T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOUYUMLU POLİMERLERİN ADJUVAN SİSTEMLERİNDE İMMÜNSTİMÜLATÖR ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

HÜLYA SERAP MOĞUL

TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ ALTAY SAVALAN

BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TEMMUZ/2024

TEZ KABUL ONAYI

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Biyoteknoloji Programında Hülya Serap Moğul tarafından hazırlanan 'biyouyumlu polimerlerin adjuvan sistemlerinde immunostimülatör etkisinin değerlendirilmesi' başlıklı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman/Başkan: Dr.Öğr. Üyesi Altay Savalan
Sağlıklı Bilimleri Üniversitesi, Biyoteknoloji
Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu
onaylıyorum/onaylamıyorum

İMZA

……..

Üye: Doç.Dr. Üyesi Arif Mermer
Sağlıklı Bilimleri Üniversitesi, Biyoteknoloji
Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu
onaylıyorum/onaylamıyorum

İMZA

……..

Üye: Dr.Öğr. Üyesi Arzu Temizyürek
Üniversite Adı, Ana Bilim Dalı Adı
Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu
onaylıyorum/onaylamıyorum

İMZA

……..

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 16/07/2024

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Hülya Serap Moğul

16.07.2024

İTHAF

“Bu çalışmayı babam Türkay Moğul’a ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Süreç boyunca her zaman destek olduğu ve taşıyıcı sistemler konusunda kattığı bilgiler ile çalışma hayatımı yönlendirmemi sağlayan danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Altay SAVALAN'a teşekkür ediyorum.

Tez çalışmalarımın deneysel kısmının yürütülmesi için altyapılarının kullanımına izin verdikleri için, DETUAM Validebağ Araştırma Parkına ve Coral Biyoteknoloji A.Ş.'ye teşekkür ederim.

Bu süreç boyunca beni destekleyen Göksel Alkaç'a teşekkür ederim. Tez çalışmalarımın hücre kısmının yürütülmesinde yardımını esirgemeyen ve bildikleri her şeyi sıkılmadan anlatan, ekip ruhunun ne kadar kıymetli olduğunu her fırsatta hissettiren Büşra Çakır ve Ece Uyar'a hem beni her konuda destekledikleri hem de teze olan katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Hayatımı güzelleştiren, beni her koşulda destekleyen daha iyisinin mümkün olduğunu gösteren ve bu yolculukta ne olursa olsun elimi tutan yol arkadaşım Berke Baloğlu'na teşekkür ederim.

Her umutsuzluğa düştüğümde elimden tutan, hayatımı her zaman kolaylaştırmaya çalışan, her koşulda arkamda duran başarılarımın mimarı annem Sevgi Moğul'a teşekkür ederim. Öğrenim hayatım boyunca beni yüreklendiren, olgunlaştıran, motive eden kardeşlerim Seda Betül Moğul Ay ve Çağla Nurgül Moğul Demir'e teşekkür ederim. Hayatımda olmaları ile her zaman kendimi şanslı hissedeceğim.

Azmi, yılmaz enerjisi ve öğrenmeye olan heyecanıyla bana ilham veren babam Türkay Moğul'a teşekkür ederim. Verdiğim sözleri tutmaya çalışırken gittiğim yolu ışıkla dolduran canım babam, hatıralarının gücüyle bu yolculuğu tamamlamama yardım ettiğin için minnettarım.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ viii
ŞEKİLLER LİSTESİ ix
SİMGELER VE KISALTMALAR xi
ÖZET xiii
ABSTRACT xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. HAYVAN SAĞLIĞI 2
2.2. AŞILAMANIN ÖNEMİ 3
2.2. ADJUVANLAR 5
2.2.1. Mineral Tuzlar 8
2.2.2. Lipozomlar 9
2.2.3. Saponinler 10
2.2.4. TLR Reseptörleri 11
2.2.5. Polimerler 12
2.2.6. Emülsiyonlar 14
2.2.6.1. Yağ içinde su emülsiyonları (W/O) 16
2.2.6.2. Su içinde yağ emülsiyonları (O/W) 16
2.2.6.3. Su içinde yağ içinde su emülsiyonları (W/O/W) 17
2.2.7. Adjuvan Sistemleri 18
2.2.7.1. Emülsiyon 20
2.2.7.2. Kitosan 24
3. GEREÇ VE YÖNTEM 27
3.1. GEREÇLER 27
3.1.1. Adjuvan Sistemi Tasarımında ve Hücre Kültüründe Kullanılacak Gereçler 27
3.1.2. Cihazlar 27
3.2. YÖNTEM 28
3.2.1. Hücre Kültürü 28
3.2.2. Kitosanın Aktif Dozunun Belirlenmesi 28
3.2.2.1. MTT 28
3.2.2.2. Makrofaj polarizayonu 29

3.2.2.3. İstatistiksel analizler. 29
3.2.3. Kitosan Çözeltisinin Hazırlanması 29
3.2.4. W/O/W Emülsiyon Formülasyonu ve Hazırlanması 30
3.2.4.1. Adjuvan sistemlerinin hazırlanması 30
3.2.4.2. Emülsiyon tipi analizi 33
3.2.5. Adjuvan Sistemlerinin Fizikokimyasal Testlerinin Yapılması 33
3.2.5.1. Sabunlaşma indisi analizleri 33
3.2.5.2. Viskozite analizleri 34
3.2.5.3. Su içeriği analizi 34
3.2.5.4. Toplam asit sayısı analizi 34
3.2.5.5. Kırma indisi analizi (25ºC) 34
3.2.5.6. Saybolt renk analizi: Ölçümler, otomatik renk tayin cihazı. 35
3.2.5.7. Yoğunluk analizi (20ºC) 35
3.2.6. Stabilite Testlerinin Gerçekleştirilmesi 35
3.2.7. Parçacık Boyutu ve Zeta Potansiyeli Ölçümleri 35
3.2.8. Adjuvan Sistemlerinin *İn Vitro* Analizlerinin Gerçekleştirilmesi 35
4. BULGULAR 37
4.1. KİTOSANIN AKTİF DOZUNUN BELİRLENMESİ 37
4.1.1. Hücre Canlılığı Analizleri 37
4.1.2. Makrofaj Polarizayonu Analizleri 43
4.2. KİTOSANIN YAĞ FORMÜLASYONUNA EKLENMESİ 47
4.3. ADJUVAN SİSTEMİNİN FİZİKOKİMYASAL ANALİZLERİ 48
4.4. ADJUVAN SİSTEMİNİN *İN VİTRO* ANALİZLERİ 50
4.4.1. Makrofaj Polarizayonu 50
5. TARTIŞMA 55
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 60
KAYNAKLAR 62

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2. 1: Adjuvanların sınıflandırılması. 6

Tablo 2. 2: Ticari kullanımda olan alüminyum adjuvanlar. 9

Tablo 2. 3: Polimerler ve etki mekanizmaları 14

Tablo 2. 4: Adjuvan sistemleri ve immün yanıta etkileri 19

Tablo 2. 5: Literatür taraması sonucunda yağ bazlı adjuvanların formülasyonlarında kullanılan farklı emülgatörler ve kullanım oranları. 32

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1: Emülsiyon oluşumu sırasında damlacık değişimi (122). 20

Şekil 2. 2: Emülgatörün hidrofilik ve lipofilik yapısı (124). 21

Şekil 2. 3: Emülgatörlerin HLB değerine bağlı olarak emülsiyon içinde düzenlenmesi (124). 21

Şekil 2. 4: Tek basamakta çoklu emülsiyon preparasyonunun şematik gösterimi (125). ... 22

Şekil 2. 5: Kitosanın kimyasal yapısı (137). 25

Şekil 4. 1: Kitosan çözeltilerinin pH ölçüm sonuçları (A): Kitosan A, (B) Kitosan T, (C): Kitosan N……..37

Şekil 4. 2: Raw 264.7 hücre hattı sitotoksisite sonuçları (A): 24 saat sonuçları, (B): 48 saat sonuçları, (C): 72 saat sonuçları 38

Şekil 4. 3: HEK 293 hücre hattı sitotoksisite sonuçları (A): 24 saat sonuçları, (B): 48 saat sonuçları, (C): 72 saat sonuçları 38

Şekil 4. 4: THP-1 hücre hattı sitotoksisite sonuçları (A): 24 saat sonuçları, (B): 48 saat sonuçları, (C): 72 saat sonuçları 39

Şekil 4. 5: Kitosan A, kitosan B ve kitosan T dozlarının HEK 293 hücrelerinde istatistiksel analiz grafikleri (A): 24 saat, (B): 48 saat, (C): 72 saat sonuçları 40

Şekil 4. 6: Kitosan A, kitosan B ve kitosan T dozlarının Raw 264.7 hücrelerinde istatistiksel analiz grafikleri (A): 24 saat, (B): 48 saat, (C): 72 saat sonuçları 41

Şekil 4. 7: Kitosan A, kitosan B ve kitosan T dozlarının THP-1 hücrelerinde istatistiksel analiz grafikleri (A): 24 saat, (B): 48 saat, (C): 72 saat sonuçları 42

Şekil 4. 8: Kitosan N makrofaj polarizasyonu ölçümleri, (A): Kitosan N'nin THP-1 hücrelerinde CD163 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği (B): Kitosan N'nin THP-1 hücrelerinde CD86 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği (C): Kitosan N'nin MFI değerleri. 44

Şekil 4. 9: Kitosan T makrofaj polarizasyonu ölçümleri, (A): Kitosan T'nin THP-1 hücrelerinde CD163 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği (B): Kitosan T'nin THP-1 hücrelerinde CD86 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği (C): Kitosan T'nin MFI değerleri. 45

Şekil 4. 10: Kitosan A makrofaj polarizasyonu ölçümleri, (A): Kitosan A'nın THP-1 hücrelerinde CD163 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği (B): Kitosan A'nın THP-1 hücrelerinde CD86 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği (C): Kitosan A'nın MFI değerleri. 46

Şekil 4. 11: Kitosanın, mineral yağ bazlı formülasyonun berraklığına etkisi 47

Şekil 4. 12: HSM 9.11 adjuvanı fiziksel görüntüsü 48

Şekil 4. 13: HSM 9.11'in emülsiye edilmesi..... 48

Şekil 4. 14: Kitosan N FlowJo histogram grafiği, (A): 24 saatte THP-1 hücrelerinde CD163 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği; (B): 24 saatte THP-1 hücrelerinde CD86 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği (1.1-1.3; THP-1 monosit hücreleri, 2.1-2.3 THP-1 orjinli makrofaj, 11.1-11.3 HSM 9.11, 12.1-12.3 OVA, 13.1-13.3 kitosan içeren HSM 9.11). 50

Şekil 4. 15: Kitosan N FlowJo histogram grafiği, (A): 48 saatte THP-1 hücrelerinde CD163 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği; (B): 48 saatte THP-1 hücrelerinde CD86 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği (1.1-1.3; THP-1 monosit hücreleri, 2.1-2.3 THP-1 orjinli makrofaj, 11.1-11.3 HSM 9.11, 12.1-12.3 OVA, 13.1-13.3 serisi kitosan içeren HSM 9.11). 51

Şekil 4. 16: Kitosan N FlowJo histogram grafiği, (A): 72 saatte THP-1 hücrelerinde CD163 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği; (B): 72 saatte THP-1 hücrelerinde CD86 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği (1.1-1.3; THP-1 monosit hücreleri, 2.1-2.3 THP-1 orjinli makrofaj, 11.1-11.3 HSM 9.11, 12.1-12.3 OVA, 13.1-13.3 serisi kitosan içeren HSM 9.11). 52

Şekil 4. 17: Kitosan ve HSM 9.11 formülasyonunun yüzde ekspresyon grafiği 53

SİMGELER VE KISALTMALAR

BRSV : Sığır solunum sinsityal virüsü

CaP : Kalsiyum fosfat

CD : Farklılaşma Kümesi (Cluster of Differentiation)

CMI : Hücre aracılı bağışıklık

CO_2 **:** Karbondioksit

CSP : Circumsporozoite proteini

CTL **:** Sitotoksik T-lenfosit

DMSO **:** Dimetil sülfoksit

FAO **:** Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü

FITC : Floresin izotiyosiyanat

FMD : Şap Hastalığı (Food and Mouth Disease)

HBsAg : Hepatit B yüzey antijeni

HEL : Tavuk yumurtası lizozimi;

HPV : İnsan papilloma virüsü

HSV : Herpes simpleks virüsü

IgA **:** İmmunoglobulin A

IgE **:** İmmunoglobulin E

IgG **:** İmmunoglobulin G

IgG2a **:** İmmunoglobulin 2a

IL : İnterlökin

ISCOM : Bağışıklık sistemini uyarıcı kompleks (Immunostimulating complex)

MDP : Muramil dipeptit

MFI : Ortalama Floresan Yoğunluğu

MHC : Doku uygunluk antijenleri

MPL : Monofosforil lipit A

O/W **:** Oil in water (Yağ içinde su)

ODN : Oligodeoksinükleotid

OVA **:** Ovalbumin

Rpm **:** Dakikadaki devir sayısı

RSV : Solunum sinsityal virüsü

W/O **:** Water in Oil (Su içinde yağ)

W/O/W **:** Water in Oil in Water (Su içinde yağ içinde su)

BİYOUYUMLU POLİMERLERİN ADJUVAN SİSTEMLERİNDE İMMUNOSTİMÜLATÖR ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Amaç: Hayvanlarda infeksiyöz hastalıklar sadece sürüleri değil halk sağlığını da etkilemektedir. Halk sağlığının korunmasının en önemli yolu aşılamadır. Aşıların kuvvetli ve uzun süreli bağışıklık sağlayabilen, güvenilir, biyolojik kararlılığa sahip olması gerekmektedir. Günümüzde kullanılan adjuvanlar bazı hastalıklarda immün sistemi uyarmada yetersiz kalmaktadır. Bu sebeple, salgın hastalıklara karşı güvenli ve koruyucu bir aşının geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. HSM 9.11 yağ bazlı adjuvanın hücresel immün yanıtlarını güçlendirmek ve uzun süre koruyuculuk sağlamak amacıyla ürünün içerisine polimer eklenmesiyle yeni yağ bazlı adjuvan sistemlerinin oluşturulmasını içermektedir. Ayrıca elde edilecek adjuvan sistemlerinin *in vitro* çalışmalar ile immün sistem üzerindeki yanıtlarının incelenmesi amaçlanmaktadır. Böylece, etkinliği kanıtlanmış formülasyonlar ile, güçlendirilmiş etki ve güvenliğe sahip yeni adjuvan sistemlerinin yerli olarak üretimi sağlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Planlanan proje kapsamında, immün yanıtı indükleyebilecek şekilde seçilen polimerlerin HSM 9.11 ürününe katılmasıyla yeni bir adjuvan sistemi oluşturulacaktır. Bu kapsamda stabilite testlerini başarıyla tamamlayan formülasyonların ileri testleri gerçekleştirilecektir. Kullanılacak olan polimerlerin tek başına ve sistem içindeki immünomodülatör etkisi *in vitro* olarak incelenecektir.

Bulgular: Adjuvan sistemleri içerisine eklenecek polimerler miktarı hücre canlılığı testi ile belirlenmiştir. Aktif doz adjuvan sistemleri içerisine stabiliteyi bozmayacak şekilde eklenmiştir. Adjuvan sistemlerinin immünomodülatör etkisi hücre kültürü ile belirlenmiştir.

Sonuç: Polimer eklenerek oluşturulan adjuvan sistemi, geliştirilmiş etki ve güvenliğe sahiptir. Yeni adjuvan sistemi immün yanıtı arttırmıştır.

Anahtar Kelimeler: Adjuvan sistemleri, biyouyumlu polimer, hücresel immün yanıt, immünostimülant, kitosan ve türevleri

EVALUATİON OF THE IMMUNOSTİMULATORY EFFECT OF BİOCOMPATİBLE POLYMERS İN ADJUVANT SYSTEMS

ABSTRACT

Aim: Infectious diseases in animals not only affect herds but also public health. The most important way to protect public health is through vaccination. Vaccines must provide strong and long-lasting immunity, be reliable, and biologically stable. Currently used adjuvants are inadequate in stimulating the immune system against some diseases. Therefore, the development of a safe and protective vaccine against epidemic diseases is of great importance. HSM 9.11 involves the creation of new oil-based adjuvant systems by adding polymers to the product to enhance cellular immune responses and provide long-lasting protection. Additionally, the aim is to investigate the responses of the immune system to the obtained adjuvant systems through *in vitro* studies. Thus, domestic production of new adjuvant systems with proven efficacy and enhanced efficacy and safety has been ensured.

Materials and Methods: New adjuvant system will be created by incorporating polymers selected to induce immune responses into the HSM 9.11 product. Formulations that successfully pass stability tests will undergo further testing. The immunomodulatory effects of the polymers used alone and within the system will be examined.

Results: The amount of polymers to be added to the adjuvant systems was determined through cell viability tests. The active dose of adjuvant systems was added without compromising stability. The immunomodulatory effect of the adjuvant systems was determined through cell culture.

Conclusion: The adjuvant system created by incorporating polymers has demonstrated improved efficacy and safety. The new adjuvant system has enhanced immune responses.

Key Words: Adjuvant systems, biocompatible polymer, cellular immune response, chitosan and derivatives, immunostimulant

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bulaşıcı hastalıklar tüm insanlığı etkileyen bir halk sağlığı sorunudur. Salgınların yaşandığı dönemlerde, toplumları sosyal, ekonomik ve kültürel olarak derinden etkilemektedir. Bunun yanında insanlarda olduğu gibi hayvanlar arasında da salgın hastalıklar olmaktadır. Bu salgın hastalıklar sadece sürüleri değil, halk sağlığını da etkilemektedir. Halk sağlığının korunmasının ve sürdürülebilirliğinin en önemli yolu aşılamadır. Aşıların kuvvetli ve uzun süreli bağışıklık sağlayabilen, güvenilir, biyolojik kararlılığa sahip, en az yan etkili, ucuz ve kolay uygulanabilir özellikte olmaları tercih edilmektedir. Bu durumda aşı içerisindeki antijen kadar adjuvan da büyük öneme sahip olmaktadır. Günümüzde kullanılan birçok adjuvan olmasına rağmen bazı hastalıklarda immün sistemi uyarmada ve uzun süreli korumada eksik kalmaktadır. Yüksek düzeyde saflaştırılmış antijenlerden oluşan alt birim aşılar, etkili ve uzun süreli koruyucu bağışıklık oluşturmak için adjuvanların varlığını gerektirir. Adjuvan araştırmalarındaki ilerlemeler, aşı etkinliğini arttırmak için iki veya daha fazla adjuvan içeren, adjuvan sistemlerinin tasarlanmasını içermektedir. Bu bağlamda etkili ve güçlü immün yanıt oluşturan yeni adjuvan sistemlerine duyulan ihtiyaç artmaktadır.

Coral Biyoteknoloji tarafından geliştirilen CORALVAC HSM 9.11 yağ bazlı adjuvanın hücresel immün yanıtlarını arttırmak ve uzun süre bağışıklık sağlamak amacıyla ürünün içerisine polimer eklenmesiyle yeni yağ bazlı adjuvan sistemlerinin oluşturulmasını içermektedir. Oluşturulan adjuvan sistemlerinin çalışmaları ile immün sistem üzerindeki yanıtlarının incelenmesi amaçlanmaktadır. Bu sayede, etkinliği belirlenmiş formülasyonlar ile salgın hastalıkların kontrolü için geliştirilmiş etki ve güvenliğe sahip yeni adjuvan sistemlerinin yerli olarak üretimi sağlanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HAYVAN SAĞLIĞI

Hayvan sağlığı hem insan sağlığı hem de ekosistemlerin sürdürülebilirliği açısından büyük bir öneme sahiptir. Zoonotik hastalıkların yayılmasının engellenmesi ile hayvan ve insan sağlığının korunması ve gıda güvenliği de sağlanmış olur. Besin kaynağı olarak kullanılan hayvanlardaki salgınlar, insan beslenmesinde yetersizliklere yol açabilmektedir (1). Sığır vebası, evcil mandalar ve bazı vahşi hayvan türleri arasında görülen, son derece bulaşıcı bir viral hastalıktır. 1889'da Hindistan'dan Afrika'ya gönderilen sığırlar, bu virüsü kıtaya taşıyarak büyük bir salgının başlamasına neden olmuştur. Bu salgın, başlangıçta Afrika'daki sığırların yaklaşık %90'ını etkilemesinin yanı sıra birçok koyun ve keçinin ölümüne de sebep olmuştur (2). Aynı zamanda, vahşi bufalo, zürafa ve antilop türlerinin de ciddi şekilde azalmasına sebep olmuştur. Bu kitlesel kayıplar, besi hayvanlarının, evcil hayvanların ve vahşi yaşamın yok olmasına ve sonucunda kitlesel açlık krizlerine neden olmuştur. Bu durumdan Etiyopya'daki insan nüfusunun üçte birinin ve Tanzanya'daki Masai halkının üçte ikisinin beslenme sebepli olarak hayatını kaybetmesiyle sonuçlanmıştır (3). Otlak hayvanların azalması, otlakların çalılıklarla kaplanmasına ve bu çalılıkların tripanozomların vektörü olan çeçe sinekleri için üreme alanı haline gelmesine neden olmuş, bu da insanlarda trypanosomiasis (Afrika uyku hastalığı) salgınına yol açmıştır. Sığır vebası salgını, kayıtlarda Afrika'yı etkileyen en yıkıcı doğal felaketlerden biri olarak değerlendirilmektedir (4).

Asya ve Afrika'da her yıl 55.000'den fazla kişi kuduzdan ölmektedir ve bu vakaların %98'i aşılanmamış köpeklerin ısırmaları sonucu meydana gelmektedir (5). İnsanlarda kuduzun yayılmasını önlemek için yeterli hayvan aşılaması ve kontrolü, risk altındakilerin eğitilmesi ve ısırılan kişilerin uygun tıbbi bakıma erişiminin arttırılması gereklidir. Kuduz aşılarının maliyetinin ve erişilebilirliğinin artırılması ile etkili aşılama programları mevcut durumu değiştirebilir (2).

Veteriner aşıları, hayvan sağlığını korumak ve üretimi artırmak amacıyla besi hayvanlarında ve kümes hayvanlarında kullanılmaktadır (6). Artan dünya nüfusunun beslenmesini sağlayabilmek için daha verimli hayvan üretimi ve yüksek kaliteli proteine

erişim önem arz etmektedir. Birleşmiş Milletler Ekonomik ve Sosyal İşler Dairesi Nüfus Bölümü'ne göre, 2010 yılında yaklaşık 6,9 milyar olan insan nüfusunun 2025'te 8 milyarı geçeceği ve 2050'de 9,1 milyar kişiye ulaşacağı tahmin edilmektedir (7). 2009 yılında gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde 1,02 milyar insanın yetersiz beslendiği tahmin edilmektedir. Dünya nüfusunu beslenmesini sağlamak için, genel gıda üretiminin 2007 ile 2050 yılları arasında %70 oranında artırılması gerektiği bildirilmektedir. Hayvan sağlığını koruyan ve üretimin arttırmasını sağlayan aşılar, bu ihtiyacın karşılanmasında kilit bir rol oynamaktadır (8).

2.2. AŞILAMANIN ÖNEMİ

Hastalıkların ve hastalıklara bağlı sakatlık ve ölümleri önlemenin en etkili yöntemlerinden biri immünizasyondur. Aşılamanın tarihi bin yıl öncesine kadar uzanır. Kayıtlar, MS 900 civarında Çinlilerin çiçek hastalığına karşı aşılama tekniklerini kullandıklarını göstermektedir (6). Aşılama, çiçek hastalığından kurtulanların yaşam boyu bağışıklık kazandıkları gözlemine dayanmaktadır ve enfekte kişilerden alınan kurutulmuş irin, kesecik sıvısı veya kabukların sağlıklı kişilerin derisine veya burun boşluğuna uygulanmasını içermektedir. Ancak, bu yöntem bazı hastalarda ciddi reaksiyon ve ölüme yol açabilmekteydi (5). Edward Jenner, inek çiçeği virüsünü kullanarak çiçek hastalığını önleyebileceğini deneylerle gösteren ilk kişidir. Bu, 18. yüzyılın sonlarında, inek çiçeği enfeksiyonunun çiçek hastalığını önlemedeki koruyucu etkilerinden yararlanılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Aşılama, bugüne kadar uygulanan en başarılı halk sağlığı müdahalelerinden biri olmuş ve dünya genelinde bulaşıcı hastalıklara bağlı reaksiyonların ve kayıpların önlenmesinde büyük etkiler yaratmıştır (9).

Aşılar hem insanlarda hem de hayvanlarda enfeksiyon hastalıklarının kontrolünde ve koruyucu hekimlikte önemli bir rol oynar (10). Hayvan hastalıklarının kontrolü ve eradikasyonunu hedefleyen veteriner aşılar, sadece hayvan sağlığı açısından değil, aynı zamanda zoonotik enfeksiyonlarla mücadele açısından da halk sağlığı için kritik bir öneme sahiptir (11).

Veteriner aşılaması, geniş bir hedef kitlesine yöneliktir. Hayvanlarda bulaşıcı hastalıkları önlemek ve kontrol etmek, hayvan refahını artırmak ve besi hayvanlarında üretim maliyetlerini azaltmak için maliyet etkin yöntemler sağlamak temel hedeflerdendir (12). Ayrıca, hayvanların toplu aşılanması, zoonoz vakalarını önlemek için etkili bir

yöntem olarak görülmektedir. Toplu aşılama programları sayesinde, çeşitli veteriner ilaçlarının kullanımı önemli ölçüde azalmış ve bu da ekolojik etkilerde, yan etkilerde ve hayvansal gıda ürünlerindeki kalıntılarda azalmaya yol açmıştır. Özetle, veteriner aşılaması hayvan sağlığı sektörünün gelişmesine ve halk sağlığının iyileşmesine büyük katkı sağlamıştır (13).

Geleneksel olarak, mevcut lisanslı veteriner aşılarının çoğu inaktif veya canlı aşılardır. Bu aşıların yaygın kullanımı, dünya genelinde hayvan ve halk sağlığının iyileştirilmesine önemli katkılar sağlasa da bazı eksik kalan bazı noktaları bulunmaktadır (14). Konvansiyonel aşıların üretimi genellikle pahalıdır ve optimal bağışıklığı indüklemek için adjuvanlar ve çoklu antijenler gerektirmektedir (15). İdeal bir aşının ucuz, stabil, toplu aşılamaya uygun ve minimum yan etki ile güçlü ve uzun süreli bir bağışıklık gibi özellikleri sağlaması gerekmektedir (5). Veteriner aşıları, sağlık, refah, gıda üretimi ve halk sağlığı açısından kritik öneme sahiptir. Hayvan hastalıklarını önlemek, gıda üretiminin verimliliğini artırmak ve zoonotik ve gıda kaynaklı enfeksiyonların insanlara bulaşmasını azaltmak için maliyet etkin bir yöntemdir. Güvenli ve etkili hayvan aşıları modern toplum için hayati önem taşır (16).

Aşı bilimi, immünoloji, mikrobiyoloji, moleküler biyoloji, biyokimya ve istatistik gibi birçok disiplinin yanı sıra düzenleme, ruhsatlandırma ve etik konularını da kapsayan çok disiplinli bir alandır (16). Aşılar başlangıçta enfeksiyonları önlemek amacıyla geliştirilmişken, günümüzde bilim insanları kanser tedavisi, doğum kontrolü ve bağışıklık tepkilerini (örneğin otoimmünite veya alerji) azaltmaya yönelik aşılar tasarlama üzerinde çalışmaktadırlar. Aşıların terapötik ve profilaktik özelliklerine göre antijen ve adjuvan içeriği değişmekte olup, bu bağlamda çalışmalar devam etmektedir (17).

