



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**DİFTERİ TOKSOİDİ İÇEREN IN-SITU JEL
YAPISINDAKİ ADJUVAN FORMÜLASYONLARININ
GELİŞTİRİLMESİ, IN VITRO VE IN VIVO
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Nalan Deniz ÖZTÜRK

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman BOZKIR**

2009- ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİFTERİ TOKSOİDİ İÇEREN IN-SITU JEL
YAPISINDAKİ ADJUVAN FORMÜLASYONLARININ
GELİŞTİRİLMESİ, IN VITRO VE IN VIVO
DEĞERLENDİRİLMESİ

Nalan Deniz ÖZTÜRK

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman BOZKIR

2009- ANKARA

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

Tez Savunma Tarihi: 24 / 07 / 2009

Prof. Dr. Kandemir CANEFE
Ankara Üniversitesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Nurşin GÖNÜL
Ankara Üniversitesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

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

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

Doç. Dr. Erem BİLENSOY
Hacettepe Üniversitesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	xiii
Simgeler ve Kısaltmalar	xv
Şekiller	xvii
Çizelgeler	xx
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. Aşılar	3
1.2.1. Aşıların Sınıflandırılması	4
1.2.1.1. Canlı Attenüe (Zayıflatılmış) Aşılar	5
1.2.1.2. Ölü ve İnaktif Tüm Hücre Aşıları	5
1.2.1.3. Alt Birim Aşılar	6
1.2.1.4. Rekombinant Aşılar	6
1.2.1.5. DNA Aşıları	6
1.2.2. Adjuvanlar	7
1.3. Mukozal Aşılama	10
1.3.1. Mukozal Bağışıklık Sistemi	12
1.3.1.1. M Hücreleri	13
1.3.1.2. Makrofajlar	13
1.3.1.3. B ve T Lenfositler	13
1.3.1.4. Antikorlar	14
1.3.2. Mukozal Adjuvanlar	15
1.3.2.1. Partiküler Sistemler	15
1.3.2.1.1. Mikro- ve Nano- partiküller	15
1.3.2.1.2. Lipozomlar	16

1.3.2.1.3.	Virozomlar ve Virus-Benzeri Partiküller	17
1.3.2.1.4.	Bağıışıklığı Uyaran Kompleksler (ISCOM'lar)	17
1.3.2.2.	Bağıışıklığı Uyaran Adjuvanlar	18
1.3.2.2.1.	Bakteriyel Toksinler ve Türevleri	18
1.3.2.2.2.	CpG Motifleri	18
1.3.2.2.3.	Monofosforil Lipit A	19
1.3.2.2.4.	Saponinler	19
1.3.2.2.5.	Endojen Moleküller: Sitokinler ve Kemokinler	19
1.3.2.2.6.	Canlı Vektörler	20
1.3.2.2.7.	Noniyonik Blok Kopolimerler	20
1.3.3.	Mukozal Aşı Uygulama Yolları	21
1.3.3.1.	Oral Yol	21
1.3.3.2.	Genital ve Rektal Yol	22
1.3.3.3.	Pulmoner Yol	23
1.3.3.4.	Nazal Yol	23
1.4.	Nazal Yolla Aşı Verilişı	23
1.4.1.	Burun Anatomisi ve Fizyolojisi	24
1.4.1.1.	Burun Boşluğu	25
1.4.1.2.	Burundan Mukus Salgılanması ve Mukosiliyer Klerens	26
1.4.1.3.	Burundan Absorpsiyon	27
1.4.1.3.1.	Burun Mukus Membranının Alanı	27
1.4.1.3.2.	Uygulama Hacmi	27
1.4.1.3.3.	Dozaj Formu	28
1.4.1.3.4.	Mukosiliyer Klerens	28
1.4.1.3.5.	Etkin Maddeye Bağlı Faktörler	28
1.4.1.3.6.	pH	29
1.4.1.3.7.	Tonisite	29
1.4.1.3.8.	Viskozite	29
1.4.2.	Nazal Bağışıklık Sistemi	31
1.4.2.1.	Burna Bağlı Lenfoid Doku (NALT)	31
1.4.2.2.	Intranazal Bağışıklama Sonrası Bağışık Yanıtın Oluşması	31

