

**ALT-BİRİM PROTEİN ANTİJENLERİNİN
İMMUNOJENİTESİNİ ARTIRMAK
AMACIYLA YENİ ADJUVANT/TAŞIYICI SİSTEMLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF A NOVEL ADJUVANT/DELIVERY
SYSTEM TO ENHANCE THE IMMUNOGENICITY OF SUB-
UNIT PROTEIN ANTIGENS**

MERT PEKCAN

PROF. DR SEVDA ŞENEL

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel Teknik ve Araştırma Kurumu (TUBİTAK) tarafından, 2552-Birleşik Meksika Devletleri Ulusal Bilim ve Teknoloji Kurumu (CONACYT) ile İkili İşbirliği programı kapsamında, **215S995** nolu ve “**Alt-Birim Protein Antijenlerinin İmmünojenitesini Artırmak Amacıyla Yeni Adjuvant/Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi**” başlıklı proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

ALT-BİRİM PROTEİN ANTİJENLERİNİN İMMUNOJENİTESİNİ ARTIRMAK AMACIYLA YENİ ADJUVANT/TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Mert PEKCAN

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sevda ŞENEL
Haziran 2021, 108 sayfa

Dünyada bir yıl içinde karşılaşılan ölümlerin yaklaşık %25'i enfeksiyon hastalıklarından kaynaklanmaktadır. Bunların önlenmesinde, en etkin ve güçlü bir yöntem aşılama değildir. Ancak günümüzde, birçok enfeksiyon hastalığı için ne yazık ki aşı ya da aşılama mevcut değildir. Bu nedenle, etkinliği ve koruyuculuğu yüksek olan aşılama geliştirilmesi üzerinde çalışmalar yoğun olarak sürdürülmektedir. Yakın zamanda geliştirilen aşılama büyük bir kısmı rekombinant moleküller ya da patojenik organizmaların alt-birimlerinden oluşmaktadır. Bu yaklaşımın nedeni, elde edilen antijenlerin güvenilirliği yüksek olması aynı zamanda da kolay ve büyük ölçekte üretilebilir olmalarıdır. Tercih edilen bu yaklaşım, her ne kadar yukarıda bahsedilen üstünlüklere sahip olsa da anılan antijenik yapıların immünojenisitesinin zayıf olması nedeniyle, etkin ve uzun süreli bağışıklık sağlanması için adjuvant kullanımı gerekmektedir. İmmün sistemin ve immün yanıt mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ile adjuvant araştırmaları yeni bir boyut kazanmıştır. Adjuvantlar içeriklerine dayalı olarak, spesifik patojenle ilişkili moleküller patenler gibi davranarak, farklı mekanizmalarla doğal immün yanıtı tetiklemektedir.

Bu çalışmada, yüksek oranda saflaştırılmış antijenlerin immünojenisitesini artırma hedefli yeni bir adjuvant sistemi geliştirmek amacıyla *Salmonella Typhi* porinleri ve kitosanın birlikte kullanımı incelenmiştir. Bu amaçla porinlerle yükleme etkinliği yüksek kitosan bazlı jel ve nanopartiküller sistemler geliştirilmiştir. Hazırlanan formülasyonların, hücresel alımı konfokal lazer mikroskopisi tekniği ile incelenmiştir. Makrofaj aktivasyonu, in vitro olarak, J774A.1 fare makrofaj hücre hattında, yüzey belirteçleri ve sitokin salımı belirlenerek incelenmiştir. Porinler tek başına makrofaj hücreleri tarafından alınmazken,

kitosan ile kombine edildiğinde önemli düzeyde alım gerçekleştiği görülmüştür. Porinler+kitosan kombine sistemlerinin CD80 ve MHC-II ($p<0.1$) ekspresyonlarını ve TNF- α ve IL-6 seviyelerini indüklediği in vitro olarak gösterilmiştir. Ayrıca, porinler+kitosan kombinasyonunun IgG ve IgM seviyelerini arttırdığı in vivo olarak BALB/c farelerde gösterilmiştir.

Sonuç olarak, porinler+kitosan kombinasyonu ile elde edilen kombine sistemin immün yanıtı önemli düzeyde artırdığı gösterilmiş olup, geliştirilmiş olan bu kombine sistemin alt birim aşılarda için ümit verici bir adjuvant olarak önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Porin, kitosan jel, kitosan nanopartikül, adjuvant, immün yanıt

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A NOVEL ADJUVANT/DELIVERY SYSTEM TO ENHANCE THE IMMUNOGENICITY OF SUB-UNIT PROTEIN ANTIGENS

Mert PEKCAN

Doctor of Philosophy, Department of Nanotechnology and Nanomedicine

Supervisor: Prof. Dr. Sevda ŞENEL

June 2021, 108 pages

Infectious diseases encompass 25% of deaths in the world per year. The most effective approach in preventing deaths is vaccination. However, at present, the availability of vaccines for many infectious diseases is still scarce. For this reason, intensive studies are being carried out for the development of vaccines with high efficacy and protection rates. Current vaccines developed mainly are based on recombinant molecules or protein subunits of pathogenic organisms. In this approach, the antigens are safer and their manufacturing in large scale is possible. In spite of these advantages, they require adjuvants to provide effective and long-term immunity because of the inheritance of weak immunogenicity of the aforementioned antigenic structures. Adjuvant research has gained an extra dimension after better understanding of the immune system and immune response mechanisms. Depending on their structure, adjuvants trigger the innate immune response through different mechanisms by behaving or acting like specific pathogen associated molecular patterns.

In this study, we combined *Salmonella Typhi* porin proteins and chitosan to develop a new adjuvant system to increase the immunogenicity of highly purified antigens. For this purpose, chitosan-based gel and nanoparticles having high porin proteins loading efficiency are prepared. The cellular uptake of the formulations was examined by confocal laser microscopy. In-vitro macrophage activation studies were performed by determining surface markers and cytokine release in the J774A.1 mouse macrophage cell line. A significant uptake of porins

was observed when combined with chitosan, whilst the porins alone were not taken up by macrophage cells. Further, it was demonstrated in vitro that the porins+chitosan combination systems induced CD80 and MHC-II ($p<0.1$) expressions as well as TNF- α and IL-6 levels. Furthermore, in vivo studies performed in BALB/c mice demonstrated that IgG and IgM levels were increased. In conclusion, we have demonstrated that the combination of chitosan+porins significantly increases the immune response, suggesting the developed combined system as a promising adjuvant for subunit vaccines.

Keywords: Porins, chitosan gel, chitosan nanoparticles, adjuvant, immune response

TEŞEKKÜR

Çalışmamın planlanması, sürdürülmesi ve sonuçlandırılmasında, engin bilgisi, katkısı, emeği ve tecrübesiyle her an desteğini hissettiğim değerli tez danışman hocam Prof.Dr.Sevda Şenel'e,

Hücre kültürü çalışmaları sırasında değerli bilimsel katkı ve yönlendirmeleri için Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof.Dr.Nuhan Puralı ve Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Güneş Esendağlı'ya,

Tez çalışmalarım esnasında değerlendirmelerini yapan ve katkılarını sunan, tez izleme komitesi değerli üyeleri Prof. Dr. Aykul Özkul ve Prof.Dr. Suna Erdoğan'a

Doktora eğitimim dönemi boyunca bilimsel birikimlerini aktararak azımsanamayacak katkılar sağlayan, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı ile Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı değerli Öğretim Üyelerine,

Deneysel aşamaların tamamında her zaman içtenlikle emeğini ve yardımını esirgemeyen ve yanımda olan ve Araş.Gör. Selin Parmaksız'a,

Eğitimim süresince bir an bile serzenişte bulunmaksızın, başta manevi olmak üzere her yönde yardımı esirgemeyen değerli eşim ve kızıma,

Bugüne kadar, yaşamımın her döneminde destekleriyle kendimi huzurlu ve güvende hissettiğim değerli annem, babam ve kardeşime,

Tez çalışmalarının gerçekleşmesi için proje desteği sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
EŞİTLİKLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 İmmün Sistem ve İmmün Yanıt Oluşma Mekanizması.....	3
2.2 Hümorale ve Hücreli İmmünite.....	5
2.3 Aşı Adjuvantları ve Taşıyıcı Sistemler.....	7
2.4 Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemler.....	12
2.5 Kitosan	13
2.6 Porinler.....	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	18
3.1 Kullanılan Kimyasallar	18
3.2 Kullanılan Cihazlar	19
3.3 Yöntemler.....	20
3.3.1 Porinlerin Elde Edilmesi.....	20
3.3.2 Porinlerin ve Model Antijen Ovalbumin Miktar Tayini	20
3.3.3 Kullanılan Proteinlerin İntegritesinin Elektrophorez Tekniği ile Belirlenmesi	21
3.3.4 Formülasyon Geliştirme.....	21
3.3.4.1 Jel Formülasyonu	22
3.3.4.2 Nanopartikül Formülasyonu	22
3.4 Karakterizasyon Çalışmaları	23
3.4.1 Viskozite	23

3.4.2 Biyoadezyon.....	23
3.4.3 Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı	24
3.4.4 Yüzey Özellikleri.....	24
3.4.5 Yükleme Etkinliği.....	24
3.5 İn Vitro Çalışmalar	25
3.5.1 Salım	25
3.6 Biyoyumluluk	25
3.6.1 Hücresel Alım	26
3.6.2 Makrofaj Aktivasyonu ve Sitokin Salımı	28
3.7 İn vivo Çalışmalar	29
3.7.1 Hayvanların temini.....	30
3.7.2 İmmünizasyon	30
3.7.3 Hümmoral İmmün Yanıt Çalışmaları	31
3.8 Stabilite Çalışmaları.....	33
4. BULGULAR	34
4.1 OVA ve Porinlerin miktar tayini	34
4.2 Formülasyon Geliştirme ve Karakterizasyonu.....	36
4.2.1 Porinlerin ve OVA'nın İntegritesinin Korunması	36
4.2.2 Jel formülasyonu	36
4.2.3 Nanopartikül Formülasyonu	39
4.3 İn Vitro Çalışmalar	41
4.3.1 Salım	41
4.4 Biyoyumluluk	42
4.4.1 Hücresel Alım	43
4.4.2 Makrofaj Aktivasyonu	45
4.4.2.1 Yüzey Belirteçleri	45
4.4.2.2 Sitokin Seviyeleri.....	49
4.5 İn Vivo Çalışmalar	52
4.5.1 Hümmoral İmmün Yanıt	52
4.6 Stabilite Çalışmaları.....	57
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	58
5.1 Geliştirilen Formülasyonların Teknolojik Olarak Değerlendirilmesi	58
5.2 İN VİTRO ÇALIŞMALAR.....	59
5.2.1 Biyoyumluluk ve Hücresel Alım	59

5.2.2 İn Vitro Makrofaj Aktivasyonu	59
5.2.3 Sitokin Seviyeleri	61
5.3 İN VİVO ÇALIŞMALAR	63
5.3.1 Hümorale İmmün Yanıt.....	63
ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR.....	66
EKLER.....	76
ETİK KURUL KARARI	Error! Bookmark not defined.
ÖZGEÇMİŞ.....	Error! Bookmark not defined.

KISALTMALAR

APC	Antijen sunan hücre
BCA	Bikinkonik asit
CD	Başkalaşım kümesi
CTL	Sitotoksik T lenfosit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FDA	Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
FITC	Floresan izotiyosiyanat
IFN	İnterferon
IgG	İmmunglobulin G
IgM	İmmunglobulin M
IL	İnterlökin
LPS	Lipopolisakkarit
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
MPL A	Monofosforil lipid A
NK(C)	Doğal Öldürücü (Hücre)
NP	Nanopartikül
OMP	Dış membran proteini
OPD	o-fenilendiamin hidroklorid
PAMP	Patojen ilişkili moleküler patern
PCL	Polikaprolakton
PE	R-fikoeritrin
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Poli-laktik-glikolik asit
Poly-I:C	Polinozinik: polisitidlik asit
PRR	Patern tanıma reseptörü
SDS-PAGE	Sodyum dodesil süfat poliakrilamid jel elektroforezi
TEM	Geçirimli elektron mikroskobi
TEMED	Tetrametiletilediamin
TLR	Toll benzeri reseptör
TPP	Tripolifosfat pentasodyum
VLP	Virus benzeri partikül

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Doğal ve adaptif immünite ve elemanları [12].....	3
Şekil 2.2 Farklı APC'lerin fonksiyonları[12].....	6
Şekil 2.3 Adjuvantların öngörülen etki mekanizmaları [27].	9
Şekil 2.4 Adjuvantlı ve adjuvantsız aşı uygulamasına karşı immün yanıt oluşumu [34].	10
Şekil 2.5 Kitosanın Kimyasal Yapısı	13
Şekil 2.6 Kitosanın immün yanıt oluşturma mekanizması[76]	15
Şekil 3.1 Biyoadezyon çalışmalarında elde edilen kuvvet-zaman eğrisi.....	24
Şekil 3.2 Akış sitometresi ile hücresel canlılığın belirlenmesi (www.rndsystems.com)	26
Şekil 3.3 Formülasyonların intraperitoneal yolla hayvanlara uygulanması [102]	30
Şekil 3.4 Hümorale immün yanıt çalışmalarında takip edilen protokol	32
Şekil 3.5 Hayvanlarda submandibular kanatma yöntemi ile kan alınması.....	32
Şekil 4.1 Ovalbümin için Kalibrasyon Doğrusu	34
Şekil 4.2 Porin için kalibrasyon doğrusu	35
Şekil 4.3 Jel formülasyonlarda proteinlerin SDS-PAGE analizi: 1) molekül ağırlığı belirleyici, 2) Porin, 3) OVA, 4) Porin+OVA	36
Şekil 4.4 Jel formülasyonlarına ait akış eğrileri (25 ± 0.1 °C) (n=3).....	37
Şekil 4.5 Jel formülasyonlarına ait viskozite değerleri (25 ± 0.1 °C) (n=3) (*p<0.1, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).....	37
Şekil 4.6 Jel formülasyonlarının biyoadezyon çalışmasında elde edilen kuvvet-zaman ilişkisi (a) Kitosan Jel; (b) Porin+OVA+Kitosan Jel; (c) OVA+Kitosan Jel; (d) Porin+Kitosan Jel	38
Şekil 4.7 Kitosan jel formülasyonlarının biyoadezif özellikleri (n=3) (*p<0.1)	39
Şekil 4.8 Nanopartikül formülasyonlarının (CS:TPP = 5:1) TEM görüntüleri: (a) ok başı: boş nanopartiküller; (b) kalın ok: porin yüklü nanopartiküller; ve (c) ince ok: OVA yüklü nanopartiküller.....	40
Şekil 4.9 Nanopartiküllerden porin salımı (n=6).....	41
Şekil 4.10 Nanopartiküllerden OVA salımı (n=6)	42
Şekil 4.11 Formülasyon uygulanan J774A.1 hücrelerinde % canlılık (n=3).....	43

Şekil 4.12 J774A.1 murin makrofaj hücrelerinden alım: Biotinlenen porin Streptavidin-Alexa Fluor 488 (yeşil) ile konjuge edilmiş, hücreler Vybrant Dil (kırmızı) ile boyanmıştır: A) Kontrol; B) Porinler; C) Porin+Kitosan Jel; D) Porin+Kitosan Nanopartikül	44
Şekil 4.13 J774A.1 murin makrofaj hücrelerinden alım: Porin+Kitosan Jel (odak bölümü:23/45, kesit kalınlığı: 0,36 µm); (a) xz ekseninde enine kesitin görüntüsü, (b) xy düzlemindeki görüntülerin z yığını (c) yz ekseninde enine kesitin görüntüsü	45
Şekil 4.14 Formülasyonların J774A.1 hücrelerine uygulanmasını takiben CD80 yüzey belirteç seviyeleri (Negatif kontrol: hücre vasatı, Pozitif kontrol: LPS) *p<0.001	46
Şekil 4.15 Formülasyonların J774A.1 hücrelerine uygulanmasını takiben CD86 yüzey belirteç seviyeleri (Negatif kontrol: hücre vasatı, Pozitif kontrol: LPS) *p<0.001, **p<0.01	47
Şekil 4.16 Formülasyonların J774A.1 hücrelerine uygulanmasını takiben F4/80 yüzey belirteç seviyeleri (Negatif kontrol: hücre vasatı, Pozitif kontrol: (LPS) ..	48
Şekil 4.17 Formülasyonların J774A.1 hücrelerine uygulanmasını takiben MHC II yüzey Belirteci seviyeleri (Negatif kontrol: hücre vasatı, Pozitif kontrol: LPS) ..	49
Şekil 4.18 Formülasyonların uygulanmasını takiben J774A.1 hücrelerinden TNF-alfa salımı (Negatif kontrol: hücre vasatı, Pozitif kontrol: LPS)	51
Şekil 4.19 Formülasyonların uygulanmasını takiben J774A.1 hücrelerinden IL-6 salımı (Negatif kontrol: hücre vasatı, Pozitif kontrol: LPS)	52
Şekil 4.20 İmmünizasyon sonrası porinlere karşı oluşan IgM seviyeleri	53
Şekil 4.21 İmmünizasyon sonrası porinlere karşı oluşan IgG seviyeleri	54
Şekil 4.22 İmmünizasyon sonrası OVA'ya karşı oluşan IgM seviyeleri	55
Şekil 4.23 İmmünizasyon sonrası OVA'ya karşı oluşan IgG seviyeleri	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Jel ve nanopartikül formülasyonuna giren maddeler	22
Çizelge 3.2 J774A.1 hücre hattı özellikleri	25
Çizelge 3.3 Makrofaj aktivasyonu tayininde incelenen yüzey belirteci-spesifik antikolar	29
Çizelge 3.4 İn vivo deney grupları	31
Çizelge 4.1 Ovalbümüne ait doğruluk çalışması sonuçları	35
Çizelge 4.2 Porine ait doğruluk çalışması sonuçları	36
Çizelge 4.3 Çalışmada geliştirilen nanopartiküllerin özellikleri	40
Çizelge 4.4 Porin ve/veya OVA yüklü nanopartiküllerin özellikleri	41
Çizelge 4.5 Formülasyonlarla uyarılan J744A.1 murin makrofaj hücrelerinden sitokin salımı (pg/mL).....	50
Çizelge 4.6 Nanopartiküllere ait stabilite sonuçları (25°C)	57

EŞİTLİKLER DİZİNİ

EŞitlik 3.1	20
EŞitlik 3.2	23
EŞitlik 3.3	23
EŞitlik 3.4	24
EŞitlik 3.5	27
EŞitlik 3.6	27

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Enfeksiyon hastalıklarının, insan sağlığını üzerinde tehdit oluşturması, ölümlere neden olması ve ülke ekonomilerine önemli mali yükler getirmesi nedeniyle bunların önlenmesi ile hastaların bakım ve tedavisi için günümüzde yoğun çaba harcanmaktadır. Aşılama (immünizasyon), hem erken dönemde yani çocukluk çağında hem de yetişkinlerde, yaşamı tehdit eden enfeksiyonların engellenmesinde oldukça etkili ve güvenli bir yöntemdir. Aşılamada esas hedef, kalıcı sakatlık, şiddetli hastalık ve ölümlerin önüne geçilmesi yaklaşımı ile sağlığın korunmasıdır. Hastalık oluşturan patojenin (antijen), canlı vücuduna uygulanarak bağışıklık sisteminin uyarılması ve hastalık meydana getiren patojene karşı direnç şekillendirecek bir immün yanıt oluşturulması esasına dayanan yaklaşım aşılama olarak nitelendirilmektedir [1]. Antijenin verilmesi sonucu bağışıklık sistem hafızasının aktive edilmesiyle, ileride aynı antijenle karşılaşması halinde duruma yanıt verecek antikolar hızla meydana gelir ve patojen daha hastalığı meydana getiremeden bertaraf edilir.

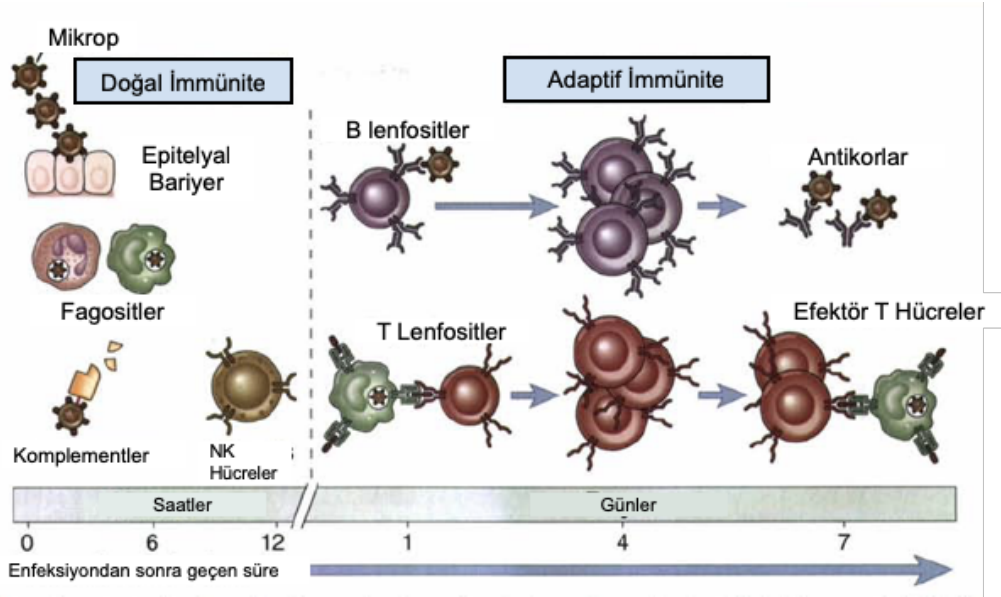
Aşılar, canlı-zayıflatılmış, inaktif, alt-birim, toksoid, konjuge ve DNA aşıları olarak gruplandırılabilir [2] Alt-birim aşılar, virüs ya da mikroorganizmaların sadece bir bölümünü ihtiva eden ve canlı olmayan aşılardır. Mikroorganizmanın, insanlarda istenmeyen etkilere neden olan kısımlar uzaklaştırılarak ve istenen immün yanıtı sağlayabilecek bölümü elde edilir veya rekombinant olarak üretilir [3-5]. Geniş çerçevede bakıldığında, oldukça saf olarak elde edilebilen alt-birim antijenlerinin tercih edilmesinin nedeni, canlı veya zayıflatılmış antijenlere kıyasla güvenliliğinin daha yüksek olmasıdır, ancak bu durumda oluşan bağışıklık yanıtı düşük olmaktadır. Zira saflaştırılmış antijenlerde doğal immün yanıtın aktivasyonu sağlayan ve immün sistem tarafından tespit edilebilen patojenle ilişkili moleküler paternler (Pathogen Associated Molecular Patterns- PAMPs) yer almaz. Bu kısıtlamalar nedeniyle alt-birim antijenlerin immün yanıtını artırmak için adjuvantlarla birlikte uygulanması gereklidir [6, 7]. Antijene özgü yanıtların başlatılması, devamı, güçlendirilmesi ve yönlendirilmesini adjuvant/taşıyıcı sistemler aracılığıyla gerçekleştirilebilmektedir [8-10].

Bu tez çalışmasında, kendi başına immün sistemi uyarabilme yeteneği ve aynı zamanda adjuvant etkinliğine sahip porinlerin, hem immünoestimulan özelliği nedeniyle hem de aşı taşıyıcı sistem olarak kullanılan katyonik bir biyopolimer olan kitosan ile jel veya nanopartikül formunda kombinasyonu ile altbirim antijenlerin immün yanıtını artıracak kombine adjuvant sistemleri geliştirilmesi ve in vitro/in vivo incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 İmmün Sistem ve İmmün Yanıt Oluşma Mekanizması

Bağışıklık sistemi canlıların enfeksiyonlardan korunabilmesini sağlar. Vücudun savunma mekanizması doğal ve edinsel olarak ikiye ayrılır (Şekil 2.1) [11, 12]. Doğal immün yanıt, enfeksiyona karşı en başta devreye giren savunma hattıdır ve hafızası yoktur.



Şekil 2.1 Doğal ve adaptif immünite ve elemanları [12]

Edinsel immün yanıt ise sonradan şekillenir ve daha yavaş gelişerek antijene karşı spesifik bir yanıt oluşturur ve hafıza şekillenir. Doğal bağışıklığın temel bileşenleri epitel bariyerleri, makrofajlar, dendritik hücreler, doğal öldürücü (NK) hücreler, kompleman sistemi ve sitokinlerdir [11, 13]

Doğal bağışıklık hücreleri, mikrobiyal patojenlerde yer alan karakteristik yapıları tanırlar. Doğal bağışıklık, patojenlerde yer alan PAMP'larca uyarılır. Patojenlerdeki bu paternleri tanıyan immün sistem hücrelerindeki reseptörler ise patern tanıyan reseptörler (pathogen recognition receptors-PRRs) olarak adlandırılır [11, 12]. Toll benzeri reseptörler (TLRs), PRR ailesine üyedir. Mikroorganizmalara karşı doğal immün yanıtta temel rol oynayarak pek çok hücre tipinde eksprese edilmektedir [14,

15]. PAMP'ların TLR'lerce tanınması, plazma zarı, endozom, lizozom ve endolizozomlar başta olmak üzere farklı hücre alanlarında gerçekleşir. TLR'ler, hücredeki konumları ve etkileştikleri PAMP ligand türlerine göre iki ayrı alt gruba ayrılır. Bunlardan ilki, hücre yüzeyinde eksprese edilen ve temel olarak lipitler, lipoprotein ve proteinler gibi mikrobiyal membran bileşenlerini tanıyan TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 ve TLR11'den oluşur; diğeri ise endoplazmik retikulum, endozom, lizozom ve endolizozomlar gibi hücre içi veziküllerde eksprese edilen ve mikrobiyal nükleik asitleri tanıyan; TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9' dan oluşur [16-18]. TLR'lerin patojenleri tanınması ile antijen sunucu hücrelerin (APC) aktivasyonunu şekillenir ve reaktif oksijen türleri oluşumu ve nitrik oksit üretimi ile patojenin yok edilmesi, TNF, IL-1 ve IL-12 gibi sitokinlerin, kemokinlerin ve kostimülator moleküllerin salımı ile akut inflamasyon ve edinsel immünitenin uyarılması ve en son aşamada ise büyüme faktörleri, anjiyogenik faktörler, fibroblast oluşumu ile doku yenilenmesi olayları gerçekleşir.

Edinsel immün sisteminin temel elemanı ise lenfositlerdir. Lenfositler, yabancı antijenleri spesifik olarak tanıyıp, bunlara karşı yanıt oluşturur. Bu nedenle humoral ve hücresele bağışıklığın araçlarıdır. Lenfositler antijenleri tanıma mekanizmaları ve fonksiyonlarına göre farklılık gösterirler (Şekil 2.2). B lenfositleri, çözünür antijenleri tanıyarak ve antikor salımı yaparlar. Yardımcı T lenfositleri, APC'lerin yüzeylerindeki antijenleri tanıyarak, bağışıklık sisteminde farklı mekanizmaları tetikleyen sitokinleri salarlar[19]. Sitotoksik T lenfositleri (CTL), enfekte olan hücrelerdeki antijenleri tanır ve bu hücreleri öldürür. Regülatör T lenfositleri, vücudun kendi antijenlerine karşı immün tepkisini baskılayarak ya da önleyerek düzenler. NK hücreleri, enfekte olan hücreler gibi hedefleri tanıyabilmek ve öldürmek için T veya B hücre antijen reseptörlerinden daha az sayı ve kapsamda reseptör içerir [12].

Edinsel immün sistem mikroorganizmalarla savaşmak için üç ana strateji kullanır: Salgılanan antikorlar, hücre dışında mikroorganizmalara tutunarak konakçı hücrelerin enfekte olmasını engeller ve fagositler tarafından yutulması ve akabinde uzaklaştırılmasını sağlar, Fagositler mikropları yutar ve öldürür, yardımcı T hücreleri de fagositik hücrelerin mikrobisidal yeteneklerini güçlendirir, Sitotoksik T lenfositler de, mikroorganizmaların enfekte ettiği ancak antikorların erişemediği hücreleri tahrip eder [12].

2.2 Hümmoral ve Hücreyel İmmünite

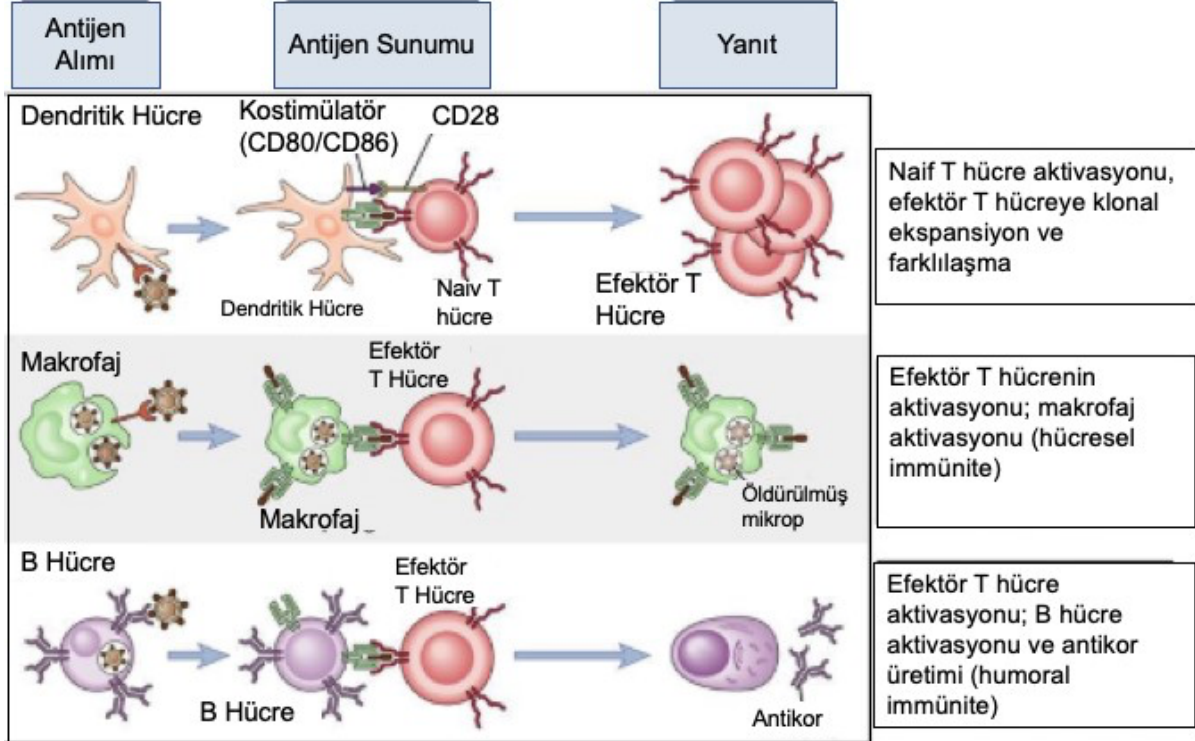
Hümmoral immünite, B lenfositlerce salınan antikorlar aracılı ve hücre dışı patojenlere karşı kanda ve mukozal sıvılarda şekillenen temel savunma sistemidir. Antijen aktivasyonu sonrası, B hücreleri çoğalır ve mikroorganizmaların antijenik bileşenlerine karşı antikorlar üretilir. Enfeksiyonların akut fazında en başta IgM antikorları salımı olur ve ilerleyen dönemlerde yerlerini IgG'lere bırakır. IgG'ler enfeksiyona karşı güçlü, uzun süreli yanıt meydana getirir ve bellek şekillendirirler. T yardımcı hücrelerince regüle edilen bazı sitokinler B hücrelerini eş zamanlı aktive edilebilmektedir; Th2 hücreleri tarafından salınan IL-4 sitokinleri, IgG1 alt sınıfının oluşumunu teşvik ederken, Th1 hücreleri tarafından salgılanan IFN- γ sitokini, IL-4 ve IgG1, IgG2b, IgG3 salınımını inhibe eder ve farelerde IgG2 salınımını indükler. Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) sitokini birçok immünoglobulin izotipinin (IgM, IgG1, IgG2a, IgG3) üretimini inhibe ederken, B hücrelerinin IgA izotipine geçişini aktive ettiği gösterilmiştir [12, 20].

Hücreyel immünite, T lenfositler ve bu lenfositlerce salınan sitokinler ile regüle edilmektedir. Hücreyel immünite, erken savunma hattıdır ve antikorların uyarılmasından önce görev alır. CD4+ T hücreleri, mikroorganizmaları yok etmeleri için makrofajların fagositik etkinliğini sağlar, CD8+ T hücreleri ise hücre içine yerleşmiş mikroorganizmaları barındıran enfekte hücreleri öldürür. Hümmoral immünitede, CD4+ yardımcı T hücreleri, B lenfositleri ile etkileşime girerek B hücrelerinin farklılaşmasını ve çoğalmasını sağlar [12, 21]. T lenfositlerin fonksiyonu, immün sistemdeki diğer hücreler ile olan etkileşimle şekillenir. APC antijeni yakalar ve farklı mekanizmalarla T lenfositlere sunar. Bu hücreler makrofajlar, dendritik hücreler ve B lenfositlerdir. Birbirinden farklı APC'lerin antijeni sunduğu T lenfositler yine farklıdır ve oluşan immün yanıtlarda değişkendir (Şekil 2.2). APC'ler, T hücre aktivasyonunda iki önemli görev alır:

- I. Hücrelerce alınan protein yapısındaki antijenler peptidlere indirgenirler. Açığa çıkan peptidler APC yüzeylerindeki major histouyumluluk kompleksi (major histocompatibility complex-MHC) aracılığıyla T lenfositlere sunulur. Antijenin ekstraselüler veya sitozolik kökenine göre MHC yolağı farklıdır. Ekstraselüler protein antijenleri, endositozla veziküler içine hapsedilir, işlenerek peptidlere indirgenir. Ardından da MHC II'ye bağlanarak hücre yüzeyinde CD4+T lenfositlere (T yardımcı lenfositlere) sunulurlar. Sitozolik

protein antijenleri ise proteozomlarla aracılığıyla peptidlere çevrilir. Bunu izleyen süreçte endoplazmik retikulum içine alınan peptidler MHC l'e bağlanır ve hücre yüzeyinde CD+8 T lenfositlere (sitotoksik T lenfositlere) sunulurlar.