Aşıların immünojenitesini artırmak için adjuvan kullanımı büyük önem taşır. Adjuvanlar, antijen sunan hücrelerin (APC'ler) antijen alımını artırır, APC'lerin aktivasyonuna ve olgunlaşmasına yardımcı olur, antijenlerin biyolojik yarı ömrünü uzatır, immunoregülatuar sitokinlerin üretimini ve çoğalmasını teşvik eder ve doz azaltımına yardımcı olur, bu sayede gereken antijen miktarını azaltır (18). Adjuvanlar, bağışıklık sistemini doğrudan uyaran veya antijenin bağışıklık sistemi bileşenlerine doğru şekilde sunulmasına yardımcı olan maddeler olabilir. İki veya daha fazla adjuvanın birleşiminden oluşan bazı adjuvan sistemleri hem bir taşıma sistemi hem de bağışıklık uyarıcı bileşenler olarak işlev görebilir (19). Hayvan aşılarında kullanılan adjuvanların seçimi aşı

etkinliğini doğrudan etkilemektedir. Adjuvanlar seçilirken; bağışıklık uyarımı türü, aşı antijeninin kimyasal özellikleri, aşının uygulanma yöntemi ve hedef hayvan türü gözönünde bulundurulmalıdır (20).

2.2. ADJUVANLAR

Aşıya adjuvan eklenmesinin bağışıklığı güçlendiren etkilerinin keşfi tesadüfi olarak gerçekleşmiştir. Fransız bir veteriner olan Gaston Ramon, atlardaki tetanoz ve difteri anti-serum veriminin, enjeksiyon bölgesinde apse gelişen hayvanlarda daha yüksek olduğunu keşfetmiştir (21). Nişasta, ekmek kırıntıları veya tapyoka enjekte ederek, inaktive toksin ile enjeksiyon bölgesinde steril apseler oluşturmuş ve böylece anti-serum üretimini artırmayı başarmıştır. Bu sayede, enjeksiyon bölgesinde lokal inflamasyonu tetikleyebilen maddelerin aynı zamanda anti-serum üretimini de arttırabildiği hipotezi doğrulanmıştır (22).

Aynı senelerde, Alexander Glenny, alüminyum tuzlarının bağışıklığı güçlendiren etkilerini keşfetmiştir. Alüminyum ilk kez 1932 yılında insan aşılarında kullanılmış ve yaklaşık 70 yıl boyunca lisanslı aşılarda kullanılan tek adjuvan olmuştur (23). Yaygın ve sürekli kullanımına rağmen alüminyumun immün etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (24). Alüminyum adjuvanlar, antikor üretimini arttırmaya yönelik etki gösterir ve bu nedenle öncelikle antikorlar tarafından inaktif olan patojenleri hedef alan aşılar için uygundur. Alüminyum ile hazırlanan aşılar, hücre içi patojenlere bağlı enfeksiyonu önlemede başarılı olamamıştır (25).

Bu keşifler, adjuvanların geliştirilmesinin temelini oluşturmuştur. Bir koruyucu bağışıklık yanıtı, belirli patojenlere karşı etkili olacak immün yanıtı arttırmalıdır (26). Bakteriyel aşılarda ve viral aşılarda istenen immün yanıt farklılık göstermektedir. Hücresel bakterilere karşı aşılar, bakterileri fagositoz için opsonize etmek için immunoglobulin G (IgG) indüklemeli, komplementi aktive etmeli ve toksinleri nötralize etmelidir (27). Mukozal yüzeylerde IgA bağlanmayı önlerken, IgE patojenin işgal etmesi durumunda mukozal yüzeyin altında mast hücrelerini harekete geçirir (28). Diğer patojenler, sadece hücresel bağışıklık reaksiyonlarıyla etkili bir şekilde yok edilir. Fakültatif intrasellüler bakteriler için (örneğin, Mycobacteria, Brucella ve bazı Salmonella'lar), aktive edilmiş makrofajlar gereklidir. Bir virüs, Listeria veya bazı protozoan parazit gibi bir patojen, bir hücrenin sitoplazmasında çoğalmaya başladığında, enfekte hücreyi yok etmek için bir sitotoksik T-lenfosit (CTL) yanıtı gereklidir (29).

Çoğu zaman, bağışıklık mekanizmalarının kombinasyonu en etkili savunma olabilir: Örneğin, bir mukozal yüzeyden virüslerin istilasını engellemek için IgA yanıtı, istila eden virüsleri nötralize etmek için IgG yanıtı ve virüsün enfekte olmayı başardığı hücreleri yok etmek için sitotoksik T hücresi yanıtı gözlemlenmektedir (30). Genellikle, bir virülans patojenle enfeksiyon, doğru türde veya türlerde bağışıklık yanıtını tetiklemek için gerekli sinyalleri sağlar. Virülans, organizmayı taklit ederek, değiştirilmiş canlı aşılar da bu sinyalleri sağlayabilir (31). Genellikle çok etkilidirler, ancak bu aşıların birkaç potansiyel dezavantajı vardır. Şu anda ana alternatif, inaktif aşılardır. Ancak, doğal olmayan bir maruz kalma yoluyla (enjeksiyonla) uygulanan canlı olmayan aşı antijenleri, koruyucu bağışıklığı tetiklemek için gerekli sinyalleri sağlamayabilir (32). Daha az saflaştırılmış inaktif aşılar bazen, 'dahili' adjuvanlar olarak hizmet edebilecek bakteriyel veya viral bileşenler içerebilir, ancak daha saflaştırılmış antijenler genellikle güçlü ve kalıcı bir bağışıklık yanıtı uyarmamaktadır (33).

Bu nedenle, adjuvanların etki mekanizmasına dayanarak, adjuvanlar immün uyarıcı moleküller, teslimat sistemleri ve iki veya daha fazla adjuvanın kombinasyonu ile oluşturulan kombine adjuvanlar olarak üç geniş sınıfa ayrılabilirler (34)(Tablo 2.1). Aşının etkisi; antijeninin kimyasal özellikleri, hayvanın aşılama yolu ve en önemlisi hedef hayvanın türü gibi etkenlere göre değişiklik göstermektedir (35). Yanlış bir adjuvan seçmek, iyi bir kalitede antijeni etkisiz hale getirebilir. Bu nedenle, yalnızca hayvanların etkili bir şekilde aşılanması için gereken istenen özelliklere sahip adjuvanlar seçilmelidir (20-21).

Tablo 2. 1: Adjuvanların sınıflandırılması.

Sınıflandırma Tipi	**Adjuvan**
İmmünostimülatörler	Saponinler (QS-21)
	NOD Agonist: Muramyl dipeptide (MDP)
	TLR 9 Agonist: CpG oligodeoxynucleotides (ODN)
	TLR 7/8 Agonists: Imiquimod and Resiquimod

Tablo 2. 2 (Devam)

	TLR5 Agonist: Flagellin
	TLR4 Agonist: Monofosforil lipid A (MPL-A)
	TLR3 Agonists: Poliinozinik ve polisitisidilik asit
Taşıyıcı Sistemler	MF59
	AS03, AS04
	Tamamlanmamış Freund Adjuvanı
	Polilaktik Asit (PLA)
	Virüs Benzeri Parçacıklar
Adjuvan Sistemleri	Cpg ODN ve Emülsiyonlar
	MF59 ve AS03
	Polfosfazenler and Polinosinik asit
	Saponin ve Emülsiyonlar
	MF59 ve Carbopol 971P
	TLR4 ve TLR 7/8 Agonists

Adjuvanlar, bağışıklık yanıtını başlatmak için bağışıklık sistemi üzerinde yapay sinyaller sağlayabilir. Bu sayede, iyi bir bağışıklık yanıtı için gereken aşılama sayısını azaltır. Ayrıca, aşıda kullanılan antijen miktarını azaltabilir, bu da aşının daha uygun maliyetli hale gelmesini sağlar (36). Ancak tüm adjuvanlar, yanıtları daha etkili bir forma veya formlara kaydırabilir. Bir aşı geliştirilirken, optimal koruma sağlayacak bağışıklık yanıtının hangi türde olduğunu bilmek ve sonra bu tür bir bağışıklık yanıtını uyaracak bir adjuvan seçmek gerekmektedir (37). Aynı zamanda seçilen adjuvanın kabul edilemez yan etkiler olmadan istenen bağışıklık yanıtını tetiklemeye yardımcı olmalıdır. Bu sebeple doğru adjuvanı seçmek kritik derecede önemlidir (38). Belirli bir patojen için belirli bir türde güvenli ve etkili bir adjuvan bulmak için genellikle önemli miktarda deneme yanılma gereklidir. Yanlış türde bir bağışıklık yanıtının tetiklenmesi, hayvanın patojene maruz kalmasından sonra hastalık patogenezini artırabilir. Kedilerde bulaşıcı peritonit virüsüne karşı bir aşı geliştirmek için yapılan erken denemeler, bu tepkinin bir örneğidir

(39). Konak faktörleri ayrıca adjuvanın etkinliğini etkiler. Genç, sağlıklı hayvanlar bazen ideal olmayan bir aşıya etkili bir bağışıklık yanıtı verebilirken, zayıf bağışıklığı olanlar bunu yapamayabilir (40).

2.2.1. Mineral Tuzlar

Mineral tuzlar, aşıların bağışıklık yanıtını artırmak için oldukça uzun bir süredir kullanılan alüminyum içeren adjuvanlardır. Bu adjuvanlar, 1926'da difteri toksoid aşılarda potansiyellerini göstermişlerdir (41). O zamandan beri, alüminyum bazlı adjuvanlar milyonlarca aşının bileşeni olarak kullanılmıştır. Yüksek başarıları; iyi kanıtlanmış güvenlik profiline, düşük üretim maliyetine, aşı antijeniyle uyumluluğa, minimum yan etkilere dayanmaktadır. Daha önce alüminyum adjuvanlı aşılar, antijenin ve alüminyumun çökeltimi yolu ile hazırlanıyordu (42). Alüminyum tuzlarıyla antijenin çökeltimesi, çökeltme işleminin adsorpsiyon derecesi üzerinde kontrol sağlanamadığı için uzun süredir antijenin alüminyum jellerine adsorpsiyon süreciyle değiştirilmiştir (43). Aşılarda yaygın olarak kullanılan alüminyum adjuvanları; alüminyum fosfat adjuvanı ve alüminyum hidroksit adjuvanıdır (44). Alüminyumun, yüksek affiniteli antijenlerle bağlandığı ve aşı uygulama yerinde bir depo oluşturarak fonksiyonunu gerçekleştirdiği bilinmektedir. Depo oluşumu, enjeksiyon yerinde yüksek antijen konsantrasyonlarının korunmasına izin verir, bu da antijenin alüminyum parçacıklarından sürekli olarak dağılmasını sağlar (45).

Alüminyum adjuvan, Th2 tip bağışıklık yanıtı uyararak, interleukin (IL-4) sitokininin salgılanmasını indükleyerek etkisini gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu süreç, IgG1 ve IgE immünglobulinlerin ve eozinofillerin oluşumunu teşvik eder ve bu da bu adjuvanların bakteriyel aşılar için iyi bir seçenek olmasını sağlar (46). Aşıların içindeki alüminyum adjuvan miktarı, güvenlik açısından önemlidir ve istenilen etkiyi indüklemek için gereklidir. Aşı formülasyonundaki alüminyum adjuvan miktarı genellikle her doz başına elementel alüminyum konsantrasyonu olarak ifade edilir. Al3+ 'ün bir miligramı, 2,2 mg alüminyum hidroksit adjuvan ve 4,5 mg alüminyum adjuvanına eşittir (47). Hayvanlarda aşıların içinde alüminyum adjuvanların kullanıldığı örnekler arasında Newcastle hastalığı ve FMD (Food and Mouth Disease- Şap Hastalığı) gibi bazı ticari öneme sahip hastalıklar bulunmaktadır (48).

Başka bir önemli mineral tuz adjuvanı, kalsiyum fosfattır (CaP), başlangıçta poliomyelit, pertusis, difteri ve tetanoz gibi bazı potansiyel insan hastalıkları için aşılarda

bir adjuvan olarak kullanılmıştır, ancak kullanımı 80'lerin sonlarında alüminyum bazlı adjuvanlar tarafından tamamen değiştirilmiştir. Fakat tekrar alüminyum adjuvanlar için iyi bir alternatif olma potansiyeline sahip olduğu fark edildiğinden günümüzde kullanılmaya devam edilmektedir (49). CaP'nin avantajlarından biri, organizmanın dokularında doğal olarak bulunması nedeniyle güvenli ve biyobenzer olmasıdır. CaP'nin absorpsiyon kapasitesi, elektrokinetik potansiyelde bir fark olan zeta potansiyeli nedeniyle alüminyum hidrokside eşit veya daha yüksektir (50). Ayrıca, CaP'nin bir adjuvan olarak uygulanması, genellikle azaltılmış IgE üretimine bağlı olan daha az lokal reaksiyona neden olur. Kalsiyum fosfatın nanopartikül adjuvanı olarak kullanılması, FMD hastalığına karşı yeterli bağışıklık yanıtı uyardığı kanıtlanmıştır (51). Mineral tuzları adjuvan olarak, göreceli olarak daha güvenlidir ve ayrıca ekstraselüler patojenlere karşı, aşılar için daha iyi adjuvan özellik gösterir, ancak hücresel iç patojenlere karşı aşılar için kullanımları sınırlı kalmaktadır (52). Şu anda kullanılmakta olan lisanslı alüminyum adjuvanlar Tablo 2.2'de görülmektedir (53).

Tablo 2. 3: Ticari kullanımda olan alüminyum adjuvanlar.

Aşı	Ticari Adı	Firma	Adjuvan
Hepatit A	Havrix	GSK	Alüminyum Hidroksit
Hepatit B	Recombivax HB	Merck	Alüminyum Hidroksifosfat sülfat
HPV Aşısı	Gardasil	Merck	Alüminyum Hidroksifosfat sülfat
Difteri ve Tetanoz Aşısı (DT)	USP	Sanofi Pasteur	Alüminyum potasyum fosfat

2.2.2. Lipozomlar

Lipozomlar, birkaç konsantre lipid çift tabaka ile sıralanmış veziküllerden oluşan küresel yapılar olup, bu tabakalar arasına sıvı fazlar yerleştirilmiştir (54). Lipid çift tabakasının yapısına dayanarak, lipozomlar unilamelar (ULV) veya multilamelar (MLV) veziküller olarak ayırt edilebilir. Unilamelar veziküllerde bulunan tek lipid çift tabakası, hidrofilik moleküllerin kapsülasyonu için mükemmel bir yapıyken, multilamelar veziküllerdeki konsantrik lipid çift tabakaları, lipid çözünür antijenlerin kapsülasyonu için idealdir (55). Lipozomlar, benzersiz yüzey taşıyıcı yapıları ve iyi biyouyumlulukları nedeniyle aşılarda adjuvan olarak etkili bir taşıyıcı sistem olduğunu kanıtlamıştır (56). Lipozomlar antijeni hapsettiğinden dolayı onları çevresel tehlikelerden korur, antijeni

belirli lenfosit yerlerine teslim eder ve aynı zamanda antijen spesifik bağışıklık uyarımının başlatılmasını potansiyalize eder (57). Lipozomların antibakteriyel, antiviral, aşılar, antikarsinojenik terapiler ve hormonlar gibi birçok terapötik ajanın taşıyıcı sistemi olarak etkili bir alternatif olduğu kanıtlanmıştır. Lipozomlar intramusküler, subkutan, intravenöz, nazal-oral ve topikal uygulama gibi çeşitli yollarla uygulanabilir (55).

Lipozomun aşı adjuvanı olarak uygulanması, granülom oluşumu, enjeksiyon bölgesinde duyarlılık reaksiyonu oluşturmaması, güçlü humoral bağışıklık yanıtının gelişmesi ve geniş bir adjuvan etkisi gösterme gibi birçok umut vadeden özelliği olduğu gösterilmiştir (58). Lipozomların, patojen ilişkili moleküler desenlerle (PAMP'ler) donatıldığı görülmüştür, bu da antijen sunan hücreleri (APC'ler) çekmeye yardımcı olur ve desen tanıma reseptörleri (PRR'ler) aracılığıyla etkileşime girer, adaptif bağışıklık sisteminin ardışık tetiklenmesine neden olur (59).

Lipozom tabanlı aşılamanın, geniş bir hayvan patojen yelpazesi karşısında gösterdiği potansiyel özellikler, lipozomları hayvan aşıları için umut vadeden bir adjuvan haline getirmiştir. Lipozomlar, farklı hayvan türlerinde klinik aşılar ve deneysel aşı adayları dahil olmak üzere çeşitli antijenlerle birlikte başarılı bir şekilde kullanılmıştır (60). Lipozom kaplı nanopartiküller, Newcastle hastalığı virüsüne (NDV) karşı aşılar içinde kullanılmıştır (54). Lipozom kullanılarak hazırlanan Newcastle hastalığı aşısı ile immünize edilen kuşlarda hücre sayısının ve antikor üretiminin daha yüksek olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, kapsüllenmiş Avian patojenik E.coli (APEC) ile lipozom tabanlı aşı, tavuklarda Kolibasiloz'un kontrolü için kullanılmıştır (61).

2.2.3. Saponinler

Saponinler, birçok farmasötik uygulaması olan, doğal olarak bitkilerde yaygın olarak bulunan maddelerdir. Kimyasal olarak saponinler, lipofilik triterpen türevine bağlı olan bir veya daha fazla hidrofilik öğeden oluşur. Anti-mikrobiyal, anti-fungal aktiviteleri nedeniyle, saponinlerin bitki savunma mekanizmalarında rol aldığı düşünülmektedir (62). Çeşitli bitki kaynaklı saponinlerin memeli bağışıklık sistemini uyarma kabiliyetleri, onların birçok hayvan aşısında adjuvan olarak kullanımına teşvik etmiştir (63). Şu anda hayvan aşılarında kullanılan saponinlerin tamamı, Güney Amerika ağacı Quillaia Saponaria (QS)'nın kabuğundan elde edilmektedir. Hayvan aşıları için en belirgin saponin bazlı adjuvan, Quil A ve onun saflaştırılmış fraksiyonu QS-2'dir (64).

Adjuvan olarak Quil A'nın uygulanması, hücresel ve hümoral yanıtları uyarmakta ve bunun sonucunda sitotoksik T lenfosit yanıtlarının üretilmesine yol açmaktadır (65). Quil A tarafından aktive edilen bu tür bağışıklık yanıtı, koksidi parazitlerine karşı aşılar ve ayrıca toxoplazmoza karşı ideal bir adjuvan olmasını sağlamıştır (66). QS-2 adlı diğer önemli bir saponin, birçok enfeksiyöz hastalık için aşı üretimi için klinik denemelerde bulunan sonuçlar ile umut vadeden bir adjuvan olduğunu kanıtlamıştır (67).

Saponin kompleksleri olarak ISCOM'lar (Immunostimulating complex-Bağışıklık sistemini uyarıcı kompleks), memelilerde farklılaşma kümesi (CD) olarak hem CD8+ hem de CD4+ T hücreli immün yanıtları etkili bir şekilde uyarabilir. Saponinlerin immünolojik işlevleri, başlıca yüzeylerinde bulunan belirli yapısal bileşenlerden kaynaklanır (68). Saponin yüzeylerinde bulunan şeker kısımlarının antijen sunan hücrelere (APC'ler) bağlandığı gözlemlenmiştir. Bu bağlanma, APC'lerin sitokin salgılamasını uyararak hem hücresel hem de hümoral bağışıklık yanıtlarının aktivasyonuna neden olur (69). Saponinlerin doğal formda daha az sürdürülebilir bağışıklığa ve toksik etkiye sebep olma ihtimalleri sebebiyle, doğal saponinlerin sentetik analoglarının üretimi için çalışmalar devam etmektedir. Böylece doğal kaynaklardan elde edilen saponinlerin değişken yapıları kontrol altına alınmış olacaktır (64). Buna bir örnek olarak; Quillaja brasiliensis yapraklarında doğal olarak bulunan saponinin, Quillaja saponaria'dan elde edilen saponine kıyasla daha az toksik olduğu ve daha sürdürülebilir bir bağışıklık yanıtı sağladığı görülmektedir. Bu bulgu, Q. brasiliensis yapraklarından elde edilen saponinin toksisite açısından daha güvenli ve bağışıklık sistemi üzerinde daha uzun süreli etkili olduğunu göstermektedir. (70).

2.2.4. TLR Reseptörleri

Toll-benzeri Reseptörler (TLR), PRR (patern tanıma reseptörü) ailesinin önemli üyelerindendir ve hem hücre yüzeyinde hem de endozomal membranlarda bulunurlar. TLR'ler, çeşitli mikrobiyal bileşenleri tanıyarak doğuştan gelen bağışıklık sistemini aktive eder (34). Her bir TLR, spesifik bir PAMP'yi tanır. Bu süreç, patojenlerin elimine edilmesi ve bağışıklık hafızasının oluşması için kritik öneme sahiptir. PRR, bağışıklık sisteminin patojenleri tanımasında ve onlara yanıt vermesinde kritik rol oynayan moleküler yapılar olarak tanımlanır (71). PRR'ler, patojenlerle ilişkili moleküler desenleri (PAMP'ler) ve hasar ile ilişkili moleküler desenleri (DAMP'ler) tanıyarak, doğuştan gelen bağışıklık yanıtının başlatılmasını sağlar. PRR'ler, hücre zarında, endozomal

membranlarda ve sitozolde bulunabilir. Başlıca PRR sınıfları şunlardır: Toll-benzeri reseptörler (TLR), Nod-benzeri reseptörler (NLR), C-tip lektin reseptörleri (CLR) ve RIG-I benzeri reseptörler (RLR). PRR'lerin aktivasyonu, inflamatuar sitokinlerin salgılanması, antijen sunumu ve adaptif bağışıklık yanıtının geliştirilmesi gibi çeşitli immün yanıtların tetiklenmesine yol açar. TLR'ler, istilacı mikroorganizmaların korunmuş moleküler desenlerini tanıyan ve ilk savunma mekanizmasını tetikleyen reseptörler olarak işlev görür (72).

TLR'ler çeşitli hücre tipleri tarafından ifade edilir. Makrofajlarda TLR'lerin ifadesi yalnızca doğal bağışıklık yanıtını uyarırken, dendritik hücrelerde TLR'lerin ifadesi hem doğal hem de adaptif bağışıklık mekanizmalarının aktive olmasına neden olur. TLR'ler hücre yüzeyinde veya hücre içinde bulunabilir (73). Hücre yüzeyinde bulunan TLR'ler, ekstrasellüler alanda bulunan bakteriyel ürünleri tanırken, hücre içi TLR'ler hem bakteriyel hem de viral patojenlerin genetik partikülleri tanır. Çeşitli evcil hayvanlar, koyun, sığır, domuz, at, köpek ve tavuk dahil olmak üzere birçok evcil hayvan için birçok TLR'nin dizi bilgisi mevcuttur (74).

Belirli TLR'ler tarafından istilacı mikroorganizmanın karakteristik tanıma desenlerinin belirlenmesi, çeşitli sinyal yolaklarının aktive olmasını teşvik ederek kemokinler, sitokinler ve birçok diğer uyarıcı molekülün üretimini arttırmaktadır (75). Patojenlerin çeşitli bileşenleri, T hücre farklılaşmasında yer alan sitokinlerin ifadesine neden olan TLR agonistleri olarak kullanılmıştır. TLR2 agonisti olarak tanınan bakteriyel lipoprotein, TLR4 agonisti olarak tanınan bakteriyel lipopolisakkaritler (LPS) ve Gram-negatif bakterilerin yüzey membranı bileşenleri, TLR5 agonisti olarak tanınan bakteriyel flagellin gibi örnekler vardır (76). Sonuç olarak, bu özellikleri sayesinde PRR ve TLR, hayvan aşılarında adjuvan olarak kullanılır. PRR, doğuştan gelen bağışıklık sistemini aktive ederek güçlü bir immün yanıt oluşturur. TLR ise antijenlerin belirli bileşenlerini tanır ve bağışıklık sistemini uyarır. Bu reseptörlerin aşılarla birlikte kullanımı, daha etkili ve uzun süreli koruma sağlar. Büyükbaş, küçükbaş ve evcil hayvanlarda çeşitli hastalıklara karşı güçlü aşılar geliştirilmesinde kullanılırlar (77).

2.2.5. Polimerler

Son yıllarda, araştırmalar, birçok hastalığa karşı antijen potansiyelini artırmak için etkili bir adjuvan olarak hareket edecek yeni maddelerin formüle edilmesi ve tasarlanması yönünde büyük ölçüde genişlemektedir. Bir adjuvan olarak polimerik biyomalzemeler,

bağışıklık tepkilerini birkaç farklı şekilde etkileyerek arttırmaktadır (78). Antijenin kapsülleyerek parçalanmasını önler ve bu sayede antijenin stabilitesini artırırlar. Polimerik matrisli aşıların yavaş salınımı, uzun süreli koruma sağlamaktadır. Çoklu antijen verilmesi gereken durumlarda, polimerik adjuvanlar birden çok antijeni başarılı bir şekilde taşıyabilmektedir (79).

Polimerik biyomoleküllerin yüzey yapısındaki esneklik, PPR'ler veya endozomal TLR'lerin kolay aktivasyonuna yardımcı olarak bağışıklık tepkilerinin etkin bir şekilde düzenlenmesine neden olur (80). Hayvan aşısı adjuvanı olarak kullanılan birçok immün aktif polimerik biyomalzeme örneği bulunmaktadır. Polimerik malzemeler doğal kaynaklardan elde edilebildiği gibi sentezlenebilmektedir. Farklı kaynaklardan elde edilen polimerlerin, immün yanıta etkileri de farklı olmaktadır (Tablo 2.3). Zayıflatılmış Newcastle hastalığı viral antijeninin kitosan molekülleri ile eşzamanlı uygulanması, tavuklarda antijen spesifik hücresel aracılı bağışıklık tepkisini arttırdığı bulunmuştur. Benzer şekilde, kitosan tabanlı AFT aşısı ile aşılanan sığırlar, AFTV'den korunmuştur (83).

Birçok sentetik polimer de hayvan aşı adjuvanı olarak test edilmiştir. Karbopol gibi poliakrilik asit polimerleri, en önemli ve yaygın olarak kullanılan sentetik polimer adjuvanlardır. Karbopol, atlar için influenza virüsüne karşı vektöre dayalı inaktive aşılarında bir adjuvan olarak kullanılmıştır (84). Karbopolun domuz aşılarında kullanımı, domuzlarda T hücresi proliferasyonunu ve interferon gama üretimini etkili bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir (85). Başka bir önemli sentetik polimer tabanlı adjuvan polifosfazen olarak rapor edilmiştir. Polifosfazenle adjuvanlanan Actinobacillus pleuropneumoniae aşısı, domuzlarda IFN-γ üretiminin arttırılmasına ve eş zamanlı olarak IgG antikorlarında artış sağlamıştır (86).

Tablo 2. 4: Polimerler ve etki mekanizmaları

Elde Edildiği Kaynak	Polimer	Aksiyon Mekanizması
Sentetik Polimerler	Polifosfazenler	Enjeksiyon bölgesinde proinflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin artan salgılanması
	Polikaprolaktonlar	Th1 tipi bağışıklık tepkilerinin aktivasyonu
	Polianhidritler	Antijen sunan hücrelerde CD86, CD40 ve MHC sınıf II yüzey belirteçlerinin artan ekspresyonuna neden olarak etki eder.
	Polielektrolitler	Antijenlerin alımını ve sunumunu artırarak etki gösterirler. Ayrıca hücre yüzeyi reseptörlerinin ekspresyonunu ve proinflamatuar sitokinlerin salınımını da arttırırlar.
	İyonik olmayan blok polimerler	Makrofaj aktivasyonuna ve MHC sınıf II moleküllerinin yüksek düzeyde ekspresyonuna neden olur.
Doğal Polimerler	Kitosan	Makrofajların aktivasyonuyla sitokinlerin üretilmesine yol açarak antikor sentezinde artışa neden olur.
	Mannan	Komplement yollarının aktivasyonu aracılığıyla işgal eden antijenin fagositozunun artmasına neden olur.
	Lentinan	Makrofajların uyarılmasına ve artan interleukin-6 üretimine neden olur.

Sonuç olarak, polimerlerin aşı adjuvanı olarak kullanılmasının birçok avantajı vardır. Polimerlerin esnek yapısı, antijenlerin stabilitesini artırır ve daha uzun süreli bir koruma sağlar. Ayrıca, polimerlerin yüzey özellikleri, bağışıklık hücrelerinin antijenlere daha etkili bir şekilde bağlanmasını sağlar ve bu da bağışıklık sisteminin daha güçlü bir yanıt vermesini sağlar. Bununla birlikte, polimerlerin biyolojik uyumluluğu ve düşük toksisitesi, aşıların güvenliği açısından da önemlidir (87).

