

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALÜMİNYUM ADJUVANLI AŞILARDA FOLATIN İMMÜNOLOJİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ecz. Ali Mert SENCER

Aşı Çalışmaları Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2022

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALÜMİNYUM ADJUVANLI AŞILARDA FOLATIN İMMÜNOLOJİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ecz. Ali Mert SENCER

Aşı Çalışmaları Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI

İKİNCİ DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Güneş DİNÇ AKBULUT

ANKARA
2022

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ALÜMİNYUM ADJUVANLI AŞILARDA FOLATIN İMMÜNOLojİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Öğrenci: Ali Mert Sencer

Danışman: Prof. Dr. Güneş Esendağlı

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Güneş Dinç Akbulut

Bu tez çalışması 05.09.2022 tarihinde jürimiz tarafından "Aşı Çalışmaları Programı"nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	<i>Prof. Dr. Vedat Bulut</i> <i>(Gazi Üniversitesi)</i>	<i>(imza)</i>
Tez Danışmanı:	<i>Prof.Dr. Güneş Esendağlı</i> <i>(Hacettepe Üniversitesi)</i>	<i>(imza)</i>
Üye:	<i>Prof. Dr. Deniz Nazire Çağdaş Ayvaz</i> <i>(Hacettepe Üniversitesi)</i>	<i>(imza)</i>
Üye:	<i>Doç. Dr. Semra Aydın</i> <i>(Hacettepe Üniversitesi)</i>	<i>(imza)</i>
Üye:	<i>Doç. Dr. Neşe Ünver</i> <i>(Hacettepe Üniversitesi)</i>	<i>(imza)</i>

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

30/09/2022

(İmza)

Ali Mert SENCER

i

ⁱ“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından** karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI ve Dr. Öğr. Üyesi Güneş DİNÇ AKBULUT danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

(İmza)
Ecz. Ali Mert SENCER

TEŞEKKÜR

İmmünoloji alanında yetişmem için sunduğu engin bilgisi, geniş imkanları, renkli bilim hayatı, uzun mesai ve hiçbir zaman tükenmeyen güveni için tez danışmanım, değerli Hocam Prof. Dr. Güneş Esendağlı' ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca hem teorik hem pratik tüm çalışmalarımda hiçbir zaman beni yalnız bırakmayan, eğlenceli kişiliğiyle ikinci danışmanım, Hocam sevgili Dr. Öğr. Üyesi Güneş Dinç Akbulut' a ve yüksek lisansım boyunca tüm güzel ve zorlu zamanlarımda yanımdan hiçbir zaman ayrılmayan, içten desteklerini her zaman karşılıksız sunan sevgili Uzm. Biol. Sibel Gökşen' e birlikte yaşadığımız tüm güzellikler için teşekkür ederim.

Tezim çalışmalarımındaki vazgeçilmez destekleri için Dr. Ece Tavukçuoğlu, Öğr. Gör. Dr. Süleyman Can Öztürk, Anıl Işık, Hatice Toprak Doğramacı, Mubaida Parveen, Gözde Bilir, Sefa Özdemir, Öğr. Gör. Dr. Nazire Pınar Acar Özen ve tüm Esendağlı Lab. ailesine çok teşekkür ederim. Tüm tez çalışmalarına ev sahipliği yapan Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, öğrencilerine, idari personeline ve deneylerimde sunduğu katkılar için Dr. Emre Gedik' e teşekkürlerimi sunarım.

Bütün eğitim hayatım boyunca, hiçbir desteği esirgemeyen, tüm istediklerimi bir an için sorgulamadan gerçekleştiren güzel aileme, 26 yıllık sonsuz emekleri ve sevgileri için minnetlerimi sunarım.

ÖZET

Sencer A.M., Alüminyum Adjuvanlı Aşılarda Folatın İmmünolojik Etkilerinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Aşı Çalışmaları Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Alüminyum adjuvanlı aşılarda, günümüzde kullanılan aşı ürünleri arasında geniş bir grubu oluşturmaktadır. Kas içine enjeksiyon yoluyla uygulanan alüminyum adjuvanlı aşı ürünlerinde, adjuvan içeriğiyle en uzun süre ve yüksek düzeyde etkileşim gösteren hücre grubunun aktive makrofajlar olduğu gözlemlenmektedir. Alüminyum adjuvanla idame edilen inflamatuvar mikroçevrede aktive olan makrofajlar, hem proinflamatuvar sitokin üretimleriyle hem de efektör T hücre uyarımını destekleyebilecek ko-stimülatör molekülleri ve antijen sunumuyla edinsel immün yanıtın gelişiminde katkı sağlamaktadır. Aktivasyonlarıyla birlikte ise, makrofaj hücrelerinde folat reseptör 2 aracılı folat alımının arttığı bilinmektedir. Bu tez çalışmasında geliştirilen in vitro modelde, J774.A1 monosit/makrofaj hücre hattı, düşük veya yüksek folat seviyelerinde, tek başına veya uyarımla birlikte, artan konsantrasyonlarda alüminyum adjuvanlı model aşı ürününe maruz bırakılmıştır. Böylece; canlılık, folat reseptör 2 ifadesi, morfoloji, makrofajlarla ilişkili yüzey belirteci ve proinflamatuvar gen ifadeleri, fonksiyonel yanıtlardaki değişimlere folatın etkisi değerlendirilmiştir. Uyarımla indüklenen aktivasyonla birlikte alüminyum adjuvan içeriği, genel olarak makrofaj yanıtlarını desteklemiştir. Folat ise uyarım yokluğunda bu yanıtları destekleyici, aktivasyonla ise azaltıcı yönde bir etki göstermiştir. Sonuç olarak, folat yolağının düzenleyici etkisi altında gerçekleşen makrofaj aktivasyonunun alüminyum adjuvan yanıtını değiştirebildiği ortaya koyulmuştur; bu sayede, aşı etkililiğinin artırılmasına yönelik bilgiler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Folat, aşı, adjuvan, alum, makrofaj.

ABSTRACT

Sencer A.M., Investigation of the immunological effects of folate in aluminum adjuvanted vaccines, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Vaccinology Program Master Thesis, Ankara, 2022. Aluminum adjuvanted vaccines (AAV) are one of the most extensive product groups, among others. Activated macrophages are the main cell population in the injection site. They interact with the aluminum adjuvant for the most extended time and at the highest intensity. Thereby, macrophages may contribute to the development of adaptive immune responses through proinflammatory cytokine production, improved co-stimulation, and antigen presentation to T cells. Enhanced folate receptor-2 mediated folate uptake is one of the explicit features of activated macrophages. In this thesis study, the J774.A1 monocyte/macrophage cell line was exposed to the model AAV product at increasing concentrations, alone or with stimulation, at low or high folate levels. Thus, the effects of folate on viability, folate receptor-2 expression, morphology, surface marker, and proinflammatory gene expressions, functional responses were evaluated. AAV content generally supported stimulation-induced macrophage responses. On the other hand, folate showed a supportive effect in the absence of stimulation and a reducing effect with activation. It has been revealed that macrophage activation under the modulatory effects of the folate pathway can change the AAV responses. This way, new pieces of information that may contribute to the AAV effectiveness were obtained.

Key Words: Folate, vaccine, adjuvant, alum, macrophage.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Aşılar ve Bağışıklama	4
2.2. Aşı İmmünolojisi	6
2.2.1 Aşıyla Gelişen Doğal İmmün Sistem Yanıtları	6
2.2.2 Aşıyla Gelişen T Lenfosit Yanıtları	10
2.2.3 Aşıyla Gelişen B Lenfosit Yanıtları	13
2.3. Antijenler ve Aşı Türleri	15
2.2.1 Canlı Atenüe Aşılar	16
2.2.2 İnaktif Tam Hücre Aşılar	17
2.2.3 Protein Bazlı Fraksiyonel Aşılar	18
2.3. Aşı Adjuvanları	22
2.3.1 Alüminyum Adjuvanlar	24

2.3.2 Emülsiyon Adjuvanlar	28
2.3.3 Toll Benzeri Reseptör Agonisti Adjuvanlar	29
2.3.3 Lipozom Adjuvanlar	30
2.4. Folat ve Folat Reseptörleri	31
3. GEREÇ ve YÖNTEM	33
3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler	33
3.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	34
3.3. Hücre Kültürü	35
3.3.1 J774.A1 Fare Monosit/Makrofaj Hücre Hattının Çözülmesi, Pasajlanması ve Dondurulması	35
3.3.1 Hücre Sayımı	37
3.4. In vitro Analizler İçin Deney Tasarımının Oluşturulması	38
3.4.1 MTT Hücre Canlılık Analizi	38
3.4.2 Propidyum İyodür Hücre Canlılık Analizi	38
3.4.3. Hücrelerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi	40
3.4.4. Alüminyum Adjuvanın Hücresel Alımının İncelenmesi	41
3.5. Monosit/Makrofaj Hücrelerinin Aktivasyon ve Matürasyonunun İncelenmesi	41
3.5.1. İmmüfenotipleme	41
3.5.2. İmmünofloresan	42
3.5.2. Moleküler Teknikler	43
3.5.1. Fonksiyonel Analizler	49
3.6. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	51
4. BULGULAR	53

4.1. Alüminyum Adjuvanlı Aşının Hücre Canlılığına Etkisi	53
4.2. Monosit/Makrofaj Hücrelerinde FOLR2 İfadesi	55
4.3. Monosit/Makrofaj Hücrelerinin Alüminyum Adjuvanlı Aşıyla Etkileşiminin Araştırılması	58
4.4. Alüminyum Adjuvanlı Aşı uygulamasının Makrofaj Aktivasyon ve Matürasyonuna Etkisi	61
4.5. Makrofaj Fonksiyonlarıyla İlişkili Gen İfadesine Alüminyum Adjuvanlı Aşı Uygulamasının Etkisi	66
4.6. Makrofaj Fonksiyonel Yanıtlarına İlişkili Alüminyum Adjuvanlı Aşı Uygulamasının Etkisi	69
5. Tartışma	72
5.1. Alüminyum Adjuvanlı Aşı Uygulamasının LPS Uyarımıyla Birlikte Hücre Canlılığına Etkisi	74
5.2. Alüminyum Adjuvanlı Aşı Uygulamasında FOLR2 Düzeyleri	74
5.3. Monosit/Makrofaj Hücrelerinin Alüminyum Adjuvanlı Aşılarla Etkileşimi	75
5.4. Alüminyum Adjuvanlı Aşılarla Karşı Gelişen Makrofaj Yanıtları	76
5.5. Alüminyum Adjuvanlı Aşılarda Makrofaj Yanıtlarına Folatın Etkisi	80
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	86
7. KAYNAKLAR	89
8. EKLER	95
EK 1. Tez çalışması orijinallik raporu	95
EK 2. Dijital Makbuz	96
9. ÖZGEÇMİŞ	97

SİMGELER ve KISALTMALAR

5m-THF	5-metil tetrahidrofolat
AH	Alüminyum hidroksit
AP	Alüminyum fosfat
AS	Alüminyum sülfat
ASH	Antijen sunan hücre
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guerin</i>
CCL	C-C motifli kemokin ligandı
CCR2	C-C motifli kemokin ligandı reseptörü
CD	Başkalaşım kümesi
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CpG	Sitozin-fosfo-guanin
DAF2DA	4,5-diaminofloresan diasetat
DAMP	Hasarla ilişkili moleküler paternler
DHF	Dihidrofolat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FOLR	Folat reseptör
FSC	<i>Forward scattered</i>
H2DCFDA	Karboksi-diklorodihidrofloresan diasetat
HPV	İnsan papilloma virüsü
IFN	İnterferon
Ig	İmmüoglobulin
IL	İnterlökin
IRF	İnterferon regüle edici faktör
IRIV	immüno-potent rekonstitüe influenza virozomu
i.m.	intramüsküler
LPS	Lipopolisakkarit
MAF	Makrofaj aktive edici faktör
MHC	Majör doku uyumluluk kompleksi

MPL	Monofosforil lipit A
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NF-KB	Nükleer faktör kappa B
NLRP3	Nod benzeri reseptör proteini 3
NO	Nitrik oksit
OFY	Ortanca floresan yoğunluğu
PAMP	Patojenle ilişkili moleküler paternler
PCFT	Proton bağımlı folat kanalı
PI	Propidyum iyodür
PMA	Forbol miristat asetat
PRR	Patern tanıma reseptörü
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RFC	İndirgenmiş folat kanalı
ROS	Reaktif oksiten türleri
SSC-A	<i>Side Scatter-Area</i>
Tc	Sitotoksik T lenfosit
Td	Alüminyum adjuvanlı tetanoz difteri aşısı
Tfh	T foliküler yardımcı hücre
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü- β
Th	Yardımcı T lenfosit
TLR	Toll benzeri reseptör
TNF-α	Tümör nekroz faktörü-α
VLP	Virüs benzeri partikül

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1	Hücresinin farklı kompartmanlarındaki patern tanıma reseptörleri. Doğal immün sistem hücreleri değişik kompartmanlardan farklı tehlike sinyallerini toplayabilen özelleşmiş reseptör türlerine sahiptir.	8
2.2	Bazı patern tanıma reseptörlerine ilişkin sinyal yolları. Farklı türlerdeki PAMPs, hücrede kendilerine özgü sinyal yollarını uyarırlar.	9
2.3	Aşıyla edinsel immün yanıtların gelişimi süreci.	15
2.4	Üstünlükleri ve sakıncaları yönünden aşı türleri.	19
2.5	Alüminyum adjuvanlar için önerilen etki mekanizmaları.	22
3.1	Fuchs-Rosental kamerasının şematik görünümü.	37
3.2	Akım sitometrisi analizleri için kapılama stratejisi.	40
4.1	Alüminyum adjuvanlı aşının, hücre canlılığına etkisinin incelenmesi. A) J774.A1 hücrelerinin, 1.8 µM folat içeren standart kültür ortamında, farklı konsantrasyonlardaki Td aşısıyla inkübasyonu sonrası MTT canlılık analizi sonuçları (n≥3). Her bir zaman noktası (24, 48 ve 72 saat) için kontrol koşuluna göre normalizasyonla göreceli yüzde canlılık hesaplanmıştır. Düşük veya yüksek folat içeren ortamda LPS (250 ng/mL) ile uyarılmış ve kontrol (uyarılmamış) J774.A1 hücrelerinin Td aşısıyla; 48 saat inkübasyon sonrası, (B) propidyum iyodür (PI) canlılık analizi (n≥5) ve (C) temsili nokta saçılım grafikleri (I) ile gösterilmiştir.	54
4.2	In vitro ortamda FOLR2 ekspresyon düzeylerinin araştırılması. J774.A1 hücrelerinde, 1.8 µM folat içeren kültür ortamında LPS (1 µg/mL) uyarımıyla; zamana bağlı (A) hücrelerin yüzde pozitifliği (n≥3), (B) ifade düzeyleri değişimi (n≥3) ve (C) temsili histogram gösterimi; (D) 24 saat inkübasyon sonrası intrasellüler immüno Floresan görüntülemesi. (Ölçek = 10 µm). E) 1.8 µM folat içeren kültür ortamında LPS (250 ng/mL) uyarımıyla gerçek-zamanlı PZR analizinde zamana bağlı transkript düzeylerinin rölatif değişimi (n≥2).	56
4.2	(Devamı) Düşük veya yüksek folat içeren ortamda LPS (250 ng/mL) ile uyarılmış ve kontrol (uyarılmamış) J774.A1 hücrelerinin Td aşısıyla; 48 saat inkübasyon sonrası (F) hücrelerin yüzde pozitifliği (n≥3), (G) ifade düzeyleri değişimi (n≥3) ve (H) temsili histogram gösterimi; (I) 24 saat inkübasyon sonrası transkript düzeylerinin göreceli değişimi (n=2). Düşük	

- folat içeren uyarım yapılmamış koşul normalizasyonda referans örnek kabul edilmiştir. 57
- 4.3** Alüminyum adjuvanlı aşının monosit/makrofaj hücreleri ile etkileşim düzeyinin araştırılması. Düşük veya yüksek folat içeren ortamda LPS (250 ng/mL) ile uyarılmış ve uyarılmamış J774.A1 hücrelerinin Td aşısıyla; 48 saat inkübasyon sonrası, (A) hücrelerin ters ışık mikroskobu görüntülemeleri (75x büyütme), (B) SSC-A OFY (ortanca floresan yoğunluğu) değerleri değişimi ($n \geq 4$) ve (C) temsili histogram gösterimi. 60
- 4.3** (Devamı) 24 inkübasyon sonrası Al^{+3} içeriğinin lumogallion reaktifi ile boyanmasıyla hücrelerdeki alüminyum adjuvan (D) yüzde pozitifliği ($n \geq 3$), (E) yoğunluğu ($n \geq 3$), (H) temsili histogram gösterimi ve 48 saat inkübasyon sonrası hücrelerdeki alüminyum adjuvan (F) yüzde pozitifliği ($n \geq 3$), (G) yoğunluğu ($n \geq 3$), (I) temsili histogram gösterimi. 61
- 4.4** Alüminyum adjuvanlı aşı uygulamasının makrofaj akitvasyon ve matürasyon belirteçleri yönünden incelenmesi. Düşük veya yüksek folat içeren ortamda LPS (250 ng/mL) ile uyarılmış ve uyarılmamış J774.A1 hücrelerinin Td aşısıyla 48 saat inkübasyon sonrası CD11b (A), F4/80 (C), CD206 (E), MHC-II (G), CD40 (I) yüzey belirteci ifadeleri ($n \geq 3$) ve temsili histogram gösterimleri (B, D, F, H, I; sırasıyla). 63
- 4.4** (Devamı) CD80 (J), CD86 (L), CD69 (N), CD62L (Ö) yüzey belirteci ifadeleri ($n \geq 3$) ve temsili histogram gösterimleri (K, M, O; sırasıyla). 64
- 4.5** Alüminyum adjuvanlı aşı uygulamasının makrofaj fonksiyonlarıyla ilişkili gen ifadeleri yönünden incelenmesi. Düşük veya yüksek folat içeren ortamda LPS (250 ng/mL) ile uyarılmış ve uyarılmamış J774.A1 hücrelerinin Td aşısıyla 24 saat inkübasyonu sonrası gerçek-zamanlı PZR analizinde; (A) Il1b, (B) Il18, (C) Tnf, (D) Il6, Ccl5 (E) gen transkript düzeylerinin göreceli değişimi ($n=2$). Düşük folat içeren uyarım yapılmamış koşul normalizasyonda referans örnek kabul edilmiştir. F) Her bir koşulun yüksek folat varlığında rölatif transkript düzeylerinin değişimi. Her gen için $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri üzerinden her bir uygulamanın yüksek folat içeren koşulu düşük folat içerene göre normalize edilmiştir. 68
- 4.6** Alüminyum adjuvanlı aşı uygulamasının makrofaj fonksiyonları üzerine etkilerinin araştırılması. Düşük veya yüksek folat içeren ortamda LPS (250 ng/mL) ile uyarılmış ve uyarılmamış J774.A1 hücrelerinin Td aşısıyla; 48 saat inkübasyonu sonrası lateks boncuk fagositozu (A) yüzde pozitifliği ($n \geq 3$), (B) her bir uygulamanın yüksek folat varlığında düşük folat içeren koşula 71

göre fagositoz aktivitesi yüzde değişimi ($n \geq 3$), (C) temsili histogram gösterimleri ve (D) yüksek folat varlığındaki uygulamalar için fagosit edilmif lateks boncuk görüntülemeleri; 3 saat inkübasyonu sonrası her bir uygulamanın yüksek folat varlığında düşük folat içeren koşula göre (e) ROS ve (G) NO retim kapasitesi yüzde değişimi ($n \geq 3$), temsili histogram gösterimleri (F, H sırasıyla).

- 5.1** J774.A1 hücrelerinin alüminyum adjuvanlı aşıyla geliştirdiği yanıtla LPS uyarımının ve folat seviyesinin etkisinin genel zeti.

TABLolar

Tablo		Sayfa
2.1	Aşıyla önlenabilir hastalıklara ilişkin örnekler.	5
2.2	Günümüzde klinik kullanımı devam eden aşı türleri.	16
2.3	Buldukları aşı ürünlerine göre adjuvan örnekleri.	24
3.1	Deneylerde kullanılan antikolar.	34
3.2	In vitro analizler için deney tasarımı.	39
3.3	PZR analizlerinde kullanılan primerlere ilişkin bilgiler.	46
3.4	PZR reaksiyonu bileşenleri.	47
3.5	Gradyan PZR protokolü.	47
3.6	Gerçek-zamanlı PZR reaksiyon bileşenleri.	48
3.7	Gerçek-zamanlı PZR protokolü.	49

1. GİRİŞ

Aşılar bireyde, hastalık etkenine karşı özgün bir koruyucu immün yanıtın gelişmesini sağlayan, biyolojik tıbbi ürünlerdir (1, 2). İmmün sistemin, aşı ürünündeki antijenleri tanımasıyla, etkene karşı edinsel immün yanıt oluşmaktadır. Aşı ürünün gelişiminde tercih edilen antijenik yapı, aynı zamanda aşının türünü belirlemektedir. Aşı türleri, bakteriyel ve viral canlı aşılar, inaktif tam hücre ve virion aşılar, saf ve konjuge polisakarit aşılar, protein bazlı toksoid ve alt birim aşılar, mRNA aşıları ve vektör aşılar olarak sınıflandırılabilir (3-8). Mikroorganizmanın canlı atenué veya inaktive biçimde tamamını içeren aşılarından farklı olarak protein bazlı fraksiyonel aşılar, immün sistemin koruyuculukla doğrudan ilişkili nötralizan antikor yanıtlarını en güçlü biçimde uyarabilen antijenik yapılar, aşı ürünü terkibine girmektedir (5, 6, 9). Bu aşılar, mikroorganizmanın doğal immün sistemi uyarırken reaktogeniteye neden olabilen PAMP (patojenle ilişkili moleküler paternler, *pathogen associated molecular patterns*) yapılarının, saflaştırma süreçleriyle uzaklaştırılması sayesinde, aşıyla ilişkili yan etki riski azalmaktadır (5, 6, 9, 10). Diğer taraftan, PAMP yapılarından yoksun olmaları sebebiyle aşının potansiyel etkinliği azalabilmektedir (5, 6, 9-11). Bu nedenle, yeterli immünojeniteyi sağlamak için aşı terkibine adjuvanlar dahil edilmektedir (3).

Adjuvanlar, aşılanan kişide daha güçlü ve uzun süren bir bağışıklık yanıtının oluşmasına yardımcı olan, fakat kendi başlarına immünojen olmayan bileşenlerdir (12, 13). Adjuvanlar sayesinde; antijene karşı gelişen antikor yanıtları artırılabilir, primer immünizasyon sonrasındaki rapel (tekrar) dozlarının azaltılması sağlanabilir, immünsüprese hastalardaki yanıtlar iyileştirilebilir, immün yanıtın süresi uzatılabilir, hücresel immün yanıtlar desteklenebilir ve üründeki antijen miktarının azaltılması sağlanabilir (12). Adjuvanlar bu etkilerini, doğrudan (PAMPs) veya dolaylı yoldan (hasarla ilişkili moleküler paternler, DAMPs) ürettikleri tehlike sinyalleri sayesinde, enjeksiyon bölgesinde lökosit infiltrasyonunun artmasıyla, lokal inflamatuvar mikroçevrenin oluşumunu sağlayarak gösterirler (14-18). Sitokin üretiminin ve lenf noduna matür antijen sunan hücre göçünün artmasıyla birlikte edinsel immün yanıtın

gelişimini desteklerler (12, 19-22). Alüminyum tuzları, 1930' lu yıllardan günümüze aşılarda en yaygın kullanılan adjuvanlardır (13, 23). Alüminyum adjuvanlar, doğal immün sistem üzerinde DAMP etkinliği göstererek, immün yanıtları destekleyen proinflamatuvar sinyallerin üretiminin artmasına yol açmaktadır (11-13, 23-25). Aşılarda kullanılan alüminyum tuzları; alüminyum hidroksit, alüminyum fosfat, alüminyum sülfat veya bu tuzların kombine edilmiş halleridir (26).

Aşı ürünlerinin neredeyse tamamına yakını iskelet kası içine (i.m.) enjeksiyon yoluyla uygulanmaktadır. Bu yolla uygulandığında aşı bileşenleriyle, en fazla doğal immün sistem hücreleri etkileşim halinde olmaktadır (10, 11, 15, 23, 27). Aşının uygulanmasını takiben, iskelet kası dokusuna yoğun miktarlarda miyeloid hücre infiltrasyonu gerçekleşmektedir (27-29). Aşı enjeksiyonunun erken dönemlerinden edinsel immün yanıtların gelişimine kadar, lokal inflamasyon alanında aşı bileşenleriyle çoğunlukla dendritik hücreler, monositler ve en yüksek düzeyde de makrofajlar etkileşim içindedir (14, 16, 18). Lezyonunda, aşı bileşenleriyle (özellikle adjuvanlarla) etkileşimlerini sürdürmeye devam eden makrofajlar, idame ettikleri lokal inflamasyon alanında, işledikleri antijenleri MHC-II yolağıyla sunmaktadır (9, 18). Bu sayede makrofajlar, aktivasyonlarını takiben aşı ile indüklenmiş inflamasyon alanına göç eden efektör T lenfositlere antijen, ko-stimülasyon sinyali verebilmekte ve bu sayede efektör hafıza gelişimini güçlendirebilmektedir (27, 30, 31). Aynı zamanda yüksek sitokin üretme kapasiteleri sayesinde makrofajlar; parakrin etki ile ortamdaki diğer antijen sunan hücre popülasyonlarını ve T lenfositleri, endokrin etki ile lenfatiklerde göç etmekte olan antijen sunan hücreleri ve lenf nodundaki edinsel immün sistem aktivasyonunu destekleyebilmektedir (22, 31, 32). Bahsedilen fonksiyonları nedeniyle makrofajlar, edinsel immüntenin önemli bir destekleyicisi olarak kabul görmektedir (31).

Alüminyum adjuvan içeriğiyle lezyonda idame edilen inflamatuvar mikroçevre sayesinde, makrofaj hücreleri aktivasyonlarında ilerlerler (22, 28, 30, 31, 33). Makrofaj aktivasyonu, zamana ve ortam koşullarına göre son derece yüksek plastisiteyle ilerleyen ve devamlılık gösteren bir süreçtir (34). Aşıyla indüklenmiş

inflamasyon bölgesine infiltre olan makrofajlarda çoğunlukla, inflamatuvar özellikteki klasik makrofaj aktivasyonu karakteri baskın durumdadır (14, 17, 27, 34). Aktivasyonlarını takiben ise makrofajlarda folat alımı, hücrelerin metabolik faaliyetlerindeki artışa bağlı olarak artmaktadır (35, 36).

Folat (folik asit, vitamin B9) ve aktif metabolitleri 5-metil tetrahidrofolat dihidrofolat ve tetrahidrofolat hücrelerde; tek karbon reaksiyonlarında, nükleik asit sentezinde, epigenetik düzenlemelerde görev alan esansiyel bir vitamindir (36). Aktive makrofajlardaki artan folat ihtiyacının önemli biyolojik beliteçlerinden biri ise FOLR- β (FOLR2) alt tipidir (35-39). Günümüzde, akut ve kronik inflamasyonda makrofaj fonksiyonlarında folatların ve FOLR2' nin rolü üzerine çalışmalar her geçen gün artmaktayken aşı immünobiyojisi açısından öneminin değerlendirilmesine yönelik yaklaşımlar henüz raporlanmamıştır.

Bu tez kapsamında, J774.A1 monosit/makrofaj hücre hattıyla geliştirilen *in vitro* modellerde alüminyum adjuvanlı aşılar karşı gelişen makrofaj yanıtlarının, uzaysal ve zamansal olarak değişken doğasıyla birlikte incelenmesi amaçlanmıştır. Ortamda yüksek ve düşük folat seviyeleri varlığında; monosit/makrofaj karakterini birlikte taşıyan veya LPS (gram negatif bakteri lipopolisakkariti) uyanımı ile aktive makrofaj karakteri kazanan hücreler, artan konsantrasyonda alüminyum hidroksit adjuvanlı tetanoz difteri aşısına maruz bırakılmıştır. Böylece, aşı lezyonuna; infiltrasyon süresince veya erişebilirlik düzeyince artan alüminyum adjuvanlı aşı maruziyeti ve proinflamatuvar uyarımların birlikte modellenmesi hedeflenmiştir. Bu sayede, makrofajların alüminyum adjuvanlı aşılar karşı gelişen değişken özellikteki yanıtlarına folatın etkisi, uzaysal ve zamansal derinlikte değerlendirilebilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aşılar ve Bağışıklama

Aşılar, bireyin hastalık etkeniyle karşılaşmadan, güvenli bir şekilde, etkene karşı koruyucu immün yanıt geliştirmesini sağlayan biyolojik tıbbi ürünlerdir (1, 2). Aşılama temel olarak, bireysel düzeyde, kişinin edinsel immün sisteminin ilgili hastalık etkenini özgün olarak tanımasını ve koruyucu yanıt oluşturmasını amaçlar. Kişi, aşıyla kazanılmış bağışıklık sayesinde ilgili hastalıktan hedeflenen düzeyde korunurken, hastalığın bulaşıcılığının azalmasıyla birlikte toplumdaki yayılma düzeyi de düşmektedir. Böylece toplumsal bağışıklığın oluşmasıyla koruyuculuk daha da artabilmektedir (33). Aşıyla elde edilen koruyuculuk klinik araştırmalarla; enfeksiyondan korunma, ağır hastalıktan korunma veya hastaneye yatışta azalma gibi farklı klinik sonuçlarla ölçülebilmekte olup hastalıklar arasında farklılık gösterebilmektedir (2). Aşılar, halihazırda var olan veya yeni gelişen enfeksiyon hastalıklarından korunmada en etkili tıbbi ürünlerden biri olarak görülmektedir (9).

Bir aşı ürünüde immün sistemin özgün yanıt geliştirmesini sağlayan aktif bileşen (etkin madde) antijendir. Ürün formülasyonunda tercih edilen antijenik yapı aynı zamanda aşının türünü belirlemektedir. Antijenler; mikroorganizmanın tamamından, belirli parçalarından, mikroorganizmanın salgıladığı ürünlerden veya bu yapıların biyoteknolojik yöntemlerle üretilmiş analoglarından oluşabilmektedir (1) (2). İmmün yanıt çoğunlukla protein yapıdaki antijenlere karşı gelişirken; pnömokok, meningokok ve Haemophilus influenza tip b gibi bazı bakterilerin kapsüler polisakkarit yapıları da antijenik olarak hedeflenebilmektedir (2).

Bağışıklama, antibiyotik tedavileriyle birlikte, insanlık tarihinin en önemli tıbbi girişimlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Aşı ve antibiyotiklerin icadı öncesi özellikle enfeksiyon hastalıkları nedeniyle bireylerin beklenen ortalama yaşam süresi 50 yaş altında seyretmekteyken günümüzde ise 70 yaş üstü olarak hesaplanmaktadır (10, 40). 1960' lı yıllarda dünya genelinde çok sayıda ülkede ulusal bağışıklama programlarının başlamasıyla birlikte aşılar, halk sağlığını geniş ölçekte iyileştirmeye

başlamıştır (2). DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü [World Health Organization]) tahminlerine göre bağışıklama programları sayesinde her sene aşıyla önlenbilir hastalıklarla ilişkili 3.5-5 milyon ölüm önlenilmektedir (41). DSÖ' nün aşıyla önlenbilir hastalıklara ilişkin listelediği örnekler Tablo 2.1.' de gösterilmiştir. Edward Jenner tarafından raporlanan 1798 yılındaki ilk bağışıklama çalışmalarından günümüze kadar geliştirilen aşilar sayesinde çok sayıda bulaşıcı hastalık, dünya genelinde çoğu ülkede kontrol altına alınabilmiştir (42).

Tablo 2.1. Aşıyla önlenbilir hastalıklara ilişkin örnekler (41).

1. Serviks kanseri	2. Kolera	3. COVID-19	4. Difteri
5. Hepatit B	6. İnfluenza	7. Japon Ensefaliti	8. Malarya
9. Kızamık	10. Menenjit	11. Kabakulak	12. Boğmaca
13. Pnömoni	14. Polio	15. Kuduz	16. Rotavirüs
17. Kızamıkçık	18. Tetanoz	19. Tifo	20. Suçiçeği
21. Sarıhumma			

Küresel ölçekte yürütülen bağışıklama politikaları sayesinde enfeksiyon hastalıklarında eliminasyon ve eradikasyon mümkün olabilmektedir (42-44). Çocukluk çağında görülme riski yüksek olan ve sıklıkla morbidite veya mortaliteye neden olabilen; difteri, meningokok serogrup C, polio, Haemophilus influenza tip b, kızamık, kızamıkçık ve boğmaca gibi etkenlere karşı geliştirilmiş aşiların bağışıklama programına dahil edilmesiyle birlikte, olgu sayılarında ve hastalık yüklerinde çok büyük oranda azalma sağlanmıştır (2, 9). Özellikle çocukluk çağında yüksek mortalite ile seyreden ve 20. yüzyılda 300 milyon insanın ölümüne neden olduğu düşünülen çiçek hastalığının (*Variola virus*), aşılama kampanyaları sayesinde 1980 yılında eradikasyonu tamamlanmıştır (40, 42, 43). Benzer şekilde, çocuk felci (poliomyelit) için de eradikasyon hedeflenmektedir. Dünya genelinde, çocuk felci olguları %99 oranında azalmıştır 2019 yılı itibariyle 175' e kadar gerilemiştir (42, 44).

Günümüze kadar geliştirilmiş aşı ürünleri sayesinde insanlık tarihinde yer edinen başarılar elde edilmiştir. Diğer taraftan, halihazırda çok sayıda hastalık için yeni aşı geliştirme çalışmaları yoğun bir biçimde devam etmektedir. Klinik aşılama pratiği var olsa da istenilen düzeyde koruyucu immün yanıtın elde edilemediği tüberküloz, malarya, mevsimsel influenza, HIV gibi hastalıklar; ebola, pandemik influenza, COVID-19 gibi küresel düzeyde yaygın bağışıklamaya ihtiyaç duyulan pandemi durumları ve immün sistemi çeşitli hastalıklar, ilaç tedavisi, ileri yaş veya benzeri sebeplerle baskılanmış bireyler için yenilikçi aşı teknolojilerinin geliştirilip klinik kullanıma sunulması hayati düzeyde önem arz etmektedir (2, 9, 41).

Tarihsel perspektiften bakıldığında, yakın geçmişe kadar aşı geliştirme çalışmalarında ağırlıklı olarak empirik yaklaşımların ön planda olduğu gözlenebilmektedir (45). Son yıllarda; mikrobiyoloji, moleküler biyoloji ve immünoloji alanlarındaki gelişmelere paralel olarak aşılar ve bağışıklamayla ilgili bilgi birikimi artmakta, koruyucu immün yanıtın gelişiminde ve yanıtın hastalık etkeni ile olan ilişkisinde rol oynayan mekanizmalar daha çok anlaşılmaktadır. Aşı bilimindeki disiplinler arası bilgi birikiminin artması hem yenilikçi aşı teknolojilerinin keşfinde hem de koruyuculukla ilişkili izlenebilecek immünolojik parametrelerin belirlenmesinde önemli faydalar sağlayabilmektedir (9-11, 33, 46).