- II. APC'ler, antijenleri yakaladıklarında yanıt olarak farklı yüzey proteinlerini (kostimülatorler) eksprese eder ve sitokin salgılamaya başlar. Kostimülatorler ve sitokinler, T lenfosit yüzeyindeki reseptörler tarafından tanınır ve antijen tanınması ile eşzamanlı olarak T lenfositleri aktive olur böylece T hücre proliferasyonunu ve farklılaşması tetiklenir. Peptit yapısındaki antijenler T lenfosit aktivasyonu için gerekli 1. sinyali oluşturur ve bu da APC'lerin yüzeyinde bulunan CD40 kostimülator molekülü, T lenfositlerin yüzeyinde bulunan CD40 ligandı ile birleşir. Bu birleşme sonucunda 2. sinyal oluşurak, T hücresi aktivasyonunda en iyi karakterize edilmiş kostimülasyon olan ve aktive haldeki APC'lerce eksprese edilen CD80 (B7-1) ve CD86 (B7-2) kostimülator moleküllerinin T hücre yüzey molekülü CD28 ile bağlanması gerçekleşir[20].



Şekil 2.2 Farklı APC'lerin fonksiyonları[12].

2.3 Aşı Adjuvantları ve Taşıyıcı Sistemler

1925 yılında ilk kez, aşılara eklemek kırıntısı, agar, tapyoka, nişasta yağı, lesitin ya da saponin ilavesinin difteri ya da tetanoza karşı elde edilebilecek antitoksin düzeylerinin artırılmasının mümkün olduğunu gösterilmiş ve spesifik antijen aşılarıyla birlikte kullanıldığında, aşının, tek başına oluşturabileceği immün yanıtta daha güçlü bir immün yanıt meydana gelmesini sağlayan bu ürünler için 'adjuvant' ve 'immünoestimulan' kavramını ortaya koyulmuştur [22].

Adjuvantların aktivitesi birden çok faktör sonucu şekillenir ve adjuvantla bir antijen için elde edilen artırılmış immün yanıtın başka bir antijen için ekstrapolasyonu mümkün değildir. Her bir antijenin fiziksel, biyolojik ve immünojenik özellikleri birbirinden farklıdır. Adjuvantlar hedeflenen immün yanıtta göre seçilmelidir ve en optimal yanıt tipi ve en düşük yan etki görülecek şekilde antijenle formüle edilmelidir [4, 23-25]

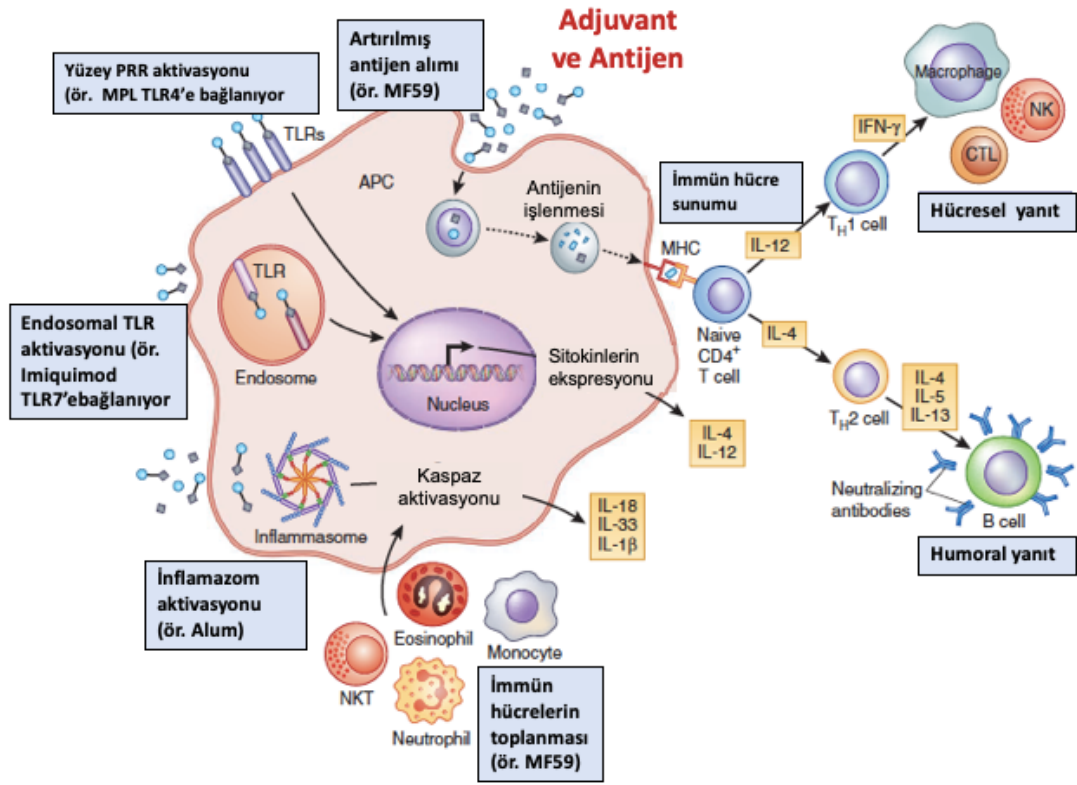
Etki mekanizmasına göre adjuvantlar 2 gruba ayrılmaktadır:

- I. İmmünopotansiyatörler: Doğal ya da sentetik olabilirken, immün sistemi doğrudan uyarırlar. Doğal kaynaklı bakteriyel kökenli yapıya, örnek olarak MLP (monofosforil lipit A), viral yapıya örnek olarak dsRNA, bitkisel yapıya ise Quilaja saponin örnek verilebilir. Sentetik immünopotensiyatör için, MPL-benzeri açillenmiş monosakkarit olan RC-529 (sentetik TLR ligandı) örnek olarak verilebilir. İmmünoestimülatörler, PRR agonisti (en çok TLR agonistleri) tarzında etki göstererek immün sistemin uyarılmasını sağlarlar[26]. Bunlar, reseptör sinyali transkripsiyon faktörlerini aktive ederek, Th1 ve Th2 aracılı immün yanıtlarının oluşmasını ve böylece bağışıklık hücrelerin enjeksiyon bölgesine göç etmesini zemin hazırlayan kemokin ve sitokinlerin üretilmesini sağlar. En çok bilinen örnek, Gram- bakterilerin hücre duvarında bulunan lipopolisakkaritler (LPS) bir TLR4 agonistidir. Poly-I:C (poliinosinik:polisitidilik asit) TLR3 agonisti, MPL TLR4 agonisti, flagellin TLR5 agonisti, imidazoquinolinler TLR7/8 agonisti ve CpG oligodeoksinukleotidleri TLR9 agonisti şeklinde immün yanıtı uyarmaktadırlar [27, 28].

İmmünostimülatörler, diğer bir PRR üyesi olan inflamazomların aktivasyonunda yine rol alır.

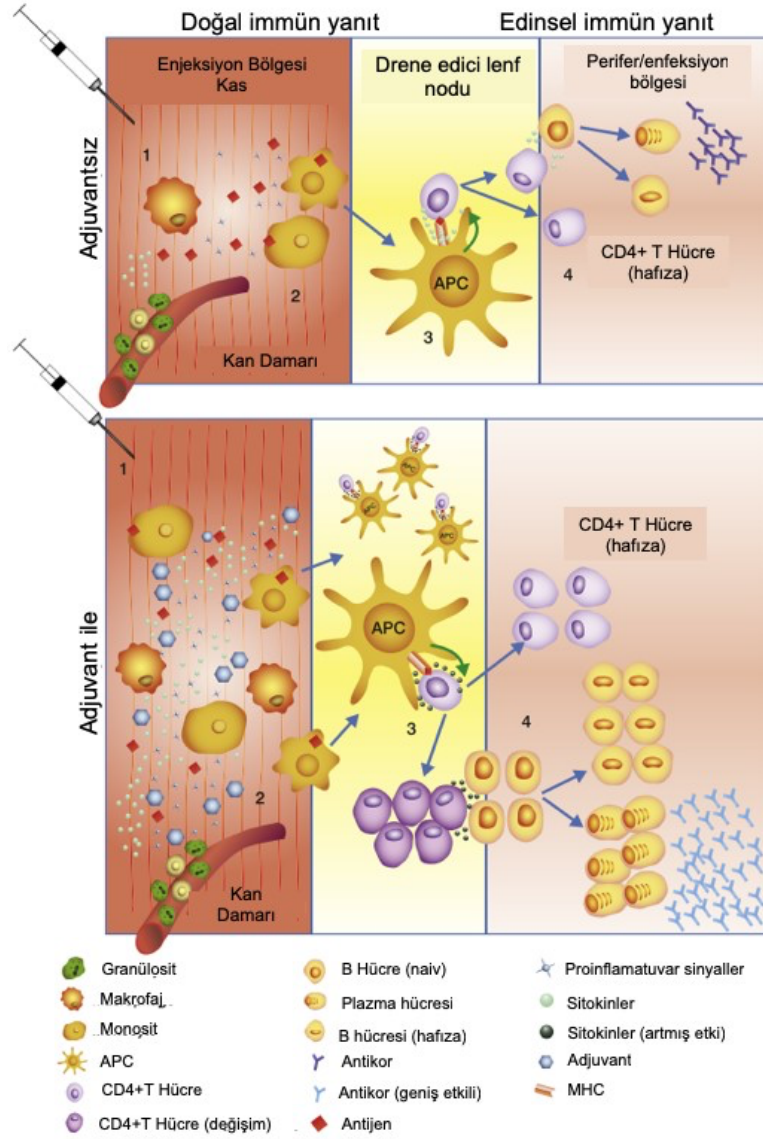
- II. Taşıyıcı sistemler: Antijen ya da adjuvantın taşınmasında yer alırlar ve antijenlerin immün sisteme en istenen şekilde sunulmasını sağlarlar. Adsorban özellikle mineral tuzlar (ör. alüminyum tuzları), lipozomlar, dendrimerler, mikro/nanopartiküller, immün sistemi uyaran bileşikler (immune stimulating complexes-ISCs), virüs benzeri partiküller (virus like particles-VLP), virozomlar ve bunların farklı kombinasyonlarıdır. Genel olarak adsorban ve partiküler adjuvantlar antijenin immün sisteme sunulmasında yer alırken, mikrobiyal, sentetik ve endojen adjuvantlar immün sistemi doğrudan uyararak ya da antijene karşı oluşan yanıtı değiştirerek etki ederler [29-31]. Emülsiyonların ise antijenleri immün sisteme sunma görevlerinin yanı sıra antijen salımını uzatma ve hızla eliminasyonunun önüne geçme gibi işlevleri de bulunmaktadır [32].

Adjuvantların etki mekanizmaları Şekil 2.3'de şematik gösterilmiştir. Birden fazla mekanizmaya sahip adjuvant/taşıyıcı sistemler ise antijen alım şeklinde değişime neden olur, PRR ligandı gibi davranır, inflamazomu aktive eder ve immün sistem hücrelerin bir araya gelmesini sağlar.



Şekil 2.3 Adjuvantların öngörülen etki mekanizmaları [27].

Canlı aşılarda adjuvant kullanımına ihtiyaç duyulmazken, özellikle yüksek düzeyde saflaştırılmış alt-birim aşıların immünitesini artırmak amacıyla adjuvant kullanımına gereksinim duyulmaktadır. Antijenin doğal immün yanıtı başlatmasına yardımcı olmak için kullanılan adjuvantlar PAMP'lar gibi davranarak, bileşimlerine dayalı olarak farklı mekanizmalarla doğal immün yanıtı tetiklemektedir (Şekil 2.3). Antijene karşı APC'lerin gelişimini indüklemek ve aktivasyonunu başlatmakta bunu takiben de edinsel immün cevabın şekillenmesini sağlamaktadırlar (Şekil 2.4) [7, 23, 27, 33, 34].



Şekil 2.4 Adjuvantlı ve adjuvantsız aşı uygulamasına karşı immün yanıt oluşumu [34].

Günümüze kadar pek çok sayıda yeni adjuvant geliştirilmiş ve prelinik/klinik çalışma aşamasına getirilmesine rağmen dünya genelinde onay alabilen adjuvant sayısı oldukça kısıtlıdır [23, 29, 35, 36]. Kendi başına adjuvant olarak onay alabilen tek bileşik alüminyum olup, piyasada mevcut aşılarında bulunan diğer tüm adjuvantların, sadece ürünle birlikte kullanımına onay verilmiştir. Alüminyum bileşikler adjuvant olarak 1930'lu yıllarda kullanılmaya başlanmış ve günümüzde de insan ve veteriner aşılarında yer almaktadır. Bununla beraber, enjeksiyon bölgesinde lokal reaksiyonların indüklenebilmesi, aşırı duyarlılık reaksiyonlarına

aracılık eden IgE antikollarının salınımının uyarılması ve hücre aracılı immün yanıtlarda etkisinin olmaması gibi birçok farklı nedenle alüminyuma alternatif adjuvantlar arayışı devam etmektedir [10, 32].

Alüminyum haricinde ilk kullanılan adjuvant; su içinde yağ emülsiyonu olan MF59 olup influenza aşısında (Fluad) kullanılmıştır ve 1997 yılında Avrupa'da kullanımı onaylanmıştır [37]. Hem taşıyıcı sistem hem de immünopotansiyatör bileşenleri birlikte içeren ilk aşı adjuvantı olan AS04, alum ve monofosforil lipit (MPL) A adjuvantları bileşiminden oluşmaktadır ve 2005 yılında Hepatit B virüsüne karşı geliştirilen aşıda (Fendrix) yer alarak Avrupa'da ruhsatlanmıştır. HPV virüsüne karşı geliştirilen AS04 adjuvantını içeren diğer bir aşı (Cervarix) ise 2010 yılında Amerika'da ruhsat almıştır. Kombine AS01 adjuvantı, lipozom bazlı olup, monofosforil lipit A MPL ve QS-21 içermektedir. Güçlü hümoral ve hücrel immün yanıt oluşmasını sağlamaktadır [38]. TLR4 agonisti olan MPL, Salmonella minnesota R595 suş lipopolisakaritinden (LPS) saflaştırılan lipit A'nın detoksifikasyonu ile elde edilmiştir [39]. Saponin bazlı bir adjuvant olan QS-21 ise toksisitesinin düşüklüğü ve güçlü adjuvant aktivite göstermesi ve özellikle Th1 sitokinleri (IL-2 ve IFN- γ) ile IgG2a antikolları salınımını indükleme özellikleri nedeniyle, aşı çalışmalarında kullanılmıştır [39-41]. Yukarıda bahsedildiği gibi MPL ve saponin (QS21) içeren çok bileşenli AS01 adjuvantı; 2016 yılında sıtma aşısı Mosquirix'de kullanılmak üzere onay almıştır. AS01 adjuvantı içeren diğer bir aşı (Shingrix); Herpes zoster aşısı 2017 yılında EMA'dan, bunu takip eden 2018 yılında da FDA'dan onay almıştır. Sentetik bir adjuvant olan ve metillenmemiş CpG paternleri içeren sentetik oligonükleotitlerden oluşan 1018 ISS Hepatit B aşısında (Heplisav) kullanılmak üzere 2017 yılında FDA'dan onay almıştır.

Virozomlar viral yapıyı taklit eden ancak infekte edici özelliği olmayan lipozomal yapıdaki virozomlar grip aşısı (Inflexal) ve Hepatit B aşısı (Epaxal) aşı formülasyonlarında taşıyıcı-adjuvant olarak kullanılmış, ancak 2014 yılından bu yana üretici firma tarafından piyasaya sunulmamıştır [7, 32, 42, 43]. AS02, MPL ve QS-21 komponentlerinden teşekkül su içinde yağ emülsiyonudur ve güçlü şekilde hem hümoral hem de Th1 yanıtlarını indükleyebilmektedir[44]. Pandemik H5N1 influenza aşısında (Pandemrix) adjuvant olarak kullanılan; AS03, polisorbata 80, α -tokoferol ve skualen içeren su içinde yağ emülsiyonudur [45].

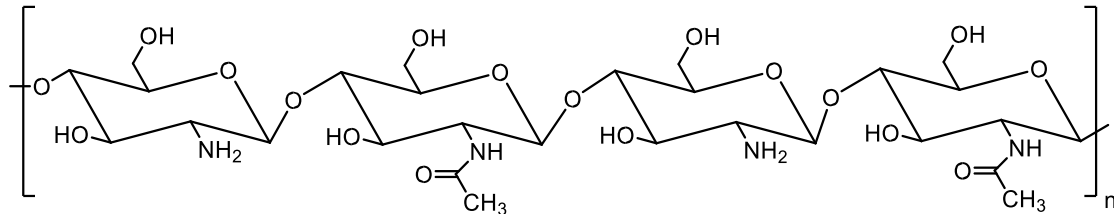
2.4 Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemler

Oldukça geniş kapsamlı moleküler altyapılara sahip doğal bileşikler, yeni ilaçların keşfinde temel teşkil etmektedir[46, 47]. Kimyasal ilaçlar, proteinler ve aşılarda dahil olmak üzere birçok madde, nanosistemlerle uygulanabilir [48]. Nanosistemlerin kendisi tedavide etkili olabilir (nanomateryel) ya da etkin maddelerin taşınmasında görev alabilir (nanotaşıyıcı) [49]. Halihazırda kullanılan nanosistemler arasında nanokristaller, lipozomlar, lipid nanopartiküller, polimerik nanopartiküler, protein nanopartiküller ve metal nanopartiküller bulunmaktadır [50]. Patojenlere benzer boyutta olması nedeniyle nanosistemler adjuvant/taşıyıcı olarak aşı formülasyonlarında kullanılmaktadır. Bu sayede, antijen sunucu hücre reseptörleri tarafından daha kolay tanınmakta ve daha yüksek düzeyde sitokin uyarımını sağlamaktadır [30, 51, 52]. Partiküler adjuvant/taşıyıcı sistemlerin 10 µm'den daha küçük olması hedeflenmektedir. APC'lerin 5 µm'den küçük partikülleri daha etkili şekilde alabildiği gösterilmiştir [53]. Partiküler sistemler aynı zamanda depo görevi üstlenerek antijenin tutulumunu da uzatmaktadır [32, 54, 55]. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında, doğal (kitosan, aljinat, hyalüronik asit vb) ve sentetik polimerler (polianhidritler, polyesterler, polilaktik asit (PLA), poliglaktik asit (PGA), poli (laktik-glikolik asit) (PLGA), polikaprolakton (PCL) vb.) ve bunların kombinasyonları kullanılmıştır [56, 57]. Partiküllerin şekli, boyutu ve yüzey yükü immün yanıtın oluşumunda önemli faktörlerdir. Partiküler sistemler APC'ler tarafından hücre içine alınıp işlendikten sonra açığa çıkan antijen ve MHC II aracılığıyla T lenfositlere sunulur. Makrofaj aktivasyonu ve ilk sinyalin iletimi ardından sinyal 2 başlayarak makrofajlardan CD80 ve CD86'nın ekspresyonu ile T lenfositleri aktivasyonu, proliferasyonunu ve farklılaşması sağlanır. Büyüklüklerine bağlı olarak, partiküllerin değişik immün sistem bileşenleri tarafından mekanizmalarla alınması birbirinden farklı immün yanıtların meydana gelmesine neden olur. Virüs ölçeğindeki partiküller (20-200 nm) endositoz yoluyla alınırken, nanopartiküller, ise doğrudan lenf düğümlerine ulaşarak B hücreleriyle etkileşerek immün yanıt meydana getirmektedir. Daha büyük partiküller (0.5-5 µm) makropinositoz ile, 0.5 µm'den büyük partiküller de ağırlıklı olarak makrofajlarca fagositoz ile alınmaktadır [39, 58, 59]. Katyonik partiküllerin, makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından daha etkin bir şekilde alındığı bilinmektedir. Pozitif yüklü partiküller ile hücre yüzeyi negatif yükü arasındaki elektrostatik etkileşim, partikül ve hücrenin kolaylıkla bağlanabilmesini ve böylece hücresel alımın etkinliğini

güçlendirmektedir [60, 61]. Antijen taşınması yanı sıra partiküler taşıyıcı sistemler immün yanıtı da artırabilmektedir [62]. Partiküler sistemlerin, immünoestimülatör etkinliğe sahip farklı adjuvantlarla da kombine edilebildiği gösterilmiştir [42, 58].

2.5 Kitosan

Kitosan, kabuklu deniz hayvanlarının dış iskeletinde, bazı bakteri ve fungusların hücre duvarlarında yer alan ve selülozun ardından doğal en yaygın bulunan polimer olan kitinin alkali ortamda deasetilasyonu ile elde edilen bir polisakkarittir [63]. Kitosan, 2-amino-2deoksi- β -D glukoz monomerlerinin β -(1 \rightarrow 4) bağı ile birbirine bağlandığı bir polisakkarittir (Şekil 2.5). Deasetilasyonun derecesi, N-asetil-D-glukozamin birimlerinin molar fraksiyonu olarak ifade edilmektedir. Polisakkarid üzerindeki serbest amino gruplarının oranını belirleyen deasetilasyon derecesi, kitin ve kitosan ayrımı için kullanılabilir. Belirgin bir isimlendirme sınır çizgisi ortaya konamamasına rağmen, eğer kitinin deasetilasyon derecesi %65-70 üzerinde ise kitosan olarak bilinir. Deasetilasyon derecesi ve modeli (rastgele ya da blok halinde) kitosanın fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerini ortaya koyar [64, 65]. Kitosanın çok yönlü özelliği, bu yüksek derecede kimyasal reaktif amino gruplarının varlığına bağlıdır. Kitosanın amino grubunun pKa değeri yaklaşık 6.5 olduğundan pozitif yüklüdür [66]. Zayıf asidik çözeltilerde çözünür.



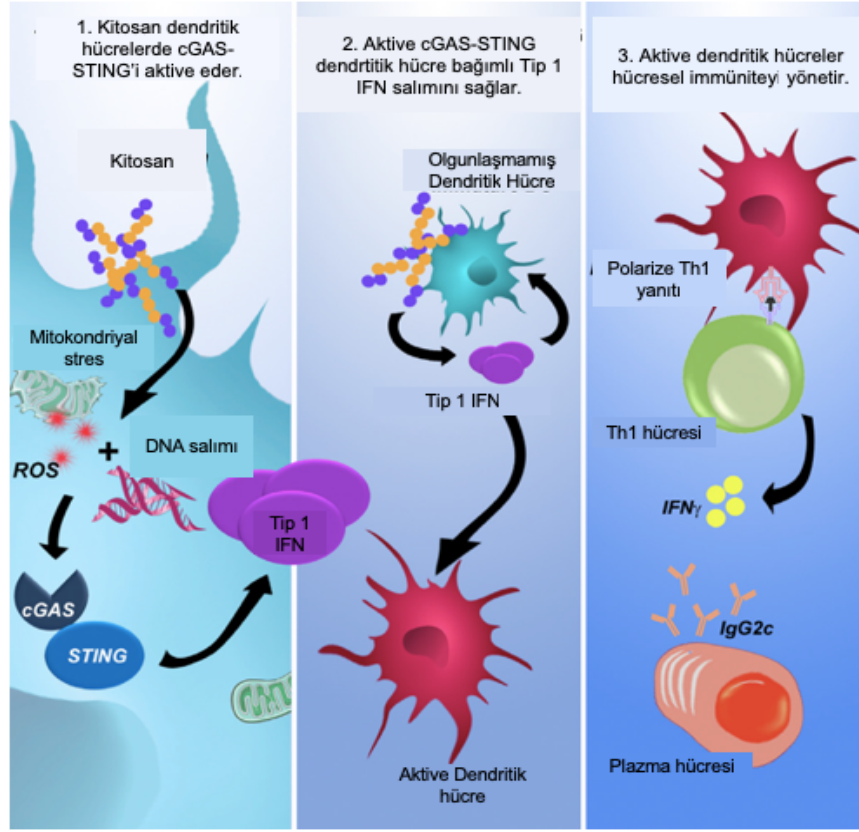
Şekil 2.5 Kitosanın Kimyasal Yapısı

Biyofarmasötik açıdan, kitosan, biyoadezif özelliğe sahiptir, bu da onu mukozal ilaç taşıyıcı sistemler için cazip kılar kılar [67].

Kitosanın biyouyumlu, biyoparçalanabilir, biyoadezif ve biyoaktif özellikleri (antiinflamatuvar, antimikrobiyal, hemostatik, antiviral, doku rejenere edici, yara iyileştirici, vb) nedeniyle ilaç taşıyıcı sistem ve tedavi amacıyla biyomedikal alanda yaygın kullanımı bulunmaktadır. Yapısındaki serbest amino grupları sayesinde

farklı maddelerle konjuge edilmesi mümkündür. Kitosan ile jel, film, sünger, mikro ve nanopartikül vb. farklı formlarda dozaj şekli hazırlamak mümkündür [31, 68, 69]. Bunların yanında bukal, nazal, intestinal, vajinal mukozalarda penetrasyonu arttırdığı gösterilmiştir [70-72].

Kitosan, immün sistemi uyarabilmesi nedeniyle hem antijen taşıyıcı sistem hem de adjuvant olarak değişik formlarda (jel, sulu dispersiyon, mikro ve nanopartikül) farklı antijenlerle mukozal ve parenteral immünizasyon için insan ve hayvanlarda incelenmiş, hücresel ve hümorale yanıtı arttırdığı gösterilmiştir [68, 73-78]. Kitosanın yapısında bulunan amino gruplarının fizikokimyasal özelliklerin esnekliği antijene özgün adjuvant/taşıyıcı sistemlerin tasarlanabilmesi mümkündür. Kitosan, katyonik yapısı sayesinde antijenin dokularla etkileşimini artırarak immün cevabı artırmaktadır. Ayrıca, kitosanın biyoadeziv özelliği, antijenin yüzeyle temas süresini arttırarak, APC'ler tarafından alımı kolaylaştırılmaktadır. [76], kitosanın hücresel immüniteyi aktivasyon mekanizmasını ortaya koymuşlardır. Kitosanın hücreye alımı, cGAS-STING yolağının aktive etmekte ve bunun sonucu meydana gelen Tip-1 IFN'nin, henüz farklılaşmamış dendritik hücrelerin aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir (Şekil 2.6). Aktive olan dendritik hücreler Th1 ile etkileşerek IFN-y oluşumunu tetiklemektedir. Bu yolağın aktivasyonunun, aynı zamanda IgG2c antikor yanıtını da arttırdığı belirtilmektedir[76].



Şekil 2.6 Kitosanın immün yanıt oluşturma mekanizması[76]

Kitosanın türevleri (karboksimetillenmiş ve trimetillenmiş) de bu amaçla denenmiştir. Kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin boyut ve yüzey yük özellikleri immün yanıt üzerinde etkili olduğu görülmüştür [74, 79]. BALB/c farelerde, kitosan nanopartiküllerin tetanoz toksoidi ile kullanımı değerlendirildiğinde; pozitif yüklü kitosan ve trimetil kitosanın, negatif yüklü karboksi metillenmiş olana göre immün yanıtı daha çok artırdığı gösterilmiştir.

2.6 Porinler

Porinler, protein yapıda Gram - bakterilerin dış membranında yer alan ve lümeninde su barındıran açık kanallardır [80]. Bu kanallar vasıtasıyla iyon ve çözünebilen maddelerin geçişini mümkün kılarlar. Bakterilerin patojenisitesini belirleyen önemli unsurlardandır. Yapılarında yüksek miktarda β tabaka trimer yapılar bulunur. İlk ve son β kollar antiparalel tarzda eşleşerek silindir formu şekillenir ve yapı kapanır. Yapının ortasında meydana gelen boşluğun genişliği por geçirgenliğinde belirleyicidir. Dışarıda kalan yapılar yüzey özelliklerini belirler. Çapları 0,6-2,3 nm arasında değişkenlik gösterir [81].

Porinler bakteriyel konakla etkileşimde ve hücre fizyolojisinde önemli rol oynarlar. Bakteriyel lizis ve ya çıkıntı oluşturarak hücre büyümesi boyunca lipopolisakkarit (LPS) ile birlikte membrandan salımları gerçekleşir. Porinler, inflamatuvar ve immünolojik hücre yanıtında pek çok biyolojik role sahiptir. β -yapıdaki bu içi sıvı dolu transport kanallarını tekrarlayan fiziksel karakteri immünojenisiteyi artırır [80, 82, 83].

Salmonella Typhi'den elde edilen porinlerinin uzun süreli bağışıklık meydana getirebildiği gösterilmiştir [84]. Enfeksiyon esnasında majör *S. Typhi* porinleri olan OmpF ve OmpC ekspresyonu hakimken, OmpS1 ve OmpS2 daha düşük düzeyde kalmıştır [85]. Porinlerin bağışıklık oluşturma gücü ilk olarak tifo enfeksiyonu geçiren hastaların akut ya da iyileşme dönemindeki bulgulardan yola çıkarak gösterilmiştir. Bu hastalarda yüksek düzeyde porinlere özgü antikorlar ile porin-spesifik immün cevap gözlenmiştir [86, 87]. Saflaştırılmış porinler farelere uygulandığında % 90 koruma sağladığı gösterilmiştir [88]. *S. Typhi* porinleri ile immünize edilen farelerde bakterisidal koruyucu antikor yanıtının yaşam boyunca korunduğu bulunmuştur [84]. Önceden tifo geçirmemiş *Salmonella* hastalarında; enfeksiyon esnasında porinlerin, porin-özgün bakterisidal antikorların şekillenmesi ve hem hücresel hem de hümmoral immün yanıtta etkili olduğunu göstermiştir [89]. Porin-bazlı aşuların *Salmonella enterica serovar typhi Vi* antijenine karşı immünojenisite ve reaktogenisitesi insanlarda incelenmiş olup, hümmoral immün yanıtın 5 kat arttığı, porinlerin bakterisidal titrelerini ve spesifik T-hücre yanıtını indüklediği gösterilmiştir [90]. Immünizasyondan 10 yıl sonra dahi, porin-spesifik bakterisidal IgM ve IgG titreleri gönüllülerden alınan kan örneklerinde tespit edilmiş ve *S. Typhi* porin-bazlı aşuların sağlıklı kişilere güvenle uygulanabileceği ve immünojenik olduğu gösterilmiştir [91]. Porinlerin adjuvant etkili de olduğu, 2009 yılı pandemik influenza A(H1N1) virusü inaktif formu için de gösterilmiştir [85].