2.2.6. Emülsiyonlar

Emülsiyonlar ilk defa, 1916'da Le Moinic ve Pinoy tarafından tanımlandı, ancak kavramı geliştiren kişi Jules Freund'dur. Bununla beraber, ilk emülsiyon adjuvanları çok

kararsız ve viskoz olmasının yanında güçlü lokal reaksiyonlarda gözlemlenmiştir. Günümüzde, yeni nesil yağlar ve stabilizatörler sayesinde stabil, güvenli ve akışkan emülsiyonlar geliştirilebilmektedir (88). Emülsiyon, dağılmış faz olarak adlandırılan bir sıvının, karışmaz olduğu sürekli faz adı verilen ikinci bir sıvı içinde dağılması şeklinde tanımlanır. Aşı formülasyonlarında bu fazlar su (antijenik ortam) ve yağdır. Emülsiyonları stabilize etmek amacıyla yüzey aktif maddeler (stabilizatörler) eklenir. Yüzey aktif madde, hidrofilik olan bir polar grup ve hidrofobik olan genellikle bir yağ zincirinden oluşan polar olmayan bir grup içeren bir bileşiktir (88, 89).

Yüzey aktif maddeler, her iki faz için afiniteleri hakkında bilgi veren Hidrofilik/Lipofilik Denge (HLB) değerleri ile tanımlanabilir. Yüzey aktif maddenin HLB değerine bağlı olarak farklı emülsiyonlar elde edilebilir (27). Düşük HLB değeri olanlar, yağlı fazlar için yüksek afiniteye sahiptir ve W/O emülsiyonları oluşturur. Bu durumda, antijenik faz, sürekli yağlı faza dağılmış damlacıklardan yapılır. Yüksek HLB değeri olanlar, sulu faz için yüksek afiniteye sahiptir ve sürekli fazın su olduğu ve dağılmış fazın yağ olduğu O/W emülsiyonları oluşturur. Belirli yüzey aktif madde sistemleriyle, HLB değeri orta olduğunda, W/O/W emülsiyonları elde edilebilir. Bu durumda, sürekli faz suludur ve dağılmış faz yağdır; ancak yağ damlacıklarının içinde sıkışmış bir sulu faz bulunur (90).

Yağ bazlı adjuvanların etki mekanizmaları net değildir ve farklı mekanizmalara dayanmaktadır. Birincisi depo etkisi ve antijenin enjeksiyon bölgesinden yavaş salınmasıdır. Emülsiyon tipine göre antijenin kinetik salınımı değişir. Bir proteinin bir emülsiyondan kinetik salınımını değerlendirmek için ters çevrilmiş diyaliz tüpü yöntemi kullanılarak yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar, emülsiyon tipine göre farklılıkları açıkça göstermektedir. Adjuvan içermeyen protein hemen salınırken, O/W emülsiyonları hafif bir gecikmeye izin verir, ancak protein hızla salınır (91). W/O emülsiyonları antijen salınımını hiç indüklemez veya çok düşük indükler. Bu, emülsiyonun stabilitesi ile ilişkilidir ve emülsiyon kırılır kırılmaz büyük miktarlarda antijen salınır, ancak O/W emülsiyonlarından daha yavaştır. W/O/W emülsiyonları arasında bir davranış sergiler (92).

Emülsiyonlar ayrıca antijeni enzimler tarafından hızlı bozulmadan korur ve antijenin elektrik yükünü değiştirerek daha immünojenik hale getirir. Ayrıca, reaktojenite yaratarak makrofajlar ve dendritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerin alımını uyarırlar.

APC tarafından antijenlerin alınmasını destekleyebilirler ve bu, yüzey aktif madde ile hücresel membran arasındaki etkileşimlerle açıklanabilir (33). Lenfosit yakalama, yağ adjuvanlarının başka bir etki mekanizmasıdır. Lenf düğümlerinde lenfosit birikimini uyarırlar ve yeniden dolaşımı değiştirerek hücre birleşmesini kolaylaştırırlar. Seçilen emülsiyon tipine göre spesifik sitokinler indüklenebilir (92).

2.2.6.1. Yağ içinde su emülsiyonları (W/O): Genel olarak, uzun süreli bağışıklık için küçükbaş, büyükbaş, kümes hayvanları ve balıklarda yağda su emülsiyonları önerilir. Şap hastalığında, mineral yağ bazlı emülsiyonlar tek aşıyla sığırları bir yıl koruyabilirken, alüminyum hidroksit bazlı formüller iki veya daha fazla takviye dozu gerektirir (23).

Mineral ve mineral olmayan yağ karışımları iyi bir alternatif olabilir. Lokal reaksiyonlar olsa bile, diğer formüller veya uygulama yollarıyla karşılaştırıldığında belirli hastalıklara karşı koruma sağlayabilirler, bu da bazı yan etkileri haklı çıkarabilir (93). W/O emülsiyonları, aşının maliyet etkinliği açısından önemli olup, aşı dozunun veya antijen konsantrasyonunun azaltılmasına imkân tanır. Mineral yağ bazlı bir adjuvan kullanılarak Newcastle hastalığına karşı aşılanmış tavuklar, dozun sadece 1/100'ü uygulanarak bile korunabilmektedir (88). Non-mineral yağ adjuvanları daha az etkili olmasına rağmen, dozun 1/50'si ile %100 koruma sağlayabilmektedir. Ayrıca, W/O formülasyonları hücresel bağışıklık tepkisini arttırabilir. Bakteriyel, viral veya parazitik antijenlerle yapılan çeşitli çalışmalarda, yağda su emülsiyonlarının diğer emülsiyon tiplerine kıyasla daha yüksek IgG2a antikor seviyelerini indüklediği gösterilmiştir (94). Koyunlarda Heartwater'a karşı W/O formülasyonları ile yapılan aşılamalar, challange testlerde korumayı artırmakta ve iyi tolere edilebilmektedir. Bu koruma, hümoral yanıtla ilişkilendirilememekte, bu da hücresel immün yanıtı arttıdığı düşünülmektedir (95). Yüksek viskoziteli W/O emülsiyonlarının enjekte edilmesi zordur ve bu tip emülsiyonlar uygulama bölgesinde nekroülseratif lezyonlara neden olabilir (96).

2.2.6.2. Su içinde yağ emülsiyonları (O/W): Su içinde yağ emülsiyonları oldukça akışkan yapıya sahip olup, iyi tolere edilmekte ve kısa vadeli güçlü bağışıklık tepkileri oluşturmaktadır (97).

Bu emülsiyonların yağ fazı oranı genellikle %15 ile %25 arasında değişmekte olup, bu da kısmen güvenlik profillerini açıklamaktadır. Üretim süreci yalnızca düşük düzeyde bir karıştırma gerektirdiği için oldukça pratiktir. Mineral yağ bazlı emülsiyonlar, bakteriyel veya viral enfeksiyonlara karşı antikor tepkilerini artırmak amacıyla besi

domuzlarında güvenli bir şekilde kullanılabilmektedir. Ayrıca, fare modellerinde psödorabiye karşı DNA aşısının etkinliğini artırdığı gösterilmiştir (98).

2.2.6.3. Su içinde yağ içinde su emülsiyonları (W/O/W): Herbert tarafından geliştirilen çok fazlı emülsiyonlar, aşı formülasyonlarının üretimini zorlaştıran iki aşamalı bir işlemle yapılıyordu. Ayrıca, bu emülsiyonların stabilitesi yeterince iyi değildi (99).

Günümüzde, kararlı, akışkan ve kullanımı kolay çift emülsiyonlar sağlayan tek aşamalı bir emülsifikasyon işlemi geliştirilmiştir. Bu emülsiyonların avantajları, düşük viskozitelerinin yanı sıra kısa ve uzun vadeli bağışıklık tepkilerini artırma yetenekleridir. Dış sulu fazdaki antijen, sulu formülasyonlar gibi bağışıklık sistemine hızla ulaşırken, iç sulu fazdaki antijen yağ içinde su emülsiyonları gibi yavaşça salınır (100). Şap hastalığında, bu formülasyon aşılamadan sadece dört gün sonra domuzları ve sığırları hastalığa karşı koruyabilir, bu da salgın durumlarında oldukça faydalı olabilir. Ayrıca, çok fazlı emülsiyonlar uzun süreli bağışıklık sağlayabilir ve tek bir aşılamadan sonra bir yıl boyunca sığırları hemorajik septisemiye karşı koruyabilir (101).

W/O/W emülsiyonları genellikle hümoral bağışıklık tepkisini artırır. Farelerde yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada, mineral yağ bazlı W/O/W emülsiyonunun IL-6 sitokini indükleyerek iyi bir koruma sağladığı görülmüştür (95). Antijen hem iç su damlacıkları içinde hem de dış su fazında tutulabilir. W/O/W emülsiyonları, W/O emülsiyonları ile karşılaştırıldığında daha kabul edilebilir lokal reaksiyonlarla birlikte güçlü adjuvan aktivitesi ve uzun süreli immün yanıt sağlayabilir. Ancak, bu emülsiyonların fiziksel stabilitesi sınırlıdır ve yalnızca özel polimerik emülgatörler kullanılarak korunabilir (96).

Yağ emülsiyon adjuvanları, yüzey aktif maddelerle stabilize edilen yağ ve su fazlarının bir karışımını içerir. Diğer bileşenler eklenmeden, yağ bazlı adjuvanların çoğu antikor yanıtlarını uyarır, fakat çeşitli durumlarda yağ-su emülsiyonları sitotoksik T lenfositlerini (CTL) etkinleştirebilir (102). Th1 veya Th2 sitokin indüksiyonları zayıf veya hiç yoktur. Çoğunlukla, yağ emülsiyonları, alum adjuvanlardan daha güçlü etkilere sahiptirler, ancak enjeksiyon bölgesinde reaksiyonlar ve granülom oluşumu gibi yan etkilere neden olabilirler. Genel olarak bu adjuvanlar mineral yağ içermektedir. Ancak, karsinojenik polisiklik aromatik hidrokarbonlarla kontamine olma riski nedeniyle, birçok emülsiyon artık bitkisel veya hayvansal yağlar içermektedir (103). Örnek olarak, köpek balığı karaciğer yağı veya skualen verilebilir. Metabolize edilebilir yağlar ile elde edilen adjuvanlar, mineral yağ bazlı adjuvanlara göre daha güvenli bir profil sunar ve genellikle

hafif bir inflamasyona neden olurlar. Ancak, bu güvenlik artışı, etkinlikte bir azalmaya yol açabilmektedir (104).

2.2.7. Adjuvan Sistemleri

Bir molekülde iyi bir adjuvanın tüm özelliklerini elde etmek imkansızdır. Bu nedenle, mevcut adjuvan formülasyonları genellikle iki veya daha fazla adjuvan molekülünden oluşur; bir araya getirildiğinde çeşitli hücreleri ve bağışıklık mekanizmalarını uyaran sinerjik bir etki gösterir (19). Görülen hayvan hastalıklarının sayısının artması, yeniden ortaya çıkması ve farklı türlerdeki hayvanlar göz önüne alındığında, kombinasyon adjuvanlarının hazırlanması, başarılı bir hayvan aşı programının tüm gereksinimlerini karşılamak için son derece önemlidir (105).

TLR ligandları, emülsiyonlar, lipozomlar, saponinler ve sentetik polimerlerden oluşan farklı adjuvan kombinasyonları, adjuvan sistemlerinin formülasyonları için kullanılmıştır. Bazı adjuvanlar, örneğin alüminyum, genellikle yalnız kullanılırken, birçok iyi bilinen aşı adjuvanı, adjuvan sistemlerini içermektedir (106). FCA, mikobakteriler içeren bir su-yağ emülsiyonudur. SAF, skualen içinde threonyl-MDP'yi içeren bir noniyonik blok kopolimer (L121) içerir ve Ribi DETOX adjuvanı, skualen içinde MPL ve hücre duvarı iskeletini içerir. Adjuvanların birleştirilmesinin sonucu, her bir bileşenin mekanizması ve toksisitesine bağlıdır (107). Kombinasyonlar, tekil bileşenlere göre daha iyi ve benzersiz sonuçlar sağlamaktadır. Yapılan bir çalışmada, farelerde hepatit B antijeni ile IM aşılanan farelerde adjuvan gücünü karşılaştırdı. Tekil adjuvanlar test edildiğinde, en etkili adjuvanlar FCA ve Titermax Gold (CRL-8300 kopolimer içeren bir su-yağ adjuvanı) idi, ancak bu 2 adjuvan tek başına uygulandığında en fazla kas hasarına neden oldu. FIA, CpG oligonükleotidler veya MPL daha düşük titreler oluşturdu. FIA orta düzeyde kas hasarına neden oldu, CpG oligonükleotidler veya MPL hafif hasara yol açtı. CpG oligonükleotidlerinin alüminyum ile birleştirilmesi, minimal kas hasarı ile görülen FCA ile benzer antikor titrelerine yol açtı (108).

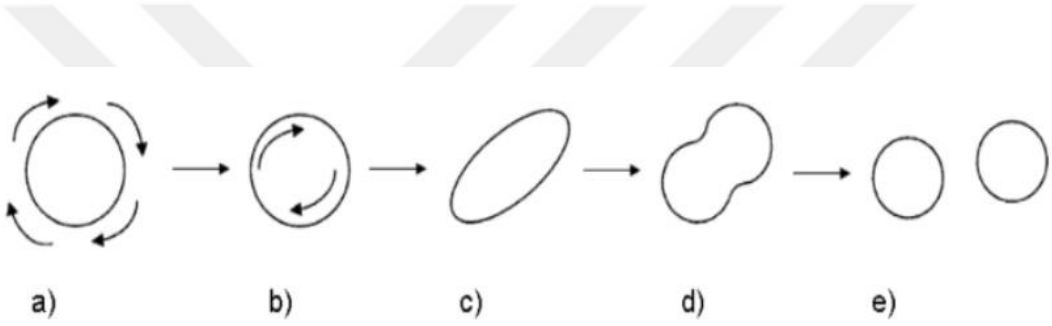
Tek adjuvanlı aşı formülasyonlarının kısıtlamaları, adjuvanların kombinasyonu ile oluşturulan adjuvan sistemlerinin keşfine olan ihtiyacı arttırmaktadır. Örneğin, alum veya LPS'nin bir türevi olan MPL, tek başına insan papillomavirüsü (HPV) aşısına sadece düşük miktarlarda bağışıklık yanıtları indükler ancak bu iki adjuvan bir araya getirildiğinde, güçlü bağışıklık yanıtlarını indüklemektedir (109).

Sonuç olarak; kanıtlar, adjuvan sistemlerinin kullanımının, bir aşı tarafından indüklenen bağışıklık yanıtlarını önemli ölçüde artırarak son derece faydalı olabileceğini göstermektedir. Bazı formülasyonlar, hatta adjuvanların birlikte uygulanmasını takiben sinerjik bir yanıt gösterir: iki adjuvanın bir araya gelmesinin etkisi, her adjuvanın etkisinin toplamından daha faydalıdır. Adjuvan sistemlerinin immün yanıta etkileri Tablo 2.4'de gösterilmiştir (110).

Tablo 2. 5: Adjuvan sistemleri ve immün yanıta etkileri

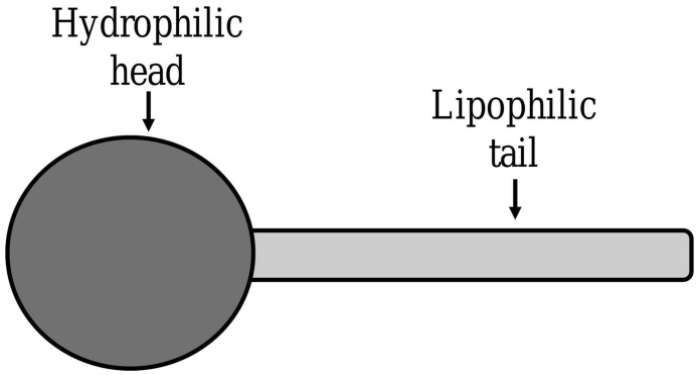
Adjuvan Sistemleri	**Antijen**	**İmmün Yanıt ve Korumaya Etkisi**	**Referans**
MALP2 + poly I:C + CpG	HIV	↑ Koruma	(111)
CpG + CT	Helicobacter felis	↑ Koruma	(112)
Lipozom + MPL + QS21	Malaria CSP	↑ Antikor Uyarımı ↑ CMI ↑ Koruma	(113)
CpG + polifosfazenler	HBsAg, RSV	↑ IgG1/IgG2a Uyarımı	(114)
CpG+ polifosfazenler + HDP	HEL BRSV-F protein Pertussis toxoid	↑ Antikor Uyarımı ↑ Th1	(115)
CpG + lipozom	Hepatitis A virus	↑ Mukozal Antikor Uyarımı	(116)
CpG + HDP	Influenza OVA	↑ IgG2a ↑ IFN-g	(117)
CpG + poly I:C	HIV Gag	↑ CD8+	(118)
Alum + MPL	HIV	↑ Antikor Uyarımı	(119)
MDP + lipozom	HBsAg	↑ IFN-g	(120)

2.2.7.1. Emülsiyon: Emülsiyon oluşum sürecine "emülsifikasyon" denir. Emülsifikasyon dinamik ve kendiliğinden olmayan bir süreçtir ve damlacıkları üretmek için enerji gereklidir. Emülsifikasyon işlemi, sıvılardan birini sürekli fazda küçük damlacıklar şeklinde dağıtmak için genellikle önemli miktarda mekanik enerji gerektirir (121). Aşağıdakiler dahil olmak üzere birkaç emülsifikasyon yöntemi vardır; basit çalkalama, rotor-stator sistemleriyle karıştırma, gözenekli membranlardan sıvı enjeksiyonu veya yüksek basınçlı homojenleştiriciler ve ultrason jeneratörleri. Bir damlacığı daha küçük boyutlara bölmek için damlanın şeklinin değiştirilmesi gerekir ve bu deformasyon emülsiyonun kesilmesi veya karıştırılması sırasında oluşmaktadır. Damlacık deformasyonu ve parçalanma süreci Şekil 2.5'te gösterilmektedir (122).

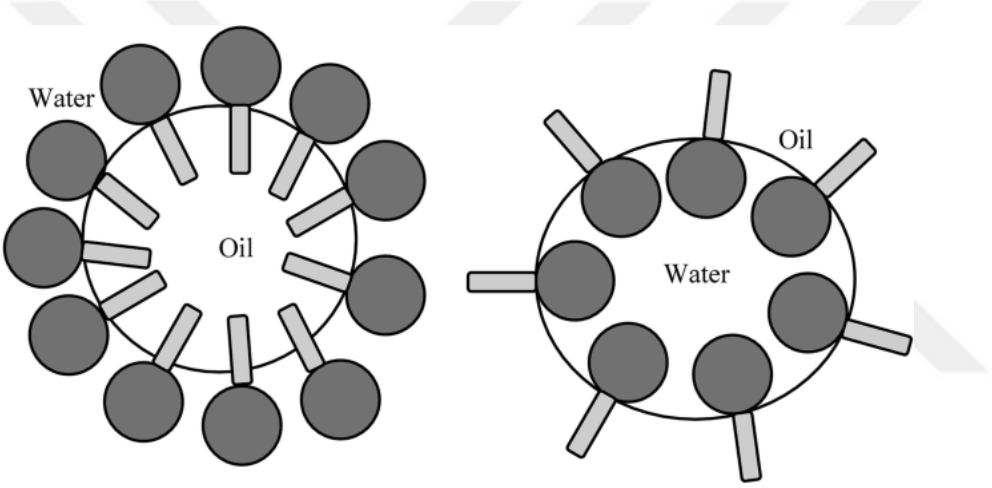


Şekil 2. 1: Emülsiyon oluşumu sırasında damlacık değişimi (122).

Emülsiyonlar, termodinamik olarak kararsız olduklarından, iki karışmaz sıvının etkileşim noktasında emülgatörler (yüzey aktif maddeler) ile eklenmektedir. Hidrofilik-lipofilik denge (HLB) yağ ve suda çözünürlüğü temsil eder ve emülgatörlerin sınıfını belirtmektedir. HLB değerine göre stabilize etmek için her emülsiyona belirli bir emülgatör türü eklenmektedir (66). Ayrıca, belirli bir uygulama için uygun bir yüzey aktif madde seçmenin bir yolunu sağlar. Emülgatörler hem hidrofilik hem de hidrofobik kısımlar içerdiklerinden amfifilik olarak tanımlanabilirler (Şekil 2.6). HLB değerleri 8-14 olan emülgatörler su içinde yağ (O/W) emülsiyonlarını ve 3-6 HLB değerleri yağ içinde su (W/O) emülsiyonlarını tercih edilmektedir (123).Emülgatörlerin HLB değerine bağlı olarak değişimleri Şekil 2.7'de gösterilmiştir.

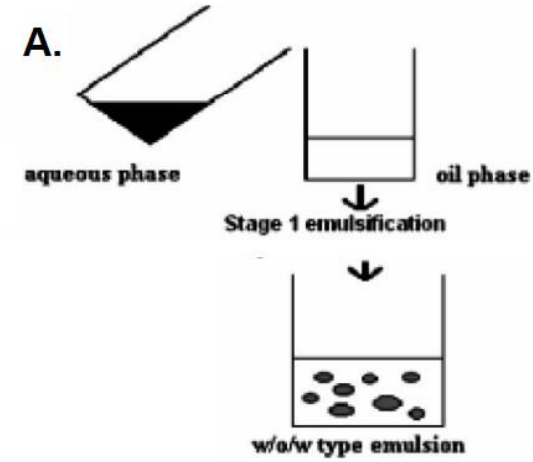


Şekil 2. 2: Emülgatörün hidrofilik ve lipofilik yapısı (124).



Şekil 2. 3: Emülgatörlerin HLB değerine bağlı olarak emülsiyon içinde düzenlenmesi (124).

Emülsiyon hazırlama da birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Emülsiyon tipine göre hazırlama yöntemi değişebilmekte hatta aynı emülsiyon tipi farklı yöntemle de hazırlanmaktadır. W/O/W emülsiyon hazırlamada en çok kullanılan tek basamakta multi emülsiyon hazırlama ve çift basamakta multi emülsiyon hazırlama yöntemleri kullanılmaktadır (Şekil 2.4) (125).



Şekil 2. 4: Tek basamakta çoklu emülsiyon preparasyonunun şematik gösterimi (125).

Geleneksel iki aşamalı prosedür kullanılarak W/O/W emülsiyonlarının ve lipid vezikül süspansiyonlarının hazırlanmasına yönelik bir yöntemi açıklayan bir dizi makale yayınlanmıştır. Çoklu emülsiyonların hazırlanması için bir dizi koşul önerilmektedir (126):

1. W/O/W emülsiyon oluşumunu sağlamak için emülsifikasyonda iki aşamalı bir prosedür gereklidir, yani W/O emülsiyonunu hazırlamak için birinci emülsifikasyonlaştırma ve W/O/W dağılımını tamamlamak için ikinci bir emülsifikasyon işlemi gerektirmektedir.

2. İyi bir W/O/W emülsiyon verimi elde etmek için ikinci emülsifikasyon prosedürü için iyonik olmayan emülgatörler, iyonik olanlara göre daha çok tercih edilir.

3. Birincil W/O emülsiyonu, mekanik çalkalama yoluyla iyonik olmayan emülgatör içeren bir harici sulu faz içinde kolaylıkla dağılır.

Gıda ve farmasötik uygulamalarda çoklu emülsiyonların geliştirilmesine uzun süredir devam eden bir ilgi vardır. İlgi, benzersiz yapılarından kaynaklanmaktadır, çünkü W/O/W emülsiyonları için, dağılmış yağ damlacıklarının kendileri, konuk molekülleri taşımak için kullanılabilen veya genel olarak dağılmış faza katkıda bulunan sulu faz damlacıkları içermektedir. Ancak stabilite zayıflıkları en büyük dezavantajını oluşturmaktadır. Bu durum iç su damlacıklarının varlığından kaynaklanmaktadır (127).

Çift emülsiyonların hazırlanmasında 2 tip emülgatör gereklidir, ilk olarak, birincil, W/O stabilize etmek için yağ fazında çözünen düşük HLB değerine sahip bir

lipofilik emülgatör gerekir. İkinci olarak, stabil bir emülsiyon formülasyonu oluşturmak için yağ damlacıklarını stabilize etmek gerekir (104). Bu sebeple harici sulu fazda bir hidrofilik (yüksek HLB) emülgatör gereklidir. Birincil su damlacıkları, düşük bir HLB emülgatörü gerektirir ve hem diğer damlacıklarla hem de dış sürekli faz ile birleşmeye duyarlıdır (127). W/O/W emülsiyonları ayrıca, iç ve dış su fazları arasındaki ozmotik ve kimyasal potansiyel farkları tarafından yönlendirilen kütle aktarımı yoluyla dış faza su kaybedebilir (128). Su damlacıklarını stabilize etmek için kullanılacak emülgatörlerin, düşük HLB değerine sahip olması ve büyük, sterik bir hidrofobik gruba sahip olması faydalıdır, ancak yalnızca sınırlı sayıda farmasötik onaylı emülgatör bulunmaktadır (104).

Çoklu emülsiyonların veya basit emülsiyonların formülasyonu ile ilgili en büyük problem, bunların genel termodinamik kararsızlığıdır. Bir sıvının damlacıklarının bir diğerinde dağılması, geniş ara yüzey alanı ile ilişkili yüksek bir yüzey serbest enerjisine sahip olmaktadır. Sistem her zaman bu yüksek serbest enerjiyi damlacık birleşmesi ile arayüzey alanını azaltarak düşürme eğiliminde olacaktır (129). 'Kararlılık' terimi genellikle emülsiyonların dağılmış damlacıklarının birleşmesine karşı direnç derecesini ifade eder. Damlacıklar ve sürekli faz arasındaki yoğunluk farklılıkları kremleşmeye neden olur, ancak bu genellikle kararsızlık olarak kabul edilmemektedir. Benzer şekilde, dağılmış parçacıkların topaklanması, damlacıkların birleşmesi olmaması ve damlacıkların hafifçe çalkalanarak kolayca yeniden dağılabilmesi koşuluyla farmasötik olarak genel olarak kabul edilir. Bir emülsiyonun stabilitesinin bir dizi faktöre bağlı olduğu gösterilmiştir: Ara yüzey filminin fiziksel doğası, damlacıklar üzerinde elektriksel veya sterik bir bariyerin varlığı, sürekli fazın viskozitesi, damlacıkların boyut dağılımı, Faz hacmi oranı, sıcaklık (130).

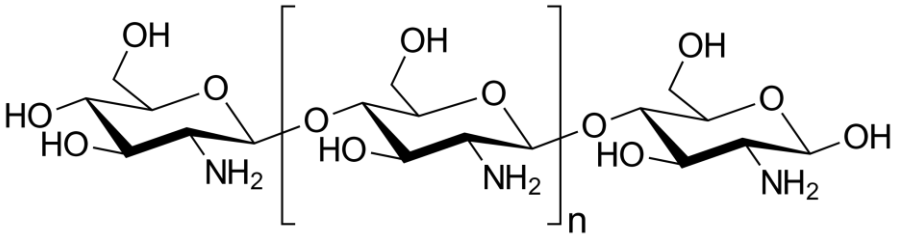
Benzer şekilde, bu faktörlerin de çoklu emülsiyonların stabilitesini etkilemesi beklenir. Emülsiyonların katı partiküller, makromoleküller (proteinler ve polielektrolitler) ve amfifilik bileşikler veya yüzey aktif madde gibi çeşitli maddeler tarafından stabilize edildiği gösterilmiştir (131).

Kararlı bir emülsiyon, dağılmış damlacıkların başlangıç karakterini koruduğu ve arzu edilen raf ömrü boyunca sürekli faz boyunca homojen olarak dağıldığı bir emülsiyon olarak kabul edilir. Depolama sırasında herhangi bir faz değişikliği veya mikrobiyal kontaminasyon olmamalıdır ve emülsiyon koku, renk ve kıvam açısından

stabilitesini korumalıdır (132). Emülsiyon formülasyonlarında hem kimyasal hem de fiziksel kaynaklı kararsızlıklar meydana gelebilir. Emülsiyon stabilitesi, su, yağ ve yüzey aktif maddeler arasındaki dengeye bağlı olan bir kavramdır. W/O/W tipi çoklu emülsiyonlarda kararsızlığın meydana geldiği ana mekanizmalar kapsamlı bir şekilde incelendiğinde aşağıdaki olası mekanizmalar olarak özetlenebilir: Dahili ve çoklu emülsiyon damlacıklarının toplanması, iç damlacıkların yüzeyindeki yağ tabakasının kırılması veya bozulması, içeriğin dış fazda iç damlacıktan sızması, yağ zarı boyunca ozmotik gradyan nedeniyle iç damlaların büzülmesi ve şişmesi, faz ayrımı (133).