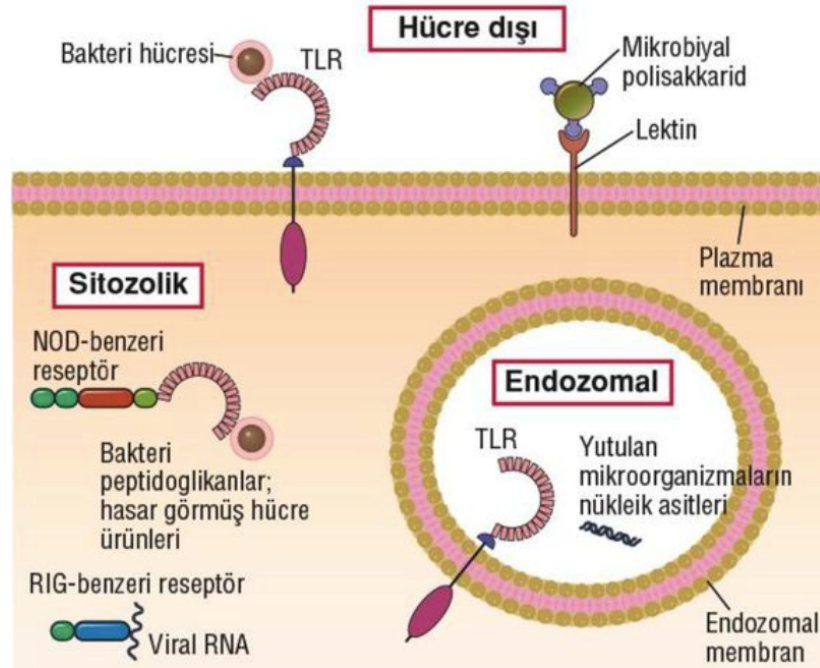
2.2. Aşı İmmünolojisi

2.2.1 Aşıyla Gelişen Doğal İmmün Sistem Yanıtları

Aşı ürünlerinin neredeyse tamamına yakını iskelet kası içine (i.m.) enjeksiyon yoluyla uygulanmaktadır. Bu yolla uygulandığında aşı bileşenleriyle, en fazla doğal immün sistem hücre ve molekülleri etkileşim halinde bulunmaktadır (10, 11, 15, 23, 27). Sağlıklı iskelet kası, deri ve mukozal dokulardan farklı olarak oldukça az sayıda gözlemci (*patrolling*) veya yerleşik lökosit barındırmaktadır (16). Aşının uygulanmasını takiben; enjeksiyon hasarı ve aşı bileşenlerinin etkisi ile kompleman sistem aktivasyonu ve iskelet kası dokusuna yoğun miktarlarda miyeloid hücre infiltrasyonu gerçekleşmektedir (27-29). Enjeksiyon bölgesinde oluşan aşıyla indüklenmiş lokal

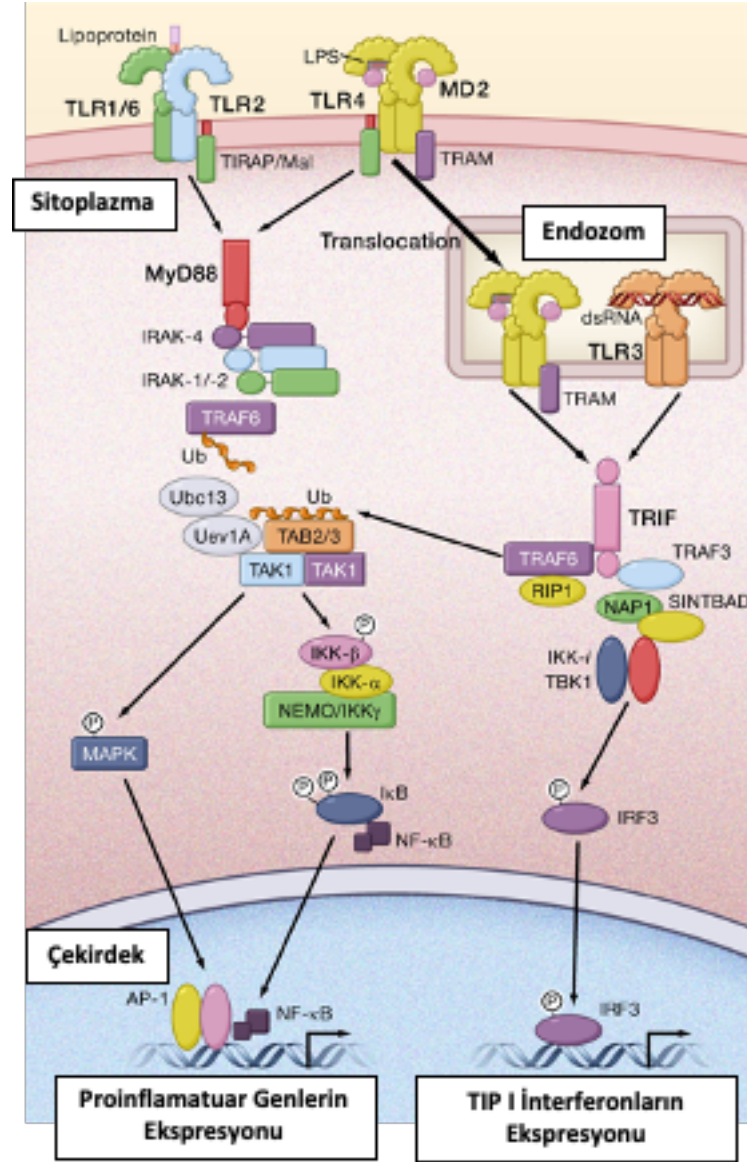
inflamasyon alanına ilk toplanan immün hücre grubunun nötrofiller olduğu gözlemlenmektedir (14, 16, 18, 27). Nötrofiller nispeten kısa ömürlü oldukları için daha çok, salgıladıkları kemokinler sayesinde uzun ömürlü doğal immün sistem hücrelerinin bölgeye çağrılmasından sorumludurlar. Aşı enjeksiyonunun erken dönemlerinden edinsel immün yanıtların gelişimine kadar, lokal inflamasyon alanında aşı bileşenleriyle çoğunlukla dendritik hücreler, monositler ve en yüksek düzeyde de makrofajlar (bölgeye göç eden monositlerden farklılaşan) etkileşim içindedir (14, 16, 18). Aşıyla indüklenmiş lokal inflamasyon alanında, bahsi geçen popülasyonlara ek olarak; eozinofillerin, doğal öldürücü hücrelerin ve T lenfositlerin de varlığı gösterilmiştir (17).

Aşı içeriğinde bulunabilen mikroorganizmalara ait yapıların veya aşı adjuvanlarının, doğal immün sistem hücreleri aracılığıyla enjeksiyon alanında lokal inflamatuvar mikro çevrenin oluşumunu sağladıkları kabul edilmektedir (2, 9, 12, 17, 33). Aşı içeriğinde bulunabilecek, doğal immün sistemi uyaran mikrobiyal ürünler ve aşı adjuvanları tezin ilerleyen bölümlerinde detaylandırılacaktır. Doğal immün sistem, bu tipteki tehlike sinyallerini PRRs (*pattern recognition receptors* [patern tanıma reseptörleri]) aracılığıyla tespit edebilmektedir (Şekil 2.1) (19, 20). PRRs ile doğal immün sistem hücreleri; patojenlerin evrimsel olarak korunmuş, yaşamsal faaliyetleri için kilit önemdeki ortak yapısal moleküler paternlerini (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) ve konakçı organizmanın sadece stres altında, hücresel hasar varlığında ürettiği veya salıverdiği hasarla ilişkili moleküler paternleri (*damage associated molecular patterns*, DAMPs) tanıyabilmektedir (19). İlk keşfedildiklerinde PAMPs ve DAMPs' in tanınmasında farklı PRRs' nin görev aldıkları düşünülse de günümüzde bu reseptörlerin her iki kaynaktan da gelen sinyalleri benzer mekanizmalarla tanıyabildiği bilinmekte ve bu sinyaller toplu halde tehlike sinyalleri olarak adlandırılmaktadır (21).



Şekil 2.1. Hücrenin farklı kompartmanlarındaki patern tanıma reseptörleri (Abbas AK. ve ark., 2015' ten (20) uyarlanmıştır). Doğal immün sistem hücreleri değişik kompartmanlardan farklı tehlike sinyallerini toplayabilen özelleşmiş reseptör türlerine sahiptir.

Farklı PRRs' nin hücrenin farklı kompartmanlarında ifade edilmesi sayesinde hücreler maruz kaldıkları tehlike sinyaline özgün bir yanıt verebilmesi mümkün olabilmektedir. Örneğin sitozolik PRRs virüsle enfekte hücrelerde viral genetik materyallerin tehlike sinyali olarak algılanmasını sağlarken; hücre membranında ifade edilen PRRs hücre dışındaki mikrobiyal yapıların, endozomal PRRs ise fagosite edilen virüs veya bakterilere ait genetik materyallerin tanınmasını sağlayabilmektedir. Böylece, aktive olmalarıyla birlikte PRRs, ilişkili oldukları sitozolik sinyal iletim mekanizmalarını indükleyerek ilgili patojene göre doğal immün yanıtların oluşmasını sağlamaktadır (Şekil 2.2) (22). Topladıkları tehlike sinyallerine özgün bir biçimde programlanan doğal immün sistem, hücreleri sekonder lenfoid organlara göç ederek veya lenfatik drenaja geçebilecek ölçüde sitokin salgılayarak, lenf nodlarında inflamasyonun kaynağındaki etkene özgün karakterde bir edinsel immün yanıtın gelişmesini sağlarlar (9, 19, 21, 22, 45).



Şekil 2.2. Bazı patern tanıma reseptörlerine ilişkin sinyal yolları (Takeuchi O ve ark., 2010' dan (22) uyarlanmıştır). Farklı türlerdeki PAMPs, hücrede kendilerine özgü sinyal yollarını uyarırlar.

PRR ailesi üyelerinden Toll benzeri reseptörlerin (TLRs) sinyali ile aktive olan MyD88 adaptör proteini, tetiklediği sinyal yolları ile nükleer faktör kappa B (NF-κB) transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu, çekirdeğe translokasyonunu ve sonuçta çok çeşitli proinflatuar özellikteki proteinlerin (örneğin; ko-stimülatör yüzey molekülleri ve sitokinler) ifadesini sağlar. TRIF adaptör proteininin aktivasyonu ile ise çeşitli interferon düzenleyici transkripsiyon faktörlerinin (*interferon regulating factors* [IRFs]) fonksiyonuyla tip-1 interferon (büyük ölçüde; IFN-α ve IFN-β) yanıtları gelişmektedir. Bu iki ana adaptör proteinin aktive ettikleri biyokimyasal reaksiyonlar

çeşitli basamaklarda birbirlerini destekleyebilmektedir. İki ana sinyal yolağını da kuvvetli bir şekilde uyarabilen TLR-4 ve ligandı bir gram negatif bakteri endotoksini olan lipopolisakkarit (LPS) oldukça etkili bir biçimde myeloid hücre aktivasyonu sağlayabilmektedir (19, 21, 22).

Aşıyla indüklenmiş inflamasyon alanında aktifleşen fagositik doğal immün sistem hücreleri çoğunlukla dispers formdaki antijenlerin hücre alımını gerçekleştirirler (17). Bu hücrelerden bir kısmı yüklendikleri antijenleri sekonder lenfoid organlara, çoğunlukla bölgesel lenf nodlarına taşırlar (16, 45). Makrofajların, monositlerin ve nötrofillerin de lenf nodlarına antijen taşıyabildiği çeşitli fare (14) ve makak (16) deneylerinde gösterilmiş olsa da en yüksek göç etme ve antijen sunumuyla T lenfosit aktive etme kapasitesine sahip hücre grubunun matüre olmuş dendritik hücreler olduğu kabul edilmektedir (31, 45, 47).

Aktivasyonlarını takiben dendritik hücrelerin matürasyonu başlar ve lenfatikler aracılığıyla bölgesel lenf nodlarına ilerlerler. Dendritik hücreler lenfatiklerdeki göçleri esnasında, otokrin ve aşıyla indüklemiş inflamasyon alanından lenfaya geçen sitokinlerin uyarımıyla matürasyonları sürdürürler. Matürasyonları sürecinde dendritik hücreler; antijen sunumu, ko-stimülasyon ve sitokin üretim kapasitelerini arttırlar.

2.2.2 Aşıyla Gelişen T Lenfosit Yanıtları

Antijen sunan hücrelerin (*Antigen presenting cells*, APH) lenf nodlarında aşı antijenlerini T lenfositlere sunması temelde ki ana mekanizmayla gerçekleşmektedir; hücre dışı antijenler MHC-II (majör doku uyumluluk kompleksleri [*major histocompatibility complex*]) moleküllerince CD4⁺ yardımcı T hücrelere (*T helper* [Th]) ve hücre içi antijenler MHC-I moleküllerince CD8⁺ sitotoksik T hücrelere (*T cytotoxic* [Tc]) sunulmaktadır (47). Böylece, her iki yolla da farklı yöntemlerle işledikleri protein yapıdaki antijenik peptidleri MHC moleküllerine yükleyerek, kompleksler halinde yüzeylerinde sergilerler. MHC molekülünün çeşidi ile hangi tip T lenfosit sunum yapılacağına, peptit-MHC kompleksi yüzeyini spesifik olarak tanıyan T hücre

reseptör kompleksinin dışında kalan CD4 ko-reseptörünün (Th' ye özgü) MHC-II molekülünü, CD8 ko-reseptörünün (Tc' ye özgü) MHC-I molekülünü tanımıyla karar verilmektedir (31, 47). MHC-I molekülü ile tüm çekirdekli hücreler devamlı olarak yabancı veya konağın kendine ait antijenleri sunmaktayken, MHC-II molekülleri ile sunum çoğunlukla fagositlerce (makrofaj, dendritik hücre, B lenfosit, nötrofil) bazen ise daha düşük düzeyde, aktifleşen fibroblastlar ve epitelyal hücrelerce gerçekleştirilmektedir (31). Buna ek olarak, özellikle dendritik hücrelerde, hücre içi antijenler otofaji aracılı olarak MHC-II molekülleriyle, hücre dışı antijenler çapraz sunum aracılı olarak MHC-I molekülleri ile sunulabilmektedir. Bu sayede, aşı antijeninin işlendiği hücrel kompartmanlarla kısıtlı kalınmadan hem CD4⁺ hem de CD8⁺ T lenfositler yanıtları indüklenebilmektedir (31) (47).

T lenfositlere antijen sunumu esnasında kurulan immün sinapsın diğer bir sinyal iletici bileşeni ko-stimülatör moleküllerdir. T hücre reseptör kompleksi ve peptit yüklü MHC kompleksi etkileşimi ile immün sinaps oluşmaya başlar. ASH yüzeyindeki CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) molekülleri T lenfosit yüzeyindeki CD28 reseptörüne, T lenfosit yüzeyindeki CD40-L molekülü ASH yüzeyindeki CD40 reseptörüne bağlanması gibi çeşitli, karşılıklı ligand-reseptör etkileşimleri sayesinde hücreler arasında ko-stimülasyon sinyal ağı kurulmaktadır. Böylece T lenfositler spesifik antijen sinyalinin yanı sıra aşıyla indüklenen inflamasyon varlığında üretilen ko-stimülatör moleküller ve sitokinler sayesinde denetimli bir şekilde aktive olabilmektedir. Aktivasyonlarını takiben T lenfositlerin klonal çoğalması gerçekleşir ve sayılarının logoritmik artmasıyla antijen spesifik hücreler farklılaşma aşamasına ilerler (9, 31, 45, 47).

Dendritik hücrelerce aktive olan CD4⁺ T yardımcı hücreler (Th), hem CD8⁺ T sitotoksik hücreler (Tc) hem de B lenfositlerin aktivasyonunda kilit öneme sahiptir. Th yanıtlarının ne yönde olacağı ise dendritik hücrelerden aldıkları antijen ve ko-stimülasyon sinyalinin gücü ve eşlik eden sitokinlerin çeşitliliği ile doğrudan orantılıdır. Düşük düzeyde aktive dendritik hücreler, IL-4, IL-5, IL-13 sitokinleriyle karakterize Th2 farklılaşmasını desteklerken; daha yüksek düzeyde aktive dendritik

hücreler, IFN- γ ve TNF- α sitokinleriyle karakterize Th1 farklılaşmasını desteklemektedir. Th farklılaşması çok sayıda farklı alt tipin (Th1, Th2, Tfh, Th17, Th9 v.d.) geliştiği ve dendritik hücrenin sinyal paternine göre oranları değişebilen bir fenotip spektrumu şeklinde gerçekleşmektedir. Th1 ve Th2, B lenfositlerin ektrafoliküler yanıtlarında rol alırken, T foliküler yardımcı hücrelere (Tfh) farklılaşanlar ise germinal merkez reaksiyonlarından sorumludurlar (31, 45, 47).

Sitotoksik aktivitelerinin sıkı denetimi nedeniyle Tc aktivasyonu için daha potent bir MHC-I sunumu, ko-stimülasyon ve sitokin uyarımı gerekmektedir. Bu nedenle Tc aktivasyonu öncesinde dendritik hücrelerin, aktive ettikleri Th1 lenfositlerce uyarılarak; çapraz sunumlarını, ko-stimülatör molekül ve sitokin üretimlerini artırmaları gerekmektedir (31, 47). MHC-I sunumuyla aktifleşen Tc' ler, sitotoksik aktiviteleriyle sunumu gerçekleştiren dendritik hücreyi de öldürmekte, açığa çıkan antijenler lenf nodundaki diğer ASH'lerce internalize edilerek tekrar sunulabilmektedir (47).

Aktivasyonlarını takiben efektör T lenfositler nispeten kısa ömürlü olmakta, hayatta kalan hücreler ise T lenfosit hafıza yanıtlarını oluşturmaktadır. Bu nedenle aktive olan T lenfosit klon sayısı ve çoğalma düzeyleri, daha sonrasında oluşacak hafıza yanıtlarının spektrumu ve hızı ile doğrudan ilişkilidir. Aşının ilk dozunun ardından oluşmaya başlayan hafıza T lenfosit yanıtları, tekrarlayan aşı dozlarıyla birlikte daha da güçlendirilebilmektedir (45, 47). Hafıza T lenfositler genellikle vücutta buldukları kompartmanlara göre sınıflandırılırlar. Lenfoid organlarda yerleşik veya mobil halde bulunanlar santral hafıza T lenfositler olarak isimlendirilirler. Efektör hafıza T lenfositler çoğunlukla dolaşımında ve periferik dokularda mobil halde bulunurlar. Yenilenen aşı dozu veya enfeksiyonla tekrar aktive olan Th yanıtları plastisite göstermekte ve eşlik eden sinyal paternine göre farklılaştığı fenotipler değişebilmektedir. Bu sayede Th hafıza yanıtları hızlı bir şekilde hem patojene hedeflenebilmekte hem B lenfosit yanıtlarının gelişimini hem de yeni Tc klonlarının aktivasyonunu destekleyebilmektedir (30, 45).

Aşı lezyonunda aşı bileşenleriyle (özellikle adjuvanlarla) etkileşimlerini sürdürmeye devam eden makrofajlar, idame ettikleri lokal inflamasyon alanında işledikleri antijenleri MHC-II yolağıyla sunmaktadır (9, 18). Bu sayede makrofajlar, aktivasyonlarını takiben dolaşım yoluyla aşı ile indüklenmiş inflamasyon alanına göç eden efektör T lenfositlere veya daha önceki aşı dozlarıyla gelişmiş efektör hafıza T lenfositlere antijen, ko-stimülasyon sinyali verebilmekte ve bu sayede efektör hafıza gelişimini güçlendirebilmektedir (27, 31) (30). Aynı zamanda yüksek sitokin üretme kapasiteleri sayesinde; parakrin etki ile ortamdaki diğer ASH popülasyonlarını ve T lenfositleri, endokrin etki ile lenfatiklerde göç etmekte olan ASH ve lenf nodundaki edinsel immün sistem aktivasyonunu destekleyebilmektedir (22, 31, 32). Bahsedilen fonksiyonları nedeniyle makrofajlar, edinsel immüntenin önemli bir destekleyicisi olarak kabul görmektedir (31).

2.2.3 Aşıyla Gelişen B Lenfosit Yanıtları

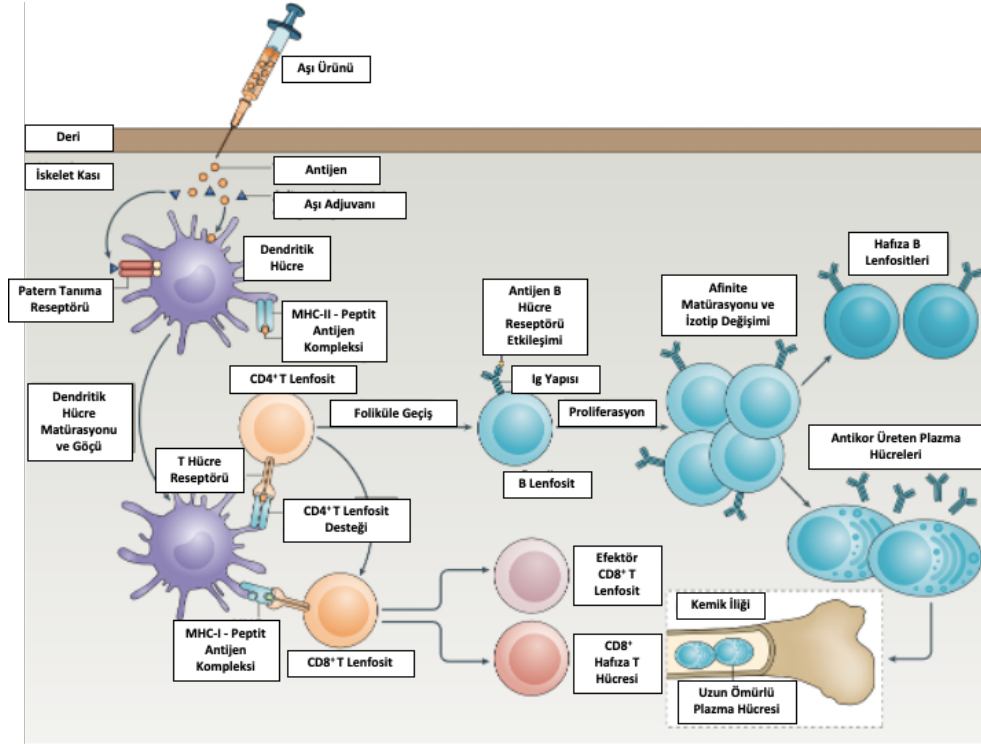
Aşı enjeksiyonunu takiben lenf noduna ASH göçü öncesinde, bir kısım dispers veya çözünür formdaki aşı içeriğinin doğrudan lenfatik drenajı başlamaktadır. Lenf noduna ulaşan antijenler ve erken pro-inflamatuar sinyaller (örneğin, aktifleşmiş kompleman ürünleri) lenf nodundaki yerleşik dendritik hücreler ve makrofajlar aracılığıyla önceden B ve T lenfosit aktivasyonunu başlatmakta, mikro çevreyi hazırlamakta, inflamatuvar bir karakter kazanan lenf noduna dolaşımdan naif lenfositlerin geçişi artmaktadır (9, 29, 45). Lenf nodunda antijenin tanınmasıyla aktive olmaya başlayan B lenfositler, paralel bir şekilde dendritik hücrelerce aktive edilen T hücre bölgesine doğru göç ederler (45).

B lenfositler, yüzeylerinde ifade ettikleri B hücre reseptörünü (ürettikleri Ig'ler [immünoglobulin, antikor]) ile aynı antijen tanıma özgünlüğündeki dizilere sahip kullanarak spesifik antijenlerini yüksek afiniteyle yakalayıp endositozla internalize ederler (9, 45). B lenfositler diğer ASH'lere benzer şekilde, internalize ettikleri protein yapılarını işleyip peptit-MHC-II kompleksleri halinde yardımcı T lenfositlere (Th1 ve Th2 fenotipindeki) sunarlar. T hücre alanı ile foliküllerin (B lenfosit alanı) kesişim bölgesinde, B lenfositler aktivasyonunun erken aşamasındaki Th ve dendritik

hücrelerden ko-stimülatör sinyalleri almaya başlarlar. Erken dönemde aldıkları Th ko-stimülasyonu nispeten düşük afiniteli ancak opsonizasyon kapasitesi yüksek IgM izotipinde (daha az miktarlarda IgG) antikor üreten kısa ömürlü plazma hücrelerine dönüşerek dolaşıma geçerler. T hücre bölgesinde gerçekleşen bu yanıtlar, ektrafoliküler reaksiyon olarak adlandırılmaktadır. Üretilen IgM antikorlarının dolaşım yoluyla aşı enjeksiyon alanına ulaşmasıyla birlikte lezyondan salınmaya devam eden antijenler daha fazla opsonize olurlar. Artmış opsonizasyonları sayesinde antijenler, lenfatik drenajla lenf nodlarına drene olmaya devam ettiklerinde foliküler dendritik hücreler ve diğer yerleşik ASH'lerce daha kolay yakalanabilir ve sunulabilir bir hale gelmektedirler (9, 45, 47).

Tfh fenotipine farklılaşan T lenfositler, B lenfositlerle birlikte foliküllere göç ederek germinal merkez reaksiyonlarının başlamasını sağlarlar. Foliküllerde; B lenfositler, foliküler dendritik hücreler ve T foliküler yardımcı hücreler arasında; antijen, ko-stimülasyon ve sitokin sinyalleri aracılığı ile gerçekleşen üçlü çapraz konuşmalarla germinal merkez reaksiyonları gerçekleştirilir ve idame ettirilir (47).

Germinal merkez reaksiyonlarında, B lenfositler foliküler dendritik hücrelerce sergilenen opsonize antijenlere olan afinitelerini artırmak için somatik hipermutasyon olarak isimlendirilen, sürekli yeni klonlara dönüştükleri mutasyon döngülerine girmektedir (47). Bu süreçte az miktardaki antijen için yarışan B lenfositlerden en yüksek afinite ile en güçlü antijen sinyalini alabilenler, farklılaşma basamaklarına devam etmektedir (9, 45). Doğal immün sistem, aldığı PAMPs ve DAMPs sinyalleri ile geliştirdiği yanıtlarla Th' i, inflamatuvar etkene özgü bir biçimde programlamaktadır. Bu bilgi akışıyla aktive olan Tfh' ler, sitokin ve ko-stimülasyon sinyalleriyle B lenfositlerde, hastalık etkeninin en optimum düzeyde hedeflenmesini sağlayabilecek Ig izotip değişimlerini uyarırlar. Afinitite matürasyonunu ve izotip değişimini tamamlayan B lenfositler kemik iliğine veya mukozal lenfoid dokular gibi hedef dokulara yerleşebilecek, uzun ömürlü, yüksek düzeylerde antikor üreten plazma hücrelerine veya hafıza B lenfositlere dönüşerek uzun süreli humoral bağışıklığı oluştururlar (Şekil 2.3) (2, 9, 33, 45).



Şekil 2.3. Aşıyla edinsel immün yanıtın gelişimi süreci (Pollard AJ ve ark., 2021' dan (2) uyarlanmıştır).

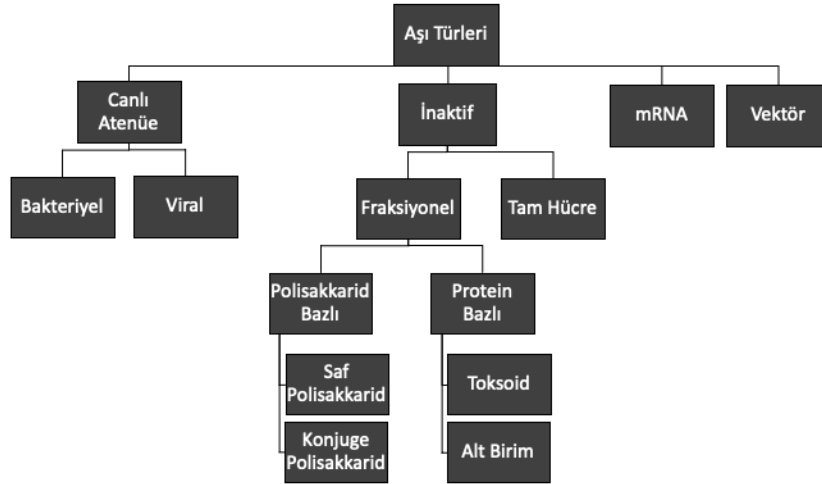
Çoğu hastalık etkenine karşı uzun süreli humoral koruculuğun birincil efektör mekanizması uzun ömürlü plazma hücreleridir. Plazma hücreleri kemik iliğine yerleşerek devamlı serum antikorunu üretebilmekte, antijenle karşılaşması halinde çok hızlı yanıt verebilmektedir. Uzun ömürlü plazma hücresi yanıtlarının zayıf kalması durumunda ise tekrar aktive olan hafıza B lenfositlerinin bir kısmı doğrudan antikor yanıtı verirken, diğerleri yeniden germinal merkez reaksiyonlarına dahil olmaktadır. Antikor yanıtlarının koruyuculukla doğrudan ilişkilendirilen fonksiyonu genellikle nötralizasyon kapasitesi olarak kabul edilmektedir. Bunun yanında kompleman sistem veya doğal immün sistem hücreleri aracılı efektör mekanizmalar da yanıtın geliştiği enfeksiyona özgü olarak koruyuculukta görev alabilmektedir (2, 9, 33).

2.3. Antijenler ve Aşı Türleri

Louis Pasteur' ün "izolasyon, inaktivasyon, enjeksiyon" prensibinden yola çıkarak geliştirilen ilk aşılardan; günümüzde rekombinant antijenler, vektör aşılar ve mesajcı RNA (mRNA) temelli geliştirilen aşılar kadar çok farklı türdeki ürün hali hazırda klinik aşı pratiğinde yer almaktadır (40, 46). Günümüzde klinik kullanımı

devam eden aşı türleri Tablo 2.2' de özetlenmiştir (3-7). Piyasadaki çoğu aşı ürünü ise, hastane ziyareti sayısını ve aşılama sıklığını azaltmak için farklı mikroorganizmaların değişik suşlarına karşı geliştirilen çeşitli aşı türlerinin kombine edildiği karma aşı formülasyonları şeklinde bulunmaktadır (6).

Tablo 2.2. Günümüzde klinik kullanımı devam eden aşı türleri (3-8).



Korunma hedeflenen enfeksiyonun patogeneziyle ilişkili olarak, immün sistemin farklı mekanizmalarla indüklenmesi ve sonuçta farklı karakterlere sahip koruyucu yanıtların kazanılması gereklidir (6, 9). Bu doğrultuda geliştirilen farklı türlerdeki aşılar, hem teknolojik hem de klinik yönden farklı üstünlük ve sakıncaları beraberinde getirebilmektedir (6).

2.2.1 Canlı Atenüe Aşılar

Canlı aşılar, yabancıl tip virüs veya bakterilerin virülansının azaltıldığı atenüasyon (zayıflatma) süreçleriyle elde edilir. Atenüasyon konvansiyonel olarak mikroorganizmanın *in vitro* ortamda tekrarlı kültürleriyle gerçekleştirilebilmektedir (6, 7). Günümüzde ise daha yenilikçi yöntemlerle (örneğin, intranasal influenza aşısı), virüsün yaşamsal faaliyetleri üzerinde etkili enzimlerin keşfini takiben gerçekleştirilen genetik modifikasyonlar yoluyla da sağlanabilmektedir (6). Bir atanüe aşının geliştirilmesi ve üretimi; tekrarlı kültür işlemleri sürecinde atenüe suşun eldesinin uzun sürmesi, yüksek düzeyde biyogüvenlik gerektirmesi, kullanılan kültür bileşenleri,

elde edilen suştan formüle edilen aşının saklama koşulları nedeniyle zaman ve kaynak tüketimi açısından yüksek maliyetli olabilmektedir (6, 7). Örneğin, günümüz aşı pratiğinde kullanılmakta olan kızamık aşısı suşunun eldesi 1954 yılındaki izolasyonunu takiben yaklaşık 10 yıl sürmüştür (7).

İmmün yanıtın gelişmesinde canlı atenüe aşuların bireyin vücudunda çoğalarak enfeksiyonun kendisini taklit etmesi gerekmektedir. Bu sayede bireye düşük dozda uygulanan aşı, immün sistemde çok yüksek düzeylerde antijen ve PAMP maruziyeti sağlayabilmektedir. Aşıyla gelişen yanıt, aşı suşunun çoğalması baskılanana kadar desteklendiği için, yüksek etkinlikte humoral ve hücrel immün yanıt oluşmaktadır. Bu sayede, koruyuculuk diğer aşı türlerine göre daha az sayıda aşılamayla sağlanabilmektedir. Diğer taraftan, atenüe mikroorganizma yabancı tipteki suşların neden olduğu hastalığı doğrudan taklit ettiği için hamileler ve immün sistemi baskılanmış bireylerde enfeksiyonun kendisine benzer komplikasyonlara neden olabilmektedir (6, 7). Günümüzde klinik kullanımı devam eden canlı aşılar; kızamık, kızamıkçık, kabakulak, suçiçeği, oral polio, intranazal influenza, oral tifo ve verem (*Bacillus Calmette-Guerin* (BCG)) örnek verilebilir (3-7).

2.2.2 İnaktif Tam Hücre Aşılar

İnaktif tam hücre aşılar, hastalık etkeni mikroorganizmanın *in vitro* kültür koşullarında çoğaltılmasını takiben ısı veya radyasyon gibi fiziksel etkenler veya formaldehit gibi kimyasallarla inaktive edilmesi yoluyla üretilmektedir. İnaktivasyonla birlikte mikroorganizma çoğalma ve hastalık oluşturma kabiliyetini tamamen kaybetmektedir (5, 6).

İnaktif aşılar ölü mikroorganizmadan üretildikleri için insan vücudunda çoğalamaz ve bireyde enfeksiyona neden olamazlar. Böylece hastalık etkeniyle ilişkili yan etki veya komplikasyona neden olmayıp, hamileler ve immün süprese bireylerde güvenli bir biçimde kullanılabilirler. İnaktif tam hücre aşılar canlı atenüe aşılarından farklı olarak; doğal enfeksiyonu taklit etmezler. İnsan vücudunda çoğalamadıklarından immün sistemin maruz kaldığı antijen ve PAMP düzeyleri

uygulanan aşı dozu ile sınırlanmış durumdadır. Bu nedenle koruyucu immün yanıt daha fazla sayıda tekrarlı aşı uygulaması ile elde edilmekte ve büyük ölçüde humoral mekanizmalar ile sağlanmaktadır (5-7). Günümüzde klinik kullanımı devam eden inaktif tam hücre aşılarına; polio, hepatit A, kuduz, boğmaca ve tifo örnek verilebilir (3-7).

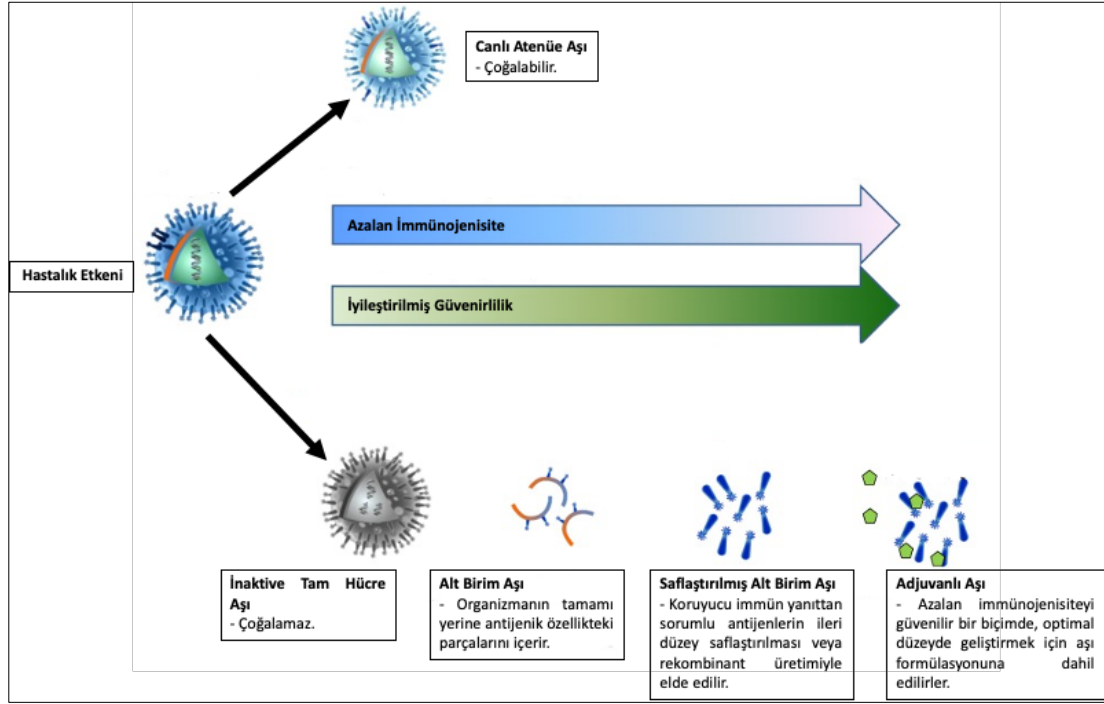
2.2.3 Protein Bazlı Fraksiyonel Aşılar

Mikroorganizmanın canlı atenüe veya inaktive biçimde tamamını içeren aşılardan farklı olarak fraksiyonel aşılar da immün sistemin, koruyuculukla doğrudan ilişkili nötralizan antikor yanıtlarını en güçlü biçimde uyarabilen antijenik yapılar, aşı ürünü terkbine girmektedir (5, 6, 9). Belirli antijenik yapılara odaklanması sayesinde hem Th hem de B lenfosit klonal yanıtları hedeflenen antijene karşı daha spesifik bir biçimde indüklenebilir. Bu durum, Th farklılaşmasında ve germinal merkez reaksiyonlarındaki Tfh, B hücre ve dendritik hücreler arasındaki çapraz konuşmalarında daha az sayıdaki antijenik determinanta odaklanılmasını sağlar. Bu sayede hücreler arası; antijen, ko-stimülasyon ve sitokin sinyallerinin; daha etkin ve korunumlu, daha az yarışmalı bir temelde aktarılması sağlanır (5, 9, 33).

