D5 ve D6 kodlu formülasyonlardan difteri toksoidinin in vitro salım profilleri

### 3.3.5. In vitro Salım Hızı Deneylerinin Kinetik Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Elde edilen mikropartiküllerden pH 7,4 PBS tamponu içinde mikroBCA analiz yöntemi ile hesaplanan difteri toksoidi çıkışının uyum sağladığı kinetik mekanizmaların belirlenmesi amacıyla, hesaplanan verilerin sıfır derece, birinci derece, Higuchi kinetiklerine uyumları değerlendirilmiştir. Çizelge 3.12’de in vitro salım hızı kinetiklerine ait parametreler yer almaktadır.

Çizelge 3.12. Difteri toksoidi içeren formülasyonların salım hızı kinetik verileri

Kinetik Mekanizma		Formülasyonlar					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6
Sıfır derece	* $k_0$ ( $\mu\text{g/gün}$ )	3,422	3,514	2,671	2,669	3,094	3,285
	** $r^2$	0,85	0,828	0,914	0,87	0,887	0,871
	***SH	0,72	0,802	0,411	0,515	0,553	0,632
	****AOKT	1169,473	1451,332	380,627	598,886	689,371	902,056
Birinci derece	***** $k_1$ ( $\text{gün}^{-1}$ )	0,039	0,023	0,048	0,041	0,037	0,033
	** $r^2$	0,516	0,618	0,651	0,562	0,658	0,623
	***SH	0,022	0,011	0,020	0,021	0,015	0,015
	****AOKT	0,381	0,09	0,325	0,354	0,193	0,182
Higuchi	***** $k_h$ ( $\text{gün}^{-1/2}$ )	18,774	19,467	14,302	14,54	16,767	17,916
	** $r^2$	0,964	0,957	0,987	0,974	0,982	0,977
	***SH	1,823	2,061	0,814	1,197	1,142	1,387
	****AOKT	282,534	360,892	56,319	121,713	110,909	163,61

\* $k_0$  : Sıfır derece salım hız sabiti ( $\mu\text{g/gün}$ )

\*\* $r^2$  : Determinasyon katsayısı

\*\*\*SH : Standart hata

\*\*\*\*AOKT : Artık ortalama kareler toplamı

\*\*\*\*\* $k_1$  : Birinci derece salım hız sabiti ( $\text{gün}^{-1}$ )

\*\*\*\*\* $k_h$  : Higuchi salım hız sabiti ( $\text{gün}^{-1/2}$ )

### 3.3.6. Difteri Toksoidi İçeren D1 ve D5 Kodlu Formülasyonlara Ait Ön Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular

Difteri toksoidi içeren D1 ve D5 kodlu formülasyonların ön stabilite çalışmaları, 3 ay süreyle 2-8°C'de buzdolabında ve 25±2°C, %60 bağıl nemdeki iklim dolabında bekletilmesiyle yapılmıştır.

Bölüm 2.2.1.4'te belirtilen şekilde yapılan miktar tayinine ait veriler Çizelge 3.13 ve 3.14'te, Bölüm 2.2.1.6'da belirtilen şekilde ancak denatüre edici olmayan koşullar altında yapılan protein bütünlüğünün korunup korunmadığının anlaşılmasına ait PAGE verileri ise Şekil 3.10 ve 3.11'de sunulmaktadır. Miktar tayinlerinde zamanla meydana gelen değişiklikler değerlendirildiğinde hem 2-8°C'de saklanan formülasyonlar hem de 25±2°C'de saklanan formülasyonlar için anlamlı farklılıklar bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

**Çizelge 3.13.** Difteri toksoidi içeren ve 2-8°C'de saklanan formülasyonların belirli zaman aralıklarında ölçülen difteri toksoidi miktarları (n=3, Ortalama ± SS)

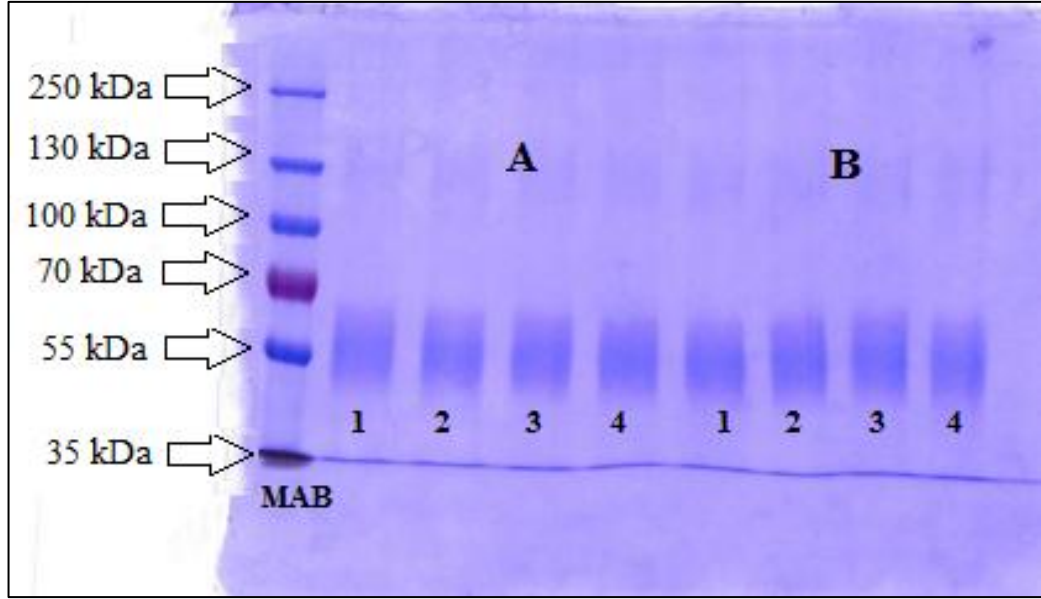
Formül Kodu:	Kalan difteri toksoidi miktarı (%) ± SS*		
	Başlangıç	1. ay	3. ay
D1	60,6 ± 0,39	58,7 ± 1,30	57,5 ± 1,54
D5	55,7 ± 0,86	54,63 ± 1,53	52,48 ± 1,69

\*SS: Standart sapma

**Çizelge 3.14.** Difteri toksoidi içeren ve 25±2°C'de saklanan formülasyonların belirli zaman aralıklarında ölçülen difteri toksoidi miktarları (n=3, Ortalama ± SS)

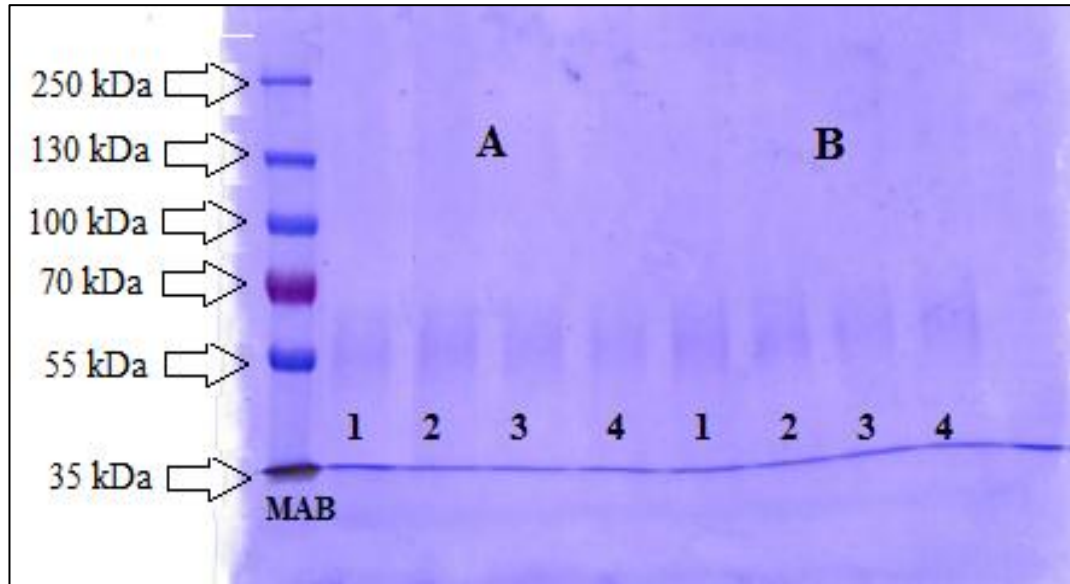
Formül Kodu:	Kalan difteri toksoidi miktarı (%) ± SS*		
	Başlangıç	1. ay	3. ay
D1	60,6 ± 0,39	57,3 ± 0,99	52,39 ± 1,72
D5	55,7 ± 0,86	52,8 ± 1,15	46,63 ± 0,57

\*SS: Standart sapma



MAB: Molekül ağırlığı belirteci

**Şekil 3.10.** A) 2-8°C’de ve B) 25±2°C saklanan D1 kodlu formülden ekstrakte edilen difteri toksoidine ait PAGE görüntüsü 1) başlangıç 2) 1. ay 3) 2. ay 4) 3. ay



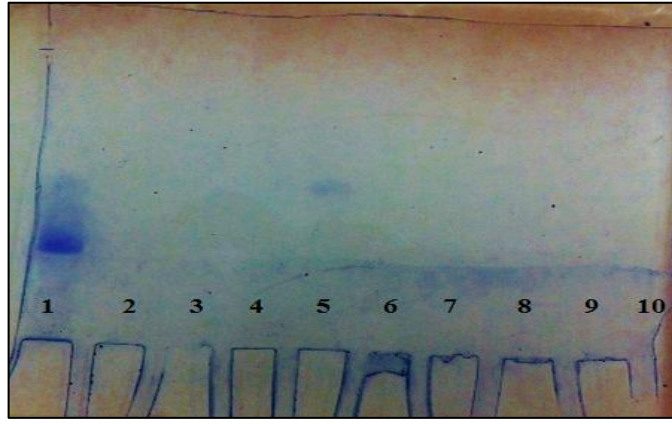
MAB: Molekül ağırlığı belirteci

**Şekil 3.11.** A) 2-8°C’de ve B) 25±2°C saklanan D5 kodlu formülden ekstrakte edilen difteri toksoidine ait PAGE görüntüsü 1) başlangıç 2) 1. ay 3) 2. ay 4) 3. ay

### 3.3.7. Gümüş Boyama Metodu ile D1 ve D5 Kodlu Formülasyonlardan Salınan Difteri Toksoidinin Yapısal Bütünlüğünün Belirlenmesine Ait Bulgular

Bölüm 2.2.1.6’da anlatıldığı şekilde denatüre edici olmayan koşullar altında yapılan in vitro salım numunelerinin uygulandığı PAGE analizi ile elde edilen jellerde bant oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 3.10). Bu nedenle in vitro salım numunelerine daha hassas olan gümüş boyama metodu Bölüm 2.2.6’da anlatıldığı şekilde uygulanmıştır. Elde edilen bantlar Şekil 3.12’de gösterilmektedir.