2.2.7.2. Kitosan: Biyopolimerler, doğal kaynaklardan elde edilen biyomalzemelerdir. Gıda, biyomedikal ve ilaç sektörlerinde onları yararlı polimerler yapan çeşitli karakterizasyonlara sahip ucuz, doğal olarak bol malzemelerdir. Bazı biyopolimerler, onları etkili adjuvanlar yapan özelliklere sahiptir (134). Adjuvanlar, karşılık gelen antijenlere karşı bağışıklık tepkisini artırarak aşıların etkinliğini değiştirmek veya güçlendirmek için kullanılır. Modern aşılar oluşturmak veya mevcut lisanslı aşıları geliştirmek için kullanılabilirler (135). Esas olarak bitkilerden, hayvanlardan, mantarlardan ve bakterilerden elde edilen, polimerler aşıların ve dağıtım sistemlerinin formülasyonu için tıp biliminde büyük ilgi çekmiştir (136). Bu bileşiklerin birçok avantajı, toksik olmayan yapıları, biyo-uyumlulukları, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri ve antiviral özellikleridir. Şimdiye kadar, bu biyopolimerlerin çok sayıda uygulaması rapor edilmiştir. Bu malzemeler kullanılarak daha güvenli ve etkili aşılar hazırlanır (137). Biyopolimerler, antijenlerin bozulmasını önleyebilir, antijenin stabilitesini geliştirebilir, yavaş salınıma neden olabilir ve bu nedenle, immünojenisiteyi arttırır. Bu doğal makromoleküller farklı virüslere karşı saygın bir engelleme performansı sergiler. Adjuvanlar veya immün güçlendirici maddeler olarak polimerler, immünojenisitenin iyileştirilmesi, ilaçların sürekli salınması ve antijen stabilitesi için faydalıdır (138). Bu polisakkaritler, doğrudan ve dolaylı olarak, viral yaşam döngüsüne müdahale ederek veya vücut bağışıklığını artırarak antiviral etkiler ve aktiviteler sergiler. Bu nedenle, bu bileşiklerin, ortaya çıkan ve pandemik tehditler için bir aşının hazırlanmasında mükemmel bir uygulamaya sahip olması beklenmektedir (139). Polimerler aşı antijenini korur ve depo görevi yaparak antijenin kontrollü salınımını sağlarlar. Polimerik partiküllerin tek doz aşıların ve mukozal aşıların geliştirilmesinde etkili olduğu bidirilmiştir. Klasik adjuvantlarla karşılaştırıldığında toksik olmamaları, biyouyumlu ve biyobozunur olmaları önemli bir avantaj sağlamaktadır (140).

Kitosan ve türevleri, çeşitli preklinik ve klinik çalışmalarda çeşitli enfeksiyonlarda iyi tolere edilebilirlik, mükemmel bağışıklık uyarımı ve pozitif sonuçlarla kullanılmış kitinden türetilen bir polisakkarittir (Şekil 2.10).



Şekil 2. 5: Kitosanın kimyasal yapısı (137).

Kitosan, kabukluların ve böceklerin dış iskeletlerinden elde edilen, toksik olmayan, biyolojik olarak uyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen, doğal bir polisakkarittir ve aşı adjuvanları olarak başarılı kullanımı, nispeten düşük bir maliyetle başarılmıştır. Kitosan ve türevleri hem hücresel bağışıklık tepkisini hem de hümoral bağışıklık (toplam IgG) tepkisini her ikisinde de önemli ölçüde artırmıştır (135). Kitosan ve türevlerinin fonksiyonel bağışıklık tepkisindeki üstünlüğü, adjuvanın doğuştan gelen bağışıklık hücresi alımını ve aktivasyonunu ve Th17 bağışıklık tepkisini indükleyen çok yönlü özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (141). Negatif yüklü hücre zarları ile pozitif yük ve iyonik etkileşimler nedeniyle kitosan, antijen sunan hücreler yoluyla üstün bir alıma neden olur. Şimdiye kadar, antijenleri iletmek ve bağışıklık tepkilerini yükseltmek için bir nano-taşıyıcı olarak test edilmiştir. Ayrıca, adjuvan performansı üç veya daha fazla mekanizma ile açıklanabilir: antijenin yavaş salınımı için bir depo sağlamak, antijenin bağışıklık hücresini hedeflemesini kolaylaştırmak ve fagositozu iyileştirmek, modülasyon ve tek başına antijen tarafından indüklenen bağışıklık tepkisini arttırmak olarak sıralanabilir (139).

Tüm patojenler yerine saf antijenleri kullanan aşılar ve alternatif uygulama yolları, güçlü adjuvanların ve etkili antijen verme sistemlerinin kullanılmasını gerektirir. Kitosanın, dağıtım sistemleri için hem bir adjuvan hem de bir matris görevi gördüğü bildirilmiştir. Ticari olarak temin edilebilir, moleküler ağırlık, deasetilasyon derecesi ve saflık dereceleri farklı olan kitosanlar bulunmaktadır (140). Scherließ ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kitosan özelliklerinin (moleküler ağırlık, deasetilasyon derecesi,

partikül boyutu, viskozite ve safsızlıklar) adjuvan aktivite üzerindeki etkisi incelenmiştir. Farklı saflık derecelerine sahip kitosanların kullanılması bağışıklık tepkisinin derecesinin değiştirebilir, kitosanın immünoadjuvan etkisi moleküler ağırlık gibi kimyasal özellikler arasındaki etkileşimin bir sonucudur. Deasetilasyon derecesi, çözünürlük ve viskozite özelliklerini etkileyen parçacık boyutu ve hazırlama tekniği gibi fiziksel özelliklerinde etkilediği bildirilmiştir. Bu nedenle aşı preparasyonlarında adjuvan olarak kullanılacak kitosan kalitesinin dikkatli seçilmesi gerekmektedir (142).

Khademi ve arkadaşları, tüberküloz (TB) aşısı geliştirmek için yaptığı çalışmadan elde ettikleri sonuçlarda, adjuvan veya dağıtım sistemi olarak kitosan ve türevleri ile kombinasyon halinde kullanıldığında, hayvan modellerinde hem koruyucu hem de hücre aracılı (CD4 ve CD8) bağışıklık tepkilerini güçlü bir şekilde indükleyebileceğini göstermiştir. Ek olarak, TB ile uyarılan farelerde Mtb enfeksiyonuna karşı korumayı arttırmışlardır. Bu çalışmanın sonuçları, kitosan bazlı TB aşılarının parenteral ve parenteral olmayan immünizasyonunun uygun immün tepkileri indükleyebileceğini göstermiştir; bununla birlikte, kitosan polimerlerinin ve mukozal dağıtım yolunun bazı avantajlarına dayanarak, parenteral olmayan aşılamanın kitosan bazlı TB aşıları içinde iyi bir uygulama yolu olabileceğini önermişlerdir (143). Yukarıdaki bilgiler ışığında; ticari veteriner aşılarda yakalanamayan hücresel immün yanıt artışını, kitosan ve türevlerinin yağ bazlı adjuvan sistemlerinde kullanılmasıyla elde edilebileceği düşünülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Adjuvan Sistemi Tasarımında ve Hücre Kültüründe Kullanılacak Gereçler

MCT (Medium chain triglyceride) Oil (Proil Oleo Chemicals, Türkiye), Emülgatör paketleri, Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi (PBS) (Gibco, ABD), Kitosan (Adaga, Naturalya, TNJ; Türkiye), Beher (Isolab, Türkiye), Falcon Tüp (Isolab, Türkiye), Ovalbumin, Tiazolil Mavi Tetrazolyum Bromür (Sigma, ABD), RPMI-1640 (Gibco, ABD), Fötal Sığır Serumu (FBS) (Gibco, ABD), Penisilin/Streptomisin (Gibco, ABD), Cell culture-treated polystyrene- Filtreli kapak T-Flask 75cm2 - 175cm2 (Thermofisher Scientific, ABD), Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi (PBS) (Sigma, ABD), Tripsin-EDTA (%0.25) (Gibco, ABD), DMSO (Sigma, ABD), 6 gözlü transwell pleyti (Nunc, ABD), Tek kullanımlık plastik malzeme (pipet, ependorf, santrifüj tüpü vb.) (Thermofisher Scientific, ABD), Hemositometre (Marienfeld, GmbH, Almanya), FITC kojuge anti-human CD11b (Kat No: 301330) (Biolegend, CA), FITC kojuge anti-human CD163 (Kat No: 333618) (Biolegend, CA), FITC konjuge anti-human CD86 (Kat No: 1F-531-T100) (Exbio, Çek Cumhuriyeti), PE konjuge anti-human (Kat No: 305210) (Biolegend, CA).

3.1.2. Cihazlar

Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (Heidolph, Almanya), Terazi ve Hassas Terazi (Radwag, İngiltere), Homojenizatör (IKA, Almanya), Etüv (Nüve, Türkiye), Buzdolabı (Arçelik, Türkiye), Yoğunluk Cihazı (KEM, Japonya), pH-İletkenlik (Methrom, İsviçre), Santrifüj (Eppendorf AG, Almanya), UV Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific. ABD), Viskozimetre Cihazı (Tanaka, Japonya), Otomatik renk tayin cihazı (Lovibond, Almanya), Refraktometre (KEM,Japonya), Mikroskop ((Zeiss, Almanya), Heracell 240i CO2 İnkübatör (Thermofisher Scientific, ABD), Klas II Laminar Akışlı Kabin (Thermofisher Scientific, ABD), ES-20 Orbital-Shaker İnkübatör (Biosan, Türkiye), BD Accuri C6 Flow Sitometri (BD Biosciences, ABD), ELISA Okuyucu (Thermo Fisher Microplate Reader, ABD), Ters Faz Mikroskop (Zeiss, Almanya), -86°C Dondurucu (Thermo Fisher Scientific, ABD), Derin Dondurucu (Arçelik, Türkiye), +4°C Buzdolabı

(Arçelik, Türkiye), Vorteks Karıştırıcı (ThermoFisher Scientific, ABD), Su Banyosu (Thermo Fisher Scientific, ABD).

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre Kültürü

Araştırmada, laboratuvarımızın stoklarında bulunan ve ATCC'den temin edilen THP-1 insan monosit hücreleri, HEK 293 insan embriyonik böbrek hücreleri ve Raw 264.7 fare makrofaj hücreleri kullanılmıştır. Hücreler, sıvı azottan çıkarılarak 37°C'lik su banyosunda çözülmüş, ardından 5 ml hücre kültürü ortamı ile santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelletleri 12 ml ortamda çözülerek 75 cm²'lik T Flasklara (Şekil 3.2) aktarılmış ve kültür devamlılığı sağlanmıştır. Hücreler, RPMI 1640 (%10 FBS, %0,1 penisilin/streptomisin) besi ortamı içinde +37°C'de CO_2'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücreler haftada iki kez pasajlanarak, logaritmik fazda aktif bir şekilde çoğalan hücreler testlerde kullanılmıştır.

3.2.2. Kitosanın Aktif Dozunun Belirlenmesi

3.2.2.1. MTT: THP-1 monosit hücreleri, HEK 293 ve Raw 264.7 hücreleri üzerinde kitosanın sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla MTT sitotoksisite testi uygulanmıştır.

MTT testinin prensibi, canlı hücrelerdeki mitokondriyal redüktaz aktivitesinin kolorimetrik analizi üzerine kuruludur. Yalnızca canlı hücrelerin mitokondrilerinde tetrazolyum tuzlarının indirgenerek formazan kristallerine dönüşmesi ve renk değişikliği yaratmasıyla kolorimetrik ölçüm sağlanır (Mosmann, 1983). THP-1 monosit, HEK 293 ve Raw 264.7 hücreleri, $1^{x}10^{5}$ hücre/ml yoğunluğunda 96 kuyucuklu pleytlere ekilmiş ve 24 saat inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücrelere 3 farklı kitosan, 3 farklı dozda uygulanmıştır. Dozlar sırasıyla 0.475 mg/ml, 0.2375 mg/ml, 0.11875 mg/ml, 0.0475 mg/ml, 0.00475 mg/ml, 0.000475 mg/ml olarak eklenmiş ve 24, 48 ve 72 saat inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler morfolojik olarak mikroskop altında incelenmiştir. Ardından, hücrelere 20 µl 2,5 mg/ml MTT çözeltisi eklenerek 4 saat inkübatörde tutulmuştur. İnkübasyon sonrasında ortam uzaklaştırılarak oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için 150 µl DMSO eklenmiştir. Formazan

kristalleri tamamen çözündükten sonra, 570 nm dalga boyunda mikropleyt okuyucusu ile absorbans ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak aşağıdaki formülle % canlılık hesaplanmış ve GraphPad Prism 5 programı aracılığı ile IC50 değeri belirlenmiştir.

$$\%\ Canlılık = \frac{madde\ eklenen\ hücrelerin\ absorbans\ değeri}{kontrol\ hücrelerinin\ absorbans\ değeri} \times 100$$

3.2.2.2. Makrofaj polarizayonu: THP-1 monositlerini, M0-THP1 makrofajlarına farklılaştırmak amacıyla 6 gözlü pleytlere $1^{x}10^{6}$ hücre/ml yoğunluğunda ekilmiştir. Hücreler, 48 saat boyunca 30 ng/ml PMA (Sigma, ABD) ile inkübe edilmiştir (Rahal et.al., 2018).

İnkübasyon süresi sonunda hücreler toplanarak anti-human CD11b antikoru ile boyanmış ve Accuri Flow Cytometer cihazı (BD Accuri, C5) kullanılarak analiz edilmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonunda hücrelerin ortamı değiştirilmiş ve hücreler iki kez yıkanmıştır. Hücrelere farklı konsantrasyonlarda kitosan eklenmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücreler tripsinizasyon ile toplanmış ve iki kez PBS ile yıkanmıştır. Toplanan hücreler anti-human CD163 ve anti-human CD86 antikorları ile boyanmış ve Accuri Flow Cytometer cihazı (BD Accuri, C5) kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.2.3. İstatistiksel analizler: Her test üç kere tekrar edilmiş ve sonuçlar, Excel kullanılarak hesaplanan ortalaması ve standart sapması ile birlikte raporlanmıştır.

İstatistiksel anlamlılık, GraphPad Prism yazılımıyla Ordinary one-way ANOVA ve Unpaired t-test kullanılarak değerlendirilmiştir. Değerlerin anlamlılığı,p değerine bakılarak yorumlanmıştır. $p<0.05$ değerini sağlayan sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuş ve yıldızla işaretlenmiştir.

3.2.3. Kitosan Çözeltisinin Hazırlanması

Ultra saf su içinde %1'lik TNJ (Kitosan T) ve Naturalya (Kitosan N) şirketlerinden temin edilen kitosan manyetik karıştıcı ile karıştırılarak çözdürülür. Adaga markalı kitosan (Kitosan A) ise %1'lik asetik asitte çözdürülerek hazırlanmıştır. Düşük

olan pH'lar Sodyum Hidroksit ile 6.5- 7 aralığına çekilmiştir. Bu basamak emülsiyon stabilitesi için önem arz etmekedir.

3.2.4. W/O/W Emülsiyon Formülasyonu ve Hazırlanması

3.2.4.1. Adjuvan sistemlerinin hazırlanması: Adjuvanlar, antijenler giderek daha fazla saflaştıkça aşıların etkinliğinde daha önemli bir rol oynar.

Rekombinant proteinler veya sentetik peptitler, ham inaktive edilmiş mikroorganizmalardan daha güvenlidir, ancak daha az immünojeniktir. Bu, belirli adjuvanlarla dengelenebilir. Ancak evrensel bir adjuvan yoktur ve etkileri henüz net değildir ve farklı mekanizmalara dayanır (40). Daha sonra, hedef türler, antijenler, bağışıklık tepkisinin türü, aşılama yolu veya bağışıklık süresi gibi çeşitli kriterlere göre adapte edilmelidirler. Bu amaçla farklı tipte emülsiyonlar geliştirilmiştir. İn vitro antijen salımı ve in vivo immünojenisite, en hızlı *in vitro* salıverme ve en düşük immünojenisiteye sahip O/W emülsiyonlar ile, ardından W/O/W ve en yavaş antijen salımı ve en yüksek immünojenisiteye sahip W/O ile ilişkilidir (144). Kullanılan yağ, damlacık boyutu ve yağın suya oranı, antijenin immünojenisitesini ve lokal tolere edilebilirliğini etkilemiştir. Bu emülsiyonlardan biri olan su içinde yağ içinde su (W/O/W) emülsiyonları, çeşitli antijenler ile kısa ve uzun vadeli immün yanıtları indükleyebilme özelliklerine sahiptir (95).

Su içinde yağ içinde su tipi çoklu emülsiyonlar (W/O/W emülsiyonları), dahili bir sulu faz içeren yağ damlacıklarının harici bir sulu faz içinde dağıldığı üç fazlı sistemlerdir (125,145). İlk olarak, Herbert tarafından geliştirilen çok fazlı emülsiyonlar, aşı formülasyonunun üretimini zorlaştıran iki aşamalı bir işlemde yapılmaktadır. Ayrıca, emülsiyonun stabilitesi de çok iyi değildir. Bu nedenle, kararlı, akışkan ve kullanımı kolay çift emülsiyonlar veren tek adımlı emülsifikasyon işlemi geliştirilmiştir. Bu emülsiyonların çekici kılan, düşük viskoziteleri ve kısa ve uzun vadeli bağışıklık tepkisini geliştirme yetenekleridir (146). Harici sulu fazdaki antijen, sulu formülasyonlar gibi bağışıklık sistemine anında salınırken, dahili sulu fazdaki antijen, yağ içinde su emülsiyonları gibi yavaşça salınır. Şap hastalığında, bu formülasyon aşılamadan sadece 4 gün sonra domuzları ve sığırları hastalığa karşı koruyabilir. Salgın durumunda çok faydalı olabilir. Ancak, çok fazlı emülsiyonlar aynı zamanda uzun süreli bağışıklığı indükleyebilir ve sadece bir aşılamadan sonra 1 yıl boyunca sığırları hemorajik

septisemiye karşı koruyabilir (95). Domuzlar için mineral yağ bazlı olanlar tavsiye edilir, ancak reaktif antijenler ile besi domuzlarının aşılanmasından kaçınılması tercih edilir, çünkü karkas lekesine neden olabilir. W/O/W emülsiyonları genellikle hümoral bağışıklık tepkisini arttırır. Farelerin çeşitli emülsiyon tiplerinde formüle edilmiş bir rekombinant adenovirüs ile aşılandığı karşılaştırmalı bir çalışma, mineral yağ bazlı W/O/W emülsiyonunun IL6 sitokini indükleyebilen ve en iyi korumayı sağlayan tek emülsiyon tipi olduğunu göstermiştir (98).

W/O/W emülsiyonlarının stabilitesi için hem lipofilik hem de hidrofilik emülgatörler gereklidir. Çoğu veteriner aşısı, lipofilik emülgatör olarak mannid monooleat (MMO) içermektedir. Hidrofilik emülgatörler genellikle polisorbat80, polisorbat 85 veya polisorbat 20 içermektedir. Emülsiyonlarda parçacık boyutu dağılımının, emülsiyon stabilitesini önemli ölçüde etkileyebilecek bir parametre olduğu bilinmektedir. Parçacık boyutunu ve dağılımını azaltmak, faz ayrımını önleyen daha iyi emülsiyon kararlılığı sağlar. Zhou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farklı miktarlarda hidrofilik emülgatör kullanımının parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımını etkilediği gözlenmiştir (147). Ağırlıkça %11 ve 19'a sahip numunelerin daha büyük partikül boyutları ve daha geniş dağılımlara sahip bir çift pik gösterdiği, ağırlıkça %13, 15 ve 17'lik numunelerin ise daha küçük partikül boyutlarına ve daha dar bir partikül boyutu dağılımına sahip tek bir pik gösterdiği bulundu. Parçacık boyutu dağılımı tek tip olduğunda, emülsiyon stabilitesi iyileşmektedir. Bununla birlikte, fiziksel stabilite sınırlıdır ve sadece özel polimerik tip emülgatörlerin kullanımıyla korunabilir (96).

Emülgatör sistemlerini modüle ederek çoklu emülsiyonları stabilize etmek için çeşitli girişimlerde bulunulmuştur. Stabil emülsiyon hazırlamak için gerekli HLB'ye sahip uygun bir yüzey aktif madde kullanılır. Emülgatörler, mekanik veya elektriksel arayüzey bariyer oluşumu veya arayüz geriliminin azaltılması veya her ikisi yoluyla emülsiyonları stabilize eder (148). Uzun vadeli emülsiyon stabilitesi için mekanik bariyerin gücü, arayüzey geriliminden daha önemlidir. Bu nedenle, belirli bir çoklu emülsiyon sistemi için optimal bir HLB, birincil ve ikincil emülgatörlerin konsantrasyonuna bağlıdır. Yüzey aktif maddenin tipi ve konsantrasyonu stabiliteyi etkileyen birincil faktörlerdir, pH ve iyonik güç ise emülsiyonların stabilitesini önemsiz derecede etkiler (149).

Yağ bazlı adjuvanların gelişimi gün geçtikçe hızlı bir şekilde artmaktadır. Yapılan literatür araştırmalarından birçok farklı emülgatörün farklı oranlarda kullanıldığı

görülmektedir. Yapılan literatür taraması sonucunda W/O/W emülsiyonlarında kullanılan farklı emülgatörler ve miktarları hakkında edinilen bilgiler detaylı olarak Tablo 2.5'te verilmiştir (150).

Tablo 2. 6: Literatür taraması sonucunda yağ bazlı adjuvanların formülasyonlarında kullanılan farklı emülgatörler ve kullanım oranları.

Emülgatör adı	**Formülasyon içerisinde kullanım yüzdesi**	**Kaynak**
polyoxyethylene dehydrated mannitol mono oleate (PDMMO)	%11-19 wt (5 farklı emülgatörün toplam oranı)	(147)
mannide monooleate (MMO)	%11-19 wt (5 farklı emülgatörün toplam oranı)	(147)
Arlacel P135	%0.5 (w/w)	(96)
Tween 80	%0.2 (w/v)	(96)
Span 80	%6 (w/w)	(151)
PEG 400 DO	%4 (w/w)	(152)
Brij 30	%2 (w/w)	(152)
EL360	%1 (w/w)	(152)
Arlacel 83	%6.55 (w/w)	(153)
Tween 40	%0.95 (w/w)	(153)
Span 83	% 0.1 – 20 (w/v)	(154)
Span 80	% 5-15 (w/w)	(155)
Tween 80	% 3-5 (w/w)	(155)
Sorbitan Sesquioleate	%0.2-5 (w/w)	(156)
POE (10) hydrogenated castor oil	% 5 (w/w)	(156)
POE (10) hydrogenated castor oil	% 5 (w/w)	(156)

Su içinde yağ içinde su emülsiyonu, yağ fazı olarak non-mineral yağ ve emülgatör paketleri kullanarak oluşturulmuştur. Yağ ve emülgatörler 500 rpm'de mekanik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Homojen hale geldiğinde %1'lik olarak hazırlanan stok kitosan çözeltisinden 1 ml alınarak, karışan yağ formülasyonuna damla damla eklenmiştir. Hazırlanan karışım, 30 dk 500 rpm'de mekanik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Emülsifikasyon işlemi için; hazırlanan karışım ve PBS 50-gram olacak şekilde tartılmıştır. 714 rpm'de karıştırılan yağ formülasyonun üstüne, saf su yavaş yavaş eklenir ve 10 dk karıştırılarak emülsiye edilmiştir.

3.2.4.2. Emülsiyon tipi analizi: Damla testi yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

Bu testte, bir beherde bulunan su yüzeyine bir damla emülsiyon bırakılmıştır. Sonrasında, damla davranışına uygun olarak emülsiyon tipi belirlenmiştir:

- Eğer damla hızlıca suda çözünüyor ise emülsiyonun O/W tipi olduğuna karar verilmiştir.
- Eğer damla sadece yuvarlak hareketlerle çevrildiğinde çözünüyor ve işem durdurulduğunda yüzeyde beyaz emülsiyon kalıyor ise emülsiyonun W/O/W tipi olduğu sonucuna varılmıştır.
- Eğer damla karıştırma sonrasında yüzeyde kalıyor ve su fazı berrak olarak görünüyor ise, emülsiyon tipinin W/O/W olduğu tespit edilmiştir.

3.2.5. Adjuvan Sistemlerinin Fizikokimyasal Testlerinin Yapılması

3.2.5.1. Sabunlaşma indisi analizleri: 1-gram numunenin reaksiyona gireceği baz miktarını gösterir. Adjuvan formülasyonu bir behere tartılmıştır.

Behere 25 ml ± 1 ml metiletilketon ve ardından 25 ml ± 0.03 ml alkollü KOH çözeltisi eklenmiştir. Beher bir kondensere bağlanmış ve geri akış başladıktan sonra 30 dakika boyunca ısıtılmıştır. 30 dakika sonunda, kondensere dikkatlice 50 ml petrol eteri eklenmiştir. Üç damla fenolftalein indikatörü eklenmiş ve ardından 0,5 N HCl ile (ASTM D94) titre edilmiştir. Rengin pembeden beyaza dönüştüğü andaki tüketim miktarı, sabunlaşma indeksini hesaplamak için aşağıdaki Formül 3.1 kullanılarak belirlenmiştir.

Formül 3.1. Sabunlaşma İndisi

$SV = 56,1 * M * (V1 – V2) / W$

SV: Sabunlaşma değeri

M: hidroklorik asidin molaritesi

V1: körün titre edilmesinde kullanılan asit hacmi, (ml)

V2: örneğin titre edilmesinde kullanılan asit hacmi, (ml)

W: örnek (g)

56,1: KOH'nin moleküler ağırlığı

3.2.5.2. Viskozite analizleri: Adjuvan formülasyonu kinematik viskozitesi, 40°C ve 100°C'de otomatik bir viskozimetre cihazı (Tanaka, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Bu işlem için, sabit sıcaklıkta tutulan cihazın kılcal cam tüpüne yaklaşık 15 ml adjuvan formülasyonu yerleştirilmiştir. Cihaz, kılcal borudan geçiş süresini otomatik olarak ölçerek, belirtilen sıcaklıklarda viskoziteyi bu süreye göre hesaplamıştır (ASTM D445).

3.2.5.3. Su içeriği analizi: Formülasyondaki su miktarını ölçmek için Karl Fischer titrasyonu kullanılmıştır. Uygun miktarda ürün şırıngaya alınmış ve 0.0001-gram hassasiyetinde hassas terazide tartılmıştır. Tartım sonucu cihaza kaydedildikten sonra numune titrasyon hücresine yüklenmiştir. Şırınganın boş ağırlığı ölçülüp cihaza kaydedilerek titrasyon işlemi yapılmıştır. Titrasyon tamamlandığında cihaz, sonucu otomatik olarak vermiştir (ASTM D6304).

3.2.5.4. Toplam asit sayısı analizi: Adjuvan formülasyonu, titrasyon beheri kullanılarak uygun miktarda tartılmıştır. Tartılan numunenin üzerine, %0,5 su, %49,5 susuz propan-2-ol ve %50 toluen içeren 50 ml titrasyon çözücüsü eklenmiştir. Numune, cihazda 0.1 M KOH ile titrasyona başlanacak şekilde yerleştirilmiştir. Cihaz, titrasyon işlemi tamamlandıktan sonra (ASTM D664) toplam asit sayısını (mg KOH/gr) otomatik olarak belirlemektedir.

3.2.5.5. Kırma indisi analizi (25ºC): Şeffaf ve açık renkli hidrokarbonların kırılma indisi değeri, 20°C ile 30°C sıcaklık aralıklarında, 1.3300 ve 1.7000 değerleri arasında dört basamaklı olarak ölçülmüştür. Bu ölçümler, otomatik Refraktometre (KEM, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (ASTM D1218).