Mikroorganizmanın, doğal immün sistemi uyarırken reaktöjeniteye neden olabilen PAMP yapılarının saflaştırma süreçleriyle uzaklaştırılması sayesinde aşıyla ilişkili yan etki riski azalmaktadır (5, 6, 9) (10). Örneğin, ilk defa 1940' lı yıllarda klinik kullanıma sunulan inaktif tam hücre boğmaca aşısı, enjeksiyon bölgesinde ağrı ve ateş gibi düşük riskli yan etkileri sebebiyle 1970' li yıllara gelindiğinde geniş kitleler tarafından reddedilmeye başlamıştır. Alternatif bir formülasyon olmaması sebebiyle, aşılama oranlarında düşüş ve enfeksiyon olgularında artış gözlemlenmiştir. Bu durum *Bordetella pertussis* bakterisinin çeşitli yüzey yapılarını ve toksoidinin formüle edildiği protein bazlı fraksiyonel yeni bir aşı ürününün geliştirilmesiyle çözüme ulaştırılmıştır (5).

Günümüzde aşı araştırma geliştirme faaliyetlerinde yenilikçi teknolojiler büyük çoğunlukla bahsedilen spesifik antijenik yapılar üzerinden kurgulanmaktadır.

Söz konusu fraksiyonel aşılarda daha güvenilir kabul edilseler de PAMP yapılarından yoksun olmaları sebebiyle aşının potansiyel etkinliği azalabilmektedir (5, 6, 9) (10) (11) (Şekil 2.4). Bu nedenle, yeterli immünojenisiteyi sağlamak için aşı terkinbine adjuvanlar eklenmekte ve bazı aşılarda belirli periyotlarda hatırlatma (rapel) dozlarının uygulanmasını gerektirmektedir (3).



Şekil 2.4. Üstünlükleri ve sakıncaları yönünden aşı türleri (Di Pasquale A. ve ark., 2015' ten (11) uyarlandı).

Alt Birim Aşılar

Protein bazlı fraksiyonel aşılarından alt birim aşı antijenleri mikroorganizmanın kültüre edilmesi veya rekombinant DNA teknolojisi gibi yöntemlerle üretilir. Sonrasında safılaştırılmış halde aşı ürünü olarak formüle edilir (6). Ürünün antijen kompozisyonunun belirlenmesinde;

- Mikroorganizmanın yaşam döngüsü ve virulansı ile doğrudan ilişkili yüzey proteinlerinin keşfi,
- *In vivo* modellerle nötralizasyonun ana hedefi olan proteinlerin belirlenmesi,

- Konvelesan donörlerden elde edilen B lenfosit klonlarından yüksek nötralizasyon aktivitesi elde edilen antijenik yapıların tespiti,

gibi yöntemlerden günümüzde sıklıkla yararlanılmaktadır (6, 10, 40).

Günümüzde, split influenza (influenza ile enfekte yumurta sistemlerinde üretilip saflaştırılan) ve asellüler boğmaca aşıları gibi antijenlerin kültüre edilen mikroorganizmadan saflaştırılarak üretildiği sistemlerden, rekombinant DNA teknolojisi ile üretime geçiş artmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinde, sadece antijeni kodlayan genetik materyalin farklı konakçı ekspresyon sistemlerine (çoğunlukla *Saccharomyces cerevisiae*) aktarılması yoluyla yüksek saflıkta, daha hızlı ve düşük maliyetli bir biçimde üretim yapılabilmektedir (3). Bu metotla aynı zamanda, viral kapsid yapıları da doğal şekline benzer formda üretilebilmektedir. Bu şekilde üretilen kapsid yapıları virüs benzeri parçacıklar (viral-like particles [VLPs]) olarak isimlendirilmektedir (3, 6, 40). Antijenik determinantların VLP formunda üretilmesi sayesinde hem doğal immün sistemin partiküle formdaki antijene ilgisi artmakta hem de antijenik yapı doğal formuna daha yüksek oranda benzerlik gösterebilmektedir (6, 48). Günümüzde klinik kullanımı devam eden rekombinant aşılar; hepatit B, meningokok serogrup B, influenza ve VLPs yapısındaki aşılar hepatit B, HPV (human papilloma virus) örnek olarak verilebilir (3-7).

Toksoid Aşılar

Diğer aşı türlerinden farklı olarak toksoid aşılar, bakterilerin yapısal antijenlerinden ziyade salgıladığı toksik ürünler antijen olarak hedeflenmektedir. Üretimlerinde, kültüre edilen bakterilerden salgılanan bu proteinler, inaktif aşılar benzer süreçlerle inaktive edilmektedir. Bu sayede toksik etkileri giderilirken, immünojenisiteyi korunabilmektedir. Elde edilen koruyucu immün yanıt ise bakterinin kendisine karşı değil toksinlerine karşı gelişmektedir (4, 7). Toksoid aşılarla indüklenen antikor yanıtlarının muhtemel bir enfeksiyonun erken dönemlerinde etkin olması önemlidir. Kazanılan immün yanıtlar doğadan (*Clostridium tetani*) ve enfekte bireyler arası (*Corynebacterium diphtheriae*) bulaş riskini azaltmamaktadır.

Bu nedenle, etkin bir koruyuculuğun idamesi için toksoid aşılar da hayat boyu tekrarlı hatırlatma dozları gerekmektedir. Toksoid aşı antijenleri yüksek düzeyde immünojenite gösterdikleri için indükledikleri yardımcı T lenfosit yanıtlarından konjuge polisakkarit aşıların geliştirilmesinde de faydalanılmaktadır. Günümüzde klinik kullanımı devam eden toksoid aşılar; tetanoz, difteri ve asellüler boğmaca örnek verilebilir (6).

Polisakkarid Aşılar

Bazı patojenik bakterilerin dış yüzeyleri, kompleks polisakkaritlerden oluşan kapsüller bir yapıyla kaplanmış haldedir. Polisakkarid kapsüller yapı bu bakterilerin, en önemli virulans faktörlerinden biri olarak enfeksiyonun patogenezi doğrudan etkilemekte ve antijenik özellik göstermektedir. Bu yapısal özellikleri gösteren bakteriler spesifik polisakkaritlerinden faydalanılarak serotiplere ayrılabilen ve polisakkaritleri aşı antijeni olarak kullanılabilir (40, 49).

Polisakkarid antijenlerin üretimi, ilgili bakterilerin kültür edilmesini takiben kapsüller polisakkaritlerin saflaştırılmasıyla yapılmaktadır (6). Saf polisakkaritlerin doğrudan antijen olarak kullanıldığı aşılar da antikor yanıtları temelinde, Th bağımsız olarak B lenfositlerin ekstrasellüler reaksiyonlarıyla gelişmektedir (6, 7). Bu sebeple, saf polisakkarit aşılar da koruyuculuğun daha az ve kısa olmasının yanı sıra aşının tekrarlayan dozlarında etkinliği düşmekte ve özellikle immünolojik gelişimini henüz tamamlayamamış 2 yaşta küçük çocuklarda koruyuculuk sağlanmamaktadır (3, 6, 7). Günümüzde klinik kullanımı devam eden saf polisakkarit aşılar; pnömokok, meningokok ve tifo örnek verilebilir (3-7).

Konjuge polisakkarit aşılar, bakteriyel polisakkarit yapılarının tetanoz veya difteri toksoidlerinden türevlendirilmiş proteinlerine konjugasyonu ile elde edilirler. Protein yapıdaki toksoidlere karşı gelişmiş Tfh yanıtları, germinal merkez reaksiyonlarını destekleyerek; yüksek afiniteli ve izotip değişimi gerçekleşmiş, uzun süreli antikor ve hafıza B lenfosit yanıtlarının elde edilmesini sağlar (2, 6, 7, 33).

Günümüzde klinik kullanımı devam eden konjuge polisakkarit aşılara; pnömokok, meningokok ve Haemophilus influenzae tip b örnek verilebilir (3-7).

2.3. Aşı Adjuvanları

Adjuvanlar, bazı aşılarda içeriğinde bulunan, aşılanan kişide daha güçlü ve uzun süren bir bağışıklık yanıtının oluşmasına yardımcı olan, fakat kendi başlarına immünojen olmayan bileşenlerdir (12, 13).

Günümüzde geliştirilen çoğu aşı hastalık etkenin tamamından ziyade küçük bileşenlerini içermektedir. Söz konusu fraksiyonel aşılarda daha güvenilir kabul edilseler de immünojenisiteyi düşüktür. Bu nedenle, fraksiyonel aşılarda yeterli düzeyde yanıtın elde edilmesinde adjuvanların kullanımı gerekli olabilmektedir (12, 13).

Adjuvanlar sayesinde;

- Antijene karşı gelişen antikor yanıtları artırılabilir.
- Primer immünizasyon sonrasındaki rapel (tekrar) dozlarının azaltılması sağlanabilir.
- İmmünsüprese hastalardaki yanıt iyileştirilebilir.
- İmmün yanıtın süresi uzatılabilir.
- Hücreli immün yanıtlar iyileştirilebilir.
- Üründeki antijen miktarının azaltılması sağlanabilir (12).

Depo etkisi çoğu adjuvanda görülebilen bir etki mekanizmasıdır. Adjuvanlar, yüzeylerine adsorbe edilen veya enkapsülasyonla yüklendikleri antijenleri enjeksiyon bölgesinde kontrollü bir biçimde salılabilmektedir. Bu sayede, hem antijenin biyolojik sıvılarda degradasyonu engellenmekte hem de T ve B lenfosit yanıtlarının gelişimini sürekli antijen salımıyla desteklenmektedir. Aynı zamanda, antijen-adjuvan etkileşimleri ile oluşan dispers formdaki yapı antijenin, ASH'lerce internalizasyonunu kolaylaştırmakta ve antijen sunumunu artırmaktadır (23, 24).

Adjuvanlar, doğrudan (PAMPs) veya dolaylı yoldan (DAMPs) ürettikleri tehlike sinyalleri sayesinde enjeksiyon bölgesine lökosit infiltrasyonunu artırarak lokal

inflamatuvar mikroçevrenin oluşmasını sağlarlar (14-18). Sitokin üretiminin ve lenf noduna matür ASH göçünün artmasıyla birlikte edinsel immün yanıtın gelişimini desteklerler (12, 19-22).

Yakın geçmişte geliştirilen yeni aşı ürünleri ile birlikte günümüzde, etkene karşı hedeflenen immün yanıtların şekillendirilmesinde çok farklı mekanizmalarla etki eden, çeşitli adjuvanlardan faydalanılmaktadır (Tablo 2.3) (10, 11, 23, 24). Adjuvan aktivitesi güçlendikçe, enjeksiyon bölgesinde lokal kızarıklık ve şişkinlik; sistemik olarak ateş, titreme ve ağrı gibi yan etkiler artabilmektedir (13). Bu nedenle aşı formülasyonuna dahil edilecek adjuvanın seçiminde, ihtiyaç duyulan aktivite ile güvenilirlik dengesinin kurulması önemlidir (23).

Artan dünya nüfusu ile birlikte, adjuvanların istenilen bağışıklama için yeterli antijen dozunu ve rapel sayılarını azaltabilir olması sürdürülebilir aşı politikalarının devamlılığı için önemli bir konu haline gelmiştir. İmmünoloji alanındaki bilimsel gelişmelerle birlikte adjuvanların etki mekanizmaları hakkındaki bilgi düzeyi de artmaktadır. Daha etkin yeni adjuvanların geliştirilmesi üzerine çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmekle birlikte çok azı güvenilirlik yönünden uygun standartları sağlayabilmektedir (24).

Tablo 2.3. Buldukları aşı ürünlerine göre adjuvan örnekleri.

ADJUVANLAR	BULUNDUĞU AŞILAR
Alüminyum Hidroksit	Hepatit A Hepatit B
Alüminyum Fosfat	Difteri - Tetanoz- Aseüler Boğmaca karma Konjuge Pnömonok
Potasyum Alüminyum Sülfat	Hemofilus influenza tip B Hepatit B İnsan papilloma virüs (HPV)
Virozom	Hepatit A İnfluenza
MF59	İnfluenza
AS03	İnfluenza
AF03	İnfluenza
MPL-Alüminyum Hidroksit	HPV
MPL-Alüminyum Fosfat (AS04)	Hepatit B
RC529	Hepatit B

MF59, AF03 skualen; *AS03*, skualen ve DL- α -tokoferol bazlı emülsiyon adjuvanlar. *MPL* ve *RC529* TLR-4 agonisti adjuvanlar.

2.3.1 Alüminyum Adjuvanlar

Alüminyum tuzları, 1930' lu yıllardan günümüze aşılar da en yaygın kullanılan adjuvanlardır (13, 23). Doksan yılı aşkın güvenilirlik profilleri, nispeten basit süreçlerle aşı formülasyonlarına dahil edilebilmeleri ve düşük maliyetleri sayesinde yeni aşı geliştirme çalışmalarında ilk tercih edilen adjuvanlar olmaktadır (11-13, 23-25). Aşılar da kullanılan alüminyum tuzları; alüminyum hidroksit (AlO(OH), AH),

alüminyum fosfat $(Al(OH)_x(PO_4)_y, AP)$, alüminyum sülfat $[KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O, AS]$ veya bu tuzların kombine edilmiş halleridir (26).

Antijenin alüminyum tuzu kristallerine adsorpsiyonu adjuvan-antijen arasındaki elektrostatik etkileşimle meydana gelmektedir. Elektrostatik etkileşim, antijenin izo-elektirik noktasına uygun karşıt yükteki alüminyum tuzunun seçimi ile optimize edilebilmektedir (12). Aşılarda doz başı alüminyum limitleri DSÖ için 1.25 mg, FDA için 0.85 mg alüminyum şeklindedir (50).

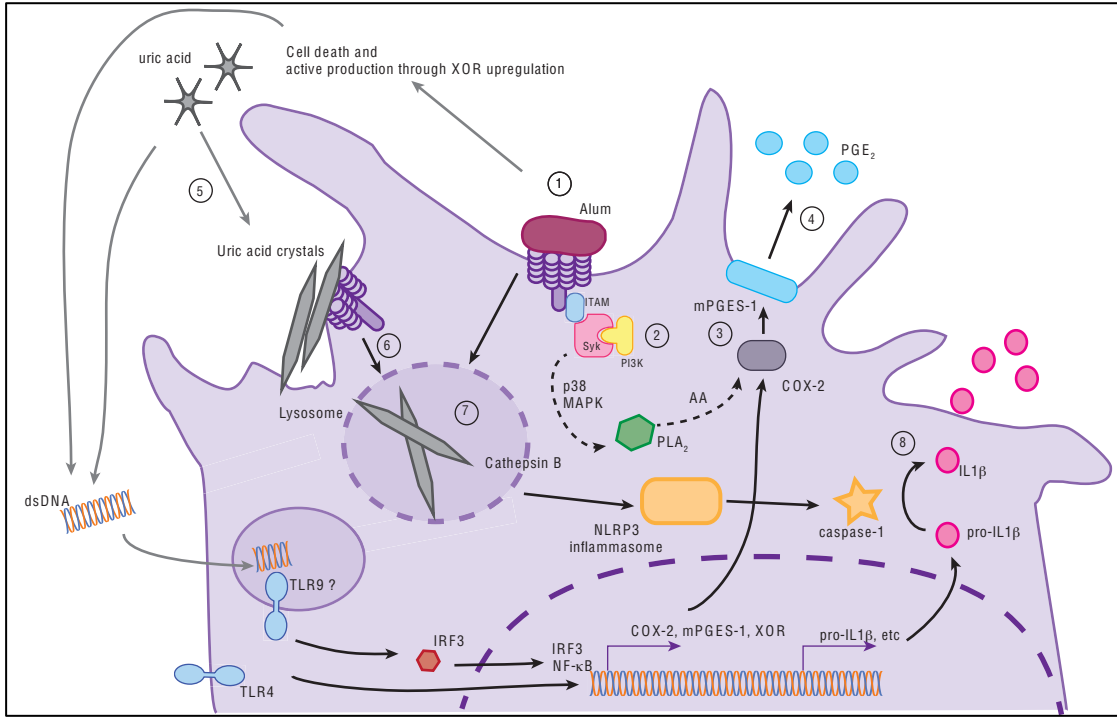
Alüminyum tuzları sulu ortamda nanometre boyutunda kristaller halindedir. Ancak bu kristaller zayıf agregatlar oluşturmaya meyillidir. Bu özellikleriyle alüminyum tuzları; antijen adsorpsiyonu için oldukça geniş bir yüzey alanı sağlarken, oluşturduğu zayıf agregatlarla da antijenin ASH'ler tarafından daha enerji korunumlu bir biçimde internalize edilmesini mümkün kılabilir (12, 24, 25).

Alüminyum adjuvanlarda, doğal immün sistem üzerindeki DAMP aktivitesine ilişkin mekanizmalar üzerinde fikir birliği henüz oluşmamıştır (12). Muhtemel etki mekanizmaları Şekil 2.5' te paylaşılmıştır (51). Alüminyum kristalleri hücre zarı lipitlerinde kümeleşmeye neden olur. Bu süreçte, özgün olmayan bir biçimde agregre olan ITAM motifli reseptörlerle tetiklenen sinyal iletimleri, siklooksijenaz-2 aracılığıyla, proinflamatuvar bir lipit mediyatör olan prostoglandin E2 sentezine yol açar. Bu membran bozucu özellikleriyle alüminyum kristalleri, sitopatik etkileriyle hücre dışı ürik asit konsantrasyonunu artırarak monosodyum urat kristallerinin oluşumunu sağlar. Oluşan monosodyum urat kristalleri de benzer şekilde lipit kümeleşmesini ve sitopatik etkileri desteklemeye devam eder (51).

Hem alüminyum hem de monosodyum urat kristallerinin endositoz yoluyla hücre içine alınmasının ardından, geç endolizozom membranının perfore olmasıyla; katepsin B gibi hücre için zararlı proteazlar, serbest oksijen ve nitrik oksit türevleri sitozole karışabilir. Oluşan tehlike sinyalleri Nod benzeri PRR ailesinden NLRP3' ün aktifleşmesi ve inflamazom kompleksini oluşturmasını sağlayabilir. İnflamazom kompleksinin oluşmasıyla aktifleşen kaspaz-1, inaktif formdaki IL-1 β ve IL-18

sitokinlerinin aktifleştirerek güçlü proinflamatuvar sitokin sinyallerin oluşmasını sağlar. NLRP3 inflamazomu, literatürde en sık çalışılan alüminyum adjuvan etki mekanizması olma özelliğini taşımaktadır (12, 25, 51). Alüminyum tuzlarının diğer PPRs aracılı etkilerine ilişkin literatür bilgisi oldukça kısıtlıdır.

Alüminyum adjuvanlar, yüzey özellikleri sayesinde kompleman sistemin tüm yollarını aktive edebilirler. En fazla kompleman sistemin alternatif yolağını tetikleyerek proinflamatuvar kompleman proteinlerinin oluşumunu sağlarlar. Kompleman ürünleri aynı zamanda B lenfosit aktivasyonuna doğrudan destek olabilmektedir. Aynı zamanda, kompleman sistemin alternatif yolağının son ürünü olan membran atak kompleksinin, makrofaj hücre mebranını perfore etmesiyle açığa çıkan tehlike sinyalleri, NLRP3 inflamazomu oluşumunu desteklemeyi sürdürebilmektedir (25).



Şekil 2.5. Alüminyum adjuvanlar için önerilen etki mekanizmaları (Fierens K. ve ark., 2012' den (51) uyarlandı).

Alüminyum kristalleri sitopatik etkileriyle çift zincirli konakçı DNA' sının hücre dışına çıkmasına neden olur. Henüz ilişkili reseptör ve sinyal yolları aydınlatılmamış olsa da bu mekanizmaya özgü olarak aktive olan IRF3 gibi

transkripsyon faktörleriyle proinflamatuvar genlerin ifadesinin uyarılabileceği gösterilmiştir (51, 52).

Alüminyum Hidroksit

AH, $AlO(OH)$ kimyasal yapısına sahip olup kristal formunda bir adjuvandır. Kristal yapısı $500m^2/g$ yüzey alanına çıkabildiğinden çok iyi bir adsorbandır. Kristal partiküllerin yapısı üç boyutlu (yaklaşık $5 \times 2 \times 200$ nm boyutlarında) fiberlerden oluşmaktadır (25). Kristal fiber yapısının yüzeyi çoğunlukla hidroksil gruplarından oluşmaktadır. Hidroksil grupları proton (H^+) alarak pozitif, proton vererek negatif yüklenebilir ve bu sayede ortamın pH'ına göre farklı yüzey yüküne sahip olabilir. pH 7.4' te (fizyolojik pH) pozitif yüzey yüküne sahiptir. Ortamda bulunması durumunda fosfat iyonu, hidroksil gruplarıyla ligand değişimi yapmakta ve kimyasal yapı AP tuzuna doğru dönüşmektedir. Bu özelliği sayesinde AH, fosfat gruplu hepatit B antijenini yüksek oranlarda yüzeyine bağlayabilmektedir (12, 25, 50).

Alüminyum Fosfat

Alüminyum fosfat (alüminyum hidroksi fosfat $[Al(OH)_x(PO_4)_y]$) amorf kristal yapı gösteren bir adjuvandır. Bu nedenle, üretim şekli ve ortam koşullarına göre kimyasal formülü değişiklik gösterebilmektedir. Amorf yapı kristal yüzeyindeki hidroksil gruplarının fosfat gruplarıyla yer değiştirebilmesinden kaynaklanmaktadır. Bu amorf yapı sayesinde geniş yüzey alanına ve dolayısıyla yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahiptir (12, 25). Hidroksil gruplarının yoğunluğuna göre izo-elektirik noktası pH 4.4 ile 5.5 arasında değişebilmektedir. Fizyolojik pH' da negatif yüzey yüküne sahiptir (12, 25, 50).

Alüminyum Sülfat

Diğer alüminyum tuzlarından farklı olarak AS yüzeyine antijenler doğrudan değil, kristallerin in-situ presipitasyonu ile adsorbe edilmektedir. Adsorpsiyon sürecinin daha karmaşık ve maliyetli olması nedeniyle AS, adjuvan olarak nispeten daha az tercih edilmektedir (25). Alüminyum sülfat fizyolojik pH' da nötr özellik

göstermesiyle de diğer alüminyum tuzlarından ayrılmaktadır. Bu nedenle antijenin fizikokimyasal özelliklerine özgü olarak bazı aşuların (örneğin, VLP tipindeki HPV aşısında) terkbine girebilmektedir (53).

2.3.2 Emülsiyon Adjuvanlar

Emülsiyon tipindeki adjuvanların ilk ve en bilinen örneği Freud (yağ içinde su [su/yağ] formundaki) adjuvanıdır. Tamamlanmış (*Mycobacterium tuberculosis* içeren [500 mg/mL]) ve tamamlanmamış (*Mycobacterium tuberculosis* içermeyen) iki türü vardır. Son derece etkili bir adjuvan olmasına karşın şiddetli yan etkileri nedeniyle günümüzde sadece deneysel amaçlarla kullanılmakta, aşı ürünlerinde yer almamaktadır.

Freud adjuvanına alternatif olarak yağ/su formundaki emülsiyon adjuvanlar geliştirilmiştir. Daha düşük viskozite değerlerine sahip olduklarından enjeksiyon esnasında uygulama kolaylığı sağlarlar. Bu gruptaki onaylı aşuların bileşenine giren adjuvanlar; MF59, AS03 ve AF03' tür (12).

Yağ/su formundaki adjuvanlardan onaylı bir aşı ürünü terkbine ilk gireni MF59' dur. MF59, yağ fazında skualen içermektedir. 1997 yılından günümüze Avrupa' da, 2016 yılından günümüze ABD' de yalnızca geriatrik popülasyonda kullanılan influenza aşısında bulunmaktadır (12, 13). MF59' ın etkinliği özellikle pandemik influenza aşısı çalışmalarında anlaşılmıştır. H5N1 kuş gribi aşısı (*avian influenza*) çalışmaları sırasında, aşılınması hedeflenen kalabalık ve immünolojik açıdan naif popülasyonda istenilen immünitinin sağlanması için gerekli ölçeklerde antijen üretimi endüstriyel olarak sağlanamamıştır. MF59 sayesinde, H5N1 kuş gribi aşılmasında gerekli olan 90 µg antijen dozu, 7.5 µg doza indirilebilmiştir (12).

AS03; skualen ve DL-α-tokoferol (vitamin E) içeren bir yağ/su emülsiyonudur. MF59' a benzer şekilde, Avrupa' da aynı dönemde pandemik influenza aşısında (Prepandrix®) kullanılmıştır. AS03 adjuvan aktivitesi ile gerekli antijen miktarı 3.75 µg doza inmiştir (12, 54).

AF03; benzer şekilde pandemik influenza aşısı çalışmalarında geliştirilmiş bir emülsiyon adjuvandır. Grubun diğer üyelerine benzer bir şekilde, skualen bazlı olsa da üretim metodunun bir ısıyla kendiliğinden indüklenen emsüfikasyon süreci olmasıyla farklılık göstermektedir (12).

Yağ/su emülsiyonları antijenlerin ASH'ler tarafından alımını ve lenf nodlarında sunulan antijen miktarını artırmaktadır (12). MF59 ile yapılan çalışmalarda, adjuvanın uygulandığı kas dokusunda TNF- α , IL-1 β düzeylerini artırdığı bulunmuştur. Bu sayede, dokudaki ASH'lerin aktivasyonunu ve kandaki ASH'lerin dokuya göçünün arttığı gözlemlenmiştir (12, 23). AS03 ile yapılan başka bir çalışmada ise, MF59' un aktivitesine ek olarak, DL- α -tokoferolün IL-6 sekresyonunu artırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (12).

2.3.3 Toll Benzeri Reseptör Agonisti Adjuvanlar

3-O-desasil-4'- monofosforil lipid A (MPL), LPS' in kimyasal yollarla detoksifiye edilmiş türevidir. TLR4 agonisti aktivitesi nedeniyle adjuvan sistemlerine dahil edilmektedir (12). MPL, enjeksiyon sonrasında bulunduğu adjuvan sisteminden LPS-bağlayıcı protein yardımıyla doku sıvısına salınır. Ardından çeşitli mekanizmalar yardımıyla TLR4-MD2 kompleksine bağlanır. Aktifleşen reseptör uyardığı sinyal yollarıyla, IL-12 ve tip I interferonlar gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini artırmaktadır. Bu sayede MPL, Th1 aracılı immün yanıtı artırabilmektedir (12, 24). AS04, MPL ve AH adjuvan sisteminden oluşmaktadır. AS04, sistemi HPV (bu ürün günümüzde piyasadan çekilmiştir) ve hepatit B aşılarında kullanılmıştır (12, 24).

Sitozin fosfoguanin (CpG) bakteriyel ve viral genetik materyali taklit ederek doğal immün sistem hücrelerince ifade edilen TLR9' u uyaraabilen sentetik bir DNA formudur. CpG; tek zincirli, 6 baz uzunluğunda, deoksi-nükleotid yapısındaki, metillenmemiş sitozin fosfo guanin motifini ifade etmektedir. CpG motifi bakteri DNA' sında görülme sıklığı memeli DNA' sına göre yirmi kat fazladır. Diğer adjuvanlara göre nispeten daha yeni geliştirilmiş, potent bir adjuvandır (12, 13, 24). CpG 1018 içeriğindeki patojen DNA' sı motifleri, PAMP sinyalleriyle doğal bağışıklık hücrelerini

uyarmaktadır. CpG motifleri; doğal öldürücü hücrelerin, plazmasitoid dendritik hücrelerin ve B lenfositlerin hücre içi veziküllerde lokalize TLR9' u etkinleştirmektedir. CpG, TLR9 aracılığıyla B lenfosit aktivasyonunu tetiklemekte; IL-1, IL-6, IL-18, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini artırmaktadır. Bu sayede, Th1 aracılı immün yanıtları destekleyebilmektedir (12, 24). CpG 1018 adjuvanlı rekombinant hepatit B aşısı, subkütan yoldan kullanılmaktadır (12, 13, 24).

2.3.3 Lipozom Adjuvanlar

Lipozomlar lipit çift katmanlı, veziküler yapıdaki dispers aşı veya ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Veziküler yapıları sayesinde lipozom partikülleri, yüksek miktarlarda antijeni enkapsüle edebilmektedir. Bu sayede ASH'ler tarafından internalize edilen antijen miktarı artmakta, antijen sunumunun iyileştirilmesi ile Th1 ve Tc yanıtları güçlendirilebilmektedir (12, 24).

Saponinler, karbonhidrat modifikasyonları nedeniyle amfifilik özellik kazanmış steroidal (triterpenik) moleküllerdir (24). Saponin bazlı adjuvanların, doğrudan PRRs aracılığıyla değil, alüminyum adjuvanlara benzer biçimde, çeşitli hasar mekanizmalarıyla etki gösterdiği düşünülmektedir (9, 12). QS-21, Quil-A saponinlerinin (*Quillaja saponaria*' dan ekstrakte edilen saponin fraksiyonu) izole edilmiş bir bileşenidir. Tek başına QS-21, veteriner aşılardan kullanılan Quil-A' dan daha az reaktogjenite göstermesine karşın klinik kullanım için hala yüksek toksisite ve kimyasal instabilite göstermektedir. QS-21' in kolesterol içeren lipozomal formülasyonları ise daha stabil ve daha az reaktogjen olduğundan insanda kullanılabilir (12). Bu doğrultuda geliştirilen AS01_b (MPL ve QS-21 içeren bir lipozom formülasyonu) rekombinant zoster aşısında kullanılmaktadır (13).

Virozomlar

Virozomlar, membranında viral proteinleri (genellikle influenza virüs proteinleri) içeren, rekonstitüsyon ile lipozom formunda yeniden oluşturulan viral zarf yapılarıdır. Üretimleri esnasında viral genetik materyal uzaklaştırıldığından çoğalamazlar (12, 24). IRIV (immünopotent rekonstitüe influenza virozomu,

immunopotentiating reconstituted influenza virosome) en yaygın kullanılan virozom adjuvan sistemlerinden biridir. Influenza ve hepatit A aşılarında kullanılmaktadır (12).

2.4. Folat ve Folat Reseptörleri

Folat (folik asit, vitamin B9) ve aktif metabolitleri 5-metil tetrahidrofolat (5m-THF), dihidrofolat (DHF), tetrahidrofolat (THF); tek karbon reaksiyonlarında, nükleik asit sentezinde, epigenetik düzenlemelerde görev alan esansiyel bir vitamindir (36). Tek karbon metabolizması olarak da adlandırılan folat döngüsü hücrede, temelde; nükleotid biyosentezi, amino asit döngüleri, S-adenosilmetiyonin üretimi gibi önemli biyokimyasal yollara destek vermektedir (55).

Folatların hücre içine alımı; indirgenmiş folat taşıyıcısı (*reduced folate carrier*, RFC), proton bağımlı folat kanalı (*proton coupled folate transporter*, PCFT) ve folat reseptörler (FOLRs) aracılığıyla gerçekleşebilmektedir. FOLRs diğer folat taşıyıcılarından farklı olarak serum folatlarını reseptör aracılı endositozla hücre içine alabilmektedir. Bu sayede; görüntüleme ajanı, ilaç, florokrom ve nanopartiküllere yapılan folat konjugatlarını; oluşturdukları yapıların büyüklüğünden bağımsız olarak internalize edebilmektedir. Böylece, folat konjugatlarıyla hücrelerdeki FOLR fonksiyonları doğrudan değerlendirilebilmektedir (56).

Aktivasyonlarını takiben makrofajların FOLR aracılı folat alımı hücrelerin metabolik faaliyetlerindeki artışa bağlı olarak artmaktadır (35, 36). Makrofajarda aktivasyona bağlı bu metabolik değişim benzer şekilde romatizma hastalarında da gösterilmiştir (36, 56). Aktive makrofajlardaki artan folat ihtiyacının önemli biyolojik beliteçlerinden biri FOLR- β (FOLR2) alt tipidir (35-39). İnsanda, günümüze kadar - α , - β , - γ ve - δ olmak üzere 4 farklı FOLR alt tipi keşfedilmiştir. Bu alt tiplerden FOLR- α 'nın (FOLR1) bazı organlardın (örneğin böbrek) luminal yüzeyindeki endotelial hücrelerince ve bu hücrelerden köken alan kanser tiplerinde, FOLR- β 'nın monositler, makrofajlar, nötrofiller ve hematopoetik öncül hücrelerce; FOLR- δ 'nın (FOLR4) regülatör T hücrelerce ekspresese edildiği bilinmektedir. FOLR- γ 'nın (FOLR3) ise hematopoez esnasında hücre dışına salgılanan bir protein olduğu düşünülmektedir.

Bu özellikleri nedeniyle FOLR ifade düzeylerinin, proliferasyonla (malignite) veya hücrel aktivasyonla ilişkili olduğu düşünülmektedir (35, 38, 56, 57).

Folat, inflamatuvar dokulara infiltre olan FOLR2 pozitif makrofajların hedeflenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (38, 39, 56). FOLR2 ifadesi; insan tümör, iskelet kası dokularına ve romatizmal eklem sinoviumlarına infiltre olan makrofaj hücrelerinde de gösterilmiştir (35, 56). FOLR2 ifadesinin regülasyonunun incelendiği çalışmalarda, monosit ve makrofaj farklılaşmasının ana düzenleyicilerinden PU.1 transkripsiyon faktörünün varlığı, Folr2 geninin proksimal düzenleyici bölgelerinde gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, MAF transkripsiyon faktörünün de dolaylı mekanizmalarla Folr2 gen ifadesini düzenleyebildiği düşünülmektedir (35, 58). Diğer taraftan inflamatuvar mikroçevrede, FOLR2 düzeylerinin makrofajların fonksiyonel davranışlarıyla ilişkisi henüz aydınlatılamamıştır (56).