A)



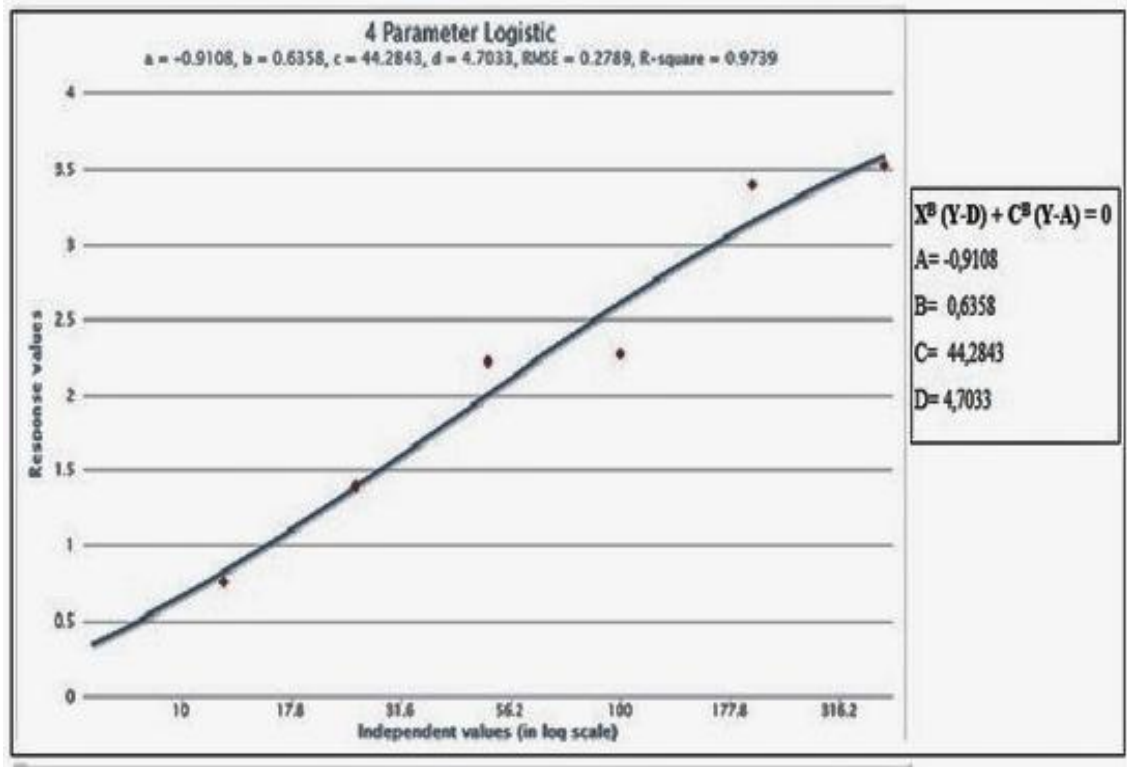
B)



**Şekil 3.12.** A) D1 ve D5 kodlu formülasyonların in vitro salım numunelerinden PAGE analizi ile elde edilen jel görüntüsü B) D1 ve D5 kodlu formülasyonların in vitro salım numunelerinden gümüş boyama analizi ile elde edilen jel görüntüsü  
 1: Marker, 2: 15 µg/ml PBS içinde difteri toksoidi, 3: 9 µg/ml PBS içinde difteri toksoidi, 4: 3 µg/ml PBS içinde difteri toksoidi, 5: D1 kodlu formülden 1. gün alınan salım numunesi, 6: D1 kodlu formülden 7. gün alınan salım numunesi, 7: D1 kodlu formülden 14. gün alınan salım numunesi, 8: D5 kodlu formülden 1. gün alınan salım numunesi, 9: D5 kodlu formülden 7. gün alınan salım numunesi, 10: D5 kodlu formülden 14. gün alınan salım numunesi

### 3.3.8. Sandviç ELISA Testine Ait Bulgular

Standardın sulandırıcı konsantrat ile 6,25-400 ng/ml arasında hazırlanan yedi dilüsyonunun Bölüm 2.2.8’de anlatıldığı şekilde elde edilen absorbanlarına karşı bilinen konsantrasyonları grafiğe geçirilerek 4 parametrelili lojistik eşitlik elde edilmiştir (Şekil 3.13).



**Şekil 3.13.** ELISA kitine uygulanan standartların bilinen konsantrasyonlarına karşı ölçülen absorbanlarının grafiğe geçirilmesi ve 4 parametrelili lojistik eşitliğin elde edilmesi

Guinea pig serumlarının Bölüm 2.2.8’de anlatıldığı şekilde elde edilen absorbanları Şekil 3.12’de elde ettiğimiz 4 parametrelili lojistik eşitlikte yerine konularak serumların konsantrasyonları bulunmuştur. Bölüm 2.2.7.5’de belirtilen gruptaki hayvanların ortalama IgG konsantrasyonları hesaplanmış ve Çizelge 3.15’te gösterilmiştir. T testi ve Fisher testi kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu gruplar arasında anlamlı farklılıklar görülmüştür ( $p < 0,05$ ).

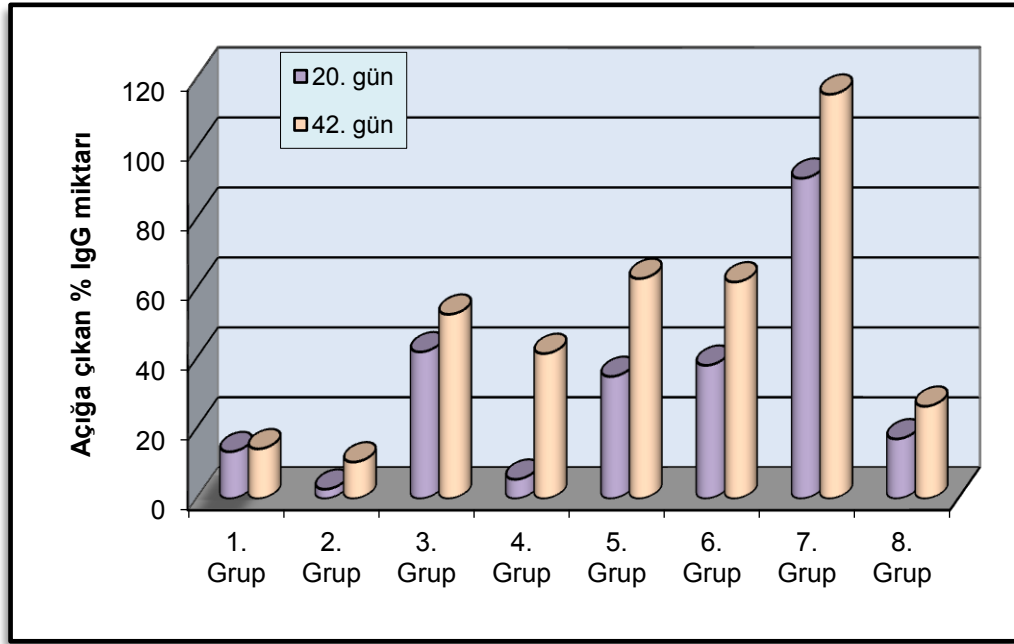
Konsantrasyonlardan elde edilen % açığa çıkan IgG miktarları Şekil 3.14 ve Şekil 3.15'te verilmektedir. Şekil 3.14'te her bir grubun 20. gün ile 42. gün sonunda alınan kanlarından açığa çıkan % IgG miktarları grafiğe geçirilmiştir. Şekil 3.15'te ise 21. gün uygulanan bağışıklama sonrası her bir grupta meydana gelen % IgG miktarı değişimleri gösterilmiştir.

**Çizelge 3.15.** Her bir gruptaki hayvanların 0., 20. ve 42. günlerdeki ortalama IgG konsantrasyonları

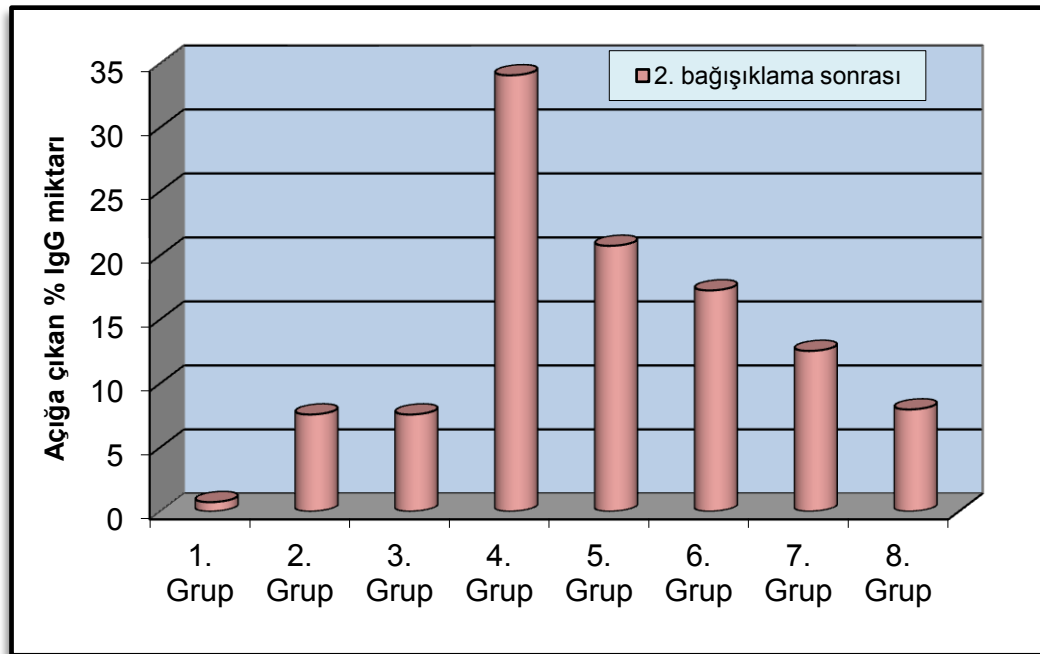
Gruplar	0., 20. ve 42. günlerde alınan serumlardaki IgG miktarı (ng/ml)		
	0. günde alınan serumlardaki IgG miktarı	20. günde alınan serumlardaki IgG miktarı	42. günde alınan serumlardaki IgG miktarı
1. grup PBS içinde DT (i.n.*) (Kontrol Grubu)	388,8	440,7	443,9
2. grup DT içermeyen boş D1 formülü (i.n.)	315,2	323,5	348
3. grup DT içermeyen boş D5 formülü (i.n.)	277,4	393,6	423,4
4. grup DT içeren Formül D1 (i.n.)	281,3	296,7	397,8
5. grup DT içeren Formül D5 (i.n.)	309,8	417,8	504,5
6. grup DT içeren Formül D1 (i.n. + s.c.**)	264,7	365,4	428,5
7. grup DT içeren Formül D5 (i.n. + s.c.)	160,3	307	345,5
8. grup PBS içinde DT (i.n. + s.c.) (Kontrol Grubu)	380,8	445,6	481,1

\*i.n. : intranasal

\*\*s.c. : subkutan



Şekil 3.14. 20. gün ve 42. günlerde her bir gruptan alınan serumlardaki % IgG miktarı



Şekil 3.15. 21. gün uygulanan bağışıklama sonrası her bir grupta meydana gelen % IgG miktarı değişimleri



## 4. TARTIŞMA

### 4.1. Difteri Toksoidinin Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda model antijen olarak difteri toksoidi kullanılmıştır. Difteri toksoidi difteri toksininin formaldehit ile muamelesi sonucu elde edilen, toksik olmayan; fakat immünojenik özelliğini koruyan bir maddedir. Difteri toksoidi, *Corynebacterium diphtheriae* basilinden kaynaklanan ve bulaşıcı bakteriyel bir üst solunum yolu enfeksiyonu olan difteriye karşı aktif bağışıklama sağlamaktadır (Isaka ve ark., 2000; Metz ve ark., 2003).

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı'ndan temin edilen difteri toksoidinin protein miktar tayini için Schleif ve Wensink tarafından geliştirilen denklem kullanılmış ve protein miktarı 1900 µg/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca difteri toksoidinin antijenisitesi Ramon flokülasyon testine göre 1320 Lf/ml olarak ölçülmüştür. Bu ölçüm ve hesaplamalar literatür yöntemleriyle uyumlu olarak gerçekleştirilmiştir (WHO, 1997).

Difteri toksoidinin belirli özelliklerinin belirlenebilmesi, formülasyonlardan difteri toksoidi salımının incelenebilmesi ve miktar tayininin yapılabilmesi için fosfat tamponunun tuzu (PBS; pH 7,4) kullanılmıştır. Çalışmalar difteri toksoidinin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu ve mikroBCA miktar tayin yönteminin esas özellikleri dikkate alınarak yürütülmüştür. Difteri toksoidinin PBS ortamındaki maksimum absorbans verdiği dalga boyu 560 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 3.1).

Difteri toksoidi için uygun okumanın yapılacağı dalga boyunun belirlenmesinden sonra difteri toksoidinin pH 7,4 PBS tamponu içinde bilinen konsantrasyonlarda dilüsyonları hazırlanmıştır ve 560 nm'de okunan absorbans değerleri konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilmiştir. Kalibrasyon doğrusundan elde edilen  $r^2$  değerinin yüksek, kesişim ve eğimin standart hatalarının düşük olması, okunan

absorbanslardan bulunacak konsantrasyon değerlerinin güvenilir sonuçlar olacağını göstermiştir (Çizelge 3.1).

Bir analitik yöntemin validasyonu, yöntemin tasarlanan yönteme uygunluğunun laboratuvar çalışmalarıyla belirlendiği bir işlemdir. Analitik yöntemin validasyon çalışmasında; doğruluk, kesinlik, özgünlük, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı, doğrusallık ve aralık parametreleri incelenmiştir.

pH 7,4 PBS tamponu içinde elde edilen, analitik yöntemin doğruluğuna ilişkin sonuçlar Çizelge 3.2’de verilmiştir. % bağıl standart sapma değerlerinin %2’den küçük olma şartına göre yorumlanmış ve yöntemin doğru sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

pH 7,4 PBS tamponu içinde elde edilen, analitik yöntemin kesinliği, tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik parametreleri üzerinden değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, % bağıl standart sapma değerlerinin %2’den küçük olma şartına göre yorumlanmış ve tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik kanıtlanmıştır (Çizelge 3.3, Çizelge 3.4). Ara kesinlikte elde edilen bulgular ile SPSS istatistik programı kullanılarak ortalamalar arası farkın önem testi yapılmış ve  $p > 0,05$  bulunduğundan,  $t_{hesap} < t_{tablo}$  olduğundan ve güven sınırlarından biri (+) iken diğeri (-) bulunduğundan ortalamalar arası farkın önemsiz olduğu kanıtlanmıştır.