3.2.5.6. Saybolt renk analizi: Ölçümler, otomatik renk tayin cihazı (Lovibond, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cihaza referans ölçümü yapıldıktan sonra numune yerleştirilmiş ve ölçüm tamamlandıktan sonra değerler kaydedilmiştir (ASTM D6045).

3.2.5.7. Yoğunluk analizi (20ºC): Yoğunluk analizi, yoğunluk ölçüm cihazı (KEM, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cihaza eklenecek numunenin içinde hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek, cihazın numune giriş bölümünden yüklenmiştir. Hücre içerisindeki numune sıcaklığı sabit hale geldiğinde numuneye ait yoğunluk değeri ekrandan okunmuştur (ASTM D4052).

3.2.6. Stabilite Testlerinin Gerçekleştirilmesi

Stabilite için uygulanan testler, ICH Harmonised Tripartite Guideline Q1A(R2) standartlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda hazırlanan formülasyonlar, 4˚C, 24˚C ve 37˚C'de bir ay boyunca stabilite testine tabi tutulmuş ve 48 saat aralıklarla ölçülmüştür.

Stabilite testlerinde belirli kriterler dikkate alınmıştır:

- Oda sıcaklığında ve 4˚C'de su ayrışması veya %10'dan fazla yağ ayrışması tespit edilmemişse,
- 37˚C'de %20'den fazla yağ ayrışması gözlenmemişse,

Bu koşullar, emülsiyonun stabil olduğunu ve standartlara uygun olduğunu gösterir ve kabul edilir.

3.2.7. Parçacık Boyutu ve Zeta Potansiyeli Ölçümleri

Formülasyonun parçacık boyutu ve zeta potansiyeli DLS ışık saçılım cihazı Malvern Zetasizer (Malvern Panalytical, İngiltere) ile ölçülmüştür. Formülasyon, ultra saf su ile seyreltilmesinin ardından ölçüm küvetine ve zeta potansiyel ölçüm küvetine konularak ölçülmüştür.

3.2.8. Adjuvan Sistemlerinin *İn Vitro* Analizlerinin Gerçekleştirilmesi

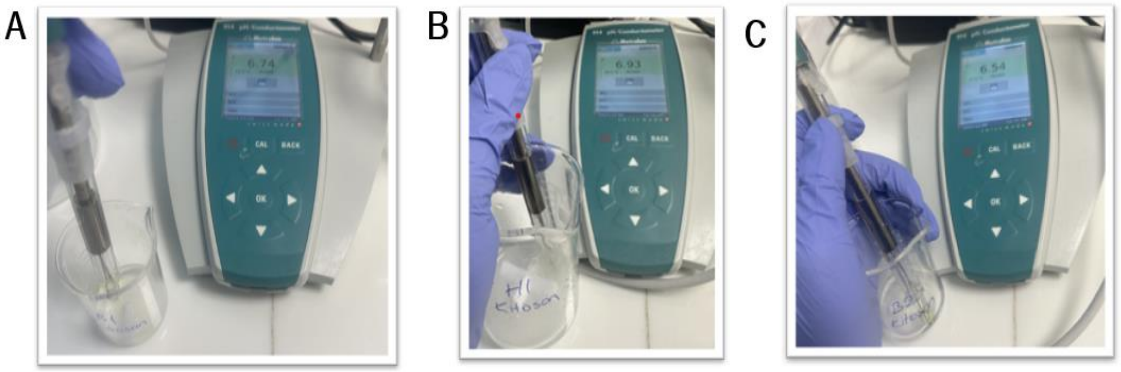
Hazırlanan yağ formülasyonu ve %1'lik stok kitosan çözeltileri otoklavlanarak steril edilmiştir. Emülsifikasyon işlemi ise biyogüvenlik kabininde gerçekleştirilmiştir. Emülsiyon 100 µg/ml OVA ile aseptik koşullar altında hazırlanmıştır. Makrofaj

polarizasyonu analizi, 3.2.2.2. makrofaj polarizayonu başlığı altında açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Emülsiyon eklenen hücreler, 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücreler tripsinizasyon ile toplanmış ve iki kez PBS ile yıkanmıştır. Toplanan hücreler anti-human CD163 ve anti-human CD86 antikorları ile boyanmış ve Accuri Flow Cytometer cihazı (BD Accuri, C5) kullanılarak analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. KİTOSANIN AKTİF DOZUNUN BELİRLENMESİ

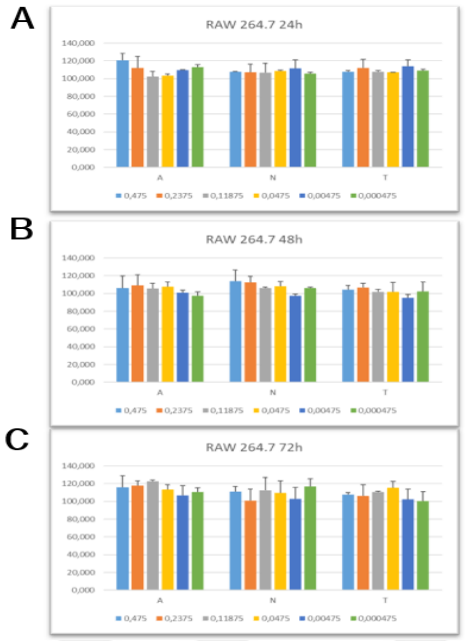
%1'llik olarak hazırlanan kitosan A, kitosan T, kitosan N solüsyonularının pH'ları 6.5-7 aralığına getirilmiştir. Kitosan A'nın pH: 6.74, Kitosan N'nın pH: 6.93, Kitosan A'nın pH: 6.54 olarak ölçülmüştür. Bu sonuç, kitosan solüsyonunun adjuvanın içine ve tek başına solüsyon olarak *in vitro* denemelerde kullanımına uygun bulunmuştur.



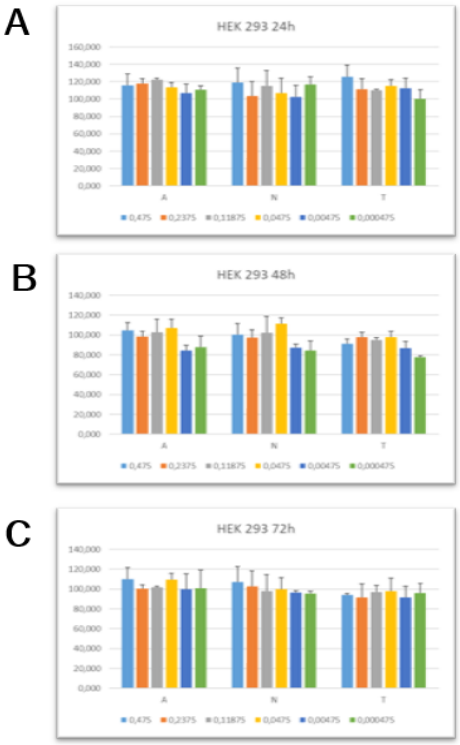
Şekil 4. 1: Kitosan çözeltilerinin pH ölçüm Sonuçları (A): Kitosan A, (B) Kitosan T, (C): Kitosan N

4.1.1. Hücre Canlılığı Analizleri

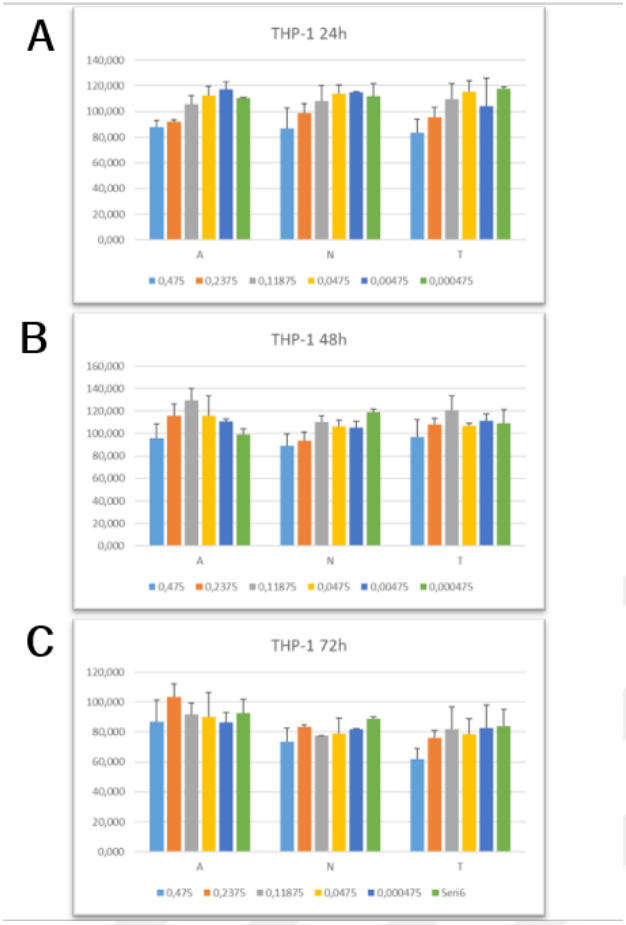
Raw 264.7, HEK 293, THP-1 hücrelerinde Kitosan A, Kitosan N, Kitosan T sırasıyla 0.475 mg/ml, 0.2375 mg/ml, 0.11875 mg/ml, 0.0475 mg/ml, 0.00475 mg/ml, 0.000475 mg/ml dozları uygulanmıştır. Raw 264.7 hücre hattında gerçekleştirilen sitotoksisite sonuçları Şekil 4.2'de; HEK 293 hücre hattında gerçekleştirilen sitotoksisite sonuçları Şekil 4.3'te; THP-1 hücrelerinde gerçekleştirilen sitotoksisite sonuçları ise Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4. 2: Raw 264.7 hücre hattı sitotoksisite sonuçları (A): 24 saat sonuçları, (B): 48 saat sonuçları, (C): 72 saat sonuçları

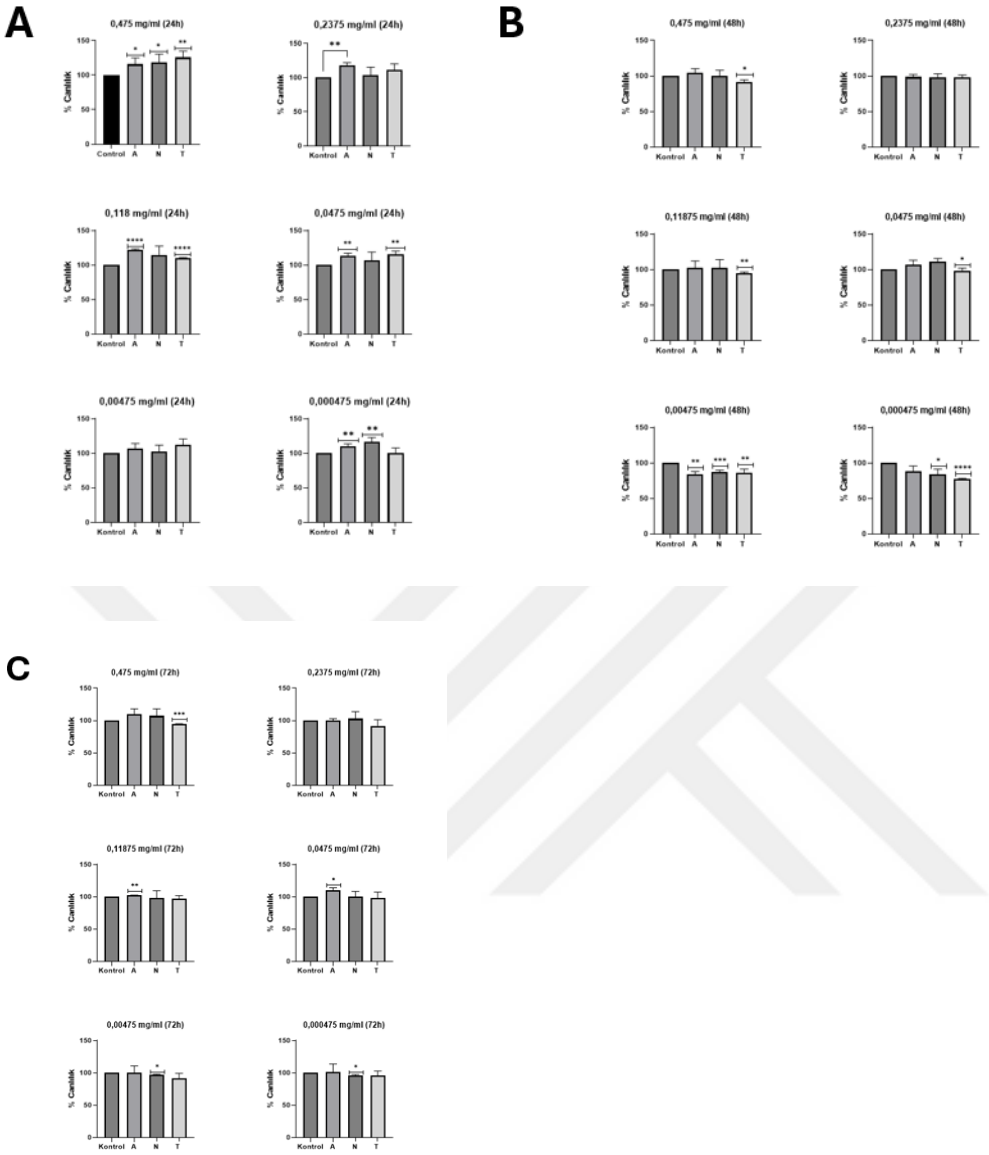


Şekil 4. 3: HEK 293 hücre hattı sitotoksisite sonuçları (A): 24 saat sonuçları, (B): 48 saat sonuçları, (C): 72 saat sonuçları



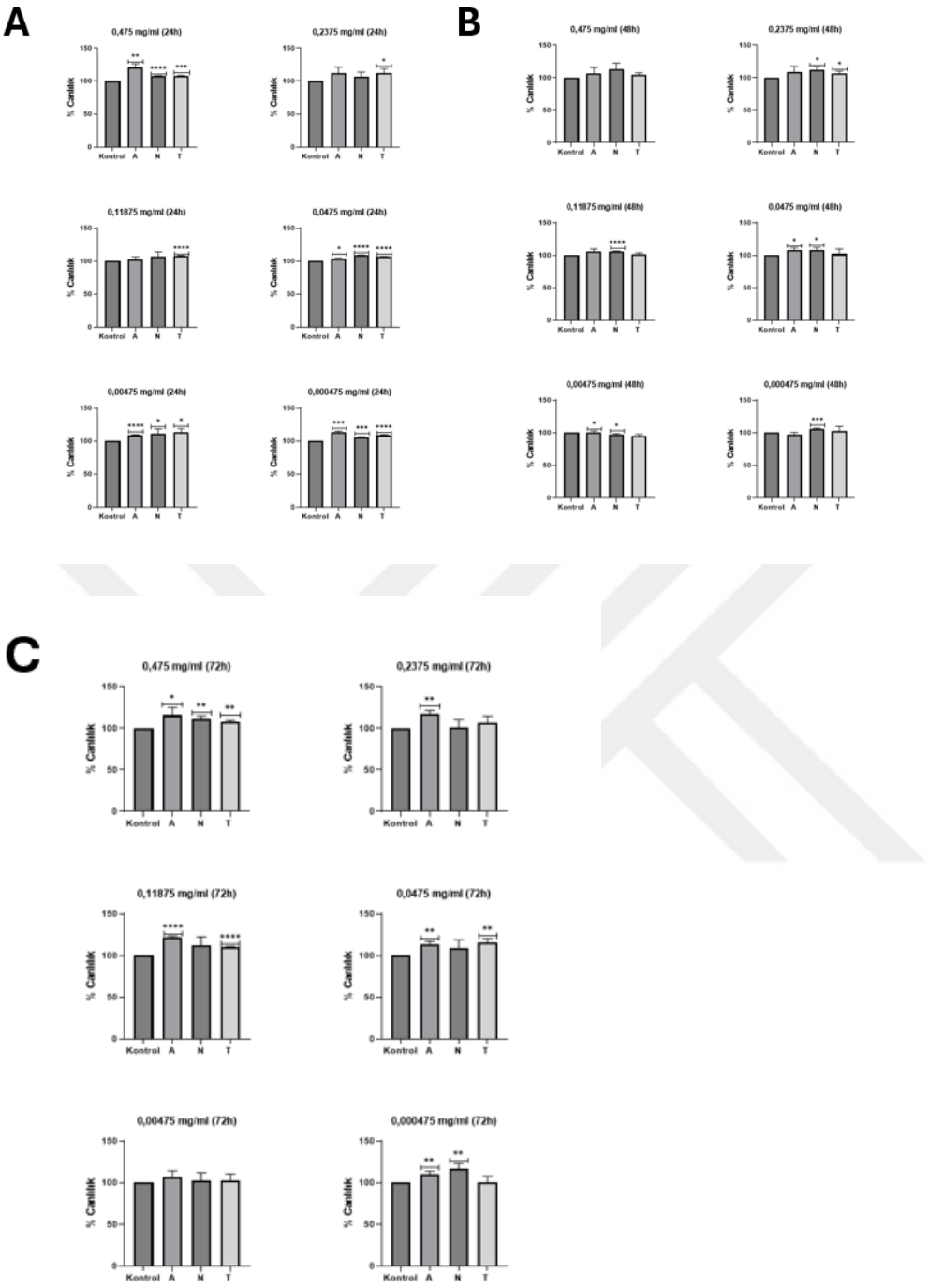
Şekil 4. 4: THP-1 hücre hattı sitotoksisite sonuçları (A): 24 saat sonuçları, (B): 48 saat sonuçları, (C): 72 saat sonuçları

Yüzde canlılık değerleri kullanılarak Raw 264.7, HEK 293, THP-1 hücrelerinde Kitosan A, Kitosan N, Kitosan T sırasıyla 0.475 mg/ml, 0.2375 mg/ml, 0.11875 mg/ml, 0.0475 mg/ml, 0.00475 mg/ml, 0.000475 mg/ml dozları uygulanmıştır. THP-1 hücrelerinde hücre canlılığı %50 ve altına düşmediğinden IC50 değerleri hesaplanamamıştır. Kitosanların hiçbirinin sitotoksik etkisi bulunmamaktadır. THP-1 hücrelerinde, yapılan doz uygulamalarında hücre canlılığı %50 ve altına düşmediğinden IC50 değerleri hesaplanamamıştır. Bu sonuçlar, Kitosanların sitotoksik etkisinin olmadığını göstermektedir.



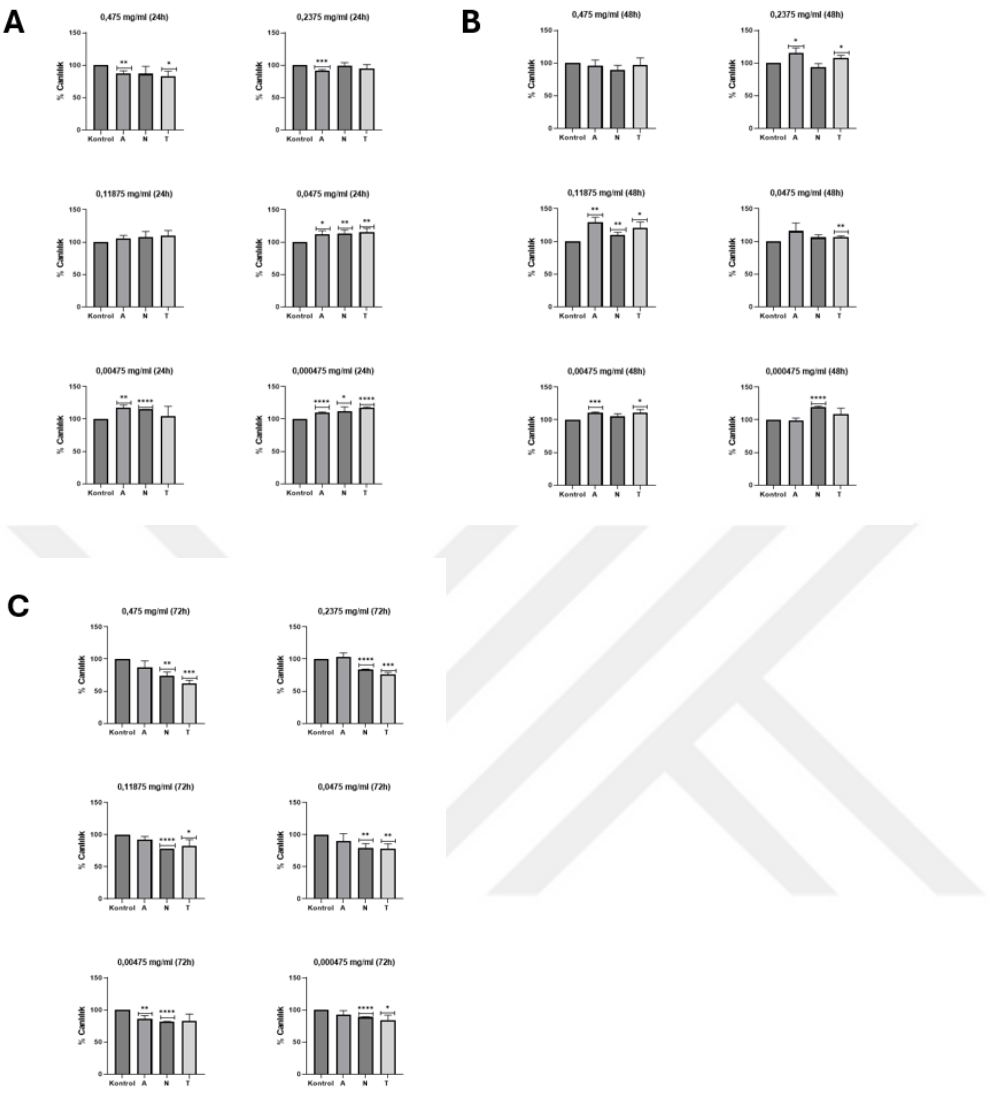
Şekil 4. 5: Kitosan A, kitosan B ve kitosan T dozlarının HEK 293 hücrelerinde istatistiksel analiz grafikleri (A): 24 saat, (B): 48 saat, (C): 72 saat sonuçları.

Not: '*' ile gösterilen değerler, p < 0.05 seviyesinde kontrole kıyasla istatistiksel anlamda farklılık göstermektedir. ****p<0. 0001; ***p<0. 001; **p<;0.01; p<0.05.



Şekil 4. 6: Kitosan A, kitosan B ve kitosan T dozlarının Raw 264.7 hücrelerinde istatistiksel analiz grafikleri (A): 24 saat, (B): 48 saat, (C): 72 saat sonuçları.

Not: '*' ile gösterilen değerler, p < 0.05 seviyesinde kontrole kıyasla istatistiksel anlamda farklılık göstermektedir. ****p<0. 0001; ***p<0. 001; **p<;0.01; p<0.05.



Şekil 4. 7: Kitosan A, kitosan B ve kitosan T dozlarının THP-1 hücrelerinde istatistiksel analiz grafikleri (A): 24 saat, (B): 48 saat, (C): 72 saat sonuçları.

Not: '*' ile gösterilen değerler, p < 0.05 seviyesinde kontrole kıyasla istatistiksel anlamda farklılık göstermektedir. ****p<0. 0001; ***p<0. 001; **p<;0.01; p<0.05.

Çalışılan tüm kitosan gruplarında kontrol grubuna göre canlılıklar arasında istatistiksel anlamlılık bulunmuştur. İstatistiksel analiz grafikleri, Şekil 4.5; Şekil 4.6; Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Anlamlılık '*' simgesi ile gösterilmiştir. Sonuçlar anlamlı olmasına rağmen hiçbir dozda ve sürede canlılık %50'nin altına düşmemiştir. Bu nedenle IC50 değeri hesaplanamamıştır ve kitosanların sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir.

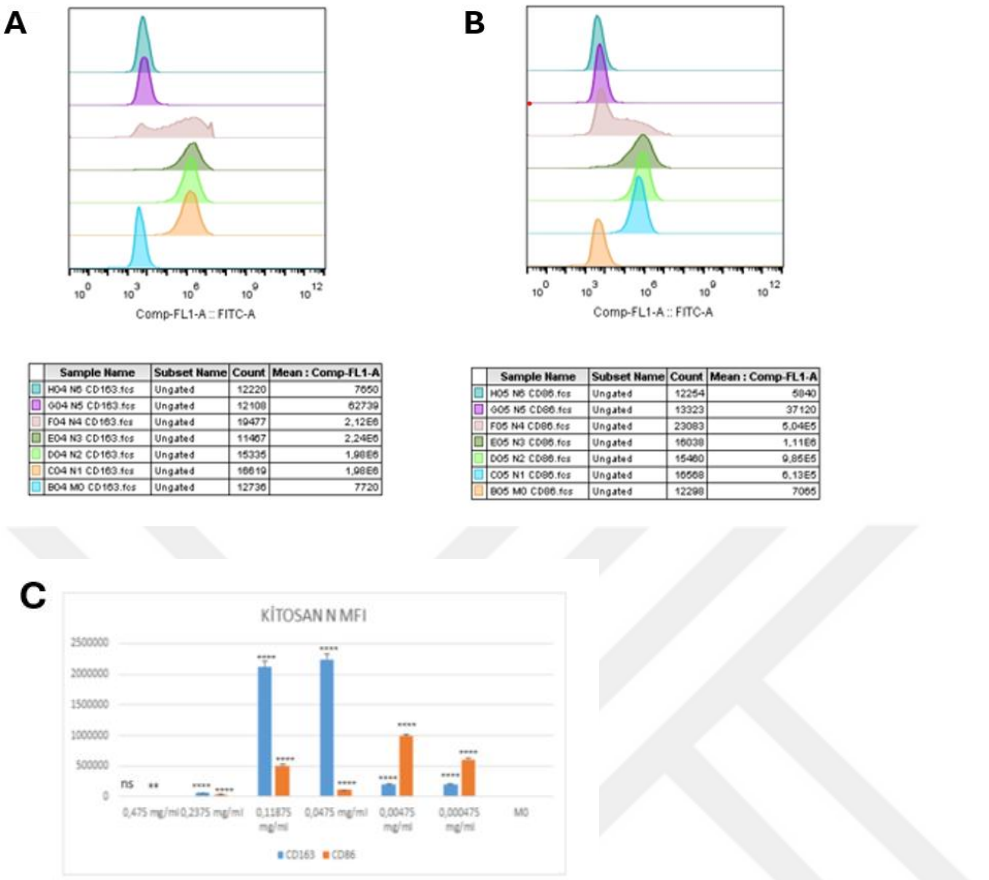
4.1.2. Makrofaj Polarizayonu Analizleri

Makrofajlar, immün sistemde antijen sunumunda kritik bir rol oynadıklarından, makrofaj polarizasyonu hücresel yanıtların değerlendirilmesinde model olarak kullanılmaktadır. Makrofajlar, M1 ve M2 olmak üzere iki ana gruba ayrılır. M1 polarize makrofajlar pro-enflamatuvar olup, fagositozda etkilidirler. Bu makrofajlar, Th1 yanıtını indükleyerek patojenlerin yok edilmesinde ve inflamatuvar süreçlerin başlatılmasında önemli rol oynarlar. M2 polarize makrofajlar ise anti-enflamatuvar özelliklere sahip olup, doku iyileşmesi ve rejenerasyon süreçlerinde yer alırlar. Bu makrofajlar Th2 yanıtını indüklerler ve böylece inflamasyonun çözülmesine ve doku onarımına katkıda bulunurlar.

Hücresel immün yanıtın ilk basamağı olan antijen sunumunda, M1 polarize makrofajların belirgin bir markörü olan CD86'nın artışı, Th1 yanıtının oluştuğunun bir göstergesi olarak yorumlanabilir. Benzer şekilde, M2 polarize makrofajların belirgin bir markörü olan CD163'ün artışı, Th2 yanıtının geliştiğini gösterir. Bu markörlerin izlenmesi, immün yanıtın yönü ve doğası hakkında değerli bilgiler sağlayarak, hastalıkların patofizyolojisinin anlaşılmasına ve potansiyel tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

MFI değerleri (Mean Fluorescence Intensity- Ortalama Floresan Yoğunluğu), makrofaj polarizasyonunun değerlendirilmesinde kritik bir parametredir. Yüzey markırlarının ekspresyon yoğunluğunu, sitokin ve kemokin üretim seviyelerini, fonksiyonel aktiviteyi ve polarizasyon dinamiklerini ölçerek, makrofajların hangi fenotipe daha fazla yöneldiğini ve bu süreçte nasıl davrandıklarını belirlemeye yardımcı olur.