1.5.	Nazal Yolla Bağıışıklamayı Artırmak Üzere Formölasyon Yaklaşımları	32
1.5.1.	Jel Yapısındaki Formölasyonlar	33
1.5.2.	In-sitü Aktivasyonla Jel Oluşturan Sistemler	37
1.5.2.1.	In-sitü Jel Oluşum Mekanizmaları	38
1.5.2.1.1.	Sıcaklık Değişimi ile Jelleşen Sistemler	38
1.5.2.1.2.	pH'ya Bağlı Olarak Jelleşen Sistemler	40
1.5.2.1.3.	İyon Etkisiyle Jelleşen Sistemler	40
1.5.2.2.	Çalışmamızda Formölasyonların Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler	41
1.5.2.2.1.	Poloksamerler (Pluronik F127 ve Pluronik F68)	41
1.5.2.2.2.	Karbopol	42
1.5.2.2.3.	Hidroksipropil Selölöz ve Hidroksipropil Metil Selölöz	43
1.5.2.2.4.	Kitosan	43
1.6.	Difteri	45
1.6.1.	Difteri Toksini	45
1.6.2.	Difteri Toksoidinin Hazırlanması	46
1.6.3.	Difteri Toksoidi ile Aşılama ve Beraberindeki Sorunlar	46
1.6.4.	Difteri Toksoidinin Mevcut Preparatları ve Gelecekteki Yaklaşımlar	48
2.	GEREÇ VE YÖNTEM	49
2.1.	Gereçler	49
2.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	49
2.1.2.	Kullanılan Cihazlar	51
2.2.	Yöntemler	52
2.2.1.	Difteri Toksoidi Özelliklerinin Belirlenmesi	52
2.2.1.1.	Difteri Toksoidinin Lf Değerinin Kontrol Edilmesi	52
2.2.1.2.	Difteri Toksoidinin Spektrumu	53
2.2.1.3.	Difteri Toksoidinin MikroBikinoninik Asit (MikroBCA) Yöntemiyle Kalibrasyonu	53

2.2.1.4.	Difteri Toksoidinin MikroBikinoninik Asit (MikroBCA) Yöntemiyle Kalibrasyonunun Validasyonu	55
2.2.1.4.1.	Doğruluk	55
2.2.1.4.2.	Kesinlik	55
2.2.1.4.3.	Özgünlük	56
2.2.1.4.4.	Gözlenebilme Sınırı (LOD)	56
2.2.1.4.5.	Alt Tayin Sınırı (LOQ)	57
2.2.1.4.6.	Doğrusallık ve Aralık	57
2.2.1.5.	Difteri Toksoidinin Safılık Tayini	57
2.2.1.6.	Difteri Toksoidinin Stabilitesi	61
2.2.2.	In-Sitü Jelleşen Ön Formülasyonların Hazırlanması	61
2.2.2.1.	Poloksamer 407/ Poloksamer 188 İçeren Ön Formülasyonların Hazırlanması	61
2.2.2.2.	Farklı Mukozadezif Polimerlerin Kullanıldığı Poloksamer 407/Poloksamer 188 Ön Formülasyonlarının Hazırlanması	62
2.2.2.3.	Kitosan İçeren Ön Formülasyonların Hazırlanması	64
2.2.3.	In-sitü Jelleşen Ön Formülasyonların Karakterizasyonu	65
2.2.3.1.	Ön Formülasyonların Jelleşme Sıcaklıklarının Ölçülmesi	65
2.2.3.2.	Ön Formülasyonların Jelleşme Sürelerinin Ölçülmesi	66
2.2.3.3.	Ozmolaritenin Belirlenmesi	66
2.2.4.	Ön Formülasyonların Değerlendirilmesi ve Uygun Formüllerin Seçimi	67
2.2.5.	F14, F17, F18, F19, F20, F21, F32 Kodlu Difteri Toksoidi İçermeyen Formüller Üzerinde Yürütülen Çalışmalar	67
2.2.5.1.	Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Organoleptik Özellikleri	67
2.2.5.2.	Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin pH Tayini	67
2.2.5.3.	Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerde Reolojik Değerlendirme ve Viskozite Ölçümü	68
2.2.5.4.	Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerde Mukoadezif Gücün Tayin Edilmesi	68