Difteri toksoidi içeren mikropartiküllerin pH 7,4 PBS tamponu içindeki miktar tayini yönteminin difteri toksoidi için özgünlüğünü belirlemek amacıyla, formülasyonda kullanılan her bir yardımcı maddenin formülasyonlarda kullanıldıkları oranlardaki çözeltileri ile difteri toksoidini içermeyen boş mikropartiküller hazırlanmıştır. Bu çözeltiler ile %5 SDS içeren 1M NaOH / 1M HCl ile muamele edilen boş mikropartiküllerin mikroBCA analiz yöntemi ile 350-750 nm’de spektrumları alınmıştır (Şekil 3.3). Difteri toksoidinin maksimum absorbans verdiği 560 nm’deki spektrumla karşılaştırılmış, herhangi bir girişimin olmadığı, ihmal edilebilir derecede

düşük absorbans verdikleri gözlenmiştir ve dolayısıyla yöntemin difteri toksoidine özgü olduğu belirlenmiştir.

Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS tamponundaki miktar tayini yöntemi için belirlenen gözlenebilme (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) sırasıyla 0,362 µg/ml ve LOQ 1,1 µg/ml'dir (Çizelge 3.5, Çizelge 3.6).

pH 7,4 PBS tamponu içinde elde edilen, analitik yöntemin doğrusallık ve doğrusallık aralığına ait veriler Çizelge 3.7'de, lineer regresyon grafikleri ise Şekil 3.4'te verilmektedir. pH 7,4 PBS tamponu için elde edilen doğrunun regresyon doğrusundan sapmalarına ait standart hata, artık kareler toplamı ve doğrusallıktan sapmaların kareler toplamının küçük, regresyon katsayılarının ( $r^2$ ) ise 1'e yakın olması verilerin güvenilirliğini göstermektedir.

SDS-PAGE protein karışımlarının kalitatif analizi için kullanılan en yaygın yöntemdir. Yöntem, proteinlerin büyüklüklerine göre ayrılması prensibine dayandığı için proteinlerin saflık analizi ve proteinlerin molekül ağırlığının saptanması için kullanılabilir (Walker, 2002b). Difteri toksoidinin saflık tayini için Bölüm 2.2.1.6'da anlatıldığı denatüre edici koşullar altında SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. Difteri toksoidi antijeninin tek zinciri yaklaşık 66 kDa, A fragmanı 29 kDa, B fragmanı 45 kDa dolaylarında görülmüştür (Şekil 3.5). Elde ettiğimiz bantlar ile literatürdeki difteri toksininin formaldehitte muamelesi sonucu, akrilamid jel üzerinde gözlenen difüze haldeki protein bantlarının uyumlu olduğu görülmüştür (Metz ve ark., 2003).

Difteri toksoidinin stabilitesinin incelenmesi amacıyla, difteri toksoidi altı ay süreyle 2-8°C'de buzdolabında bekletilmiştir. Difteri toksoidinin stabilite çalışmaları için pH 7,4 PBS tamponu içinden belirli zaman aralıklarında alınan numunelerin mikroBCA yöntemiyle protein miktar tayinleri yapılmış ve tayin edilen protein miktarlarında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Çizelge 3.8). Difteri toksoidinin 2-8°C'de saklandığında yıllarca stabil kaldığını gösteren literatür verileri mevcuttur (World Health Organization (WHO) Temperature sensitivity of vaccines, 2006).

## 4.2. Ön Formülasyon Hazırlama Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda kullanılması tasarlanan difteri toksoidinin; partiküler sistemdeki enkapsülasyon etkinliğinin yeterli düzeyde olduğu, burun içine uygulanabilecek partikül büyüklüğünde elde edilebildiği, stabilitesinin korunabildiği optimum özelliklere sahip mikropartiküler bir dozaj formunun geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Mikropartikül hazırlamak için ön formülasyon çalışmalarında öncelikle Bölüm 1.5.2’de anlatılan partikül hazırlama yöntemleri incelenerek antijenin özelliklerine ve mevcut laboratuvar koşullarımıza en uygun olan yöntem belirlenmeye çalışılmıştır. Birçok literatür s/y/s emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminin protein yapısındaki etkin maddeler için uygulanabilir olduğunu ve yüksek enkapsülasyon etkinliğinin elde edilebildiğini göstermektedir (O’Donnell ve McGinity, 1997; Jain, 2000; Bansode ve ark., 2010). Bu nedenle ön formülasyon çalışmalarında s/y/s çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir.

Mikropartiküler yapıdaki formülasyonların hazırlanmasında taşıdıkları biyouyumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilir olma özellikleri nedeniyle poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) polimeri ile poli-ε-kaprolakton (PCL) polimerlerinin kullanılması kararlaştırılmıştır. PCL polimeri yavaş parçalanma ve parçalandığında bulunduğu ortamı PLGA gibi asidik pH’ya çekmeme özelliklerinden dolayı birçok çalışmada taşıyıcı sistem olarak tercih edilmiştir. Ayrıca yüksek hidrofobisitesi nedeniyle NALT tarafından partiküler sistemlerin alımını artırmaktadır (Benoit ve ark., 1999; Somavarapu ve ark., 2005; Singh ve ark., 2006). Çalışmamızda kullanılan polimerler 50:50 laktik asit:glikolik asit kopolimer oranına sahip PLGA ile iki farklı molekül ağırlığına sahip poli-ε-kaprolakton (Ma: 14kDa ile Ma: 70-90kDa) polimerleridir.

Ön formülasyon çalışmalarımızda model protein olarak kullanılan ovalbumin ve çalışmamızda kullanılması tasarlanan polimerler ile mikropartikül formülasyonları hazırlanmış ve optimum formülasyonun seçilebilmesi için uygun protein miktarı,

primer emülsiyon oluşturulmasında kullanılan karıştırıcı (yüksek hızlı homojenizatör veya sonikatör) ve kullanılan polimerlerin cinsi veya farklı molekül ağırlığında polimer kullanılması gibi parametreler değiştirilmiştir. Elde edilen partiküllerin morfolojisi, partikül büyüklükleri, enkapsülasyon etkinlikleri ve üretim verimleri değerlendirilmiştir.

Çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan partiküler sistemlerin içine proteinlerin hapsedilmesi işleminde proteinlerin stabilitesini etkileyen en önemli basamaklardan biri karıştırma işlemidir. Çalışmamızda hem sonikatör ile hem de homojenizatör ile primer s/y emülsiyonları hazırlanmıştır. Sonikasyon sırasında sıcaklık yükseldiği için sonikasyonla karıştırma işlemi buz banyosu içinde gerçekleştirilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda, homojenizasyona göre sonikasyon veya vorteksleme işleminin daha çok protein agregasyonuna neden olduğu belirtilmiştir (Morlock ve ark., 1997; Zambaux ve ark., 1999).

### **4.3. Mikropartiküler Yapıdaki Ön Formülasyonların Değerlendirilmesi**

#### **4.3.1. Ön Formülasyonların Morfolojik Özelliklerinin Değerlendirilmesi**

Mikropartiküllerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için optik mikroskop ile incelemeler yapılmıştır.

Mikropartiküllerin liyofilizasyondan sonra elde edilen optik mikroskop görüntüleri Şekil 3.6'da yer almaktadır. Bu fotoğraflarda sekonder emülsiyon damlacık büyüklüğünden küçük birçok primer emülsiyon damlacık büyüklüğüne sahip damlacıkları içeren petek görümlü çoklu emülsiyon yapılar görülmekte olup bu petek yapısının etkin maddenin başarılı enkapsülasyonu nedeniyle yükleme etkinliği için en uygun yapı olduğu belirtilmiştir (Rosca ve ark., 2004).

Mikropartiküllerin optik mikroskopla yapılan morfolojik incelemelerinde küresel şekle sahip oldukları görülmüş olup formülasyon parametrelerine bağlı olarak büyüklük ve dağılımlarının farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle primer s/y emülsiyonu hazırlarken karışım için sonikatör cihazı kullanılan formülasyonlarda agregasyon olduğu gözlenmiştir.

Optik mikroskop ile incelenen partiküllerin büyüklükleri birçok formülasyonda amaçladığımız boyutta yani yaklaşık 10 µm civarında çıkmıştır. Ancak iç sulu faza eklenen poloksamer miktarının ve kullanılan PCL polimerinin molekül ağırlığının artmasıyla partikül boyutlarında da artma olduğu gözlenmiştir (Jalil ve Nixon, 1990). Kullanılan polimer cinsinin de partiküllerin agregasyonunu etkilediği belirlenmiş, PCL polimeri ile hazırlanan partiküler sistemlerde daha çok agregasyon gözlenmiştir (Singh ve ark., 2006).

#### **4.3.2. Ön Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinlikleri ve Üretim Verimlerinin Değerlendirilmesi**

Çalışmamızda protein yapısındaki etkin maddeler için yüksek enkapsülasyon etkinliği sağlayan ve partiküler sistem hazırlama yöntemi olan s/y/s çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Mikropartikül hazırlanmasında kullanılan işlem parametrelerine bağlı olarak enkapsülasyon etkinliğinin değiştiği görülmüştür.

Ön formülasyon çalışmamızda farklı protein miktarlarının enkapsülasyon etkinliğini değiştirip değiştirmediği incelenmiş ve elde edilen sonuçlar protein miktarıyla enkapsülasyon etkinliğinin değiştiğini göstermiştir (Çizelge 3.9). Yapılan çalışmalar ile etkin madde:polimer oranının değişmesiyle enkapsülasyon etkinliğinin belirli bir değere kadar arttığı gösterilmiş ve bu durumun etkin maddenin iç sulu fazda belirli bir orana kadar çözünmesinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (Patel ve ark., 2006; Lakshmana ve ark., 2009).

Çalışmamızda Poloksamer 407 (Pluronic F127) ve Poloksamer 188 (Pluronic F68), formülasyonların iç sulu fazına belirli oranlarda ilave edilmiş ve formülasyon üzerindeki etkileri incelenmiştir. Poloksamerler; toksik ve iritan özellikte olmayan, %1-5 oranlarında formülasyonlara eklendiklerinde stabilizan olarak kullanılabilen maddelerdir (The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009). Birçok çalışmada poloksamerlerin formülasyon üzerindeki etkileri incelenmiş ve poloksamerlerin; mikropartiküllerin agregasyonunu önledikleri, enkapsülasyon etkinliklerini artırdıkları, partikül büyüklüğü dağılımını daha homojen hale getirdikleri, olası protein-polimer etkileşimini önledikleri sonuçlarına ulaşılmıştır (Lin ve Huang, 2001; Murillo ve ark., 2001). Çizelge 3.9'da görüleceği gibi formülasyonların enkapsülasyon etkinliği poloksamer eklenmesiyle artmıştır. Bu bulgu literatür verilerini desteklemiştir (Sinha ve ark., 2004; Estevan ve ark., 2006).

Kullanılan polimer cinsinin de enkapsülasyon etkinliğini etkilediği gözlenmiştir. PLGA polimeri ile hazırlanan formülasyonların PCL polimeri ile hazırlanan formülasyonlara göre daha yüksek enkapsülasyon etkinliği gösterdiği belirlenmiştir (Peracchia ve ark., 1997).

Mikropartiküllerin hazırlanmasında kullandığımız s/y/s çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile aynı zamanda yüksek verimle mikropartikül elde edilebilmektedir (Bittner ve ark., 1998). Hazırladığımız mikropartikül formülasyonlarında elde ettiğimiz üretim verimleri %56,8-99 aralığındadır (Çizelge 3.9).

#### **4.4. F11, F17, F23, F29, F35 ve F36 Kodlu Formülasyonların Difteri Toksoidi ile Hazırlanmalarına Ait Bulgular**

Elde edilen ön formülasyon çalışmaları sonucu partiküllerin morfolojisi, partikül büyüklükleri, enkapsülasyon etkinlikleri ve üretim verimleri değerlendirilmiş olup

difteri toksoidi ile hazırlanacak formülasyonlar için F11, F17, F23, F29, F35 ve F36 kodlu formülasyonlar seçilmiştir (Çizelge 2.4).

#### **4.4.1. Difteri Toksoidi İçeren Mikropartiküler Formülasyonların Morfolojik Özelliklerinin Değerlendirilmesi**

Optik mikroskopla fotoğrafları çekilen D1, D2, D3, D4, D5 ve D6 kodlu formülasyonların optik mikroskop görüntüleri Şekil 3.7’de verilmektedir. Mikropartiküllerin optik mikroskopla yapılan morfolojik incelemelerinde özellikle D1, D2, D5 ve D6 kodlu formülasyonlardaki partiküllerin küresel şekilde oldukları ancak büyük molekül ağırlığındaki PCL polimerinin kullanıldığı D3 ve D4 kodlu formülasyonlardaki partikül şeklinin küreselliğinin bozulduğu belirlenmiştir.