Majör ve minör *S. Typhi* porinleri, TLR2 ve TLR4 sinyalleri üzerinden doğuştan gelen bağışıklık sistemini etkin bir şekilde aktive etmekte, bu da dendritik hücreler ve B hücreleri üzerinde artan kostimülatör moleküller ve sitokin ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır [92, 93]. *S. Typhi* porinlerinin PLGA mikropartiküllerine enkapsülasyonu ile degradasyondan ve sıcaklık etkisinden korunduğu ve *S. Typhi*-özgün B hücre yanıtını indüklediği gösterilmiştir [94]. *Acinetobacter baumannii*

bakteri suşu dış membran proteinlerinin kitosan nanopartiküllere yüklenerek uygulandığı çalışmada ise kitosan nanopartiküllerinin dış membran proteinlerine (OMP) yönelik antikor ve sitokinleri arttırdığını göstermişlerdir [95].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar

BCA Protein Tayin Kiti (Thermo Fisher, Katalog No: 23225)

Akrilamid (Sigma-Aldrich, Katalog No: A887)

Bis-Akrilamid (Sigma-Aldrich, Katalog No:M7279)

Tris-Baz (Sigma-Aldrich, Katalog No:T1503)

Ovalbumin (Sigma-Aldrich, Katalog No: A5503)

Sığır serum albumini (Sigma-Aldrich, Katalog No: A4161)

Hidroklorik asit (Merck, Katalog No:100317)

Sodyum dodesil sülfat (Sigma-Aldrich, Katalog No:L3771)

Amonyum persülfat (Sigma-Aldrich, Katalog No:A3678)

Gliserol (Merck, Katalog No:104057)

Bromfenol mavisi (Fischer Scientific, Katalog No: B3925)

Ditiotreitol (Gerbu, Katalog No:1008-25g)

Glisin (Sigma-Aldrich, Katalog No:G8898)

Coomassie mavisi G-250 (Merck, Katalog No:115444)

Tetrametiletilendiamin (Merck, Katalog No:110732)

Kitosan (Protasan UP CL 213, Novamatrix, Norveç)

Tripolifosfat pentasodyum (TPP) (Sigma-Aldrich, Katalog No:72061,)

Diyaliz membranı (Spectra Por, Katalog No:133336)

o-fenilendiamin dihidroklorid (OPD) (Thermofisher, Katalog No:34005)

PE/Cy7, anti-fare CD80 antikor. klon: 16-10A1 (BioLegend, Katalog No:104734)

PE, anti-fare CD86 antikor klon:GL-1 (BioLegend, Katalog No:105008)

FITC, anti-fare F4/80 antikor. klon: BM8. (BioLegend, Katalog No:123108)

Alexa Fluor® 647, anti-fare I-Ad antikor klon:39-10-8 (Biolegend, Katalog No:115010)

LEGENDPlex Fare Th Sitokin Paneli (Biolegend, Katalog No:740740)

Anti-IgG (Keçi anti-fare IgG (H+L), Thermo Fisher, Katalog No:62-6500)

Anti-IgM (Keçi anti-fare IgM (H) sekonder antikor, HRP, Thermo Fisher, Katalog No:62-6820)

Fötal dana serumu (Sigma-Aldrich, Katalog No:F7524)

EZLink NHS Biotin (Thermo-Fischer, Katalog No:20217)

Vybrant Dil (1,1 dioktadesil, 3,3,3',3'-tetrametil indokarbosiyanin perklorat) (Thermo-Fischer, Katalog No:V22885)

RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Katalog No:R7388)

Akkutaz (Thermo-Fischer, Katalog No:A1110501)

Triton X-100 (Millipore, Katalog No:648466)

Tween 20 (Merck, Katalog No:822184)

Fosfat tamponu tabletleri (Sigma-Aldrich, Katalog No:79382)

Sodyum karbonate (Fischer Chemicals, Katalog No:BP357-1)

Sodyum bikarbonat (Merck, Katalog No:106329)

Dimetilformamid (Merck, Katalog No:103053)

Sitrik asit (Fischer Chemicals, Katalog No:A95-3)

Disodyum hidrojen fosfat (Merck, Katalog No:106559)

Hidrojen peroksit (Merck, Katalog No:107209)

3.2 Kullanılan Cihazlar

Dansitometre (Bio-Rad GS-800)

Tekstür analiz cihazı (TA-XT Plus model, Stable Micro Systems)

Zeta Potansiyel ve Tanecik Büyüklüğü Cihazı (Malvern Zetasizer NS)

Elektron mikroskopisi (FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin C TEM)

Konfokla Mikroskop (Zeiss LSM 510 Axiovert 200M, Germany)

Koni plak viskozimetresi (Brookfield DV2T)

3.3 Yöntemler

3.3.1 Porinlerin Elde Edilmesi

Porinler, proje çalışma ortağı López-Macias grubunca *S. Typhi* 9,12, Vi:d ATCC 9993'den elde edilerek, Nikaido and Rosenberg (1983) tarafından tarif edilen prosedüre göre elde edilmiştir. Kısaca, *S. Typhi*, glikoz ilave edilmiş minimal A besiyerinde çoğaltıldıktan sonra bakteriler toplanmış ve bunların hücre duvarlarından porinler ekstrakte edildikten sonra Sephacryl S-200 kolonu kullanılarak moleküler dışlama kromatografisiyle saflaştırılmıştır.

3.3.2 Porinlerin ve Model Antijen Ovalbumin Miktar Tayini

Porinlerin ve ovalbumin (OVA)'in ayrı ayrı miktar tayini için bikinkoninik asit (BCA) tekniği kullanılmıştır [97]. Bu yöntem, bakır ile kelat teşkili esasına dayanmakta olup, reaktif olarak BCA kullanılmaktadır. Reaksiyonun ilk basamağında alkali çözeltide proteinler Cu^{+2} 'yi Cu^{+1} 'e indirger, sonraki basamakta ise indirgenmiş Cu^{+1} iyonları BCA ile mor renkli bir kompleks oluşturur ve 562 nm'deki (maksimum absorbans) renk şiddeti protein yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Çalışmada yukarıda anlatılan prensibe dayanan ve ticari olarak temin edilmiş Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Kat. No: 23225, ABD) kullanılmıştır.

Kullanılan tekniğin deteksiyon aralığı 20-2000 μ g/mL olarak belirlenmiştir. Standart eğri oluşturmak için 2 mg/mL BSA çözeltisinden hareketle 2000, 1500, 1000, 500, 250, 125, 25 standart çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri üzerinden doğrusallık hesaplanmıştır

Doğruluğun tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan 3 farklı konsantrasyonda her bir konsantrasyondan 6 adet olacak şekilde çözeltiler hazırlanmış ve ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Analitik doğruluğun gösterilmesi için bağıl hata değerinin %2'den düşük olması gerekmektedir. Doğruluğun değerlendirilmesi için Eşitlik 3.1 kullanılmıştır.

$$\text{Doğruluk (\% Bağıl Hata)} = \frac{A - B}{B} \times 100 \quad \text{Eşitlik 3.1}$$

A=ölçülen konsantrasyon B= hazırlanan konsantrasyon

3.3.3 Kullanılan Proteinlerin İntegritesinin Elektroforez Tekniği ile Belirlenmesi

Saflaştırılan porinlerin ve OVA'nın integritesi, tek başına ve formülasyona yüklendikten sonra, sodyum dodesil sülfat -poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) tekniği ile gösterilmiştir [98].

Elektroforez işlemi, %10'luk SDS-PAGE ayırma jellerinde gerçekleştirilmiştir. Koşurma işlemi öncesi, örnekler eşit hacimde örnek tamponu ile muamele edilerek 95°C'de 10 dakika tutulmuştur. Daha sonra bu örnekler kuyucuklara yüklenerek, jel başına ilk 30 dakika 10 mA daha sonra izleme boyası (bromfenol mavisi) jelin alt sınırına yaklaşıncaya kadar jel başına 20 mA sabit akımda işlem gerçekleştirilmiştir.

Elektroforez işlemi tamamlanan jel cam plakalar arasından uzaklaştırılarak boyama işlemlerine geçilmiştir. Elektroforez işlemi tamamlanan jelin Coomassie mavisi ile boyama işlemi gerçekleştirilmiştir [99].

Jel, boya kalıntılarının uzaklaştırılması için 3 kere 10'ar dakika distile su ile yıkandıktan sonra protein bantları görünür hale getirilmiş ve bu aşamadan sonra Bio-Rad GS800 dansitometresiyle görüntülenmiştir.

3.3.4 Formülasyon Geliştirme

Kitosan (Protasan UP CL 213, Novamatrix, Norveç) kullanılarak jel ve nanopartiküller hazırlanmış, porinler bu sistemlere yüklenmiştir. Model antijen olarak ovalbumin (OVA) kullanılmıştır. Jel ve nanopartikül formülasyonuna giren maddeler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Jel ve nanopartikül formülasyonuna giren maddeler

Protasan UP CI 213 (Novamatrix, Norveç) MA: 150-400 kDa Deasetilasyon derecesi: %86
<i>S. Typhii</i> porinleri L-11269 (1,093 mg/mL) (0,8 µg/mL SDS çözeltisi içerisinde)
Ovalbumin (A5378, Sigma-Aldrich, USA)

3.3.4.1 Jel Formülasyonu

Kitosanın %0,5 (a/h) konsantrasyonda su içinde jel formülasyonları hazırlanmıştır. Porinler, jele %0,02 (a/h) konsantrasyon olacak şekilde eklenmiştir. OVA ise %0,1 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde kitosan jele eklenmiştir.

3.3.4.2 Nanopartikül Formülasyonu

Nanopartikül formülasyonları kitosan kullanılarak iyonotropik jelasyon yöntemi ile hazırlanmıştır[74, 100].

Çapraz bağlayıcı olarak tripolifosfat pentasodyum (TPP) kullanılmış ve farklı kitosan: tripolifosfat pentasodyum ağırlık oranları (2,5:1, 3,3:1, 4:1, 5:1, 6,6:1, 10:1) çalışmada denenmiştir. Distile su içerisinde % 0,2 (a/h) konsantrasyonda hazırlanan kitosan dispersiyonuna hesaplanan oranlarda olacak şekilde TPP çözeltisinden 2 mL damla damla eklenerek ve magnetik karıştırıcı ile 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. Bu süre sonrasında 25°C'de 15.000 rpm de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan kısım (süpernatant çözelti) uzaklaştırıldıktan sonra nanopartiküller toplanmıştır.

% 0,1 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde OVA çözeltisi, kitosan dispersiyonuna eklenmiş ve yukarıda açıklandığı şekilde işlem devam ettirilmiştir.

%0,1 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde porin çözeltisi kitosan çözeltisine eklenmiş ve yukarıda açıklandığı şekilde işlem devam ettirilmiştir. OVA veya porin yüklenmiş formülasyonlar hazırlandıktan sonra süpernatant çözelti ayrılarak yükleme etkinliğinin tayini için saklanmıştır.

3.4 Karakterizasyon Çalışmaları

3.4.1 Viskozite

Elde edilen jel formülasyonlarının akış özellikleri Brookfield DV2T koni plak viskozimetresinde kullanılarak $25\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 'de, 50-200 rpm arasında ölçülmüştür. Analiz, her formülasyon için 3 kere tekrarlanmış ve viskozite değerleri cP cinsinden Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Viskozite } (\eta) = \frac{\text{Kayma Gerilimi } (F)}{\text{Kayma Hızı } (G)} \quad \text{Eşitlik 3.2}$$

3.4.2 Biyoadezyon

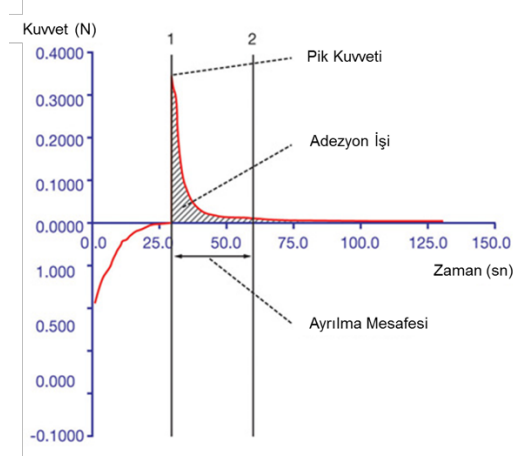
Jel formülasyonlarının biyoadezyon ölçümleri oda sıcaklığında tekstür analiz cihazında (TA-XT Plus model, Stable Micro Systems, UK) gerçekleştirilmiştir. 0,15 mL jel, sentetik membran (Spectra/Por molecular porous membrane) üzerine uygulanmıştır. Prob ile membran temas ettiği yüzey alanı $0,635 \text{ cm}^2$ dir. Probun iniş ve çıkış hızı $0,1 \text{ mm/sn}$ olarak seçilmiş $0,2 \text{ N'luk}$ kuvvet 180 saniye boyunca uygulanmıştır. Kuvvete karşı zaman eğrileri elde edilmiş (Şekil 3.2) ve eğri altında kalan alandan Eşitlik 3.3 kullanılarak biyoadezyon işi (mJ/cm^2) hesaplanmıştır. Her bir formülasyon için test 3 kez tekrarlanmıştır. Verilerin değerlendirilmesi için Texture Exponent 4.0. software programı kullanılmıştır.

$$\text{Biyoadezyon} = \frac{AUC}{\pi r^2} \quad \text{Eşitlik 3.3}$$

πr^2 : membranla temas eden yüzeyi alanı

r : yarıçap (cm)

AUC : eğri altında kalan alan (adezyon işi)



Şekil 3.1 Biyoadezyon çalışmalarında elde edilen kuvvet-zaman eğrisi

3.4.3 Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı

Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (PDI) analizleri, Malvern Zetasizer NS cihazı ile belirlenmiştir. Nanopartiküller ölçüm öncesi deiyonize su ile resüspanse edilmiş ve tüm analizler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.4.4 Yüzey Özellikleri

Yüzey yükü: Nanopartiküller, su içerisinde resüspanse edildikten sonra Malvern Zetasizer NS cihazı kullanılarak zeta potansiyelleri belirlenmiş ve tüm ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır.

Yüzey morfolojisi: Nanopartiküller transmisyon elektron mikroskopisi (FEI Tecnaı G2 Spirit BioTwin C TEM) ile incelenmiştir.

3.4.5 Yükleme Etkinliği

TPP çözeltisindeki nanopartiküller santrifüj edilmesinin ardından elde edilen süpernatanda serbest porin ve OVA miktarı BCA yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar üzerinden Eşitlik 3.4 kullanılarak yükleme etkinliği hesaplanmıştır.

$$\text{Yüzde Yükleme Etkinliği} = \frac{\text{Toplam protein miktarı} - \text{Serbest protein Miktarı}}{\text{Toplam protein miktarı}} \times 100$$

Eşitlik 3.4

3.5 İn Vitro Çalışmalar

3.5.1 Salım

OVA yüklü nanopartiküller, %0,1 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde fosfat tamponunda (pH 7.4) süspende edilerek, 24 saat boyunca 37°C'de yatay çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Bu süre zarfında belirli zaman aralıklarında örnekler santrifüj uygulanmış 500 µL süpernatandan örnek alındıktan sonra aynı hacimde fosfat tamponu ilave edilmiştir. Süpernatandaki OVA miktarı BCA yöntemi ile tayin edilmiştir.

3.6 Biyoyumluluk

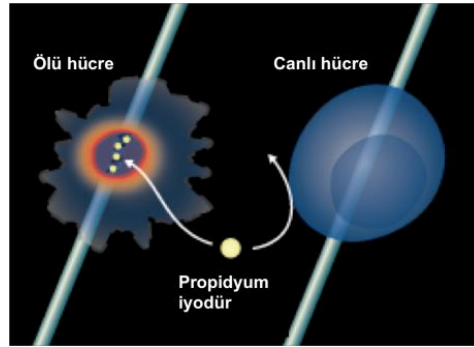
Biyoyumluluk testlerinde J774A.1 murin makrofaj hücreleri (ATCC® TIB-67™) kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Kullanılan hücre hattı, Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Laboratuvarından sağlanmıştır. Hücreler, %20 Fötal Dana Serum (FDS) ve antibiyotik ihtiva eden RPMI-1640 medyumunda çoğaltılmıştır. Hücreler, 37°C sıcaklık ve %5 CO₂'li ortamda tutulmuş ve idameleri amacıyla 1:3-1:6 arasında değişen oranda subkültüre edilmiştir. Subkültürler arasında ise medyum her 3 günde bir yenilenmiştir.

Çizelge 3.2 J774A.1 hücre hattı özellikleri

Organizma	Mus musculus, fare
Tür	BALB/cN
Doku	Asites
Hastalık	Retikulum hücre sarkoma
Hücre Tipi	Monosit; makrofaj
Yaş	Yetişkin
Cinsiyet	Dişi
Morfoloji	Makrofaj
Büyüme Koşulları	Çoğunlukla adheren

Formülasyonların hücrelere biyoyumluluğu, propidyum iyodür (PI) boyası kullanarak incelenmiş ve 2x10⁵ adet J774A.1 hücresi % canlılığı olarak hesaplanmıştır [101]. Propidyum iyodür (veya PI), hücreleri boyamada kullanılabilen, moleküler ağırlığı 668,4 Da olan bir interşelat ve floresan özellikte

moleküldür. PI nükleik asitlere bağlandığında, floresan maksimum uyarım dalga boyu 535 nm ve maksimum dalga boyu ise 617 nm'dir. PI sağlıklı hücrelerin zarından geçemezken, hücre zarı bütünlüğün bozulduğu hallerde ise hücre içine girebilme ve DNA ile etkileştiğinde ve uygun dalga boyunda ışık kaynağına maruz kaldığında karakteristik kırmızı renkte floresans verir. Akış sitometrisinde analiz edildiğinde ölü hücreler parlak kırmızı bir floresan verirken, sağlıklı hücreler floresan vermemektedir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Akış sitometresi ile hücresel canlılığın belirlenmesi (www.rndsystems.com)

İn vitro çalışmalara başlamadan önce biyoyoumluluğun en yüksek düzeyde olduğu konsantrasyonun belirlenebilmesi amacıyla dört farklı porin konsantrasyonunda (2 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.25 µg/mL; OVA: 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2.5 µg/mL) denemeler yapılmıştır.

96 kuyucuklu plaklara jel, nanopartikül formülasyonları hücre vasatı (RPMI 1640+%20 FBS) içerisinde toplam miktar 400 µL olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır. 24 saat sonunda santrifüj edilerek hücreler toplanmış ve serbest olan hücreler uzaklaştırılmıştır. Tripsin-EDTA çözeltisi ile plaktaki hücreler kaldırıldıktan sonra üzerlerine hücre vasatı ilave ederek tripsin inaktive edilmiştir. Hücreler PI ile boyandıktan sonra akış sitometrisinde (FACS Aria II sorter, Becton Dickinson) ölçüm yapılmıştır.

3.6.1 Hücresel Alım

Biyotin-porin konjugasyon işlemi:

Hücresel alım çalışmalarında da J774A.1 hücreleri kullanılmıştır. Porin önce biyotin (EZLink NHS Biotin, Thermo-Fisher) ile konjuge edilmiştir. Biotinle konjuge edilen

porin, hücrelere uygulandıktan sonra, biyotine yüksek afinite ile bağlanan floresan işaretli (Alexa Fluor 488) streptavidin; hücreler fikse ve permeabilize edildikten sonra uygulanmış ve sonuçta meydana gelen bağlanma izlenerek hücresel alım değerlendirilmiştir

Navigasyon sağlanabilmesi amacıyla, hücreler kırmızı floresan veren Dil boyası ile inkübe edilerek membranlarının işaretlenmesi sağlanmıştır. Biotin konjügasyonu ise, Thermo Fisher EZ-Link NHS Biotin-ticari kiti kullanılarak prosedüre uygun gerçekleştirilmiştir. Protein Biotinleme protokolüne göre: 2 mg/mL protein çözeltisinin 20 katı molar konsantrasyonda biotin kullanılmaktadır.

Reaksiyon için gerekli biotin miktarı (mmol) Eşitlik 3.5 ile hesaplanmıştır.

$$mmol \text{ Biotin} = ml \text{ protein} \times \frac{mg \text{ protein}}{ml \text{ protein}} \times \frac{mmol \text{ protein}}{mg \text{ protein}} \times \frac{20 \text{ mmol Biotin}}{mmol \text{ protein}} \quad \text{Eşitlik 3.5}$$

Reaksiyona eklenecek 10 mmol biotin ajanının çözeltisinin miktarı (μL) Eşitlik 3.6 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\mu\text{l biotin} = \frac{mol \text{ Biotin} * 1000000 \mu\text{l}}{L} \times \frac{L}{10 \text{ mmol}} \quad \text{Eşitlik 3.6}$$

Üretici firma tarafından sağlanan protokolde göre 1-10 mg protein 0,5-2,0 mL PBS'de çözülmüştür. Hazırlanan porinler SDS çözeltisinde bulunduğu ve amin içeren tamponda bulunmadığından diyaliz ile tampon değişimi uygulanmamıştır. Porin ihtiva eden çözelti pH'sının 7.2-8.0'da aralığında olduğuna emin olunmuştur.

10 mM konsantrasyonda biotin çözeltisi hazırlamak için 1,13 mg biotin 163,85 μL dimetilformamid içinde çözüldürülmüştür.

100 μL porin için 5,46 μL 10 mM biotin çözeltisi kullanılmıştır. Reaksiyon için oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.

Bu noktada porinin işaretleme işlemi tamamlanmıştır. İşaretli protein optimum performans ve stabilitesi için ve bağlanmamış biotinlerin uzaklaştırılması için önce iki defa 1 saat arayla daha sonra da bir gece boyunca SDS çözeltisi (0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) içinde diyaliz edilmiştir.

Hücrelere formülasyonların uygulanması

J774A.1 makrofaj hücreleri, 1 mL %10 FDS+ RPMI-1640 içinde 5 µL Vybrant Dil (Thermo Fisher, V22885, ABD) olacak tarzda hücrelere uygulanarak boyanmıştır. Hücreler 24 saat boyunca boya ile inkübe edildikten sonra formülasyonlar 1:100 oranında %10 FDS+ RPMI-1640 ile seyreltilerek hücrelere uygulanmıştır. 24 saat sonunda hücreler önce PBS ile 3 kere yıkanmış daha sonra %4'lük paraformaldehid çözeltisi ile fikse edilmiştir. Daha sonra tekrar PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve % 0,1'lik Triton X100 ile 3 dakika boyunca permeabilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemle hücre membranından küçük gözenekler meydana gelmesi sağlanmıştır. Triton X100 ile yapılan permeabilizasyon işlemi sonrasında PBS ile tekrar yıkanmıştır. Bunun ardından %1 sığır serum albümin (BSA) ile 20 d muamele edilerek bloklanmıştır. Bloklamanın ardından hücreler yine yıkanmış ve 10 µg/mL, Streptavidin işaretli Alexa Fluor 488 uygulanarak 2 saat ışıktan korunmuş ortamda inkübe edilerek biyotinle konjuge olması sağlanmıştır. Daha sonra PBS ile 4 kez yıkanmış ve %50 gliserol/PBS (200 µL) ile kapatma işlemi yapılmıştır. İşlemler tamamlandıktan sonra hücreler lazer taramalı konfokal mikroskop (Zeiss LSM 510 Axiovert 200M, Germany) ile görüntülenmiştir. 488 nm lazer ışığı Argon lambası Vybrant Dil için ve 543 nm lazer ışığı He-Ne lambası Alexa Fluor 488'in eksitasyonu için kullanılmıştır. Yalancı pozitif sonuçların olmasını engellemek için 3 farklı konsantrasyonda Alexa Fluor 488 Streptavidin (1, 0,1, 0,01 µg/mL) ile denemeler yapılarak en uygun konsantrasyonun 0,1 µg/mL olduğuna kanaat getirilmiştir.

3.6.2 Makrofaj Aktivasyonu ve Sitokin Salımı

İn vitro çalışmalarda makrofaj aktivasyonunu incelemek amacıyla olarak CD80, CD86, MHCII ve F4/80 yüzey belirteçleri tercih edilmiştir. Nanopartikül ve jel formülasyonlarının makrofaj aktivasyonu üzerindeki etkileri J774A.1 hücrelerinde (2×10^5) yapılan çalışmada, formülasyonların uygulamasının ardından makrofaj hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen yüzey belirteçlerinin spesifik olarak floresan boya işaretli antikolar ile işaretlenmesi ve daha sonra akış sitometresinde oluşan ortalama floresans şiddetinin (MFI: Mean Fluorescence Intensity) ölçülmesi ile incelenmiştir. MFI'de artış izlenmesi, anılan belirtecin hücre yüzeyinde ekspresyonunun artışı ifade etmektedir. Formülasyonlar, 1 µg/mL konsantrasyonda porin ve 10 µg/mL OVA içerecek şekilde hücre vasatı içerisinde

(%10 FDS+ RPMI-1640) toplam miktar 400 µL olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır. 24 saat sonunda hücreler toplanmış ve santrifüj edilerek hücrelerin serbest olanları toplanmıştır. Plaklardan Accutase (Thermo-Fischer) ile kalan hücreler kaldırılmış ve daha sonra hücre vasatı eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Hücreler PE-Cy7 antimouse CD80 antikor, PE antimouse CD86 antikor, Alexa Fluor 647 anti-Mouse I-Ad antikor ve FITC anti-Mouse F4/80 antikor ile işaretlendikten sonra akış sitometrisi yöntemi ile ölçüm gerçekleştirilmiştir. Kullanılan antikorların özellikleri Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3 Makrofaj aktivasyonu tayininde incelenen yüzey belirteci-spesifik antikorlar

Yüzey Belirteci	Floresan İşaretli Spesifik Antikor
CD80	PE/Cy7, anti-mouse CD80 Antibody. clone: 16-10A1 (BioLegend. cat no:104734)
CD86	PE, anti-mouse CD86 Antibody. clone:GL-1 (BioLegend. cat no:105008)
F4/80	FITC, anti-mouse F4/80 Antibody. clone: BM8. (BioLegend. cat no:123108)
MHC II	Alexa Fluor® 647, anti-mouse I-Ad Antibody clone:39-10-8 (Biolegend. cat no:115010)

Doğal immünite sistemin bir parçası olan fagositik hücreler olan makrofajlar uyarıldıklarında buldukları ortama sitokinler salmaktadır. Hazırlanan adjuvant sistemlerinin in vitro olarak makrofaj hücrelerine etkisini incelemek için J774A.1 murin makrofaj hücrelerinde sitokin salımı incelenmiştir. Bu doğrultuda, uyarılan makrofaj hücrelerinde LEGENDPlex Mouse Th Cytokine Panel kiti kullanılarak IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, TNF-α ve IFN-γ sitokinlerinin analizi yapılmıştır.

3.7 İn vivo Çalışmalar

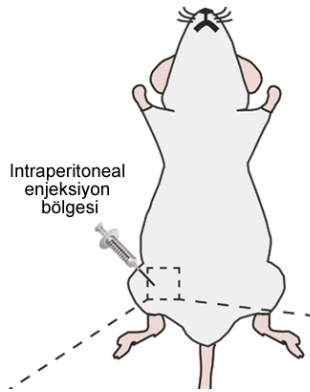
İn vivo çalışmalar kapsamında humoral immün yanıt ile hücrel immün yanıt seviyeleri incelenmiştir.

3.7.1 Hayvanların temini

Geliştirilen formülasyonların in vivo şartlarda uygulanarak oluşan hümoral immün yanıtın incelenmesi için Başkent Üniversitesi Üretim ve Araştırma Merkezi'nden 80 adet 6-10 haftalık dişi BALB/c fare temin edilmiştir. Tüm deney prosedürleri ve hayvanların bakımı Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna sunulmuş ve 2015/75-14 sayılı kararla onaylanmış olup, deneyler Hacettepe Üniversitesi'nde Deney Hayvanları için ayrılan Hacettepe Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan tüm fareler aynı bakım, beslenme ve barındırma koşullarına riayet ederek; 12 saat gece ve 12 saat gündüz siklusu, oda sıcaklığında ve standart kafeslerde barındırılmıştır.

3.7.2 İmmünizasyon

Hayvanlar biri kontrol grubu olmak üzere toplam 16 gruba ayrılmıştır (n=5) (Çizelge 3.4). Formülasyonlar farelere intraperitoneal (ip) yoldan uygulanarak immünizasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Kontrol gruplarına serum fizyolojik çözeltisi verilmiştir. Formülasyonların uygulama hacmi 100 µL'dir.



Şekil 3.3 Formülasyonların intraperitoneal yolla hayvanlara uygulanması [102]

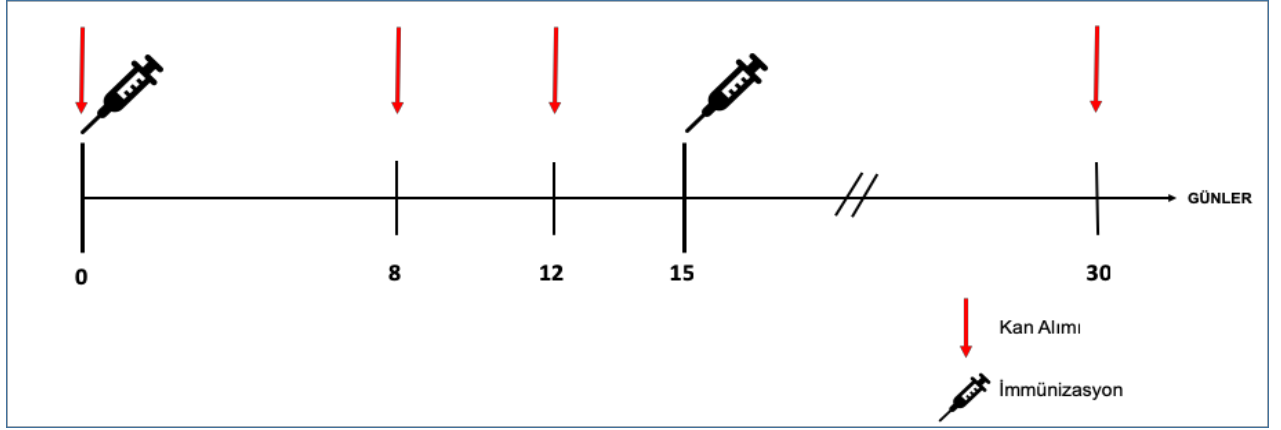
Çizelge 3.4 İn vivo deney grupları

	Deney Grupları	Uygulama Dozu/100 µL		
		Porinler	OVA	Kitosan
1	Porin	20 µg	-	-
2	Ovalbumin	-	100 µg	-
3	Ovalbumin+Porin	20 µg	100 µg	-
4	Kitosan Jel (0.5%)	-	-	500 µg
5	Porin+ Kitosan Jel	20 µg	-	500 µg
6	Ovalbumin+Kitosan Jel	-	100 µg	500 µg
7	Porin+Ovalbumin+ Kitosan Jel	20 µg	100 µg	500 µg
12	Kitosan Nanopartikül	-	-	-
13	Porin+Kitosan Nanopartikül	20 µg	-	-
14	OVA+Kitosan Nanopartikül	-	100 µg	-
15	Porin+OVA +Kitosan Nanopartikül	20 µg	100 µg	-
16	Serum Fizyolojik Çözeltisi (kontrol)	-	-	-

3.7.3 Hümorale İmmün Yanıt Çalışmaları

Hümorale immün yanıt çalışmaları Şekil 3.4'de verilen immünizasyon protokoluna uygun gerçekleştirilmiştir. 0, 8, 12 ve 30. günlerde submandibular yoldan hayvanlardan kan örnekleri alınmıştır (Şekil 3.5) [103]. Daha önce heparinize edilen 1,5 mL tüplere toplanan kan örnekleri 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

Süpernatantlar, salınan IgG ve IgM seviyelerini tayin etmek üzere -20°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.4 Hümoral immün yanıt çalışmalarında takip edilen protokol



Şekil 3.5 Hayvanlarda submandibular kanatma yöntemi ile kan alınması

OVA ve porinlere spesifik salınan antikorlar (IgG ve IgM) miktarları örneklerden ELISA yöntemi ile tayin edilmiştir.

96 kuyucuklu plakların (Nunc MaxiSorp ELISA plates) her kuyucuğu 100 μ L pH 9,5 karbonat tamponu içerisinde 1 μ g porin veya OVA içeren çözelti ile muamele edilmiştir. Kuyucuklar 37°C'de 1 saat, 4°C'de 24 saat boyunca porinler veya OVA ile inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda kuyucuklar Tween içeren PBS (PBS-T) ile yıkanarak bağlanmayan uzaklaşması sağlanmıştır. %5 süt tozu içeren PBS (PBS-süt) ile 37°C'de 1 saat bloklama işlemi gerçekleştirilmiş ve böylece non-spesifik

bağlanmaların önüne geçilmiştir. Kuyucuklar tekrar PBS-süt çözeltisinden arındırılmak için PBS-T ile yıkanmıştır. Hayvanlardan alındıktan sonra santrifüj edilerek hazırlanmış örnekler 1:150 oranında PBS-T ile seyreltikten sonra plaklara uygulanmıştır. Her dilüsyonun ardından kuyucukların pipetaj ile homojenizasyonu sağlanmıştır. Dilüsyon işlemi gerçekleştikten sonra 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. 1 saat sonunda kuyucuklar PBS-T ile yıkanmıştır. IgG (Goat anti-mouse IgG (H+L), 62-6500, Thermo Fisher, ABD) ve IgM (Goat anti-Mouse IgM (Heavy chain) Secondary Antibody, HRP, 62-6820, Thermo Fisher, ABD) antikorları 1:2000 oranında PBS-Tween20-süt solüsyonunda dilüe edilmiştir. Kuyucuklara 100 µL antikor içeren PBS-Tween20-süt eklenmiştir. 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. 1 saat sonunda PBS-T ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Substrat olarak kullanılacak olan o-fenilendiamin dihidroklorid (OPD) (Thermofisher, 34005, ABD) için maddenin protokolüne uygun olarak aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır. 0.05 M sitrik asit, 0.05 M sodyum fosfat çözeltileri hazırlanmış ve pH'nın 5 olduğu teyit edildikten sonra OPD, 1.0 mg/mL olacak şekilde tampon içinde çözündürülmüş, ardından 1mL substrat çözeltisi başına % 30 hidrojen peroksit çözeltisinden 1µL ilave edilmiştir. Hazırlanan substrat çözeltisinden her kuyucuğa 100 µL eklenmiş ve 10 dk karanlıkta bekletildikten sonra absorbanslar 492 nm'de okunmuştur.

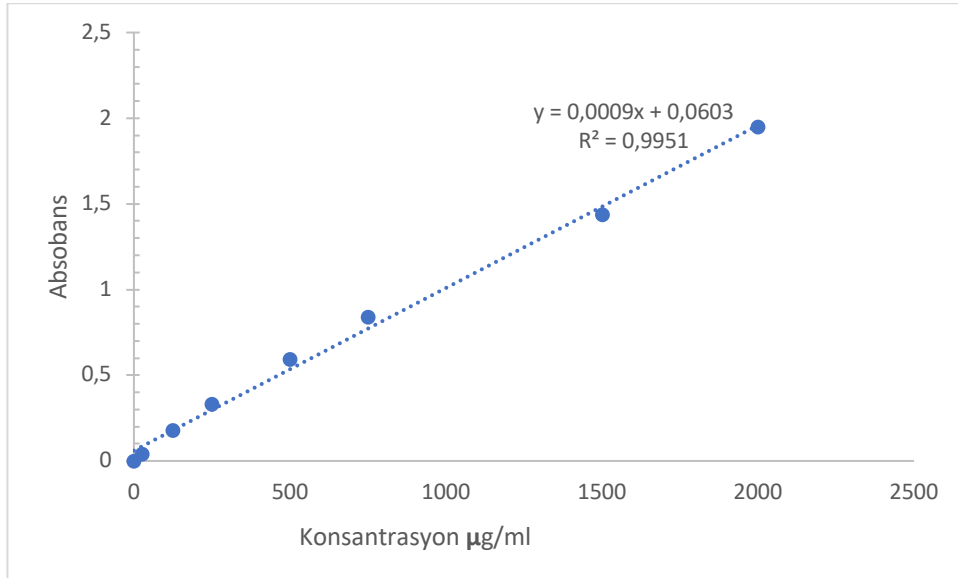
3.8 Stabilite Çalışmaları

Formülasyonların stabilitelerini incelemek için 25°C'de 3. ve 6. aylarda formülasyonlarda partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür.