Bu bağlamda, makrofaj polarizasyonunun ve ilgili hücresel yanıtların doğru bir şekilde değerlendirilmesi, immün sistemin dinamiklerinin anlaşılması ve ilgili klinik müdahalelerin optimize edilmesi için kritik öneme sahiptir.

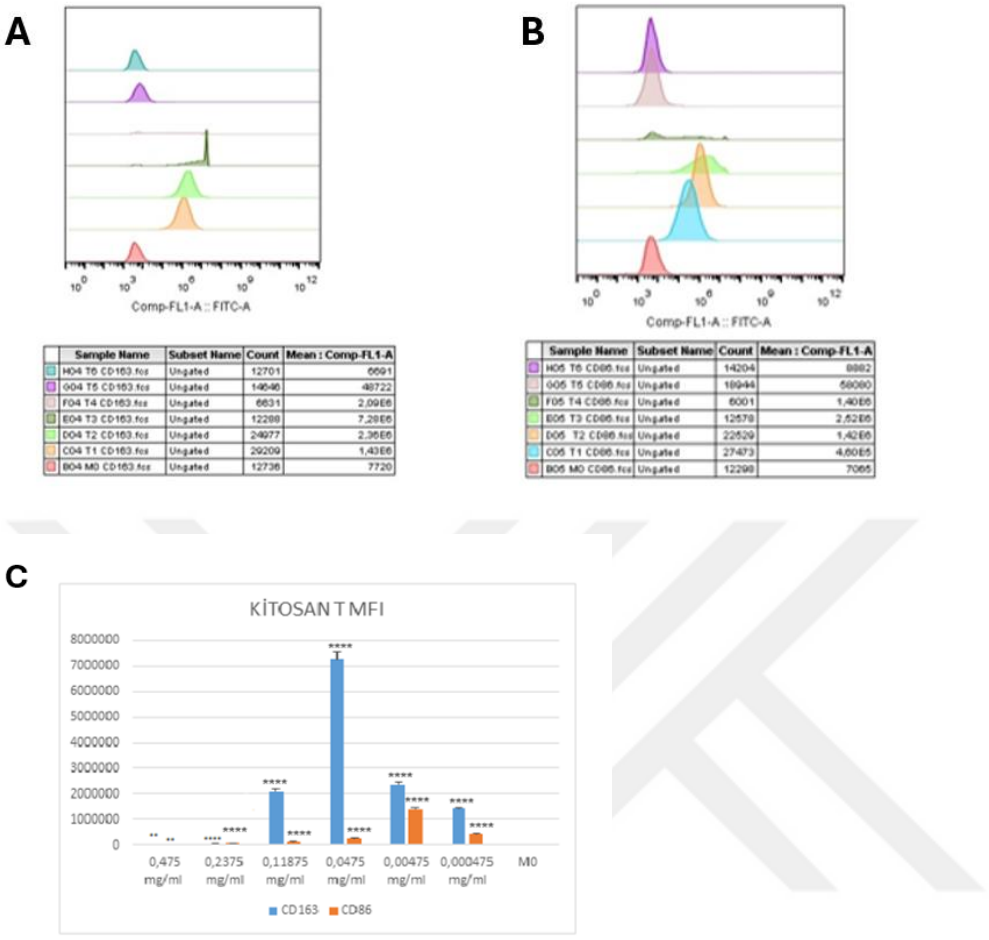


Sample Name	Subset Name	Count	Mean : Comp-FL1-A
H04 N5 CD163.fcs	Ungated	12220	7650
G04 N5 CD163.fcs	Ungated	12108	62739
F04 N4 CD163.fcs	Ungated	19477	2,12E6
E04 N3 CD163.fcs	Ungated	11467	2,24E6
D04 N2 CD163.fcs	Ungated	15335	1,98E6
C04 N1 CD163.fcs	Ungated	16619	1,98E6
B04 M0 CD163.fcs	Ungated	12736	7720

Sample Name	Subset Name	Count	Mean : Comp-FL1-A
H05 N5 CD86.fcs	Ungated	12254	5840
G05 N5 CD86.fcs	Ungated	13323	37120
F05 N4 CD86.fcs	Ungated	23083	5,04E5
E05 N3 CD86.fcs	Ungated	16038	1,11E6
D05 N2 CD86.fcs	Ungated	15460	9,85E5
C05 N1 CD86.fcs	Ungated	16568	6,13E5
B05 M0 CD86.fcs	Ungated	12298	7065

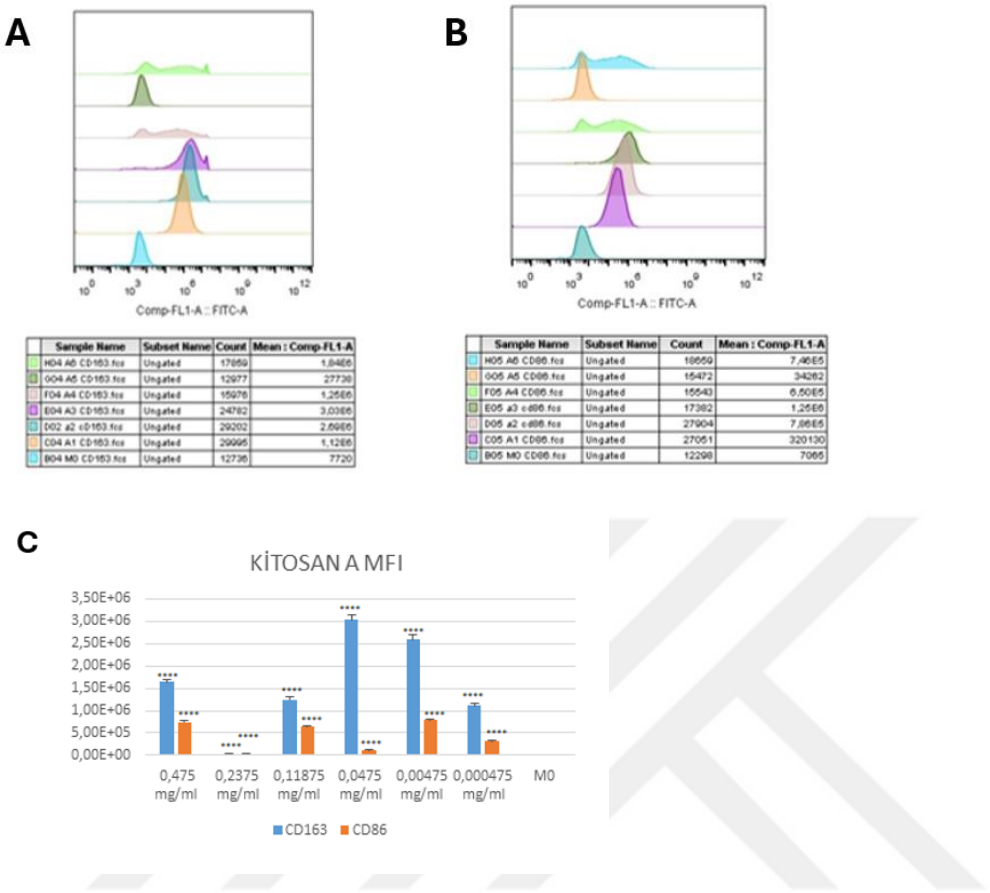
Şekil 4. 8: Kitosan N makrofaj polarizasyonu ölçümleri, (A): Kitosan N'nin THP-1 hücrelerinde CD163 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği (B): Kitosan N'nin THP-1 hücrelerinde CD86 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği (C): Kitosan N'nin MFI değerleri.

Makrofaj polarizasyonu testlerinin sonuçları, Kitosan N ile uyarılan hücrelerde hem CD86 hem de CD163 yanıtlarının arttığını göstermiştir. Bu bulgular, Kitosan N'nin makrofajların pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar durumlar arasında denge kurmasını sağladığını işaret etmektedir. Zamana bağlı olarak CD86 ve CD163 ekspresyonunun artması, bu hücrelerin çevresel değişikliklere uyum sağladığını ve esnek bir bağışıklık yanıtı geliştirdiğini göstermektedir.



Şekil 4. 9: Kitosan T makrofaj polarizasyonu ölçümleri, (A): Kitosan T'nin THP-1 hücrelerinde CD163 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği (B): Kitosan T'nin THP-1 hücrelerinde CD86 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği (C): Kitosan T'nin MFI değerleri.

Kitosan T ile yapılan makrofaj polarizasyon testleri, hücrelerde hem CD86 hem de CD163 yanıtlarının artışını ortaya koymuştur. Bu durum, Kitosan T'nin makrofajların iki farklı aktivasyon durumu arasında geçiş yapmasını kolaylaştırdığını göstermektedir. Zaman içerisinde CD86 ve CD163 ekspresyonunda gözlenen artış, hücrelerin çevresel uyaranlara adapte olduğunu ve karmaşık bir bağışıklık yanıtı sergilediğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4. 10: Kitosan A makrofaj polarizasyonu ölçümleri, (A): Kitosan A'nın THP-1 hücrelerinde CD163 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği (B): Kitosan A'nın THP-1 hücrelerinde CD86 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği (C): Kitosan A'nın MFI değerleri.

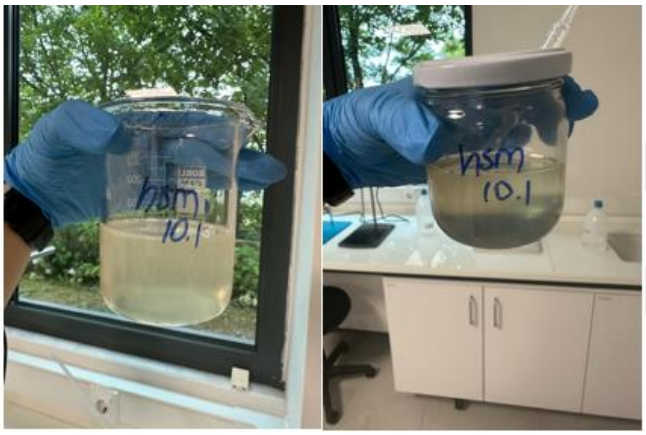
Kitosan A ile gerçekleştirilen makrofaj polarizasyon testlerinin sonuçlarına göre, hücrelerde hem CD86 hem de CD163 yanıtları artmıştır. Bu sonuçlar, Kitosan A'nın makrofajların hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar fenotipler arasında denge kurmasını sağladığını göstermektedir. Zamana bağlı olarak CD86 ve CD163 ekspresyonunda görülen artış, hücrelerin çevresel uyaranlara uyum sağladığını ve dinamik bir bağışıklık tepkisi oluşturduğunu işaret etmektedir.

Sonuç olarak, Makrofaj polarizasyonu testi sonuçlarına göre, hem CD86 hem de CD163 yanıtlarının arttığı gözlemlendi. CD86 ve CD163'ün zamana bağlı olarak artan ekspresyonu, Kitosan N, Kitosan T ve Kitosan A ile uyarılan hücrelerin hem pro-

inflamatuar hem de anti-inflamatuar fenotipler arasında geçiş yapabildiğini ve çevresel uyarıcılara uyum sağlayabildiğini göstermektedir. Bu bulgular, makrofajların kompleks ve esnek bir bağışıklık tepkisi sergilediğini göstermektedir.

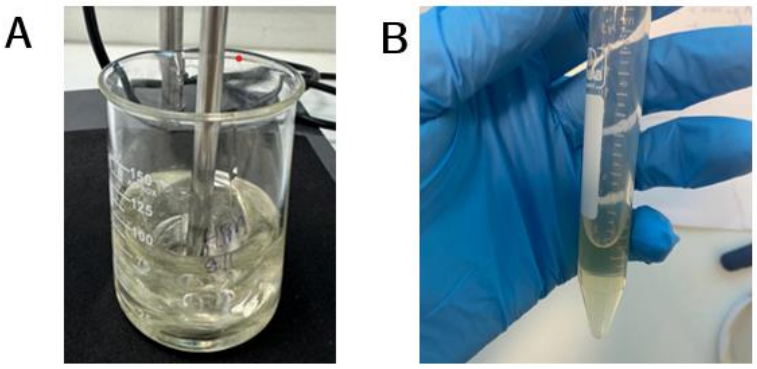
4.2. KİTOSANIN YAĞ FORMÜLASYONUNA EKLENMESİ

Yağ ve emülgatör formülasyonlarında mineral yağ ile hazırlanan karışımların berraklığı ve emülsiyon stabilitesini bozduğu gözlemlenmiştir. Bu sebeple non-mineral yağlar formülasyon için denenmiştir.



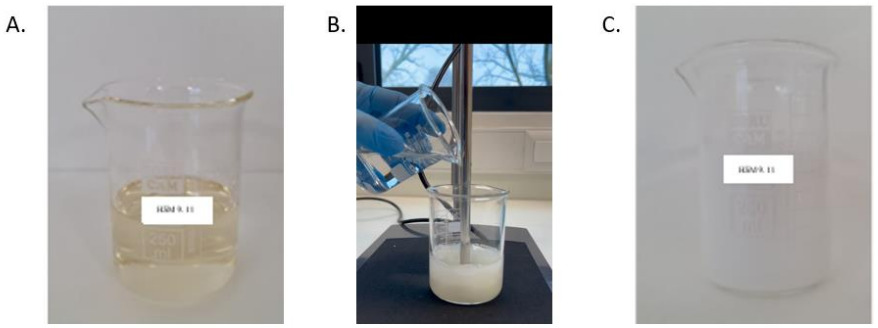
Şekil 4. 11: Kitosanın, mineral yağ bazlı formülasyonun berraklığına etkisi

Kullanılan non mineral yağın HLB değerine uygun olarak emülgatör paketleri seçilmiştir. 99 gram olarak hazırlanan yağ-emülgatör karışımının içine 1 gram kitosan solüsyonu eklenmiştir. Nihai formülasyon olan HSM 9.11 formülasyonu hazırlanmıştır ve 1 gün boyunca stabilitede gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 12: HSM 9.11 adjuvanı fiziksel görüntüsü

1 gün boyunca, berrak ve ayrışma yapmayan non mineral yağ-emülgatör karışımı HSM 9.11 formülasyonu 1 gün sonunda berrak ve stabil olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.9). Bu doğrultuda emülsifikasyon basamağına geçilmiştir.



Şekil 4. 13: HSM 9.11'in emülsiye edilmesi

HSM 9.11 adjuvanı 50 gram tartılmıştır ve 50 gram PBS ile emülsiye edilmiştir. Emülsifikasyon işlemi 714 rpm'de 10 dk karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. Emülsiyonlar, 4 °C, 24 °C ve 37 °C sıcaklıklarda stabilite testleri için 10 ml tüplere konmuştur.

4.3. ADJUVAN SİSTEMİNİN FİZİKOKİMYASAL ANALİZLERİ

Coral Biyoteknoloji laboratuvarında kullanılan cihazlar ve standart yöntemler ile gerçekleştirilen fizikokimyasal testler sonucunda elde edilen tüm değerler, W/O/W emülsiyonları için uygun değerler içinde kalmıştır. Yapılan fizikokimyasal test

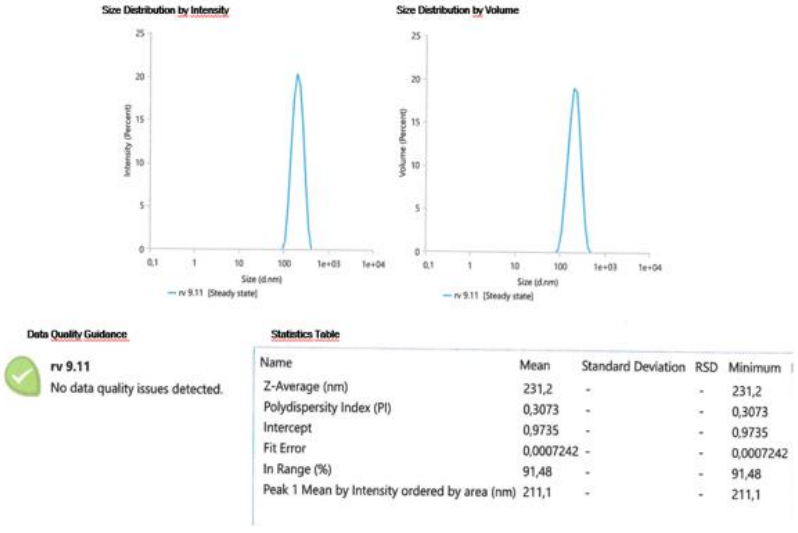
sonçlarının uygun çıkmasına takiben boyut ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen bu değerler, Tablo 4.1'de sunulmuştur.

Tablo 4. 1: Fizikokimyasal Test ve Boyut Ölçümü Sonuçları

A.

TEST	UNIT	METHOD	HSM 9.11
Görünüş (Appearance)	-	-	C&B
Saybolt Renk (Saybolt Colour)	-	ASTM D6045	5
Astm Renk (Astm Colour)	-	ASTM D1500	0.3
*Yoğunluk (Density) @15 °C	kg/m^3	ASTM D4052 TS EN ISO 12185	959.6
*Viskozite (Viscosity) @40 °C	mm^2/s	ASTM D445 TS 1451 EN ISO 3104	25.56
*Kırma İndisi (Refractive Index) @ 20 °C	-	ASTM D1218	1.4503
*Su Miktarı (Water Content)	%	ASTM D6304 (METHOD A) TS 6147 EN ISO 12937	1.21
*Toplam Asit Sayısı, (Total Acid Number)	mgKOH/g	ASTM D664	0.25
*Sabunlaşma Değeri (Saponification Value)	mgKOH/g	ASTM D94	311.38
İyot Değeri (Iyodine Value)	$gI_2/100g$	AOCS Tg 1a-64	4.15
Peroksit Sayısı (Peroxide Value)	$meqvO_2/kg$	AOCS Cd 8b-90	0

B.



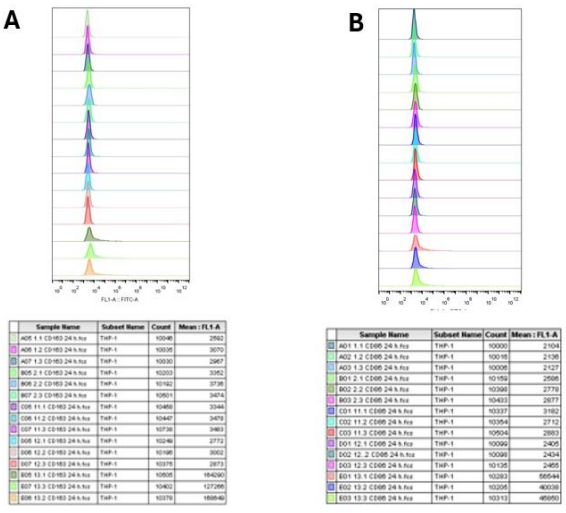
Malvern Zetasizer Pro cihazı kullanılarak HSM 9.11 emülsiyonunun parçacık boyutu ölçülmüştür. Parçacık boyutu, tam parçacık boyutu dağılımından hesaplanan yüzey ağırlıklı ortalama çap (d.nm) olarak sunulmuştur. Sonuçlar, Malvern Panalytical

yazılımı ile raporlanmış ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir. W/O/W emülsiyon olarak formüle edilen HSM 9-11 formülasyonunun parçacık boyutu 231,2 nm olarak ölçülmüştür. Polidispers indeksi değeri ise 0,3 olarak ölçülmüştür. Ölçülen bu değer 0'a yakın olduğu için parçacık boyutlarının homojen olarak dağıldığı sonucuna varılmıştır.

4.4. ADJUVAN SİSTEMİNİN *İN VİTRO* ANALİZLERİ

4.4.1. Makrofaj Polarizayonu

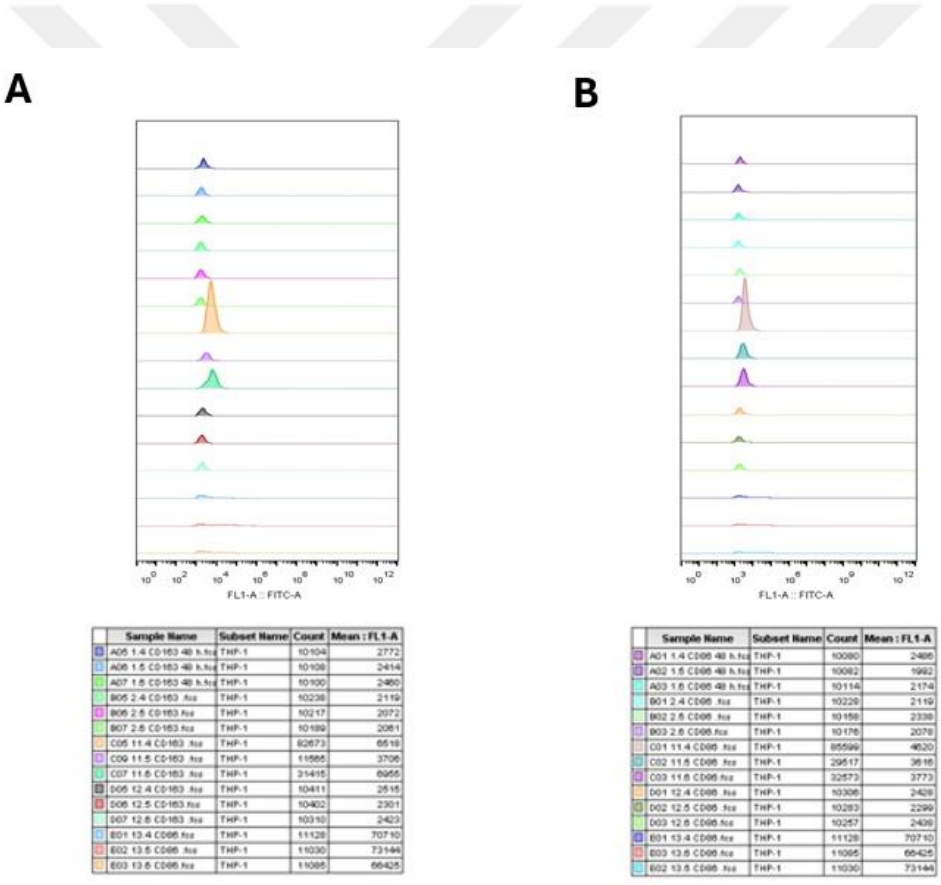
HSM 9.11 yağ formülasyonu ve %1'lik stok kitosan çözeltileri, otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Emülsiyon işlemlerinde kullanılan mekanik karıştırıcı uçları da aynı şekilde steril edilmiştir. Emülsifikasyon işlemi, biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmiş ve emülsiyon, aseptik koşullar altında 100 µg/ml OVA ile hazırlanmıştır. Emülsiyon eklenen hücreler, 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler, tripsinizasyon yöntemi ile toplanarak iki kez PBS ile yıkanmıştır. Elde edilen hücreler, anti-human CD163 ve anti-human CD86 antikorları ile boyanmış ve BD Accuri C5 Flow Cytometer cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Tüm gruplar, 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır.



Şekil 4. 14: Kitosan N FlowJo histogram grafiği, (A): 24 saatte THP-1 hücrelerinde CD163 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği; (B): 24 saatte THP-1 hücrelerinde CD86 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği (1.1-1.3; THP-1 monosit hücreleri,

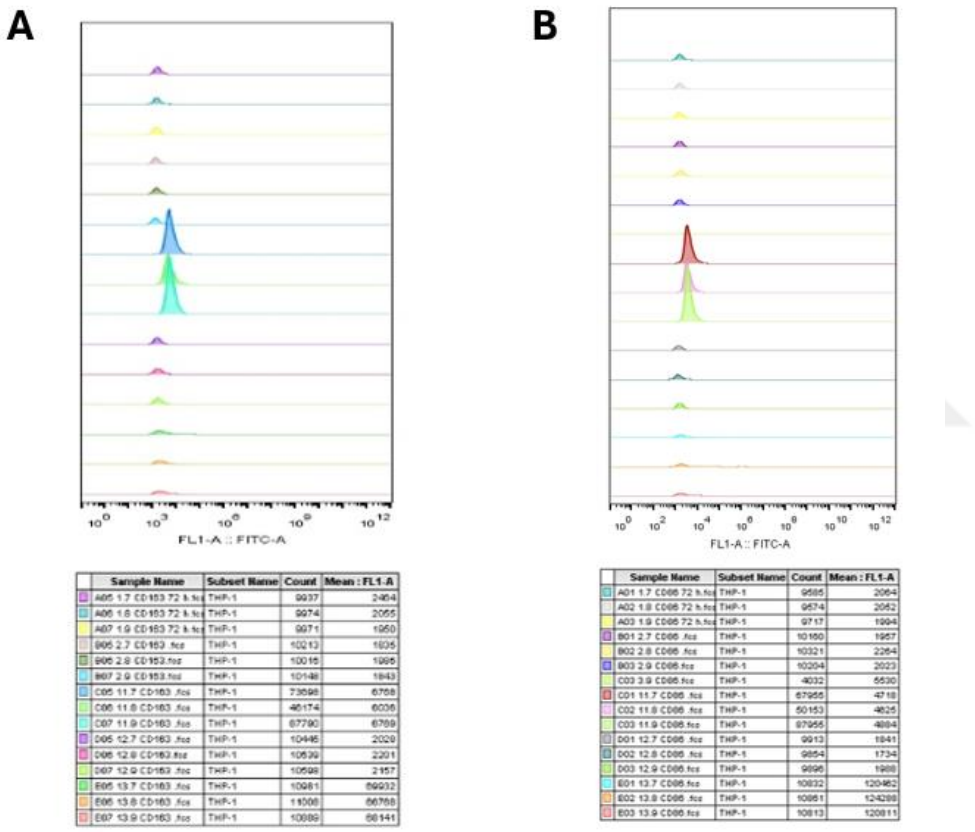
2.1-2.3 THP-1 orjinli makrofaj, 11.1-11.3 HSM 9.11, 12.1-12.3 OVA, 13.1-13.3 kitosan içeren HSM 9.11).

24 saat sonunda yapılan ölçüm değerleri dikkate alındığında, CD163 ve CD86 ekspresyon seviyelerinde belirgin bir artış gözlemlenmektedir (Şekil 4.14). Bu artış, kitosanın makrofajları hızla aktive ettiğini ve inflamatuar yanıtı başlattığını göstermektedir. CD163 ve CD86 ekspresyonlarının artması, makrofajların çevresel uyarıcılara hızla uyum sağlayabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 4. 15: Kitosan N FlowJo histogram grafiği, (A): 48 saatte THP-1 hücrelerinde CD163 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği; (B): 48 saatte THP-1 hücrelerinde CD86 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği (1.1-1.3; THP-1 monosit hücreleri, 2.1-2.3 THP-1 orjinli makrofaj, 11.1-11.3 HSM 9.11, 12.1-12.3 OVA, 13.1-13.3 serisi kitosan içeren HSM 9.11).