Adjuvanlı aşuların i.m. uygulamalarında makrofajlar adjuvan içeriği ile en yüksek düzeyde etkileşim içerisindeki immün hücre grubudur. İskelet kasında özellikle adjuvanlarla indüklenen inflamasyonun idamesinde, lokal olarak ve bölgesel lenfnodlarında etkili proinflamatuvar sitokinlerin üretiminde, inflamasyon bölgesine göç eden efektör fazdaki T lenfositlere antijen sunumunda makrofajların merkezi bir rolü vardır. Günümüzde, akut ve kronik inflamasyonda makrofaj fonksiyonlarında folatların ve FOLR2' nin rolü üzerine çalışmalar her geçen gün artmaktayken aşı immünoyoloji açısından önemini değerlendirmeye yönelik yaklaşımlar henüz raporlanmamıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler

RPMI 1640 (Biological Industries, İsrail), folat içermeyen RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, ABD), penisilin (10.000 U/mL)/streptomisin (10 mg/mL) çözeltisi (Biological Industries, İsrail), L-glutamin, fetal sığır serumu (fetal bovine serum, FBS), 10x Tripsin (%0.5) – EDTA (%0.2) (Biological Industries, İsrail), fosfat tamponlu salin çözeltisi (phosphate buffered saline, PBS) (Advansta, ABD), tripan mavisi, etanol, izopropil alkol, dimetil sülfoksit (DMSO) (Thermo Fisher, ABD), alüminyum hidroksit adjuvanlı tetanoz difteri aşı ürünü (Tetadif 0.5 ml IM, Türk İlaç ve Serum Sanayi A.Ş.), LPS (Sigma Aldrich, ABD), 96 kuyucuklu plaka, 12 kuyucuklu plaka, 6 kuyucuklu plaka (Nest, Çin); T25 ve T75 flask, serolojik pipetler (5, 10, 25 mL, Orange Scientific, Belçika), santrifüj tüpleri (50, 15, 1.5, 0.2 mL, Sarstedt, Almanya), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid, sodyum dodesil sülfat (SDS) (JT Baker, ABD), N,N-dimetilformamid (DMF), Japonya); FACS flow™, Cell wash™ (BD Biosciences, ABD); propidyum iyodür (Sigma-Aldrich, ABD), lumogallion (TCI Chemicals dietilpirokarbonat, formaldehit, triton X-100, , 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), Anti-fare FOLR2 tavşan poliklonal primer antikoru (Thermo Fisher, ABD), Anti-tavşan Alexafluor-555 işaretli sekonder antikor, sığır serum albümin (bovine serum albumine, BSA) (Sigma-Aldrich, ABD), preparat kapatma çözeltisi (Abcam, İngiltere) immersiyon yağı (Sigma-Aldrich, ABD), (DEPC; Sigma Aldrich, ABD), total RNA izolasyon kiti (Omega Bio-tek, ABD), 2-merkaptoetanol, DNaz enzimi (DNase I), Dream Taq tampon çözeltisi, Taq polimeraz enzimi, 25 mM dNTP çözeltisi, 100 baz çifti (bç) DNA belirteci (Geneall, Güney Kore), oligo(dT) primerler, cDNA sentez kiti (New England Biolabs, Kanada), SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix çözeltisi (BioRad, ABD; yükleme boyası 5x (BioRad, ABD), etilendiamintetraasetik (EDTA), agaroz (Lonza, İsviçre), etidyum bromür, karboksidiklorodihidrofloresan diasetat (H2DCFDA), 4,5-diaminofloresan Diasetat (DAF2DA), (BioLegend), Balb-C serum (Odin Bioscience, ABD), PE-Texas red-A işaretli lateks fagositoz boncukları (Sigma-Aldrich, ABD).

Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan antikorlar.

Hedef Protein	Klon	Florokrom	Üretici Firma	Konsantrasyon
FOLR2	10/FR2	APC	Sony	1:100
F4/80	BM8	FITC	Biologend	1:100
CD11b	M1/70	APC-Cy7	Sony	1:100
CD206	C068C2	PE-Cy7	Sony	1:100
I-Ad (MHC-II)	39-10-8	Alexa Fluor 647	Biologend	1:100
CD40	HM40-3	FITC	BD Biosciences	1:100
CD80	16-10A1	PE-Cy7	Biologend	1:100
CD86	GL-1	PE	Biologend	1:100
CD69	104526	APC-Cy7	Biologend	1:100
CD62L	104412	APC	Biologend	1:100

3.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Tam RPMI besiyeri: L-glutamin (1 mM) içeren RPMI 1640 besiyeri son konsantrasyonu %20 olacak şekilde ısıyla inaktive edilmiş (56°C, 20 dakika) FBS ve son konsantrasyonu %1 olacak şekilde penisilin/streptomisin eklenerek tam RPMI besiyeri hazırlanır. Besiyeri 2-8°C'de saklanır ve raf ömrü 4 haftadır.

Folat içermeyen tam RPMI besiyeri: Tam RPMI besiyeri ile aynı şekilde hazırlanır.

PBS çözeltisi (1x): Tek kullanımlık toz formunda temin edilen ve 150 mM sodyum klorür ile 10 mM sodyum fosfat içeren karışım, 500 mL distile suda (dH₂O) çözülerek, 7.2 pH değerinde 1x PBS çözeltisi elde edilir. Çözelti otoklavlanarak sterilize edilir. 2-8°C sıcaklıkta 2 yıl saklanabilir.

Tripan Mavisi: Tripan mavisi tozunun, 1x PBS ile %4' lük (g/mL) çözeltisi hazırlanır. Oda sıcaklığında 1 yıl saklanabilir.

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT): Toz MTT, 1xPBS ile 5 mg/mL konsantrasyonda çözülür. Taze hazırlanır. Kullanılana kadar 2-8°C sıcaklıkta, ışıktan korunarak saklanabilir.

SDS/DMF çözeltisi: 25 mL DMF, 25 mL distile su ile karıştırılır. 10 gr SDS çözeltiye yavaşça eklenerek çözünür. Hidroklorik asit ve sodyum hidroksit ile pH 4,7'ye ayarlanır. Oda sıcaklığında saklanabilir.

Propidyum İyodür (PI): Toz propidium iyodür, distile su ile 5 mg/mL (2,5 mM) konsantrasyonda çözülür. 2-8° C sıcaklıkta, ışıktan korunarak 6 ay saklanabilir.

Lumogallion: Toz lumogallion, 1xPBS ile 0.2 mg/mL (0.58 mM) konsantrasyonda çözülür. -20° C sıcaklıkta, ışıktan korunarak saklanır.

Karboksi-diklorodihidrofloresan Diasetat (H2DCFDA): Liyofilize toz H2DCFDA, DMSO ile 100 mM konsantrasyonda çözülür. -80° C sıcaklıkta, ışıktan korunarak saklanır.

4,5-diaminofloresan Diasetat (DAF2DA): Liyofilize toz DAF2DA, DMSO ile 0.5 mM konsantrasyonda çözülür. -80° C sıcaklıkta, ışıktan korunarak saklanır.

Tris Borat EDTA (TBE) Tampon Çözeltisi: 800 mM konsantrasyonunda Tris, 900 mM konsantrasyonunda borat ve 25 mM konsantrasyonunda EDTA bileşenlerinden oluşan çözelti öncelikle 10x konsantrasyonda hazırlanır. Kullanılacağı zaman distile su ile 1x konsantrasyona seyreltilir. Çözelti oda sıcaklığında saklanır.

Sığır serum albumini %1 (BSA): Liyofilize toz BSA, distile su ile %1 (g/mL) konsantrasyonda çözülür. 2-8° C sıcaklıkta, ışıktan korunarak 6 ay saklanabilir.

3.3. Hücre Kültürü

3.3.1 J774.A1 Fare Monosit/Makrofaj Hücre Hattının Çözülmesi, Pasajlanması ve Dondurulması

Hücrelerin Çözülmesi

Erken pasaj sayısındaki J774.A1 fare (dişi Balb-c kökenli) monosit/makrofaj hücre hattı (Prof. Dr. Vedat Bulut, Gazi Üniversitesi, Türkiye, tarafından hediye edilen) kriyojenik tüplerde sıvı azot tankında (-196° C sıcaklıkta) saklanır. Çözme işleminde,

azot tankından alınan kriyojenik tüp 37° C'deki su banyosunda çözündürülmesi sağlanır. Erimeyi takiben çözünmüş halde toksisite gösteren dondurma ajanı DMSO'nun ortamdaki hızla uzaklaştırılması gerekmektedir. Kriyojenik tüp steril bir biçimde önceden ultraviyole ve %70'lik etanolle dekontamine edilen laminar akım kabine alınır. Hücreler 50 mL'lik tüp içerisindeki 37° C'deki tam RPMI besiyerine aktarılır. 1800 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek yıkanır. Laminar kabinde süpernatant uzaklaştırılarak hücre peleti 10 mL tam RPMI besiyerinde süspand edilir. Hücreler T-25 kültür kabına aktararak inkübatöre (37° C, %5 CO₂) yerleştirilir.

Hücrelerin Pasajlanması

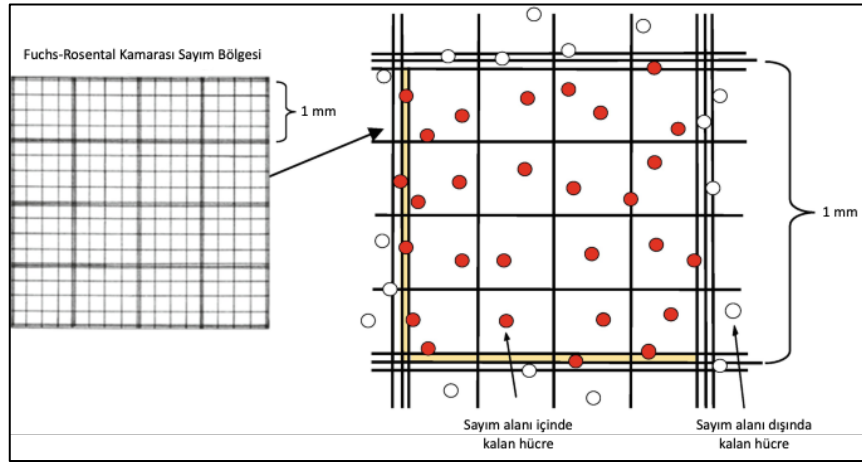
Mikroskop (*inverted*) ile hücrelerin kültür kabındaki yoğunluklarının yaklaşık %80'ne ulaştığının gözlemlenmesiyle yarı aderan özellikteki J774.A1 hücreleri hücre kazıyıcı (*cell scraper*) yardımıyla kültür kabı yüzeyinden kaldırılır. 10 mL'lik serolojik pipetle süspand edilen hücreler 1:10 oranında taze tam RPMI ile 10 mL'ye seyreltilerek pasajı tamamlanır. Toplanan 9:10'luk kısım deney kurulumunda, örnek büyütmede ve hücre dondurma işlemlerinde kullanılabilir veya atılır.

Hücrelerin Dondurulması

Hücrenin açılışını takiben ilk pasajdaki artan kısım T-75 kültür kaplarına alınır ve ortam hacmi taze tam RPMI ile 20 mL'ye çıkartılır. Hücre yoğunluğunun yaklaşık %80 olarak gözlemlenmesiyle hücreler kaldırılarak süspand hale getirilir (Bkz. Pasajlama). Hücrelerin sayımının (Bkz. 3.3.2) ardından, $1-5 \times 10^6$ hücre/mL konsantrasyonda %10 DMSO, %40 FBS, %50 tam besiyeri içeren dondurma ortamında homojen bir biçimde dağıtılır. DMSO'lu ortama alınır alınmaz hızlı bir şekilde 1-1.8 mL hacimlerde kriyojenik tüplere alınır. Sonrasında tüpler içerisinde izopropil alkol olan dondurma kabına (Mr. Frosty, Thermo Fisher, ABD) -80° C sıcaklıkta en az 24 saat bekletilerek yavaş donması sağlanır. Sonrasında kriyojenik tüpler, hücrelerin uzun süre saklanabileceği sıvı azot tankına aktarılır.

3.3.1 Hücre Sayımı

Pasaj sonrasında elde edilen homojen tek hücre süspansiyonundan 10 µL örnek alınarak 10 µL tripan mavisini çözeltisi ile karıştırılır. Karışım Fuchs-Rosental (Hausser Scientific, ABD) kamarası üzerine kapatılan lamel arasına kılcallık etkisi ile yayılır. Fuchs-Rosental kamarasının her bir sayım bölgesi 1x1 mm alana sahip 16 eşit kareden meydana gelmekte ve lamel arasındaki yükseklik 0.1 mm olmaktadır (Şekil 3.1) (59). Fuchs-Rosental kamarasıyla lamel arasında her bir eş kare ile sınırlanan alan 0.1 µL'lik hacime tekabül etmektedir. Mikroskopta 10x büyütmede tripan mavisini ile boyanan ölü hücreler dışlanarak sayım yapıldığında her bir 1 mm² alanındaki eş karede sayılan canlı hücre sayısı boyanmış örneğin 0.1 µL' si başına hücre konsantrasyonuna tekabül etmektedir (Formül 3.1). Hücre sayımında güvenilir bir sonuç elde edilmesi için boyama işlemi öncesi seyreltmeler, her bir eş karede 50-100 hücre dağılacak şekilde ayarlanmalıdır.



Şekil 3.1. Fuchs-Rosental kamarasının şematik görünümü (Neuendorf J., 2020' ten (59) uyarlandı).

$$\text{Alan} = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 1 \text{ mm}^2 \quad (3.1.)$$

$$\text{Hacim} = 1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3$$

$$\text{Hücre Konsantrasyonu (hücre/mL)} = \frac{\text{Hücre sayısı} \times 10^4}{(\text{Sayım alanı} / 1 \text{ mm}^2)} \times \text{Dilüsyon faktörü}$$

3.4. In vitro Analizler İçin Deney Tasarımının Oluşturulması

3.4.1 MTT Hücre Canlılık Analizi

Hücre pasajı sonrası toplanan J774.A1 hücreleri, kuyu başına 50 µL taze tam RPMI besiyeri içerisinde 7×10^3 hücre (Bkz. 3.3.1) düşecek şekilde düz altlı 96 kuyucuklu plakalara ekildi. Hücrelerin adezyonu için 16 saat beklenilmesinin ardından üzerlerine 50 µL tam RPMI besiyeri içerisinde alüminyum hidroksit adjuvanlı tetanoz difteri aşısı (Td) ürünü uygulandı. Hücreler bu şekilde; 0, 3, 6, 12, 24 $\times 10^{-3}$ Td seyreltmelerine (aşı kısa ürün bilgisinde verilen maksimum Al^{3+} miktarı üzerinden; 0, 7.5, 15, 30, 60 µg/mL konsantrasyonlarda) 24, 48, 72 saat maruz bırakılmıştır. İnkübasyonların ardından kuyulara 25 µL, 5 mg/mL MTT çözeltisi eklenerek 4 saat 37 ° C' de bekletildi. Sonrasında, kuyulara 80 µL SDS/DMF çözeltisi eklenir. Devamında 16 saat, 37 ° C' deki inkübasyonun ardından kuyularda oluşan renkli çözeltinin absorbansı SDS/DMF kör okumasına karşı, 570 nm dalga boyunda, mikropilaka spektrofotometresinde (Spectra Max Molecular Devices, ABD) ölçülür. Her bir koşul için dördümlü teknik replikadan elde edilen kontrole (0 µg/mL Td) göre OD (*optical density*, optik yoğunluk) yüzde değişim değerleri Formül 3.2' de belirtildiği gibi hesaplanır.

$$\text{Canlı hücre miktarı \%} = \text{Td uygulanmış kuyu OD} / \text{kontrol OD ortalaması} \times 100$$

(3.2.)

3.4.2 Propidyum İyodür Hücre Canlılık Analizi

Toksisiteyle gelişen apoptotik ve nekrotik süreçlerde bozulan membran bütünlüğü nedeniyle propidyum iyodür (PI) hücre içine girerek DNA' ya bağlanabilmekte böylece PI sinyali alınmayan hücreler üzerinden canlılık doğrudan ölçülebilmektedir. Canlılığının korunduğu Td konsantrasyonlarının MTT analizi ile tespitinin ardından deneyler yaklaşık 1.8 µM folat içeren standart tam RPMI besiyeri (yüksek folatlı ortam) ve folat içermeyen tam RPMI besiyeri (düşük folatlı ortam; 0.3 nM folat içeren) (60) olmak üzere iki farklı ortamda kurulmuştur. Hücreler, 12

kuyucuklu plaklara, 0.9 mL hacimde standart veya folat içermeyen tam RPMI besiyeri içerisinde 2×10^5 hücre yoğunluğunda ekilmiştir. Hücrelerin düşük veya yüksek folat ortamlarında ekiminin ve 16 saatlik adezyon sürelerinin ardından, MTT analiziyle tespit edilen toksik olmayan maksimum Td konsantrasyonu olan $15 \mu\text{g/mL}$ (6×10^{-3} seyreltmesi) ve $5 \mu\text{g/mL}$ (2×10^{-3} seyreltmesi) son konsantrasyonunda iki farklı Td uygulaması ya tek başına ya da LPS (250 ng/mL son konsantrasyonunda, aksi belirtilmediği sürece) ile birlikte yapılmıştır (Tablo 3.2). Tüm, Td konsantrasyonları ile LPS kombinasyonları standart veya folat içermeyen tam RPMI besiyeri içerisinde, belirtilen son konsantrasyonlarına uygun miktarda (10x konsantrasyonda) $100 \mu\text{L}$ hacimde kuyulara uygulanmış eliptik karıştırma yöntemiyle kuyu içerisinde uygulanan içeriğin homojen dağılımı sağlanmıştır.

Tablo 3.2. *In vitro* analizler için deney tasarımı.

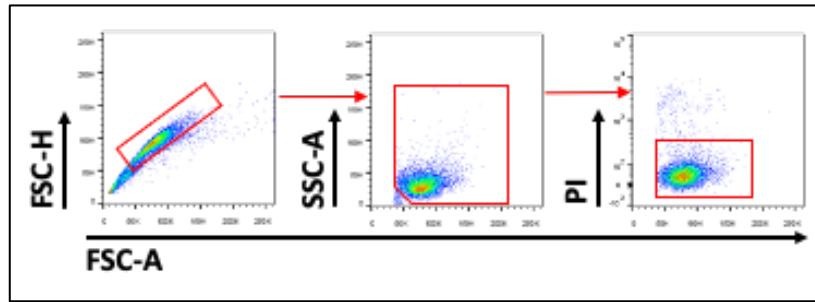
<u>Kontrol</u>	<u>5 $\mu\text{g/mL}$ Td</u>	<u>15 $\mu\text{g/mL}$ Td</u>	<u>Kontrol</u>	<u>5 $\mu\text{g/mL}$ Td</u>	<u>15 $\mu\text{g/mL}$ Td</u>
<u>0.3 nM / 1.8 μM Folat</u>			<u>0.3 nM / 1.8 μM Folat</u>		
<u>LPS Uygulanmamış (Uyarılmamış)</u>			<u>LPS Uygulanmış (Uyarılmış)</u>		

Tablo 3.2' de tarif edilen formülasyon kombinasyonlarının uygulanmasını takiben hücreler 48 saat inkübe edilir. İnkübasyonun ardından, öncelikle süspende haldeki hücre fraksiyonu toplanıp kuyularda kalan FBS içeriği tripsinizasyon öncesi 1xPBS ile yıkaması ile uzaklaştırılır. Sonrasında kuyu yüzeyini kaplayacak miktarda 10x Tripsin–EDTA eklenir ve plakalar 3 dakika 37°C ' de inkübe edilir. Serbestleşen adheran hücre fraksiyonu 1xPBS ile yıkanarak öncesinde toplanan süspende fraksiyonla birleştirilir ve hücreler 1xPBS ile 1800 rpm' de 5 dakika santrifüjlenerek yıkanır. Süpernatant dökülerek hücre pelleti $100 \mu\text{L}$ Cell wash™ standardize 1xPBS ürünü içerisinde dağıtılmasıyla tek hücre süspansyonu halinde akım sitometrisi örnekleri hazır hale getirilir.

Örneklerin, $1 \mu\text{L}$ PI (5 mg/mL) çözeltisi eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmesiyle boyama işlemi yapılır. Sonrasında örneklerin 1800 rpm' de 5 dakika santrifüjlenmesiyle serbest PI yıkanarak uzaklaştırılır. Pellet Cell wash™

ile dağıtılarak tek hücre süspansyonu haline getirilir ve akım sitometrisi cihazıyla (FACSCanto II, BD, ABD) analiz gerçekleştirilir.

Akım sitometrisi örneklerinin analizi, tercih edilen kapılama stratejisinde (Bkz. Şekil 3.2) hücrelerin boyutsal (*Forward Scatter*, FSC) ve granüler (*Side Scatter*, SSC) ayrımlarını takiben PI ile boyanmamış en az 10^3 canlı hücrenin cihaz tarafından okunmasıyla yapılır. Deney sonucunda veri dosyaları .fcs (*Flow Cytometry Standard*) dosya formatına getirilip FlowJo yazılımı (Tree Star, ABD) kullanılarak veri analizi gerçekleştirilir.



Şekil 3.2. Akım sitometrisi analizleri için kapılama stratejisi.

3.4.3. Hücrelerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

Hücrelerin düşük ve yüksek folat içerikli ortamda, 16 saat adezyon süresini takiben Tablo 3.2’de belirtilen formülasyonlarla 48 saat inkübasyonunun ardından PI boyamasıyla canlı olarak tespit edilen (3.4.1’ de tarif edildiği gibi) hücrelerde granülaritedeki değişimin incelenmesi, SSC-A (*Side Scatter-Area*) değerlerinin ortanca ışıma yoğunluğunun (OFY, *median fluorescence intensity*) FlowJo yazılımı kullanılarak analizi edilmesi ile gerçekleştirilir.

Akım sitometri ile granülaritedeki değişimin kantitiye analizinin yanı sıra hücrelerin doğrudan, formülasyonlarla 48 saat inkübe edildikleri 12 kuyucuklu plakalardaki morfolojik özelliklerinin görüntülemeleri ters ışık mikroskobu (IMT-2, Olympus, Japonya) ile 75x büyütmede gerçekleştirilmiştir.

3.4.4. Alüminyum Adjuvanın Hücresel Alımının İncelenmesi

Hücrelerin düşük ve yüksek folat içerikli ortamda, 16 saat adezyon süresini takiben Tablo 3.2'de belirtilen formülasyonlarla 24 ve 48 saatlik inkübasyonun ardından hücreler tarafından internalize edilen Al^{3+} düzeyleri lumogallion boyamasıyla incelenmiştir. Hücreler tripsinizasyon (Bkz. 3.4.2) işlemiyle toplanıp 20 μM lumogallion içeren 1 mL tam RPMI besiyeri ortamında tekrar 12 kuyucuklu plakalara ekilir ve 37° C' de 4 saat inkübe edilir. Lumogallion ile boyanan hücrelerin toplanıp 1x PBS ile 2 sefer 1800 rpm' de 5 dakika santrifüjlenerek yıkanmasıyla serbest lumogallion ortamdaki uzaklaştırılır. Hücre pelleti Cell wash™ ile süspand edilerek başlık 3.4.2 altında anlatılan FSC ve SSC kapılama stratejisi uygulanmasıyla akım sitometrisi analizi gerçekleştirilir. Analiz sonrası tüplere 100 μL örnek hacmi için 30 μL tripan mavisi çözeltisi eklenerek hücre yüzeyinden alınan floresan sinyalinin söndürülmesi işlemi (*quenching*) yapılmış ve lumogallion floresan sinyalinin hücre içinden kaynaklandığı doğrulanmıştır. FlowJo yazılımı kullanılarak yüzde lumogallion pozitifliği ve lumogallion OFY değerleri hesaplanmıştır.

3.5. Monosit/Makrofaj Hücrelerinin Aktivasyon ve Matürasyonunun İncelenmesi

3.5.1. İmmünofenotipleme

Hücrelerin düşük ve yüksek folat içerikli ortamda, 16 saat adezyon süresini takiben Tablo 3.2'de belirtilen formülasyonlarla 48 saat inkübasyonun ardından başlık 3.4.2 altında tarif edildiği gibi 100 μL Cell wash™ içerisinde tek hücre süspansiyonları hazırlanır. İmmünofenotipleme için hücrelerin yüzey belirteçleri Tablo 3.1' de listelenen florokrom işaretli antikor ürünleri ile 1:100 dilüsyonda 25 dakika oda sıcaklığında karanlıkta boyanır. İnkübasyonun 20. dakikasında ise 5 dakikalık PI boyamasının inkübasyonu başlatılır. İnkübasyonun ardından bağlanmayan antikorlar ve PI içeriği 1800 rpm' de 5 dakika santrifüjlenerek uzaklaştırılır. Hücre pelleti Cell wash™ ile tekrar süspand edilerek akım sitometrisi analizi en az 10^3 canlı hücre

üzerinden gerçekleştirilir (Bkz. 3.4.2). FlowJo yazılımı kullanılarak ilgili yüzey belirteçlerinin ifade düzeyleri için OFY değerleri hesaplanır.

3.5.2. İmmünofloresan

Yüksek folat içerikli ortamda, 16 saat adezyon süresinin ardından hücrelere 1 µg/mL konsantrasyonda LPS uygulaması yapılmıştır. 24 saat inkübasyonun ardından başlık 3.4.2 altında tarif edildiği gibi Cell wash™ içerisinde tek hücre süspansiyonları hazırlanır. Kontrol ve LPS koşulu için hücre sayımı (Bkz. 3.3.1) yapılarak 3.5×10^5 hücreye karşılık gelen hacim alınıp Cell wash™ ile 1 mL' ye tamamlanır. Sonrasında tüm hacim lam üzerine kurutma kağıdıyla yerleştirilen sitospin (*cytospin*) aparatının kuyularına alınır ve sitospin cihazında (Hettich Universal 320, Almanya) örnekler santrifüjlenir. Sonrasında süpernatant uzaklaştırılmasının ardından spin aparatı çıkartılarak kalan sıvının kurutulması için örnekler 150xg de 1 dakika santrifüjlenir ve 16 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılır.

Kurutma işleminin ardından sitospinle hücrelerin lamele yapıştığı alanda boyama işlemleri gerçekleştirilir. Alanın yüzeyi %4'lük formaldehitte kaplanıp 15 dakika boyunca fikse edilir. Fiksasyonun ardından formaldehit uzaklaştırılır ve 1xPBS ile 3 defa 5 dakikalık inkübasyonlarla yıkama yapılır. Sonrasında 1xPBS içerisindeki %0.1'lik Triton X-100 çözeltisiyle 10 dakika permabilizasyon yapılır. Devamında 1xPBS ile 3 defa 5 dakikalık inkübasyonlarla yıkama işlemi tekrarlanır. Sonrasında %1'lik BSA çözeltisi ile 1 saat boyunca bloklama yapılır ve inkübasyonun ardından 1xPBS ile 3 defa 5 dakikalık inkübasyonlarla yıkama işlemi tekrarlanır. Tavşan kökenli FOLR2 primer antikorunu %1'lik BSA ile 1:200 seyreltilerek örnekler üzerine uygulanır ve 1 saat inkübasyona bırakılır. Primer antikorla inkübasyonun ardından 1xPBS ile 3 defa 5 dakikalık inkübasyonlarla yıkama işleminin tekrarlanmasını takiben %1'lik BSA içerisinde hazırlanan 1:200 seyreltmedeki Alexafluor-555 işaretli Anti-tavşan sekonder antikorunu ve 1:300 seyreltmedeki hücre çekirdek boyası DAPI karışımı örnekler üzerine uygulanarak 1 saat inkübasyona bırakılır. Son defa 1xPBS ile 3 defa 5 dakikalık inkübasyonlarla yıkama işlemi tekrarlanmasının ardından örneklerin bulunduğu alana kapatma solüsyonu (*mounting media*) damlatılarak 0,17 mm

kalınlığındaki lamel ile kapatılır. Preparatın kurummasını önlemek için lamelin etrafı oje ile mühürlenir. Hazırlanan preparatlar +4° C'de en az 2 ay saklanabilmektedir.

Floresan mikroskopisi görüntülemeleri için, immersiyon yağı damlatılmış örnekler 100x objektifte epifloresan mikroskoba (Olympus BX51, Japonya) yerleştirilir. Görüntülemeler soğutmalı 5,0 mega piksel CCD renkli kamera (DC5000i, Euromex, Hollanda) ile alınır. Floresan görüntülerinin analizinde ImageJ yazılımı (NIH, ABD) kullanılır.

3.5.2. Moleküler Teknikler

RNA İzolasyonu

Her bir koşul için elde edilebilecek RNA miktarının artırılması için hücreler, 6 kuyucuklu plaklara, 1.8 mL hacimde standart veya folat içermeyen tam RPMI besiyeri içerisinde 6×10^5 hücre yoğunluğunda ekilmiştir. Hücrelerin düşük veya yüksek folat içerikli ortamda ekiminin ve 16 saatlik adezyon sürelerinin ardından 200 µL hacimde standart veya folatsız tam RPMI besiyeri içerisinde Tablo 3.2' de açıklanan formülasyonlar 10x konsantrasyonda uygulanarak aynı final konsantrasyonlar 2 mL kültür ortamı için de elde edilmiştir (Bkz 3.4.2).

Moleküler çalışmalarda DNA ve RNA kontaminasyonunun önlenmesi için dietilpirokarbonat (DEPC) ve otoklav sterilizasyonu ile dekontamine edilmiş pipet uçları ve tüpler kullanılır. Hücrelerden RNA izolasyonunun inkübasyonların 24. saatinde (Folr2 için 24. saat de dahil; 6, 12 ve 48. saatler de çalışılmıştır) gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Literatürde, J774 hücrelerinde tüberküloz basili enfeksiyonunun incelendiği transkriptomik çalışmalarında, farklı ifadelenen gen (*differentially expressed genes*) profillerinin enfeksiyonun 24. saatinde belirginlik kazanması nedeniyle bu zaman noktası tercih edilmiştir (61). Formülasyonlarla 24 saat veya sadece standart tam RPMI' lı ortamda LPS uygulamasının yapıldığı koşul için 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonun ardından hücreler başlık 3.4.2 altında anlatıldığı gibi toplanır. Devamında örnekler, 1x PBS ile ilki 5, ikincisi 10 dakika olmak üzere 2 sefer 1800 rpm' de santrifüjlenerek yıkanır. Yıkamaların ardından kalan süpernatant

tamamen uzaklaştırılır. İzolasyonun diğer aşamalarında E.Z.N.A Total RNA Kit I (Omega Biotek,ABD) kit protokolleri takip edilir.

Kit içeriğinde bulunan TRK lizis tamponu %0.2 oranında β - merkaptoetanol eklenerek hazırlanır ve pellet halindeki örneklerin üzerine 75 μ L TRK lizis tamponu eklenir. Tüm hücrelerin parçalanması için örneklere sert pipetleme ve 3 dakika vorteks işlemi uygulanır. Lizisi tamamlanan örneklerin üzerine hacimleri kadar %70' lik etanol eklenir, örnekler pipetleme ile karıştırılarak RNA izolasyon kolonlarına yüklenir. Kolonlar 10.000xg' de 1 dakika santrifüjlenerek örneklerin kolona yüklenmesi sağlanır. Kolon üstünde hacim kalması durumunda ilgili kolon için santrifüj işlemi tekrarlanır. Elüsyon işlemine kadar kolon alt haznesine geçen sıvı her zaman atılır. Devamında, kolonlar 250 μ L RNA Wash Buffer I ile 10.000xg' de 1 dakika santrifüjlenerek yıkanır. Sonrasında, kolonlara 75 μ L DNase I karışımı (73.5 μ L DNase I tamponu + 1.5 μ L 20 Kunitz/ μ L DNase I) eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilir. DNase I enziminin ve enzim kataliziyle parçalanmış DNA' nın kolonlardan uzaklaştırılması için kolonlara 250 μ L RNA Wash Buffer I yüklenir ve 2 dakika inkübe edilen kolonlar 10.000xg' de 1 dakika santrifüjlenerek yıkanır. Sonrasında kolonlara 2 sefer 500 μ L RNA Wash Buffer II ile 10.000xg' de 1 dakikalık santrifüjlerle yıkama yapılır. Yüksek etanol içeriğine sahip RNA Wash Buffer II' nin buharlaştırma yoluyla uzaklaştırılması için kolonlar herhangi bir yükleme yapılmadan maksimum g değerinde ağızları açık bir biçimde 2 dakika santrifüjlenir. Elüsyon için kolonlar örnek toplama tüplerine (1.5 mL' lik) yerleştirilir. Kolona bağlı haldeki saflaştırılmış total RNA nın izolasyonu için kolonlara 30 μ L steril ultra saf su yüklenir ve 1 dakika inkübasyonun ardından maksimum g değerinde 2 dakika santrifüjlenerek elüsyon işlemi gerçekleştirilir. RNA moleküllerinin kolondan ayrılmasıyla birlikte stabilitelerinin azalması nedeniyle kalan aşamalara buz üzerinde devam edilir.

Örneklerden izole edilen total RNA' nın konsantrasyonu ve saflığı UV spektrofotometrede (NanoDrop ND-1000, ABD) 230 nm, 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans ölçümleri ile kontrol edilir. RNA örneklerinin kalitesi; RNA konsantrasyonunun 80 ng/ μ L' den fazla olması, $A_{260}/A_{280}>2$ ve $A_{260}/A_{230}>1.7$

saflik parametrelerini sağlamasi açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen RNA rnekleri -80° C'de saklanır.

Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

İzolasyonu yapılan RNA rneklerinin mRNA içeriğinden komplementer DNA (cDNA) sentezi ProtoScript II First Strand cDNA Sentez Kiti (New England BioLabs, ABD) kullanılarak buz üzerinde DEPC ile muamele edilmiş malzemeler ile gerçekleştirilmiştir. Takip edilen kit protokolü özetle; 2 μL oligo d(T) primeri (50 μM), 480 ng RNA rneği ve son hacim 8 μL olacak şekilde steril ultra saf su ile seyreltilerek PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu) cihazında (Thermal Cycler, Thermo Scientific, ABD) 65° C'de 5 dakika tutularak oligo d(T) primerinin bağlanması sağlanır. Sonrasında, RNA örneklerine kitin sağladı 10 μL 2x reaksiyon tamponu ve 2 μL 10x enzim karışımı (M-MuLV Reverse Transkriptaz ve RNaz İnhibitrn) eklenerek 42°C'de 60 dakika Thermal Cycler'da inkübe edilerek cDNA sentezlenir. Devamında 80° C'de 5 dakika inkübe edilerek enzim inaktivasyonu sağlanır. Elde edilen cDNA rnekleri, -20°C sıcaklıkta saklanır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Gen ifadesinin incelenmesinde kullanılan primer çiftleri dizilerine ilişkin bilgiler Tablo 3.3' te paylaşılmıştır. Tüm primer çiftlerden en az bir tanesi, ilgili genin ekzon-ekzon birleşme bölgesine bağlanmaktadır.

Tablo 3.3. PZR analizlerinde kullanılan primerlere ilişkin bilgiler.

Gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Ürün Bazıftı	Genbank No.
Actb	CACTGTCTGAGTCGCGT CC	TCATCCATGGCGAAC TGGTG	89	NM_007 393.5
Folr2	GTGGACCAGAGTTGG CGTAA	GGGCACTTGTTAATG CCTGAG	152	NM_001 303239.1
Il1b	TGCCACCTTTTGACAG TGATG	AAGGTCCACGGGAA AGACAC	220	NM_008 361.4
Il18	CCGCCTCAAACCTTCC AAATC	TGTCTGATTCCAGGT CTCCATTT	149	NM_008 360.2
Tnf	AGGCACTCCCCAAAA GATG	CCATTTGGGAAGTTC TCATCCC	157	NM_013 693.3
Il6	GGATACCACTCCAAC AGACC	GAATTGCCATTGCAC AACTCTTTTC	111	NM_031 168.2
Ccl5	TATGGCTCGGACACCA CTCC	TTCCTTCGAGTGACA AACACGAC	131	NM_013 653.3

Gradyan PZR için gerekli bileşenler Tablo 3.4 ve reaksiyon protokolü Tablo 3.5' de özetlenmiştir. PZR reaksiyonu hazırlıklarının buz üzerinde gerçekleştirilir. Öncelikle, steril ultra saf su, Taq tampon çözeltisi, dNTPs (deoksinükleotit trifosfat karışımı), primerler, MgCl₂ eklenerek reaksiyon ortamı oluşturulur. Daha sonra Taq DNA polimeraz enzimi eklenerek karışım 200 µL'lik PZR tüplerine eşit biçimde (24 µL) dağıtılır. Ardından, elde edilen cDNA örnekleri (1 µL) eklenir. Pozitif kontrol olarak ilgili genleri ifade ettiği bilinen, laboratuvarın daha önceki çalışmalarında; fare akciğer, karaciğer, lenf nodu, böbrek, beyin, kemik iliği, kan, meme ve 4T1 tümör dokularından izole edilen RNA'lardan birleştirilerek sentez edilen cDNA karışım örneği tüplere eklenir. Hazırlanan PZR tüpleri Thermal Cycler'a yerleştirilir.

Tablo 3.4. PZR reaksiyonu bileşenleri.

Bileşen	Hacim (μL)	Son Konsantrasyon
Taq Tampon çözeltisi (10x)	2,5	1x
dNTP mix (2 mM)	2,5	0,2 mM
MgCl₂(25 mM)	2,5	2,5 mM
Forward Primer	1	0,2 μM
Reverse Primer	1	0,2 μM
Taq DNA Polimeraz (5 U/μL)	0,25	0,05 U/ μL
H₂O	14,25	
cDNA	1	
Son Hacim	25	

Optimizasyonu laboratuvarın daha önceki çalışmalarında yapılmış olan Actb (62.9 °C) ve Folr2 (62.1 °C) hariç diğer tüm genler için Tablo 3.5'te belirtilen gradyan PZR programıyla reaksiyon gerçekleştirilir. Gradyan PZR sonucunda Il1b, Il18, Tnf, Il6 ve Ccl5 primerleri için optimal bağlanma sıcaklığı 62.9 °C olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.5. Gradyan PZR protokolü.