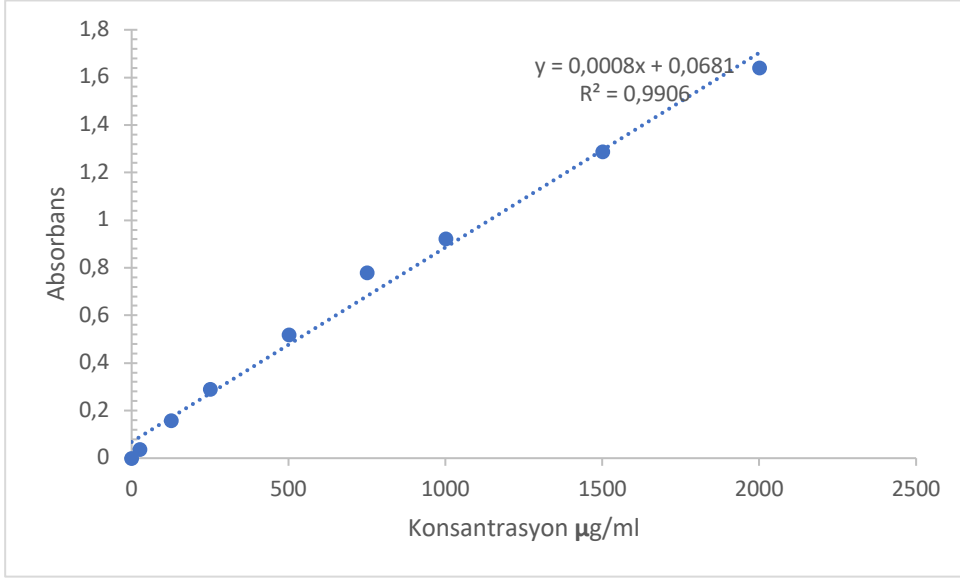
4. BULGULAR

4.1 OVA ve Porinlerin miktar tayini

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltiler için elde edilen absorban değerlerinin konsantrasyona karşı grafiği geçirilerek kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir (Şekil 4.1 ve 4.2). Doğruluğun tespitine yönelik olarak kalibrasyonda kullanılan 3 farklı konsantrasyona ait ölçüm sonuçları Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2 de verilmiştir. % bağıl hata değerleri 2'den düşük bulunmuştur.



Şekil 4.1 Ovalbümin için Kalibrasyon Doğrusu



Şekil 4.2 Porin için kalibrasyon doğrusu

Çizelge 4.1 Ovalbümine ait doğruluk çalışması sonuçları

Hazırlanan Konsantrasyon (µg/mL)	Ölçülen Konsantrasyon (µg/mL)	% Bağıl Hata
250	248,9	0,42
750	745,3	0,62
1500	1495,9	0,27

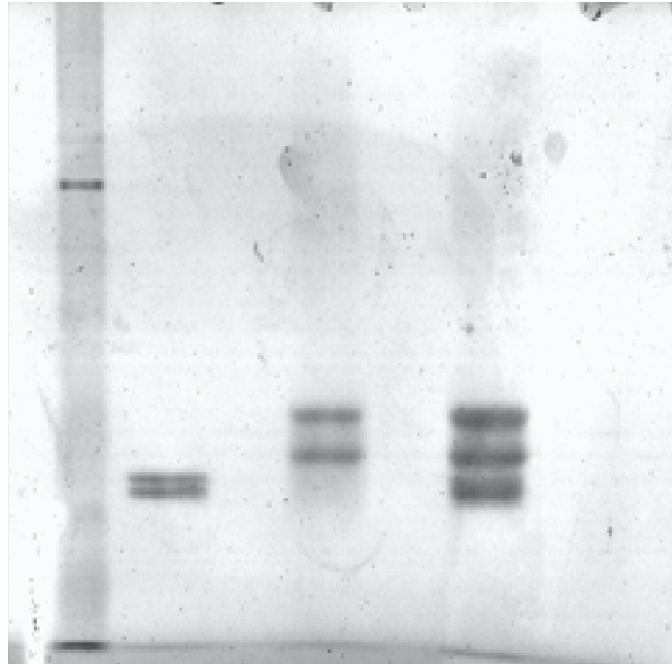
Çizelge 4.2 Porine ait doğruluk çalışması sonuçları

Hazırlanan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ölçülen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	% Bağıl Hata
250	252,3	0,90
750	748,3	0,22
1500	1513,4	0,88

4.2 Formülasyon Geliştirme ve Karakterizasyonu

4.2.1 Porinlerin ve OVA'nın İntegritesinin Korunması

Porin ve OVA'nın hem tek başına hem de bir arada integritesini koruduğu SDS-PAGE analizi ile gösterilmiştir (Şekil 4.3).

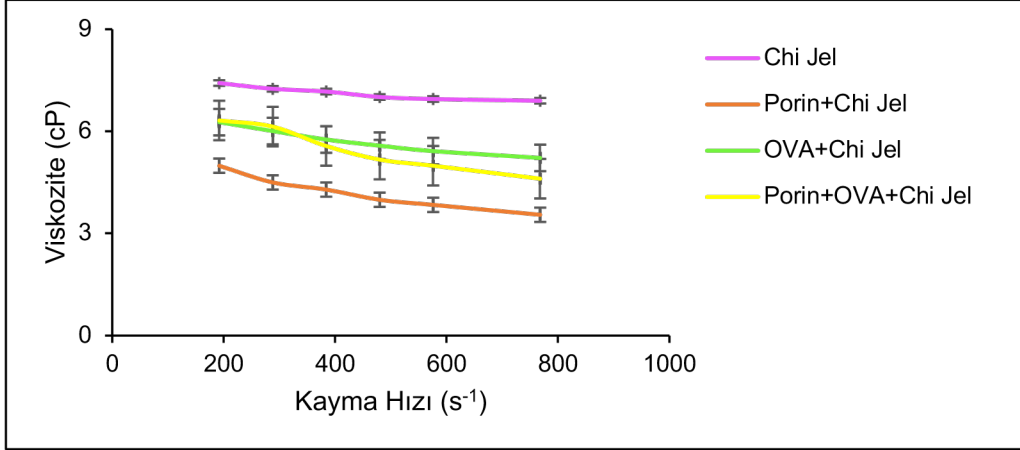


Şekil 4.3 Jel formülasyonlarda proteinlerin SDS-PAGE analizi: 1) molekül ağırlığı belirleyici, 2) Porin, 3) OVA, 4) Porin+OVA

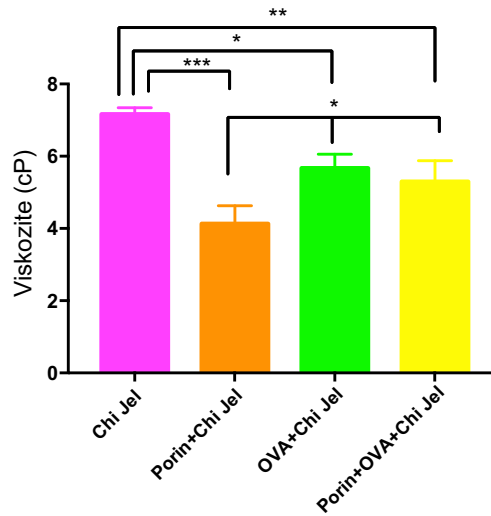
4.2.2 Jel formülasyonu

% 0,5 (a/h) konsantrasyonda hazırlanan kitosan jel Newtonian akış özelliği göstermiştir (Şekil 4.4). Porinlerin ve/veya OVA ilavesi ile birlikte viskozitenin

azaldığı görülmüştür (Şekil 4.5). Kitosan jelin viskozite değeri $7,16 \pm 0,18$ cP olarak ölçülmüştür. Porin ilavesi ile viskozite $4,14 \pm 0,5$ cP'ye düşmüş ($p < 0,001$), ovalbumin ilavesi ile $5,67 \pm 0,39$ cP ($p < 0,1$) ve porinler+OVA birlikte yer aldığında ise $5,29 \pm 0,58$ cP ($p < 0,01$) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4 Jel formülasyonlarına ait akış eğrileri (25 ± 0.1 °C) (n=3)

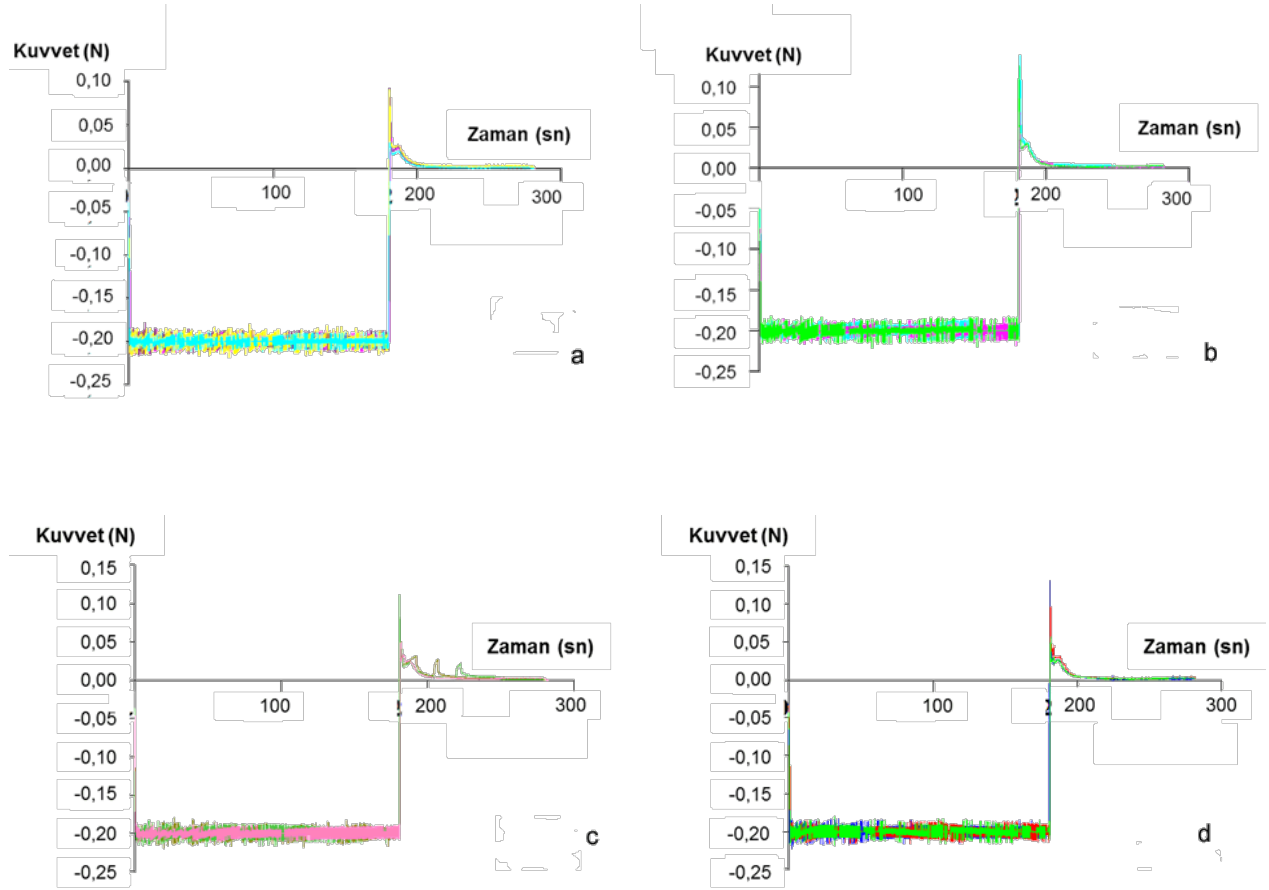


Şekil 4.5 Jel formülasyonlarına ait viskozite değerleri (25 ± 0.1 °C) (n=3) (* $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)

Kitosan jelin kendisine ait zeta potansiyeli ($78,1 \pm 2,0$ mV) iken, porinler+kitosan jel ($36,3 \pm 0,71$ mV), OVA+kitosan jel ($66,6 \pm 6,8$ mV) ve OVA+porinler+kitosan jel

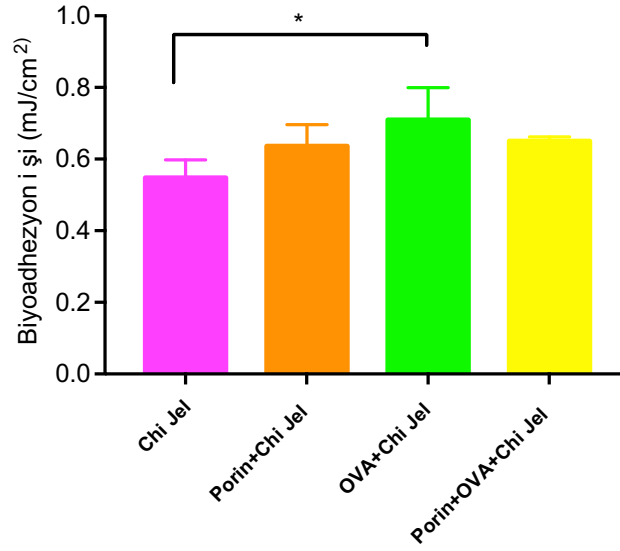
(45,2±3,6 mV) formülasyonlarının hepsinde pozitif zeta potansiyel değerleri kaydedilmiştir.

Jel formülasyonlarının biyoadezyon çalışmalarında elde edilen kuvvet- zaman eğrileri Şekil 4.6'da ve biyoadezyon özellikleri Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.6 Jel formülasyonlarının biyoadezyon çalışmasında elde edilen kuvvet-zaman ilişkisi (a) Kitosan Jel; (b) Porin+OVA+Kitosan Jel; (c) OVA+Kitosan Jel; (d) Porin+Kitosan Jel

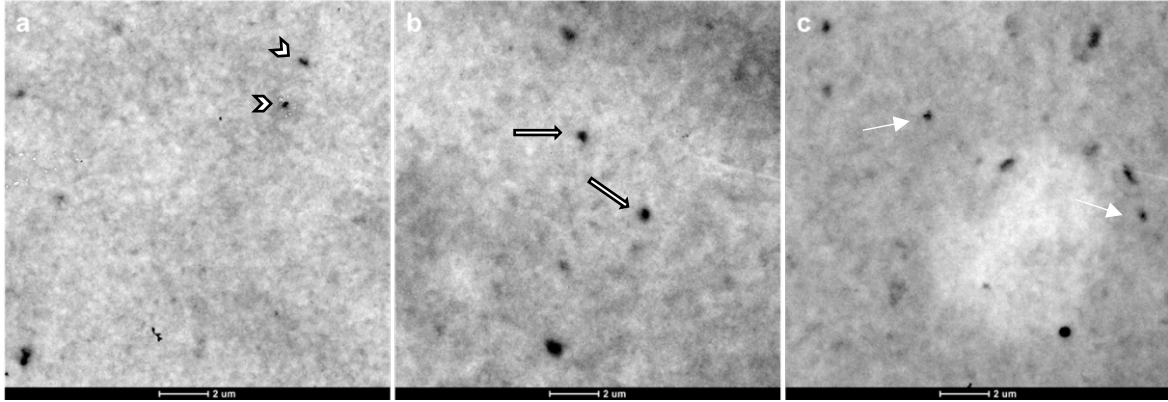
Kitosan jel için biyoadezyon iş değeri $0,55 \pm 0,050$ mJ/cm² olarak bulunmuştur. OVA varlığında biyoadezyonda artış görülürken ($0,71 \pm 0,009$ mJ/cm²) ($p < 0,1$), porin ($0,64 \pm 0,060$ mJ/cm²) ve porin+OVA eklenmesi sonucunda biyoadezyonda ($0,65 \pm 0,012$ mJ/cm²) bir fark görülmemiştir ($p > 0,1$).



Şekil 4.7 Kitosan jel formülasyonlarının biyoadhezif özellikleri (n=3) (*p<0.1)

4.2.3 Nanopartikül Formülasyonu

İyotropik jelasyon tekniği ile hedeflenen özelliklere sahip pozitif yüklü nanopartiküllerin elde edilmiştir (Şekil 4.8, Çizelge 4.3). Farklı kitosan:TPP ağırlık oranlar denemiş olup, uygun partikül büyüklüğü ($366,4 \pm 4,8$ nm) ve partikül büyüklüğü dağılımının (PDI= 0.2), kitosan:TPP oranı 5:1 ile elde edilmiştir. Çalışmalarda, nanopartiküller bu oran kullanılarak hazırlanmıştır



Şekil 4.8 Nanopartikül formülasyonlarının (CS:TPP = 5:1) TEM görüntüleri: (a) ok başı: boş nanopartiküller; (b) kalın ok: porin yüklü nanopartiküller; ve (c) ince ok: OVA yüklü nanopartiküller

Çizelge 4.3 Çalışmada geliştirilen nanopartiküllerin özellikleri

Formülasyonlar	Partikül Büyüklüğü (nm) ± SS	PDI ± SS	Zeta Potansiyel ± SS (mV)
Kitosan: TPP (2,5:1)	6548,3 ± 945,5	1,0	14,1 ± 0,4
Kitosan: TPP (3,3:1)	472,5 ± 16,2	0,43 ± 0,02	45,5 ± 0,6
Kitosan: TPP (4:1)	4236,0 ± 334,0	0,54 ± 0,01	16,4 ± 0,3
Kitosan: TPP (5:1)	366,4 ± 4,8	0,20 ± 0,01	47,9 ± 3,5
Kitosan: TPP (6,6:1)	963,8 ± 22,0	0,49 ± 0,04	58,2 ± 2,0
Kitosan: TPP (10:1)	991,8 ± 11,0	0,48 ± 0,04	58,8 ± 2,3

Porin yüklenmesiyle nanopartikül boyutunda değişiklik olmadığı, OVA yüklendiğinde azalma olduğu, OVA ile birlikte porin yüklendiğinde ise partikül büyüklüğünün arttığı görülmüştür (Çizelge 4.4). Nanopartikül porin yükleme

etkinliğinin $86,5 \pm 4,7$ ve OVA yükleme etkinliğinin ise $68,9 \pm 6,5$ olduğu görülmüştür.

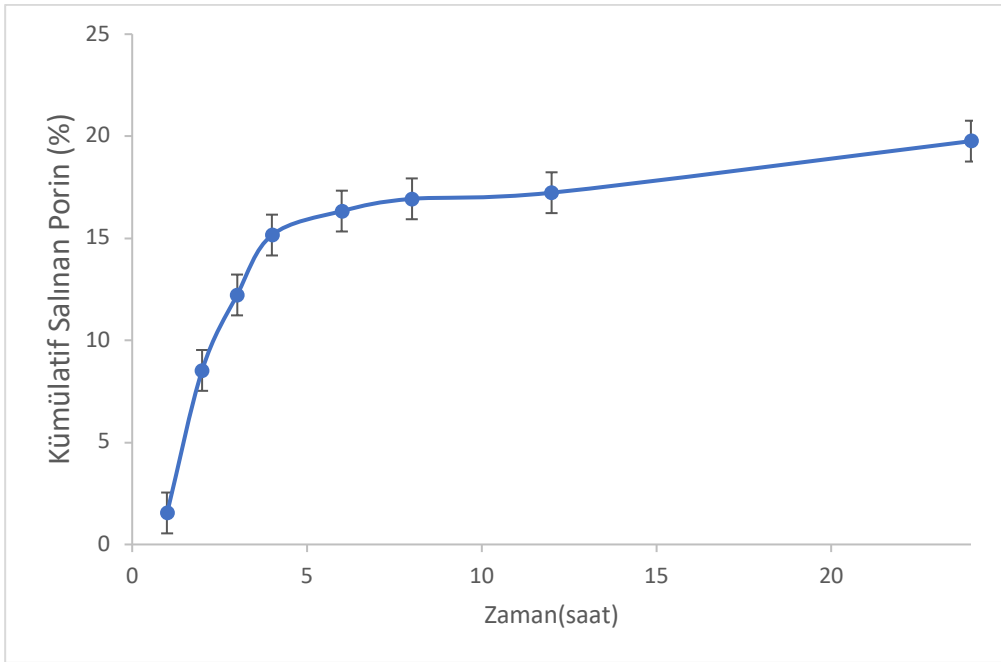
Çizelge 4.4 Porin ve/veya OVA yüklü nanopartiküllerin özellikleri

Formülasyon	Partikül Büyüklüğü (nm) \pm SS	PDI \pm SS	Zeta Potansiyel \pm SS (mV)
Porin+Kitosan Nanopartikül	$337,7 \pm 1,7$	$0,29 \pm 0,02$	$30,3 \pm 0,5$
OVA+Kitosan Nanopartikül	$239,6 \pm 3,3$	$0,24 \pm 0,01$	$36,4 \pm 0,2$
OVA+Porin+ Nanopartikül	$429,9 \pm 6,8$	$0,32 \pm 0,09$	$32,5 \pm 0,9$

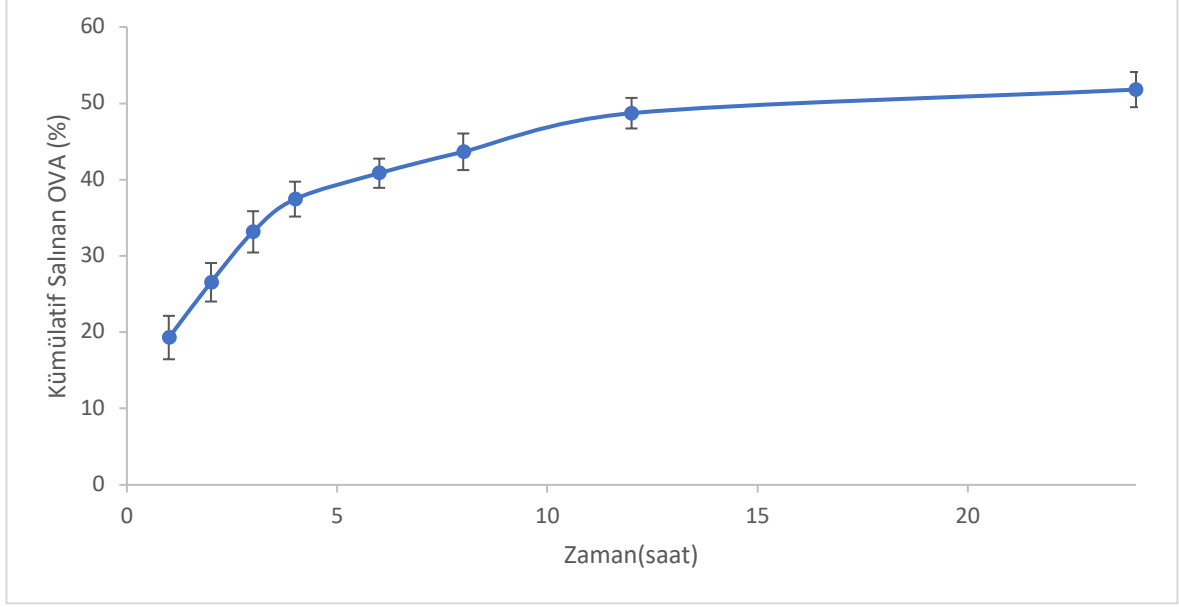
4.3 İn Vitro Çalışmalar

4.3.1 Salım

Nanopartiküllerden porinlerin salım profilleri Şekil 4.9'da ve OVA salımı Şekil 4.10'de verilmiştir. Genel olarak, hücre salım öncesi antijenin taşıyıcı sistemden salımının çok düşük düzeyde kalması istenmektedir.



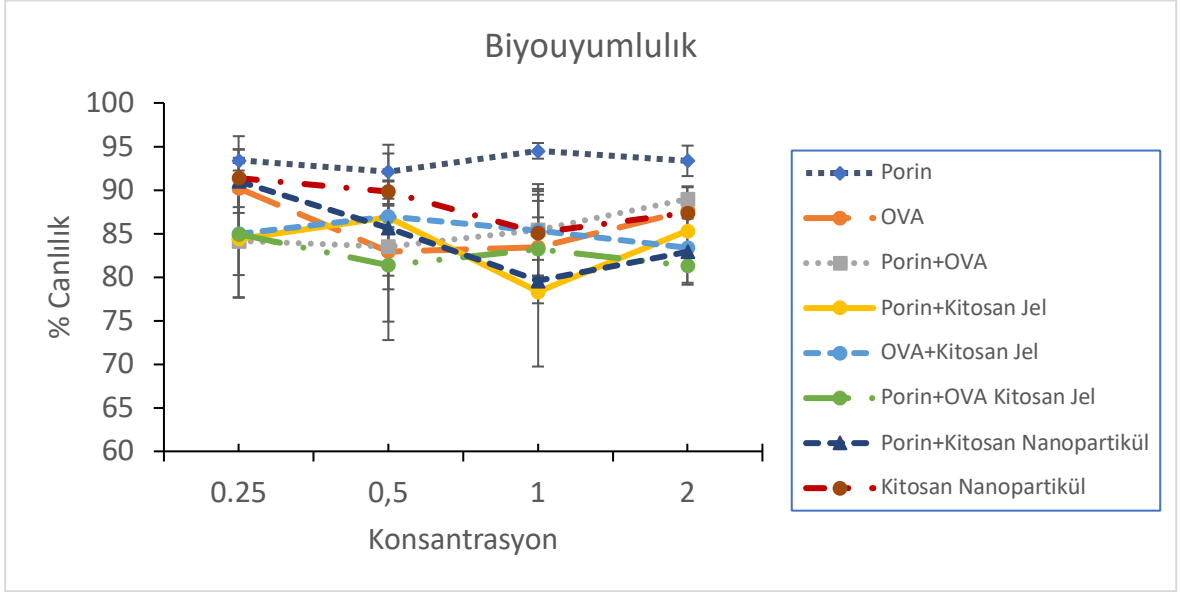
Şekil 4.9 Nanopartiküllerden porin salımı (n=6)



Şekil 4.10 Nanopartiküllerden OVA salımı (n=6)

4.4 Biyouyumluluk

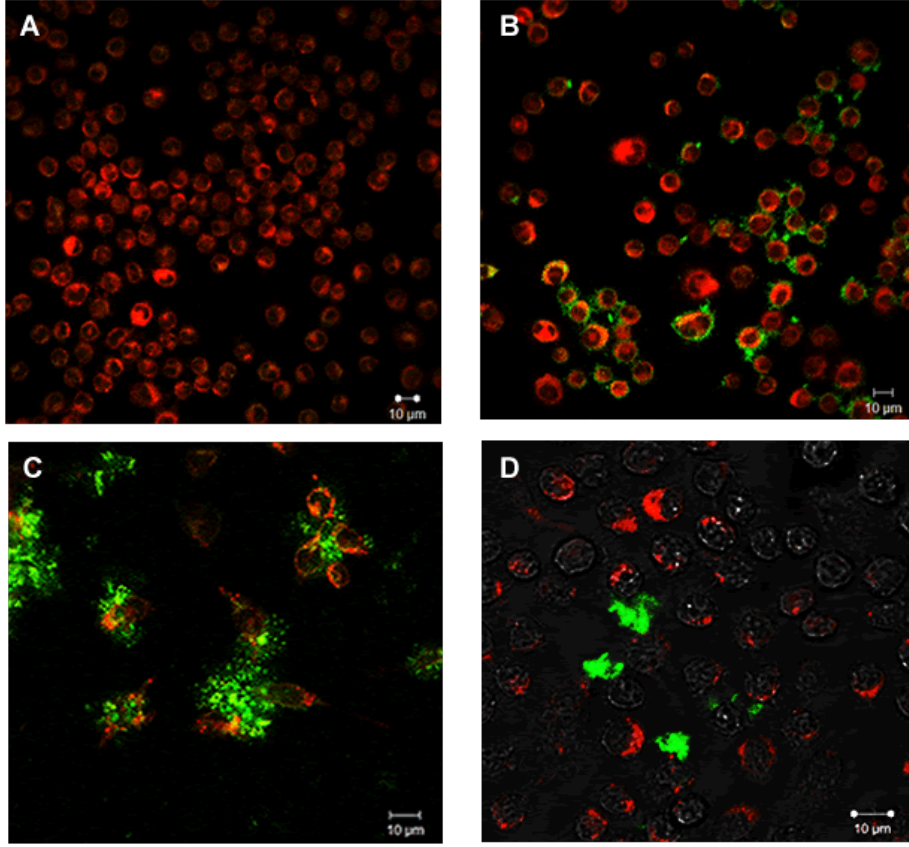
Porinler, OVA ve kitosan J774A.1 murin makrofaj hücrelerine ayrı ayrı uygulandığında, hücre canlılığının % 80'nin üstünde olduğu görülmüştür (Şekil 4.11). Benzer şekilde porin yüklü jel ve nanopartikül formülasyonlarının hücre canlılığı üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi görülmemiştir.



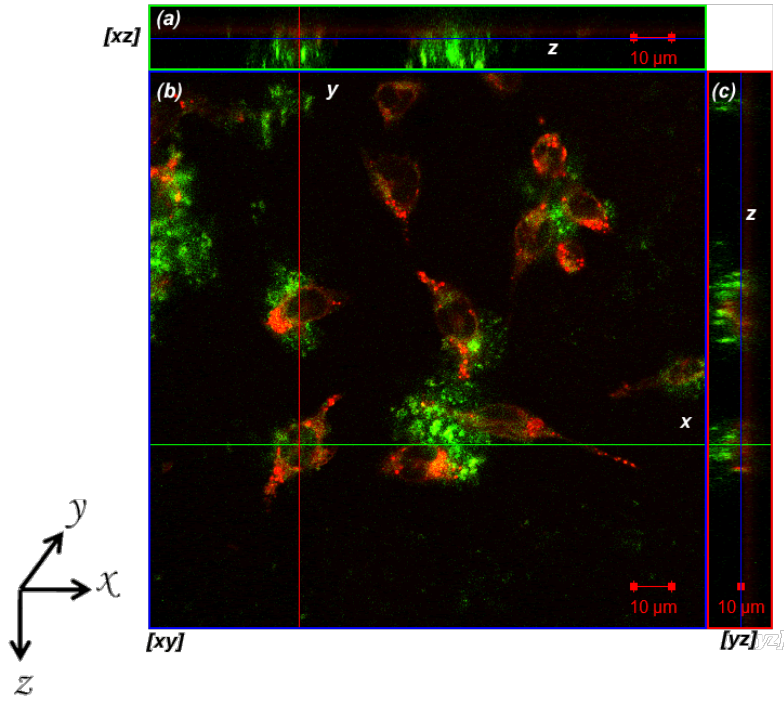
Şekil 4.11 Formülasyon uygulanan J774A.1 hücrelerinde % canlılık (n=3)

4.4.1 Hücresel Alım

J774A.1 murin makrofaj hücrelerine uygulanan formülasyonların hücresel alımına ait konfokal mikroskop görüntüleri (Şekil 4.12) yer almaktadır. Porinler tek başına uygulandığında hücre membranını geçemediği ve daha çok hücrenin duvarına tutunduğu görülmüştür (Şekil 4.12B). Kitosan jel ile uygulandığı zaman ise makrofaj hücreleri tarafından etkin şekilde alındığı (Şekil 4.12C), nanopartikülerde is agragat oluşumu şekillendiği ve muhtemelen bu nedenle de alımın azaldığı düşünülmektedir (Şekil 4.12D).



Şekil 4.12 J774A.1 murin makrofaj hücrelerinden alım: Biyotinlenen porin Streptavidin-Alexa Fluor 488 (yeşil) ile konjuge edilmiş, hücreler Vybrant Dil (kırmızı) ile boyanmıştır: A) Kontrol; B) Porinler; C) Porin+Kitosan Jel; D) Porin+Kitosan Nanopartikül



Şekil 4.13 J774A.1 murin makrofaj hücrelerinden alım: Porin+Kitosan Jel (odak bölümü:23/45, kesit kalınlığı: 0,36 µm); (a) xz ekseninde enine kesitin görüntüsü, (b) xy düzlemindeki görüntülerin z yığını (c) yz ekseninde enine kesitin görüntüsü

4.4.2 Makrofaj Aktivasyonu

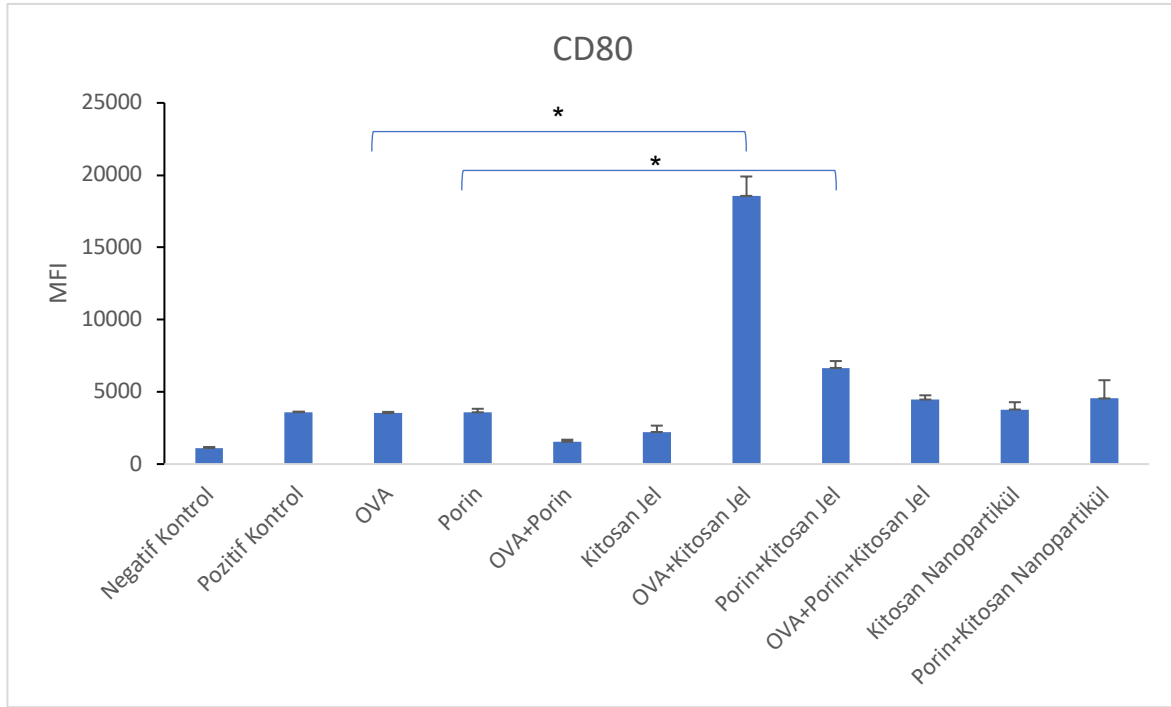
Yüzey ligand ve sitokinlerin salınımı belirlenmesiyle immün sistemin uyarılmasında etkili olan makrofajların in vitro olarak aktivasyonu incelenmiştir. Aşağıdaki bölümlerde sonuçlar sunulmuştur.