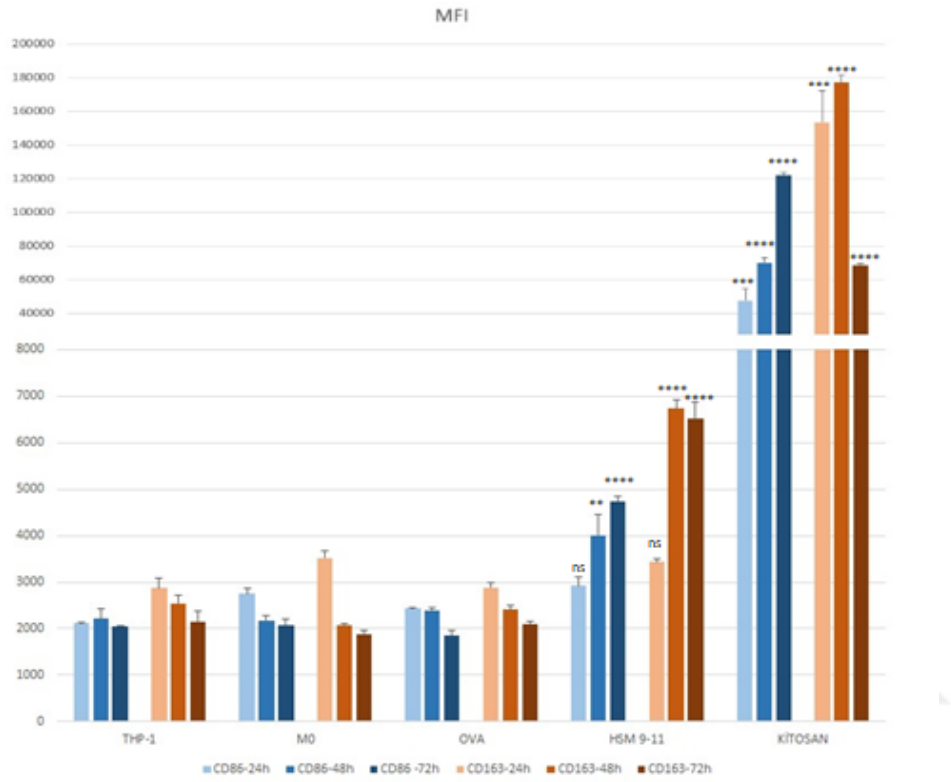
48 saat sonunda yapılan ölçüm değerleri sonuçları incelendiğinde, CD163 ve CD86 ekspresyon seviyelerinde 24 saatlik ölçümlere kıyasla daha yüksek bir artışın olduğu görülmektedir (Şekil 4.15). Bu bulgu, Kitosan'ın makrofajların aktivasyonunu sürdürdüğünü ve zamanla daha güçlü bir immün yanıtın oluştuğunu gösterebilir. CD163 ve CD86 ekspresyonlarının artış hızının 24 saatlik ölçümlere göre daha yüksek olması, kitosanın uzun süreli etkisinin olduğunu ve makrofajların adaptif bir yanıt geliştirdiğini öne sürebilir.



Şekil 4. 16: Kitosan N FlowJo histogram grafiği, (A): 72 saatte THP-1 hücrelerinde CD163 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği; (B): 72 saatte THP-1 hücrelerinde CD86 ekspresyonunun FlowJo histogram grafiği (1.1-1.3; THP-1 monosit hücreleri, 2.1-2.3 THP-1 orjinli makrofaj, 11.1-11.3 HSM 9.11, 12.1-12.3 OVA, 13.1-13.3 serisi kitosan içeren HSM 9.11).

Ekspresyon değerleri incelendiğinde, Kitosan denemelerinde 48. saatteki CD86 ve CD163 ekspresyonlarının 72. saatte düştüğü gözlemlenmiştir. Diğer yandan, HSM 9-11 formülasyonunda zamana bağlı olarak CD86 ve CD163 yanıtlarında artışlar tespit

edilmiştir. Bu artışlar, HSM 9-11 formülasyonunun makrofajların aktivasyonunu sürdürdüğünü ve inflamatuar yanıtın devam ettiğini işaret edebilir. CD86 ve CD163 ekspresyonlarının zamanla artması, HSM 9-11'in uzun vadeli etkisinin olduğunu ve makrofajların adaptif bir yanıt geliştirdiğini düşündürebilir.



Şekil 4. 17: Kitosan ve HSM 9.11 formülasyonunun yüzde ekspresyon grafiği

BD Accuri C6 Plus Flow Sitometri cihazı kullanılarak elde edilen ekspresyon değerleri Şekil 4.17'de sunulmuştur. Ekspresyon değerleri incelendiğinde, Kitosan denemelerinde 48. saatteki CD86 ve CD163 ekspresyonlarının 72. saatte düştüğü gözlemlenmiştir. Buna karşın, HSM 9-11 formülasyonunda zamana bağlı olarak CD86 ve CD163 yanıtlarında artışlar tespit edilmiştir. Bu durum, kitosanın makrofajların erken aktivasyonunu tetikleyebileceğini ancak bu etkinin zamanla azaldığını göstermektedir. Makrofajların CD86 ve CD163 ekspresyonlarında 72. saatteki düşüşü, kitosanın etkisinin geçici olduğunu ve hücrelerin pro-inflamatuar aktivitesinin zamanla normale döndüğünü düşündürebilir. HSM 9-11 formülasyonunda zamana bağlı olarak CD86 ve CD163 yanıtlarında artışlar tespit edilmiştir. Bu artışlar, HSM 9-11 formülasyonunun makrofajların aktivasyonunu sürdürdüğünü ve inflamatuar yanıtın devam ettiğini işaret

edebilir. CD86 ve CD163 ekspresyonlarının zamanla artması, HSM 9-11'in uzun vadeli etkisinin olduğunu ve makrofajların adaptif bir yanıt geliştirdiğini düşündürebilir.

5. TARTIŞMA

Hayvan aşılarının geliştirilmesi, çok sayıda bilimsel ve çevresel zorluğu beraberinde getiren karmaşık bir süreçtir. Farklı hayvan türlerinin bağışıklık sistemlerindeki büyük çeşitlilik, aşıların etkinliğini ve güvenliğini değerlendirmeyi güçleştirir. Ek olarak, ekonomik faktörler önemli bir engel teşkil eder; geniş ölçekli üretim ve dağıtım maliyetlerinin yüksekliği gibi çeşitli nedenlerle veteriner aşı teknolojilerinin gelişimi sınırlı kalmaktadır. Bu ekonomik kısıtlamalar, araştırma ve geliştirme yatırımlarını da azaltmaktadır (157). Ayrıca, hayvan aşılarının düzenleyici onay süreçleri de karmaşıktır ve bu süreçler, çeşitli ülkelerde farklılık gösterebilir. Bu nedenle, hayvan aşılarının geliştirilmesi, titiz bilimsel araştırmalar, yenilikçi stratejiler ve dikkatli ekonomik planlama gerektiren çok yönlü bir çaba gerektirir. Çiftlik hayvanları da dahil olmak üzere büyükbaş hayvanlarda uzun süreli ve hücresel bağışıklığı indükleyebilecek uygun maliyetli, tek dozluk aşılara duyulan büyük ihtiyaca rağmen, veteriner aşılarının iyileştirilmesine yönelik yeni aşı formülasyon stratejilerinin potansiyeline ulaşamamaktadır (158).

Adjuvanlar, antijenlerin gerekli terapötik etki göstermesini sağlamak amacıyla kullanılan maddelerdir. Adjuvanlar, vücudun antijenlere verdiği yanıtı modüle ederek antikor üretimini artırabilir, koruma süresini uzatabilir ve yan etkileri azaltabilirler. Bu sayede, daha az miktarda antijenle hızlı, yüksek ve uzun süreli bağışıklık tepkisi sağlanabilir ve aşı maliyetleri düşürülebilir (144). Polimerler, diğer adjuvanlarla kombinasyon halinde veya kimyasal olarak değiştirilmiş formlarda kullanılabilirler. Emülsiyon tipi adjuvanlar, üretim kolaylığı ve düşük maliyet avantajları nedeniyle veteriner sağlıkta en yaygın kullanılan adjuvanlardır (140).

Kitosan, biyouyumluluk, düşük sitotoksisite, biyobozunurluk, doğada bol miktarda bulunabilirlikleri ve mukoadezivlik gibi birçok arzu edilen özelliğe sahiptir ve yüksek immünolojik etkinlikleri nedeniyle aşı taşınmasında en çok tercih edilen adaylar arasında yer alır (159). Kitosan, herhangi bir yüzey aktif madde eklenmeden W/O/W emülsiyon oluşturabilir. Yüksek ortalama deasetilasyon derecesi (DD), W/O emülsiyonlarının oluşumunu teşvik ederken, düşük DD'li moleküller yağ damlacıkları içindeki suyun emülsifikasyonunu teşvik eder. Yüksek DD'li moleküllerin düşük

DD'lilere göre nispi miktarı nedeniyle, sürekli faz su olur ve Bancroft'un kuralına uyulur. Böylece, kitosan farklı HLB değerlerine sahip yüzey aktif madde karışımı gibi davranır (159). Kitosanın deasetilasyon derecesi immün yanıt üzerinde de etkilidir.

Birçok çalışma, daha düşük DDA'nın daha belirgin bir immün yanıtı tetikleyebileceğini göstermiştir. Daha düşük DDA, *in vivo* daha hızlı bir parçalanmaya neden olur, ancak aynı zamanda daha az pozitif yüklü olası grupların mevcut olduğu anlamına gelir. Pozitif yük, genellikle artan immünojenisite ile ilişkili olmasına rağmen olası toksik etkilerle de bağlantılıdır (143,160,161). Kitosanın serbest amino grupları protonlanabilme kapasitesine sahiptir ve dolayısıyla pozitif yük taşıyabilir. Bu durum, kitosanın pH'ya bağlı çözünürlüğünün yanı sıra proteinler gibi negatif yüklü moleküller için yüksek adsorpsiyon kapasitesi oluşturmasının temel nedenidir (142). Bu sebeple çalışmada kullanılan kitosan preparatlarının deasetilasyon seviyeleri farklı olarak seçilmiştir. Kitosan N DD'si ≥75 olarak, Kitosan T DD'si ≥98% ve Kitosan A 90-95% DD'li olarak seçilmiştir. Bu çalışmada, daha düşük DDA'ya sahip kitosan, daha yüksek bir immün yanıt ile sonuçlanmıştır ve elde edilen bu sonuçlar literatürle uyumludur; burada %75 veya daha düşük DDA'ya sahip kitosanlar ile daha yüksek DDA'ya sahip kitosanlar arasında belirgin bir fark tanımlanmıştır. Ancak, bu etkinin mekanizması belirsizliğini korumaktadır çünkü daha yüksek DDA'ya sahip kitosan daha fazla protonlanma kapasitesine sahip olmalı ve daha fazla antijen taşımalıdır (161).

Çift emülsiyonlar, esas olarak mikrodamlacıklar arasındaki materyal taşınımı nedeniyle doğası gereği kararsızdır. W/O/W emülsiyonlarında materyallerin yağ tabakası boyunca taşınabileceği birkaç olası mekanizma önerilmiştir. En yaygın olanı, yağda çözünen maddelerin moleküler difüzyon kontrollü mekanizmasıdır (162). Karışık yüzey aktif maddelerle stabilize edilmiş çoklu emülsiyonlarda, karışık ters miseller suyu ve suda çözünen bileşenleri çözebilir ve bunları diğer faza taşıyabilir. Adsorbe olmuş kitosan, hem hidrofobik hem de hidrofilik maddelerin difüzyon kontrollü taşınımı için muhtemelen bir arayüzey bariyeridir. Dolayısıyla yağ damlacıkları içinde göç çok sınırlıdır ve bu da stabiliteyi artırır (163). Kitosan ve su arasındaki afinite, pH arttıkça azalır. Optimal emülsiyon alkali yapıldığında gözle görülebilir bir değişiklik olmaz, ancak damlacıklar daha katı hale gelir. Mikroskobik olarak, katı, çift kırılma göstermeyen kitosan ile kaplanmış damlacıklar görülür. Bu, kitosanın damlacıkları koalesansa karşı koruyarak yağ/su arayüzeyinde kaldığı anlamına gelir (164). Optimal yağ/kitosan oranı

belirlenerek, emülsiyonun en ekonomik ve verimli şekilde kullanılması sağlanır. Yağ fazla olduğunda, yaklaşık 3 saat içinde üç katman oluşur. Optimal yağ/kitosan oranında veya kitosan fazlasında, iki ay boyunca faz ayrımı tespit edilmez. Optimal yağ/kitosan oranı, emülsifiye edilmemiş yağ tabakasının sıfır hacmine ekstrapolasyonla bulunarak, 0.2 (g kitosan/g yağ) olarak belirlenmiştir. Bu optimal emülsiyon formülasyonu, sulu asetik asit ile seyreltilmeye karşı stabildir ve bu, emülsifikatörün tercihli olarak yağ/su arayüzeyine çekildiğini ve sulu ortamda yeniden çözünmediğini, bu da emülsiyona büyük stabilite sağladığını gösterir. Bu çalışmalardan elde edilen veriler doğrultusunda, kitosan çözeltileri %1, %2 ve %4'lük konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. En berrak ve homojen çözelti %1'lik kitosan çözeltisi olarak belirlenmiştir. Çözeltinin berraklığı, ekleneceği yağ fazını doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle, tüm çalışmalarda stok çözelti olarak %1'lik kitosan çözeltisi kullanılmıştır. Kitosan T ve N suda çözünürken, Kitosan A %1'lik asetik asitte çözdürülmüştür. Sodyum hidroksit ile pH nötre yaklaştırılırken Kitosan N ile en berrak stok solüsyon elde edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında oluşturulan yağ bazlı emülsiyon HSM 9.11 emülsiyonu içinde kitosan kullanılmıştır. Bu emülsiyonlar *in vitro* denemeler için OVA ile hazırlanmıştır. Huang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada benzer özelliklere sahip olan, Montanide ISA 51 (ISA51), mineral yağ ve lipofilik emülgatör içeren su-yağ (W/O) emülsiyonları kullanılmaktadır. Bu tür adjuvanlar, aşıların etkinliğini artırmak ve uzun süreli koruyucu bağışıklık yanıtları sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Ancak, bu emülsiyonların ince iğnelerle enjeksiyonu zor olup, enjeksiyon bölgesinde yerel Sreaksiyonlara neden olmaktadır (165). Suya olan afinitesini değiştirmek için hidrofobik polimer emülgatörler (PEG-b-PLA, PEG-b-PCL ve PEG-b-PLACL) içeren ISA 51 adjuvanlı aşılar geliştirilmiştir. Bu amfifilik blok kopolimerler, biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir özelliklerinden dolayı seçilmiştir. Çalışmada, emülsiyonların çeşitli fizikokimyasal özellikleri, stabilite, damlacık testi, partikül boyut dağılımı ve model protein ovalbumin (OVA)'nın *in vitro* salımı gibi özellikleri test edilmiştir. PEG-b-PLACL stabilizasyonlu ISA 51 adjuvanı ile formüle edilen OVA'nın bağışıklık tepkisi ve geleneksel ISA 51 yağlı adjuvanı ile formüle edilmiş OVA ile karşılaştırıldığında daha iyi stabilite ve immünite gözlemlenmiştir (166). Tez çalışmasında benzer olarak HSM 9.11 içinde kitosan N kullanılmıştır. Emülsiyonlar, model antijen ovalbumin (OVA) ile hazırlanmıştır. Karşılaştırma amacıyla, adjuvan olarak ticari olarak satışı gerçekleştirilen yağ bazlı formülasyonlar ve yalnızca kitosan içeren formülasyonların immün yanıtları

değerlendirilmiştir. Emülsiyon stabilitesi ticari adjuvanlarla kıyaslandığında 2 kat daha uzun süre stabil kalmıştır. Ticari olarak satılan adjuvanların emülsiyonları 1 ay stabil kalırken, kitosan içeren HSM 9.11 formülasyonu 2 ay stabil kalmaktadır.

Aşı adjuvanlarının hazırlanmasında biyouyumlu emülgatörlerin sayısını artırmak için sentetik polimerler iyi bir alternatif olarak değerlendirilebilir. Bu polimerler, monomer ekleme sırası ve miktarına göre kolayca özelleştirilebilmektedir. TiterMax® örneğinde, squalene bazlı W/O emülsiyonu, mikropartikül silika ve non-iyonik blok kopolimer (Pluronic® veya Poloxamer® olarak bilinen POE-POP-POE) ile stabilize edilmektedir. TiterMax®, LMWS (low-molecular weight surfactants- düşük moleküler ağırlıklı sürfaktanlar) içeren emülsiyon formülasyonlarından daha güçlü bağışıklık tepkileri oluşturmaktadır (167–169). Farklı parçacıkların fiziksel karışımı bağışıklık yanıtında artış oluşturmaktadır. Bu artış, her iki tür parçacığın birleşik adjuvan etkisine bağlıdır. Daha fazla sayıda parçacık, hızla salınan antijenleri absorbe edebilecek daha büyük bir yüzey alanı sağlar ve bu yüzeyde absorbe edilmiş antijenler, MHC II yolları aracılığıyla geliştirilmiş bağışıklık yanıtı için sunulur. PLA polimer parçacıklarının karışımları, yüksek protein adsorpsiyonu ve daha yüksek hidrofobiklik nedeniyle yüzeyde daha fazla antikor yanıtı oluşturmaktadır (170). Yapılan makrofaj polarizayonu testleri sonucunda, kontrol grubu olan MO grubunun 24. Saatteki CD163 ekspresyon seviyelerinin ortalama değeri 3520±160, CD86 ekspresyon seviyesi ise 2747±120 bulunmuştur. Kitosan içeren HSM 9.11 formülasyonun 48. Saatteki ortalama CD163 değeri 3435±64, CD86 ekspresyon seviyesi 2925,66±194 olarak hesaplanmıştır. Kitosanın aşı dozunda kullanılan miktarı tek başına ölçüldüğünde CD163 ekspresyon seviyesi 153401,7±18566,19; CD86 ekspresyon seviyesi ise 47477±6836 olarak hesaplanmıştır. 48. saatte yapılan ölçümler sonucunda, MO grubunun CD163 ekpresyon seviyelerinin ortalama değeri 2084±25; CD86 ekspresyon seviyesi ise 2178±114 bulunmuştur. Kitosan içeren HSM 9.11 formülasyonun 48. Saatteki ortalama CD163 ekspresyon seviyesi değeri 6726,333±178; CD86 ortalama ekspresyon seviyesi ise 4003±440 olarak ölçülmüştür. Kitosan tek başına CD163 ekspresyonu 177003,7±4329,912 ve CD86 ekspresyonu ise 70093±2777 olarak hesaplanmıştır. CD86 ve CD163'ün 72. Saatteki ekspresyon seviyeleri ise; kontrol grubunda ortalama CD163 ekspresyonu 1888±69 ve CD86 2036±30; HSM 9-11'de CD163 seviyesi 6524,333±345 ve CD86 ortalama ekspresyon değeri 4742,3±107; kitosanın tek başına uygulandığı grupların CD163 ekspresyonu 68280,33±1295 ve CD86 için ise 121853,7±1727 olarak

hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, kitosan ve kitosan içeren HSM 9.11 formülasyonlarının makrofaj polarizasyonu üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. Kontrol grubuna kıyasla, HSM 9-11 ve kitosan gruplarında CD163 ve CD86 ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Bu bulgu, kitosanın makrofajların CD163 ekspresyonunu güçlü bir şekilde indükleyebildiğini ve böylece inflamatuar yanıtta önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Elde edilen bu sonuçlar literatür ile uyumlu bulunmuştur.

CD83 ekspresyonundaki artış, kitosan ve kitosan içeren HSM 9.11 formülasyonlarının, makrofajların antijen sunma yeteneklerini artırabileceğini ve böylece adaptif immün yanıtları destekleyebileceğini gösterir. CD163 ekspresyonundaki artış ise kitosan ve kitosan içeren HSM 9.11 formülasyonlarının anti-inflamatuar yanıtları ve doku onarım süreçlerini destekleyebileceğini gösterir. Yüksek CD163 seviyeleri, bu formülasyonların M2 makrofaj polarizasyonunu teşvik ettiğini işaret eder. Sonuç olarak, kitosan ve kitosan içeren HSM 9.11 formülasyonlarının makrofaj polarizasyonunu hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar yönlerde etkileyerek immün yanıtların düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabileceği anlamına gelmektedir.

Sonuç olarak, polimerlerin ve özellikle kitosanın aşı taşınmasında kullanımı, gelecekteki aşı geliştirme çalışmaları için önemli bir araştırma alanını oluşturmaktadır. Bu polimerlerin güvenlik ve etkinlik profillerinin daha detaylı bir şekilde incelenmesi ve klinik çalışmaların yapılması, aşıların geliştirilmesinde ve hayvan sağlığının korunmasında önemli bir rol oynayabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Kitosan A, Kitosan N ve Kitosan T gruplarındaki hücre canlılığı, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermesine rağmen, uygulanan dozlar ve inkübasyon sürelerinde canlılığın %50'nin altına düşmediği belirlenmiştir. Tez kapsamında, farklı kitosan konsantrasyonları ve uygulama süreleri kullanılarak sitotoksisite ve makrofaj polarizasyonu analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde, kitosanların farklı hücre hatları üzerindeki etkileri incelenmiş ve her bir dozun sonuçları dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, kitosanların hücre canlılığını önemli ölçüde etkilemediği ve bu nedenle IC50 değerlerinin hesaplanamadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, kitosanların hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermediği belirlenmiş ve bu bulgular, kitosanların sağlık uygulamalarındaki güvenilirliği konusunda olumlu veriler sağlamıştır.

Makrofaj polarizasyonu testi ile inflamatuar yanıtın zamanla nasıl değiştiği ve bu değişimin bağışıklık sistemi üzerindeki olası etkileri değerlendirilmiştir. HSM 9-11 formülasyonunun CD86 ve CD163 ekspresyonlarının zamanla artması, uzun vadeli etkisinin olduğunu ve makrofajların adaptif bir yanıt geliştirdiğini, aynı zamanda makrofajların aktivasyonunu sürdürdüğünü ve inflamatuar yanıtın devam ettiğini göstermektedir. Denenen altı farklı kitosan dozundan en iyi immün yanıtı gösteren dozun 0,00475 mg/ml olduğu bulunmuştur. Bu bulgu, yapılan fizikokimyasal, stabilite ve makrofaj testleri ile doğrulanmış ve bu doz final üründeki konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

Kitosan ile oluşturulmuş W/O/W emülsiyon olan HSM 9-11 formülasyonu, geleneksel emülsiyonlarla kıyaslandığında daha iyi stabilite ve immün yanıt etkilerine sahiptir. W/O/W emülsiyonlarda kullanılan emülgatör miktarının düşürülmesi sayesinde maliyet düşürülerek daha ekonomik ve etkili bir formülasyon tasarlanmıştır.

Tez kapsamında elde edilen bu bulgular, Kitosan A, Kitosan N ve Kitosan T'nin farklı hücre hatları üzerindeki biyolojik etkilerinin değerlendirilmesine ve potansiyel tıbbi uygulamalarının araştırılmasına yönelik ileri çalışmalara temel oluşturabilir. Bu çalışmalar, emülsiyon içinde kullanılan kitosanların hücresel düzeydeki etkilerini daha iyi anlamak ve tıbbi alanda kullanımlarını genişletmek için önemlidir. Kitosan oligosakkaritleri ve trimetil kitosan gibi kitosanın çeşitli formları üzerinde daha fazla

araştırma yapılması gerekmektedir. Çalışmanın bulguları, kitosanların potansiyel kullanımları hakkında daha fazla araştırma yapılmasını ve doz belirlemesi, güvenlik gibi parametreleri belirleyebilmek amacıyla *in vivo* olarak çalışılmasına teşvik etmektedir. Yeni ve uyumlu adjuvanlara yönelik yapılan çalışmalar, geleneksel olarak kullanılan bileşenlerin alışılmış kullanımını kırmak için teşvik edilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Roth JA. (2011). Veterinary Vaccines and Their Importance to Animal Health and Public Health. *Procedia in Vaccinology*, 1;5:127-36.
2. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond, (2024). https://www.mdpi.com/2076-393X/3/2/320
3. Gross CP, Sepkowitz KA. (1998). The myth of the medical breakthrough: smallpox, vaccination, and Jenner reconsidered. *Int J Infect Dis*, 1998;3(1):54-60.
4. Zepp F. (2010). Principles of vaccine design-Lessons from nature. *Vaccine*. 28 Suppl 3:C14-24.
5. Bonanni P, Santos JI. (2011). Vaccine evolution. *Perspectives in Vaccinology*, 1(1):1-24.
6. Normile D. (2008).Driven to Extinction. *Science*, 319(5870):1606-9.
7. Pastoret PP, Brochier B. (1996). The development and use of a vaccinia-rabies recombinant oral vaccine for the control of wildlife rabies; a link between Jenner and Pasteur. *Epidemiology & Infection*, 3:235-40.
8. Food and Agriculture Organization of the United Nations (İnternette) 2020, 25 Mayıs Erişim. 15.12.2024, https://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/HLEF2050_Global_Agriculture.pdf.
9. Sorrento T. (1995) Caring for the next generation: developments in pediatric vaccination. Proceedings of a meeting, *J Infect Dis*, 3:S259-344.
10. Meeusen ENT, Walker J, Peters A, Pastoret PP, Jungersen G. Current Status of Veterinary Vaccines. (2007). *Clin Microbiol Rev.*, 20,3:489-510.
11. Büyüktanır Ö. (2010) Günümüzde biyoteknolojik bakteriyel aşılar. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergis*i. 5(2):97-105.
12. Domínguez A, Polanco R, Cossío G, Morejón Y, Riquenes Y. (2014). Current trends and perspectives in veterinary vaccine production. *Biotecnología Aplicada,* 31(3):196-203.
13. Bowersock TL, Martin S. (1999). Vaccine delivery to animals. *Advanced drug delivery reviews,* 38(2):167-94.
14. Kurtbeyoğlu GA, Akan M. (2023). KANATLI HAYVANLARDA KULLANILAN VEKTÖR AŞILAR. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 14(2):98-107.
15. Krishnan BR. (2000). Current status of DNA vaccines in veterinary medicine. *Advanced drug delivery reviews,* 43(1):3-11.
16. Pastoret PP. (2010). Human and animal vaccine contaminations. *Biologicals,* 38(3):332-4.
17. Shams H. Recent developments in veterinary vaccinology. (2005). *The Veterinary Journal*, 170(3):289-99.
18. Moser M, Leo O. (2010). Key concepts in immunology. *Vaccine,* 28:C2-13.
19. Lee S, Nguyen MT. (2015). Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune network,* 15(2):51.
20. Bhat BA, Aadıl S. (2021). Adjuvants Used In Animal Vaccines-Their Formulations and Modes of Action: An Overview. *Osmaniye Korkut Ata University Journal of Natural and Applied Sciences*, 4(3):492-506.
21. Improving Vaccine Performance with Adjuvants, Clinical Infectious Diseases, Oxford Academic. Erişim: 25.05.2024, https://academic.oup.com/cid/article/30/Supplement_3/S266/273084
22. Current Status of Immunological Adjuvants, Annual Reviews, Erişim: 25.05.2024, https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.iy.04.040186.002101
23. Marrack P, McKee AS, Munks MW. (2009). Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol,* 9(4):287-93.
24. Powell BS, Andrianov AK, Fusco PC. (2015). Polyionic vaccine adjuvants: another look at aluminum salts and polyelectrolytes, *Clin Exp Vaccine Res*.;4(1):23-45.
25. Gelaw G. A Review On Role Of Adjuvants For Vaccine Efficacy. Erişim: 25.05.2024, Researchgate, https://www.researchgate.net/profile/Gizachew-Ayalew/publication/356715927_A_Review_On_Role_Of_Adjuvants_For_Vaccine_Efficacy/links/61a868f629948f41dbb9968b/A-Review-On-Role-Of-Adjuvants-For-Vaccine-Efficacy.pdf
26. Roth JA. (1999). Mechanistic bases for adverse vaccine reactions and vaccine failures. *Advances in veterinary medicine*, 41:681.
27. Cox JC, Coulter AR. (1997). Adjuvants—a classification and review of their modes of action. *Vaccine*, 15(3):248-56.
28. O'hagan DT. (1998). Conference Science Medal Lecture: Recent Advances in Vaccine Adjuvants for Systemic and Mucosal Administration. *Journal of Pharmacy and Pharmacology,* 50(1):1-10.