İlk Denatürasyon	95°C	30 sn	} 40 Döngü
Denatürasyon	95°C	30 sn	
Bağlanma	58-62.9	30 sn	
Uzama	72°C	20 sn	
Son Uzama	72°C	5 dk	

Agaroz Jel Elektrofrez

Reaksiyon sonrasında PZR ürünleri agaroz jel elektrofrezinde yürütülmüştür. Agaroz jel (%2'lik) 1x TBE tampon çözeltisi içerisinde hazırlanır. Karışımdaki jel kristalleri mikrodalga fırınında eritilerek TBE çözeltisi içinde çözündürülür, sıcaklığı 60°C' ye düştüğünde son konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde etidyum bromür eklenerek karıştırılır. Elde edilen sıvı jel karışımı kalıba dökülerek kuyular için taraklar

yerleştirilir. Jel katılaşması için oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra taraklar çıkarılarak jel 1x TBE tampon çözeltisi içinde yürütme tankına yerleştirilir. Her bir PZR ürününden 20 µL alınıp ve 5 µl 5x yükleme boyası ile karıştırılır ve jel kuyusuna yüklenir. 5 µL 100 bç DNA belirteci ampikon büyüklüğünün kontrolü için ilk kuyuya yüklenir. Yürütme işlemi (100 V, 75 dakika, oda sıcaklığında) tamamlandıktan sonra PZR ürünleri görüntüleme sisteminde UV ışık altında görüntülenir.

Gerçek-Zamanlı PZR

Gen ifadesinin kantitatif analizi için gerçek-zamanlı pqr (kantitatif pqr) tekniği ile çalışılmıştır. Gerçek-zamanlı PZR reaksiyonu için bileşenler Tablo 3.6' da paylaşılmıştır.

Tablo 3.6. Gerçek-zamanlı PZR reaksiyon bileşenleri.

Bileşenler	Hacim (µL)	Final Konsantrasyon
SYBR Green Supermiks çözeltisi (2x)	5	1X
<i>Forward Primer</i> (5 µM)	1	0,5µM
<i>Reverse primer</i> (5 µM)	1	0,5µM
H ₂ O	2	
cDNA örneği	1	
Toplam Hacim	10	

1,5 mL' lik tüplerde SYBR green Süpermiks çözeltisi (Biorad, ABD), steril ultra saf su, *forward* ve *reverse* primerler reaksiyon karışımı hazırlanır. Karışım PZR tüplerine (Biorad, ABD) eşit hacimde (9 µL) dağıtılır. Her bir koşul için ikili teknik tekrar olacak şekilde ilgili koşulun cDNA (11 ng) kuyulara eklenir. PZR tüpleri gerçek-zamanlı PZR cihazına (BIO-RAD Real Time PCR Detection System, ABD) yerleştirilir ve Tablo 3.7'de verilen protokole göre reaksiyon gerçekleştirilir.

Tablo 3.7. Gerçek-zamanlı PZR protokolü.

Polimeraz aktivasyonu ve DNA denatürasyonu	95 °C	3 dk	
Denatürasyon	95 °C	15 sn	} 40 Döngü
Bağlanma	62.1/62.9 °C	30 sn	
Uzama	72 °C	20 sn	
Melting-curve analizi	55-95 °C (0.5 °C artış)	5 sn/adım	

Gerçek-zamanlı PZR analizi sonrasında elde edilen detekte edilebilir döngü değerleri (*cycle of threshold*, Ct) ilgili çalışmada aynı koşullar için elde edilen referans gen Actb (β -aktin) Ct değerleri ile normalize edilerek Δ Ct değerleri elde edilir. Düşük/yüksek folat içerikli ortamlardan hazırlanan örneklerin beraber çalışıldığı deneylerde referans örnek, düşük folatlı ortamın uyarılmamış kontrol koşulu kabul edilirken; sadece yüksek folatlı ortamlardan hazırlanan örneklerin çalışıldığı deneylerde referans örnek, yüksek folatlı ortamın uyarılmamış kontrol koşulu kabul edildiği normalizasyon işlemleriyle $-\Delta\Delta$ Ct değerleri hesaplanmıştır. Koşullar arası rölatif transkript miktarlarındaki değişimin incelenebilmesi için $2^{-\Delta\Delta$ Ct değerleri hesaplanarak analizler tamamlanmıştır. Gerçek-zamanlı PZR veri analizi için kullanılan Formül 3.3' deki hesaplamalar kullanılmıştır.

$$2^{-\Delta\Delta$$
Ct} = 2^{-(\DeltaCt hedef örnek - Δ Ct referans örnek)} \quad (3.2.)
$$= 2^{-[($$
Ct hedef gen - Ct referans gen)hedef örnek - (Ct hedef gen - Ct referans gen)referans örnek]}

3.5.1. Fonksiyonel Analizler

Fagositoz Analizi

Fagositoz inkübasyonu öncesinde PE-Texas red-A işaretli, satandardize, lateks fagositoz boncuklarının; Balb-c fare serumu ile, 5x seyreltmede, 37 °C' de 1 saatlik inkübasyonla opsonizasyon işlemi gerçekleştirilir. Fagositoz boncukları PE-Texas red-A işaretli oldukları için daima ışıktan korunarak çalışılır. Eş zamanlı olarak, Hücrelerin düşük ve yüksek folat içerikli ortamlarda 16 saat adezyon süresini takiben Tablo

3.2'de belirtilen formülasyonlarla 48 saat inkübasyonun ardından başlık 3.4.2 altında tarif edildiği gibi 1xPBS içerisinde tek hücre süspansiyonları hazırlanır. Hücre sayımı (Bkz. 3.3.1) yapılarak 3×10^5 hücreye karşılık gelen hacimler 1.5 mL'lik tüplere alınarak santrifüjle çöktürülür. Hücre pelleti 190 µL hacimde standart veya folat içermeyen tam RPMI besiyeri ile tekrar süspande edilir. Sonrasında tüplere 10 µL hacimde serum içerisindeki opsonize fagositoz boncukları eklenerek boncuklar için 100x son seyreltmesi sağlanmış olunur. Sonrasında örnekler 37 °C' de 4 saatlik inkübasyonuna kaldırılır.

Fagositoz inkübasyonunun ardından örneklerin 1x PBS ile 1800 rpm' de 5 dakika santrifüjlenerek yıkanmasıyla serbest PE-Texas red-A ortamdan uzaklaştırılır. Hücre pelleti Cell wash™ ile tekrar süspande edilerek başlık 3.4.2 altında anlatılan FSC ve SSC kapılama stratejisi uygulanmasıyla akım sitometrisi (FACSAria II, BD, ABD) analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonrası başlık 3.4.4 altında anlatıldığı gibi hücre yüzeyinden alınan floresan sinyalinin söndürülmesi işlemi yapılmış ve PE-Texas red-A floresan sinyalinin hücre içinden kaynaklandığı doğrulanmıştır. FlowJo yazılımı kullanılarak yüzde fagositoz boncuğu (PE-Texas red-A) pozitifliği ve pozitif hücreler üzerinden PE-Texas red-A OFY değerleri hesaplanmıştır. Her bir formülasyon kombinasyonu için hücrelerdeki fagositoz kapasitesi yüzde değişiminin hesaplanmasında Formül 3.4' ten yararlanılmıştır.

$$\% \text{Aktivite Değişimi} = [(OFY \ 1.8 \ \mu\text{M} \ \text{Folat}) / (OFY \ 0.3 \ \text{nM} \ \text{Folat}) \times 100] - 100$$

(3.4.)

Akım sitometri analizinin yanı sıra fagositoz aktivitesindeki değişim floresan mikroskopisiyle de incelenmiştir. Akım sitometrisi için hazırlanan örneklerden 2×10^5 hücreye karşılık gelen hacim ayrılarak hacmi Cell wash™ ile 1 mL'ye tamamlanır. Sonrasında tüm hacim lam üzerine kurutma kağıdıyla yerleştirilen sitospin (*cytospin*) aparatının kuyularına alınır ve sitospin cihazında (Hettich Universal 320, Almanya) örnekler santrifüjlenir. Sonrasında süpernatant uzaklaştırılmasının ardından spin aparatı çıkartılarak kalan sıvının kurutulması için örnekler 150xg de 1 dakika

santrifüjlenir ve 16 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Sonrasındaki örnekler 1:300 oranında DAPI eklenmiş kapatma solüsyonu damlatılarak 0,17 mm kalınlığındaki lamel ile kapatılır. Preparatın kurummasını önlemek için lamelin etrafı oje ile mühürlenir. Hazırlanan preparatlar +4° C'de en az 2 ay saklanabilmektedir. Floresan mikroskopisi görüntülemeleri için, immersiyon yağı damlatılmış örnekler 100x objektifte epifloresan mikroskoba (Olympus BX51, Japonya) yerleştirilir. Görüntülemeler İmmünofloresan başlığı altında tarif edildiği şekilde gerçekleştirilir.

Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Nitrik Oksit (NO) Analizi

Hücrelerin düşük ve yüksek folat içerikli ortamlarda 16 saat adezyon süresini takiben Tablo 3.2'de belirtilen formülasyonlarla 3 saat inkübasyonun ardından başlık 3.4.2 altında tarif edildiği gibi Cell wash™ içerisinde tek hücre süspansiyonları hazırlanır. Hücre sayımı (Bkz. 3.3.1) yapılarak 10⁵ hücreye karşılık gelen hacimler ROS (*reactive oxygen species*) ve NO analizleri için ayrı ayrı akım sitometrisi tüplerine alınıp hacimleri 100 µL' ye tamamlanır. Karanlık ortamda tüplere 2 µl hacminde H2DCFDA (ROS indikatörü) çözeltisi veya 1 µl hacminde DAF2DA (NO indikatörü) çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 25 dakika inkübe edilir. İnkübasyonunun ardından örneklerin hızlı bir şekilde Cell wash™ ile 1800 rpm' de 5 dakika santrifüjlenerek yıkanmasıyla serbest H2DCFDA veya DAF2DA reaktifleri ortamdan uzaklaştırılır. Hücre pelleti Cell wash™ ile tekrar süspande edilerek analiz sırası gelene kadar tüpler +4 °C' de saklanır. Başlık 3.4.2 altında anlatılan FSC ve SSC kapılama stratejisi uygulanmasıyla akım sitometrisi (FACSCanto II, BD, ABD) analizi gerçekleştirilir. FlowJo yazılımı kullanılarak H2DCFDA ve DAF2DA OFY değerleri hesaplanmıştır. Her bir formülasyon kombinasyonu için hücrelerdeki ROS ve NO içeriği yüzde değişiminin hesaplanmasında Formül 3.3' ten yararlanılmıştır.

3.6. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Deneylerden elde edilen sonuçlar istatistiksel analizi, *Student's paired* veya *unpaired* testleri, ANOVA, *Mann-Whitney U* testi veya Ki-kare testleri ile gerçekleştirilerek istatistiksel farklılıklar gösterildi. P değerleri <0,05 veya <0,01

olduğunda elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Grafiklerdeki ortalama standart hata ile birlikte gösterildi.

4. BULGULAR

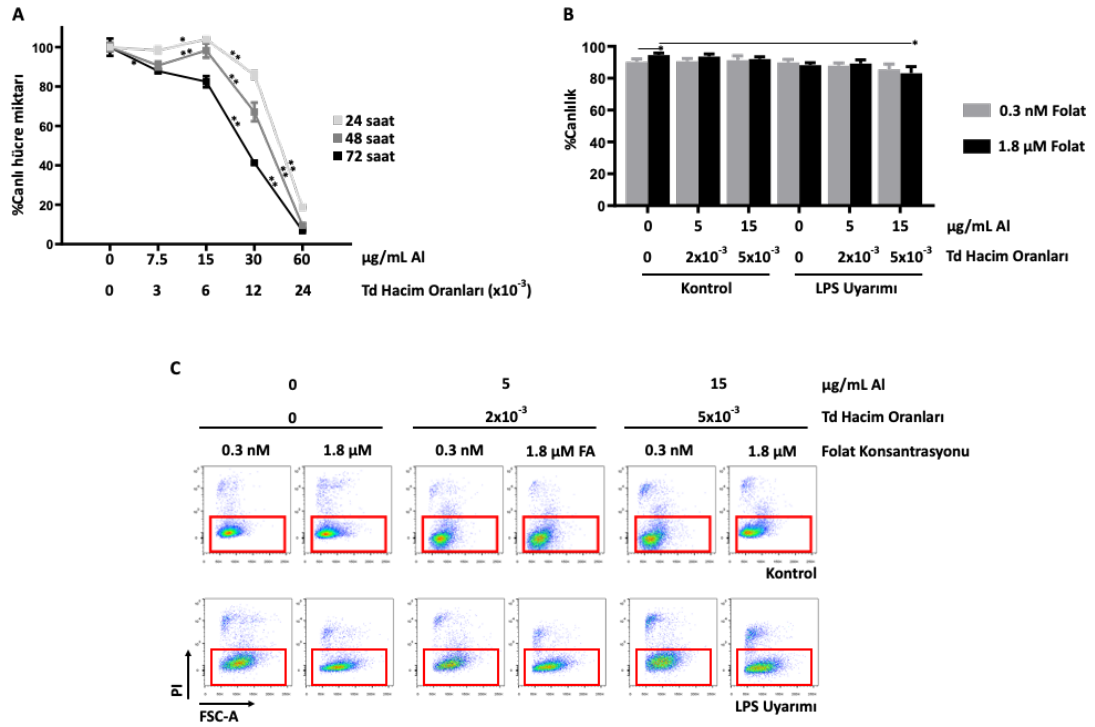
Alüminyum adjuvanlı aşılar karşı gelişen makrofaj yanıtları ve bu yanıtlarda folatın rolünün araştırılması amacıyla; bu çalışmada, J774.A1 fare monosit/makrofaj hücreleri *in vitro* model olarak kullanılmıştır. J774.A1 hücreleri; LPS'e hassas, fagositoz kapasitesi (62), IL-6 ve diğer makrofaj hücre hatlarına kıyasla aktif IL-1 β proinflatuvar sitokin üretiminin yüksek olması (63) ve çeşitli adjuvan araştırmalarında model antijen sunan hücre olarak kullanılması (62, 64-66) gibi özellikleri nedeniyle tercih edilmiştir.

Makrofaj yanıtlarının araştırılmasında model aşı olarak alüminyum hidroksit adjuvanlı erişkin tetanoz difteri aşı ürünü Tetadif (Td, Türk İlaç ve Serum Sanayi A.Ş) kullanılmıştır. Fraksiyonel, protein bazlı bir aşı türü olması, alüminyum adjuvan varlığı ve uzun yıllardır antimikrobiyal koruyucu olarak aşı terkbine giren tiyomersal (67) içeriği nedeniyle kapsayıcı bir aşı modeli olarak kabul edilmiştir.

4.1. Alüminyum Adjuvanlı Aşının Hücre Canlılığına Etkisi

MTT analizi, hücre canlılığının bir göstergesi olan mitokondriyal aktivitenin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemle, toksik olmayan Td konsantrasyonunun tespiti için J774.A1 hücreleri 24, 48 ve 72 saat boyunca artan konsantrasyonlarda ($0, 3 \times 10^{-3}$, 6×10^{-3} , 12×10^{-3} , 24×10^{-3} uygulama hacmi oranlarında bir başka ifadeyle, aşı kısa ürün bilgisinde verilen maksimum Al³⁺ miktarı üzerinden sırasıyla; 0, 7.5, 15, 30, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarında) Td aşısına maruz bırakılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Td uygulaması yapılmayan kontrol koşulunda ölçülen aktivitenin %100 canlılığa tekabül ettiği kabul edilerek farklı konsantrasyonlardaki Td uygulamaları için normalize edilmiş hücre canlılığı sonuçları elde edilmiştir. Canlı hücre miktarının, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat boyunca sırasıyla %103.89 \pm 0.32, %85.97 \pm 3.88, %82.46 \pm 2.3 düzeylerinde korunduğu; 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda 48. saatte %76.90 \pm 4.11 düzeyine, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda 24. saatte %18.77 \pm 0.1 düzeyine düştüğü ($p < 0.01$) ve inkübasyon süresinin uzamasıyla bu konsantrasyonlar için canlılığın daha da azaldığı tespit edilmiştir. MTT analizi

sonucunda, canlı hücre miktarının %80 üstünde gözlemlendiği 15 $\mu\text{g/mL}$ 'in yüksek konsantrasyon Td koşulu olarak kabul edildi. Canlı hücre miktarının %87' nin üstünde korunmuş olan (24 ve 48. saatler için, $p>0.05$) 7.5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu temel alınarak ise 5 $\mu\text{g/mL}$ düşük Td koşulu olarak kabul edildi. İleri çalışmalara bu iki konsantrasyonla devam edilmiştir (Şekil 4.1.A).



Şekil 4.1. Alüminyum adjuvanlı aşının, hücre canlılığına etkisinin incelenmesi. A) J774.A1 hücrelerinin, 1.8 μM folat içeren standart kültür ortamında, farklı konsantrasyonlardaki Td aşısıyla inkübasyonu sonrası MTT canlılık analizi sonuçları ($n \geq 3$). Her bir zaman noktası (24, 48 ve 72 saat) için kontrol koşuluna göre normalizasyonla göreceli yüzde canlılık hesaplanmıştır. Düşük veya yüksek folat içeren ortamda LPS (250 ng/mL) ile uyarılmış ve kontrol (uyarılmamış) J774.A1 hücrelerinin Td aşısıyla; 48 saat inkübasyon sonrası, (B) propidyum iyodür (PI) canlılık analizi ($n \geq 5$) ve (C) temsili nokta saçılım grafikleri (I) ile gösterilmiştir (istatistiksel anlamlılık; $p < 0,05$ için "**", $p < 0,01$ için "***" sembolleriyle ifade edilmiştir).

Makrofaj hücrelerinin Td aşısına karşı geliştirdikleri yanıtlarda folatın etkisinin araştırılması için J774.A1 hücrelerine; düşük ve yüksek folatlı ortamlarda (sırasıyla, 1.8 μM ve 0.3 nM seviyelerinde) tutuldu. LPS uyarımı varlığında veya yokluğunda 5 ve 15 $\mu\text{g/mL}$ Al^{3+} konsantrasyonunda Td aşısı 48 saat süresince uygulanmıştır. Geliştirilen bu deney tasarımı için hücre canlılığı analizi propidyum iyodür (PI)

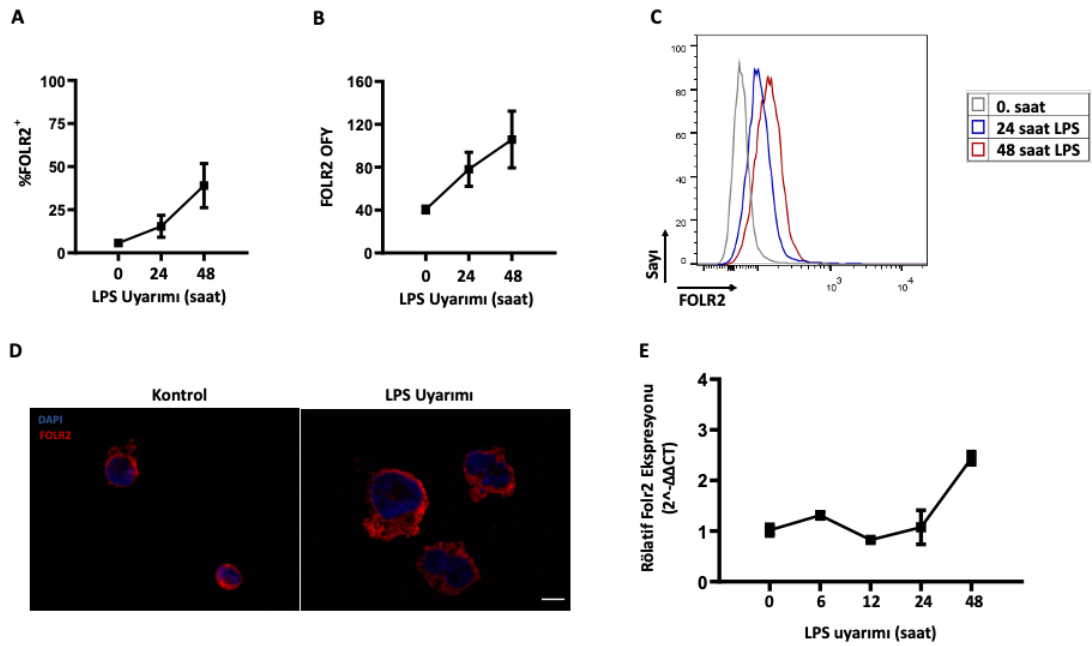
boyaması ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan PI analizi sonucunda yüzde canlılık, uyarılmamış J774.A1 hücrelerinde; 0.3 nM folat içeren ortamda 0 (kontrol), 5, 15 µg/mL Al³⁺ konsantrasyonunda Td aşısı uygulaması sonrası sırasıyla 90.17±1.7, 90.63±1.6, 91.27±2.5 ve 1.8 µM folat içeren ortamda 94.52±1.2, 93.60±1.6, 92.07±1.4; uyarılmış hücrelerde 0.3 nM folat içeren ortamda 89.87±1.7, 87.86±1.5, 85.45±3.1; ve 1.8 µM folat içeren ortamda 88.17±1.4, 89.20±2.2, 83.14±3.9 olarak bulunmuştur (Şekil 4.1.B ve C). Böylece J774.A1 canlılığının Td uygulamasından önemli ölçüde etkilenmediği ve folat seviyesinin artmasıyla daha yüksek seyrettiği belirlendi. Ancak, uyarılmamış kontrol koşulu hariç istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Kullanılan koşullarda canlılığın, Td uygulamasından ve folat seviyesinden önemli ölçüde etkilenmediği saptandı. Uyarılmış makrofajlarda ve sadece yüksek folat varlığında ve yüksek konsantrasyonda Td uygulaması yapıldığında canlılık uyarılmamış kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde etkilenmiştir. Diğer taraftan, *in vitro* deney modelinde yapılan MTT ve PI analizleri sonucunda canlılığın büyük ölçüde (>%80) korunmuş olduğu görülmüştür.

4.2. Monosit/Makrofaj Hücrelerinde FOLR2 İfadesi

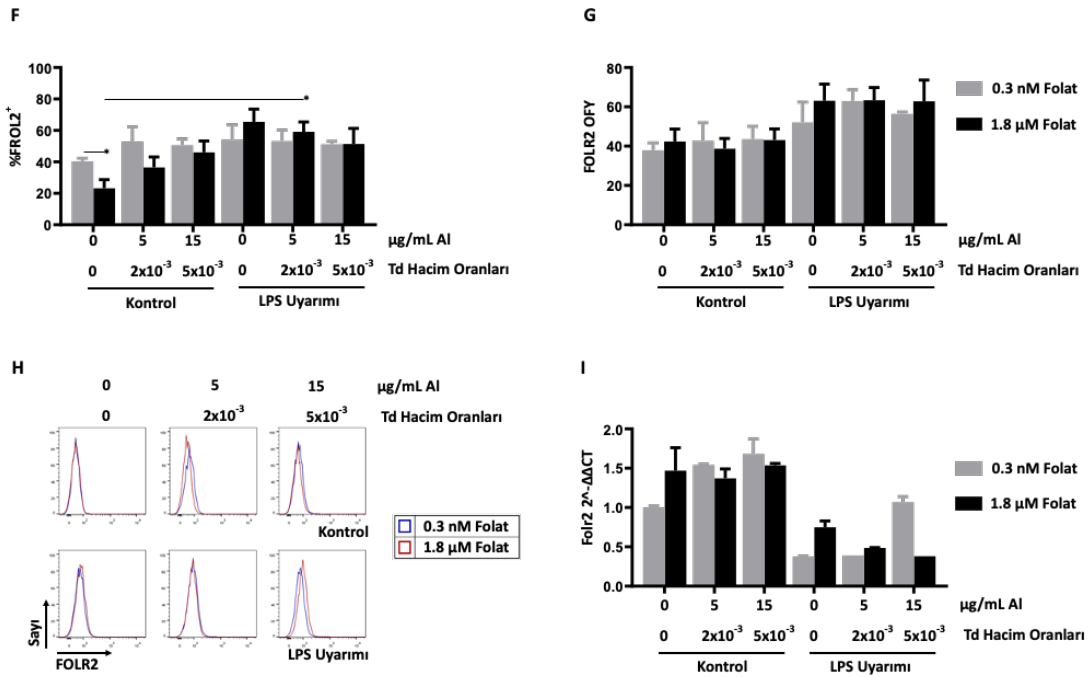
J774.A1 hücre yüzeyinde FOLR2 ifadesi incelendiğinde, hücrelerde LPS (1 ug/mL) uyarımını takiben zamana bağlı 0 (kontrol), 24 ve 48. saatlerdeki; yüzde pozitiflikleri sırasıyla 5.72±0.94, 15.40± 5.2, 39.01±11.4 olarak bulunmuştur (Şekil 4.2.A ve C). Aynı şekilde ifade düzeyleri floresan yoğunluğu olarak incelendiğinde LPS ile uyarımın süresine bağlı FOLR2 yüzey ifadesinde artış görülmüştür (Şekil 4.2.B ve C).

FOLR2'nin endositik bir reseptör olmasının yanı sıra endozomal reaksiyonlar sonrasında folatın serbestleşerek sitozole geçmesiyle reseptör stabil bir biçimde tekrar hücre yüzeyinde sergilenebilmektedir (geri dönüşümlü, *recycling*) (68). Bu nedenle, hücre yüzey boyaması ile gerçekleştirilen akım sitometri analizinin yanı sıra, immünofloresan boyama ile makrofaj hücrelerindeki FOLR2 düzeylerinin görüntülenmesi yapılmıştır. Endozomal lokalizasyonu nedeniyle FOLR2'nin sitoplazmada homojen değil noktasal bir dağılım gösterdiği; LPS uyarımıyla birlikte

hücrelerdeki total FOLR2 düzeyinin artışı, hücre ve çekirdek boyutlarının genişlediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.2.D). FOLR2 ifadesinin LPS uyarımıyla protein düzeyindeki değişiminin gösterilmesinin ardından Folr2 geninin transkript düzeyindeki göreceli değişimleri incelenmiştir. LPS (250 ng/mL) uyarımının 6, 12, 24 ve 48. saatlerinde 0. saate (kontrol) göre belirgin bir değişim gözlemlenmezken, 48. saatte kısmi bir artış görülmüştür (Şekil 4.2.E).



Şekil 4.2. *In vitro* ortamda FOLR2 ekspresyon düzeylerinin araştırılması. J774.A1 hücrelerinde, 1.8 μM folat içeren kültür ortamında LPS (1 μg/mL) uyarımıyla; zamana bağlı (A) hücrelerin yüzde pozitifliği (n≥3), (B) ifade düzeyleri değişimi (n≥3) ve (C) temsili histogram gösterimi; (D) 24 saat inkübasyon sonrası intrasellüler immünofloresan görüntülemesi. (Ölçek = 10 μm). E) 1.8 μM folat içeren kültür ortamında LPS (250 ng/mL) uyarımıyla gerçek-zamanlı PZR analizinde zamana bağlı transkript düzeylerinin rölatif değişimi (n≥2). Uyarım yapılmamış koşul normalizasyonda referans örnek kabul edilmiştir.



Şekil 4.2. (Devamı) Düşük veya yüksek folat içeren ortamda LPS (250 ng/mL) ile uyarılmış ve kontrol (uyarılmamış) J774.A1 hücrelerinin Td aşısıyla; 48 saat inkübasyon sonrası (F) hücrelerin yüzde pozitifliği ($n \geq 3$), (G) ifade düzeyleri değişimi ($n \geq 3$) ve (H) temsili histogram gösterimi; (I) 24 saat inkübasyon sonrası transkript düzeylerinin göreceli değişimi ($n=2$). Düşük folat içeren uyarım yapılmamış koşul normalizasyonda referans örnek kabul edilmiştir (istatistiksel anlamlılık; $p < 0,05$ için "**", $p < 0,01$ için "***" sembolleriyle ifade edilmiştir).

Makrofaj hücrelerinin FOLR2 düzeylerinde ortamdaki folat seviyesinin ve Td uygulamasının etkisi incelendiğinde ise, 48 saatlik inkübasyon sürecinin ardından FOLR2 yüzde pozitiflikleri, 0.3 nM folat içeren ortamda 0 (kontrol), 5, 15 µg/mL Al³⁺ konsantrasyonunda Td aşısı uygulaması sonrası sırasıyla 40.37 ± 1.6 , 52.87 ± 7.6 , 50.60 ± 3.3 ve 1.8 µM folat içeren ortamda 23.25 ± 5.1 , 36.47 ± 5.4 , 46.07 ± 5.9 ; uyarılmış (250 ng/mL) hücrelerde 0.3 nM folat içeren ortamda 54.13 ± 7.8 , 53.20 ± 5.7 , 51.17 ± 1.5 ; ve 1.8 µM folat içeren ortamda $65.47 \pm 6.$, $59.13 \pm 5.1.$, 51.37 ± 8.1 olarak bulunmuştur (Şekil 4.2.F ve H). J774.A1 hücrelerinde FOLR2 yüzde pozitifliği folat seviyesinin artmasıyla düşük seyrederken (kontrol koşulu için $p < 0.05$), yüksek konsantrasyonda Td uygulamasında aradaki bu fark azalmaktadır. LPS uyarımıyla makrofajlardaki FOLR2 yüzde pozitifliği artmaktadır. Folat seviyesinin yükseltilmesiyle LPS' in FOLR2 pozitifliğini desteklediği ve düşük konsantrasyon Td ile birlikte bu

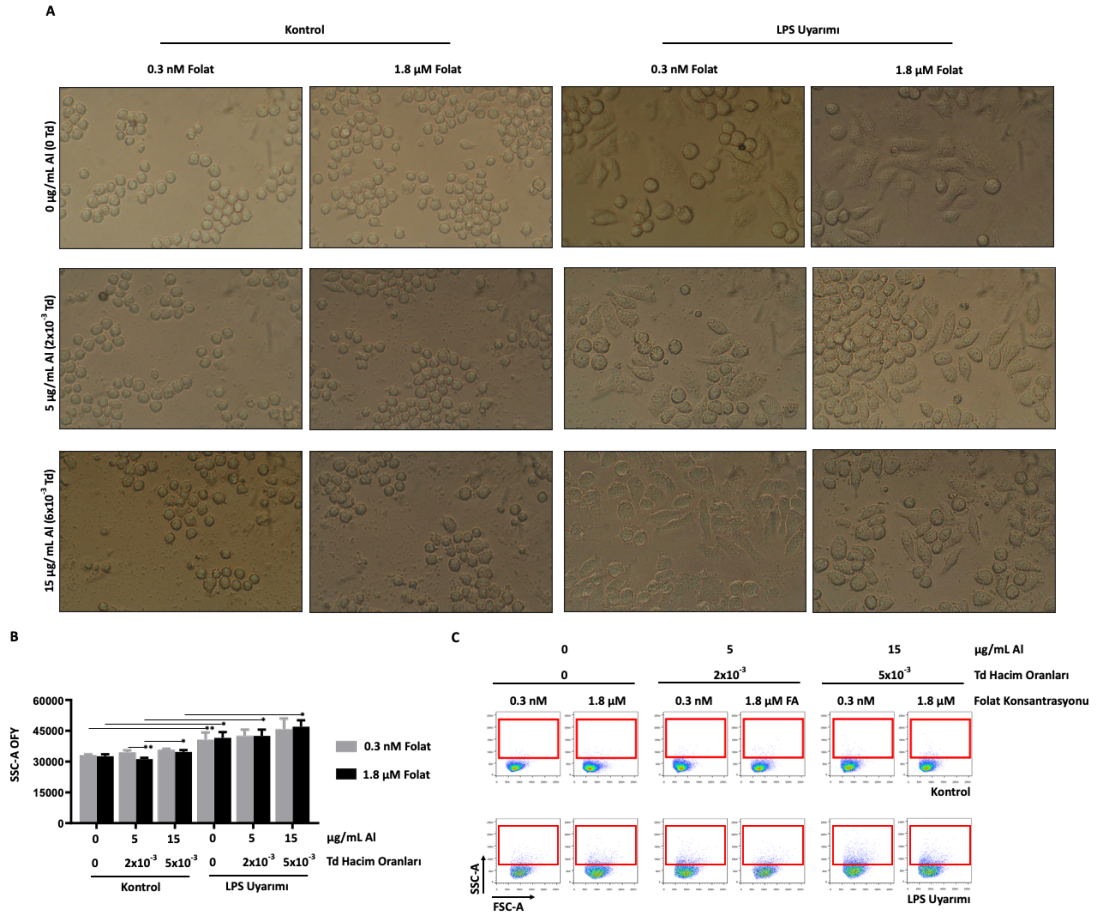
durumun korunduğu gözlemlenmiştir. Yüksek konsantrasyon Td varlığında ise folat seviyesinde yapılan değişiklik uyarılmış makrofajların FOLR2 pozitifliği üzerinde etkili bulunmamıştır. Yüksek folat varlığında uyarılmış makrofajlarda FOLR2 yüzde pozitifliği Td ile konsantrasyona bağlı olarak azalmaktadır. Düşük folat varlığında ise, benzer bir eğilim gözlemlenmemektedir (Şekil 4.2.F ve H). İfade düzeyi yönünden incelendiğinde ise FOLR2, uyarılmamış makrofajlarda Td ve folat düzeylerinden anlamlı ölçüde etkilenmezken, LPS uyarımı ile artmaktadır (Şekil 4.2.G ve H). Uyarılmış makrofajlarda ise, genel olarak folat seviyesinin artırılması FOLR2 ifadesini desteklemekte iken; 5 µg/mL Al³⁺ konsantrasyonda Td ile bu fark kaybolmuştur. Aynı uygulamalar ile 24 saatlik inkübasyonun ardından Folr2 geni ifadesi değerlendirildiğinde belirgin bir değişimin olmadığı görülmüştür. Uyarılmış makrofajlarda ise göreceli bir azalmanın varlığı dikkat çekmiştir (Şekil 4.2 I).