2.2.6.	F14, F17, F18, F19, F20, F21, F32 Kodlu Formüllerin Difteri Toksoidi ile Hazırlanmaları	69
2.2.6.1	Difteri Toksoidinin Formüllere İlave Edilmesi	69
2.2.6.2.	Difteri Toksoidi İlavesinin Formüllerin Jelleşme Sıcaklığı Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi	70
2.2.6.3.	Difteri Toksoidi İçeren Formüllerin Organoleptik Özellikleri	70
2.2.7.	F14, F17, F18, F19, F20, F21, F32 Kodlu Difteri Toksoidi İçeren Formüllerde In vitro Testler	70
2.2.7.1.	Difteri Toksoidi Miktar Tayini	70
2.2.7.2.	Difteri Toksoidi İçeren Formüllerde In vitro Salım Çalışmaları	71
2.2.8.	Stabilite Çalışmaları	71
2.2.8.1.	Difteri Toksoidi İçermeyen F14, F17, F18, F19, F32 Kodlu Formüllerin Stabilite Çalışmaları	72
2.2.8.2.	Difteri Toksoidi İçeren F14, F17, F18, F19, F32 Kodlu Formüllerin Stabilite Çalışmaları	72
2.2.9.	In vivo Çalışmalar	73
2.2.9.1.	Deney Hayvanlarının Seçimi	73
2.2.9.2.	Deney Hayvanlarının Özellikleri	73
2.2.9.3.	Formülasyonların Seçimi ve Hazırlanması	73
2.2.9.4.	Uygulama Dozunun Belirlenmesi	74
2.2.9.5.	In vivo Aşılama Planı ve Deney Hayvanlarından Kan Alma	75
2.2.9.6.	Subkütan ve Intranazal Toksisite Testi	77
2.2.10.	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	77
2.2.11.	Hücre Kültüründe Antikor Nötralizasyon Testi	78
2.2.12.	İstatistiksel Analizler	79
3.	BULGULAR	80
3.1.	Difteri Toksoidi Özelliklerinin Belirlenmesine Ait Bulgular	80
3.1.1.	Difteri Toksoidinin Lf Değerinin Belirlenmesine Ait Bulgular	80
3.1.2.	Difteri Toksoidinin UV Spektrumuna Ait Bulgular	80

3.1.3.	Difteri Toksoidinin MikroBikinoninik Asit (MikroBCA) Yöntemiyle Kalibrasyonuna Ait Bulgular	82
3.1.4.	Difteri Toksoidinin MikroBikinoninik Asit (MikroBCA) Yöntemiyle Kalibrasyonunun Validasyonuna Ait Bulgular	83
3.1.4.1.	Doğruluk	83
3.1.4.2.	Kesinlik	85
3.1.4.2.1.	Tekrarlanabilirlik	85
3.1.4.2.2.	Ara Kesinlik	86
3.1.4.3.	Özgünlük	88
3.1.4.4.	Gözlenebilme Sınırı	88
3.1.4.5.	Alt Tayin Sınırı	89
3.1.4.6.	Doğrusallık ve Aralık	89
3.1.5.	Difteri Toksoidinin Saflık Tayinine Ait Bulgular	91
3.1.6.	Difteri Toksoidinin Stabilesine Ait Bulgular	92
3.2.	In-sitü Jelleşen Ön Formülasyonların Hazırlanmasına Ait Bulgular	93
3.3.	In-sitü Jelleşen Ön Formülasyonların Karakterizasyonu	93
3.3.1.	Ön Formülasyonların Jelleşme Sıcaklıklarına Ait Bulgular	94
3.3.2.	Ön Formülasyonların Jelleşme Sürelerine Ait Bulgular	98
3.3.3.	Ön Formülasyonların Ozmolaritelerine Ait Bulgular	98
3.4.	Ön Formülasyonların Değerlendirilmesi ve Uygun Formüllerin Seçimi	99
3.5.	F14, F17, F18, F19, F20, F21, F32 Kodlu Difteri Toksoidi İçermeyen Formüller Üzerinde Yürütülen Çalışmalara Ait Bulgular	99
3.5.1.	Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Organoleptik Özelliklerine Ait Bulgular	99
3.5.2.	Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin pH Değerlerine Ait Bulgular	99
3.5.3.	Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerde Reolojik Değerlendirme ve Viskozite Ölçümüne Ait Bulgular	100