#### **4.4.2. Difteri Toksoidi İçeren Mikropartiküler Formülasyonların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımlarının Değerlendirilmesi**

D1, D2, D3, D4, D5 ve D6 kodlu formülasyonların lazer kırınımı granülometresi kullanılarak elde edilen partikül büyüklüğü - %hacim dağılımı grafikleri elde edilmiş (Şekil 3.8) ve geometrik ortalama çap değerleri (Çizelge 3.10) hesaplanmıştır. D1, D2, D5 ve D6 kodlu formülasyonlarda partikül büyüklüğü arasında önemli farklılıkların olmadığı görülmüştür. Ancak primer s/y emülsiyonunu hazırlamak için homojenizatör yerine sonikatör kullanıldığında daha büyük partikül büyüklüğü elde edildiği gözlenmiştir. Bu durumun sonikatörle hazırlanan mikropartiküllerin homojenizatörle hazırlanan mikropartiküllere göre daha fazla agregasyon göstermelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca D4 ve D5 kodlu formülasyonlarda kullanılan büyük molekül ağırlığındaki PCL polimerinin partikül boyutunu artırdığı tespit edilmiştir.



#### **4.4.3. Difteri Toksoidi İçeren Mikropartiküler Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinlikleri ve Üretim Verimlerinin Değerlendirilmesi**

Difteri toksoidi içeren mikropartiküler formülasyonların elde edilen enkapsülasyon etkinlikleri ve üretim verimleri Çizelge 3.11’de sunulmuş olup ön formülasyon çalışmalarında elde edilen bulgularla paralellik göstermiştir. PLGA polimeri ile hazırlanan formülasyonların enkapsülasyon etkinliği PCL polimeri ile hazırlanan formülasyonların enkapsülasyon etkinliklerinden yüksek bulunmuştur.

S/y/s çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırladığımız difteri toksoidi içeren mikropartikül formülasyonlarında yüksek üretim verimleri elde edilmiştir. Elde edilen üretim verimleri %73,57-88,96 aralığındadır (Çizelge 3.11).

#### **4.4.4. Difteri Toksoidi İçeren Mikropartiküler Formülasyonların In vitro Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi**

Şekil 3.9’da gösterilen D1, D2, D3, D4, D5 ve D6 kodlu formülasyonlara ait in vitro salım çalışmaları incelendiğinde bütün formülasyonlarda partikül yüzeyine adsorbe olmuş antijenden ve hapsolmemiş antijenden kaynaklı ilk gündeki çıkışın yüksek olduğu gözlenmiştir. PLGA ve PCL polimeri ile hazırlanan formülasyonlarda genellikle görülen trifazik salım profilleri elde edilmiştir (Dong ve ark., 2005; Lao ve ark., 2008). PLGA polimeri ile hazırlanan D1 ve D2 kodlu formülasyonlardan çıkışın daha hızlı olduğu ve beş hafta sonunda difteri toksoidinin %100’ünün çıktığı görülmüştür. Bununla birlikte PCL polimeri ile hazırlanan D3, D4, D5 ve D6 kodlu formülasyonlardan çıkışın daha yavaş olduğu ve beş hafta sonunda bütün antijeni açığa çıkarmadığı gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda da PLGA ile hazırlanan partiküler sistemlerin salım hızlarının, PCL ile hazırlanan partiküler sistemlerin salım hızlarına göre daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır (Lamprecht ve ark., 1999).

#### 4.4.5. In vitro Salım Çalışmalarının Kinetik Değerlendirilmesi

D1, D2, D3, D4, D5 ve D6 kodlu formülasyonların pH 7,4 PBS tamponu içindeki in vitro salım hızı kinetikleri sıfır derece, birinci derece, Higuchi kinetikleri uygulanarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.12). Bütün formülasyonlar için Higuchi kinetiğinde elde edilen  $r^2$  değerlerinin yüksek olması ile formülasyonlarımızın matris sistemlerde görülmesi beklenen bu kinetiğine uyum gösterdiği sonucuna varılmıştır. PCL polimerinin kullanıldığı D3, D4, D5 ve D6 kodlu formülasyonların  $k_h$  değerleri PLGA polimerinin kullanıldığı D1 ve D2 formülasyonlarının  $k_h$  değerlerine göre daha düşük bulunmuştur.

#### 4.4.6. D1 ve D5 Kodlu Formülasyonların Ön Stabilite Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Elde edilen partikül morfolojisi, partikül büyüklüğü ve dağılımı, enkapsülasyon etkinliği sonuçları değerlendirildiğinde in vivo çalışmalar için kullanılacak iki formülün D1 ve D5 kodlu formülasyonlar olmasına karar verilmiştir. Bu nedenle D1 ve D5 kodlu formülasyonların ön stabilite çalışmaları yapılmış 3 ay süreyle 2-8 °C'de buzdolabında ve 25±2°C, %60 bağıl nemdeki iklim dolabında bu formülasyonlar bekletilmiştir. Yapılan miktar tayini sonucu antijen miktarında 1. ve 3. ayda anlamlı bir değişiklik ( $p>0,05$ ) meydana gelmediğini göstermiştir (Çizelge 3.13 ve Çizelge 3.14).

2-8°C'de buzdolabında ve 25±2°C, %60 bağıl nemdeki iklim dolabında bekletilen mikropartiküllerden ekstrakte edilen numuneler poliakrilamid jele denatüre edici olmayan koşullarda uygulanmıştır. Elde edilen bantların 66kDa civarında görülmesi ve bunun dışında herhangi bir bandın görülmemesi formülasyonlarda enkapsüle edilen antijenin stabil kaldığını bize göstermektedir (Şekil 3.10 ve Şekil 3.11).

#### **4.4.7. D1 ve D5 Kodlu Formülasyonlardan Salınan Difteri Toksoidinin Yapısal Bütünlüğünün Değerlendirilmesi**

D1 ve D5 kodlu formülasyonlardan salınan difteri toksoidinin yapısal bütünlüğünün korunup korunmadığının değerlendirilmesi için in vitro salım numunelerine önce denature edici olmayan koşullarda PAGE analizi uygulanmış ancak salım numunelerindeki protein miktarlarının düşük olması nedeniyle jelde bant oluşumunu gözlemlemek mümkün olmamıştır. Bu nedenle PAGE analizinden 100 kat daha hassas olan gümüş boyama metodu in vitro salım numunelerine uygulanmış ve bant oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3.12). Elde edilen bantlar mikropartikül oluşumu esnasında difteri toksoidinin yapısal bütünlüğünün korunduğunu göstermektedir.

#### **4.5. In vivo Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi**

##### **4.5.1. Formülasyonların Seçimi ve Hazırlanmasına Ait Bulguların Değerlendirilmesi**

In vivo hayvan deneylerinde D1 ve D5 kodlu formülasyonlar ile kontrol amaçlı PBS içinde DT kobaylara belirli zaman noktalarında subkütan veya intranazal uygulanmıştır (Çizelge 2.5).

##### **4.5.2. ELISA'ya Ait Bulguların Değerlendirilmesi**

Belirli günlerde kobaylardan toplanan serum örneklerindeki difteriye spesifik antikor titrelerinin tayininde ELISA kitinden yararlanılmıştır.

ELISA kitine uygulanan standartlardan elde edilen 4 parametrelili lojistik eşitlik (Şekil 3.13) elde edildikten sonra absorbanları okunan serumların ng/ml cinsinden konsantrasyonları hesaplanmış ve her bir grubun ortalama kan konsantrasyonları

Çizelge 3.15’de verilmiştir. T testi ve Fisher testi ile istatistiksel olarak veriler değerlendirilmiş olup anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).

Kobaylardan alınan serumlardaki 20. gün ve 42. günlerdeki IgG miktarları ile ikinci bağışıklama sonrasında elde edilen IgG miktarları grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.14 ve Şekil 3.15). Bu grafikler incelendiğinde, intranazal yoldan üç kez aşılana hayvan gruplarında sistemik bağışık yanıtın uyarıldığı görülmüştür.

2. grup ile 4. grup karşılaştırıldığında D1 kodlu formülün intranazal uygulandığı zaman 42. günde IgG titresini artırdığı bulunmuştur. Subkütan uygulamayı takiben intranazal uygulamanın yapıldığı 6. grup kan konsantrasyonları incelendiğinde ise intranazal uygulamayla da kan konsantrasyonunun arttığı gözlenmiş ve D1 formülasyonunun devam formülasyonu olarak da kullanılabilceği görülmüştür.

3. grup ile 5. grup karşılaştırıldığında D5 kodlu formülün de intranazal uygulandığı zaman 42. günde IgG titresini artırdığı bulunmuştur. Subkütan uygulamayı takiben intranazal uygulamanın yapıldığı 7. grup kan konsantrasyonları incelendiğinde ise intranazal uygulamayla da kan konsantrasyonunun arttığı gözlenmiş ve D5 formülasyonunun devam formülasyonu olarak da kullanılabilceği görülmüştür.

D1 ve D5 kodlu formülasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman ise D5 kodlu formülün D1 kodlu formüle göre antikor oluşumunu daha güçlü uyardığı gözlenmiştir ve aralarındaki fark T testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiş olup anlamlı olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Bunun nedeninin PCL polimerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. PCL polimerinin tek başına intranasal uygulandığı (grup 3) formülasyonda grup 1’e oranla elde edilen immün yanıtta belirgin bir artış görülmektedir. IgG’de gözlenen bu artış PCL polimerinin immün yanıtı oluşturacak sistemlerin uyarılmasında aktif bir rol üstlendiğini düşündürmektedir. Murillo ve ark., PCL polimerini in vivo olarak hayvanlara uyguladıklarında benzer adjuvan etkiyi gözlemlemişlerdir (Murillo ve ark., 2002). Buna karşılık nazal uygulamada PLGA polimerinin adjuvan etki göstermediği anlaşılmıştır (Şekil 3.14).

Sadece intranasal uygulamanın yapıldığı 4. ve 5. grupların oluşturduğu immün yanıt, subkutan uygulamayı takiben intranasal uygulamanın yapıldığı 6. ve 7. gruplara göre oluşan immün yanıtta göre daha yüksek bulunmuştur (Şekil 3.15). Başlangıçta ve ikinci bağışıklamada da intranasal uygulama sonucu elde edilen bağışık yanıtın diğer uygulama modellerine oranla daha yüksek çıkmasının nedeni olarak, difteri toksoidinin üst solunum yolunu tutan bir hastalık oluşturmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bulgu WHO'nun difteri gibi özellikle üst solunum yolunu tutan hastalıklarda mukozal bağışıklamanın teşvik edilmesi isteğini desteklemektedir (World Health Organization (WHO) World Health Report, 1999).

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında bulaşıcı bir üst solunum yolu enfeksiyonu olan difteriye karşı oluşturulacak intranazal verilen mikropartiküler formülasyonların geliştirilmesi amaçlanmıştır. Böylelikle hem difteri toksoidinin stabilitesinin artırılması hem de aşının mukozal bölgede kalış süresinin uzatılması hedeflenmektedir. Ayrıca mukozal bağışıklama ile hem sistemik hem lokal bağışık yanıtlar uyarılabilmektedir.

Çalışmamızda proteinler için uygun bir yöntem olan s/y/s emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi difteri toksoidi içeren mikropartiküler formülasyonları hazırlamak için kullanılmıştır. Mikropartiküler formülasyonların hazırlanmasında biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak uyumlu olma özellikleri nedeniyle poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) polimeri ile poli-ε-kaprolakton (PCL) polimeri kullanılmıştır.

Ön formülasyon çalışmaları sonucu seçilen formülasyonlardan F11, F17, F23, F29, F35 ve F36 kodlu formülasyonlara difteri toksoidi ilave edilmiş ve çeşitli parametreler incelendikten sonra D1 ve D5 kodlu formülasyonların in vivo çalışmalarda kullanılmasına karar verilmiştir.

Kobaylardan toplanan serumlardaki antitoksin titreleri, ELISA kit ile değerlendirilmiş ve D1 ve D5 kodlu formülasyonların intranazal aşılama ile yeterli sistemik bağışık yanıt oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca başlangıçta subkütan, 21. günde intranazal verilen mikropartiküler formülasyonların IgG titrelerini destek dozuyla anlamlı ölçüde yükselttiği belirlenmiştir.

D1 ve D5 kodlu formülasyonların sistemik bağışık yanıtı uyardıkları gösterilmiştir. Bundan sonra yapılacak çalışma ile hazırlanan mikropartiküler formülasyonların kobaylarda oluşturdukları mukozal bağışık yanıtların (salgısal Ig A antikoru oluşumu) ELISA ile tespitine karar verilmiştir.