4.3. Monosit/Makrofaj Hücrelerinin Alüminyum Adjuvanlı Aşıyla Etkileşiminin Araştırılması

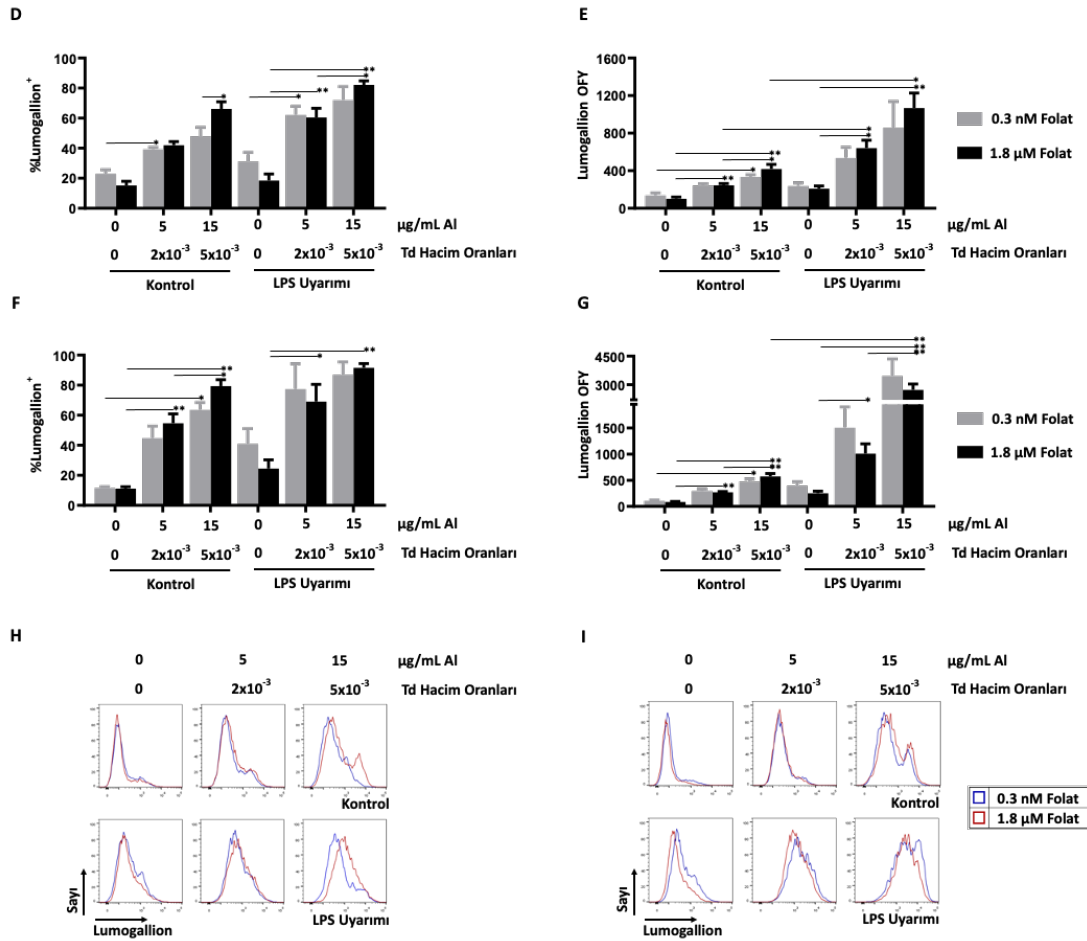
J774.A1 hücreleri önceki bölümlerde tarif edilen formülasyon kombinasyonları ile 48 saat inkübe edilmesinin ardından morfolojik özelliklerindeki değişimler kültür ortamında *inverted* mikroskop görüntülemeleri ile incelenmiştir (Şekil 4.3.A). İncelemeler sonucunda, uyarılmamış hücrelerin yarı aderan monosit/makrofaj karakterlerini korudukları, daha küçük boyutlu oldukları ve çoğunlukla küresel bir morfolojiye sahip oldukları görülmüştür (Şekil 4.3.A). Diğer taraftan LPS uyarımı ile birlikte fusiform morfolojideki matür makrofaj görünümüne sahip oldukları, aderan bir karakter kazandıkları, boyutlarının büyüdüğü, granülaritelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Td uygulaması ile konsantrasyona bağlı olarak hem uyarılmamış hücrelerde hem de uyarılmış hücrelerde daha yüksek düzeyde olmak üzere granülaritelerinin arttığı ve hücre dışı ortamda görünür ölçekte alüminyum hidroksit agregatlarının varlığı ile örtüşen cisimler izlenmiştir. Folat seviyesindeki değişimlerin ise LPS uyarımı ve farklı konsantrasyonlardaki Td uygulamasından bağımsız olarak gözlemlenebilir düzeyde bir morfolojik değişime yol açmadığı görülmüştür (Şekil 4.3.A).

Mikroskopik gözlemlerin yanı sıra, hücrel granülaritedeki değişimler nicel olarak akım sitometride, SSC-A yoğunluğundaki değişimlerden yararlanılarak incelenmiştir (Şekil 4.3.B ve C). Mikroskopik değerlendirmelerden farklı olarak, uyarılmamış hücrelerde granülarite ile Td uygulanması arasında güçlü bir artış eğilimi gözlemlenmemiştir. Uyarılmış hücrelerde ise mikroskopik değerlendirmeye benzer olarak, uygulanan Td konsantrasyonuna bağlı granülaritede göreceli düzeyde ($p < 0.05$) artış olduğu ve folat düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadığı görülmüştür (Şekil 4.3.B ve C).

J774.A1 hücrelerinin alüminyum hidroksit içeriğiyle olan etkileşim düzeyine; hücrelerin uyarım durumunun, uygulanan Td konsantrasyonunun ve ortamın folat seviyesinin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, hücrelerce internalize edilen alüminyum içeriğinin saptanabilmesi için Al^{3+} iyonu ile kompleks yapabilen floresan özellikteki lumogallion boyaması yapılmıştır (69). Hücrelerin formülasyon kombinasyonları ile inkübasyonu sonrası lumogallion yüzde pozitiflikleri Td konsantrasyonunu ile korele bir biçimde arttı. LPS uyarımı ile pozitiflikler daha da yükseldi (Şekil 4.3.D ve H). İnkübasyon süresinin 24 saatten (Şekil 4.3.D ve H) 48 saate (Şekil 4.3.F ve I) çıkması ile benzer eğilimde daha yüksek oranlara ulaşılmıştır. Hücrelerdeki lumogallion boyanma yoğunlukları incelendiğinde ise Td konsantrasyonu ile korelasyon eğilimi devam etmiştir. Uyarılmış hücrelerin çok daha yüksek düzeyde alüminyum hidroksit internalize ettikleri görüldü. Özellikle, inkübasyonun 48. saatine (Şekil 4.3.G ve I) gelindiğinde düzeyler arasındaki farklar daha da belirgin hale gelmiştir. Kontrol (uyarılmamış) koşullarının, yüksek konsantrasyonda alüminyum hidroksit içeriğini internalizasyon kapasitesinin folat seviyesinin artırılması ile desteklendiği görüldü. Uyarımla beraber 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise yüksek folat seviyesinin alüminyum hidroksit internalizasyon düzeyi üzerine azaltıcı yönde bir etkisi olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.3. Alüminyum adjuvanlı aşının monosit/makrofaj hücreleri ile etkileşim düzeyinin araştırılması. Düşük veya yüksek folat içeren ortamda LPS (250 ng/mL) ile uyarılmış ve uyarılmamış J774.A1 hücrelerinin Td aşısıyla; 48 saat inkübasyon sonrası, (A) hücrelerin ters ışık mikroskobu görüntülemeleri (75x büyütme), (B) SSC-A OFY (ortanca floresan yoğunluğu) değerleri değişimi ($n \geq 4$) ve (C) temsili histogram gösterimi (istatistiksel anlamlılık; $p < 0,05$ için "**", $p < 0,01$ için "***" sembollerile ifade edilmiştir).



Şekil 4.3. (Devamı) 24 inkübasyon sonrası Al³⁺ içeriğinin lumogallion reaktifi ile boyanmasıyla hücrelerdeki alüminyum adjuvan (D) yüzde pozitifliği (n≥3), (E) yoğunluğu (n≥3), (H) temsili histogram gösterimi ve 48 saat inkübasyon sonrası hücrelerdeki alüminyum adjuvan (F) yüzde pozitifliği (n≥3), (G) yoğunluğu (n≥3), (I) temsili histogram gösterimi (istatistiksel anlamlılık; p<0,05 için "**", p<0,01 için "***" sembolleriyle ifade edilmiştir).

4.4. Alüminyum Adjuvanlı Aşı uygulamasının Makrofaj Aktivasyon ve Matürasyonuna Etkisi

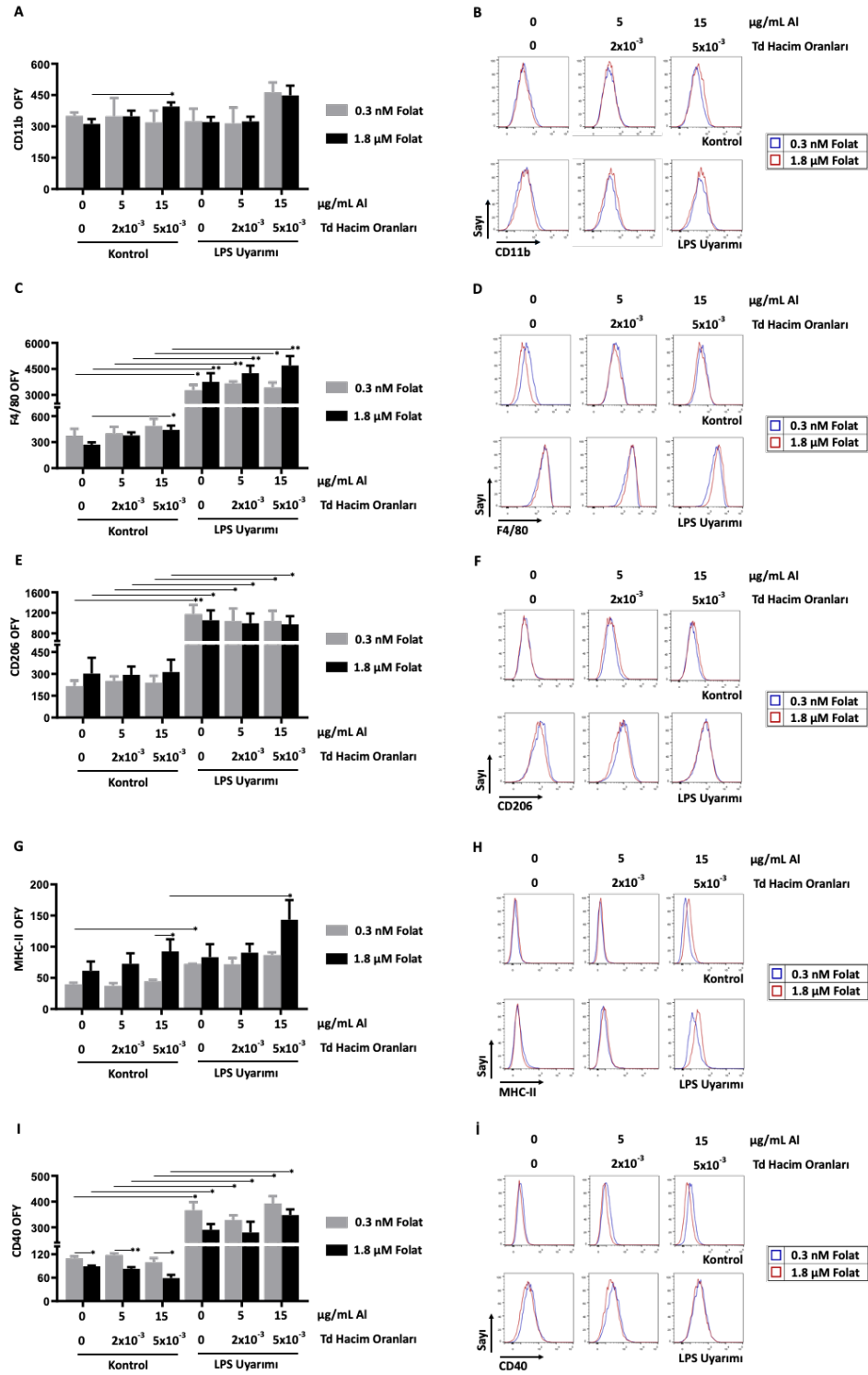
J774.A1 hücreleri, formülasyon kombinasyonları ile 48 saat inkübe edilmesinin ardından makrofaj aktivasyonu ve matürasyonu ile ilişkili yüzey belirteçleri yönünden değerlendirilmiştir. CD11b, F4/80, CD206, CD69 ve CD62L belirteçleri matürasyon; MHC-II, CD40, CD80 ve CD86 belirteçleri aktivasyon için kullanıldı.

Hücreler, büyük ölçüde; folat seviyesi, LPS uyarımı ve Td uygulamasından bağımsız olarak CD11b ifade düzeylerini korumuştur. Uyarılmamış hücreler, yüksek folat seviyesindeki Td uygulamasıyla CD11b ifadelerini artırmıştır (15 µg/mL Al³⁺ için kontrole göre, p<0.05). LPS uyarımıyla ise, yüksek konantrasyondaki Td uygulaması, ortamın folat seviyesinden bağımsız olarak CD11b ifade düzeyini artırıcı yönde etki etmiştir (Şekil 4.4.A ve B).

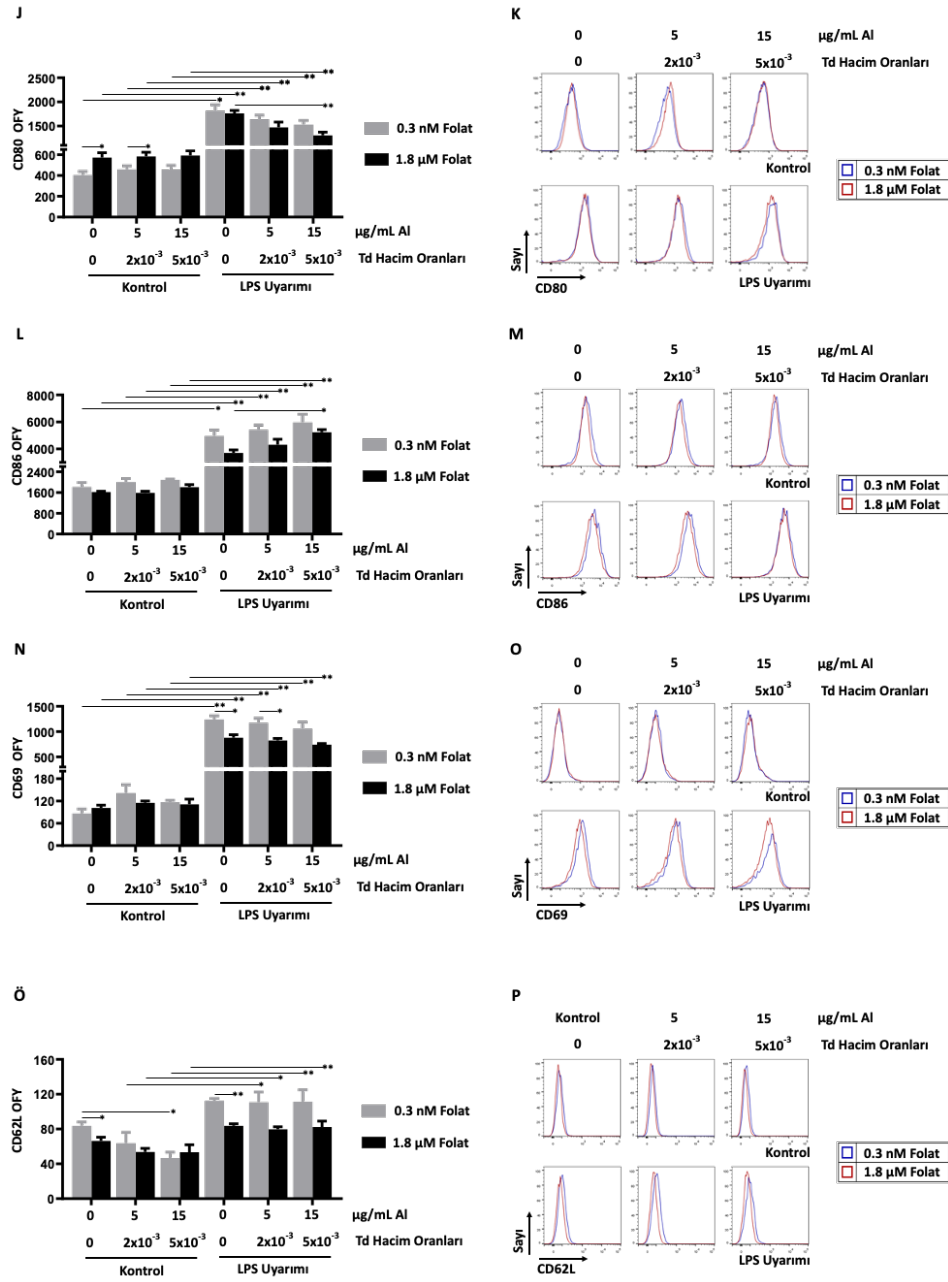
Monosit/makrofaj hücre hattı J774.A1 hücrelerinin matürasyonu açısından değerlendirildiğinde F4/80 ifadesi, uyarılmamış hücrelerde Td konantrasyonuna bağlı olarak artış göstermekteydi (yüksek folat seviyesiyle 15 µg/mL Al³⁺ için kontrole göre p<0.05) (Şekil 4.4.C). Ancak, yüksek folat seviyesinde ifade düzeyleri daha düşük seyretmiştir (Şekil 4.4.C). LPS uyarımıyla birlikte F4/80 ifadesi tüm uygulama kombinasyonlarında oldukça yükselmiş (tüm koşullar için p<0.05 veya p<0.01) ve uyarılmamış hücrelerden farklı olarak, folat seviyesinin artmasıyla ifade düzeyi, Td konantrasonu ile korele bir biçimde belirginleşmiştir (Şekil 4.4.C ve D).

J774.A1 hücrelerinin CD206 ifadesi, LPS uyarımı ile birlikte tüm uygulama kombinasyonlarında çok yüksek düzeylerde artmıştır (tüm koşullar için p<0.05 veya p<0.01). Diğer taraftan, ne kontrol (uyarılmamış), ne de uyarılmış hücrelerde CD206 ifadesi Td uygulamasına bağlı olarak bir değişim göstermemiştir. Folat seviyesinin yükselmesiyle CD206 ifadesi; J774.A1 hücrelerinde düşük düzeyde desteklenmekteyken, uyarılmış hücrelerde azalma gerçekleşmiştir (Şekil 4.4.E ve F).

Makrofaj aktivasyonu açısından değerlendirildiğinde MHC-II ifadesi, yüksek folat seviyesinde artmış ve bu artış genel olarak hem uyarılmamış hem uyarılmış hücrelerde uygulanan Td konantrasyonuna bağlı bir biçimde desteklenmiştir. Düşük folat seviyesinde ise düzeyleri daha düşük seyretmiş; ancak, LPS uyarımıyla belirli bir ölçüde belirginleşmiştir (Şekil 4.4.G ve H).



Şekil 4.4. Alüminyum adjuvanlı aşı uygulamasının makrofaj aktivasyon ve matürasyon belirteçleri yönünden incelenmesi. Düşük veya yüksek folat içeren ortamda LPS (250 ng/mL) ile uyarılmış ve uyarılmamış J774.A1 hücrelerinin Td aşısıyla 48 saat inkübasyon sonrası CD11b (A), F4/80 (C), CD206 (E), MHC-II (G), CD40 (I) yüzey belirteci ifadeleri (n≥3) ve temsili histogram gösterimleri (B, D, F, H, J; sırasıyla) (istatistiksel anlamlılık; p<0,05 için "**", p<0,01 için "***) sembollerile ifade edilmiştir.



Şekil 4.4. (Devamı) CD80 (J), CD86 (L), CD69 (N), CD62L (Ö) yüzey belirteci ifadeleri ($n \geq 3$) ve temsili histogram gösterimleri (K, M, O, P; sırasıyla) (istatistiksel anlamlılık; $p < 0.05$ için "*", $p < 0.01$ için "**") sembollerleriyle ifade edilmiştir).

CD40 ifadesi, kontrol (uyarılmamış) koşullarında folat seviyesindeki artışla istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azalmış ve yüksek konsantrasyonda Td uygulamasıyla bu azalış daha keskin hale gelmiştir. LPS uyarımıyla birlikte CD40 ifadesi tüm uygulama kombinasyonlarında çok yüksek düzeylerde artmış (tüm koşullar için $p < 0.05$) ve benzer bir biçimde folat seviyesindeki artıştan olumsuz etkilendiği değerlendirilmiştir (Şekil 4.4.I ve İ).

Makrofaj aktivasyonu açısından değerlendirildiğinde, CD80 ifadesi J774.A1 hücrelerinde folat seviyesinin yükselmesiyle birlikte artmış (kontrol ve 5 µg/mL Al³⁺ için p<0.05) ancak Td uygulamasından anlamlı düzeyde etkilenmemiştir. LPS uyarımıyla birlikte CD80 ifadesi tüm uygulama kombinasyonları için çok yüksek ölçeklerde artmakta (tüm koşullar için p<0.05 veya p<0.01); ancak, uyarılmamış hücrelerden farklı olarak uygulanan Td konsantrasyonuna bağlı olarak düzeyleri düşmekte ve folat seviyesindeki artışla bu düşüş daha belirgin hale gelmekteydi (Şekil 4.4.J ve K).

CD86 ifadesi, hücrelerde CD80 molekülüne benzer şekilde Td uygulamasından önemli düzeyde etkilenmezken folat seviyesindeki artışla düzeylerinde düşüş gözlemlenmiştir. LPS uyarımıyla birlikte CD86 ifadesi tüm uygulama kombinasyonları için çok yüksek ölçeklerde artmış (tüm koşullar için p<0.05 veya p<0.01) ve benzer şekilde folat seviyesindeki artıştan negatif yönde etkilenmiştir. Ancak, uyarılmamış hücrelerden farklı olarak CD86 ifadesi uygulanan Td konsantrasyonuna kolera bir biçimde artmıştır (Şekil 4.4.L ve M).

J774.A1 hücrelerinin CD69 ifadesi genel olarak folat seviyesi ve Td uygulamasından anlamlı ölçüde etkilenmemişken yalnızca düşük konsantrasyonda Td uygulamasında folat seviyesindeki artış CD69 düzeyini azaltıcı yönde etki etmiştir. LPS uyarımıyla birlikte CD69 ifadesi tüm uygulama kombinasyonları için çok yüksek düzeylerde artmış (tüm koşullar için p<0.01), uyarılmamış hücrelerden farklı olarak folat seviyesinin ve Td konsantrasyonunun artmasıyla ifade düzeyi azalış eğilimi (uyarılmış kontrol ile 5 µg/mL Al³⁺ için p<0.05) gösterilmiştir (Şekil 4.4.N ve O).

CD62L ifadesi değerlendirildiğinde, J774.A1 hücrelerinde genel olarak folat seviyesinde ve Td konsantrasyonundaki artışla düzeyleri düşmüştür. Ancak, kontrole göre seviyesi halen daha az olmakla beraber Td konsantrasyonundaki artışla folatın bu etkisinin tersine döndüğü gözlemlenmiştir. LPS uyarımı sonrasında ise CD62L ifadesinin artışı, bu artışın Td uygulamasından etkilenmediği, diğer taraftan folat seviyesindeki artışla ifade düzeyinin düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.4.Ö ve P).

Makrofaj matürasyonu açısından değerlendirildiğinde, J774.A1 hücrelerinde Td uygulamasıyla birlikte; F4/80 ve CD11b ifadesinin genel olarak desteklendiği, CD206 ve CD69 ifadelerinin önemli ölçüde etkilenmediği ve CD62L ifadesinin ise azaldığı görülmüştür. Makrofaj aktivasyonu açısından değerlendirildiğinde ise, Td uygulamasıyla birlikte hücrelerde; MHC-II ifadesinin genel olarak arttığı, CD80 ve CD86 ifadelerinin önemli ölçüde değişmediği, CD40 ifadesinin ise azaldığı gözlemlenmiştir. Folat seviyesinin yükseltilmesi ise, artan Td konsantrasyonlarında CD11b, CD206, MHC-II ve CD62L ifadelerini desteklemiş; CD69 ifadesini önemli ölçüde etkilememiş, F4/80, CD40 ve CD86 ifadelerinde azaltıcı yönde etki göstermiştir. LPS uyarımıyla J774.A1 hücrelerinin CD11b haricindeki tüm aktivasyon ve matürasyon belirteçlerinin ifade düzeyleri artmıştır. LPS ile uyarılmış hücrelerde Td uygulamasıyla birlikte genel olarak CD11b, F4/80, MHC-II, CD40 ve CD86 ifadeleri artmış; CD206 ve CD62L ifadeleri önemli düzeyde etkilenmemiş; CD69 ve CD80 ifadeleri azalmıştır. Folat seviyesinin yükseltilmesi ise, uyarılmış hücrelerde, artan Td konsantrasyonlarıyla F4/80 ve MHC-II ifadelerini desteklemiş; CD11b ifadesini önemli düzeyde değiştirmemiş, CD206, CD69, CD62L, CD40, CD80 ve CD86 ifadelerini azaltıcı yönde etki etmiştir.

4.5. Makrofaj Fonksiyonlarıyla İlişkili Gen İfadesine Alüminyum Adjuvanlı Aşı Uygulamasının Etkisi

J774.A1 hücreleri, önceki bölümlerde tarif edilen formülasyon kombinasyonları ile 24 saat inkübasyonun ardından makrofaj fonksiyonlarıyla ilişkili, proinflamatuvar özellikteki Il1b, Il18, Tnf, Il6 ve Ccl5 genlerinin göreceli ifade düzeylerindeki değişimler yönünden incelenmiştir. Il1b gen ifadesi, uyarılmamış hücrelerde Td uygulamasından ve folat seviyesinden önemli ölçüde etkilenmezken, folat seviyesinin artırılmasıyla yüksek konsantrasyonda Td uygulamasında artış göstermiştir. LPS uyarımıyla birlikte Il1b gen ifadesi yüksek düzeylerde artmaktayken Td konsantrasyonuna bağlı bir biçimde azalış göstermiştir. Folat seviyesinin artırılmasını takiben transkript düzeylerinde en dramatik düşüş uyarılmış kontrol

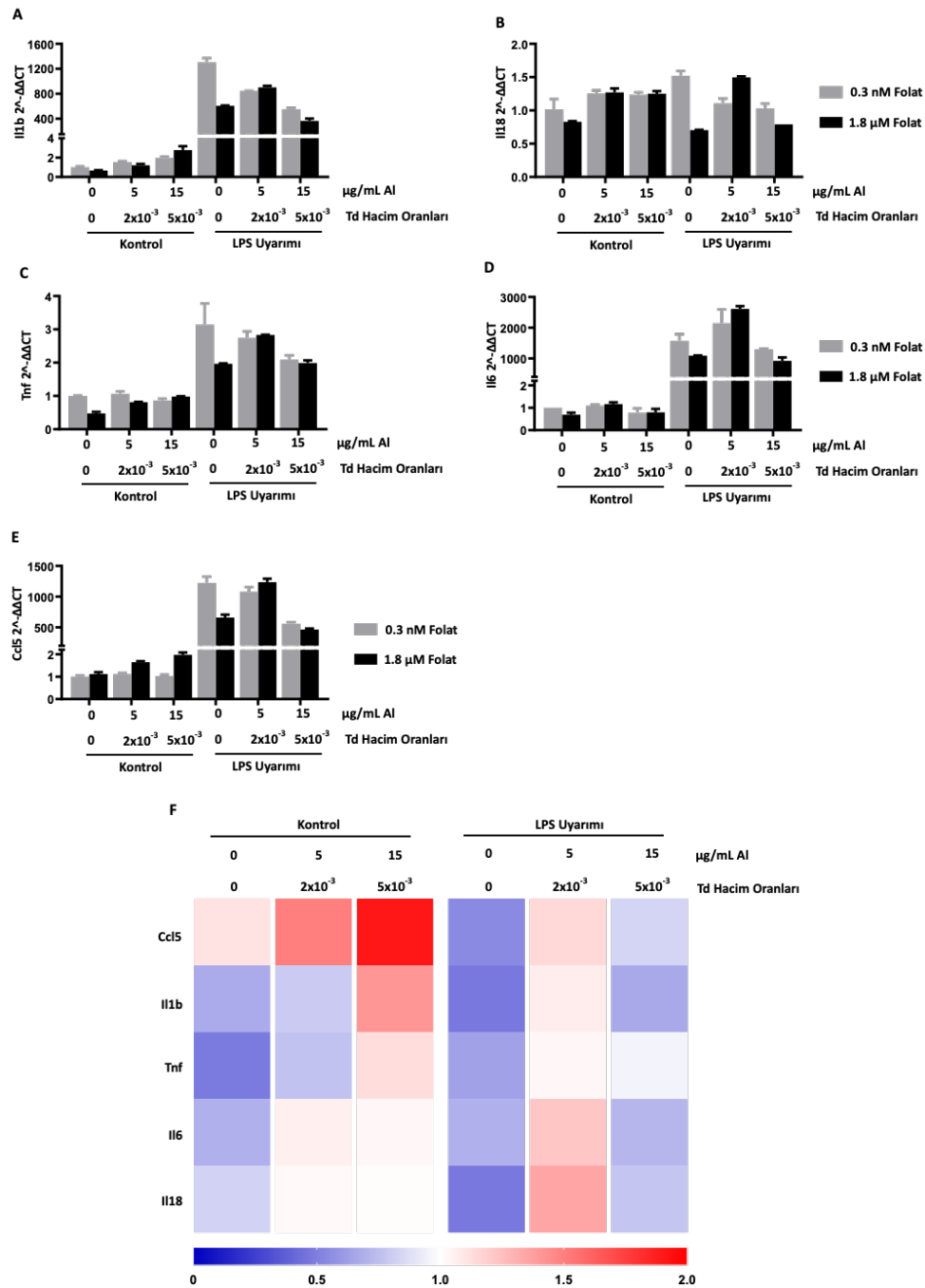
koşulunda görülmektedir. Bunu yine uyarılmış makrofajlarda 15 µg/mL Al³⁺ koşulu izlemektedirken 5 µg/mL Al³⁺ ile benzer bir eğilim görülmemiştir (Şekil 4.5.A).

Il18 gen ifadesi, makrofaj yanıtları açısından değerlendirildiğinde LPS uyarımından, folat seviyesinden ve Td uygulamalarından önemli ölçüde etkilenmediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.5.B).

J774.A1 hücrelerindeki Tnf transkript düzeyleri folat seviyesi ve Td uygulamalarından bağımsız olarak kararlı bir profil sergilerken, bu düzeyler LPS uyarımı ile birlikte artmıştır. LPS ile uyarılmış hücrelerde düşük folatlı ortamdaki Td uygulaması ile konsantrasyon bağımlı bir şekilde Tnf gen ifadesinin baskılandığı görülmektedirken yüksek folat seviyesine çıktığında benzer bir eğilim gözlemlenmedi (Şekil 4.5.C).

Makrofaj yanıtları açısından değerlendirildiğinde J774.A1 hücrelerinde Il6 gen ifadesinin, folat seviyesinden ve Td uygulamalarından önemli ölçüde etkilenmediği gözlemlenmiştir. LPS uyarımıyla birlikte Il6 gen ifadesi yüksek düzeylerde artmış ve bu artışın düşük konsantrasyonda Td uygulaması ile daha da desteklendiği görülmüştür. Folat seviyesinin artırılması LPS ile uyarılmış hücrelerde genel olarak Il6 gen ifadesini azaltıcı yönde bir etki gösterse de yine düşük konsantrasyon Td uygulamasında destekleyici bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.5.D).

CCL5 sitokinini kodlayan Ccl5 geni ifadesinin uyarılmamış (kontrol) hücrelerde folat seviyesinden ve Td uygulamalarından önemli ölçüde etkilenmediği gözlemlenmiş olsa da yüksek folat seviyesinde Td uygulamasıyla belli bir ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. Uyarılmış hücrelerde Ccl5 gen ifadesi ise yüksek düzeylerde artmakta, düşük folatlı ortamda bu artışın ortamdaki Td uygulaması ile konsantrasyon bağımlı bir biçimde baskılandığı görülmektedir. Folat seviyesinin artırılmasının uyarılmış hücrelerde genel olarak Ccl5 gen ifadesini baskılayabildiği gözlemlense de yine düşük konsantrasyonda Td uygulamasıyla bu etkinin terse döndüğü görülmemiştir (Şekil 4.5.E).



Şekil 4.5. Alüminyum adjuvanlı aşı uygulamasının makrofaq fonksiyonlarıyla ilişkili gen ifadeleri yönünden incelenmesi. Düşük veya yüksek folat içeren ortamda LPS (250 ng/mL) ile uyarılmış ve uyarılmamış J774.A1 hücrelerinin Td aşısıyla 24 saat inkübasyonu sonrası gerçek-zamanlı PZR analizinde; (A) Il1b, (B) Il18, (C) Tnf, (D) Il6, Ccl5 (E) gen transkript düzeylerinin göreceli değişimi (n=2). Düşük folat içeren uyarım yapılmamış koşul normalizasyonda referans örnek kabul edilmiştir. F) Her bir koşulun yüksek folat varlığında rölatif transkript düzeylerinin değişimi. Her gen için $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri üzerinden her bir uygulamanın yüksek folat içeren koşulu düşük folat içerece göre normalize edilmiştir.

Td uygulaması J774A1 hücrelerinde genel olarak Il1b ve Ccl5 gen ifadelerini belirli ölçüde artırabildiği; Il18, Tnf ve Il6 içinse önemli düzeyde değişime neden olmadığı görülmüştür. LPS uyarımıyla hücrelerin Il1b, Tnf, Il6 ve Ccl5 ifadelerini artırdığı, düşük konsantrasyonda Td uygulamasıyla bu artışın genel olarak desteklendiği ancak, Td konsantrasyonunun artırılmasının bu etkiyi tersine çevirdiği gözlemlenmiştir. Her bir uyarım ve Td uygulaması koşulu için hücrelerden elde edilen gen ifadesi yanıtlarına folatın etkisi ısı haritası çizilerek Şekil 4.5.F' de özetlenmiştir. Bu bağlamda, folatın uyarılmamış (kontrol) hücrelerdeki makrofaj fonksiyonlarıyla ilişkili gen ifadesini, Td konsantrasyonundaki artışla daha çok destekleyici yönde etkilediği anlaşılmaktadır. LPS uyarımıyla ise büyük ölçüde baskılayıcı yönde bir etkisinin olduğu, düşük konsantrasyon Td uygulamasıyla bu etkinin terse döndüğü görülse de yüksek Td konsantrasyonuna çıkıldığında tekrardan baskılayıcı bir karakter kazandığı dikkat çekmiştir.

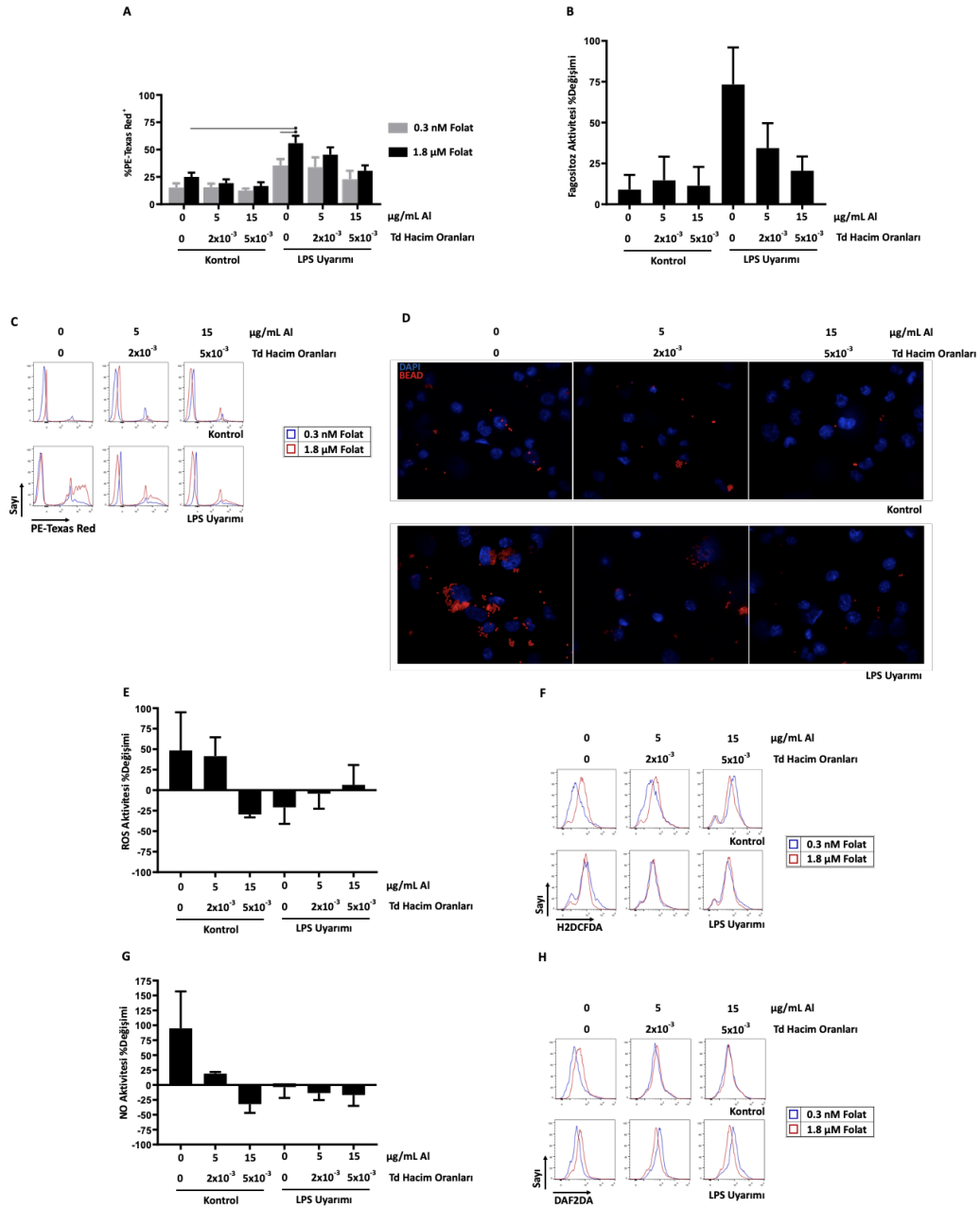
4.6. Makrofaj Fonksiyonel Yanıtlarına İlişkili Alüminyum Adjuvanlı Aşı Uygulamasının Etkisi

Uyarılmış ve kontrol (uyarılmamış) J774.A1 hücrelerinin Td uygulamasına karşı geliştirdiği fonksiyonel yanıtlara folatın etkisi öncelikle fagositoz kapasitesindeki değişimleri yönünden incelenmiştir. Bu doğrultuda hücreleri önceki bölümlerde tarif edilen formülasyon kombinasyonlarıyla 48 saat inkübasyonu sonrasında fagositoz analizi gerçekleştirilmiştir. Fagositoz kapasitesine sahip hücre oranları internalize edilen fagositoz boncuğu yüzde pozitifliği ile incelendiğinde, Td uygulamasının konsantrasyon bağımlı olarak hem LPS uyarımı yapılmamış hem de daha yüksek oranlarda uyarılmış hücrelerde fagositoz kapasitesini baskıladığı görülmüştür (Şekil 4.6.A) Bu bulgu aynı zamanda, yüksek folatlı ortamda inkübe edilen hücrelerin floresan mikroskopisi görüntülemelerinde de benzer biçimde gözlemlenmiştir (Şekil 4.6.D). Ortamdaki folat seviyesinin artırılmasıyla hem kontrol (uyarılmamış) hem de daha yüksek oranlarda uyarılmış hücrelerde fagositoz kapasitesine sahip hücre oranlarının arttığı (Şekil 4.6.A) görülmüştür. Bu hücrelerin, folat seviyesinin

yükselmesiyle, benzer bir eğilimle, internalize ettikleri boncuk yoğunluğundaki değişimler yönünden fagositoz aktivitelerini arttırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.6.B).