3.5.4.	Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Mukoadezif Güçlerine Ait Bulgular	104
3.6.	F14, F17, F18, F19, F20, F21, F32 Kodlu Formülasyonların Difteri Toksoidi ile Hazırlanmalarına Ait Bulgular	104
3.6.1.	Difteri Toksoidinin Formüllere İlave Edilmesine Ait Bulgular	104
3.6.2.	Difteri Toksoidi İlavesinin Formüllerin Jelleşme Sıcaklığı Üzerindeki Etkisine Ait Bulgular	105
3.6.3.	Difteri Toksoidi İçeren Formüllerin Organoleptik Özelliklerine Ait Bulgular	105
3.7.	F14, F17, F18, F19, F20, F21, F32 Kodlu Difteri Toksoidi İçeren Formüllerde In vitro Testlere Ait Bulgular	106
3.7.1.	Difteri Toksoidi Miktar Tayinine Ait Bulgular	106
3.7.2.	Difteri Toksoidi İçeren Formüllerin In vitro Salım Çalışmalarına Ait Bulgular	107
3.8.	Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular	107
3.8.1.	Difteri Toksoidi İçermeyen F14, F17, F18, F19, F32 Kodlu Formüllerin Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular	108
3.8.1.1.	Stabilite Çalışmasında Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Organoleptik Özelliklerine Ait Bulgular	108
3.8.1.2.	Stabilite Çalışmasında Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin pH Değerlerine Ait Bulgular	110
3.8.1.3.	Stabilite Çalışmasında Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Reolojik Davranış ve Viskozitelerine Ait Bulgular	111
3.8.1.4.	Stabilite Çalışmasında Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Jelleşme Sıcaklıklarına Ait Bulgular	112
3.8.2.	Difteri Toksoidi İçeren F14, F17, F18, F19, F32 Kodlu Formüllerin Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular	115
3.8.2.1.	Stabilite Çalışmasında Difteri Toksoidi İçeren Formüllerin Miktar Tayinine Ait Bulgular	115

3.8.2.2.	Stabilite Çalışmasında Difteri Toksoidi İçeren Formüllerde Protein Bütünlüğü Tayinine Ait Bulgular	116
3.9.	In vivo Çalışmalara Ait Bulgular	120
3.9.1.	Formülasyonların Seçimi ve Hazırlanmasına Ait Bulgular	120
3.9.2.	Subkütan ve Intranazal Toksisite Testine Ait Bulgular	120
3.9.3.	ELISA Testine Ait Bulgular	120
3.9.4.	Hücre Kültüründe Antikor Nötralizasyon Testine Ait Bulgular	121
4.	TARTIŞMA	131
4.1.	Difteri Toksoidinin Özelliklerinin Belirlenmesi	131
4.2.	Ön Formülasyon Hazırlama Çalışmalarının Değerlendirilmesi	134
4.3.	In-sitü Jelleşen Ön Formülasyonların Karakterizasyonlarının Değerlendirilmesi	135
4.3.1.	Ön Formülasyonların Jelleşme Sıcaklıklarının Değerlendirilmesi	135
4.3.2.	Ön Formülasyonların Jelleşme Sürelerinin Değerlendirilmesi	137
4.4.	Ön Formülasyonların ve Uygun Formüllerin Seçimi	137
4.5.	F14, F17, F18, F19, F20, F21, F32 Kodlu Difteri Toksoidi İçermeyen Formüller Üzerinde Yürütülen Çalışmalara Ait Bulgular	137
4.5.1.	Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin pH Ölçümlerinin Değerlendirilmesi	137
4.5.2.	Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Reolojik Deneyleri ve Viskozitelerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	138
4.5.3.	Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Mukoadezif Güçlerinin Değerlendirilmesi	139
4.6.	F14, F17, F18, F19, F20, F21, F32 Kodlu Formülasyonların Difteri Toksoidi ile Hazırlanmalarına Ait Bulgular	140