4.4.2.1 Yüzey Belirteçleri

CD80

Formülasyonların uygulamasının ardından elde edilen CD80 yanıtı Şekil 4.14'de gösterilmiştir. Porin tek başına uygulandığında pozitif kontrol olarak kullanılan LPS'e benzer düzeyde CD80 ekspresyonuna neden olmuştur ($p > 0,1$). Kitosanın, jel formunda uygulanması, porin ile karşılaştırıldığında; CD80 yanıtında daha az bir artışa fakat nanopartikül formunda ise porine benzer düzeyde CD80 ekspresyonuna neden olmuştur. Porinler ve kitosan jelin birlikte uygulanması, tek başına porin ve kitosan jel uygulamasına göre daha yüksek CD80 yanıtına neden olmuştur ($p < 0,001$). Porinler nanopartikül içinde uygulandığında da CD80 ekspresyonu

gözlenmiş ancak seviyeleri jel formuna oranla düşük kalmıştır. Porin ve model antijen olarak kullanılan OVA birlikte uygulandığında, sadece OVA'ya kıyasla CD80 ekspresyonunda bir artış gözlenmemiştir. OVA, kitosan jel ile birlikte uygulandığında ise tek başına OVA ve kitosan jel uygulamasına göre daha yüksek CD80 molekülünün ekspresyonu gözlemlenmiştir ($p<0,001$). OVA, kitosan ve porinlerle birlikte verildiğinde OVA ile benzer ekspresyon seviyeleri görülmüştür.

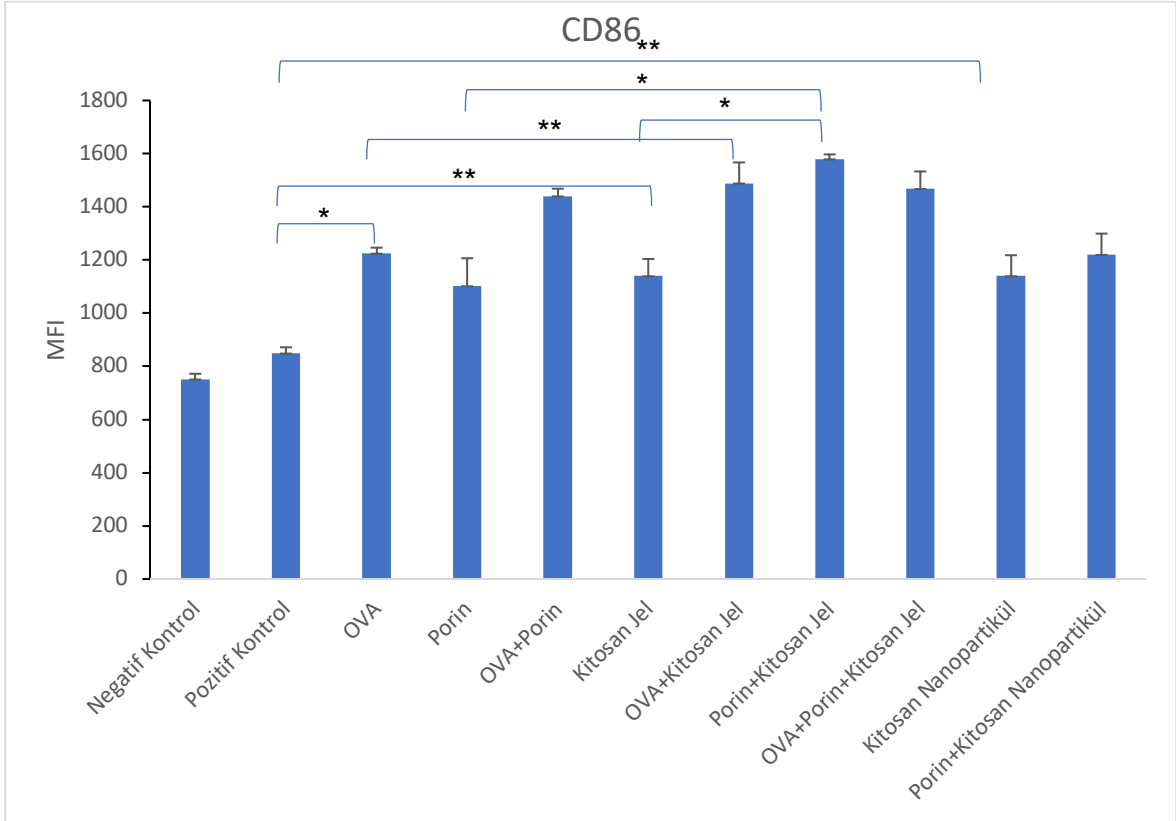


Şekil 4.14 Formülasyonların J774A.1 hücrelerine uygulanmasını takiben CD80 yüzey belirteç seviyeleri (Negatif kontrol: hücre vasatı, Pozitif kontrol: LPS) * $p<0,001$

CD86

OVA ($p<0,001$), porin ($p<0,1$), kitosan jel ($p<0,01$) ve nanopartikül ($p<0,01$) tek başına pozitif kontrol (LPS) ile karşılaştırıldığında daha yüksek CD86 ekspresyonuna neden olmuştur (Şekil 4.15). Porin, kitosan jel birlikte uygulandığında porinin ve kitosan jelin tek başına uygulanmasına göre daha yüksek CD86 ekspresyonu görülmüştür ($p<0,001$). Porinler nanopartiküllerle birlikte uygulandığında, tek başına porinlere göre CD86 seviyesinde hafif bir artış gözlemlenmiştir. Porin ve OVA birlikte uygulandığında, tek başına OVA'ya göre daha

yüksek düzeyde ekspresyonu gözlenmiştir ($p>0,1$). OVA-kitosan birlikte uygulandığında da OVA ile elde edilen CD86 düzeyinden daha yüksek düzeyde ekspresyon gözlenmiş olup ($p<0,01$), porin+kitosan varlığında ise benzer düzeyde kalmıştır.



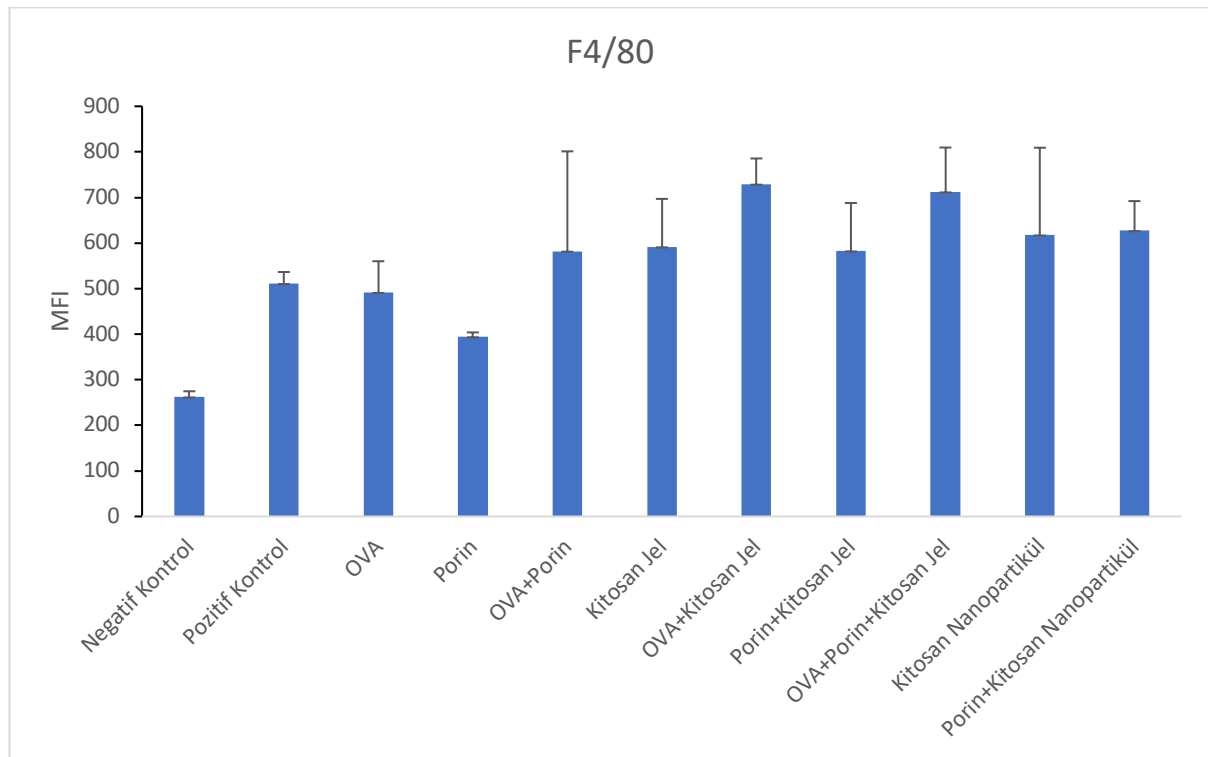
Şekil 4.15 Formülasyonların J774A.1 hücrelerine uygulanmasını takiben CD86 yüzey belirteç seviyeleri (Negatif kontrol: hücre vasatı, Pozitif kontrol: LPS) * $p<0.001$, ** $p<0.01$

F4/80

Porinler, F4/80 ekspresyonunda artışa neden olurken, pozitif kontrol olarak kullanılan LPS kadar yüksek seviyelere ulaşmadığı görülmüştür ($p>0,1$) (Şekil 4.16). Porinler, kitosan jel ile birlikte verildiğinde ise F4/80 ekspresyonuna neden olmuştur ($p<0,1$). Nanopartikül ile birlikte uygulanmasıyla da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

($p < 0,1$). Kitosan, jel ve nanopartikül formunda tek başına uygulandığında sadece porinlere nazaran daha yüksek F4/80 seviyeleri elde edilmesine neden olmuştur.

OVA tek başına F4/80 ekspresyonunu artırırken, porinlerle birlikte uygulanması bu etkiyi daha da artırmıştır ($p < 0,1$). Benzer şekilde kitosana birlikte uygulanması sonucunda da F4/80 seviyeleri arttı fakat porinlere nazaran daha etkili olduğu görülmüştür ($p < 0,1$). OVA, kitosana ve porinlerle birlikte uygulanması sonucu, F4/80 seviyelerinin OVA+kitosana benzer düzeyde olduğu görülmüştür ($p > 0,1$). Genel olarak kitosana, porinlerle karşılaştırıldığında F4/80 ekspresyonunda daha etkili olduğu söylenebilir.

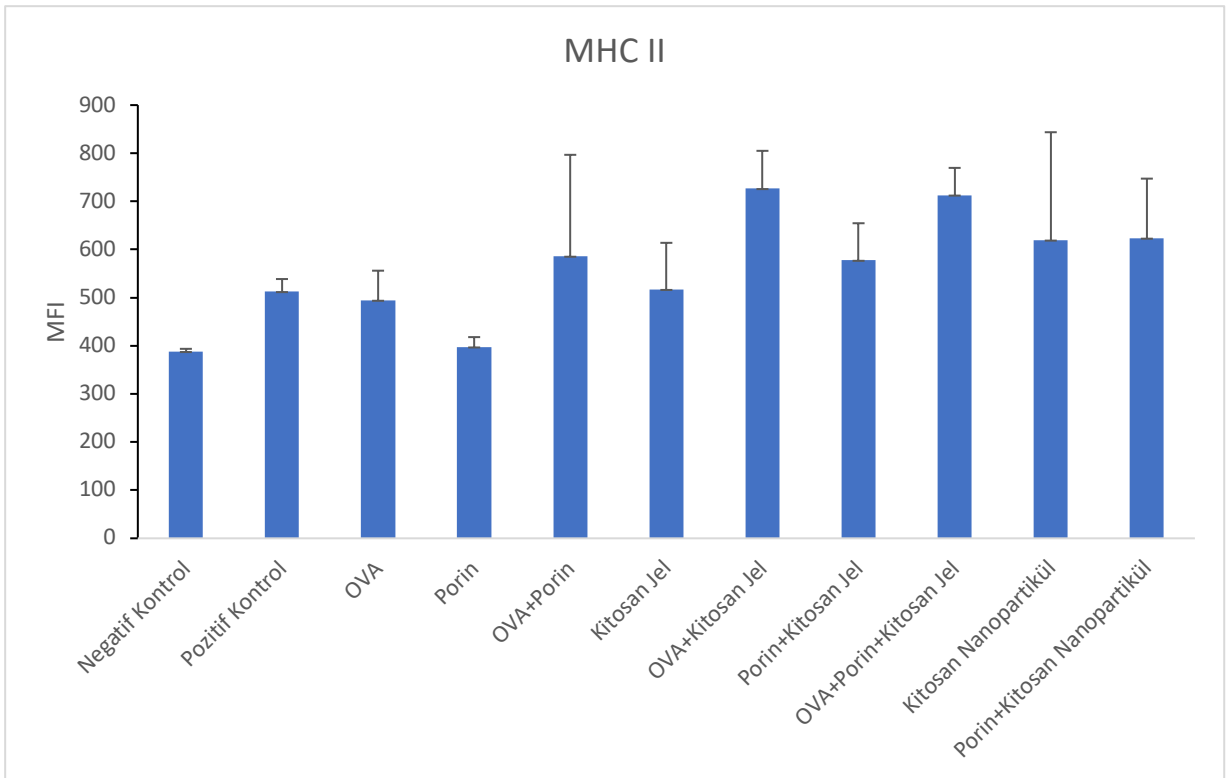


Şekil 4.16 Formülasyonların J774A.1 hücrelerine uygulanmasını takiben F4/80 yüzey belirteç seviyeleri (Negatif kontrol: hücre vasatı, Pozitif kontrol: (LPS))

MHC II

Porinlerin MHCII ekspresyonu üzerine etkisi negatif kontrol ile karşılaştırıldığında bir fark olmadığı görülmüştür. Kitosana ise jel ve nanopartikül formunda MHCII seviyelerinde artışa neden olmuştur ($p < 0,1$) (Şekil 4.17). Kitosana ve porinlerin bir arada uygulanması, tek başına porine kıyasla artmıştır ($p < 0,1$). Bu artış jel ve

nanopartiküller için benzer düzeydedir. Sadece OVA uygulandığında MHCII ekspresyonunu artırırken, porinler ve kitosan birlikte uygulandığı koşullarda ekspresyon düzeyinin daha da arttığı görülmüştür. Kitosan ve OVA kombinasyonu ile elde edilen düzeyler, Porinler ve OVA ile elde edilene göre daha yüksektir ($p<0,1$). Porinler, OVA ve kitosanın birlikte uygulanması MHCII seviyeleri açısından kitosan ve OVA ile elde edilen düzeyle benzerdir. MHC II ekspresyonu üzerinde kitosanın porinelere göre daha etkili olduğu görülmektedir.



Şekil 4.17 Formülasyonların J774A.1 hücrelerine uygulanmasını takiben MHC II yüzey Belirteci seviyeleri (Negatif kontrol: hücre vasatı, Pozitif kontrol: LPS)

4.4.2.2 Sitokin Seviyeleri

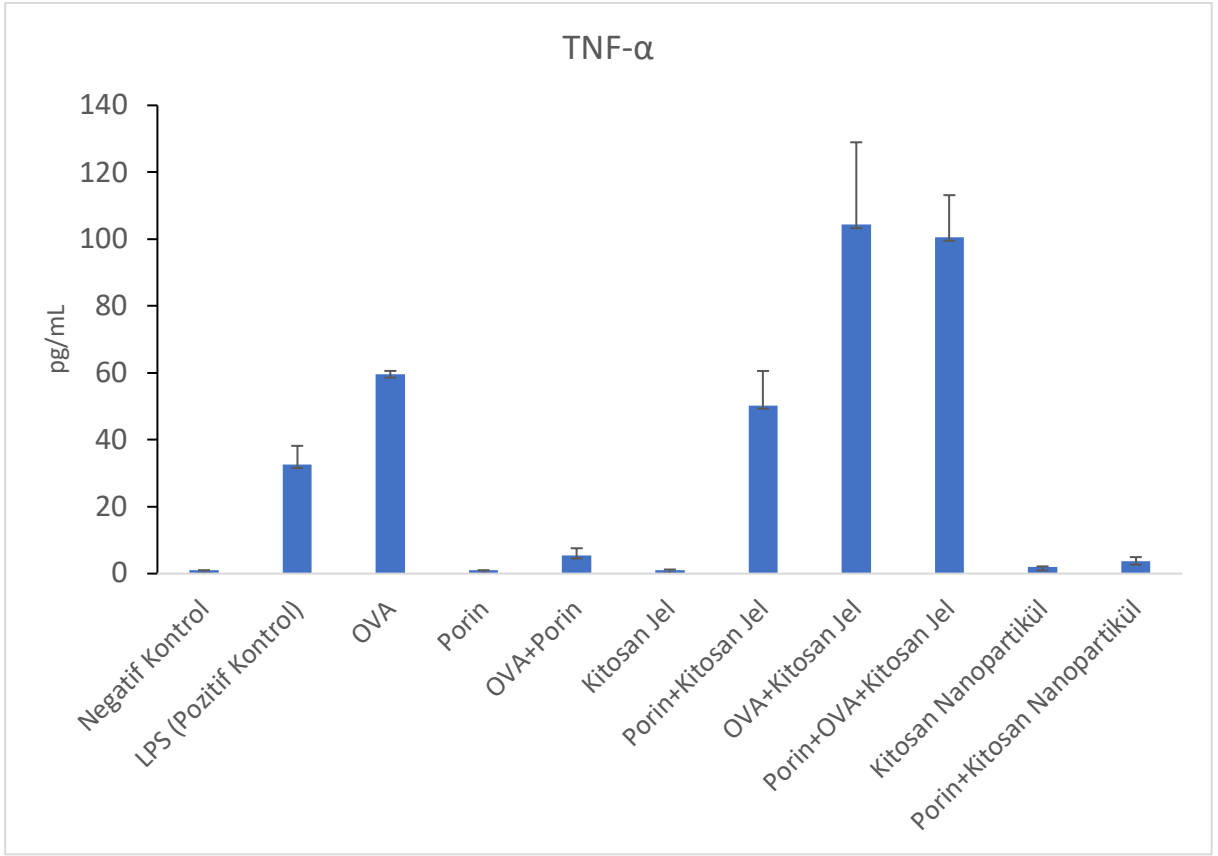
Formülasyonların J774A.1 hücrelerine uygulanması sonrası elde edilen sitokin seviyeleri Çizelge 4.5'de sunulmuştur. İncelenen sitokinler arasında sadece TNF- α ve IL-6 salımında artış görülmüştür (Şekil 4.18 ve 4.19). Diğerlerinde ise kontrole göre anlamlı yükseliş izlenmemiştir.

Çizelge 4.5 Formülasyonlarla uyarılan J744A.1 murin makrofaj hücrelerinden sitokin salımı (pg/mL)

	IFN γ	IL-5	TNF- α	IL-2	IL-6	IL-4	IL-10	IL-9	IL-17A	IL-17F	IL-21	IL-22	IL-23
Negatif kontrol (Hücre vasatı)	1,75	1,14	1,02	0,92	0,97	0,95	1,97	2,24	0,94	0,77	1,57	0,88	0,97
Pozitif kontrol (LPS)	1,75	1,14	32,6	0,97	149,1	0,95	1,97	2,24	0,94	0,77	1,57	0,88	0,97
OVA	1,75	1,14	59,6	0,92	265,9	0,95	1,97	2,24	0,94	0,77	1,57	0,88	0,97
Porin	1,75	1,14	1,02	0,92	0,97	0,95	1,97	2,24	0,94	0,77	1,57	0,88	0,97
OVA+Porin	1,75	1,14	5,52	0,92	9,39	0,95	1,97	2,24	0,94	0,77	1,57	0,88	0,97
Kitosan Jel	1,75	1,14	1,12	0,97	0,97	0,95	1,97	2,24	0,94	0,77	1,57	0,88	0,97
Porin+ Kitosan Jel	1,75	1,14	50,3	0,92	194,1	0,95	1,97	2,24	0,94	0,77	1,57	0,88	0,97
OVA+ Kitosan Jel	1,75	1,14	104,3	0,92	448,8	0,95	1,97	2,24	0,94	0,77	1,57	0,88	0,97
Porin+OVA+Kitosan Jel	1,75	1,14	100,5	0,92	547,4	0,95	1,97	2,24	0,94	0,77	1,57	0,88	0,97
Kitosan Nanopartikül	1,75	1,14	1,95	0,92	1,75	0,95	1,97	2,24	0,94	0,77	1,57	0,88	0,97

TNF- α

Porinlerin tek başına TNF- α salımını uyarmadığı görülmüştür. Kitosan jel ile birlikte verildiğinde ise TNF- α düzeyinin, kontrol olarak kullanılan LPS ile elde edilen düzeyle kıyaslanması sonucunda artışa neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.18) ($p < 0,1$). Kitosanın hem jel hem de nanopartikül formunda tek başına verilmesi sonucu TNF- α salımı olmamıştır. Porin yüklü nanopartiküllerin de TNF- α 'yı uyarmadığı gözlenmiştir. Model antijen olarak seçilen OVA'nın tek başına uygulanması pozitif kontrole göre çok yüksek TNF- α salımına neden olmuştur ($p < 0,1$), ancak porinlerle birlikte uygulandığında ise TNF- α salımı gözlenmemiştir. OVA, kitosan jel kombinasyonu, tek başına OVA'ya göre daha yüksek TNF- α salımına neden olmuştur ($p < 0,1$). OVA+porinler+kitosan formülasyonunda ise OVA+kitosan'a benzer TNF- α seviyeleri elde edilmiştir ($p > 0,1$). Porinlerin ilave bir etkisi olmadığı görülmüştür.



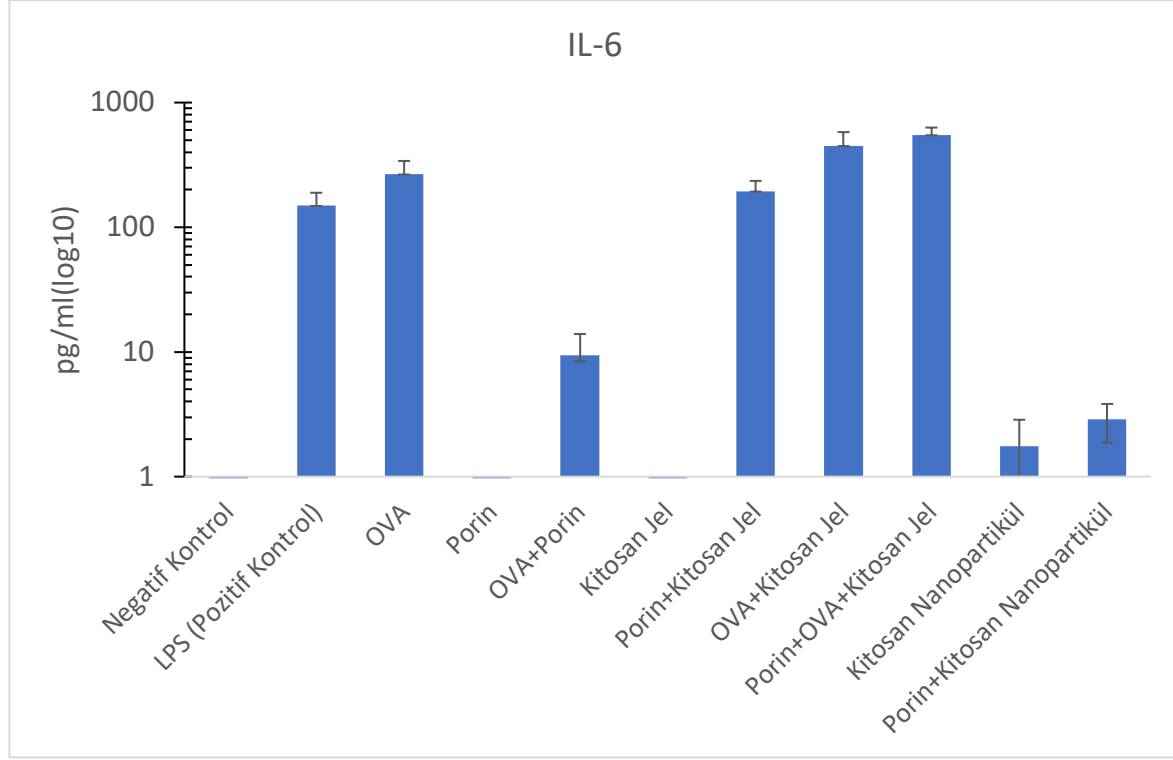
Şekil 4.18 Formülasyonların uygulanmasını takiben J774A.1 hücrelerinden TNF-alfa salımı (Negatif kontrol: hücre vasatı, Pozitif kontrol: LPS)

IL-6

Porinler tek başına IL-6 salımı üzerine etkili olmamış, ancak kitosan jel ile birlikte uygulandığında IL-6 düzeyinde artış olmuştur ($p < 0,1$). Porinler+kitosan nanopartikül ile IL-6 salımı anlamlı bir şekilde uyarılmamıştır (Şekil 4.19).

OVA tek başına uygulandığında IL-6 salımını uyarılmış, ancak porinlerle birlikte uygulandığında IL-6 salımına etkisi olmamıştır. OVA, kitosan jel ile uygulandığında ise tek başına OVA ile elde edilenden daha yüksek düzeyde IL-6 salımı görülmüştür ($p < 0,1$).

OVA, porinler ve kitosan birlikte uygulandığında en yüksek IL-6 düzeyi elde edilmiştir.



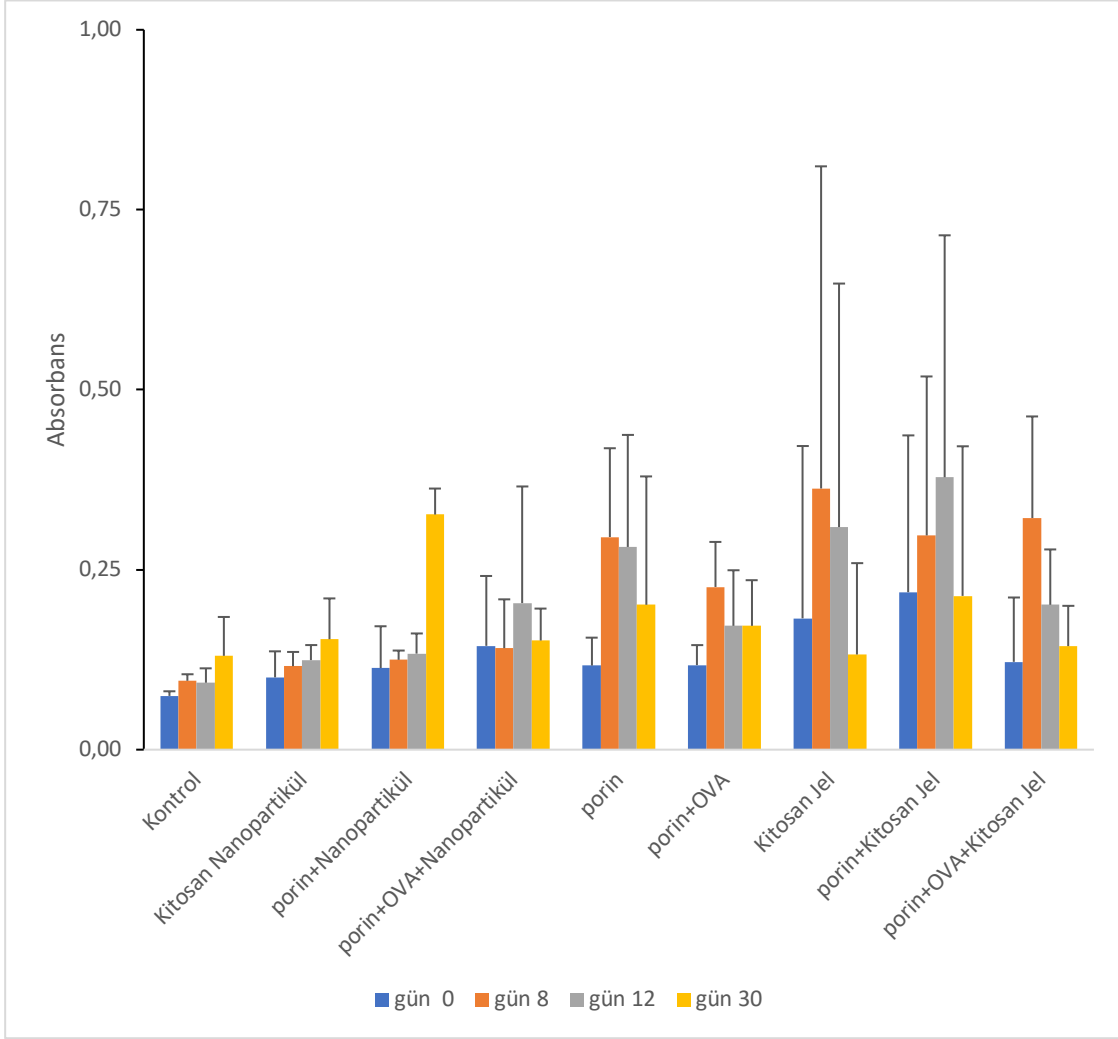
Şekil 4.19 Formülasyonların uygulanmasını takiben J774A.1 hücrelerinden IL-6 salımı (Negatif kontrol: hücre vasatı, Pozitif kontrol: LPS)

4.5 İn Vivo Çalışmalar

4.5.1 Hümorale İmmün Yanıt

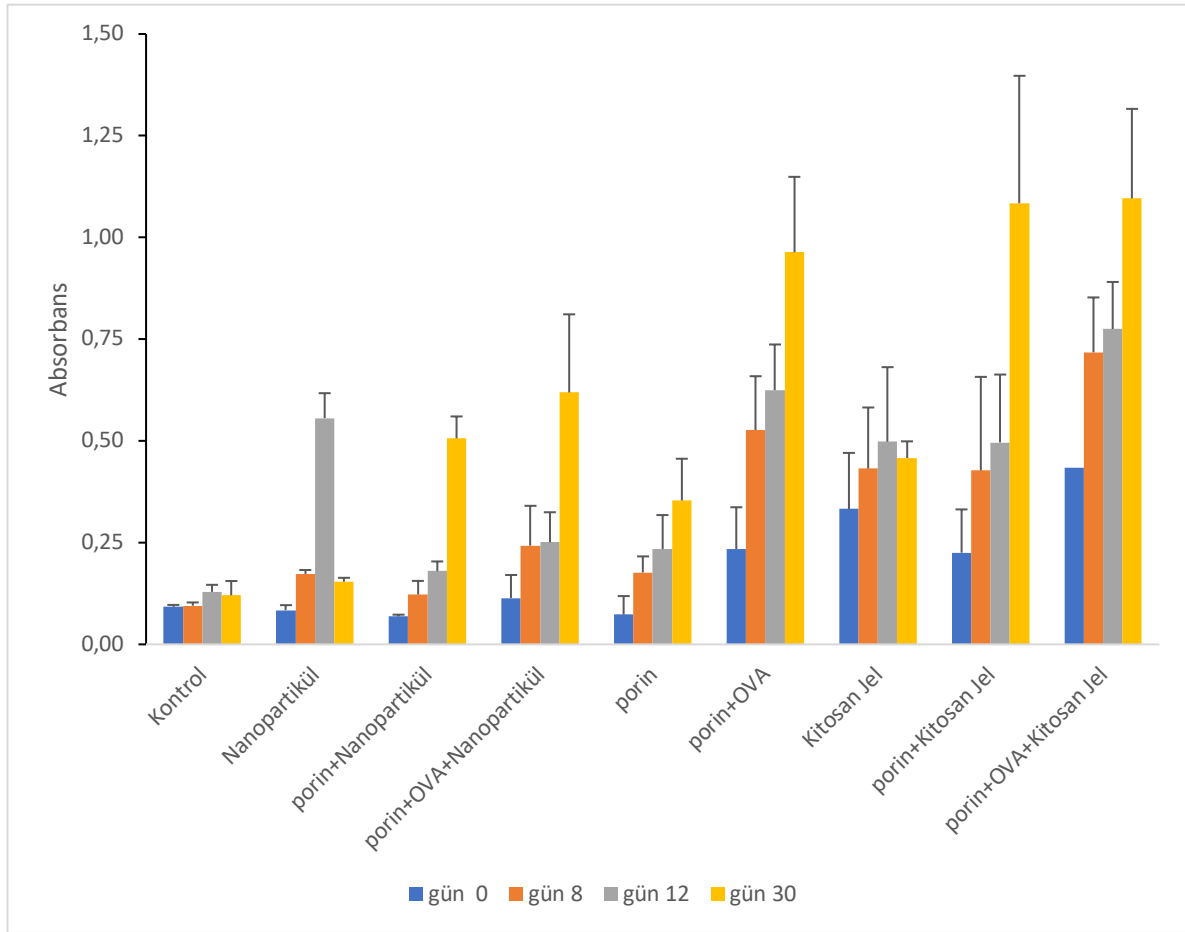
Anti-porin IgM seviyeleri

Porine karşı oluşan IgM seviyeleri Şekil 4.20'de verilmiştir. Porinler tek başına uygulandığında IgM seviyeleri 8. günde artmış, 12. günde hafif azalmış, aşı tekrarından sonra da düşüş devam etmiştir. Kitosan jel ile birlikte uygulanması tek başına porine göre daha yüksek IgM salımı olmuş, 8 ve 12. günde düzeylerde artış görülmüştür ($p < 0.05$). Tekrar immünizasyondan sonra ise IgM seviyesinde düşüş görülmüştür. Porinler, nanopartiküller ile verildiğinde ise ikinci aşılardan sonra IgM seviyesinde belirgin bir artış görülmüştür ($p < 0.01$).