J774.A1 hücrelerinde incelenen diğer fonksiyonel yanıtlar ise ROS ve NO üretim kapasiteleridir. Bu doğrultuda hücrelerin önceki bölümlerde tarif edilen formülasyon kombinasyonlarıyla 3 saat inkübasyonu sonrası folatın, hücrelerin ROS ve NO aktivitesi üzerine etkisi analiz edilmiştir. Ortamın folat seviyesinin artırılmasıyla hücrelerin ROS aktivitesinin artış yaşandığı, ancak bu değişimin Td uygulamasıyla azalmaya başladığı ve yüksek konsantrasyonda Td varlığında tersine döndüğü görülmüştür. LPS ile uyarılmış hücrelerde ise, ters yönde bir eğilim gözlenmekte ve folat seviyesindeki artışla birlikte ROS aktivitesi düşerken, Td uygulamasıyla birlikte folatın bu etkisi azalmamıştır (Şekil 4.6.E).

Folatın NO aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde, hücrelerde yükselen folat seviyesiyle NO aktivitesi artarken, Td uygulaması ile bu etkinin büyük ölçüde azaldığı ve yüksek konsantrasyonda Td varlığında tersine döndüğü görülmüştür. LPS ile uyarılmış hücrelerde folat önemli ölçekte NO aktivitesi üzerinde değişikliğe neden olamazken artan Td konsantrasyonuna paralel olarak NO aktivitesinin azalmaya başladığı görülmektedir (Şekil 4.6.G).



Şekil 4.6. Alüminyum adjuvanlı aşı uygulamasının makrofaj fonksiyonları üzerine etkilerinin araştırılması. Düşük veya yüksek folat içeren ortamda LPS (250 ng/mL) ile uyarılmış ve uyarılmamış J774.A1 hücrelerinin Td aşısıyla; 48 saat inkübasyonu sonrası lateks boncuk fagositozu (A) yüzde pozitifliği ($n \geq 3$), (B) her bir uygulamanın yüksek folat varlığında düşük folat içeren koşula göre fagositoz aktivitesi yüzde değişimi ($n \geq 3$), (C) temsili histogram gösterimleri ve (D) yüksek folat varlığındaki uygulamalar için fagosite edilmiş lateks boncuk görüntülemeleri; 3 saat inkübasyonu sonrası her bir uygulamanın yüksek folat varlığında düşük folat içeren koşula göre (e) ROS ve (G) NO üretim kapasitesi yüzde değişimi ($n \geq 3$), temsili histogram gösterimleri (F, H sırasıyla) (istatistiksel anlamlılık; $p < 0.05$ için "*" sembolüyle ifade edilmiştir).

5. Tartışma

Alüminyum adjuvanlı aşılarla indüklenen makrofaj yanıtlarının başlangıcında, dolaşımda bulunan periferik monositlerin iskelet kasındaki aşı lezyonuna infiltrasyonu gerçekleşir (18). Gözlemci (*patrolling*) monositler, inflamasyonun olmadığı sağlıklı dokularda tehlike sinyallerine karşı tarama fonksiyonlarını gerçekleştirmek için bulunabilseler de aşı lezyonuna monosit göçü büyük ölçüde alüminyum adjuvan varlığında indüklenen lokal inflamatuvar yanıtlarla sağlanmaktadır. Monositler, inflamatuvar bölgeden dolaşıma geçen CCL2 kemokini gradyanını CCR2 reseptörü ile algılayarak; L-selektin ve Mac-1 integrin gibi yüzey moleküllerinin aktivitesiyle damar endotelini aşp iskelet kası dokusundaki aşı lezyonuna doğru göç ederler (28, 32, 34). Göçün başlamasıyla birlikte matürasyonları ilerleyen monositler, lezyona doğru artan proinflamatuvar sinyaller ile makrofajlara dönüşürler (14, 16, 18, 28, 32). Alüminyum adjuvan içeriğiyle lezyonda idame edilen inflamatuvar mikroçevre sayesinde aktivasyonlarında ilerleyen makrofajlar; iskelet kasında lokal ve sistemik etkili (özellikle bölgesel lenf nodları üzerinde) proinflamatuvar sitokin üretimleri ve efektör/efektör hafıza Th ile etkileşimleriyle aşıyla gelişen edinsel immün yanıtları desteklerler (22, 28, 30, 31, 33).

Makrofaj aktivasyonu, zamana ve ortam koşullarına göre son derece yüksek plastisiteyle ilerleyen ve devamlılık gösteren bir süreçtir (34). Aşıyla indüklenmiş inflamasyon bölgesine infiltre olan makrofajlarda başlangıçta, inflamatuvar özellikteki klasik makrofaj aktivasyonu karakteri baskın durumdadır (14, 17, 27, 34). Bu karaktere sahip makrofajlar fonksiyonel olarak; yüksek proinflamatuvar sitokin sekresyon düzeylerine, yabancı etkenlerin elimine edilmesi için yüksek fagositoz aktivitesine ve ROS/NO üretim kapasitesine sahiptirler (28). *In vitro* koşullarda, Th₁ sitokinleri IFN- γ ve TNF- α uyarımıyla kazanılan fenotipik özellikler, makrofajların klasik aktivasyonunun (M₁) karakteristikleri olarak kabul görmektedir. Buna ek olarak makrofajlar M₁ karakterini, otokrin TNF- α ve IFN- β sitokinleriyle de kazanabilmektedir. LPS ile uyarılan TLR4 sinyal yolları, hem NF-KB hem de IRF3 transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu tetikleyerek sırasıyla TNF- α ve IFN- β sitokin

üretimini sağlamaktadır (34, 70). Benzer şekilde laboratuvarımızda gerçekleştirilen önceki çalışmalarda (62) J774.A1 hücrelerinin, LPS uyarımı ile artan TNF- α ve IL-6 üretimleriyle M₁ benzeri karakter kazandıkları görülmüştür.

Makrofajların, alternatif yoldan aktivasyonlarıyla konakçı savunmasından daha çok homeostatik fonksiyon gösterdiği bilinmektedir. Aktivasyon spektrumunda öne çıkan makrofaj karakterlerinden biri antiinflamatuvar özellikteki düzenleyici makrofajlardır. Düzenleyici makrofaj fonksiyonları akut inflamatuvar yanıtların başlangıç aşamasında uyarılsa da, ortamda; antijen, DAMP ve/veya PAMP sinyallerinin azalmasıyla birlikte antiinflamatuvar karakterleri baskın hale gelebilmektedir. Özellikle, IL-10 ve TGF- β sitokin üretimleriyle inflamatuvar yanıtları baskılamaktadırlar (34). Alternatif aktivasyonla kazanılan diğer bir makrofaj karakteri ise yara iyileştirici (*wound healing*) makrofajlardır. Yara iyileştirici makrofaj fenotipi IL-4 sinyalleriyle idame edilmektedir (34). Bu karaktere sahip makrofajlar fonksiyonel olarak, hücre dışı matriksin onarımını ve TGF- β ve PDGF üretimleriyle doku yenilenmesini desteklemektedir (28). Alternatif yoldan aktive olan makrofajların aşı ile indüklenen akut inflamatuvar yanıtlar üzerindeki etkilerinin, edinsel immün yanıtlara yansımalarıyla ilgili literatürdeki bilgiler ise sınırlıdır.

Bu tez kapsamında, makrofaj biyolojisine ilişkin bahsedilen bilgiler doğrultusunda, J774.A1 monosit/makrofaj hücre hattıyla geliştirilen *in vitro* modellerde alüminyum adjuvanlı aşılar karşı gelişen makrofaj yanıtlarının, uzaysal ve zamansal olarak değişken doğasıyla birlikte incelenmesi amaçlanmıştır. Monosit/makrofaj ikili karakteriyle, M₁ benzeri karakterdeki hücreler, artan konsantrasyonda Td' ye maruz bırakılmıştır. Böylece, aşı lezyonuna; infiltrasyon süresince veya erişebilirlik düzeyince artan Td maruziyeti ve proinflamatuvar uyarımlar birlikte modellenebilmiştir. Bu sayede, makrofajların alüminyum adjuvanlı aşılar karşı gelişen değişken özellikteki yanıtlarına folatın etkisi, uzaysal ve zamansal derinlikte değerlendirilebilmiştir.

5.1. Alüminyum Adjuvanlı Aşı Uygulamasının LPS Uyarımıyla Birlikte Hücre Canlılığına Etkisi

J774.A1 hücrelerine LPS uyarımıyla birlikte, önceden toksik olmadığı tespit edilmiş olan yüksek konsantrasyondaki Td uygulamasının, canlılıkta anlamlı düzeyde düşüşe neden olduğu görülmüştür. Bu sonuç makrofaj yanıtları çerçevesinde değerlendirilecek olunursa, yoğun DAMP ve/veya PAMP sinyalleri varlığında makrofajlar güçlü bir biçimde uyarılabilmekte, potent aktivasyonları sonucu canlılıkları azalabilmektedir (70). Aynı zamanda, makrofajlarda artan hücre ölümü; kontrollü bir biçimde, proinflamatuvar nitelikteki programlanmış hücre nekrozu piroptoz (pyroptosis) ile gerçekleşebilmektedir (71). LPS uyarımıyla birlikte artan alüminyum hidroksit internalizasyonu, J774.A1 hücrelerinde NLRP3 bağımlı kaspaz-1 aktivasyonuna neden olabilir (12, 51, 63). Aktive kaspaz-1, pro-IL-1 β 'nin kesimiyle aktif IL-1 β üretimi sağlamasının yanı sıra gasdermin D aktivasyonunu başlatabilir. Aktive gasdermin D ise, hücre membranında oligomerize olarak por oluşumuna neden olabilmektedir. Tehlike sinyallerine yoğun maruziyet sonucu yüksek düzeylerde kaspaz-1 aktivasyonu ile gerçekleşen bu durum, hem hücre içi yapıların hücre dışı ortama çıkışının DAMP aktivitesi göstermesiyle hem de aktive olan IL-1 β 'nin kolaylaştırılmış sekresyonu yoluyla inflamatuvar yanıtları desteklemektedir (71).

Uyarılmış J774.A1 hücrelerinde yüksek konsantrasyonda Td uygulamasıyla alüminyum hidroksit internalizasyon düzeylerinde görülen güçlü artış göz önünde bulundurularak; artan hücre ölümünün, makrofaj piroptoz yanıtlarıyla ilişkili olabileceği düşünülebilir. Bu durum *in vivo* şartlarda makrofajların alüminyum adjuvanlara karşı geliştirdikleri yanıt spektrumunda yüksek aktivasyon düzeylerinin bir parçası olarak görülebilir.

5.2. Alüminyum Adjuvanlı Aşı Uygulamasında FOLR2 Düzeyleri

FOLR2 nin genel olarak myeloid seriye özgün bir biçimde ifade edildiği kabul görse de nötrofillerde fonksiyonel FOLR2 aktivitesinin varlığı kanıtlanamamıştır (72). FOLR2 ifadesi günümüze kadar; enfeksiyon modellerinde inflamatuvar makrofaj

yanıtlarıyla (36), tümör ile ilişkili makrofajların hem tolerojenik (35, 37) hem de inflamatuvar (58) karakteriyle, romatoid artritte sinoviyal makrofajların inflamatuvar yanıtlarıyla (56, 72, 73), astım modellerinde alternatif makrofaj aktivasyonu ile ilişkin belirteçlerin ifadesiyle (74) ilişkilendirilmiştir. Bahsedilen tüm bu makrofaj aktivasyon spektrumu içerisinde FOLR2' nin fonksiyonel aktivitesinin yeri düşünüldüğünde; aktive makrofajlarda, yanıt karakterinden bağımsız olarak, dinlenme durumundaki ve/veya sağlıklı dokulardaki yerleşik makrofajlara göre FOLR2 aracılı folat internalizasyonu kapasitelerini artırdıkları gözlemlenmektedir (37, 56, 68, 74, 75).

Benzer bulgular J774.A1 hücrelerinde gerçekleştirilen çalışmamızda da izlenmiştir. Hücrelerin LPS uyarımı sonucu aktivasyonu ile birlikte FOLR2 yüzey ifadesi artmıştır. Bu artışın, sitoplazmik bölgede daha belirgin olarak gözlenebilmesinin; reseptörün devamlı olarak, plazma membran yüzeyi ile endozom yüzeyi arasında geri dönüşümlü bir biçimde konumlanmasına yol açan endositoz aktivitesinden (68) kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Protein düzeylerinin aksine transkript düzeylerinde belirgin farklarla karşılaşılmamasında, FOLR2' nin geri dönüşümlü dinamiği sayesinde protein düzeyinin stabil bir biçimde korunmasının ve bu sayede devamlı yeni reseptör ifadesine ihtiyaç duyulmamasının etkili olduğu düşünülmektedir.

Bazal durumda, yüksek folat seviyesiyle hücrelerin FOLR2 ifade etme oranlarının düştüğü gözlemlenmektedir. Bu düşüş artmış FOLR2 internalizasyonu ile ilişkilendirilebilir. Benzer şekilde, uyarılmamış (kontrol) hücrelerde artan Td uygulaması ile aradaki bu farkın kapanmasının, yükselen FOLR2 pozitifliği nedeniyle, internalizasyon sonucu görülen geçici negatifliğin izlenemeyecek düzeylere inmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

5.3. Monosit/Makrofaj Hücrelerinin Alüminyum Adjuvanlı Aşılarla Etkileşimi

In vitro modelin geliştirilmesinde planlandığı üzere, farklı uygulama kombinasyonları sayesinde, J774.A1 hücrelerinin koşullar arası heterojenliğin sağlandığı, morfolojik özellikleri yönünden gözlemlenebilmiştir. Hücrelerin, aşındaki

alüminyum hidroksit içeriğini internalize etme oranları ve yoğunlukları beklenildiği şekilde; maruziyet düzeyi ve süresiyle, ama en fazla makrofaj aktivasyonu ile artmıştır.

Uyarılmamış kontrol ve uyarılmış kontrol koşullarında herhangi bir Al^{3+} içeriği olmamasına rağmen düşük düzeyde lumogallion pozitifliğinin varlığı gözlemlenmektedir. Alüminyum adjuvanlı aşılar da lumogallion analizinin çalışıldığı araştırmalara bakıldığında, alüminyumsuz ortamdaki hücrelerde spesifik olmayan lumogallion boyanmasıyla ilgili bir incelemenin yapılmadığı görülmektedir (69, 76-78).

5.4. Alüminyum Adjuvanlı Aşılar Karşı Gelişen Makrofaj Yanıtları

Alüminyum adjuvanlı aşının makrofaj matürasyonuna etkisi CD11b, F4/80, CD206, CD69 ve CD62L belirteçlerinin değişimi yönünden incelenmiştir. İlgili belirteçlerden CD11b, CD18 ile oluşturduğu heterodimerik kompleks yapısı ile (Mac-1, $\alpha\beta 2$ integrin, CR3) integrin fonksiyonu görmesi (ICAM1-3, VCAM-1 v.b. bağlanarak), matriks proteinlerine (fibronektin, laminin, kollajen v.b.) adezyonu sağlaması, kompleman faktörleri (iC3b) ile opsonize partiküllerin fagositozunda görev alması sayesinde makrofaj fonksiyonlarının idamesinde önemli görevler üstlenmektedir (79). Fare makrofajlarının fenotiplenmesinde en sıklıkla kullanılan belirteçlerden biri olan F4/80 molekülünün ifade düzeyi, makrofaj matürasyonu ile ilişkilendirilmektedir (80). Makrofaj mannoz reseptörü (CD206, MRC1) ise fagositik aktivitesi sayesinde; mannozlu mikrobiyal yapıların tanınması ve internalizasyonunda, iyileşme fazında ise inflamatuvar yanıtlarla ilişkili fonksiyonel glikoproteinlerin ortamda hızlıca metabolize edilmesinde görev almaktadır (81). Lökositler için genel bir aktivasyon belirteci olarak görülen CD69 molekülü, sfingozin-1-fosfat gradyanı ile dolaşıma lökosit göçünü inhibe ederek hücrelerin buldukları doku kompartmanlarındaki fonksiyonlarının idamesine katkıda bulunmaktadır (82). Makrofajlarda CD69 ifadesinin aktivasyonla arttığı bilirse de, molekülün makrofaj aktivasyonunu doğrudan destekleyebildiği de düşünülmektedir (83). Belirteçlerden diğer bir tanesi olan L-selektinin (CD62L), dolaşımdan dokulara lökosit

ekstravazasyonuna aracılık etmesinin yanı sıra inflamatuvar koşullarda doku matriks glikoproteinlerine (sülfatlı glikozaminoglikan) adezyonda görev almaktadır (84).

J774.A1 hücrelerinde Td uygulamasına bağlı olarak matürasyonla ilişkili belirteçlerin ifade düzeylerindeki değişim; F4/80 ve CD11b için genel olarak yükselme, CD206 ve CD69 için benzer kalma ve CD62L için azalma yönünde gerçekleşmiştir. LPS uyarımıyla birlikte, CD11b hariç tüm belirteçlerin belirgin ölçüde yükselmesiyle; monositik karakterden, makrofajlaşmaya doğru matürasyon düzeyinin arttığı anlaşılmaktadır. Uyarılmış hücrelerde Td uygulaması; CD11b ve F4/80 ifadesini desteklemiş, CD206 ve CD62L ifadesini önemli ölçüde etkilememiş, CD69 ifadesini ise azaltıcı yönde etki etmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, morfolojik incelemeler ile birlikte değerlendirildiğinde, alüminyum adjuvanlı aşuların makrofaj hücrelerinde matürasyonu destekleyici yönde etki ettiği söylenebilir.

Alüminyum adjuvanlı aşının makrofaj aktivasyonuna etkisi; MHC-II, CD40, CD80 ve CD86 proinflamatuvar özellikteki yüzey belirteçlerinin (31, 45, 47) değişimi yönünden incelenmiştir. MHC-II molekülü antijen sunumu sayesinde yardımcı T lenfositlerin (*T helper* [Th]); aktivasyonunda, efektör yanıtlarının idamesinde ve güçlü hafıza yanıtlarının oluşmasında merkezi rol üstlenmektedir. Makrofaj ve Th arasında antijen sunumuyla kurulan immün sinapsta görev alan moleküllerden CD40 reseptörü, Th yüzey molekülü CD40L' nin bağlanmasıyla makrofaj hücresi için ko-stimülasyon sinyali sağlamaktadır. Böylece, aktive olan veya aktivasyonunun daha ileri safhalarına ilerleyen makrofaj hücresi; antijen sunumunu, ko-stimülatör molekül ifadesini ve proinflamatuvar sitokin üretimini artırarak Th yanıtlarını daha güçlü bir biçimde destekleyebilmektedir. Makrofaj ile Th immün sinapsında görev alan diğer bir yüzey belirteci olan CD80 ko-stimülatör molekülü, Th aktivasyonuna ve güçlü ko-stimülasyon sinyali sağlayabilmesi halinde Th₁ farklılaşmasına önemli katkılar sunmaktadır. CD86 molekülü ise, CD80 ile aynı protein ailesine mensup ve benzer fonksiyonlara sahip bir diğer ko-stimülatör moleküldür.

J774.A1 hücrelerinde Td uygulamasına bağlı olarak aktivasyonla ilişkili belirteçlerin ifade düzeylerindeki değişim; MHC-II için genel olarak yükselme, CD80

ve CD86 için benzer kalma ve CD40 için azalma yönünde gerçekleşmiştir. LPS uyarımla birlikte tüm belirteçlerin belirgin ölçüde yükselmesiyle inflamatuvar makrofaj yanıtlarının geliştiği anlaşılmaktadır. Uyarılmış hücrelerde Td uygulaması; MHC-II, CD40 ve CD86 ifadesini desteklemiş, CD80 ifadesini ise azaltıcı yönde etki etmiştir. MHC-II düzeyindeki artışın, artan uyarımlara karşı gelişen makrofaj yanıtlarının doğrudan etkisinin yanı sıra, aşının antijenik içeriğinin adsorbe olduğu alüminyum hidroksit internalizasyonuna bağlı, benzer eğilimde artan antijen sunumu kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Alüminyum adjuvanlı aşının, makrofajların proinflamatuvar sitokin yanıtlarına etkisi; IL1b, IL18, Tnf, IL6 ve Ccl5 gen ifadeleri düzeyinde incelenmiştir. IL1b, IL-1 β proteininin kaspaz-1 enzimi ile kesime (proinflamatuvar özellikteki matür IL-1 β sikoninin üretimi) uğramamış inaktif formunu kodlamaktadır (63). IL18 geni ise, IL-1 β ile fonksiyonel açıdan büyük ölçüde benzerlik gösteren IL-18 proteininin inaktif formunu kodlamaktadır (12). İnflamatuvar makrofaj yanıtlarında imza sitokinleri olarak görülen IL-6, IL6 geni; TNF- α ise Tnf geni tarafından kodlanmaktadır (34). Proinflamatuvar sitokin yanıtlarına ek olarak makrofajlar, ürettikleri CCL5 kemokini aracılığıyla periferik dokulara Th göçünü sağlayabilmekte; böylece efektör Th' lere antijen sunumu, ko-stimülasyon ve sitokin uyarımının devamlılığını sağlayarak hafıza yanıtlarını destekleyebilmektedir (30).

Sonuçlar değerlendirildiğinde, hücrelerin yüksek konsantrasyonda Td varlığında, biyolojik açıdan anlamlı kabul edilebilir düzeyde artış, incelenen genler içerisinde yalnızca IL1b ve Ccl5 ifadesinde görülmektedir. Uyarımla birlikte aktive olan makrofajlarda IL18 dışında incelenen tüm gen ifadelerinde artış olmuş, IL1b, IL6 ve Ccl5 genlerinde bu artış çok yüksek düzeylerde gözlemlenmiştir. Aktive makrofajlarda Td maruziyeti beklenmedik bir biçimde, genel olarak düşük konsantrasyonda proinflamatuvar gen ifadesini desteklerken yüksek konsantrasyonda ise bu etki yitirilmektedir.

Ulaşılan bu sonuçlar ışığında, aktive makrofajlarda alüminyum adjuvanlı aşıya maruziyet sonucu elde edilen yanıt düzeylerinin genel olarak geliştiği ancak incelenen

belirteçler arasında homojen bir değişim eğilimin olmadığı görülmektedir. Literatürde daha önceden gerçekleştirilmiş, konuyla alakalı çalışmalar incelendiğinde, Mori A ve ark. fare kemik iliğinden dönüştürülmüş dendritik hücrelere, LPS uyarımını takiben alüminyum hidroksit uygulaması yapmışlardır. Çalışmalarında, Th₁ polarizasyonunu destekleyici aktivitedeki proinflamatuvar IL-12 sitokininin p35 alt ünitesi ifadesinin baskılandığını raporlamışlardır (85). Gözlemlenen bu baskılanmada fosfoinositid 3 kinaz (*phosphoinositide-3 kinase*, PI3K) yolağının etkili olduğuna dair bulgular elde etmişlerdir. PI3K yolağı aynı zamanda, NLRP3 aktivasyonu üzerinden fonksiyonel IL-1β yanıtlarının oluşmasında da görev almaktadır (86). Kuroda E ve ark., tek başına LPS uyarımı veya alüminyum hidroksit uygulaması yapılmış peritoneal makrofaj hücrelerinde düşük IL-1β yanıtları elde ederken LPS ve AH' in birlikte kullanımıyla çok yüksek düzeylerde IL-1β yanıtıyla karşılaştıklarını raporlamıştır (87).

TLR4 (LPS reseptörü) uyarımı ile alüminyum adjuvanın birlikteliğinin aşı immünolojisi açısından diğer bir önemi, alüminyum hidroksit ve MPL içeriğiyle AS04 adjuvan sisteminin hepatit B ve HPV aşılarında kullanılmasıdır (12). Ko EJ ve ark. gerçekleştirdikleri *in vivo* çalışmalarda, alüminyum hidroksit ile kombine edildiğinde MPL' nin, influenzaya karşı geliştirilen humoral immün yanıtlara ve koruyuculuğa etkisinin daha fazla desteklendiğini görmüştür. Ancak beklenmedik bir biçimde, alüminyum hidroksit ile kombine edildiğinde MPL ile indüklenen; kemik iliğinden dönüştürülmüş dendritik hücrelerdeki CD80, CD86, CD40 ifadelerinde ve IL-6, TNF-α, IL-12 sekresyonlarında düşüş tespit edilmiştir. Yazarlar bu durumu, aşıyla ilişkili yan etki potansiyelinde olası bir azalmayla ilişkilendirmiştir (70).

Çalışma kapsamında elde edilen bulgular literatürle birlikte değerlendirildiğinde, uyarılmış antijen sunan hücre yanıtları, alüminyum adjuvan varlığından tek yönlü bir eğilimle etkilenmemekte, bazı proinflamatuvar yanıtlarda belli bir ölçüde azalma olurken, muhtemelen yine benzer mekanizmalar üzerinden diğer yanıtların ve özellikle IL-1β düzeylerinin desteklendiği gözlemlenmektedir. Doğal immün sistemin bu derece karmaşıklık gösteren yanıtlarının, kümülatif etkinlik ve etkililik üzerinde destekleyici nitelikte olduğu sonucuna varılabilir.

Fagositoz tarihsel olarak ilk aydınlatılan makrofaj fonksiyonel yanıtlarındandır ve makrofaj aktivasyonunun en belirgin özelliklerinden biridir (34). Fagositoz analizlerinde beklenildiği üzere, uyarımla birlikte fagositoz kapasitesine sahip hücre oranlarının büyük ölçüde arttığı görülmektedir. Bu durum, geliştirilen *in vitro* model açısından değerlendirildiğinde, uyarımla artan fagositoz kapasitesi sayesinde artan alüminyum hidroksit internalizasyonu sonucu hücre içi düzeyde artmış Td maruziyeti elde edilebilmiştir. Diğer taraftan hücrelerde, aktivasyondan bağımsız olarak Td inkübasyonu ile fagositoz oranlarının düştüğü gözlemlenmiştir. Bu sonuçlarla, analiz öncesi hücrelerde artan alüminyum hidroksit internalizasyonu ile ters orantılı olarak fagositoz kapasitesinin azaldığı anlaşılmaktadır. Aktivasyon ve Td maruziyetiyle artan fagosomal yük nedeniyle fagositoz kapasitesinin devamlılığının azaldığı söylenebilir.

5.5. Alüminyum Adjuvanlı Aşılarda Makrofaj Yanıtlarına Folatın Etkisi

Folatlar ve kofaktör görevi gördükleri biyokimyasal reaksiyonlar, hücrelerin tek karbon metabolizmasında önemli roller üstlenmektedir. 5-metil tetrahidrofolat (5m-THF), B12 vitaminin de katıldığı reaksiyonlarla homosisteinden metiyonin sentezlenmesinde metil donörü olarak görev alırken kendisi de THF' ta dönüşmektedir. Bu yolla üretimini desteklediği S-adenozil metiyonin (SAM), DNA' da sitozin metilasyonlarıyla gen ifadesinin epigenetik düzenlenmesinde doğrudan rol alabilmektedir. Bunun yanı sıra, tek veya çift karbon gruplarının yapısına eklenmesiyle THF, sırasıyla timidilat ve pürin biyosentezine karbon sağlayarak RNA, DNA sentezine katkıda bulunmaktadır. THF, timidilat sentezinde DHF formuna yükseltgenmekteyken, hızlı bir biçimde tekrar THF formuna indirgenerek, hücrelerdeki THF çekirdeğini içeren ko-faktör havuzunun idamesi sağlanmaktadır.

Hücresel folat düzeylerinin idamesinde folat reseptörleri (FOLRs) ile birlikte indirgenmiş folat taşıyıcısı (*reduced folate carrier*, RFC) ve proton bağımlı folat kanalı da (*proton coupled folate transporter*, PCFT) görev almaktadır. PCFT çoğu sağlıklı dokuda ifade edilse de yalnızca düşük pH değerlerinde hücresel folat alımını sağlayabilmektedir. Bu aktivitesinin yanı sıra, fizyolojik pH koşullarında fonksiyon gösteren FOLR'den geç endozomun asidik pH koşullarında serbestleşen folatlar, aynı

koşullarda aktifleşen PCFT katkısıyla sitoplazmaya geçebilmektedir. Diğer taraftan RFC, çoğu sağlıklı dokudaki nötral pH değerlerinde optimal düzeyde fonksiyonunu gerçekleştirebilmektedir. Her iki taşıyıcıda çift yönlü olarak çalışabilmekte, membrandan folat geçişinin hücre içi yönünde devamlılığı; RFC için hücre içi organik fosfat konsantrasyonunun yüksekliği, PCFT için hücre içi nötral pH değerleri ile sağlanmaktadır (88).

Folatın makrofaj biyolojisine etkisi öncelikle hücrelerdeki alüminyum hidroksit düzeyleri açısından değerlendirildiğinde, LPS uyarımı yokluğunda hücrelerdeki alüminyum internalizasyon kapasitesini artmasına yol açtığı görülmektedir. Ancak uyarımın 24 saatlik döneminde hala gözlemlenebilen bu etkinin, 48. saate gelindiğinde büyük ölçüde tersine döndüğü görülmektedir. Bu aktivitesi özelinde, folatın, makrofaj aktivasyonunun ilk zamanlarında aşı etkinliğini destekleyici, devamında ise azaltıcı yönde etki edebileceği düşünülebilir.

Makrofaj matürasyonu ve aktivasyonu ile ilişkili yüzey belirteçlerinin ifadesinde folatın etkisine bakıldığında, J774.A1 hücrelerinin Td' ye karşı geliştirdiği yanıtlarda genel olarak; MHC-II, CD80, CD206 düzeylerinin arttığı; CD40, CD86, F4/80, CD69 düzeylerinin azaldığı görülmektedir. Uyarımla birlikte aktive olan makrofajlarda ise folatın genel olarak F4/80 ve MHC-II düzeylerini destekleyici; CD40, CD80, CD86, CD69, CD62L düzeylerini azaltıcı yönde etki etmiştir.

Folatın, makrofajların proinflamatuvar fonksiyonlarıyla ilişkili gen ifadesine etkisi incelendiğinde, LPS uyarımı yapılmayan hücrelerde sadece yüksek konsantrasyonda Td maruziyetiyle uyarılan Il1b ve Ccl5 ifadelerini biyolojik açıdan anlamlı olabilecek düzeylerde desteklediği görülmektedir. Aktive makrofajlarda Td maruziyeti olmadığında folatla proinflamatuvar gen ifadesi baskılanırken, düşük düzeyde Td maruziyetiyle bu etkinin büyük ölçüde tersine döndüğü, ancak artan Td maruziyetiyle etkisinin tekrar baskılayıcı bir karakter kazandığı görülmüştür.

Folatın, Td aşısına karşı gelişen makrofaj fonksiyonel yanıtlarına etkisi incelendiğinde, her koşulda fagositoz aktivitesinin desteklendiği görülmektedir.

Koşullardaki bu aktivite artışının hücrelerde alüminyum hidroksit yüküyle ilişkilendirildiğinde, azalan fagositoz kapasitesine karşın folatın destekleyici etkisi devam etmektedir. Bu gözlemden yola çıkarak *in vivo* şartlarda, aşıyla doğrudan veya dolaylı olarak indüklenen makrofaj aktivasyon spektrumunun tamamında, folatla birlikte antijen internalizasyonunun artması ihtimali söz konusu olabilir. Benzer bir şekilde folatla, alüminyum hidroksit düzeylerindeki değişim eğilimlerinden bağımsız olarak MHC-II ifadesinde artış gözlemlenmesi, fagositoz kapasitesinin devamlı desteklenmesi ile ilişkili olarak görülebilir. Machacek C ve ark. FOLR2' nin plazma membranında CD18 molekülüyle etkileşime girerek CD11b ile Mac-1 integrin (CR3) kompleksi yapısının oluşmasını engellediğini fonksiyonel olarak göstermişlerdir (89). Bu bilgiler ışığında, çalışma bulgularımızda fagositoz aktivitesindeki artışın, ortamdaki yüksek folat seviyesiyle FOLR2' nin endositoz aktivitesinin artması sayesinde, Mac-1 integrin fonksiyonlarının geri kazanılmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Diğer incelenen fonksiyonel yanıtlar ise ROS ve NO üretim kapasitesidir. Radikalik aktiviteleri nedeniyle hücrelerdeki hem ROS (90) hem de NO (91) üretimi, antijen işlenmesi süreçlerinin önemli birer bileşenidir. Hücrelerin Td' ye verdikleri ROS ve NO yanıtlarında folatla, düşük Td maruziyet düzeyinde destekleyici, yüksek maruziyetle ise azaltıcı etki görülmüştür. Ancak hücrelerin, LPS uyarımıyla birlikte Td uygulaması yapıldığındaki ROS ve NO yanıtlarında folatın önemli düzeyde bir etkisi görülmemiştir. Antijen işleme kapasitesi yönünden bakıldığında, folatın artan Td maruziyeti ve inflamatuvar koşullara bağlı hücrelerdeki fagolizozomal reaksiyonları baskılayıcı veya düşük düzeyde baskılayıcı bir etkiye neden olabileceği söylenebilir.

Folatın, makrofajların inflamatuvar fonksiyonlarıyla ilişkili belirteçler yönünden alüminyum adjuvanlı aşıya karşı geliştirilen yanıtlardaki etkileri tek yönlü bir eğilim göstermemektedir. Ancak aktive makrofaj hücrelerinde genel anlamda, proinflamatuvar karakterdeki yanıtları baskılar nitelikte bir aktivitesi olabileceği düşünülebilir. Bu gözlemler çerçevesinde literatür değerlendirmesi yapıldığında; Yu ve ark. çalışmalarında, hücresel tek-karbon metabolizması ile üretilen SAM molekülünün, LPS ile indüklenen peritoneal makrofaj hücrelerinde IL-1 β yanıtlarını

desteklediği gösterilmiştir. Folat metabolitlerinin, 5-mTHF aracılığıyla metiyonin üretiminden daha çok adenoil biyosenteziyle katkıda bulunduğu gözlemlenmiştir. Düzeyleri artan SAM aktivitesini H3 histon proteininin metilasyonu (H3K4me3 ve H3K36me3 bağlandıkları gen bölgelerinin aktif transkripsiyonuyla ilişkilendirilmektedirler) ile IL1b genini transkripsiyonunu desteklediği savunulmuştur (92). Ancak çalışma kapsamında, DMEM besiyerinde hazırlanan kültür ortamındaki folat seviyesinin etkisi değerlendirilmediğinden elde edilen IL-1 β yanıtlarında yüksek folat seviyesinin destekleyici veya azaltıcı yönde nasıl etki ettiği tartışılmamaktadır.