## ÖZET

### **Mukozal Yolla Uygulanan Mikropartiküler Antijen Taşıyıcı Sistemler Üzerinde Çalışmalar**

Bu tez çalışmasının amacı; model antijen olarak difteri toksoidini içeren mikropartiküler sistemlerin geliştirilmesi ve intranazal uygulanmalarının değerlendirilmesidir. Mukozal aşılama ile amaç hem sistemik hem de mukozal bağışık yanıtları uyarabilmektir.

Çalışmamızda difteri toksoidi içeren mikropartiküler formülasyonlar, s/y/s emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Mikropartiküler formülasyonların hazırlanmasında polimer olarak biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak uyumlu olmaları nedeniyle Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) polimeri ile Poli-ε-kaprolakton (PCL) polimeri kullanılmıştır.

Ön formülasyon çalışmaları için partiküllerin morfolojisi, partikül büyüklükleri, enkapsülasyon etkinlikleri ve üretim verimleri incelenmiştir. Formülasyonların optimizasyonunun sağlanmasının ardından hesaplı miktarda difteri toksoidi F11, F17, F23, F29, F35 ve F36 ilave edilmiştir. Bu formülasyonlar için; partiküllerin morfolojisi, partikül büyüğü ve dağılımı, enkapsülasyon etkinlikleri, üretim verimleri, etkin madde salım profilleri ve stabiliteyi incelenmiştir.

In vitro testler (örn., enkapsülasyon etkinlikleri, partikül büyüklük ve dağılımları, morfolojileri) dikkate alındığında D1 ve D5 kodlu formülasyonların diğer formülasyonlara kıyasla daha üstün oldukları bulunmuştur. Bu nedenle bu formülasyonların intranazal ve subkütan uygulama sonrası oluşturacakları bağışık yanıt kobaylarda incelenmiştir. ELISA testi ile okunan absorban değerleri D1 ve D5 kodlu formülasyonların intranazal aşılamayla yeterli sistemik bağışık yanıt oluşturduğunu göstermiştir. Ayrıca subkütan uygulamadan sonra destek doz olarak intranazal verilen D1 ve D5 kodlu formülasyonların IgG titrelerini anlamlı ölçüde yükselttiği görülmüştür. PCL polimeri PLGA polimerine kıyasla daha güçlü immün yanıt oluşturmuştur ( $p < 0,05$ ). Bununla birlikte PCL polimerinin tek başına kullanıldığında da adjuvan etkisine sahip olduğu bulunmuştur.

**Anahtar Sözcükler:** Bağışıklık, Difteri toksoidi, Intranazal, Mikropartiküler formülasyonlar, PCL, PLGA

## SUMMARY

### **Studies on the Mucosal Delivery of Microparticulate Antigen Delivery Systems**

The purpose of this study is to develop microparticulate systems containing diphtheria toxoid as the model antigen and to evaluate their intranasal administration. The objective of mucosal vaccination is to stimulate both systemic and mucosal immune responses.

Microparticulate formulations containing diphtheria toxoid were prepared w/o/w emulsion solvent evaporation method. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) polymers were used in microparticulate formulations because of their biodegradable and biocompatible properties.

For pre-formulation studies; morphological properties, particle size, encapsulation efficiencies, production yields of microparticles were investigated. Calculated amounts of diphtheria toxoid were added to formulations (F11, F17, F23, F29, F35 and F36) after optimization of formulations was achieved. For these formulation; morphological properties, particle size and distribution, encapsulation efficiencies, production yields, drug release profiles and stability of microparticles were investigated.

Formulations coded D1 and D5 were considered to be superior to other formulations given the in vitro tests (eg., encapsulation efficiencies, particle size and distribution, particle size and distribution). Therefore, these formulations were tested in guinea pigs in order to determine immune responses they would produce following intranasal and subcutaneous administration. Absorbance values of ELISA test showed that formulations coded D1 and D5 were able to stimulate adequate systemic immune response with intranasal vaccination. Additionally, formulations coded D1 and D5 resulted in significantly increased IgG titers with intranasal administration as a booster dose following subcutaneous administration. PCL polymer elicited a high immune response compared to PLGA polymer ( $p < 0.05$ ). However, the PCL polymer when used alone, were also found to have an adjuvant effect.

**Key Words:** Diphtheria toxoid, Immunity, Intranasal, Microparticulate formulations, PCL, PLGA



## KAYNAKLAR

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. (2000). Cellular and Molecular Immünology (4th Ed). Pennsylvania: W. B. Saunders Company
- AGUILA, A., DONACHIE, A. M., McSHARRY, C. P., MOWAT, A. McL., PEYRE, M., SESARDIC, D. (2006). Induction of protective and mucosal immunity against diphtheria by a immune stimulating complex (ISCOMS) based vaccine. *Vaccine*, **24**: 5201-5210
- AGUILAR, J. C., RODRIGUEZ, E. G. (2007). Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*, **25**: 3752-3762
- ALMEIDA. A. J., ALPAR. H. O. (1996). Nasal delivery of vaccines. *Journal of Drug Targeting*, **3(6)**: 455-67
- ALPAR, H. O., EYLES, J. E., SOMAVARAPU, S., WILLIAMSON, E. D. (2001). Intranasal vaccination against plague, tetanus and. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **51**: 173-201
- ALPAR, H. O., ATUAH, K. N., BRAMWELL, V. W., SOMAVARAPU, S. (2005). Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **57**: 411-430
- ALTAŞ, K. (1998). Aşılamanın ve Pasif Bağışıklamanın İmmunolojik Temelleri. In: *Çocuk ve Erişkinde Bağışıklama*, Ed.: Lale Sever. İstanbul: Deonta Güncel Tıp Yayınları, s.: 9-15
- AMIDI, M., BORCHARD, G., HENNINK, W. E., JISKOOT, W., JUNGINGER, H. E., ROMEIJN, S. G. (2006). Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *Journal of Controlled Release*, **111**: 107-116
- AMON, R., BEN-YEDIDIA, T. (2003). Old and new vaccine approaches. *International İmmünopharmacology*, **3**: 1195-1204
- ANDRIANOV, A. K., PAYNE, L. G. (1998). Polymeric carriers for oral uptake of microparticulates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **34**: 155-170
- ARORA, P., GARG, S., SHARMA, S. (2002). Permeability issues in nasal drug delivery. *Drug Discovery Today*, **7(18)**: 967-975
- ATUAH, K. N., WALTER, E., MERKLE, H. P., ALPAR, H. O. (2003). Encapsulation of plasmid DNA in PLGA-stearylamine microspheres: a comparison of solvent evaporation and spray-drying methods. *Journal of Microencapsulation*, **20(3)**: 387-399

- BANSODE, S. S., BANARJEE, S. K., GAIKWAD, D. D., JADHAV, S. L., THORAT, R. M. (2010). Microencapsulation: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **1(2)**: 38-43
- BARAS, B., BENOIT, M., DUPRE, L., POULAIN-GODEFROY, O., SCHACHT, A., CAPRON, A., GILLARD, J., RIVEAU, G. (1999). Single-Dose Mucosal Immunization with Biodegradable Microparticles Containing a *Schistosoma mansoni* Antigen. *Infection and Immunity*. **67(5)**: 2643-2648
- BAXTER, D. (2007). Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occupational Medicine*, **57**: 552-556
- BEHL, C. R., PIMPLASKAR, H. K., SILENO, A. P., DEMEIRELES, J., ROMEO, V. D., (1998). Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **29**: 89-116
- BELLAMY, R., FREEDMAN, A. (2005). Immunization. *Medicine*, **33(3)**: 17-21
- BENOIT, M., BARAS, B., GILLARD, J. (1999). Preparation and characterization of protein-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **184**: 73-84
- BEVERLEY, P. C. L. (2002). Immunology of vaccination. *British Medical Bulletin*, **62**: 15-28
- BEYAZOVA, U., AKTAŞ, F. (2007). Çocukluk Çağı Aşılamaları ve Erişkin Bağışıklaması. *Gazi Tıp Dergisi*, **18(2)**: 47-65
- BIESTERVELD, N. (2002). Nasal vaccine delivery, vaccine delivery adjuvants. Erişim: [<http://www.lesn.lehigh.edu/interact/courses/spring04/chm421/Biesterveld-MS%20thesis.pdf>]. Erişim Tarihi: 08. 2002
- BITTNER, B., MORLOCK, M., KOLL, H., WINTER, G., KISSEL, K. (1998). Recombinant human erythropoietin (rhEPO) loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres: influence of the encapsulation technique and polymer purity on microsphere characteristics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **45**: 295-305
- BOLLAG, D. M., ROZYCKI, M. D., EDELSTEIN, S. J. (1996). Gel Electrophoresis under Denaturing Conditions. In: *Protein Methods* (2nd Ed.). New York: Wiley-Liss Inc., p.: 116-172
- BORGES, O., CORDEIRO-DA-SILVA, A., ROMEIJN, S. G. (2006). Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination. *J. Control Release*, **114(3)**: 348-358

- BOZKIR, A., HAYTA, G. (2004). Preparation and Evaluation of Multiple Emulsions Water-in-oil-in-water (w/o/w) as Delivery System for Influenza Virüs Antigens. *Journal of Drug Targeting*, **12(3)**: 157-164
- BOZKIR, A., HAYTA, G., SAKA, O. M. (2004). Comparison of biodegradable nanoparticles and multiple emulsions (water-in-oil-in-water) containing influenza virüs antigen on the *in vivo* immune response in rats. *Pharmazie*, **59**: 723-725
- BOZKIR, A., YÜKSEL, N., KARATAŞ, A., GÖNÜL, N., HASÇİÇEK, C., ÖZDEMİR, N., CANEFE, K., BAYKARA, T., KILIÇARSLAN, M., KILINÇŞEN, T., TARIMCI, N., ÇOMOĞLU, T. (2007). *Farmasötik Teknoloji*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi
- BRANDTZAEG, P., FARSTAD, I. N., HARALDSEN, G. (1999). Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immünology Today*, **20(6)**: 267-277.
- BRANDTZAEG, P., KIYONO, H., PABST, R., RUSSELL, M. W. (2008). Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immünology*, **1**: 31-37
- BRAYDEN, D. J., BAIRD, A. W. (2001). Microparticle vaccine approaches to stimulate mucosal immunisation. *Microbes and Infection*, **3(10)**: 867-876
- CAMCIOĞLU, Y. (2008). Aşılamanın İmmünolojisi. *Çocuk Enf. Derg.*, **2(1)**: 25-30
- CAMERON, C., CROWCROFT, N., POWER, D., WHITE, J. (2007). Diphtheria boosters for adults: Balancing risks. *Travel Medicine and Infectious Disease*, **5**: 35-39
- CAPAN, Y., JIANG, G., GIOVAGNOLI, S., NA, K., DeLUCA, P. P. (2003). Preparation and Characterization of Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Microspheres for Controlled Release of Human Growth Hormone. *AAPS PharmSciTech*, **4(2)**: E28
- CHAKAVARTI, B., CHAKAVARTI, D. (2008). Electrophoretic separation of proteins. *Journal of Visualized Experiments*, **12(16)**: 1
- CHEN, H. (2000). Recent advances in mucosal vaccine development. *Journal of Controlled Release*, **67**: 117-128
- CHO, N., SEONG, S., CHUN, K., KIM, Y., KWON, I. C., AHN, B., JEONG, S. Y. (1998). Novel mucosal immunization with polysaccharide-protein conjugates entrapped in alginate microspheres. *Journal of Controlled Release*, **53**: 215-224
- CIOFI DEGLI ATTI, M. L., SALMASO, S., COTTER, B., GALLO, G., ALFARONE, G., PINTO, A., BELLA, A., VON HUNOLSTEIN, C. (2002). Reactogenicity and immunogenicity of adult versus paediatric diphtheria and tetanus booster dose at 6 years of age. *Vaccine*, **20**: 74-79