4.6.1.	Difteri Toksoidi İlavesinin Formülasyonların Jelleşme Sıcaklığı Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi	140
4.7.	F14, F17, F18, F19, F20, F21, F32 Kodlu Difteri Toksoidi İçeren Formüllerde In vitro Testlerin Değerlendirilmesi	140
4.7.1.	Difteri Toksoidi Miktar Tayini Bulgularının Değerlendirilmesi	140
4.7.2.	Difteri Toksoidi İçeren Formüllerin In vitro Salım Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	141
4.8.	Stabilite Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	143
4.8.1.	Difteri Toksoidi İçermeyen F14, F17, F18, F19 ve F32 Kodlu Formüllerin Stabilite Çalışmalarının Değerlendirilmesi	143
4.8.1.1.	Stabilite Çalışmasında Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Organoleptik Özelliklerinin Değerlendirilmesi	144
4.8.1.2.	Stabilite Çalışmasında Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin pH Sonuçlarının Değerlendirilmesi	144
4.8.1.3.	Stabilite Çalışmasında Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Reolojik Davranış ve Viskozite Bulgularının Değerlendirilmesi	145
4.8.1.4.	Stabilite Çalışmasında Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Jelleşme Sıcaklıklarının Değerlendirilmesi	145
4.8.2.	Difteri Toksoidi İçeren F14, F17, F18, F19, F32 Kodlu Formüllerin Stabilite Çalışmalarının Değerlendirilmesi	146
4.8.2.1.	Stabilite Çalışmasında Difteri Toksoidi İçeren Formüllerin Miktar Tayini Bulgularının Değerlendirilmesi	146
4.8.2.2.	Stabilite Çalışmasında Difteri Toksoidi İçeren Formüllerde Protein Bütünlüğü Tayini Sonuçlarının Değerlendirilmesi	147
4.9.	In vivo Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi	148
4.9.1.	Formülasyonların Seçimi ve Hazırlanmasına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	148
4.9.2.	ELISA'ya Ait Bulguların Değerlendirilmesi	148
4.9.3.	Hücre Kültüründe Antikor Nötralizasyon Testine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	149

5. SONUÇ VE ÖNERİLER	152
ÖZET	154
SUMMARY	155
KAYNAKLAR	156
ÖZGEÇMİŞ	171

ÖNSÖZ

Bu yüksek lisans tez çalışması ile model etkin madde difteri toksoidinin intranazal yoldan uygulanması ve oluşturacağı hem lokal hem de sistemik bağışık yanıtın artırılması amacıyla in-sitü jel formülasyonları geliştirilmiştir. Araştırmalar; formüllerin hazırlanması, in vitro testler ve in vivo hayvan deneylerini içermektedir.

Tez çalışmamı yöneten, bilgi ve tecrübesiyle her zaman bana destek olan danışmanım Prof. Dr. Sayın Asuman Bozkır'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım esnasında bana her imkanı sağlayan A.Ü. Eczacılık Fakültesi Teknoloji Bölümü ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sayın Nurten Özdemir başta olmak üzere tüm öğretim üye ve yardımcılarına, araştırma görevlilerine teşekkür ederim.