Samblas ve ark., THP-1 insan monositik hücre hattında folatın proinflamatuvar gen ifadesinin epigenetik düzenlenmesi üzerine etkilerini, standart RPMI kültür ortamına karşın 11.3 μ M'lık oldukça yüksek folat uygulamasıyla test etmişlerdir. İlgili kültür ortamında hücreler forbol miristat asetat (PMA) uygulamasıyla makrofaja dönüştürülmüştür. LPS uyarımı varlığında, artırılan folat seviyesiyle; IL1B, TNF, CCL2, ve TLR4 rölatif transkript düzeylerinde düşüş elde edilmiştir. CD40 ve IL18 gen ifadesinde farklılık gösterilmemiştir. Çalışmada IL1B ifadesindeki bu değişim promotör bölgesindeki artmış metilasyon düzeyleriyle ilişkilendirilebilmiş olsa da TNF için benzer bir gözlem elde edilememiştir. IL1B ve TNF gen ifadesi NF-KB fonksiyonları açısından değerlendirildiğinde ise her iki geninde promotör bölgelerinde NF-KB bağlanma düzeylerinde bir değişim görülmemiştir (93).

Samaniego R ve ark. insan monositlerinden dönüştürdükleri GM-CSF ile indüklenmiş makrofajlar (FOLR2⁻, CD86^{düşük}, HLA-DR^{düşük}, CD68^{düşük}, CD209⁻, CD163^{düşük}, CD14^{düşük}; LPS uyarımıyla IL-10^{düşük}, TNF- α ^{yüksek}, IL-6^{yüksek}, IL-23⁻) ile M-CSF ile indüklenmiş makrofajları (FOLR2⁺, CD86^{yüksek}, HLA-DR^{yüksek}, CD68^{yüksek}, CD163^{yüksek}, CD209⁻, CD163^{yüksek}, CD14^{yüksek}; LPS uyarımıyla IL-10^{yüksek}, TNF- α ^{düşük}, IL-6^{düşük}, IL-23⁺) karşılaştırdıkları çalışmalarında, M-CSF ile dönüştürülmüş makrofajların GM-CSF ile dönüştürülmüşlere göre daha fazla 5m-THF hücre alımı yaptıkları ve bu süreçte FOLR2 aktivitesinden faydalandıklarını göstermişlerdir. IL-4 uyarımının iki makrofaj türünde de 5m-THF hücre alımını destekleyici ama IFN- γ 'nın azaltıcı etki gösterdiği, M-CSF ile dönüştürülmüş makrofajların FOLR2 ve PCFT (SLC46A1 geni) rölatif

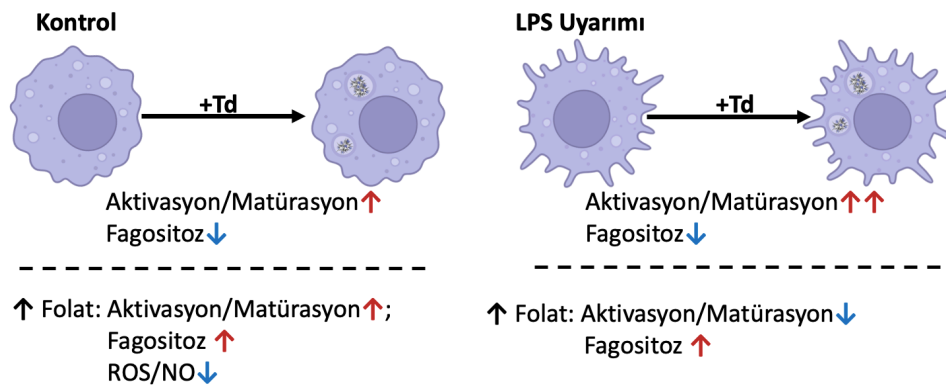
transkript düzeylerini artırdığı, GM-CSF ile dönüştürülmüşlerde ise RFC (SLC19A1) geni düzeylerinde artışın olduğu gözlemlenmiştir (72). GM-CSF ve M-CSF dönüşümlerinde 2.3 μM 'lık folat seviyesinin etkisi LPS uyarımı altında incelendiğinde, GM-CSF ile dönüştürülmüş makrofajlarda CCL2, CSF1 (M-CSF), IL6, TNF rölatif transkript düzeylerinde düşüş görülmüşken; IL10 düzeylerinde ve M-CSF dönüştürülmüş makrofajlardaki ifade değişimlerinde anlamlı farklar gözlemlenmemiştir.

Bu bilgiler ışığında, ortamdaki folatların ve hücrelerdeki düzeylerinin, makrofajların uzaysal ve zamansal olarak değişken biyolojisi üzerinde; SAM ve allosterik inhibitörü S-adenozilhomosistein arasındaki dengenin sonucu olarak; proinflamatuvar genlerin düzenleyici özellikteki promotör ve hızlandırıcı (*enhancer*) bölgelerinin metilasyonu veya H3K4me3 ve H3K36me3 histon modifikasyonu gibi karmaşık düzenleyici mekanizmaları destekleyerek etkili olduğu düşünülebilir (72, 92-94). Folatın, proinflamatuvar gen ifadesini düzenlenmesinde destekleyici veya azaltıcı yönde etki ederek makrofaj hücrelerinin alüminyum adjuvanlı aşılara karşı geliştirdikleri yanıtların şekillenmesine katkıda bulunabileceği görülmektedir. Folatın alüminyum adjuvanlı aşı etkinliği veya yan etkileri üzerinde düzenleyici rolünün araştırılmasında *in vivo* çalışmalar, değerli bulguları literatüre kazandırabilir.

Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlarda, alüminyum adjuvanlı model aşının (Td) monosit/makrofaj hücrelerinde CD11b, F4/80 ve MHC-II ifadesini, Il1b ve Ccl5 gen ifadesini artırdığı; diğer taraftan CD62L ve CD40 ifadesini, fagositoz kapasitesini azalttığı görülmüştür. LPS uyarımının ise, makrofaj yanıtlarıyla ilişkili incelenen çoğu parametrenin düzeylerini artırdığı gösterilmiştir. Aktive makrofajlarda ise Td uygulamasının; CD11b, F4/80, MHC-II, CD40 ve CD86 ifadesini artırdığı; canlılığı, CD69, CD80, fagositoz kapasitesini azalttığı; Il1b, Tnf, Il6, Ccl5 gen ifadesini ise artan konsantrasyonlarda başta desteklediği sonrasında azalttığı ortaya konmuştur. Folat seviyesinin yükseltilmesinin ise, hücrelerin artan Td maruziyetinde; alüminyum hidroksit internalizasyonunu, CD11b, CD206, CD62L, MHC-II, ve CD80 ifadesini, Il1b ve Ccl5 gen ifadesini, fagositoz kapasitesini destekleyici; F4/80, CD40 ve CD86

ifadesini, ROS ve NO üretim kapasitesini azaltıcı yönde etki etmiştir. Aktive makrofajlarda ise; F4/80 ve MHC-II ifadesini, fagositoz kapasitesini desteklediği ancak; alüminyum hidroksit internalizasyonunu, CD40, CD80, CD86, CD69, CD62L ifadesini, genel olarak IL1b, Tnf, IL6 ve Ccl5 gen ifadesini azalttığı ortaya konmuştur.

Raporlanan bulgular çerçevesinde, alüminyum adjuvanın, özellikle aktive makrofaj yanıtlarını, aşı etkinliğini artırabilecek yönde destekleyebildiği düşünülmektedir. Alüminyum adjuvanla indüklenmiş inflamasyon ortamında aktive olan makrofajlar bu yanıtları sayesinde özellikle Th yanıtlarının desteklenmesinde önemli roller üstlenebilir. AS04 ve benzeri TLR agonisti-alüminyum adjuvan kombine sistemlerin aşı araştırma ve geliştirme çalışmalarında daha sık yer almasıyla etkinliği ve koruyuculuğu daha yüksek ürünlerin keşfi mümkün olabilir. Folat seviyesinin artırılması ise, monosit/makrofaj karakterindeki hücrelerin yanıtlarını büyük ölçüde aşı etkinliğini arttıracak yönde desteklemiştir. Diğer taraftan, aktive makrofajların fizyolojik koşullara yakın seviyedeki folat varlığında, alüminyum adjuvanlı aşıyla geliştirdikleri yanıtların proinflamatuvar karakterinin, folat seviyesinin artırılmasıyla büyük ölçüde baskılandığı sonucuna varılabilir. Makrofaj yanıtlarının düzenlenmesinde etkili olabileceği düşünülen folat ve ilişkili yollarının hedeflenmesiyle, aşı etkinliğinin kurgulanan yönde şekillenmesini sağlayabilecek yenilikçi yaklaşımların keşfi mümkün olabilir.



Şekil 5.1. J774.A1 hücrelerinin alüminyum adjuvanlı aşıyla geliştirdiği yanıtlara LPS uyarımının ve folat seviyesinin etkisinin genel özeti.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- J774.A1 hücreleriyle canlılığın korunarak, alüminyum adjuvanlı aşılarla karşı gelişen makrofaj yanıtlarında, maruziyet düzeyinin ve aktivasyon durumunun birlikte değerlendirilebildiği, *in vitro* deney modeli oluşturulmuştur. Sadece LPS uyarımıyla birlikte yüksek konsantrasyonda Td maruziyetinin 48. saatindeki düşüşe rağmen canlılık, tüm koşullarda %80' nin üzerinde korunmuştur.
- J774.A1 hücreleri uyarım süresine bağlı olarak yüzey FOLR2 ifadesini artırmıştır. İmmünofloresan görüntülemesinde FOLR2 ifadesinin sitoplazmik kompartmanlarda yoğun bir biçimde görülmesi reseptörün endositoz aktivitesiyle ilişkilendirilmiştir. FOLR2 ifadesinin düşük folat seviyesiyle arttığı ancak Td uygulaması ve uyarımla birlikte bu farkın kaybolduğu görülmüştür. Hücredeki FOLR2 rölatif transkript düzeylerinde, koşullar arasında önemli ölçüde değişim izlenmemiştir.
- Mikroskopik analizlerde J774.A1 hücreleri, çoğunlukla monositik morfolojilerini korurken, uyarımla birlikte makrofaj benzeri karakter kazanmıştır. Hücresel granülarite Td düzeylerine bağlı olarak artmıştır.
- Alüminyum hidroksitin hücre içi düzeylerinin, uygulanan Td konsantrasyonu ve LPS uyarımıyla, zamana bağlı olarak arttığı görülmüştür. Böylece, geliştirilen modelde koşullar arası amaçlanan heterojenitenin sağlandığı anlaşılmıştır. Folat seviyesinin yükseltilmesi; LPS uyarımının 24. saatinde hücrelerin alüminyum hidroksit internalizasyonunu desteklerken, uyarımın 48. saatinde azaltıcı yönde etki etmiştir.
- J774.A1 hücrelerinde Td uygulamasıyla birlikte; F4/80, CD11b ve MHC-II ifadelerinin genel olarak desteklendiği; CD206, CD69, CD80 ve CD86 ifadelerinin önemli ölçüde etkilenmediği; CD62L ve CD40 ifadelerinin ise azaldığı görülmüştür. Folat seviyesinin yükseltilmesi ise, artan Td konsantrasyonlarında CD11b, CD206, MHC-II ve CD62L ifadelerini desteklemiş; CD69 ifadesini önemli ölçüde etkilememiş, F4/80, CD40 ve CD86 ifadelerinde azaltıcı yönde etki göstermiştir. LPS uyarımıyla J774.A1 hücrelerinin CD11b haricindeki tüm aktivasyon ve matürasyon belirteçlerinin ifade düzeyleri artmıştır. LPS ile

uyarılmış hücrelerde Td uygulamasıyla birlikte genel olarak CD11b, F4/80, MHC-II, CD40 ve CD86 ifadeleri artmış; CD206 ve CD62L ifadeleri önemli düzeyde etkilenmemiş; CD69 ve CD80 ifadeleri azalmıştır. Folat seviyesinin yükseltilmesi ise, uyarılmış hücrelerde, artan Td konsantrasyonlarıyla F4/80 ve MHC-II ifadelerini desteklemiş; CD11b ifadesini önemli düzeyde değiştirmemiş, CD206, CD69, CD62L, CD40, CD80 ve CD86 ifadelerini azaltıcı yönde etki etmiştir.

- J774.A1 hücrelerinde Td uygulamasıyla, genel olarak Il1b ve Ccl5 gen ifadelerinin belirli ölçüde arttığı; Il18, Tnf ve Il6 için ise önemli düzeyde değişimin olmadığı görülmüştür. LPS uyarımıyla hücrelerin Il1b, Tnf, Il6 ve Ccl5 ifadelerini artırdığı, düşük konsantrasyonda Td uygulamasıyla bu artışın genel olarak desteklendiği, Td konsantrasyonunun artırılmasının ise bu etkiyi tersine çevirdiği gözlemlenmiştir. Folat seviyesinin artırılması, uyarılmamış (kontrol) hücrelerdeki gen ifadesini, Td konsantrasyonundaki artışla daha çok destekleyici yönde etkilediği görülmüştür. LPS uyarımıyla folatın, büyük ölçüde baskılayıcı yönde bir etkisinin olduğu, düşük konsantrasyon Td uygulamasıyla bu etkinin terse döndüğü, yüksek Td konsantrasyonuna çıkıldığında tekrardan baskılayıcı bir karakter kazandığı gözlemlenmiştir.
- Td uygulamasının, konsantrasyon bağımlı olarak hem LPS uyarımı yapılmamış hem de uyarılmış hücrelerde fagositoz kapasitesini baskıladığı görülmüştür. Ortamdaki folat seviyesinin artırılmasıyla hem kontrol (uyarılmamış) hem de uyarılmış hücrelerde fagositoz aktivitesi belirli ölçüde desteklenmiştir.
- Folat, hücrelerin Td' ye verdikleri ROS ve NO yanıtlarında, düşük konsantrasyondaki Td uygulamasında destekleyici, yüksek konsantrasyonda ise azaltıcı yönde etki etmiştir. LPS uyarımıyla birlikte Td uygulaması yapıldığında, ROS ve NO yanıtlarında folatın önemli düzeyde bir etkisi görülmemiştir.
- MTT analizindeki toksik olmayan konsantrasyonlarda canlılıkta görülen dalgalı seyrin, hücrelerin mitokondriyal aktivitesindeki değişimlerden kaynaklanması söz konusu olabilir. Bu durumun aydınlatılmasında, model olarak kullanılan hücre hattının Td ile inkübasyon süreleri boyunca, proliferasyon düzeylerindeki

değişimlerin de göz önüne alınmasıyla hücre sayımı yapılarak, hücre başına düşen mitokondriyal aktivitenin hesaplanması faydalı olabilir.

- FOLR2 ifadesi western blot çalışmalarıyla değerlendirilerek, total reseptör ifadesinin değişimi endositik aktivitesinden bağımsız olarak araştırılabilir.
- Hücrelerdeki morfolojik değişimler, sitokimyasal boyamalarla (May-Grunwald Giemsa) daha detaylı incelenebilir.
- Popülasyonda, hücre başına düşen alüminyum hidroksit internalizasyon düzeyleri, inkübasyon sonrası hücre sayımını takiben gerçekleştirilecek atomik absorpsiyon spektroskopisi analizleriyle doğrudan ölçülebilir. Bu yöntemle, spesifik olmayan boyanmaların sonuçlarda yaptığı girişim elimine edilebilir.
- 48. saatte analiz edilen yüzey belirteci ifadeleri, 24. saatte de incelenerek, *in vivo* şartlardaki makrofaj aktivasyon spektrumundan beklenebilecek yanıtlar daha detaylandırılmış bir biçimde incelenebilir.
- Gen ifadeleri düzeyinde incelenen kemokin ve sitokinlerin hücrelerden salgılanma seviyeleri, süpernatant örneklerinden gerçekleştirilebilecek ELISA bazlı analizlerle protein düzeyinde tayin edilebilir.
- ROS ve NO, radikalik metabolitler olmaları nedeniyle, akım sitometri örnek hazırlığı sürecinde stabilitelerinin korunması için hassas ve hızlı işlem süreçlerini gerektirmektedir. Formülasyonlarla 3 saatlik inkübasyon süresince kuyu başına düşen canlı hücre sayısının koşullar arasında büyük ölçüde benzer kalması ihtimali göz önünde bulundurularak, floresan plaka okuyucu tabanlı analizlerle stabilite daha etkin bir biçimde korunabilir.
- Hücrelerdeki ROS ve NO üretim kapasitesinde folatın etkisinin daha etkin bir biçimde incelenebilmesi için formülasyon uygulamaları, folatsız veya standart tam RPMI besiyerinde adezyon süresine takiben 48 saatlik inkübasyon sonrası gerçekleştirilebilir.

KAYNAKLAR

1. CDC. Vaccines & immunizations: glossary [İnternet]. 2020 [Erişim Tarihi 14 Temmuz 2022]. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/vaccines/terms/glossary.html>.
2. Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology*. 2021;21(2):83-100.
3. Group OV. Types of vaccine [İnternet]. 2021 [Erişim Tarihi 17 Temmuz 2022]. Erişim adresi: <https://vk.ovg.ox.ac.uk/vk/types-of-vaccine>.
4. HHS. Vaccine types. 2021 [Erişim Tarihi 17 Temmuz 2022]. Erişim adresi: <https://www.hhs.gov/immunization/basics/types/index.html>.
5. NIH. Vaccine types. 2019 [Erişim Tarihi 17 Temmuz 2022]. Erişim adresi: <https://www.niaid.nih.gov/research/vaccine-types>.
6. Vetter V, Denizer G, Friedland LR, Krishnan J, Shapiro M. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Annals of Medicine*. 2018;50(2):110-20.
7. Wodi AP MV. Principles of vaccination. 2021 [Erişim Tarihi 17 Temmuz 2022]. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/prinvac.html>.
8. Sağlık Bakanlığı. Aşı türleri. 2022 [Erişim Tarihi 17 Temmuz 2022]. Erişim adresi: <https://covid19asi.saglik.gov.tr/TR-77805/asi-turleri.html>.
9. Roth GA, Picece VCTM, Ou BS, Luo W, Pulendran B, Appel EA. Designing spatial and temporal control of vaccine responses. *Nature Reviews Materials*. 2022;7(3):174-95.
10. Andreano E, D'Oro U, Rappuoli R, Finco O. Vaccine Evolution and Its Application to Fight Modern Threats. *Frontiers in Immunology*. 2019;10.
11. Di Pasquale A, Preiss S, Tavares Da Silva F, Garçon N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines (Basel)*. 2015;3(2):320-43.
12. Garçon N, Friede M. 6 - Evolution of Adjuvants Across the Centuries. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, Edwards KM, editors. *Plotkin's Vaccines (Seventh Edition)*: Elsevier; 2018. p. 61-74.e4.
13. CDC. Adjuvants and vaccines. 2020 [Erişim Tarihi 14 Temmuz 2022]. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/vaccinesafety/concerns/adjuvants.html>.
14. Calabro S, Tortoli M, Baudner BC, Pacitto A, Cortese M, O'Hagan DT, et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine*. 2011;29(9):1812-23.
15. Didierlaurent AM, Collignon C, Bourguignon P, Wouters S, Fierens K, Fochesato M, et al. Enhancement of Adaptive Immunity by the Human Vaccine Adjuvant AS01 Depends on Activated Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. 2014;193(4):1920-30.
16. Liang F, Lindgren G, Sandgren KJ, Thompson EA, Francica JR, Seubert A, et al. Vaccine priming is restricted to draining lymph nodes and controlled by adjuvant-mediated antigen uptake. *Sci Transl Med*. 2017;9(393).
17. Liang F, Loré K. Local innate immune responses in the vaccine adjuvant-injected muscle. *Clin Transl Immunology*. 2016;5(4):e74.

18. Lu F, Hogenesch H. Kinetics of the inflammatory response following intramuscular injection of aluminum adjuvant. *Vaccine*. 2013;31(37):3979-86.
19. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021;6(1):291.
20. Abbas AK LA, Pillai S. *Temel İmmünoloji*. Philadelphia: Elsevier; 2015.
21. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw*. 2018;18(4):e27.
22. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
23. Chauhan N, Tiwari S, Iype T, Jain U. An overview of adjuvants utilized in prophylactic vaccine formulation as immunomodulators. *Expert Rev Vaccines*. 2017;16(5):491-502.
24. Bastola R, Noh G, Keum T, Bashyal S, Seo JE, Choi J, et al. Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Arch Pharm Res*. 2017;40(11):1238-48.
25. HogenEsch H, O'Hagan DT, Fox CB. Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want. *npj Vaccines*. 2018;3(1):51.
26. FDA. Common ingredients in U.S. licensed vaccines. 2019 [Erişim Tarihi 22 Temmuz 2022]. Erişim adresi: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/common-ingredients-us-licensed-vaccines#:~:text=The%20aluminum%20salts%20in%20some,vaccine%2C%20and%20hepatitis%20B%20vaccines>.
27. van Aalst S, Ludwig IS, van Kooten PJS, van der Zee R, van Eden W, Broere F. Dynamics of APC recruitment at the site of injection following injection of vaccine adjuvants. *Vaccine*. 2017;35(12):1622-9.
28. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(11):723-37.
29. Mellors J, Tipton T, Longet S, Carroll M. Viral Evasion of the Complement System and Its Importance for Vaccines and Therapeutics. *Front Immunol*. 2020;11:1450.
30. Gray JI, Westerhof LM, MacLeod MKL. The roles of resident, central and effector memory CD4 T-cells in protective immunity following infection or vaccination. *Immunology*. 2018;154(4):574-81.
31. Chapter 7 - Antigen Processing and Presentation. In: Mak TW, Saunders ME, Jett BD, editors. *Primer to the Immune Response (Second Edition)*. Boston: Academic Cell; 2014. p. 161-79.
32. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res*. 2014;2(1):1.
33. Chapter 14 - Vaccination. In: Mak TW, Saunders ME, Jett BD, editors. *Primer to the Immune Response (Second Edition)*. Boston: Academic Cell; 2014. p. 333-75.
34. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(12):958-69.

35. Samaniego R, Domínguez-Soto Á, Ratnam M, Matsuyama T, Sánchez-Mateos P, Corbí Á L, et al. Folate Receptor β (FR β) Expression in Tissue-Resident and Tumor-Associated Macrophages Associates with and Depends on the Expression of PU.1. *Cells*. 2020;9(6).
36. Xia W, Hilgenbrink AR, Matteson EL, Lockwood MB, Cheng JX, Low PS. A functional folate receptor is induced during macrophage activation and can be used to target drugs to activated macrophages. *Blood*. 2009;113(2):438-46.
37. Cresswell GM, Wang B, Kischuk EM, Broman MM, Alfar RA, Vickman RE, et al. Folate Receptor Beta Designates Immunosuppressive Tumor-Associated Myeloid Cells That Can Be Reprogrammed with Folate-Targeted Drugs. *Cancer Res*. 2021;81(3):671-84.
38. Yi YS. Folate Receptor-Targeted Diagnostics and Therapeutics for Inflammatory Diseases. *Immune Netw*. 2016;16(6):337-43.
39. Joshi B, Shevade SS, Dandekar P, Devarajan PV. Folate Receptor and Targeting Strategies. In: Devarajan PV, Dandekar P, D'Souza AA, editors. *Targeted Intracellular Drug Delivery by Receptor Mediated Endocytosis*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 407-31.
40. Rappuoli R, Pizza M, Giudice GD, Gregorio ED. Vaccines, new opportunities for a new society. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(34):12288-93.
41. WHO. Vaccines and immunization 2022 [Available from: https://www.who.int/health-topics/vaccines-and-immunization#tab=tab_1].
42. Plotkin SL, Plotkin SA. 1 - A Short History of Vaccination. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, Edwards KM, editors. *Plotkin's Vaccines (Seventh Edition)*: Elsevier; 2018. p. 1-15.e8.
43. CDC. Smallpox. 2017 [Erişim Tarihi 14 Temmuz 2022]. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/smallpox/index.html>.
44. WHO. Poliomyelitis (polio). 2022 [Erişim Tarihi 16 Temmuz 2022]. Erişim adresi: https://www.who.int/health-topics/poliomyelitis#tab=tab_1.
45. Siegrist C-A. 2 - Vaccine Immunology. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, Edwards KM, editors. *Plotkin's Vaccines (Seventh Edition)*: Elsevier; 2018. p. 16-34.e7.
46. Chung YH, Beiss V, Fiering SN, Steinmetz NF. COVID-19 Vaccine Frontrunners and Their Nanotechnology Design. *ACS Nano*. 2020;14(10):12522-37.
47. Abul Abbas AL, Shiv Pillai. *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia: Elsevier; 2021.
48. Zepeda-Cervantes J, Ramírez-Jarquín JO, Vaca L. Interaction Between Virus-Like Particles (VLPs) and Pattern Recognition Receptors (PRRs) From Dendritic Cells (DCs): Toward Better Engineering of VLPs. *Front Immunol*. 2020;11:1100.
49. Gierke R WA, Kobayashi M. Pneumococcal disease. 2021 [Erişim Tarihi 19 Temmuz 2022]. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/pneumo.html>.
50. Rowe CR SP, Quinn ME. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6th ed. ed. Londra: Pharmaceutical Press; 2009.

51. Fierens K, Kool M. The mechanism of adjuvanticity of aluminium-containing formulas. *Curr Pharm Des.* 2012;18(16):2305-13.
52. Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nature Medicine.* 2011;17(8):996-1002.
53. Caulfield MJ, Shi L, Wang S, Wang B, Tobery TW, Mach H, et al. Effect of alternative aluminum adjuvants on the absorption and immunogenicity of HPV16 L1 VLPs in mice. *Hum Vaccin.* 2007;3(4):139-45.
54. Biologicals G. Prepandrix. 2019 [Erişim Tarihi 22 Temmuz 2022]. Erişim adresi: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/prepandrix-epar-product-information_en.pdf.
55. Ducker GS, Rabinowitz JD. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab.* 2017;25(1):27-42.
56. Steinz MM, Ezdoglian A, Khodadust F, Molthoff CFM, Srinivasarao M, Low PS, et al. Folate Receptor Beta for Macrophage Imaging in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol.* 2022;13:819163.
57. Tian Y, Wu G, Xing JC, Tang J, Zhang Y, Huang ZM, et al. A novel splice variant of folate receptor 4 predominantly expressed in regulatory T cells. *BMC Immunol.* 2012;13:30.
58. Nalio Ramos R, Missolo-Koussou Y, Gerber-Ferder Y, Bromley CP, Bugatti M, Núñez NG, et al. Tissue-resident FOLR2(+) macrophages associate with CD8(+) T cell infiltration in human breast cancer. *Cell.* 2022;185(7):1189-207.e25.
59. Neuendorf J. Cell Counting in the Fuchs-Rosenthal Counting Chamber. In: Neuendorf J, editor. *Urine Sediment.* Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 49-52.
60. Price RJ, Lillycrop KA, Burdge GC. Folic acid induces cell type-specific changes in the transcriptome of breast cancer cell lines: a proof-of-concept study. *J Nutr Sci.* 2016;5:e17.
61. Andreu N, Phelan J, de Sessions PF, Cliff JM, Clark TG, Hibberd ML. Primary macrophages and J774 cells respond differently to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific Reports.* 2017;7(1):42225.
62. Yüksel S, Pekcan M, Puralı N, Esendağlı G, Tavukçuoğlu E, Rivero-Arredondo V, et al. Development and in vitro evaluation of a new adjuvant system containing *Salmonella Typhi* porins and chitosan. *International Journal of Pharmaceutics.* 2020;578:119129.
63. Hirano S, Zhou Q, Furuyama A, Kanno S. Differential Regulation of IL-1 β and IL-6 Release in Murine Macrophages. *Inflammation.* 2017;40(6):1933-43.
64. Rezaei F, Keshvari H, Shokrgozar MA, Doroud D, Gholami E, Khabiri A, et al. Nano-adjuvant based on silk fibroin for the delivery of recombinant hepatitis B surface antigen. *Biomaterials Science.* 2021;9(7):2679-95.
65. Shen S-S, Yang Y-W. Dynamics of antigen delivery and the functional roles of L121-adjuvant. *Vaccine.* 2015;33(35):4341-8.
66. Li X, Aldayel AM, Cui Z. Aluminum hydroxide nanoparticles show a stronger vaccine adjuvant activity than traditional aluminum hydroxide microparticles. *J Control Release.* 2014;173:148-57.

67. WHO. Thiomersal. 2022 [Erişim Tarihi 7 Ağustos 2022]. Erişim adresi: <https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/vaccines-quality/thiomersal>.
68. Varghese B, Vlashi E, Xia W, Ayala Lopez W, Paulos CM, Reddy J, et al. Folate receptor- β in activated macrophages: ligand binding and receptor recycling kinetics. *Mol Pharm*. 2014;11(10):3609-16.
69. Mold M, Eriksson H, Siesjö P, Darabi A, Shardlow E, Exley C. Unequivocal identification of intracellular aluminium adjuvant in a monocytic THP-1 cell line. *Sci Rep*. 2014;4:6287.
70. Ko EJ, Lee YT, Kim KH, Lee Y, Jung YJ, Kim MC, et al. Roles of Aluminum Hydroxide and Monophosphoryl Lipid A Adjuvants in Overcoming CD4+ T Cell Deficiency To Induce Isotype-Switched IgG Antibody Responses and Protection by T-Dependent Influenza Vaccine. *J Immunol*. 2017;198(1):279-91.
71. Robinson N, Ganesan R, Hegedús C, Kovács K, Kufer TA, Virág L. Programmed necrotic cell death of macrophages: Focus on pyroptosis, necroptosis, and parthanatos. *Redox Biol*. 2019;26:101239.
72. Samaniego R, Palacios BS, Domiguez-Soto Á, Vidal C, Salas A, Matsuyama T, et al. Macrophage uptake and accumulation of folates are polarization-dependent in vitro and in vivo and are regulated by activin A. *J Leukoc Biol*. 2014;95(5):797-808.
73. Chandrupatla D, Molthoff CFM, Lammertsma AA, van der Laken CJ, Jansen G. The folate receptor β as a macrophage-mediated imaging and therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Drug Deliv Transl Res*. 2019;9(1):366-78.
74. Shen J, Chelvam V, Cresswell G, Low PS. Use of folate-conjugated imaging agents to target alternatively activated macrophages in a murine model of asthma. *Mol Pharm*. 2013;10(5):1918-27.
75. Mohammadi M, Li Y, Abebe DG, Xie Y, Kandil R, Kraus T, et al. Folate receptor targeted three-layered micelles and hydrogels for gene delivery to activated macrophages. *J Control Release*. 2016;244(Pt B):269-79.
76. Shardlow E, Mold M, Exley C. The interaction of aluminium-based adjuvants with THP-1 macrophages in vitro: Implications for cellular survival and systemic translocation. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2020;203:110915.
77. Mile I, Svensson A, Darabi A, Mold M, Siesjö P, Eriksson H. Al adjuvants can be tracked in viable cells by lumogallion staining. *J Immunol Methods*. 2015;422:87-94.
78. Mold MJ, Kumar M, Chu W, Exley C. Unequivocal imaging of aluminium in human cells and tissues by an improved method using morin. *Histochemistry and Cell Biology*. 2019;152(6):453-63.
79. Lamers C, Plüss CJ, Ricklin D. The Promiscuous Profile of Complement Receptor 3 in Ligand Binding, Immune Modulation, and Pathophysiology. *Front Immunol*. 2021;12:662164.
80. Odkhuu E, Koide N, Haque A, Tsolmongyn B, Naiki Y, Hashimoto S, et al. Inhibition of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)-induced

- osteoclast formation by pyrroloquinoline quinone (PQQ). *Immunol Lett.* 2012;142(1-2):34-40.
81. Azad AK, Rajaram MV, Schlesinger LS. Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics. *J Cytol Mol Biol.* 2014;1(1).
 82. Kimura MY, Hayashizaki K, Tokoyoda K, Takamura S, Motohashi S, Nakayama T. Crucial role for CD69 in allergic inflammatory responses: CD69-Myl9 system in the pathogenesis of airway inflammation. *Immunol Rev.* 2017;278(1):87-100.
 83. Ishizaki S, Kasuya Y, Kuroda F, Tanaka K, Tsuyusaki J, Yamauchi K, et al. Role of CD69 in acute lung injury. *Life Sciences.* 2012;90(17):657-65.
 84. Ivetic A, Hoskins Green HL, Hart SJ. L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling. *Front Immunol.* 2019;10:1068.
 85. Mori A, Oleszycka E, Sharp FA, Coleman M, Ozasa Y, Singh M, et al. The vaccine adjuvant alum inhibits IL-12 by promoting PI3 kinase signaling while chitosan does not inhibit IL-12 and enhances Th1 and Th17 responses. *Eur J Immunol.* 2012;42(10):2709-19.
 86. HogenEsch H. Mechanism of Immunopotentiality and Safety of Aluminum Adjuvants. *Frontiers in Immunology.* 2013;3.
 87. Kuroda E, Ishii Ken J, Uematsu S, Ohata K, Coban C, Akira S, et al. Silica Crystals and Aluminum Salts Regulate the Production of Prostaglandin in Macrophages via NALP3 Inflammasome-Independent Mechanisms. *Immunity.* 2011;34(4):514-26.
 88. Visentin M, Zhao R, Goldman ID. The antifolates. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2012;26(3):629-48, ix.
 89. Machacek C, Supper V, Leksa V, Mitulovic G, Spittler A, Drbal K, et al. Folate Receptor β Regulates Integrin CD11b/CD18 Adhesion of a Macrophage Subset to Collagen. *J Immunol.* 2016;197(6):2229-38.
 90. Kotsias F, Hoffmann E, Amigorena S, Savina A. Reactive oxygen species production in the phagosome: impact on antigen presentation in dendritic cells. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(6):714-29.
 91. Velez CD, Lewis CJ, Kasper DL, Cobb BA. Type I Streptococcus pneumoniae carbohydrate utilizes a nitric oxide and MHC II-dependent pathway for antigen presentation. *Immunology.* 2009;127(1):73-82.
 92. Yu W, Wang Z, Zhang K, Chi Z, Xu T, Jiang D, et al. One-Carbon Metabolism Supports S-Adenosylmethionine and Histone Methylation to Drive Inflammatory Macrophages. *Mol Cell.* 2019;75(6):1147-60.e5.
 93. Samblas M, Martínez JA, Milagro F. Folic Acid Improves the Inflammatory Response in LPS-Activated THP-1 Macrophages. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:1312626.
 94. Shulpekova Y, Nechaev V, Kardasheva S, Sedova A, Kurbatova A, Bueverova E, et al. The Concept of Folic Acid in Health and Disease. *Molecules.* 2021;26(12).

8. EKLER

EK 1. Tez çalışması orijinallik raporu

ALÜMİNYUM ADJUVANLI AŞILARDA FOLATIN İMMÜNOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%5	%5	%0	%0
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%4
2	www.gecekitapligi.com İnternet Kaynağı	<%1
3	Matthias Giese. "Chapter 7 Adjuvants", Springer Science and Business Media LLC, 2016 Yayın	<%1
4	Kaat Fierens, Mirjam Kool. "The Mechanism of Adjuvanticity of Aluminium-Containing Formulas", Current Pharmaceutical Design, 2012 Yayın	<%1
5	open.uct.ac.za İnternet Kaynağı	<%1
6	Tülay Aksoy, Eda Sivcan, Fatma Doğan, Songül Çetin, Türkan Mutlu Yar. "Arı Ürünlerinin (Bal, Propolis) Leishmania tropica Promastigotları	<%1

EK 2. Dijital makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Ali Mert Sencer
Ödev başlığı: ALÜMİNYUM ADJUVANLI AŞILARDA FOLATIN İMMÜNOLOJİK E...
Gönderi Başlığı: ALÜMİNYUM ADJUVANLI AŞILARDA FOLATIN İMMÜNOLOJİK E...
Dosya adı: Ali_Mert_Sencer_YL_Tez_Turnitin_23.9.22._docx.pdf
Dosya boyutu: 5.13M
Sayfa sayısı: 100
Kelime sayısı: 21,537
Karakter sayısı: 149,316
Gönderim Tarihi: 23-Eyl-2022 08:55ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1906894163



9. ÖZGEÇMİŞ