- CIOMBOR, D. M., JAKLENEC, A., LIU, A. Z., THANOS, C., RAHMAN, N., WESTON, P., AARON, R., MATHIOWITZ, E. (2006). Encapsulation of BSA using a modified W/O/O emulsion solvent removal method. *Journal of Microencapsulation*, **23(2)**: 183-194
- COACHMAN, K., RANISH, J., HAHN, S. (2002). Silver Stain for SDS PAGE. Erişim: [[http://labs.fhrc.org/hahn/Methods/biochem\\_meth/silver\\_stain.html](http://labs.fhrc.org/hahn/Methods/biochem_meth/silver_stain.html)]. Erişim tarihi: 13.05.2002
- COLLIER, R. J. (1975). Diphtheria Toxin: Mode of Action and Structure. *Bacteriological Reviews*, **39**: 54-85
- CONWAY, B. R., ALPAR, H. O. (1996). Double emulsion microencapsulation of proteins as model antigens using polylactide polymers. Effect of emulsifier on the microsphere characteristics and release kinetics. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **42**: 42-48
- COSTA, P., LOBO, S.J.M. (2003). Evaluation of mathematical models describing drug release from estradiol transdermal systems. *Drug Dev. and Ind. Pharm.*, **29**: 89-97
- COZZI, R., TELFORD, J.L., MAIONE, D. (2011). Towards the development of a universal vaccine against group B Streptococcus. In : *Vaccine Design: Innovative Approaches and Novel Strategie*, Ed.: R. Rappuoli, F. Bagnoli. Norfolk, UK: Caister Academic Press. p.: 289-302
- COX, E., VERDONCK, F., VANROMPAY, D., GODDEERIS, B. (2006). Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa. *Vet. Res.*, **37**: 511-539
- CRIPPS, A. W., FOXWELL, A. R., JENNELLE, M. K. (2001). Vaccines and mucosal immunisation. *Vaccine*, **19**: 2513-2515
- CUI, Z., MUMPER, R. J. (2002). Intranasal administration of plasmid DNA coated nanoparticles results in enhanced immune responses. *J. Pharm. Pharmacol.*, **54(9)**: 1195-1203.
- DALTON, M. E., BROMHAM, D. R., AMBROSE, C. L., OSBORNE, J., DALTON, K. D. (1987). Nasal absorption of progesterone in women. *British journal of obstetrics and gynaecology*, **94(1)**: 84-88.
- DAVIS, S. S. (2001). Nasal vaccines. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **51**: 21-42
- DENNING, T. L., WANG, Y., PATEL, S. R., WILLIAMS, I. R., PULENDRAN, B. (2007). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nature Immunology*, **8**: 1086-1094

- DEVİRİM, B., BOZKIR, A., CANEFE, K. (2007). Preparation and Evaluation of Surface-Modified PLGA Microparticles with Chitosan for Pulmonary Delivery of Proteins. *Advances in Chitin Science*, **10**: 349-354
- DIETRICH, G., GRIOT-WENK, M., LANG, A.B., METCALFE, I. C., VIRET, J-F. (2003). Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine*, **21**: 678-683
- DIWAN, M., KHAR, R. K., MISRA, A., TALWAR, G. P. (1997). Long-term high immune response to diphtheria toxoid in rodents with diphtheria toxoid conjugated to dextran as a single contact point delivery system. *Vaccine*, **15(17/18)**: 1867-1871
- DOBAKHTI, F., RAHIMI, F., DEHPOUR, A. R., TAGHIKHANI, M., AJDARY, S., RAFIEI, S., RAFIEE-TEHRANI, M. (2006). Stabilizing effects of calcium alginate microspheres on mycobacterium bovis BCG intended for oral vaccination. *Journal of Microencapsulation*, **23(8)**: 844-854
- DONG, C. M., GUO, Y. Z., QIU, K. Y., GU, Z. W., FENG, X. D. (2005). In vitro degradation and controlled release behavior of D, L-PLGA50 and PCL-bD, L-PLGA50 copolymer microspheres. *Journal of Controlled Release*, **107(1)**: 53-64
- EATON, M. D. (1936). The Purification and Concentration of Diphtheria Toxin II. Observations on the Nature of the Toxin. *J. Bacteriol.*, **31(4)**: 367-383.
- EDELMAN, R. (2000). An overview of adjuvant use. In: *Vaccine adjuvants, Preparation Methods and Research Protocols*, Ed.: Derek T. O'Hagan. Totowa, New Jersey: Humana Pres, p.: 1-27
- ERIKSSON, K., HOLMGREN, J. (2002). Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. *Current Opinion in Immunology*, **14(5)**: 666-672
- ESİRGİN, S. (2007). Kitozan mikrokürelerden etkin madde salımını etkileyen parametrelerin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, s: 37-38
- ESTEVAN, M., GAMAZO, C., GRILLO, M. J., DEL BARRIO, G. G., BLASCO, J. M., IRACHE, J. M. (2006). Experiments on a sub-unit vaccine encapsulated in microparticles and its efficacy against *Brucella melitensis* in mice. *Vaccine*, **24**: 4179-4187
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA ONLINE. (2005). Monographs: Vaccines
- FELNEROVA, D., VIRET, J., GLUCK, R., MOSER, C. (2004). Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Current Opinion in Biotechnology*, **15**: 518-529
- FREITAS, S., MERKLE, H. P., GANDER, B. (2005). Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release*, **102**: 313-332

- FLORINDO, H. F., PANDIT, S., LACERDA, L., GONÇALVES, L. M. D., ALPAR, H. O., ALMEIDA, A. J. (2009). The enhancement of the immune response against *S. equi* antigens through the intranasal administration of poly- $\epsilon$ -caprolactone-based nanoparticles. *Biomaterials*, **30(5)**: 879-891
- FREYTAG, L. C., CLEMENTS, J. D. (2005). Mucosal adjuvants. *Vaccine*, **23**: 1804-1813
- FRIES, L. F., MONTEMARANO, A. D., MALLET, 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)**: 4545-4553.
- GALLAGHER, S. R. (2007). One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. In: *Current Protocols in Cell Biology*, Ed.: J. S. Bonifacino, M. Dasso, J. B. Harford, J. Lippincott-Schwartz, K. M. Yamada. John Wiley and Sons, Inc. Unit 6.1
- GARFIN, D. E. (1990). One-Dimensional Gel Electrophoresis. In: *Methods of Enzymology: vol. 182, Guide to Protein Purification*, Ed.: M. P. Deutscher. Academic Press. p.: 425-441
- GERBER, J. D. (2004). Adjuvant composition for mucosal and injection delivered vaccines. US20046676958
- GIUDICE, E. L., CAMPBELL, J. D. (2006). Needle-free vaccine delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **58**: 68-69
- GLUCK, R., METCALFE, I. C. (2002). New technology platforms in the development of vaccines for the future. *Vaccine*, **20**: 10-16.
- GLUCK, R., BURRI, K.G., METCALFE, I. (2005). Adjuvant and Antigen Delivery Properties of Virosomes. *Current Drug Delivery*, **2**: 395-400
- GOLDBLATT, D. (2000). Conjugate vaccines. *Clin. Exp. Immunol.*, **119**: 1-3
- GOLDSBY, R. A., KINDT, T. J., OSBORNE, B. A. (2000). Kuby immunology (4th Ed.). W. H. Freeman and Company, New York. p.: 425-465
- GOULD-FOGERITE, S., MANNINO, R. J. (2000). Cochleates for Induction of Mucosal and Systemic Immune Responses. In: *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols*, Ed.: D. T. O'Hagan. Humana Press Inc. p.: 179-196
- GOYAL, A. K., KHATRI, K., MISHRA, N., VYAS, S. P. (2008). New patents on mucosal delivery of vaccines. *Expert Opin. Ther. Patents*, **18(11)**: 1271-1288
- GUPTA, R. J., SIBER, G. R. (1995). Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine*, **13(14)**: 1263-1276

- GÜNEY, S. V., YEĞİN, O. (2008). Mucosal immunization. *Journal of Pediatric Infection*, **2**: 31-35
- HENRIKSEN, M. (2010). Formulation and development of cationic liposomes as adjuvants for subunit protein vaccines. Erişim: [[http://eprints.aston.ac.uk/14668/1/Henriksen\\_A.pdf](http://eprints.aston.ac.uk/14668/1/Henriksen_A.pdf)]. Erişim Tarihi: 25. 02. 2011
- HERRMANN, J., BODMEIER, R. (1995). Effect of particle microstructure on the somatostatin release from poly(lactide) microspheres prepared by a W/O/W solvent evaporation method. *J. Control. Release*, **36**: 63-71.
- HOBSON, P., BARNFIELD, C., BARNES, A., KLAVINSKIS, L. S. (2003). Mucosal immunization with DNA vaccines. *Methods*, **31**: 217-224
- HOLMGREN, J., CZERKINSKY, C. (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nature Medicine*, **11**: 45-53
- HOWARD, K. A., LI, X. W., SOMAVARAPU, S., SINGH, J., GREEN, N., ATUAH, K. N., OZSOY, Y., SEYMOUR, L. W., ALPAR, H. O. (2004). Formulation of a microparticle carrier for oral polyplex-based DNA vaccines. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1674**: 149-157
- ICH Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, November 2005
- ILLUM, L. (2003). Nasal drug delivery-possibilities, problems and solutions. *Journal of Controlled Release*, **87**: 187-198
- ILLUM, L. (2007). Nanoparticulate Systems for Nasal Delivery of Drugs: A Real Improvement over Simple Systems? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **96(3)**: 473-483
- ILLUM, L., DAVIS, S. S. (2001). Nasal vaccination: a non-invasive vaccine delivery method that holds great promise for the future. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **51**: 1-3
- ISAKA, M., YASUDA, Y., KOZUKA, S., TANIGUCHI, T., MATANO, K., MAEYAMA, J., KOMIYA, T., OHKUMA, K., GOTO, N., TOCHIKUBO, K. (2000). Induction of systemic and mucosal antibody responses in mice immunized intranasally with aluminium-non-adsorbed diphtheria toxoid together with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine*, **18**: 743-751
- ISSA, M. M., ARTURSSON, P., KÖPING-HÖGGARD, M. (2005). Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs. *Drug Discovery Today: Technologies*, **2(1)**: 1-6
- RAJPUT, Z. I., HU, S., XIAO, C., ARIJO, A. G. (2007). Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *Journal of Zhejiang University Science B*, **8(3)**: 153-161

- JAIN, R. A. (2000). The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, **21**: 2475-2490
- JALIL, R., NIXON, J. R. (1990). Microencapsulation using poly (L-lactic acid) III: Effect of polymer molecular weight on the microcapsule properties. *Journal of Microencapsulation*, **7(1)**: 41-52
- JISKOOT, W., BEUVERY, E.C., KERSTEN, G.F.A. (1997). Vaccines. In: *Pharmaceutical Biotechnology*, Ed.: J. A. Crommelin, R. D. Sindelar. UK: Harwood Academic Publishers, p.: 255-278
- JEONG, K. I., SUZUKI, H., NAKAYAMA, H., DOI, K. (2000). Ultrastructural study on the follicle-associated epithelium of nasal-associated lymphoid tissue in specific pathogen-free (SPF) and conventional environment-adapted (SPF-CV) rats. *J. Anat.*, **196**: 443-451
- JOHANSEN, P., GANDER, B., MERKLE, H. P. (1998). Physico-chemical and antigenic properties of tetanus and diphtheria toxoids and steps towards improved stability. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1425**: 425-436
- JONES, N. (2001). The nose and paranasal sinuses physiology and anatomy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **51**: 5-19
- JORDAN, W. (2002). Antigen Measurement Using ELISA. In: *The Protein Protocols Handbook (2nd Ed.)*. Humana Press Inc. p.: 1083-1088
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. (2006). Solunum Sistemi. In: *Temel Histoloji, Çeviri* Ed.: Y. Aytekin, S. Solakoğlu, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, s.: 349-354
- KALIN, M. (1998). Pneumococcal serotypes and their clinical relevance. *Thorax*, **53**: 159-162
- KATZ, S. L. (1997). Future vaccines and a global perspective. *The Lancet*, **350**: 1767-1770
- KAYA, A. (2002). Elektroforez Yöntemleri. *Dicle Tıp Dergisi*, **29(3)**: 57-63
- KENSIL, C. R. (1996). Saponins as vaccine adjuvants. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **13(1-2)**: 1-55.
- KENSIL, C. R., MO, A. X., TRUNEH, A. (2004). Current vaccine Adjuvants: An overview of a diverse class. *Frontiers in Bioscience*, **9**: 2972-2988
- KERSTEN, G. F. A., CROMMELIN, D. J. A. (2003). Liposomes and ISCOMs. *Vaccine*, **21**: 915-920