Şekil 4.20 İmmünizasyon sonrası porinlere karşı oluşan IgM seviyeleri

Porine yanıt olarak elde edilen IgG seviyeleri Şekil 4.21’de verilmiştir. Porinlerin uygulanması ile 8. günü izleyen dönemde IgG seviyelerinde artış gözlenmiş ve tekrar immünizasyonun ardından 30. günde de artış devam etmiştir ($p < 0,05$). Kitosan ile birlikte porin uygulamasıyla, 8. ve 12. günde tek başına porine benzer düzeyler elde edilmiş, ikinci aşılardan sonra ise IgG düzeyinde önemli bir artış gözlenmiştir ($p < 0,001$). Ancak nanopartiküler formda uygulandığında kitosanın varlığı porin IgG düzeyinde, tek başına porin uygulanmasına göre anlamlı bir fark oluşturmamıştır ($p > 0,05$). Nanopartiküller ancak ikinci immünizasyondan sonra IgG düzeyini artırmıştır.

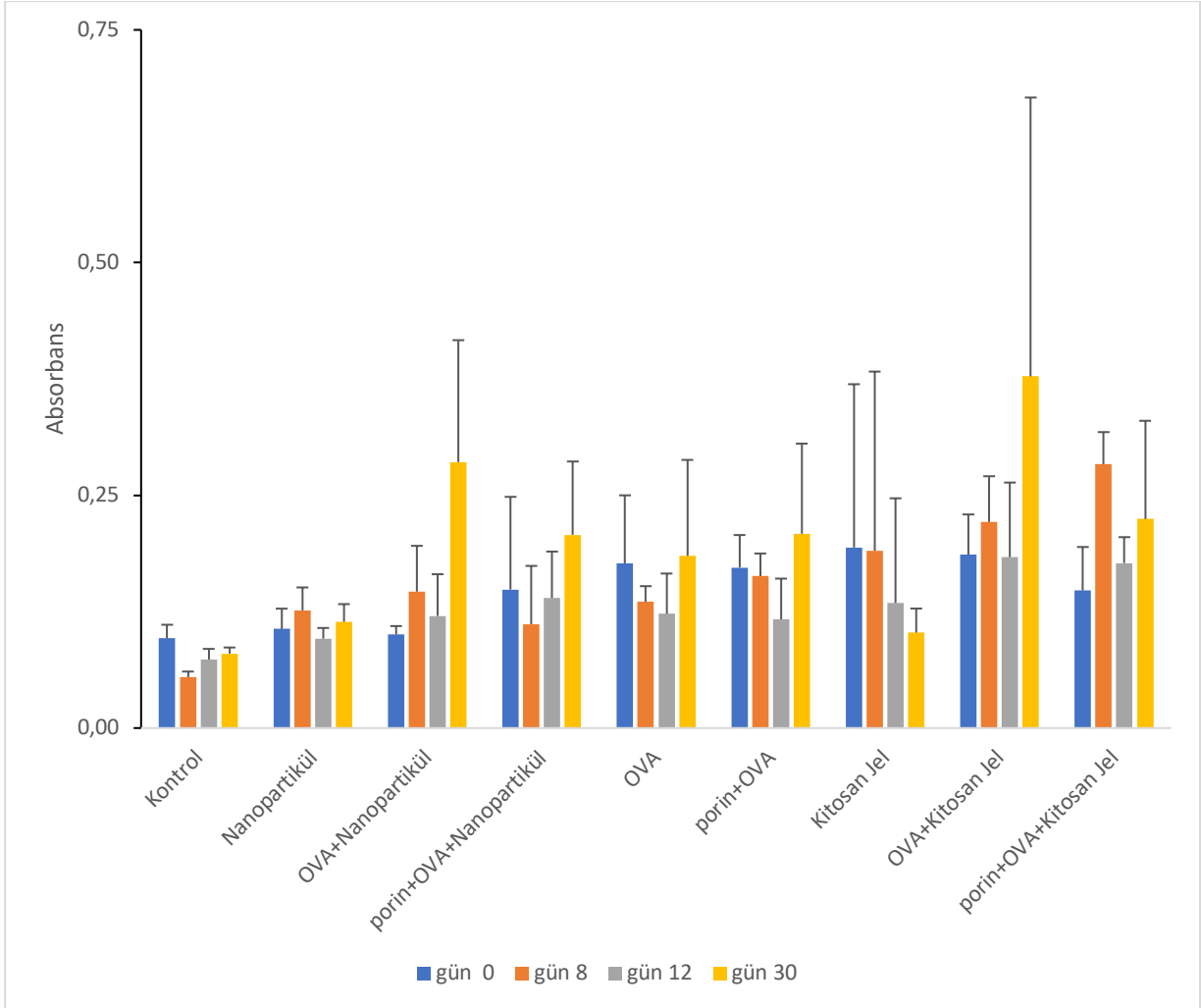


Şekil 4.21 İmmunizasyon sonrası porinlere karşı oluşan IgG seviyeleri

Anti OVA IgM seviyeleri

OVA'ya yanıt olarak elde edilen IgM yanıtı Şekil 4.22'de verilmiştir. Tek başına OVA uygulanması sonucu şekillenen IgM seviyeleri kontrole göre biraz daha yüksek bulunmuştur ve ikinci aşılardan sonra seviyeleri daha artmıştır. OVA, porinlerle birlikte uygulandığında da yine benzer IgM profili elde edilmiştir. Kitosan jel ile verilmesi sonucunda ise IgM düzeyi önemli düzeyde artmış ve ikinci aşılardan sonra da en yüksek düzeye ulaşmıştır ($p < 0.05$). OVA, porinler ve kitosan, jel formunda uygulanmasında, IgM düzeyinde 8. günde artış gözlenirken, 12. günde azalan seviyelerin, ikinci aşılardan sonra tekrar arttığı görülmüştür. IgM seviyelerinde, OVA-nanopartikül formunda uygulandığında, tek başına OVA'ya göre önemli bir artış gözlenmemiştir ($p > 0.05$). OVA ve porinlerle yüklü nanopartiküller karşı yanıt tek başına OVA ile yanıtı karşılaştırıldığında, aralarında

anlamli bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Kitosanin tek başına (jel veya nanopartikül) önemli derecede IgM yanıtına neden olmadığı görülmüştür.

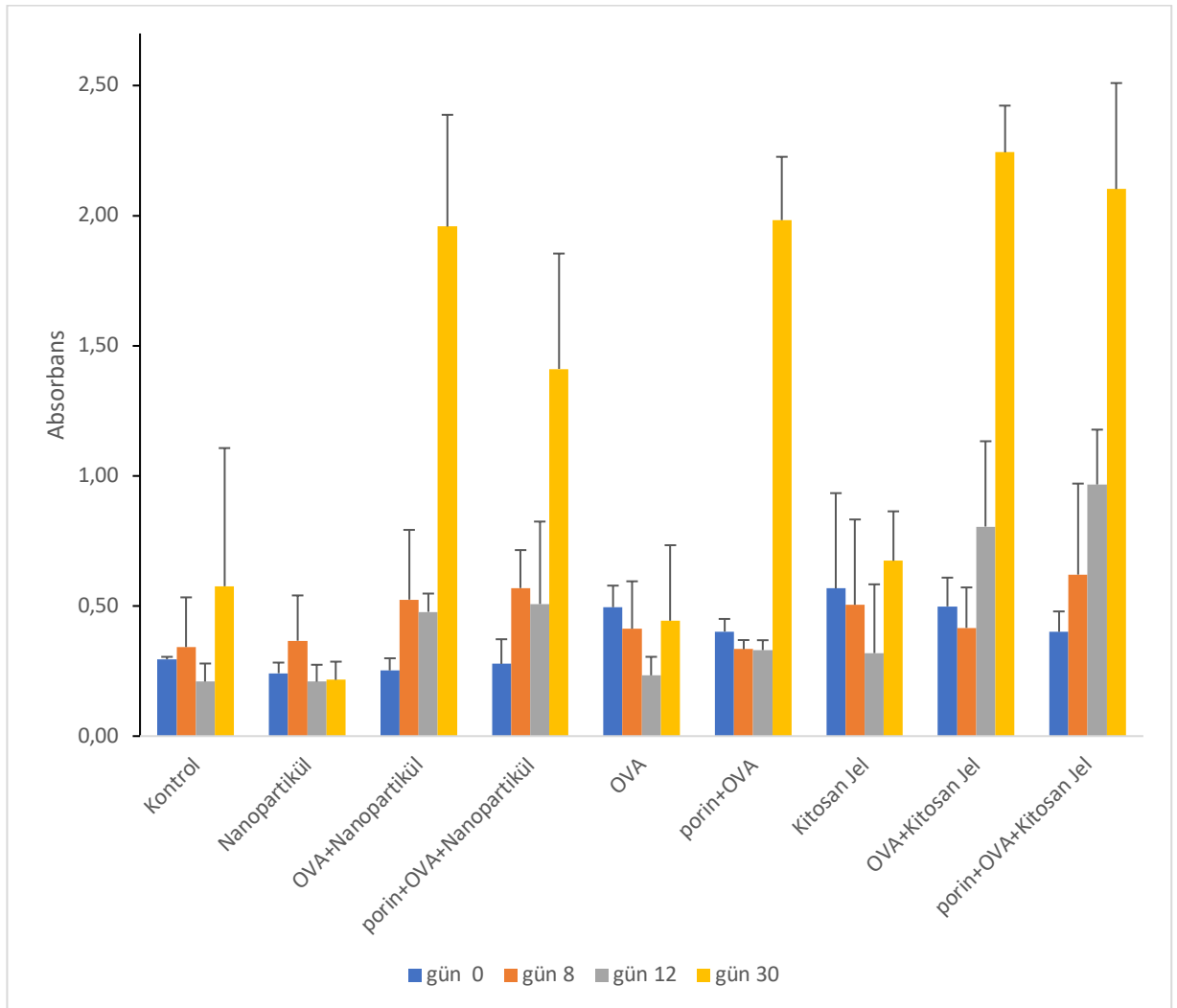


Şekil 4.22 İmmünizasyon sonrası OVA'ya karşı oluşan IgM seviyeleri

Anti OVA IgG seviyeleri

OVA'IgG yanıtı Şekil 4.23'de verilmiştir. OVA tek başına IgG yanıtına neden olamamıştır. Porinlerle birlikte verilmesi sonucunda ikinci aşılama sonrası IgG seviyelerinde artış görülmüştür. OVA'nın kitosan jel ile birlikte uygulanmasıyla, IgG seviyelerinde 12. günde artış başlamış, ikinci immünizasyondan sonra ise OVA ve porinin birlikte uygulanması ile elde edilen düzeye benzer şekilde çok yüksek bir artış elde edilmiştir ($p<0.001$). OVA, porinler ve kitosan ile birlikte jel şeklinde

verildiğinde, IgG seviyelerinde artış 8. günde başlamış, 12. günde artış devam etmiş ve tekrar immünizasyon sonrasında diğer uygulamalara benzer şekilde yükselmiştir. OVA, nanopartiküllere birlikte uygulandığında ise ilk 15 gün IgG seviyelerinde bir artış gözlenmezken, ikinci immünizasyondan sonra IgG seviyeleri kitosan jel ile elde edilene benzer şekilde yükselmiştir ($p<0.001$). OVA içeren nanopartiküllere porinlerin ilavesi IgG seviyelerinde bir farklılık gözlenmemiştir. Kitosan jel içinde uygulandığında, ikinci immünizasyondan sonra IgG düzeyinde artış görülmüştür. Nanopartikül formunun kendi başına IgG yanıtı üzerinde etkili olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.23 İmmünizasyon sonrası OVA'ya karşı oluşan IgG seviyeleri

4.6 Stabilite Çalışmaları

Oda sıcaklığında yapılan stabilite çalışmalarına ait sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir. Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve dağılımında ve zeta potansiyelinde 6 aylık zaman diliminde herhangi bir değişiklik olmamıştır.

Çizelge 4.6 Nanopartiküllere ait stabilite sonuçları (25°C)

	3. ay			6.ay		
	Partikül Büyüklüğü ± SS	PDI ± SS	Zeta Potansiyel ± SS (mV)	Partikül Büyüklüğü ± SS	PDI ± Std. Sapma	Zeta Potansiyel ± SS (mV)
Kitosan Nanopartikül	370,4±3,6 nm	0,21±0,03	46,5±2,6	372,4±5,8 µm	0,221±0,05	45,4±4,6
Porin+Kitosan Nanopartikül	340,56±4,2 nm	0,321±0,024	29,9±3,1	342,61±3,1 µm	0,298±0,04	29,4±4,2
OVA+Kitosan Nanopartikül	241,3±5,1 nm	0,326±0,035	28,7±2,8	243,3±2,5 µm	0,332±0,04	27,5±1,6
Porin+OVA +Kitosan Nanopartikül	431,9 ±5,9 nm	0,343±0,059	30,9±5,1	433,1±2,1 µm	0,349±0,06	29,8±1,9

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1 Geliştirilen Formülasyonların Teknolojik Olarak Değerlendirilmesi

Tez çalışmasında alt-birim protein antijenlerinin immünojenitesinin artırılması amacıyla yeni bir adjuvant/taşıyıcı sistem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla immünoestimulan etkisi bilinen porinler, hem immünoestimulan özelliği nedeniyle hem de aşı taşıyıcı sistem olarak kullanılan katyonik bir biyopolimer olan kitosan ile nanopartikül ve jel formunda kombine edilmiştir. Model antijen olarak ovalbumin kullanılmıştır.

Çalışmada, *S. Typhi* 'den elde edilen porin proteinleri (OmpC ve OmpF), kullanılmıştır. Kitosanın, immünoestimulan özelliğinin yanısıra taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasına olanak vermesi, pozitif yüklü olması, biyoadeziv ve penetrasyon artırıcı özelliklerinden dolayı tercih edilmiştir.

Adjuvant sistemlerin, immün yanıtı uyarabilmesi ve artırabilmesi için antijen sunucu hücreler tarafından alınması gerekmektedir [58]. Bu nedenle, hedeflenen sistemlerin büyüklük, şekil, yüzey yükü ve aynı zamanda bu sistemlere yüklenen antijen oranı önemlidir [104]. Etkin bir immün yanıt oluşturacak bir formülasyon geliştirilmesinde tüm bu faktörler dikkate alınmıştır.

Çalışmada suda çözünür kitosan tercih edilmiş, zira, bazik özellikteki kitosanın pH'sı asidik olduğu için protein tabiatında olan porinlerin stabilitesini etkileyebileceği düşünülmüştür.

Porinler ve kitosan bir araya geldiğinde davranışını gözlemlemek ve ön bilgi oluşturmak amacıyla, kitosan jel hazırlanmış ve porinler jele inkorpore edilmiş ve kitosan ile bir araya getirildiklerinde porinlerin integritesini koruduğu gösterilmiştir (Şekil 4.3).

İstenen özelliklere (zeta potansiyel, partikül büyüklüğü ve dağılımı, yükleme etkinliği) sahip nanopartiküller iyotropik jelasyon tekniği ile hazırlanmıştır. Çapraz bağlayıcı olarak farklı oranlarda tripolifosfat pentasodyum (TPP) kullanılmıştır. Yüzey yükü, partikül büyüklüğü ve dağılımı, gibi özellikler göz önünde bulundurularak, en uygun kitosan:TPP oranının 5:1 olduğu görülmüştür. $366,4 \pm 4,8$

nm büyüklüğünde elde edilen nanopartiküllerin yüzey yükleri pozitifdir ($47,9 \pm 3,5\text{mV}$). 500 nm'den küçük, katyonik nanopartiküllerin immün sistem ile etkileşerek daha etkin şekilde alındığı bilinmektedir [105]. Porin ve OVA'nın yükleme etkinlikleri sırasıyla %87 ve %69 düzeyinde olup oldukça yüksektir.

5.2 İN VİTRO ÇALIŞMALAR

Elde edilen nanopartiküllerde in vitro çalışmalar, aşı ve immünolojik çalışmalarda sıklıkla tercih edilen Balb/C fare kökenli J774A.1 mürin makrofaj hücre hattında gerçekleştirilmiştir [74, 106-109].

5.2.1 Biyouyumluluk ve Hücresel Alım

Geliştirilen jel ve nanopartikül formülasyonlarının hücre canlılığı üzerinde olumsuz etki göstermediği görülmüştür (Şekil 4.11).

Porinlerin hücreden alımının kitosan varlığında gerçekleştiği gösterilmiştir (Şekil 4.13). Porinlerin negatif yüke sahip olması nedeniyle hücre membranından geçişin çok düşük olduğu, katyonik yüke ve permeabilite artırıcı niteliklere sahip kitosanın, porinlerin hücresel alımını kolaylaştırdığı görülmüştür [110]. Öte yandan, partiküler taşıyıcı sistemler, patojenleri boyutları nedeniyle taklit edebilmeleri nedeniyle makrofaj ve dendritik hücreler tarafından kolaylıkla alınmaktadır [31, 60, 61]. Partiküler sistemlerin büyüklüğü, şekli, yükü gibi fizikokimyasal özellikleri formülasyonların hücresel alımını etkilemektedir [104, 111-113]. Nanopartiküler sistemlerde ise bu partiküllerin boyutu çok küçüldüğünde ($<10\text{ nm}$), alımın endositozla gerçekleştiği ancak etkinin istenen düzeye ulaşmadığı bildirilmiştir [113]. Diğer bir faktör ise, nanopartiküllerin boyutu küçüldükçe nanokümeleşmeye yatkın oldukları ve APC tarafından difüzyon mekanizmasıyla alındığı ve etkinin arttığı ifade edilmiştir [114]. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada da $337,7 \pm 1,7\text{ nm}$ boyutunda olan nanopartiküllerin nanokümeleşme oluşturduğu ve jele göre hücresel alımın düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.12.D).

5.2.2 İn Vitro Makrofaj Aktivasyonu

J774A.1 mürin makrofaj hücre hattında yapılan çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan lipopolisakkarit (LPS), Gram - bakterilerin hücre duvarının temel yapı taşlarındandır. LPS, APC yüzeyindeki TLR'ler tarafından tanınarak, immün yanıtın şekillenmesi ve CD80 ile CD86 moleküllerinin ekspresyonunu artırdığı bilinmektedir

[80, 115]. Makrofajların in vitro olarak aktivasyonu incelemek amacıyla yüzey ligandları ile sitokinlerin salım seviyeleri tayin edilmiştir. Öncelikle CD80, CD86, F4/80 ve MHCII yüzey belirteçleri incelenmiştir. Hücrel immün yanıtta rol alan T hücrelerinin görevini yerine getirebilmesi için efektör hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması için aktivasyonları gerekmektedir. T hücreleri doğrudan antijeni tanıyamadığından, APC'ler aracılık görevi üstlenmektedir [116]. T hücrelerine antijenlerin sunulmasında APC'lerin yüzeyindeki major doku uyşum kompleksi (Major Histocompatibility Complex- MHC I veya MHC II) görev alır. MHC I kompleksi, antijeni CD8+ /sitotoksik T lenfositine sunar, MHC II kompleksi ise antijeni CD4+/ yardımcı T lenfositine sunar. Sitotoksik T lenfositleri antijeni elimine ederler, yardımcı T hücreleri ise başta makrofajlar olmak üzere diğer immün hücrelerin uyarılması, sitokin salımı ve adaptif immünitenin uyarılmasında görev alır. MHC aracılığıyla antijeni tanıyan T hücresi ilk sinyali alarak ikinci sinyali meydana getirir ve T hücre yüzeyindeki CD40 ligandı ile APC üzerinde CD40 etkileşir. Bu etkileşimle 2. sinyali alan APC'lerin yüzeyinde CD80 ve CD86 kostimulatör moleküllerinin ekspresyonu artar. APC'lerin yüzeyinde eksprese edilen CD80 ve CD86, T lenfosit üzerindeki CD28'i aktive ederek T hücre ve APC üzerindeki iletişimi artırır [117, 118]. F4/80 ise fare makrofaj hücrelerinde spesifik olarak bulunan ve yaygın olarak kullanılan bir yüzey belirteçidir.

Çalışmada model antijen olarak kullanılan OVA'nın öngörüldüğü şekilde kostimulatör molekülleri ve MHC II'nin ekspresyonunu artırdığı görülmüştür [119]. Adjuvant ve antijen taşıyıcı olarak seçilen kitosanın ise humoral ve hücrel aracılı immün yanıtı artırdığı bilinmektedir [120]. Ayrıca, kitosan nano- ve mikropartiküllerin makrofaj ve polimorfonükleer hücrelerin bir araya gelmesini ve aktivasyonunu artırdığı ve ayrıca sitokinleri indükleyerek immüniteyi uyardığı bildirilmiştir [121]. Ed Lavelle ve grubu [76] çalışmalarında, kitosanın, hücrel immünitede, APC yüzey CD40 ve CD86 kostimulatör moleküllerinin ekspresyonunu indüklediğini göstermişlerdir. Çalışmamızda, kitosanın, jel ve nanopartikül formunda CD86, F4/80 ve MHCII kostimulatör moleküllerinin ekspresyonunu artırarak makrofajları aktive ettiği fakat CD80 ekspresyonu üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı görülmüştür. Bakteri hücreleri ve bunlara ait bileşenler, sitokin salımını modifiye ederek, sitokin üretimi ve bu sayede kostimulatör moleküllerin ekspresyonunu düzenlemektedir. T hücrelerinden salınan IL-5, IFN- γ ve GM-CSF sitokinleri; CD80 ve CD86

ekspresyonunu regüle etmektedir [117]. Gram - bakteri hücre duvarında yer alan porinler ve lipopolisakkaritlerin yüksek oranda ve benzer şekilde CD80 ve CD86 ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir[80]. TLR4 transfekte hayvanlarda yürütülen bir çalışmada da *S. Typhi* porinlerinin CD80 ve CD86 ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir [92]. Çalışmamızda da porinlerin LPS'e benzer tarzda CD80 ve CD86 ekspresyonu indüklediği görülmüştür. Porin, pozitif yüzeyle yüklü kitosan jel ile nanopartiküllerle birlikte uygulandığında hücre alım artışıyla beraber CD80 ve CD86 ekspresyonunda artış izlenmiştir.

Porinlerin, MHC II ekspresyonu üzerine etkisi görülmemiştir. Kitosan porin kombinasyonu ise MHC II ekspresyonunu artırmıştır. Yüzeyle yükünün APC'lerce alımı olumlu etkilediği ve pozitif yüke sahip antijenlerin makrofajlar tarafından daha etkin bir şekilde alındığı bilinmektedir[122]. Pozitif yüklü kitosan ve negatif yüklü porinlerin, birlikte uygulanması, makrofaj hücrelerinin alımını artırmıştır. Hücre alım çalışmalarında porinin kitosan ile birlikte uygulanması, hücre içine alımı daha etkin hale getirdiği görülmüştür (Şekil 4.12). Bazı *S. Typhi* porin proteinlerinin MHCII ekspresyonunu bazılarının da CD40 ekspresyonunu arttırdığı yapılan bir çalışmada gösterilmiştir [85].

Model antijen olarak seçilen OVA'nın kitosan jel ile birlikte uygulanması tek başına uygulamaya göre daha güçlü bir makrofaj aktivasyonu (ko-stimülatör molekül hem de sitokin salımı) oluşturduğu görülmüştür. Bu bulgular daha önce bildirilen çalışma sonuçlarıyla uyumludur [123]. Kitosanın pozitif yüzeyle yükünün yanısıra permeabilite artırıcı özelliklerinin de etkili olduğu düşünülmektedir. OVA, porinlerle birlikte uygulandığında da makrofaj aktivasyonunda artışa neden olmuştur. OVA, porin ve kitosan hep birlikte uygulandığında OVA+porin uygulamasına nazaran bir artış görülmemiştir.

5.2.3 Sitokin Seviyeleri

Makrofaj aktivasyonunu inceleyebilmek için sitokin seviyelerine de bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar, sadece IL-6 ve TNF- α salımının gerçekleştiğini göstermiştir (Çizelge 4.8). IL-6 ve TNF- α gibi proinflatuar sitokinler, aktive olmuş APC'ler, özellikle makrofajlar tarafından üretilmektedir ve enflamatuar reaksiyonlarda rol oynarlar [124]. Doğal immünite sitokini olan TNF- α 'nın üretiminin indüklenebilmesi için LPS ya da diğer mikrobiyal ürünlerin TLR'ler ile etkileşime girmesi

gerekmektedir [125]. TNF- α 'nın asıl görevi enfeksiyon sırasında nötrofilleri ve monositleri bölgeye göç ettirip, aktiveleştirmek ve enfeksiyona neden olan patojenin fagosite edilmesini sağlamaktır. IL-6 aynı zamanda B hücre farklılaştırma faktörüdür ve Ig G üretiminde aktif rol alır [126]. IL-6, artan IL-21 ekspresyonu ile B yardımcı CD4 + T hücrelerinin yeteneklerini arttırarak antikor üretimini indüklemektedir [127].

Önemli erken dönem sinyal proteini ve oldukça hassas immün yanıt belirteci olması nedeniyle TNF- α , immünoreaktivitenin göstergesi olarak kullanılmaktadır [128]. Kitosan kullanılan bir çalışmada, IL-1 β ve IL-6 yanıtının TNF- α kadar hassas olmadığı belirtilmiştir. Kitosanın immünomodülatör etkisinin incelendiği bir çalışmada sitokin salımına neden olduğu fakat aynı zamanda da antiinflamatuvar etki gösteren kitosanın, LPS ile uyarılmış makrofaj hücrelerinde pro-inflamatuvar sitokinlerden TNF- α ve IL-6 sitokinlerinin salımını inhibe ettiği farklı çalışmalarda gösterilmiştir [129, 130]. Çalışmamızda da kitosan tek başına kullanıldığında (jel veya nanopartikül) IL-6 salımına neden olmadığı görülmüştür.

S. Typhi'den elde edilen porinlerin TNF- α ve IL-6 sitokin salımını indüklediği bildirilmiştir. [131, 132]. Çalışmamızda porinlerin kendi başına sitokin salımını uyarıcı olmadığı görülmüştür, ancak kitosan ile kombinasyonu hem TNF- α hem de IL-6 salımına neden olmuştur (Şekil 4.18 ve 4.19).

Kitosan mikrokürelerinin incelendiği bir çalışmada, *B. Bronchiseptica* antijenleri ile yüklenen mikropartiküllerin hücre sel yanıtları incelendiğinde, mikropartiküllerin antijene karşı oluşan TNF- α ve IL-6 salımını arttırdığını gösterilmiştir [133]. Porinlerin kitosan jel IL-6 ve TNF- α salımını uyardığı, ancak nanopartiküllerle uygulanmasında herhangi bir etki gözlenmemiştir.

OVA ve kitosan jelin birlikte uygulanması TNF- α ve IL-6 salınımına önemli derecede artırmıştır. Bu bulgular makrofaj aktivasyonu sonuçlarıyla da örtüşmektedir. OVA ve porin ile birlikte uygulandığında ise TNF- α ve IL-6'in salınımının uyarılmadığı, ancak tek başına OVA ile karşılaştırıldığında, porin ve kitosan jelin birlikte uygulanması, her iki sitokin salınımında artışa neden olmuştur.

Negatif yüklü porinler ile pozitif yüklü kitosan tek başına TNF- α ve IL-6 sitokin salınımına neden olmamıştır fakat kombine kullanımları her iki sitokin de salınımını arttırmaktadır. Bu sonuçlar porin ve kitosan kombinasyonunun makrofaj

aktivasyonunu artırdığını göstermektedir. Hücresel alım çalışmalarında da benzer sonuç elde edilmiştir. Bu kombinasyonun jel ve nanopartikül formunda olması bu etkinin şiddeti üzerinde etkili olduğu yani formülasyon, şekil, yük ve büyüklüğünün önemli olduğu görülmüştür.

5.3 İN VİVO ÇALIŞMALAR

In vivo çalışmalarda, immünize edilen BALB/c farelerde hüморal yanıt (IgG ve IgM) incelenmiştir.

5.3.1 Hüморal İmmün Yanıt

Antijenle ilk karşılaşma, B lenfositlerini aktive etmektedir ve bu hücreler antikor salgılayan plazma hücrelerine farklılaşır. IgM, immün yanıtın başlangıç döneminde ilk üretilen antikordur ve ardından antijene özgü IgG, IgA ve IgE antikorların üretilmesi de humoral immün yanıtı meydana getirir. İmmün yanıtın ilerleyen dönemlerinde, aktive plazma hücreleri, antijene özgü IgG üretirler [12, 134]. Çalışmada geliştirilen adjuvant/taşıyıcı sistemlerle hayvanlar immünize edildikten sonra elde edilen kan örneklerinde IgG ve IgM antikorlar seviyeleri ortaya konmuştur.

Daha önceki çalışmalar, *S. Typhi*'den elde edilen porinlerin, immünizasyon sonrası 5. günden itibaren IgM ve IgG seviyelerini arttırdığı, daha sonra IgM seviyesinin azalmaya başladığı, IgG'nin seviyelerinin ise korunduğu ya da çok hafif bir azalma gösterdiği gösterilmiştir [84, 85, 90]. Çalışmamızda da benzer tarzda porinlerle immünizasyondan sonra 8. günde IgM düzeyinde görülen yükselişin 12. günde azaldığı, ikinci immünizasyondan sonra ise tekrar yükseldiği görülmüştür (Şekil 4.20). IgG seviyelerinde ise 8. günde belirgin bir yükselişle başlayan ve giderek artan düzeyde IgG seviyeleri görülmüştür (Şekil 4.21). Porinler, kitosan ile bir arada uygulandığında, IgM seviyelerinde oldukça yüksek artış kaydedilmiştir, ikinci immünizasyondan sonra ise IgM düzeyi sadece porinle elde edilen düzeye inmiştir. IgG seviyelerinde ise, ikinci immünizasyondan sonra yükselme kaydedilmiştir. Porinlerin, nanopartikül içinde uygulanmasında ile elde edilen IgG ve IgM seviyeleri jel ile karşılaştırıldığında daha düşüktür. Hücresel alım çalışmaları sonuçları, kitosanın porinlerin alımını kolaylaştırdığı ve bunun etkisiyle de in vivo olarak antikor seviyelerini de artırdığı düşünülmektedir. Partiküler ve jel sistemleri arasındaki yük, şekil ve boyut farkları, elde edilen bulgulara ait farklılıkların nedeni olabilir. Kitosan

immünostimülatör etkili adjuvantlar birlikte uygulandığında antijenin etkisini benzer tarzda daha güçlü kılmaktadır. Kitosan ve IL-12'nin beraber uygulandığı bir adjuvant sistemi ile yapılan çalışmada, bu kombine adjuvant sisteminin OVA'ya karşı üretilen antikor seviyelerinden daha yüksek olduğu gösterilmiştir[135].

Model antijen OVA, "kitosan+porinler" ile birlikte verildiğinde IgG ve IgM seviyelerine baktığımızda IgG seviyelerinin özellikle ikinci immünizasyondan sonra arttığı görülmüştür. Kitosanın, özellikle jel formunda etkili olduğu görülmüştür. Lopez-Macias ve ekibi, *S. Typhi* porinleriyle birlikte OVA uygulamasının, IgG seviyelerinin arttırdığı, antikor sınıf değişimi ve affinite maturasyonunu indüklediğini göstermiştir [85, 93]. Farklı bir çalışmada ise OVA, kitosan jel ile birlikte uygulandığında; alum ile benzer şekilde IgG antikor seviyelerinin önemli derecede arttığı bildirilmiştir [136]. Çalışmamızda da OVA ve kitosan jel birlikte uygulamasının IgM seviyelerinde hafif bir artışa neden olduğu, IgG seviyelerinde ise OVA'nın tek başına uygulanmasıyla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu görülmüştür. Kitosan nanopartiküllerin kullanıldığı bir başka çalışmada, OVA IgG yanıtı düşük düzeylerde kalırken, nanopartiküller ile formüle edildiğinde IgG seviyelerinin önemli derecede arttığı gözlenmiştir [137]. Çalışmamızda da OVA, nanopartiküller ile birlikte uygulanması OVA'ya karşı şekillenen hem IgM hem de IgG antikor yanıtını önemli derece yükseltmiştir.