29. Freund J, Opie EL. (1938). SENSITIZATION AND ANTIBODY FORMATION WITH INCREASED RESISTANCE TO TUBERCULOUS INFECTION INDUCED BY HEAT KILLED TUBERCLE BACILLI. *J Exp Med*, 68(2):273-98.
30. Morein B, Villacrés-Eriksson M, Sjölander A, Lövgren Bengtsson K. (1996). Novel adjuvants and vaccine delivery systems. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 54(1):373-84.
31. Liposomal vaccines: clinical status and immunological presentation for humoral and cellular immunity. Europe PMC. Erişim: 25.05.2024, https://europepmc.org/article/med/7625648
32. Oxenius A, Martinic MM, Hengartner H, Klenerman P. (1999). CpG-containing oligonucleotides are efficient adjuvants for induction of protective antiviral immune responses with T-cell peptide vaccines. *J Virol*, 73(5):4120-6.
33. Adjuvants in Veterinary Vaccines: Modes of Action and Adverse Effects. Journal of Veterinary Internal Medicine. Wiley Online Library. Erişim: 25.05.2024, https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1939-1676.2003.tb02448.x
34. Iwasaki A, Medzhitov R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 5(10):987-95.
35. HogenEsch H. (2002). Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine*, 3:S34-39.
36. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms. Signal Transduction and Targeted Therapy. Erişim: 25.05.2024, https://www.nature.com/articles/s41392-023-01557-7
37. McKee AS, Munks MW, Marrack P. (2007). How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. *Immunity*, 27(5):687-90.
38. Taub RN, Krantz AR, Dresser DW. (1970). The effect of localized injection of adjuvant material on the draining lymph node. *Immunolog*, 18(2):171.
39. Jafari M, Moghaddam Pour M, Taghizadeh M, Masoudi S, Bayat Z. (2017). Comparative assessment of humoral immune responses of aluminum hydroxide and oil-emulsion adjuvants in Influenza (H9N2) and Newcastle inactive vaccines to chickens. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 45(1):84-9.
40. Lavelle EC, McEntee CP. (2024). Vaccine adjuvants: Tailoring innate recognition to send the right message. *Immunity*. 57(4):772-89.
41. Effect of Thermal Treatment During the Preparation of Aluminum Hydroxide Adjuvant on the Protein Adsorption Capacity During Aging. Erişim: 25.05.2024, https://www.researchgate.net/publication/10971245_Effect_of_Thermal_Treatment_During_the_Preparation_of_Aluminum_Hydroxide_Adjuvant_on_the_Protein_Adsorption_Capacity_During_Aging
42. Aluminium Compounds as Adjuvants for Vaccines and Toxoids in Man: A Review on JSTOR. Erişim: 25.05.2024, https://www.jstor.org/stable/41983922
43. Burrell LS, White JL, Hem SL. (2000). Stability of aluminium-containing adjuvants during aging at room temperature. *Vaccine*. 18(21):2188-92.
44. Aluminum hydroxide adjuvant produced under constant reactant concentration. Erişim: 25.05.2024, https://www.researchgate.net/publication/6989517_Aluminum_hydroxide_adjuvant_produced_under_constant_reactant_concentration
45. Kool M, Fierens K, Lambrecht BN. (2012). Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *Journal of Medical Microbiology*, 61(7):927-34.
46. Masson JD, Angrand L, Badran G, De Miguel R, Crépeaux G. (2022). Clearance, biodistribution, and neuromodulatory effects of aluminum-based adjuvants. Systematic review and meta-analysis: what do we learn from animal studies? *Critical Reviews in Toxicology*, 52(6):403-19.
47. Vecchi S, Bufali S, Skibinski DA, O'hagan DT, Singh M. (2012). Aluminum adjuvant dose guidelines in vaccine formulation for preclinical evaluations. *Journal of pharmaceutical sciences*, 101(1):17-20.
48. Lindblad EB, Schønberg NE. Aluminum Adjuvants: Preparation, Application, Dosage, and Formulation with Antigen. Erişim: 25.05.2024, http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-585-9_4
49. Sesardic D, Rijpkema S, Patel BP. (2007). New adjuvants: EU regulatory developments. *Expert Review of Vaccines*, 6(5):849-61.
50. Sun Z, Li W, Lenzo JC, Holden JA, McCullough MJ, O'Connor AJ. (2021). The potential of calcium phosphate nanoparticles as adjuvants and vaccine delivery vehicles. *Frontiers in Materials*, 8:788373.
51. Lin Y, Wang X, Huang X, Zhang J, Xia N, Zhao Q. (2017). Calcium phosphate nanoparticles as a new generation vaccine adjuvant. *Expert Review of Vaccines*, 16(9):895-906.
52. He Q, Mitchell AR, Johnson SL, Wagner-Bartak C, Morcol T, Bell SJD. (2000). Calcium Phosphate Nanoparticle Adjuvant. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7(6):899-903.
53. Kool M, Lambrecht BN. Mechanism of Adjuvanticity of Aluminum-Containing Formulas. Erişim: 25.05.2024, https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-00978-0_14

54. Allen TM, Cullis PR. (2013). Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1):36-48.
55. Bozzuto G, Molinari A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. IJN, 1(5);97-55.
56. Weissig V. Liposomes Came First: The Early History of Liposomology. Erişim: 25.05.2024, http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6591-5_1.
57. Moyer TJ, Zmolek AC, Irvine DJ. (2016). Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. *The Journal of clinical investigation*, 126(3):799-808.
58. Lila ASA, Ishida T, Allen TM. (2014). Liposomal nanomedicines. Handbook of Nanobiomedical Research: Fundamentals. *Applications, and Recent Developments*, 23:1-53.
59. Nagy NA, De Haas AM, Geijtenbeek TBH, Van Ree R, Tas SW, Van Kooyk Y. (2021). Therapeutic Liposomal Vaccines for Dendritic Cell Activation or Tolerance. *Front Immunol*, 12:674048.
60. Štimac A, Cvitaš JT, Frkanec L, Vugrek O, Frkanec R. (2016). Design and syntheses of mono and multivalent mannosyl-lipoconjugates for targeted liposomal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 511(1):44-56.
61. Yaguchi K, Ohgitani T, Noro T, Kaneshige T, Shimizu Y. (2009). Vaccination of chickens with liposomal inactivated avian pathogenic Escherichia coli (APEC) vaccine by eye drop or coarse spray administration. *Avian diseases*, 53(2):245-9.
62. Sparg S, Light ME, Van Staden J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of ethnopharmacology*, 94(2-3):219-43.
63. Kensil CR. (1996). Saponins as vaccine adjuvants. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 13(1-2):1-55.
64. Kensil CR, Soltysik S, Wheeler DA, Wu JY. Structure/Function Studies on QS-21, A Unique Immunological Adjuvant from Quillaja saponaria. Erişim: 25.05.2024, http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-1367-8_15
65. Brunner L, Barnier-Quer C, Collin N. QS-21 Adjuvant: Laboratory-Scale Purification Method and Formulation Into Liposomes. Erişim: 25.05.2024, http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6445-1_5
66. Chen K, Wang N, Zhang X, Wang M, Liu Y, Shi Y. (2023). Potentials of saponins-based adjuvants for nasal vaccines. *Frontiers in Immunology*, 14:1153042.
67. Charerntantanakul W, Pongjaroenkit S. (2018). Co-administration of saponin quil A and PRRSV-1 modified-live virus vaccine up-regulates gene expression of type I interferon-regulated gene, type I and II interferon, and inflammatory cytokines and reduces viremia in response to PRRSV-2 challenge. *Veterinary immunology and immunopathology*, 205:24-34.
68. Top H, Sarikahya NB, Nalbantsoy A, Kirmizigul S. (2017). Immunomodulatory, hemolytic properties and cytotoxic activity potent of triterpenoid saponins from Cephalaria balansae. *Phytochemistry*, 137:139-47.
69. Marciani DJ, Reynolds RC, Pathak AK, Finley-Woodman K, May RD. (2003). Fractionation, structural studies, and immunological characterization of the semi-synthetic Quillaja saponins derivative GPI-0100. *Vaccine*, 21(25):3961-71.
70. Silveira F, Cibulski SP, Varela AP, Marqués JM, Chabalgoity A, de Costa F. (2011). Quillaja brasiliensis saponins are less toxic than Quil A and have similar properties when used as an adjuvant for a viral antigen preparation. *Vaccine*, 29(49):9177-82.
71. Li W, Watarai S, Iwasaki T, Kodama H. (2004). Suppression of Salmonella enterica serovar Enteritidis excretion by intraocular vaccination with fimbriae proteins incorporated in liposomes. *Developmental & Comparative Immunology*, 28(1):29-38.
72. Toll-Like Receptors: Ligands, Cell-Based Models, and Readouts for Receptor Action. Erişim: 25.05.2024, https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-3335-8_1
73. Avian toll-like receptors Erişim: 26.05.2024, https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-010-1026-0
74. Jungi TW, Farhat K, Burgener IA, Werling D. (2011). Toll-like receptors in domestic animals. *Cell Tissue Res.*, 343(1):107-20.
75. Garlapati S, Garg R, Brownlie R, Latimer L, Simko E, Hancock REW. (2012). Enhanced immune responses and protection by vaccination with respiratory syncytial virus fusion protein formulated with CpG oligodeoxynucleotide and innate defense regulator peptide in polyphosphazene microparticles. *Vaccine*, 30(35):5206-14.
76. Krieg AM. (1996). An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 128(2):128-33.
77. Lavelle EC, McEntee CP. (2024). Vaccine adjuvants: Tailoring innate recognition to send the right message. *Immunity*, 57(4):772-89.

78. Micro and Nanoparticle-Based Delivery Systems for Vaccine Immunotherapy: An Immunological and Materials Perspective Erişim: 26.05.2024, https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adhm.201200268
79. Development of a single-dose stabilized poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) microspheres-based vaccine against hepatitis B. Erişim: 25.05.2024, https://academic.oup.com/jpp/article-abstract/56/10/1243/6147383
80. Bento D, Staats HF, Gonçalves T, Borges O. (2015). Development of a novel adjuvanted nasal vaccine: C48/80 associated with chitosan nanoparticles as a path to enhance mucosal immunity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93:149-64.
81. Chitins and Chitosans as Immunoadjuvants and Non-Allergenic Drug Carriers. Erişim: 25.05.2024, https://www.mdpi.com/1660-3397/8/2/292
82. Xia Y, Fan Q, Hao D, Wu J, Ma G, Su Z. (2015). Chitosan-based mucosal adjuvants: Sunrise on the ocean. *Vaccine,* 33(44):5997-6010.
83. Rauw F, Gardin Y, Palya V, Anbari S, Gonze M, Lemaire S. (2010). The positive adjuvant effect of chitosan on antigen-specific cell-mediated immunity after chickens vaccination with live Newcastle disease vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology,* 134(3):249-58.
84. A Systematic Review of Recent Advances in Equine Influenza Vaccination. Erişim: 26.05.2024, https://www.mdpi.com/2076-393X/2/4/797
85. Mair KH, Koinig H, Gerner W, Höhne A, Bretthauer J, Kroll JJ. (2015). Carbopol improves the early cellular immune responses induced by the modified-life vaccine Ingelvac PRRS® MLV. *Veterinary Microbiology,* 176(3):352-7.
86. Dar A, Lai K, Dent D, Potter A, Gerdts V, Babiuk LA. (2012). Administration of poly[di(sodium carboxylatoethylphenoxy)]phosphazene (PCEP) as adjuvant activated mixed Th1/Th2 immune responses in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 146(3):289-95.
87. Biomaterials for Nanoparticle Vaccine Delivery Systems. Erişim: 25.05.2024, https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-014-1419-y
88. Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. (2001). Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*. 19(17):2666-72.
89. Vogel: Immunologic adiuvants. Erişim: 25.05.2024, https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Immunologic+adjuvants&author=Vogel,+F.&author=Hem,+S.L.&publication_year=2004&pages=69%E2%80%9379
90. Gradon JD, Lutwick LI. (1999). MAINTAINING AND ENHANCING VACCINE IMMUNOGENICITY. *Infectious Disease Clinics of North America,* 13(1):39-60.
91. Jabbal-Gill I, Lin W, Jenkins P, Watts P, Jimenez M, Illum L. (1999). Potential of polymeric lamellar substrate particles (PLSP) as adjuvants for vaccines. *Vaccine,* 18(3):238-50.
92. Prolonged Release of Drug from O/W Emulsion and Residence in Rat Nasal Cavity: Pharmaceutical Development and Technology. Erişim: 25.05.2024, https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10837459809028627
93. Horne DS. - Caseins: Interfacial layer properties and their influence on emulsion stability. Erişim: 25.05.2024, https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444501783500652
94. Schultz N, Oratz R, Chen D, Zeleniuch-Jacquotte A, Abeles G, Bystryn JC. (1995). Effect of DETOX as an adjuvant for melanoma vaccine. *Vaccine*, 13(5):503-8.
95. Aucouturier J, Deville S, Perret C, Vallée I, Boireau P. (2001). Assessment of efficacy and safety of various adjuvant formulations with a total soluble extract of Trichinella spiralis. *Parasite,* 8:S126-32.
96. Jansen T, Hofmans MPM, Theelen MJG, Manders F, Schijns VEJC. (2006). Structure- and oil type-based efficacy of emulsion adjuvants. *Vaccine*, 24(26):5400-5.
97. P.95 The interaction of heparin, calcium and lipid emulsion in simulated Y-site delivery of total parenteral nutrition (TPN) admixtures. Erişim: 25.05.2024, https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-aa7e53d6-9f8c-3868-ac19-1bfec367471b
98. Ganne V, Eloit M, Laval A, Adam M, Trouve G. (1994). Enhancement of the efficacy of a replication-defective adenovirus-vectored vaccine by the addition of oil adjuvants. *Vaccine,* 12(13):1190-6.
99. Benoy CJ, Elson LA, Schneider R. (1972). Multiple emulsions, a suitable vehicle to provide sustained release of cancer chemotherapeutic agents. *Br J Pharmacol,* 45(1):135P-136P.
100. Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability: Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Erişim: 25.05.2024, https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390701289292
101. Emulsion Stability. Erişim: 26.05.2024, https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-2486-1_61

102. A Comprehensive Review on Emulsions and Emulsion Stability in Chemical and Energy Industries. Erişim: 26.05.2024, https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cjce.23336
103. Structure stability and crystallization behavior of water in oil in water (WOW) double emulsions during their characterization by differential scanning calorimetry (DSC). Erişim: 25.05.2024, https://link.springer.com/article/10.1007/s10973-017-6723-4
104. Perez-Moral N, Watt S, Wilde P. (2014). Comparative study of the stability of multiple emulsions containing a gelled or aqueous internal phase. *Food Hydrocolloids,* 42:215-22.
105. Bastola R, Noh G, Keum T, Bashyal S, Seo JE, Choi J. (2017). Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Arch Pharm Res*. 40(11):1238-48.
106. Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *European Journal of Immunology*. Erişim: 25.05.2024, https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1521-4141%28200211%2932%3A11%3C3235%3A%3AAID-IMMU3235%3E3.0.CO%3B2-J
107. Squalene emulsion potentiates the adjuvant activity of the TLR4 agonist, GLA, via inflammatory caspases, IL-18, and IFN-γ. European Journal of Immunology, Wiley Online Library Erişim: 26.05.2024, https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201444543
108. Weeratna RD, McCluskie MJ, Xu Y, Davis HL. (2000). CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine*, 18(17):1755-62.
109. Weeratna RD, Makinen SR, McCluskie MJ, Davis HL. (2005). TLR agonists as vaccine adjuvants: comparison of CpG ODN and Resiquimod (R-848). *Vaccine*, 23(45):5263-70.
110. Mutwiri G, Gerdts V, van Drunen Littel-van den Hurk S, Auray G, Eng N, Garlapati S. (2011). Combination adjuvants: the next generation of adjuvants? Expert. *Review of Vaccines*, 10(1):95-107.
111. Using 3 TLR ligands as a combination adjuvant induces qualitative changes in T cell responses needed for antiviral protection in mice. Erişim: 26.05.2024, https://www.jci.org/articles/view/39293
112. Mucosal Immunization with Helicobacter, CpG DNA, and Cholera Toxin Is Protective. Erişim: 25.05.2024, https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/iai.71.1.40-46.2003
113. GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives: Expert Review of Vaccines: Erişim: 26.05.2024, https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/14760584.6.5.723
114. Mutwiri G, Benjamin P, Soita H, Babiuk LA. (2008). Co-administration of polyphosphazenes with CpG oligodeoxynucleotides strongly enhances immune responses in mice immunized with Hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine*, 26(22):2680-8.
115. Kovacs-Nolan J, Latimer L, Landi A, Jenssen H, Hancock REW, Babiuk LA. (2009). The novel adjuvant combination of CpG ODN, indolicidin and polyphosphazene induces potent antibody- and cell-mediated immune responses in mice. *Vaccine,* 27(14):2055-64.
116. Mitchell LA, Joseph A, Kedar E, Barenholz Y, Galun E. (2006). Mucosal immunization against hepatitis A: Antibody responses are enhanced by co-administration of synthetic oligodeoxynucleotides and a novel cationic lipid. *Vaccine*, 24(25):5300-10.
117. Riedl K, Riedl R, von Gabain A, Nagy E, Lingnau K. (2008). The novel adjuvant IC31® strongly improves influenza vaccine-specific cellular and humoral immune responses in young adult and aged mice. *Vaccine*, 26(27):3461-8.
118. Enhancement of the priming efficacy of DNA vaccines encoding dendritic cell-targeted antigens by synergistic toll-like receptor ligands. Erişim: 26.05.2024, https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2172-10-43
119. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H.(2009). AS04, an Aluminum Salt- and TLR4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity1. *The Journal of Immunology*,183(10):6186-97.
120. Jain V, Vyas SP, Kohli DV. (2009). Well-defined and potent liposomal hepatitis B vaccines adjuvanted with lipophilic MDP derivatives. Nanomedicine: *Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5(3):334-44.
121. Lombard M, Pastoret PP, Moulin AM. (2007). A brief history of vaccines and vaccination. *Rev Sci Tech*, 26(1):29-48.
122. Emulsion Types, Stability Mechanisms and Rheology: A Review by Abdurahman Hamid Nour . Erişim: 25.05.2024, https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3324905
123. Influence of Surfactant Structure on the Stability of Water-in-Oil Emulsions under High-Temperature High-Salinity Conditions. Erişim: 20.05.2024, https://www.hindawi.com/journals/jchem/2017/5471376/
124. Solid-in-Oil-in-Water Emulsion: An Innovative Paradigm to Improve Drug Stability and Biological Activity. Erişim: 25.05.2024, https://link.springer.com/article/10.1208/s12249-021-02074-y

125. Bozkir A, Hayta G. (2004). Preparation and Evaluation of Multiple Emulsions Water-in-oil-in-water (w/o/w) as Delivery System for Influenza Virus Antigens. *Journal of Drug Targeting*, 12(3):157-64.
126. IN VITRO DRUG RELEASE FROM W/O/W MULTIPLE EMULSIONS. Erişim: 25.05.2024, https://www.proquest.com/openview/9f8bccfa4c8a175cf4d474543191aefb/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y
127. Dickinson E. (2011). Double Emulsions Stabilized by Food Biopolymers. *Food Biophysics*, 6(1):1-11.
128. Pawlik A, Cox PW, Norton IT. (2010). Food grade duplex emulsions designed and stabilised with different osmotic pressures. *Journal of Colloid and Interface Science*, 352(1):59-67.
129. Sjöblom J. (2010). Emulsions and emulsion stability. Erişim: 25.05.2024, https://api.taylorfrancis.com/content/books/mono/download?identifierName=doi&identifierValue=10.1201/9781420028089&type=googlepdf
130. Rosen MJ, Kunjappu T. (2012). J Surfactants and Interfacial Phenomena. *John Wiley & Sons*, 6(2): 62-562.
131. Garti N, Bisperink C. (1998). Double emulsions: Progress and applications. Current Opinion in *Colloid & Interface Science*, 3(6):657-67.
132. Garti N. (1997). Progress in Stabilization and Transport Phenomena of Double Emulsions in Food Applications. *LWT - Food Science and Technology*, 30(3):222-35.
133. Hino T, Kawashima Y, Shimabayashi S. (2000). Basic study for stabilization of w/o/w emulsion and its application to transcatheter arterial embolization therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45(1):27-45.
134. Martău GA, Mihai M, Vodnar DC. (2019). The Use of Chitosan, Alginate, and Pectin in the Biomedical and Food Sector—Biocompatibility, Bioadhesiveness, and Biodegradability. *Polymers*, 11(11):1837.
135. Chitosan and alginate salt as biomaterials are potential natural adjuvants for killed cholera vaccine. Erişim: 25.05.2024, https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.a.37240
136. Lack of Cross-Protection against Diarrhea Due to Vibrio cholerae O139 (Bengal Strain) after Oral Immunization of Rabbits with V. cholerae O1 Vaccine Strain CVD103-HgR. Erişim: 25.05.2024, https://academic.oup.com/jid/article/169/1/230/896222
137. Mallakpour S, Azadi E, Hussain CM. (2021). Chitosan, alginate, hyaluronic acid, gums, and β-glucan as potent adjuvants and vaccine delivery systems for viral threats including SARS-CoV-2: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182:1931-40.
138. Mosafer J, Sabbaghi AH, Badiee A, Dehghan S, Tafaghodi M. (2019). Preparation, characterization and in vivo evaluation of alginate-coated chitosan and trimethylchitosan nanoparticles loaded with PR8 influenza virus for nasal immunization. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(2):216-21.
139. Biodegradable Cationic Polycarbonates as Vaccine Adjuvants. Erişim: 25.05.2024, ACS Applied Materials & Interfaces: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsami.0c09649.
140. Biodegradable polymeric microsphere-based vaccines and their applications in infectious diseases. Erişim: 26.05.2024, https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2015.1009345
141. Vaccine Adjuvants. Derived from Marine Organisms:Biomolecules. Erişim: 25.05.2024, https://www.mdpi.com/2218-273X/9/8/340.
142. Scherließ R, Buske S, Young K, Weber B, Rades T, Hook S. (2013). In vivo evaluation of chitosan as an adjuvant in subcutaneous vaccine formulations. *Vaccine*, 31(42):4812-9.
143. Khademi F, Taheri RA, Yousefi Avarvand A, Vaez H, Momtazi-Borojeni AA, Soleimanpour S. (2018). Are chitosan natural polymers suitable as adjuvant/delivery system for anti-tuberculosis vaccines?. *Microbial Pathogenesis*, 121:218-23.
144. van der Laan JW, Gould S, Tanir JY. (2015). Safety of vaccine adjuvants: Focus on autoimmunity. *Vaccine*, 24 Mart;33(13):1507-14.
145. Okochi H, Nakano M. (2000). Preparation and evaluation of w/o/w type emulsions containing vancomycin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45(1):5-26.
146. Salt JS, Barnett PV, Dani P, Williams L. (1998). Emergency vaccination of pigs against foot-and-mouth disease: protection against disease and reduction in contact transmission. *Vaccine*, 16(7):746-54.
147. Preparation and characterization of polyoxyethylene dehydrated mannitol mono oleate as hydrophilic emulsifier potentially used in w/o/w type adjuvants: Journal of Dispersion Science and Technology. Erişim: 25.05.2024, https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01932691.2019.1701488
148. Hou W, Papadopoulos KD. (1997). W1/O/W2 and O1/W/O2 globules stabilized with Span 80 and Tween 80. Colloids and Surfaces A. *Physicochemical and Engineering Aspects*, 125(2):181-7.
149. Stability Study of W/O/W Viscosified Multiple Emulsions: Drug Development and Industrial Pharmacy. Erişim: 25.05.2024, https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/DDC-100100990

150. A stable W/O/W multiple emulsion. Erişim: 25.05.2024, https://cir.nii.ac.jp/crid/1572543026541580160.
151. I. EE, W. G. M, A. H. I, Walaa S. (2020). Immuno-Potentiator Effect Of Rapeseed Or Soybean Oil With Foot And Mouth Disease Vaccine In Calves. *Journal of Applied Veterinary Sciences*, 5(3):92-102.
152. Xu H, Niu Y, Hong W, Liu W, Zuo X, Bao X. (2020). Development of a water-in-oil-in-water adjuvant for foot-and-mouth disease vaccine based on ginseng stem-leaf saponins as an immune booster. Comparative Immunology, *Microbiology and Infectious Diseases*, 71:101499.
153. Response to foot-and-mouth disease vaccines in newborn calves. Influence of age, colostral antibodies and adjuvants. Epidemiology & Infection: Erişim: 25.05.2024, https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/response-to-footandmouth-disease-vaccines-in-newborn-calves-influence-of-age-colostral-antibodies-and-adjuvants/1EEA232B0398A2DC496357DCA5C4C495
154. Jiao J, Burgess DJ. (2015). Rheology and stability of water-in-oil-in-water multiple emulsions containing Span 83 and Tween 80. *AAPS PharmSci*, 55(1):7.
155. Optimization of chitosan-coated W/O/W multiple emulsion stabilized with Span 80 and Tween 80 using Box–Behnken design. *Journal of Dispersion Science and Technology*, Erişim: 25.05.2024, https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01932691.2020.1774387
156. Fukanoki S ichi, Matsumoto K, Mori H, Takeda R. (2000). Relationship between Antigen Release and Antibody Response of Infectious Coryza Water-in-Oil-in-Water Emulsion Vaccines. *Avian Diseases*, 44(4):869-73.
157. Economics of animal vaccination. Erişim: 02.06.2024, https://europepmc.org/article/med/17892154
158. Plotkin S, Robinson JM, Cunningham G, Iqbal R, Larsen S. (2017). The complexity and cost of vaccine manufacturing – An overview. *Vaccine*, 35(33):4064-71.
159. Schulz PC, Rodríguez MS, Del Blanco LF, Pistonesi M, Agulló E. (1998). Emulsification properties of chitosan. *Colloid Polym Sci.*, 276(12):1159-65.
160. Neimert-Andersson T, Hällgren AC, Andersson M, Langebäck J, Zettergren L, Nilsen-Nygaard J. (2011). Improved immune responses in mice using the novel chitosan adjuvant ViscoGel, with a Haemophilus influenzae type b glycoconjugate vaccine. *Vaccine*, 29(48):8965-73.
161. Amidi M, Mastrobattista E, Jiskoot W, Hennink WE. (2010). Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Advanced drug delivery reviews*, 62(1):59-82.
162. Some Fundamentals of the One-Step Formation of Double Emulsions: Journal of Dispersion Science and Technology: Erişim: 02.06.2024, https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01932690903224656
163. Seifritz W (1980). Encyclopedia of Emulsion Technology, Erişim: 02.06.2024, https://www.google.com/search?q=Encyclopedia+of+Emulsion+Technology%2C+Vol+2.+Marcel+Dekker%2C+New+York%2C+p+159%3B+Seifritz+W+(1980)+J+Phys+Chem+29%3A738&rlz=1C1GCEU_trTR1099TR1099&oq=Encyclopedia+of+Emulsion+Technology%2C+Vol+2.+Marcel+Dekker%2C+New+York%2C+p+159%3B+Seifritz+W+(1980)+J+Phys+Chem+29%3A738&gs_lcrp=EgZjaHJvbWUyBggAEEUYOdIBBzI0M2owajSoAgCwAgE&sourceid=chrome&ie=UTF-8
164. Garti N, Frenkel M, Shwartz R. (1983). Multiple Emulsions. Part Ii: Proposed Technique to Overcome Unpleasant Taste of Drugs. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 4(3):237-52.
165. Mancebo A, Casacó A, González B, Ledón N, Sorlozabal J, León A. (2012). Repeated dose intramuscular injection of the CIMAvax-EGF vaccine in Sprague Dawley rats induces local and systemic toxicity. *Vaccine*, 30(22):3329-38.
166. Huang CH, Huang CY, Cheng CP, Dai SH, Chen HW, Leng CH. (2016). Degradable emulsion as vaccine adjuvant reshapes antigen-specific immunity and thereby ameliorates vaccine efficacy. *Sci Rep*., 6(1):36732.
167. Huang MH, Huang CY, Lien SP, Siao SY, Chou AH, Chen HW. (2009). Development of Multi-Phase Emulsions Based on Bioresorbable Polymers and Oily Adjuvant. *Pharm Res.*, 26(8):1856-62.
168. Poly(N-vinyl-pyrrolidone)-block-poly(D, L-lactide) as polymeric emulsifier for the preparation of biodegradable nanoparticles, Erişim: 25.05.2024, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17387697/
169. Todd CW, Balusubramanian M, Newman MJ. (1998). Development of adjuvant-active nonionic block copolymers. *Adv Drug Deliv Rev*., 32(3):199-223.
170. Coumes F, Huang CY, Huang CH, Coudane J, Domurado D, Li S. (2015). Design and Development of Immunomodulatory Antigen Delivery Systems Based on Peptide/PEG–PLA Conjugate for Tuning Immunity. *Biomacromolecules*, 16(11):3666-73.
171. Athirathinam K, Nandakumar S, Kandasamy R. (2022). Biopolymers and Osmolytes - A Focus towards the Prospects of Stability and Adjuvanticity of Vaccines. *Macromol Res*., 30(9):599-608.