- KERSTEN, G., HIRSCHBERG, H. (2004). Antigen delivery systems. *Expert Rev. Vaccines*, **3(4)**: 453-462
- KESER, M., HATİPOĞLU, N. (2008). Bağışıklık antijenleri ve Aşı içeriği. *Çocuk Enf. Derg.*, **2(1)**: 15-24
- KIM, B., BOWERSOCK, T., GRIEBEL, P., KIDANE, A., BABIUK, L. A., SANCHEZ, M., ATTAH-POKU, S., KAUSHIK, R. S., MUTWIRI, G. K. (2002). Mucosal immune responses following oral immunization with rotavirüs antigens encapsulated in alginate microspheres. *Journal of Controlled Release*, **85**: 191-202
- KHOSRAVI-DARANI, K., PARDAKHTY, A., HONARPISHEH, H., RAO, V. S. N. M., MOZAFARI, M. R. (2007). The role of high-resolution imaging in the evaluation of nanosystems for bioactive encapsulation and targeted nanotherapy. *Micron*, **38**: 804-818
- KRISHNAN, L., DICAIRE, C. J., PATEL, G. B., SPROTT, G. D. (2000). Archaeosome Vaccine Adjuvants Induce Strong Humoral, Cell-Mediated, and Memory Responses: Comparison to Conventional Liposomes and Alum. *Infection and Immunity*, **68(1)**: 54-63
- KURELLA, S., MANOCHA, M., SABHNANI, L., THOMAS, B., RAO, D. N. (2000). New age adjuvants and delivery systems for subunit vaccines. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, **15**: 83-100
- LAMPRECHT, A., UBRICH, N., PEREZ, M. H., LEHR, C. M., HOFFMAN, M., MAINCENT, P. (1999). Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification. *International Journal of Pharmaceutics*, **184**: 97-105
- LAKSHMANA, P. S., SHIRWAIKAR, A. A., SHIRWAIKAR, A., KUMAR, A. (2009). Formulation and evaluation of sustained release microspheres of rosin containing aceclofenac. *ARS Pharmaceutica*, **50(2)**: 51-62
- LAO, L. L., VENKATRAMAN, S. S., PEPPAS, N. A. (2008). Modeling of drug release from biodegradable polymer blends. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **70**: 796-803
- LEVINE, M. M., SZTEIN, M. B. (2004). Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. *Nature Immunology*, **5**: 460-464
- LIN, W. J., HUANG, L. I. (2001). Influence of pluronics on protein-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) microparticles. *Journal of Microencapsulation*, **18(2)**: 191-197
- LIU, M. A. (2003). DNA vaccines: a review. *Journal of Internal Medicine*, **253**: 402-410
- LYNG, J. (1990). Quantitative Estimation of Diphtheria and Tetanus Toxoids. 4. Toxoids as International Reference Materials Defining Lf-units for Diphtheria and Tetanus Toxoids. *Biologicals*, **18**: 11-17

- MAGISTRIS, M. T. D. (2006). Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58**: 52-67
- MAINARDES, R. M., URBAN, M. C., CINTO, P. O., CHAUD, M. V., EVANGELISTA, R. C., GREMIAO, M. P. (2006). Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. *Current Drug Delivery*, **3(3)**: 275-285
- MARTTIN, M., SCHIPPER, N. G. M., VERHOEF, J. C., MERKUS, F. W. H. M. (1998). Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **29**: 13-38
- MATTHIAS, D. M., GARRISON, M. M., NELSON, C., NEWLAND, S., ROBERTSON, J. (2007). Freezing temperatures in the vaccine cold chain: A systematic literature review. *Vaccine*, **25**: 3980-3986
- MAULDING, H. V., TICE, T. R., COWSAR, D. R., FONG, J. W., PEARSON, J. E., NAZARENO, J. P. (1986). Biodegradable microspheres: Acceleration of polymeric excipient hydrolytic rate by incorporation of a basic medicament. *J. Control. Release*, **3**: 103-117
- MBOW, M. L., DE GREGORIO, E., VALIANTE, N. M., RAPPUOLI, R. (2010). New adjuvants for human vaccines. *Current Opinion in Immunology*, **22(3)**: 411-416
- McCONNELL, E. L., BASIT, A. W., MURDAN, S. (2008). Colonic antigen administration induces significantly higher humoral levels of colonic and vaginal IgA, and serum IgG compared to oral administration. *Vaccine*, **26**: 639-646
- McNEELA, E. A., MILLS, K. H. G. (2001). Manipulating the immune system: humoral versus cell-mediated immunity. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **51**: 43-54
- McNEELA, E. A., DAVIS, S. S., ILLUM, L., JABBAL-GILL, I., MILLS, K. H. G., O'CONNOR, D., PEPPOLONI, S., PIZZA, M., RAPPUOLI, R. (2001). A mucosal vaccine against diphtheria: formulation of cross reacting material (CRM<sub>197</sub>) of diphtheria toxin with chitosan enhances local and systemic antibody and Th2 responses following nasal delivery. *Vaccine*, **19**: 1188-1198
- MESTECKY, J., COMPANS, R. W., MICHALEK, S. M., MOLDOVEANU, Z., MORROW, C. D., RUSSELL, M.W., SCHAFER, D. P. (1997). Current options for vaccine delivery systems by mucosal routes. *Journal of Controlled Release*, **48**: 243-257
- METZ, B., CROMMELIN, D. J. A., HENNINK, W. E., JISKOOT, W., KERSTEN, G. F. A. (2003). Physicochemical and immunochemical techniques predict the quality of diphtheria toxoid vaccines. *Vaccine*, **22**: 156-167

- METZ, B., CROMMELIN, D. J. A., HENNINK, W. E., JISKOOT, W., KERSTEN, G. F. A., KINGMA, R., MEKKES, D. (2007). Quality control of routine, experimental and real-time aged diphtheria toxoids by in vitro analytical techniques. *Vaccine*, **25**: 6863-6871
- MINICHIELLO, V. (2002). New vaccine technology--what do you need to know? *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, **14(2)**: 73-81
- MIRCHEFF, A. K. (2010). Adaptive Immune System and the Eye: Mucosal Immunity. In: *Encyclopedia of the Eye* (2nd Ed.), Ed.: D. A. Dartt, J. Besharse, R. Dana. Elsevier/Academic Press. p.: 33-40
- MITRA, R., CHU, W. A., MITRA, A. K., PEZRON, I. (2000). Lipid emulsions as vehicles for enhanced nasal delivery of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, **205**: 127-134
- MORLOCK, M., KOLL, H., WINTER, G., KISSEL, T. (1997). Microencapsulation of erythropoietin, using biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide): protein stability and the effects of stabilizing excipients. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **43**: 29-36
- MUKERJEE, A., SINHA, V. R., PRUTHI, V. (2007). Preparation and Characterization of Poly-ε-caprolactone Particles for Controlled Insulin Delivery. *Journal of Biomedical & Pharmaceutical Engineering*, **1(1)**: 40-44
- MURILLO, M., GRILLO, M. J., RENE, J., MARIN, C. M., BARBERAN, M., GONI, M. M., BLASCO, J. M., IRACHE, J. M., GAMAZO, C. (2001). A Brucella ovis antigenic complex bearing poly-ε-caprolactone microparticles confer protection against experimental brucellosis in mice. *Vaccine*, **19**: 4099-4106
- MURILLO, M., GONI, M. M., IRACHE, J. M., ARANGO, M. A., BLASCO, J. M., GAMAZO, C. (2002). Modulation of the cellular immune response after oral or subcutaneous immunization with microparticles containing *Brucella ovis* antigens. *Journal of Controlled Release*, **85**: 237-246
- MYGIND, N., DAHL, R. (1998). Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **29**: 3-12
- NANDI, R., BHATTACHARJEE, A. K., DE, M., PURKAYASTHA, P. (2003). Diphtheria--the patch remains. *International Congress Series*, **1254**: 391-397
- NEUTRA, M. R., KOZLOWSKI, P. A. (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat. Rev. Immunol.*, **6**: 148-158
- NIH-NIAID (2008). Understanding Vaccines, What they are, How they Work. Erişim: [<http://www.niaid.nih.gov/topics/vaccines/documents/undvacc.pdf>]. Erişim Tarihi: 29. 08. 2008

- ODA, K., MATSUDA, H., MURAKAMI T., KATAYAMA, S., OHGITANI, T., YOSHIKAWA, M. (2000). Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biol. Chem.*, **381(1)**: 67-74.
- O'DONNELL, P. B., MCGINITY, J. W. (1997). Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **28**: 25-42
- OGRA, P. L., FADEN, H., WELLIVER, R. C. (2001). Vaccination Strategies for Mucosal Immune Responses. *Clinical Microbiology Reviews*, **14(2)**: 430-445
- O'HAGAN, D. T. Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines. (1998). *Advanced Drug Delivery Reviews*, **34**: 305-320
- O'HAGAN, D. T., OTT, G.S., NEST, G.V. (1997). Recent advances in vaccine adjuvants: the development of MF59 emulsion and polymeric microparticles. *Molecular Medicine Today*, **3**: 69-75
- O'HAGAN, D. T., MACKICHAN, M. L., SINGH, M. (2001). Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomolecular Engineering*, **18**: 69-85
- O'HAGAN, D. T., DE GREGORIO, E. (2009). The path to a successful vaccine adjuvant-'the long and winding road'. *Drug Discovery Today*, **14(11-12)**: 541-551
- OZSOY, Y., GUNGOR, S., CEVHER, E. (2009). Nasal delivery of high molecular weight drugs. *Molecules*, **14(9)**: 3754-3779.
- ÖSTH, K., GRASJÖ, J., BJÖRK, E., 2002. A new method for drug transport studies on pig nasal mucosa using a horizontal ussing chamber. *Journal of pharmaceutical sciences*, **91(5)**: 1259-1273.
- ÖZCENGİZ, E., AKKUŞ, M., HACIÖMEROĞLU, M., TARHAN, G. (1998). Difteri Toksininin Hızlı Saflaştırılması. *Mikrobiyol. Bült.*, **32**: 123-130
- PARK, J. H., YE, M., PARK, K. (2005). Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. *Molecules*, **10**: 146-161
- PATEL, Y. L., SHER, P., PAWAR, A. P. (2006). The Effect of Drug Concentration and Curing Time on Processing and Properties of Calcium Alginate Beads Containing Metronidazole by Response Surface Methodology. *AAPS PharmSciTech*, **7(4)**: E1-E7
- PEARSE, M. J., DRANE, D. (2005). ISCOMATRIX<sup>®</sup> adjuvant for antigen delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **57**: 465-474

- PERACCHIA, M. T., GREF, R., MINAMITAKE, Y., DOMB, A., LOTAN, N., LANGER, R. (1997). PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: Investigation of their drug encapsulation and release characteristics. *Journal of Controlled Release*, **46**: 223-231
- PERESWETOFF-MORATH, L. (1998). Microspheres as nasal drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **29(1-2)**: 185-194
- PETROVSKY, N., AGUILAR, J. C. (2004). Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunology and Cell Biology*, **82**: 488-496
- PETROVSKY, N., HEINZEL, S., HONDA, Y., LYONS, A.B. (2007). New-age vaccine adjuvants: friend or foe? *BioPharm International*, **20**: A24-A33.
- PIZZA, M., GIULIANI, M. M., FONTANA, M. R., MONACI, E., DOUCE, G., DOUGAN, G., MILLS, K. H. G., RAPPUOLI, R., DEL GIUDICE, G. (2001). Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. *Vaccine*, **19**: 2534-2541
- PLOTKIN, S. A. (2005). Vaccines: past, present and future. *Nature Medicine*, **11**: 5-11
- PRENETA-BLANC, R., BIERLEY, M., RIGSBY, B., SESARDIC, D., TIERNEY, R., WILHELMSSEN, E. S. (2008). Calibration of replacement international standards of diphtheria and tetanus toxoids for use in flocculation test. *Biologicals*, **36**: 315-326
- READ, R. C., BOND, J., FISHER, A., ILLUM, L., JABBAL- GILL, I., JENNINGS, R., NAYLOR, S. C., POTTER, C. W. (2005). Effective nasal influenza vaccine delivery using chitosan. *Vaccine*, **23**: 4367-4374
- RAJAPAKSA, T. E., LO, D. D. (2010). Microencapsulation of Vaccine Antigens and Adjuvants for Mucosal Targeting. *Current Immunology Reviews*, **6**: 29-37
- REDDY, I. K. (1998). Protein and Peptide Drug Delivery. In: *Pharmaceutical Biotechnology: A Programmed Text* (2nd Ed.), Ed.: S. W. Zito. Hardcover, CRC Press. p.: 99-122
- REED, S. G., BERTHOLET, S., COLER, R. N., FRIEDE, M. (2009). New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology*, **30(1)**: 23-32
- RESTA, O., BARBARO, M., CARNIMEO, N. (1992). A comparison of sodium cromoglycate nasal solution and powder in the treatment of allergic rhinitis. *Br. J. Clin. Practice*, **46**: 94-98
- RIEDEL, S. (2005). Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc. (Bayl Univ Med. Cent.)*, **18(1)**: 21-25