Tez çalışmasının sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde:

Uygun partikül büyüklüğü ve dağılımı, yüzey yükü, yükleme etkinliğine sahip, proteinlerin integritesini koruyan, stabilitesi yeterli düzeyde olan; porinler+kitosan jel (viskozite: 4-7cP, pozitif yüklü) ile porinler+kitosan nanopartiküller formda (240-430 nm, pozitif yüklü, %70-87 yükleme etkinliği) kombine adjuvant/taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Geliştirilen sistemlerin in vitro olarak biyouyumluluğu, hücresel alımı ve makrofaj aktivasyonu incelenmiş olup, hücre canlılığına olumsuz etkisi olmadığı ve tek başına kitosan ve porine göre kombine sistemin hücresel alımının daha yüksek olduğu ve makrofaj aktivitesinin de önemli düzeyde arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, in vivo olarak uygulandığında humoral ve hücresel immün yanıtı belirgin olarak arttırdığı ve ikinci dozdan sonra artan IgG düzeyleri de koruyucu özelliğinin de olabileceğini göstermiştir. Sonuç olarak geliştirilen porinler:kitosan kombine

sistemin altbirim aşıların immün yanıtını arttıran etkili bir adjuvant olduğu gösterilmiştir.

ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçların devamı olarak, geliştirilen adjuvant sisteminin farklı antijenlerle ve farklı uygulama yolları (intradermal, mukozal) etkinliğinin incelenmesinin de önemli olacağına inanıyoruz.

KAYNAKLAR

- [1] P.L. Ogra, H. Faden, R.C. Welliver, Vaccination strategies for mucosal immune responses, *Clin Microbiol Rev*, 14 (2001) 430-445.
- [2] S. Şenel, D.D. Dora, Aşı Tipleri, In: S. Şenel, M.K. Derici (Eds.) Aşı Akademik, Endüstriyel ve Resmi Otorite Yönüyle, Hipokrat Yayınevi, Ankara, 39-44, 2019.
- [3] D. Baxter, Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing, *Occupational Medicine*, 57 (2007) 552-556.
- [4] P.M. Moyle, I. Toth, Modern subunit vaccines: development, components, and research opportunities, *ChemMedChem*, 8 (2013) 360-376.
- [5] C.P. Karch, P. Burkhard, Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies, *Biochem Pharmacol*, 120 (2016) 1-14.
- [6] Y. Burakova, R. Madera, S. McVey, J.R. Schlup, J. Shi, Adjuvants for Animal Vaccines, *Viral Immunology*, 31 (2018) 11-22.
- [7] D.T. O'Hagan, L.R. Friedland, E. Hanon, A.M. Didierlaurent, Towards an evidence based approach for the development of adjuvanted vaccines, *Current Opinion in Immunology*, 47 (2017) 93-102.
- [8] N.M. Valiante, D.T. O'Hagan, J.B. Ulmer, Innate immunity and biodefence vaccines, *Cell Microbiol*, 5 (2003) 755-760.
- [9] P. Ndaya-Oloo, P. Pitisuttithum, N.G. Tornieporth, D. Desgrandchamps, F.M. Munoz, S. Kochhar, J. Buttery, J. Bauwens, J. Bonhoeffer, Vaccine Update: Recent Progress With Novel Vaccines, and New Approaches to Safety Monitoring and Vaccine Shortage, *J Clin Pharmacol*, 58 Suppl 10 (2018) S123-S139.
- [10] V. Vetter, G. Denizer, L.R. Friedland, J. Krishnan, M. Shapiro, Understanding modern-day vaccines: what you need to know, *Annals of Medicine*, 50 (2017) 110-120.
- [11] A.K. Abbas, A.H. Lichtman, Temel immünoloji: İmmün sistemin işlev ve bozuklukları (çev. Y. Camcıoğlu, G. Deniz), Medikal Yayıncılık, İstanbul, 2007.
- [12] A.K. Abbas, A.H. Lichtman, S. Pillai, Cellular and molecular immunology, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007.
- [13] R. Medzhitov, C.A. Janeway, Jr., Innate immunity: impact on the adaptive immune response, *Curr Opin Immunol*, 9 (1997) 4-9.
- [14] C. Pasare, R. Medzhitov, Toll-Like Receptors: Linking Innate and Adaptive Immunity, Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation X, Springer US, 2005, pp. 11-18.
- [15] R. Suresh, D.M. Mosser, Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology, *Adv Physiol Educ*, 37 (2013) 284-291.
- [16] A. Aderem, R.J. Ulevitch, Toll-like receptors in the induction of the innate immune response, *Nature*, 406 (2000) 782-787.

- [17] T. Kawai, S. Akira, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors, *Nat Immunol*, 11 (2010) 373-384.
- [18] R. Medzhitov, Toll-like receptors and innate immunity, *Nat Rev Immunol*, 1 (2001) 135-145.
- [19] S. Şenel, D.D. Dora, Aşı Nasıl Çalışır, In: S. Şenel, M.K. Derici (Eds.) *Aşı Akademik, Endüstriyel ve Resmi Otorite Yönüyle*, Hipokrat Yayınevi, Ankara, 31-37, 2019.
- [20] A.K. Abbas, A.H. Lichtman, S. Pillai, *Cellular and molecular immunology*, 8th ed., Saunders, Philadelphia, 2014.
- [21] A. Iwasaki, R. Medzhitov, Regulation of adaptive immunity by the innate immune system, *Science*, 327 (2010) 291-295.
- [22] A. Batista-Duharte, D.T. Martínez, I.Z. Carlos, Efficacy and safety of immunological adjuvants. Where is the cut-off?, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105 (2018) 616-624.
- [23] A. Di Pasquale, S. Preiss, F. Tavares Da Silva, N. Garçon, Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond, *Vaccines (Basel)*, 3 (2015) 320-343.
- [24] B. Weinberger, Adjuvant strategies to improve vaccination of the elderly population, *Current Opinion in Pharmacology*, 41 (2018) 34-41.
- [25] B. Laupèze, C. Hervé, A. Di Pasquale, F. Tavares Da Silva, Adjuvant Systems for vaccines: 13 years of post-licensure experience in diverse populations have progressed the way adjuvanted vaccine safety is investigated and understood, (2019).
- [26] D.N. Toussi, P. Massari, Immune Adjuvant Effect of Molecularly-defined Toll-Like Receptor Ligands, *Vaccines (Basel)*, 2 (2014) 323-353.
- [27] S.G. Reed, M.T. Orr, C.B. Fox, Key roles of adjuvants in modern vaccines, *Nature Medicine*, 19 (2013) 1597-1608.
- [28] R. Bastola, G. Noh, T. Keum, S. Bashyal, J.-E. Seo, J. Choi, Y. Oh, Y. Cho, S. Lee, Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system, *Archives of Pharmacal Research*, 40 (2017) 1238-1248.
- [29] S.G. Reed, S. Bertholet, R.N. Coler, M. Friede, New horizons in adjuvants for vaccine development, *Trends in Immunology*, 30 (2009) 23-32.
- [30] M.-L. De Temmerman, J. Rejman, J. Demeester, D.J. Irvine, B. Gander, S.C. De Smedt, Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response, *Drug Discovery Today*, 16 (2011) 569-582.
- [31] S. Şenel, Chitosan-Based Particulate Systems for Non-Invasive Vaccine Delivery, *Advances in Polymer Science*, Springer Berlin Heidelberg, 2011, pp. 111-137.
- [32] A.S. McKee, P. Marrack, Old and new adjuvants, *Current opinion in immunology*, 47 (2017) 44-51.
- [33] Y. Perrie, A.R. Mohammed, D.J. Kirby, S.E. McNeil, V.W. Bramwell, Vaccine adjuvant systems: Enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens, *International Journal of Pharmaceutics*, 364 (2008) 272-280.

- [34] N. Garçon, G. Leroux-Roels, W.-F. Cheng, Vaccine adjuvants, Perspectives in Vaccinology, 1 (2011) 89-113.
- [35] R. Seder, S.G. Reed, D. O'Hagan, P. Malyala, U. D'Oro, D. Laera, S. Abrignani, V. Cerundolo, L. Steinman, S. Bertholet, Gaps in knowledge and prospects for research of adjuvanted vaccines, Vaccine, 33 (2015) B40-B43.
- [36] G. Del Giudice, R. Rappuoli, A.M. Didierlaurent, Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines, Seminars in Immunology, 39 (2018) 14-21.
- [37] D.T. O'Hagan, G.S. Ott, G.V. Nest, R. Rappuoli, G.D. Giudice, The history of MF59® adjuvant: a phoenix that arose from the ashes, Expert Review of Vaccines, 12 (2013) 13-30.
- [38] A.M. Didierlaurent, B. Laupèze, A. Di Pasquale, N. Hergli, C. Collignon, N. Garçon, Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines, Expert Review of Vaccines, 16 (2016) 55-63.
- [39] R.P. McGeary, C. Olive, I. Toth, Lipid and carbohydrate based adjuvant/carriers in immunology, J Pept Sci, 9 (2003) 405-418.
- [40] C.D. Skene, P. Sutton, Saponin-adjuvanted particulate vaccines for clinical use, Methods, 40 (2006) 53-59.
- [41] H.-X. Sun, Y. Xie, Y.-P. Ye, Advances in saponin-based adjuvants, Vaccine, 27 (2009) 1787-1796.
- [42] S.R. Bonam, C.D. Partidos, S.K.M. Halmuthur, S. Muller, An Overview of Novel Adjuvants Designed for Improving Vaccine Efficacy, Trends in Pharmacological Sciences, 38 (2017) 771-793.
- [43] S. Şenel, D.D. Dora, Aşı Formülasyonları ve Adjuvantlar, In: S. Şenel, M.K. Derici (Eds.) Aşı Akademik, Endüstriyel ve Resmi Otorite Yönüyle, Hipokrat Yayınevi, Ankara, 47-51, 2019.
- [44] N. Garçon, A. Di Pasquale, From discovery to licensure, the Adjuvant System story, Hum Vaccin Immunother, 13 (2017) 19-33.
- [45] R.N. Lodaya, A.P. Kanitkar, K. Friedrich, D. Henson, R. Yamagata, S. Nuti, C.P. Mallett, S. Bertholet, M.M. Amiji, D.T. O'Hagan, Formulation Design, Optimization and In Vivo Evaluations of an α -Tocopherol-Containing Self-Emulsified Adjuvant System using Inactivated Influenza Vaccine, Journal of Controlled Release, 316 (2019) 12-21.
- [46] T. Rodrigues, D. Reker, P. Schneider, G. Schneider, Counting on natural products for drug design, Nature chemistry, 8 (2016) 531.
- [47] S. Griffin, M.I. Masood, M.J. Nasim, M. Sarfraz, A.P. Ebokaiwe, K.H. Schäfer, C.M. Keck, C. Jacob, Natural Nanoparticles: A Particular Matter Inspired by Nature. LID - 10.3390/antiox7010003 [doi] LID - 3, (2018).
- [48] M. Zhu, G. Wang R Fau - Nie, G. Nie, Applications of nanomaterials as vaccine adjuvants.
- [49] J.K. Patra, G. Das, L.F. Fraceto, E.V.R. Campos, M.d.P. Rodriguez-Torres, L.S. Acosta-Torres, L.A. Diaz-Torres, R. Grillo, M.K. Swamy, S. Sharma, S. Habtemariam, H.-

S. Shin, Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects, *Journal of Nanobiotechnology*, 16 (2018) 71.

[50] F. Farjadian, A. Ghasemi, O. Gohari, A. Roointan, M. Karimi, M.R. Hamblin, Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities, *Nanomedicine (Lond)*, 14 (2019) 93-126.

[51] M. Singh, A. Chakrapani, D. O'Hagan, Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems, *Expert Rev Vaccines*, 6 (2007) 797-808.

[52] F. Lebre, C.H. Hearnden, E.C. Lavelle, Modulation of Immune Responses by Particulate Materials, *Adv Mater*, 28 (2016) 5525-5541.

[53] D.T. O'Hagan, M. Singh, Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems, *Expert Review of Vaccines*, 2 (2014) 269-283.

[54] E.C. Lavelle, D.T. O'Hagan, Delivery systems and adjuvants for oral vaccines, *Expert Opin Drug Deliv*, 3 (2006) 747-762.

[55] R.R. Shah, D.T. O'Hagan, M.M. Amiji, L.A. Brito, The impact of size on particulate vaccine adjuvants, *Nanomedicine (Lond)*, 9 (2014) 2671-2681.

[56] V.B. Joshi, S.M. Geary, A.K. Salem, Biodegradable particles as vaccine delivery systems: size matters, *AAPS J*, 15 (2013) 85-94.

[57] P. Sahdev, L.J. Ochyl, J.J. Moon, Biomaterials for nanoparticle vaccine delivery systems, *Pharmaceutical research*, 31 (2014) 2563-2582.

[58] D.T. O'Hagan, N.M. Valiante, Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants, *Nat Rev Drug Discov*, 2 (2003) 727-735.

[59] S.D. Xiang, A. Scholzen, G. Minigo, C. David, V. Apostolopoulos, P.L. Mottram, M. Plebanski, Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter?, *Methods*, 40 (2006) 1-9.

[60] L. Thiele, H.P. Merkle, E. Walter, *Pharmaceutical Research*, 20 (2003) 221-228.

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

[62] F.A. Sharp, D. Ruane, B. Claass, E. Creagh, J. Harris, P. Malyala, M. Singh, D.T. O'Hagan, V. Pétrilli, J. Tschopp, L.A.J. O'Neill, E.C. Lavelle, Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (2009) 870-875.

[63] S. Şenel, Current status and future of chitosan in drug and vaccine delivery, *Reactive and Functional Polymers*, 147 (2020) 104452.

[64] S. Basa, M. Nampally, T. Honorato, S.N. Das, A.R. Podile, N.E. El Gueddari, B.M. Moerschbacher, The pattern of acetylation defines the priming activity of chitosan tetramers, *Journal of the American Chemical Society*, 142 (2020) 1975-1986.

[65] M.X. Weinhold, J.C.M. Sauvageau, J. Kumirska, J. Thöming, Studies on acetylation patterns of different chitosan preparations, *Carbohydrate polymers*, 78 (2009) 678-684.

- [66] F.C. MacLaughlin, R.J. Mumper, J. Wang, J.M. Tagliaferri, I. Gill, M. Hinchcliffe, A.P. Rolland, Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery, *Journal of controlled release*, 56 (1998) 259-272.
- [67] K. Janes, P. Calvo, M. Alonso, Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules, *Advanced drug delivery reviews*, 47 (2001) 83-97.
- [68] S. Şenel, S.J. McClure, Potential applications of chitosan in veterinary medicine, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56 (2004) 1467-1480.
- [69] J. Kim, Z. Cai, H.S. Lee, G.S. Choi, D.H. Lee, C. Jo, Preparation and characterization of a Bacterial cellulose/Chitosan composite for potential biomedical application, *Journal of Polymer Research*, 18 (2010) 739-744.
- [70] S. Şenel, M.J. Kremer, S. Kaş, P.W. Wertz, A.A. Hıncal, C.A. Squier, Enhancing effect of chitosan on peptide drug delivery across buccal mucosa, *Biomaterials*, 21 (2000) 2067-2071.
- [71] G. Sandri, S. Rossi, F. Ferrari, M.C. Bonferoni, C. Muzzarelli, C. Caramella, Assessment of chitosan derivatives as buccal and vaginal penetration enhancers, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21 (2004) 351-359.
- [72] K. Netsomboon, A. Bernkop-Schnürch, Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 98 (2016) 76-89.
- [73] S. Maxwell, S. Şenel, S.J. McClure, Chitosan for delivery of mucosal vaccines in ruminants, 33rd Annual Meeting&Exposition of the Controlled Release SocietyVienna, austria, 2006.
- [74] B. Sayın, S. Somavarapu, X.W. Li, M. Thanou, D. Sesardic, H.O. Alpar, S. Şenel, Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC) and N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles for non-invasive vaccine delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 363 (2008) 139-148.
- [75] C. Çokçalışkan, F. Özyörük, R.N. Gürsoy, M. Alkan, M. Günbeyaz, H.Ç. Arca, E. Uzunlu, S. Şenel, Chitosan-based systems for intranasal immunization against foot-and-mouth disease, *Pharmaceutical Development and Technology*, 19 (2013) 181-188.
- [76] E.C. Carroll, L. Jin, A. Mori, N. Muñoz-Wolf, E. Oleszycka, H.B.T. Moran, S. Mansouri, C.P. McEntee, E. Lambe, E.M. Agger, P. Andersen, C. Cunningham, P. Hertzog, K.A. Fitzgerald, A.G. Bowie, E.C. Lavelle, The Vaccine Adjuvant Chitosan Promotes Cellular Immunity via DNA Sensor cGAS-STING-Dependent Induction of Type I Interferons, *Immunity*, 44 (2016) 597-608.
- [77] D. Li, D. Fu, H. Kang, G. Rong, Z. Jin, X. Wang, K. Zhao, Advances and Potential Applications of Chitosan Nanoparticles as a Delivery Carrier for the Mucosal Immunity of Vaccine, *Curr Drug Deliv*, 14 (2017) 27-35.
- [78] H.B.T. Moran, J.L. Turley, M. Andersson, E.C. Lavelle, Immunomodulatory properties of chitosan polymers, *Biomaterials*, 184 (2018) 1-9.
- [79] B. Sayın, S. Somavarapu, X.W. Li, D. Sesardic, S. Şenel, O.H. Alpar, TMC–MCC (N-trimethyl chitosan–mono-N-carboxymethyl chitosan) nanocomplexes for mucosal delivery of vaccines, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38 (2009) 362-369.
- [80] M. Galdiero, M.G. Pisciotta, E. Galdiero, C.R. Carratelli, Porins and lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium* regulate the expression of CD80 and CD86 molecules on B

cells and macrophages but not CD28 and CD152 on T cells, *Clinical Microbiology and Infection*, 9 (2003) 1104-1111.

[81] R.E. Hancock, A. Bell, Antibiotic uptake into gram-negative bacteria, *Perspectives in Antiinfective Therapy*, Springer 42-53, 1989.

[82] R.E. Hancock, Role of porins in outer membrane permeability, *Journal of bacteriology*, 169 (1987) 929-933.

[83] R. Koebnik, K.P. Locher, P. Van Gelder, Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell, *Mol Microbiol*, 37 (2000) 239-253.

[84] I. Secundino, C. López-Macías, L. Cervantes-Barragán, C. Gil-Cruz, N. Ríos-Sarabia, R. Pastelin-Palacios, M.A. Villasis-Keever, I. Becker, J.L. Puente, E. Calva, A. Isibasi, Salmonella porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response, *Immunology*, 117 (2006) 59-70.

[85] M.A. Moreno-Eutimio, A. Tenorio-Calvo, R. Pastelin-Palacios, C. Perez-Shibayama, C. Gil-Cruz, R. López-Santiago, I. Baeza, M. Fernández-Mora, L. Bonifaz, A. Isibasi, E. Calva, C. López-Macías, Salmonella Typhi OmpS1 and OmpS2 porins are potent protective immunogens with adjuvant properties, *Immunology*, 139 (2013) 459-471.

[86] F. Blanco, A. Isibasi, C.R. Gonzalez, V. Ortiz, J. Paniagua, C. Arreguin, J. Kumate, Human Cell Mediated Immunity to Porins from Salmonella typhi, *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 25 (1993) 73-80.

[87] R. Pelayo, J. Isibasi A Fau - Paniagua, V. Paniagua J Fau - Ortíz, M. Ortíz V Fau - Muy, C. Muy M Fau - González, F. González C Fau - Blanco, S. Blanco F Fau - Islas, J. Islas S Fau - Kumate, J. Kumate, [Elaboration of an immunosorbent for the purification of porins from Salmonella typhi 9, 12, Vi:d], (1989).

[88] A. Isibasi, V. Ortiz-Navarrete, J. Paniagua, R. Pelayo, C.R. Gonzalez, J.A. Garcia, J. Kumate, Active protection of mice against Salmonella typhi by immunization with strain-specific porins, *Vaccine*, 10 (1992) 811-813.

[89] C.A. MacLennan, J.J. Gilchrist, M.A. Gordon, A.F. Cunningham, M. Cobbold, M. Goodall, R.A. Kingsley, J.J.G. van Oosterhout, C.L. Msefula, W.L. Mandala, D.L. Leyton, J.L. Marshall, E.N. Gondwe, S. Bobat, C. López-Macías, R. Doffinger, I.R. Henderson, E.E. Zijlstra, G. Dougan, M.T. Drayson, I.C.M. MacLennan, M.E. Molyneux, Dysregulated humoral immunity to nontyphoidal Salmonella in HIV-infected African adults, *Science*, 328 (2010) 508-512.

[90] R.M.a. Salazar-González, C. Maldonado-Bernal, N.E. Ramírez-Cruz, N. Rios-Sarabia, J. Beltrán-Nava, J. Castañón-González, N. Castillo-Torres, J.A. Palma-Aguirre, M. Carrera-Camargo, C. López-Macías, A. Isibasi, Induction of cellular immune response and anti-Salmonella enterica serovar typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever, *Immunology Letters*, 93 (2004) 115-122.

[91] C. Perez-Shibayama, C. Gil-Cruz, R. Pastelin-Palacios, L. Cervantes-Barragan, E. Hisaki, Q. Chai, L. Onder, E. Scandella, T. Regen, A. Waisman, A. Isibasi, C. Lopez-Macias, B. Ludewig, IFN- γ -Producing CD4+ T Cells Promote Generation of Protective Germinal Center-Derived IgM+ B Cell Memory against Salmonella Typhi, *The Journal of Immunology*, 192 (2014) 5192-5200.

- [92] L. Cervantes-Barragan, C. Gil-Cruz, R. Pastelin-Palacios, K.S. Lang, A. Isibasi, B. Ludewig, C. Lopez-Macias, TLR2 and TLR4 signaling shapes specific antibody responses to Salmonella typhi antigens, *Eur J Immunol*, 39 (2009) 126-135.
- [93] M. Pérez-Toledo, N. Valero-Pacheco, R. Pastelin-Palacios, C. Gil-Cruz, C. Perez-Shibayama, M.A. Moreno-Eutimio, I. Becker, S.M. Pérez-Tapia, L. Arriaga-Pizano, A.F. Cunningham, A. Isibasi, L.C. Bonifaz, C. López-Macías, Salmonella Typhi Porins OmpC and OmpF Are Potent Adjuvants for T-Dependent and T-Independent Antigens, *Front Immunol*, 8 (2017) 230-230.
- [94] J.M. Carreño, C. Perez-Shibayama, C. Gil-Cruz, A. Printz, R. Pastelin, A. Isibasi, D. Chariatte, Y. Tanoue, C. Lopez-Macias, B. Gander, B. Ludewig, PLGA-microencapsulation protects Salmonella typhi outer membrane proteins from acidic degradation and increases their mucosal immunogenicity, *Vaccine*, 34 (2016) 4263-4269.
- [95] A. Alzubaidi, Z. Alkozai, Immunogenic properties of outer membrane protein of Acinetobacter baumannii that loaded on chitosan nanoparticles, *Am J BioMed*, 3 (2015) 59-74.
- [96] H. Nikaido, E.Y. Rosenberg, Porin channels in Escherichia coli: studies with liposomes reconstituted from purified proteins, *Journal of Bacteriology*, 153 (1983) 241-252.
- [97] P.K.e. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical biochemistry*, 150 (1985) 76-85.
- [98] U. Laemmli, Denaturing (SDS) discontinuous gel electrophoresis, *Nature*, 227 (1970) 680-685.
- [99] N. Dyballa, S. Metzger, Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels, *J Vis Exp*, (2009) 1431.
- [100] P. Calvo, C. RemunanLopez, J.L. VilaJato, M.J. Alonso, Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers, *Journal of Applied Polymer Science*, 63 (1997) 125-132.
- [101] H. Zhu, Propidium Iodide Staining of Cells for FACS Analysis, *Bio-protocol*, 2 (2012) e195.
- [102] W. Yuan, D. Yang, Q. Su, X. Zhu, T. Cao, Y. Sun, Y. Dai, W. Feng, F. Li, Intraperitoneal Administration of Biointerface-Camouflaged Upconversion Nanoparticles for Contrast Enhanced Imaging of Pancreatic Cancer, *Advanced Functional Materials*, 26 (2016) 8631-8642.
- [103] W.T. Golde, P. Gollobin, L.L. Rodriguez, A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet, *Lab Animal*, 34 (2005) 39-43.
- [104] M.F. Bachmann, G.T. Jennings, Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns, *Nature Reviews Immunology*, 10 (2010) 787-796.
- [105] E. Fröhlich, The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles, *Int J Nanomedicine*, 7 (2012) 5577-5591.
- [106] B.P. Arulanandam, J.M. Lynch, D.E. Briles, S. Hollingshead, D.W. Metzger, Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A and interleukin-12 augments antibody-

mediated opsonization and protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection, *Infection and immunity*, 69 (2001) 6718-6724.

[107] Y.-W. Yang, S.-S. Shen, Enhanced antigen delivery via cell death induced by the vaccine adjuvants, *Vaccine*, 25 (2007) 7763-7772.

[108] H. Yue, W. Wei, Z. Yue, P. Lv, L. Wang, G. Ma, Z. Su, Particle size affects the cellular response in macrophages, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41 (2010) 650-657.

[109] A. Verma, D.L. Burns, Improving the stability of recombinant anthrax protective antigen vaccine, *Vaccine*, 36 (2018) 6379-6382.

[110] H.C. Arca, M. Gunbeyaz, S. Senel, Chitosan-based systems for the delivery of vaccine antigens, *Expert Rev Vaccines*, 8 (2009) 937-953.

[111] C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, C. Yin, Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Biomaterials*, 31 (2010) 3657-3666.

[112] M.O. Oyewumi, A. Kumar, Z. Cui, Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses, *Expert review of vaccines*, 9 (2010) 1095-1107.

[113] N. Benne, J. van Duijn, J. Kuiper, W. Jiskoot, B. Slütter, Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines, *Journal of Controlled Release*, 234 (2016) 124-134.

[114] C. Thomas, V. Gupta, F. Ahsan, Particle Size Influences the Immune Response Produced by Hepatitis B Vaccine Formulated in Inhalable Particles, *Pharmaceutical Research*, 27 (2010) 905-919.

[115] J.C. Chow, D.W. Young, D.T. Golenbock, W.J. Christ, F. Gusovsky, Toll-like Receptor-4 Mediates Lipopolysaccharide-induced Signal Transduction, *Journal of Biological Chemistry*, 274 (1999) 10689-10692.

[116] R. Medzhitov, Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System, *Science*, 296 (2002) 298-300.

[117] L.L. Lanier, S. Fallon, C. Somoza, J.H. Phillips, P.S. Linsley, K. Okumura, D. Ito, M. Azuma, CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL, *The Journal of Immunology*, 154 (1995) 97.

[118] S.W. Van Gool, P. Vandenberghe, M.d. Boer, J.L. Ceuppens, CD80, CD86 and CD40 Provide Accessory Signals in a Multiple-Step T-Cell Activation Model, *Immunological Reviews*, 153 (1996) 47-83.

[119] C.F. Anderson, D.M. Mosser, A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage, *Journal of Leukocyte Biology*, 72 (2002) 101-106.

[120] D.A. Zaharoff, C.J. Rogers, K.W. Hance, J. Schlom, J.W. Greiner, Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination, *Vaccine*, 25 (2007) 2085-2094.

- [121] I.M. van der Lubben, J.C. Verhoef, G. Borchard, H.E. Junginger, Chitosan for mucosal vaccination, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52 (2001) 139-144.
- [122] C.A. Fromen, T.B. Rahhal, G.R. Robbins, M.P. Kai, T.W. Shen, J.C. Luft, J.M. DeSimone, Nanoparticle surface charge impacts distribution, uptake and lymph node trafficking by pulmonary antigen-presenting cells, *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 12 (2016) 677-687.
- [123] B. Koppolu, D.A. Zaharoff, The effect of antigen encapsulation in chitosan particles on uptake, activation and presentation by antigen presenting cells, *Biomaterials*, 34 (2013) 2359-2369.
- [124] J.-M. Zhang, J. An, Cytokines, inflammation, and pain, *Int Anesthesiol Clin*, 45 (2007) 27-37.
- [125] S. Gallucci, P. Matzinger, Danger signals: SOS to the immune system, *Current Opinion in Immunology*, 13 (2001) 114-119.
- [126] K. Maeda, H. Mehta, D.A. Drevets, K.M. Coggeshall, IL-6 increases B-cell IgG production in a feed-forward proinflammatory mechanism to skew hematopoiesis and elevate myeloid production, *Blood*, 115 (2010) 4699-4706.
- [127] O. Dienz, S.M. Eaton, J.P. Bond, W. Neveu, D. Moquin, R. Noubade, E.M. Briso, C. Charland, W.J. Leonard, G. Ciliberto, C. Teuscher, L. Haynes, M. Rincon, The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells, *J Exp Med*, 206 (2009) 69-78.
- [128] S. Ravindranathan, B.P. Koppolu, S.G. Smith, D.A. Zaharoff, Effect of Chitosan Properties on Immunoreactivity, *Mar Drugs*, 14 (2016) 91.
- [129] H.J. Yoon, M.E. Moon, H.S. Park, S.Y. Im, Y.H. Kim, Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358 (2007) 954-959.
- [130] P. Ma, H.-T. Liu, P. Wei, Q.-S. Xu, X.-F. Bai, Y.-G. Du, C. Yu, Chitosan oligosaccharides inhibit LPS-induced over-expression of IL-6 and TNF- α in RAW264.7 macrophage cells through blockade of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and PI3K/Akt signaling pathways, *Carbohydrate Polymers*, 84 (2011) 1391-1398.
- [131] F. Galdiero, G.C. de L'ero, N. Benedetto, M. Galdiero, M.A. Tufano, Release of cytokines induced by Salmonella typhimurium porins, *Infection and Immunity*, 61 (1993) 155-161.
- [132] M. Galdiero, M. D'Isanto, M. Vitiello, E. Finamore, L. Peluso, M. Galdiero, Porins from Salmonella enterica serovar Typhimurium induce TNF- α , IL-6 and IL-8 release by CD14-independent and CD11a/CD18-dependent mechanisms, *Microbiology*, 147 (2001) 2697-2704.
- [133] H.-L. Jiang, M.L. Kang, J.-S. Quan, S.G. Kang, T. Akaike, H.S. Yoo, C.-S. Cho, The potential of mannosylated chitosan microspheres to target macrophage mannose receptors in an adjuvant-delivery system for intranasal immunization, *Biomaterials*, 29 (2008) 1931-1939.
- [134] M. Boes, Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses, *Molecular Immunology*, 37 (2000) 1141-1149.

[135] M.J. Heffernan, D.A. Zaharoff, J.K. Fallon, J. Schlom, J.W. Greiner, In vivo efficacy of a chitosan/IL-12 adjuvant system for protein-based vaccines, *Biomaterials*, 32 (2011) 926-932.

[136] S. Gordon, A. Saupe, W. McBurney, T. Rades, S. Hook, Comparison of chitosan nanoparticles and chitosan hydrogels for vaccine delivery, *J Pharm Pharmacol*, 60 (2008) 1591-1600.

[137] Z.-S. Wen, Y.-L. Xu, X.-T. Zou, Z.-R. Xu, Chitosan nanoparticles act as an adjuvant to promote both Th1 and Th2 immune responses induced by ovalbumin in mice, *Mar Drugs*, 9 (2011) 1038-1055.

EKLER

TEZ ÇALIŞMASINDAN ÇIKAN YAYIN VE BİLDİRİLER

Yayın:

1. Yüksel, S., Pekcan, M., Puralı, N., Esendağlı, G., Tavukçuoğlu, E., Rivero-Arredondo, V., Ontiveros-Padilla, L., López-Macías, C., Şenel, S. 2020. "Development and in vitro evaluation of a new adjuvant system containing Salmonella Typhi porins and chitosan. " International Journal of Pharmaceutics, 578, 119129.