- ROSCA, I. D., WATARI, F., UO, M. (2004). Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *Journal of Controlled Release*, **99**: 271-280
- ROTH, Y., CHAPNIK, J. S., COLE, P. (2003). Feasibility of aerosol vaccination in humans. *The Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, **112(3)**: 264-70.
- RYAN, E. J., DALY, L. M., MILLS, K. H. G. (2001). İmmünomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends in Biotechnology*, **19(8)**: 293-304
- SAATÇI, F., BOZKIR, A. (2003). Aşıların nazal yoldan uygulanışı. *J. Fac. Pharm.*, **32(3)**: 175-193
- SAYIN, B., ALPAR, H. O., LI, X. W., SOMAVARAPU, S., ŞENEL, S. (2007). A New Vaccine Delivery System With Chitosan Derivative for Intranasal İmmünisation: In Vitro/In Vivo Evaluations. *Advances in Chitin Science*, **X**: 219-224
- SAYIN, B., ALPAR, H. O., LI, X. W., SESARDIC, D., SOMAVARAPU, S., ŞENEL, S., THANOU, M. (2008). Mono-*N*-carboxymethyl chitosan (MCC) and *N*-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles for non-invasive vaccine delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **363**: 139-148
- SCHIPPER, N. G. M., MERKUS, F. W. H. M., VERHOEF, J. C. (1991). The Nasal Mucociliary Clearance: Relevance to Nasal Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*, **8(7)**: 807-814
- SCHOLL, I., BOLTZ-NITULESCU, G., JENSEN-JAROLIM, E. (2005). Review of novel particulate antigen delivery systems with special focus on treatment of type I allergy. *Journal of Controlled Release*, **104**: 1-27
- SHAHIWALA, A., AMIJI, M. M., VYAS, T. K. (2007). Nanocarriers for Systemic and Mucosal Vaccine Delivery. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, **1**: 1-9
- SHARMA, S., BENSON, H. A. E., CHEN, Y., MUKKUR, T. K. S. (2009). Pharmaceutical Aspects of Intranasal Delivery of Vaccines Using Particulate Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **98(3)**: 812-843
- SIMON, J. K., LEVINE, M. M., WENIGER, B. G., RESTREPO, M. H. (2010). Mucosal Immünization and Needle-Free Injection Devices. In: *New Generation Vaccines* (4nd Ed.), Ed.: M. M. Levine, G. Dougan, M. F. Good, M. A. Liu, G. J. Nabel, J. P. Nataro, R. Rappuoli. Informa Healthcare USA, Inc. p.: 405-414
- SINGH, M., O'HAGAN, D.T. (2002). Recent Advances in vaccine adjuvants. *Pharmaceutical Research*, **19(6)**: 715-728

- SINGH, J., PANDIT, S., BRAMWELL, V. W., ALPAR, H. O. (2006). Diphtheria toxoid loaded poly-( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles as mucosal vaccine delivery systems. *Methods*, **38**: 96-105
- SINHA, V. R., TREHAN, A. (2003). Biodegradable microspheres for protein delivery. *Journal of Controlled Release*, **90**: 261-280
- SINHA, V. R., BANSAL, K., KAUSHIK, R., KUMRIA, R., TREHAN, A. (2004). Poly--caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*, **278**: 1-23
- SLOBBE, L., MEDLICOTT, N., LOCKHART, E., DAVIES, N., TUCKER, I., RAZZAK, M., BUCHAN, G. (2003). A prolonged immune response to antigen delivered in poly ( $\epsilon$ -caprolactone) microparticles. *Immunology and Cell Biology*, **81**: 185-191
- SLUTTER, B., HAGENAARS, N., JISKOOT, W. (2008). Rational design of nasal vaccines. *Journal of Drug Targeting*, **16(1)**: 1-17
- SMITH, P. K., FUJIMOTO, E. K., GARTNER, G. T., GOEKE, N. M., HERMANSON, G. T., KLENK, D. C., KROWN, R. I., OLSON, B. J., PROVENZANO, M. D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150(1)**: 76-85
- SOANE, R. J., DAVIS, S. S., JONES, N. S., FRIER, M., ILLUM, L., PERKINS, A. C. (1999). Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive. *International Journal of Pharmaceutics*, **178**: 55-65
- SOMAVARAPU, S., ALPAR, O. H., BANDERA, M., GRADASSI, G., PANDIT, S., RAVICHANDRAN, E. (2005). Effect of Vitamin E TPGS on immune response to nasally delivered diphtheria toxoid loaded poly(caprolactone) microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, **298**: 344-347
- SÖKER, S. (2005). Dendritik Hücreler. *Dicle Tıp Dergisi*, **3**: 158-160
- STANLEY, A. C., BUXTON, D., INNES, E. A., HUNTLEY, J. F. (2004). Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* tachyzoite antigen encapsulated into PLG microspheres induces humoral and cellmediated immunity in sheep. *Vaccine*, **22(29-30)**: 3929-3941
- STOSCHECK, C. M. (1990). Quantitation of Protein. In: *Methods of Enzymology: vol. 182, Guide to Protein Purification*, Ed.: M. P. Deutscher. Academic Press. p.: 50-68
- STURESSON, C., ARTURSSON, P., SVENSSON, L., CARLFORS, J. (1996). Preparation and characterization of hydrophobic PLG microspheres suitable for oral vaccination with rotavirüs. *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.*, **23**: 515-516

- SUBHASHINI, M. H., RAVINDRANATH, M. H. (1981). Electrophoretic separation of proteins. In: *Manual of Research Methods for Crustacean Biochemistry and Physiology*. Ed: M. H. Ravindranath. The Diocesan Press. p.: 103-115
- SYED, U. M., WOO, A. F., PLAKOGIANNIS, F., JIN, T., ZHU, H. (2008). Cochleates bridged by drug molecules. *International Journal of Pharmaceutics*, **363**: 118-125
- TABAK, F. (1998). Erişkin Yaş Döneminde Aşılama. In: *Çocuk ve Erişkinde Bağışıklama*, Ed.: Lale Sever. İstanbul: Deonta Güncel Tıp Yayınları, s.: 33-45
- TAFAGHODI, M., JAAFARI, M. R., SAJADI, T. S. A. (2006). Nasal immunization studies using liposomes loaded with tetanus toxoid and CpG-ODN. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **64(2)**: 138-145
- TAMBER, H., JOHANSEN, P., MERKLE, H. P., GANDER, B. (2005). Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**: 357-376
- THE HANDBOOK of PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS ONLINE. (2009). Monographs: Carbomer, Aliphatic Polyesters
- TOMASI, M., DERTZBAUGH, M. T., HEARN, T., HUNTER, R. L., ELSON, C. O. (1997). Strong mucosal adjuvanticity of cholera toxin within lipid particles of a new multiple emulsion delivery system for oral immunization. *Eur. J. Immunol.*, **27(10)**: 2720-2725
- TONNESEN, H. H., KARLSEN, J. (2002). Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **28(6)**: 621-630
- TREANOR, J., NOLAN, C., O'BRIEN, D., BURT, D., LOWELL, G., LINDEN, L., FRIES, L. (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**: 254-262
- TÜRKER, S., ONUR, E., ÖZER, Y. (2004). Nasal route and drug delivery systems. *Pharm. World Sci.*, **26**: 137-142
- TYAGI, R. K., SHARMA, P. K., VYAS, S. P., MEHTA, A. (2008). Various carrier system(s)-mediated genetic vaccination strategies against malaria. *Expert Review of Vaccines*, **7(4)**: 499-520
- UGWOKE, M. I., AGU, R. U., KINGET, R., VERBEKE, N. (2005). Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **57**: 1640-1665



- van der LUBBEN, I. M., VERHOEF, J. C., BORCHARD, G., JUNGINGER, H. E. (2001a). Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **14**: 201-207
- van der LUBBEN, I. M., BORCHARD, G., JUNGINGER, H. E., VERHOEF, J. C. (2001b). Chitosan for mucosal vaccination. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **52**: 139-144
- VAJDY, M., O'HAGAN, D. T. (2001). Microparticles for intranasal immunization. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **51**: 127-141
- VAJDY, M., DONNELLY, J., O'HAGAN, D., POLO, J., SINGH, M., SRIVASTAVA, I. (2004). Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA-based vaccines. *Immunology and Cell Biology*, **82**: 617-627
- VOGEL, F. R., HEM, S. L. (2008). Immunologic adjuvants. In: *Vaccine* (5nd Ed.), Ed.: S. A. Plotkin, W. A. Orenstein, P.A. Offit. Philadelphia: WB Saunders. p.: 59-71
- VORA, J., CHRISTENSEN, G., REGINATO, M., MACIZ, R., GUCHOCO, C., OH, C. (1993). Influence of formulation variables on plasma growth hormone levels following intranasal administration of growth hormone releasing peptide in anesthetized rats. *Journal of Controlled Release*, **24**: 193-200
- WADELL, C. (2002). Nasal Drug Delivery- In Vitro Studies on Factors Influencing Permeability and Implications on Absorption. Acta Universitatis Upsaliensis.
- WALKER, J. M. (2002a). The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. In: *The Protein Protocols Handbook (2nd Ed.)*. Humana Press Inc. p.: 11-14
- WALKER, J. M. (2002b). SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In: *The Protein Protocols Handbook (2nd Ed.)*. Humana Press Inc. p.: 61-67
- WASHINGTON, N., BUSH, D., GILL, D. A., JACKSON, S. J., MASON, J., PITT, K., RAWLINS, D. A., STEELE, R. J. C. (2000). Determination of baseline human nasal pH and the effect of intranasally administered buffers. *International Journal of Pharmaceutics*, **198**: 139-146
- WEISBERG, S. S. (2007). Diphtheria. *Dis. Mon.*, **53**: 430-434
- WHARTON, M., VITEK, C. R. (2004). Diphtheria Toxoid. In: *Vaccines* (4th Ed.). Ed.: S. A. Plotkin, W. A. Orenstein. Philadelphia: Elsevier Inc., p.: 211-228
- World Health Organization (WHO). (1993). The Immunological Basis for Immunization Series/Module 2: Diphtheria, p.: 1-12
- World Health Organization (WHO). (1997a). Manual For The Production And Control Of Vaccines, Diphtheria Toxoid

- World Health Organization (WHO). (1997b). Potency control of bacterial vaccines, ELISA methods for the determination of diphtheria and tetanus antibodies
- World Health Organization (WHO). (1999). World Health Report.
- World Health Organization (WHO). (2006). Weekly epidemiological record. **81(3)**: 21-32
- XIE, J., NG, W. J., LEE, L. Y., WANG, C. (2008). Encapsulation of protein drugs in biodegradable microparticles by co-axial electrospray. *Journal of Colloid and Interface Science*, **317**: 469-476
- YEO, Y., BAEK, N., PARK, K. (2001). Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **6**: 213-230
- YOUAN, B. B. C., BENOIT, M. A., BARAS, B., GILLARD, J. (1999). Protein-loaded poly(epsilon-caprolactone) microparticles. I. Optimization of the preparation by (water-in-oil)-in water emulsion solvent evaporation. *Journal of Microencapsulation*, **16(5)**: 587-599
- YUKI, Y., KIYONO, H. (2003). New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Reviews in Medical Virology*, **13**: 293-310
- YURDAKÖK, K., İNCE, T. (2008). Aşı adjuvanları. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, **51**: 225-239
- ZAMBAUX, M. F., BONNEAUX, F., GREF, R., DELLACHERIE, E., VIGNERON, C. (1999). Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, **60**: 179-188
- ZHAO, K., SCHERER, P. W., HAJILOO, S. A., DALTON, P. (2004). Effect of Anatomy on Human Nasal Air Flow and Odorant Transport Patterns: Implications for Olfaction. *Chemical senses*, **29**: 365-379

## ÖZGEÇMİŞ

### I. Bireysel Bilgiler

Adı : Selin  
Soyadı : Çoban  
Doğum yeri ve tarihi : Tatvan – 04.03.1985  
Uyruğu : T.C.  
Medeni durumu : Bekar  
İletişim adresi : Mutlu Günler Sitesi B Blok No:22 Batıkent/ANKARA  
Telefonu : 0 538 964 23 98

### II. Eğitimi

2011 - 2008 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik  
Teknoloji Anabilim Dalı  
2008 - 2004 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
2003 - 1998 Nermin-Mehmet Çekiç Anadolu Lisesi  
Yabancı Dili : İngilizce

### III. Ünvanları

2008 Eczacı

### IV. Mesleki Deneyimi

..... – Haziran 2010 İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü  
(Ruhsatsız Jenerik Ürünler Şube Müdürlüğü-Eczacı)

Mayıs 2010 – Ağustos 2009 İDE Bilgi Merkezi Eğitim ve Danışmanlık  
(Ruhsatlandırma İşleri Asistanı)

### V. Bilimsel İlgi Alanları

Poster sunumu:

- Asuman Bozkır, Berrin Başaran, Selin Çoban, Duygu Hınç, Gülin Amasya. (2009). The Preparation and Characterization of

Poly (Lactide-Co-Glycolide) Microspheres Containing Ovalbumin. *International Symposium on Pharmaceutical Sciences*, 23-26 Haziran 2009, ANKARA

## VI. Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı Burslar:

- TÜBİTAK Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu Bursiyeri (2008-2010)

Ödüller:

- Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Fakülte İkinciliği (2008)
- Türk Eczacıları Birliği 2. Bölge Ankara Eczacı Odası Başarı Belgesi (2009)

Verdiği konferans ya da seminerler :

- « Mikropartiküler Antijen Taşıyıcı Sistemler » başlıklı seminer