Bildiriler

1. Yüksel, S., Pekcan, M., Ozkul, A., Puralı, N., Gundogan, E., Erdogan, S., Rivero-Arredondo, V., Ontiveros-Padilla, L., López-Macías, Şenel, S. "Development of a novel formulation for mucosal delivery based on chitosan and Salmonella typhi outer membrane proteins", CRS Annual Meeting and Exposition, 22-24 Temmuz 2018, New York, U.S.A (**Poster**)
2. Yüksel, S., Pekcan, M., Özkul, A., Puralı, N., Esendağlı, G., Tavukçuoğlu, E., Erdoğan, S., Rivero-Arredondo, V., Ontiveros-Padilla, L., López-Macías, C., Şenel, S. "In Vitro Evaluation of Porin Encapsulated Chitosan Nanosystems for Mucosal Vaccine Delivery", AAPS PharmSci 360, 4-7 Kasım 2018, Washington, USA (**Poster**)
3. Yüksel, S., Pekcan, M. Özkul, A., Puralı, N., Esendağlı, G., Tavukçuoğlu, E., Rivero-Arredondo, V., Ontiveros-Padilla, L., López-Macías, C., Şenel, S. "In Vitro Activation of Murine Macrophages by Adjuvant System Composed Of Chitosan And Porins." EUFEPS Annual Meeting 2019, 6-8 Mart 2019, Frankfurt, Germany (**Oral presentation**)
4. Ontiveros-Padilla, L., Yüksel, S., Rivero-Arredondo, V., Pekcan, M. Özkul, A., Puralı, N., Bonifaz, L., Şenel, S., López-Macías, C. "Activation of Dendritic Cells by an Adjuvant System Composed of Chitosan and Porins " CRS Annual Meeting, 21-24 Temmuz 2019, Valencia, Spain (**Poster**)
5. Yüksel, S., Pekcan, M., Türkmen, E., Özkul, A., Puralı, N., Rivero-Arredondo, V., Ontiveros-Padilla, L., López-Macías, C., Şenel, S. In vivo studies on enhancement of immune responses by porins-chitosan adjuvant system. 8th BBBB, Çeşme, İzmir, Turkey, 2019. (**Poster**)

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm



ELSEVIER



Development and in vitro evaluation of a new adjuvant system containing *Salmonella Typhi* porins and chitosan

Selin Yüksel^a, Mert Pekcan^b, Nuhân Purallı^c, Güneş Esen dağlı^d, Ece Tavukçuoğ lu^d,
Vanessa Rivero-Arredondo^e, Luis Ontiveros-Pailla^e, Constantino López-Macías^{e,*}, Sevdâ Şenel^{a,*}

^a Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey

^b Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Ankara University, Dışkapı, 06110 Ankara, Turkey

^c Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey

^d Department of Basic Oncology, Hacettepe University Cancer Institute, Ankara, Turkey

^e Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Chitosan
Porins
Adjuvant
Vaccine
Nanoparticles
Microparticles

ABSTRACT

In order to improve the immunogenicity of the highly purified vaccine antigens, addition of an adjuvant to formulation, without affecting the safety of the vaccine, has been the key aim of the vaccine formulators. In recent years, adjuvants which are composed of a delivery system and immunopotentiators have been preferred to induce potent immune responses. In this study, we have combined *Salmonella Typhi* porins and chitosan to develop a new adjuvant system to enhance the immunogenicity of the highly purified antigens. Cationic gels, microparticle (1.69 ± 0.01 µm) and nanoparticles (337.7 ± 1.7 nm) based on chitosan were prepared with high loading efficiency of porins. Cellular uptake was examined by confocal laser scanning microscopy, and the macrophage activation was investigated by measuring the surface marker as well as the cytokine release in vitro in J774A.1 macrophage murine cells. Porins alone were not taken up by the macrophage cells whereas in combination with chitosan a significant uptake was obtained. Porins-chitosan combination systems were found to induce CD80, CD86 and MHC-II expressions at different levels by different formulations depending on the particle size. Similarly, TNF-α and IL-6 levels were found to increase with porins-chitosan combination. Our results demonstrated that combination of porins with chitosan as a particulate system exerts enhanced adjuvant effect, suggesting a promising adjuvant system for subunit vaccines with combined immunostimulating activity.



DEVELOPMENT OF A NOVEL FORMULATION FOR MUCOSAL VACCINE DELIVERY BASED ON CHITOSAN AND *SALMONELLA TYPHI* OUTER MEMBRANE PROTEINS

Yüksel S¹, Pekcan M², Özkul A², Puralı N³, Erdoğan S⁴, Rivero-Arredondo V⁵, Ontiveros-Padilla L⁵, López-Macias C⁵, Şenel S¹

¹Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, 06100-Ankara, Turkey

²Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Ankara University, 06110 Ankara, Turkey

³Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey

⁴Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Radiopharmacy, 06100-Ankara, Turkey

⁵Medical Research Unit on Immunochemistry, Specialities Hospital, National Medical Centre "Siglo XXI", Mexican Social Security Institute (IMSS), Mexico City, Mexico

INTRODUCTION

Vaccine delivery/adjuvant systems are important to present the antigen efficiently to mucosal immune system at the development of mucosal vaccines. Chitosan, which is a biodegradable, bioadhesive cationic biopolymer is reported to be very promising both as an adjuvant and delivery system (1). Salmonella Typhi porins have been shown to be potent protective immunogens with adjuvant properties for T-dependent and T-independent antigens (2). In this study, the porins were incorporated into chitosan aqueous dispersions and micro and nanoparticles as an efficient adjuvant system, and characterized in vitro.

METHODS

Chitosan (Protasan UP CI213, Novamatrix) was used for the formulations. The porins were purified from *S. typhi* 9,12, VI: d ATCC 9993. SDS-PAGE analysis was performed to study the integrity of the porins.

Preparation of Formulations

Chitosan aqueous dispersion was prepared in distilled water at 0.5 % w/v concentration. Porin was added to dispersion at 1:1 volume ratio.

Chitosan microparticles were prepared using spray drying method. Glutaraldehyde was used as cross-linker. Porins (1 mg/mL) were loaded by incubation after preparing microparticles.

Chitosan nanoparticles were prepared by ionic gelation method (3). Porins (1 mg/mL) were loaded during preparation.

Characterization of Formulations

Bioadhesive property of chitosan aqueous dispersion was measured in Texture analyser (TA-XT Plus model, Stable Micro Systems, UK). The loading efficacy was determined measuring the unloaded porin in the supernatant, using the BCA method. The particle size and zeta potential of the particles were measured. Surface morphology of microparticles and nanoparticles were examined under scanning electron microscopy and transmission electron microscopy.

Cellular uptake

J774A.1 (ATCC® TIB-67™) murine macrophage cells were used. Cells were labelled with Vybrant Dil. Biotinylated porins incorporated into chitosan aqueous dispersion was inoculated onto the cells and incubated for 24 h. After fixation, permeabilization and blocking procedures, the cells were treated with 0,1 µg/mL Streptavidin-Alexa Fluor 488 to allow conjugation with biotin.

RESULTS

Porin-loaded chitosan based aqueous dispersions, microparticles with 1 to 5 µm particle size and nanoparticles with 330 to 370 nm were successfully developed (Figs 1 and 2). The integrity of the porins was found to remain unchanged when combined with chitosan (Fig 3). The bioadhesion of chitosan was not affected when combined with porins (Fig 3). In absence of porins, zeta potential of the formulations was found to be positive. With porin loading, the zeta potential of the microparticles became negative whereas with nanoparticles it remained positive. Loading efficacy for both systems was between 54 to 60 % (Table 1). Porins+chitosan was shown to be taken up by the cells (Fig 5).

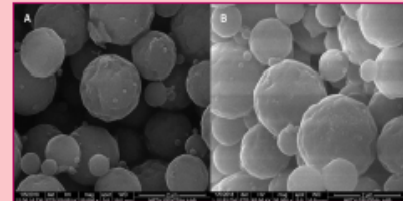


Fig 1. SEM micrographs of microparticles: A. Blank microparticles; and B. Porins+microparticles

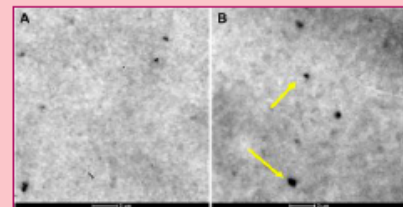


Fig 2. TEM micrographs of nanoparticles: A. Blank nanoparticles; B. porins loaded nanoparticles

Table 1. Properties of micro- and nanoparticles

Formulations	Particle Size±S.D	Zeta Potential ±S.D. (mV)	PDI±S.D.	SPAN ±S.D.	Loading efficacy ±S.D.
Blank nanoparticle	366,4±4,8 nm	47,96±3,5	0,203±0,012	-	-
Porins+nanoarticle	337,7±1,7 nm	30,7±0,72	0,287±0,02	-	%59,5±0,2
Blank microparticle	1,3 ±0,1 µm	27,20±0,7	-	3,18±0,02	-
Porins+microparticle	4,8±0,01 µm	-11,10±0,2	-	1,49±0,006	%53,98±0,5

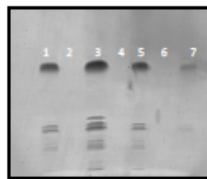


Fig 3. SDS-Page patterns of formulations
1. Porins
2. Chitosan Aqueous Dispersion
3. Porins in Chitosan aqueous dispersion
4. Blank Nanoparticle
5. Porins+Nanoparticle
6. Blank microparticle
7. Porins+Microparticle

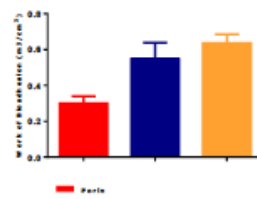


Fig 4. Bioadhesion measurements

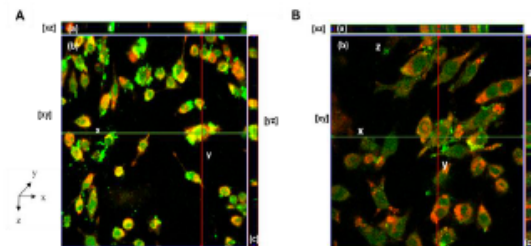


Fig 5. 3D confocal images of cellular uptake of porins (A) and porins+chitosan aqueous dispersion (B) by J774A.1 murine macrophage cells

CONCLUSIONS

Chitosan based microparticles and nanoparticles incorporated with porins were developed successfully and it was demonstrated in vitro that they are taken up by the macrophage cells.

Acknowledgements:

This project is a bilateral collaboration supported by TÜBİTAK-Turkey (SBAG- 215S995) awarded to SŞ and CONACYT-Mexico Project: SRE-CONACYT 263683 awarded to CL-M.

References:

- 1.B Sayın, S Somavavara, XW Li, M Thanou, D Sesardic, HO Alpar, S Şenel, Int. J. Pharm., 2008, 363, 139-148.
- 2.M Pérez-Toledo, N Valero-Pacheco, R Pastelin-Palacios, C Gil-Cruz, C Perez-Shibayama, M A. Moreno-Eutímio, I Becker, S M Pérez-Tapia, L Arriaga-Pizano, A F. Cunningham, A Isibasi, L C. Bonifaz, C López-Macias, Front Immunol. 2017 Mar 9;8:230. doi: 10.3389/fimmu.2017.00230. eCollection 2017.
- 3.M Günbeyaz, A Faraçlı, A Özkul, N Puralı, S Şenel, Eur.J.Pharm.Sci, 2010, 41, 531-545.

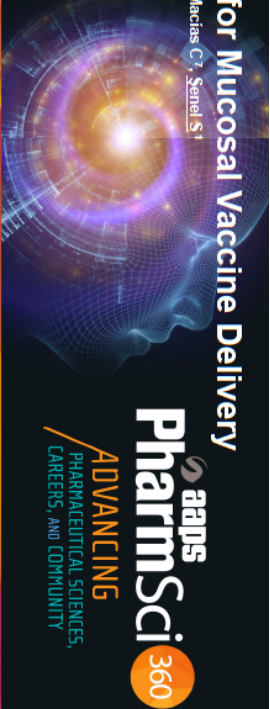
W1130-
09-069

In Vitro Evaluation of Porin Encapsulated Chitosan Nanosystems for Mucosal Vaccine Delivery

Yüksel S¹, Pekcan M², Özkal A³, Puralı N⁴, Esenatlaglı G⁵, Tavukçuoğlu E⁵, Erdogan S⁶, Rivero-Arredondo V⁷, Ontiveros-Padilla L⁷, Lopez-Macias C⁷, Senel S¹

¹Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara, Turkey
²Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Ankara, Turkey
³Yildirim University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Ankara, Turkey
⁴Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Ankara, Turkey
⁵Hacettepe University, Institute of Oncology, Department of Basic Oncology, Ankara, Turkey
⁶Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Radiopharmacy, Ankara, Turkey
⁷Medical Research Unit on Immunochimistry, Specialties Hospital, National Medical Centre "Siglo XXI", Mexican Social Security Institute (IMSS), Mexico City, Mexico

CONTACT INFORMATION: ssenel@hacettepe.edu.tr



aaps
PharmSci 360
 ADVANCING
 PHARMACEUTICAL SCIENCES,
 CAREERS, AND COMMUNITY

PURPOSE

Vaccines containing pure antigens instead of whole pathogens, and alternative administration routes require the use of potent adjuvants and effective antigen delivery systems. Particulate systems have been successfully applied to provide improved protection and to facilitate transport of the antigen, and consequently more effective antigen recognition by the immune cells, which resulted in enhanced immune responses were obtained. Chitosan is a cationic polysaccharide derived from the partial deacetylation of chitin, which is obtained predominantly from crustaceans and has been widely investigated both as an adjuvant and antigen delivery system (1). It is commercially available with different molecular weight, degree of deacetylation and solubility properties, and consequently, exerts different biochemical and physical characteristics. Chitosan is capable of driving potent cell-mediated immunity, and recently mechanisms by which it acts was demonstrated to be engaging the STING-cGAS pathway to trigger innate and adaptive immune responses (2). From the formulation point of view, chitosan-based particulate systems offer advantages over other polymers used by avoiding the harsh conditions of heat and/or organic solvents for encapsulation of the antigen and also providing opportunity to engineer antigen-specific adjuvant/delivery systems with desired particle size (3). The outer-membrane proteins from *Salmonella*, known as porins, as potent immunogens with intrinsic adjuvant properties, which have been shown in vitro and in vivo to increase the immunogenicity and protective capacity of several vaccine antigens (4). In this study, we have combined chitosan and porins as a nanoparticulate adjuvant/delivery system and evaluated the cell viability and the macrophage activation in vitro in J774A.1 murine macrophage cells.

RESULTS

Chitosan (Chi Nanop) and porins loaded chitosan nanoparticles (Porins+Chi Nanop) with a particle size between 366.4±4.8 to 337.7±1.7 and positive surface charge were obtained (Fig 1, Table 1). Surface charge was observed to decrease after porin-loading. The cell viability of the J774A.1 murine macrophage cells was found to be over 80% (Fig 2). A decrease in viability of the cells was observed with nanoparticle formulations when compared to that with porins alone (94.5±0.9). No significant difference was observed between chitosan (Chi Nanop) (95.1±5.0) and porin-loaded (Chi Nanop) (83.5±3.3) nanoparticles (p>0.0001). Macrophage activation was observed with porins, chitosan nanoparticles (Chi Nanop) and porins loaded chitosan nanoparticles (Porins+Chi Nanop) (fig3). For the surface markers CD80, MHC-II and F4/80, the levels of the macrophage activation were found to be higher when porins were encapsulated in chitosan nanoparticles. For CD86, no significant difference was obtained between porins alone and chitosan nanoparticles.

Formulations	Particle Size (nm) ±S.D.	PDI±S.D.	Zeta Potential (mV) ±S.D.	Loading Efficacy±S.D.
Chi Nanop	366,4±4,8	0,203±0,012	47,96±3,5	-
Porins+Chi Nanop	337,7±1,7	0,287±0,02	30,7±0,72	86,5±4,7

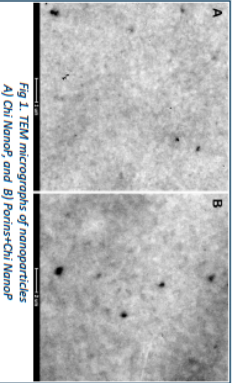


Fig 1. TEM micrographs of nanoparticles A) Chi Nanop, and B) Porins+Chi Nanop

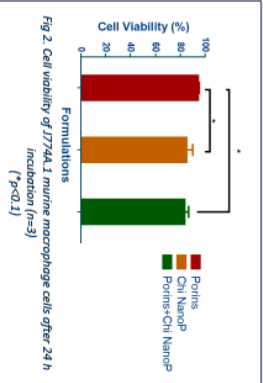


Fig 2. Cell Viability of J774A.1 murine macrophage cells after 24 h incubation (n=3) (*p<0.1)

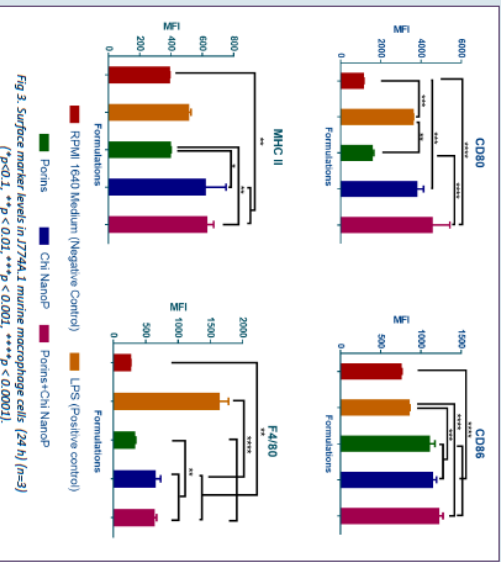


Fig 3. Surface marker levels in J774A.1 murine macrophage cells (24h) (n=3) (*p<0.1, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

METHODS

The porins were purified from *Salmonella typhi* 9.12. Vt. dATCC 9893. All batches were found to be negative with a detection limit of 0.2 µg LPS/µg protein (5). The purified porins were stored in SDS solution (0.08 %). Water-soluble chitosan (Proxscan UP C213, Novamatrix, Norway) based nanoparticles containing 1 µg/ml porins were prepared using the ionic gelation method (6). Porins were incorporated into chitosan aqueous dispersion before addition of tripolyphosphate.

Zeta potential and particle size of nanoparticles was measured by Malvern Zetasizer Nano ZS. J774A.1 murine macrophage cell line (ATCC® TIB-67™) was used in in vitro studies. Cell viability of formulations was evaluated by means of flow cytometry using propidium iodide (PI). For evaluation of macrophage activation, specific fluorescently labeled antibodies were used to recognize the cell surface markers, Alexa Fluor 647 anti-Mouse I-Ad Antibody clone for MHC II, FITC anti-Mouse F4/80 Antibody, clone, for F4/80, PE-Cy7 antimouse CD80 Antibody clone for CD80, and PE antimouse CD86 Antibody for CD86. The mean fluorescence intensity (MFI) of cell surface markers after 24h incubation with formulations was measured using flow cytometry. The RPMI medium was the negative control, and LPS was the positive control. 1µg/ml porins in RPMI 1640 medium was also applied.

GRANT

This project was carried out through bilateral collaboration supported by TÜBİTAK-TURKEY (SBAĞ-215S969) awarded to SS and Conacyt-Mexico project: SRE-CONACYT 2636683 awarded to C.L.M.

REFERENCES

1. Arca, H.A., Guibez, M., Senel, S. Expert Rev. Vaccines 8(7), 937-953, 2009.
2. Carroll, E. C. et al., Immunology, 44(3), 597-608, 2016.
3. Senel, S. Chitosan-based Particulate Systems For Non-invasive Vaccine Delivery, Adv Polym Sci 243, 111-138, 2011.
4. Pérez-Toledo, M. et al., Front. Immunol. 8:230. Doi: 10.3389/fimmu.2017.00230
5. Ishaq, A. et al., Infect. And Immun., 56(11), 2853-2959, 1988.
6. Sayin, B. et al., Int.J. Pharm. 363, 139-148, 2008.



This study was supported by Gaz University Scientific Research Project Foundation (Project No. 022017-14).

[1] Guada M et al., Reformulating cyclosporine A (CsA): More than just a life cycle management strategy. *Journal of Controlled Release*, 2016, 225: 260-282.

[2] Gulbagel et al., Top down production of cyclosporine A nanosuspensions: Formulation design and characterization for oral delivery. *EUFEPS Annual Meeting 2018: Crossing Barriers for Future Medicines*, 24-26 May 2018, CP-06.

POS.51

FP.06

Flurbiprofen nanosuspension based gel systems: Wet milling assisted production of nanosuspensions for dermal application

Ayse Nur OKTAY, Sibel ILBA SMIS-TAMER, Nevin CELEBI

Gaz University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara/TURKEY

The main objective of this study was to produce and evaluate the Flurbiprofen (FB) nanosuspension (NS) based gel systems for dermal application. For this purpose, FB-NSs were prepared using wet milling process and optimized with Design of Experiment. The optimum FB-NS formulated in different gel systems and their suitability for dermal application were evaluated by means of pH and viscosity measurements, texture profile analysis and in-vitro and ex-vivo permeation studies. FB-NSs were prepared using wet milling process with Plantacare® 2000 (PL) as a stabilizer and the optimum formulation was determined with 33 full factorial design. While independent variables were selected as bead size, bead volume, milling time; dependent variables were selected as particle size (PS), polydispersity index (PDI) and zeta potential (ZP) values (1). Scanning electron microscopy (SEM), Differential scanning calorimetry (DSC), X-ray powder diffraction (XRPD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) analysis were employed to characterize FB-NS. The solubility studies also performed for the optimum formulation. Then HPMC K100 LV (5%), polycarboxyl (5%), oleogel, chitosan (2%) gel systems were prepared by incorporating FB-NS with gel matrix (2). The prepared gel systems were inspected visually on the basis of color, homogeneity, phase separation of gel systems. The pH and viscosity were measured for each gel systems. Moreover, the texture profile analysis was performed to evaluate mechanical properties (hardness, compressibility, adhesiveness, cohesiveness, springiness) of gel systems. Then the in-vitro and ex-vivo permeation studies were performed at 37 °C during 40 h using dialysis membrane and dorsal rat skin, respectively also retained amount of FB in skin at 40h were determined.

FB-NSs were successfully prepared by means of wet milling process and the PS, PDI and ZP values of optimum formulations were found 237.7 ± 6.8 nm, 0.133 ± 0.030 and -30.4 ± 0.7 mV, respectively. By means of wet milling process, the spherical shapes having homogeneous particle size distribution occurred on the SEM images. The DSC thermograms of the physical mixture showed that there was no incompatibility between PL and FB and no polymorphic change of FB was observed while preparing the nanosuspensions. XRPD results showed the lyophilization or the wet milling processes did not influence the crystalline state of FB. The size reduction from coarse FB powder to nanosized crystals increased the FB water solubility about 7-fold with wet milling process. After performing characterization studies, different gel systems for this optimum FB-NS were successfully prepared. The physical appearance of the FB-NSs prepared in the carrier gels, the homogeneity, phase separation and the color characteristic were investigated. Gels with homogeneous appearance were obtained. The pH measurements showed, while the pH of the gel systems prepared with HPMC was close to neutral pH. The results of viscosity measurements, all gel systems showed pseudoplastic flow. On the basis of the texture profile analysis, the lowest hardness and compressibility values were observed in the HPMC gel. Permeation studies showed that % permeated amount of FB via HPMC based gel systems were found similar to the FB-NS through the dialysis membrane and was achieved to reach 100 % at the end of 24 hours. The flux value observed for HPMC gel formulation was higher than the other gel systems and retained amount of FB in the skin for HPMC-NS gel system was found highest level.

As a conclusion, FB-NS based gel systems were successfully prepared and the results shows that HPMC have advantages to obtain more suitable gel systems for dermal applications of FB-NS.

Acknowledgement This study was supported by TUBITAK (Project No: 117S149).

References

1. Oktay A.N, Karakucuk A., Ibasmi-Tamer S., Celbi N., Optimization of Dermal Flurbiprofen Nanosuspension using Design of Experiment (DoE): Development by Wet Milling. *AAPS PharmSci 360 Advancing Pharmaceutical Sciences, Carriers and Communities 4-T* Nov 2018, Washington D.C / USA
2. Oktay A.N, Ibasmi-Tamer S., Karakucuk A., Celbi N., Evaluation of Dermal Permeation of Flurbiprofen-Nanosuspension Based Gel Systems. *19th International Pharmaceutical Technology Symposium-PTS 2018*, 17-19 Sept 2018, Antalya- Belek/TURKEY.

POS.52

FP.07

In vitro Activation of Murine Macrophages by Adjuvant System composed of Chitosan and Porins

Yükef S1; Pekcan M2; Özkul A3; Puralı N4; Esendağlı G5;

Tavukçuoğlu E5; Rivero-Arredondo V6; Ontiveros-Padilla L6; López-

Macías C6 Şenel S1

1 Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, 06100-Ankara, Turkey

2 Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, 06110, Dışkapı, Ankara, Turkey

3 Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, 06110-Ankara, Turkey

4 Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, 06100-Ankara, Turkey

5 Hacettepe University, Institute of Oncology, Department of Basic Oncology, 06100-Ankara, Turkey

6 Medical Research Unit on Immunochimistry, Specialties Hospital, National Medical Centre "Siglo XXI", Mexican Social Security Institute (IMSS), Mexico City, Mexico

Adjuvants are important components for vaccine development for infectious and non-communicable diseases. Chitosan has been investigated as adjuvant/delivery system for vaccines [1]. Porins, which are the outer membrane proteins obtained from Gram negative bacteria have been shown to have adjuvant activity on experimental antigens against several pathogens [2]. In our previous study, we have prepared and characterized chitosan microparticles combined with porins, which were purified from *Salmonella typhi* 9,12, Vi, as an adjuvant system [3]. Microparticles were prepared using water-soluble chitosan (Protas UP C1213, Novamatrix, Norway). Porins were incorporated into microparticles by incubation. J774A.1 murine macrophage cell line (ATCC® TIB-67™) was used in all vitro studies. Cellular uptake of the microparticles were shown by confocal microscopy using biotinylated porins. Cell viability of the microparticles was evaluated by dye exclusion method using propidium iodide (PI). For evaluation of macrophage activation, specific fluorescently labeled antibodies were used to recognize the cell surface markers: Alexa Fluor 647 anti-Mouse I-Ad Antibody clone for MHCII; FITC anti-Mouse F4/80 Antibody, clone, for F4/80; PE-Cy7 antimouse CD80 Antibody clone for CD80; and PE antimouse CD86 Antibody for CD86. The mean fluorescence intensity (MFI) of cell surface molecules after 24 h incubation with formulations was measured using flow cytometry. The microparticles were observed to be efficiently uptaken by macrophage cells. The cell viability was found to be over 60 % and was decreased with the increasing concentration of porins. Both blank chitosan microparticles and porins loaded microparticles were found to induce the macrophage activation. For CD80, CD86 and F4/80 surface markers no significant difference was found between the formulations. MHC II expressions on macrophages increased with porins+chitosan microparticles when compared to that of porins and blank chitosan microparticles. Our results suggest that porins+chitosan combination in microparticle form can activate macrophages and increase antigen presentation, resulting in an enhanced immune response.

Acknowledgments This project is a bilateral collaboration supported by TUBITAK-Turkey (SBAG-215599) awarded to ŞŞ and CONACYT-Mexico Project: SRE-CONACYT 263683 awarded to CLM.

References

1. Arza, H.C., M. Garbeyss, and S. Şenel. *Expert Rev Vaccines*, 2009, 8(7): p. 937-93.
2. Perez-Toledo, M., et al., *Front Immunol*, 2017, 8: p. 230

P-86

IN VIVO STUDIES ON ENHANCEMENT OF IMMUNE RESPONSES BY PORINS-CHITOSAN ADJUVANT SYSTEM

SELİN YÜKSEL¹, MERT PEKCAN², ECE TÜRKMEN¹, AYKUT ÖZKUL³, NUHAN PURALI⁴,
VANESSA RIVERO-ARREDONDO⁵, LOUIS ONTIVEROS-PADILLA⁵,
CONSTANTINO LÓPEZ-MACÍAS⁵, SEVDA ŞENEL¹

¹ HACETTEPE UNIVERSITY, FACULTY OF PHARMACY, DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY, 06100, ANKARA-TURKEY

² ANKARA UNIVERSITY, FACULTY OF VETERINARY MEDICINE, DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY, ANKARA-TURKEY

³ ANKARA UNIVERSITY, FACULTY OF VETERINARY, MEDICINE DEPARTMENT OF VIROLOGY, ANKARA-TURKEY

⁴ HACETTEPE UNIVERSITY, FACULTY OF MEDICINE, DEPARTMENT OF BIOPHYSICS, 06100, ANKARA-TURKEY

⁵ MEDICAL RESEARCH UNIT ON IMMUNOCHEMISTRY, SPECIALTIES HOSPITAL, NATIONAL MEDICAL CENTRE "SIGLO XXI", MEXICAN SOCIAL SECURITY INSTITUTE (IMSS), MEXICO CITY, MEXICO

1. INTRODUCTION

Subunit vaccines do not contain live components of the pathogen; therefore, they are safer, however their immunogenicity is lower. Hence, presence of an adjuvant is required to enhance the immune responses. Particulate systems are widely applied as carrier systems to present the antigen to the immune system. Chitosan has been used both as a delivery system and immunostimulator [1-3]. On the other hand, the outer membrane proteins (OMPs, porins) of gram-negative bacteria have been shown to exert adjuvant effect against various pathogens [4]. In our previous studies, we have developed chitosan-porins based microparticles and studied their adjuvant properties *In Vitro*. [5]. In this study, we present the *in vivo* studies performed on our combined adjuvant system with model antigen in animal model.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Water soluble chitosan, Protasan UP Cl 213 was purchased from NovaMatrix (Norway). Endotoxin free ovalbumin, EndoFit Ovalbumin was purchased from InvivoGen (Toulouse, France). IgG (Goat anti-mouse IgG (H+L)) and IgM (Goat anti-Mouse IgM (Heavy chain) Secondary Antibody, HRP) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA).

2.2. Preparation of Formulations

Chitosan microparticles were prepared by spray drying method (Buchi B-290 Mini Spray Dryer) [2] and porins (purified from *Salmonella typhi* 9,12, Vi: d ATCC 9993) were incorporated into microparticles during spray drying. OVA loaded microparticles were prepared by incubation method.

2.3. Immunization

Thirty female, 6-10 weeks old BALB/c mice were divided into six groups (n=5). Mice were immunized intraperitoneally at day 0 and day 15. Physiological saline solution was used as control. Administration volume was 100 µL. All animal care and experimental protocols were approved by Animal Experimentations Local Ethics Board (protocol no: 2015/75-14).

2.4. Determination of humoral immune responses

On 0, 8, 12 and 30 days the animals were bled by submandibular route. Levels of anti-OVA IgG and IgM was determined by ELISA [4]. 96-well plates were coated with OVA. The plates were washed with PBS+Tween 20 and were blocked with PBS+milk powder. Plates were incubated with collected serums. IgG and IgM antibodies were added to plates. Unbound conjugate was removed by washing with PBS+Tween 20 and enzyme activity was determined by o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD). The absorbance was read at 492 nm on an ELISA reader.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Positive surface charged spherical chitosan microparticles with a smooth surface were obtained (Table 1).

POSTER PRESENTATIONS

Table 1. Properties of chitosan microparticles

Formulations	Particle Size (mm)	Zeta Potential (mV)
Chi MicroP	1.30±0.01	33.5±1.6
OVA+Chi MicroP	5.93±0.03	8.67±0.2
OVA+Porins+Chi MicroP	2.49±0.03	19.87±0.2

Anti-OVA IgM Antibodies

B-cells create IgM antibodies as a first line of humoral immune response. Our results showed that IgM levels was increased on day 8 after immunization (Fig. 1). When OVA was applied with porins and chitosan microparticle, the increase in IgM levels was found to be higher compared to OVA alone.

Anti-OVA IgG Antibodies

IgG antibodies represent a late-phase response to the antigen and provide long-term immunity to that antigen. A significant increase in IgG levels was observed on day 30 when OVA was administered with combination of porins and chitosan microparticles (Fig. 2).

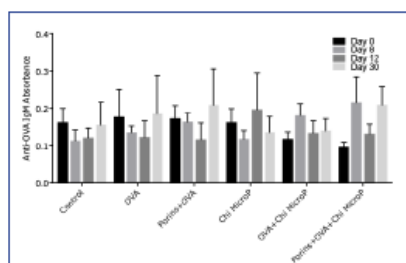


Figure 1. Anti-OVA IgM levels after immunization

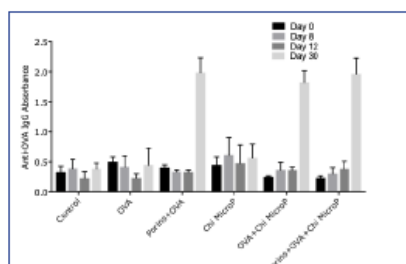


Figure 2. Anti-OVA IgG levels after immunization

4. CONCLUSION

Humoral immune response which is known as antibody-mediated immunity generates antibodies to neutralizing antigen, causing lysis or phagocytosis of antigen and provide long-term memory to antigen. IgM is the first immunoglobulin class produced in a primary response to an antigen, then IgG enables long-term immunity to produce immune memory. IgM antibodies are relatively short lived, disappearing earlier than IgG. Our combined adjuvant system provides high levels of IgM in the early stage and high levels of IgG in the advanced stage of immunization in the immune response to OVA. These results demonstrate that porins+chitosan systems can be a promising adjuvant system for vaccine antigens.

5. REFERENCES

- Sayin, B., Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC) and N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles for non-invasive vaccine delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 2008. 363(1-2): p. 139-148.
- Günbeyaz, M., et al., Chitosan based delivery systems for mucosal immunization against bovine herpesvirus 1 (BHV-1), *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010. 41(3-4): p.531-545.
- Şenel, S., Chitosan-Based Particulate Systems for Non-Invasive Vaccine Delivery, *Advance in Polymer Science*, 2011. 243: p.111-38.
- Perez-Toledo, M., et al., Salmonella Typhi Porins OmpC and OmpF Are Potent Adjuvants for T-Dependent and T-Independent Antigens, 2017. 8: p. 230.
- Yüksel, S., et al., *In Vitro* Activation of Murine Macrophages by Adjuvant System Composed Of Chitosan And Porins, in: *EUFEPS Annual Meeting 2019*, Frankfurt am Main, Germany, 2019.

Acknowledgment

This project is a bilateral collaboration supported by TÜBİTAK-Turkey (SBAG- 215S995) awarded to SŞ and CONACYT-Mexico (SRE-CONACYT 263683) awarded to CL-M.