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

In vivo deneyler esnasındaki çalışmaları ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Biyolojik Kontrol ve Araştırma Laboratuvarı Şefi Sayın Filiz Koç'a, Sayın Nüvide Doğan'a ve Sayın İlhan Bozyiğit'e çok teşekkür ederim.

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

Tez çalışmam süresince anlayış ve tecrübeleriyle bana destek olan başta Prof. Dr. Sayın Atilla Hıncal ve Ecz. Sayın Necla İnce Koca olmak üzere tüm İDE mensuplarına teşekkürü bir borç bilirim.

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

Bu tez çalışmasının başından sonuna kadar her anında yanımda olan, sabrı ve ilgisiyle bana güç veren Ecz. Serkan Özbilgin'e minnettarım.

Desteğini her an hissettiğim, zor anlarımda beni yalnız bırakmayan değerli arkadaşım Ecz. Selin Çoban'a,

Deneylerim ve tez yazım aşamamda verdikleri destekten dolayı Uzm. Ecz. Burcu Devrim'e ve Uzm. Ecz. Berrin Başaran'a, Çalışmam süresince destekleriyle yanımda olan arkadaşlarım Uzm. Ecz. Berna Türkmen'e, Uzm. Ecz. Gülin Amasya'ya, Uzm. Ecz. Günseli Yüksel'e teşekkür ederim.

Sevgi ve güvenleriyle bana destek olan, sıkıntı ve sevincimi benimle paylaşan aileme tüm kalbimle sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ASH	Antijen sunucu hücre
BALT	Bronşlara bağlı lenfoid doku
BN	Bağıl Nem
cgc	Kritik jel konsantrasyonu
cmc	Kritik misel konsantrasyonu
DT	Difteri Toksoidi
FDA	Food and Drug Administration
GALT	Bağırsağa bağlı lenfoid doku
HPC	Hidroksipropil selüloz
HPMC	Hidroksipropil metil selüloz
IgA	İmmünoglobulin A
IgE	İmmünoglobulin E
i.n.	Intranazal
KT	Kolera toksini
LMW	Düşük molekül ağırlıklı
Lf	Flokülasyon Değeri
LT	Isıya dayanıksız enterotoksin
MALT	Mukozaya bağlı lenfoid doku
MikroBCA	MikroBikinoninik Asit
M hücreler	Mikrofold hücreler
MMW	Orta molekül ağırlıklı
NALT	Burna bağlı lenfoid doku
ODN	Oligodeoksinükleotit
OPD	o-Fenildiamin Dihidroklörür
PBS	Fosfat tampon tuzu
PLGA	Poli-laktik-ko-glikolik asitleri
s.c.	Subkütan
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
SH	Standart Hata

SS	Standart Sapma
STL	Sitotoksik T hücreleri
T _h	Yardımcı T hücreleri

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Mukozal yüzeylerde antijen örnekleme: epitel ve dendritik hücrelerin (DT) işbirliği	12
Şekil 1.2.	İnsan burnunun anatomik yapısı	25
Şekil 1.3.	Nazal epiteldeki hücre tipleri	26
Şekil 1.4.	NALT ve nazal mukoza yolu ile lokal mukozal yanıt ve sistemik yanıt ya da tolerans oluşturan yolların şeması	32
Şekil 1.5.	Poloksamer 407'nin kimyasal yapısı	38
Şekil 1.6.	Blok kopolimer çözeltisindeki kritik misel konsantrasyonu (cmc) ve kritik jel konsantrasyonunun (cgc) şematik görünümü	39
Şekil 1.7.	Sıcaklığın artmasıyla Poloksamerler tarafından oluşturulan miseller fazların şematik görünümü	39
Şekil 1.8.	Karbomer resindeki akrilik asit monomer birimi	42
Şekil 1.9.	Kitin ve kitosanın yapısı	44
Şekil 2.1.	Formülasyonların hazırlanması	64
Şekil 2.2.	Mukoadeziflik ölçümünde kullanılan aletin fotoğrafı	69
Şekil 2.3.	Kobayların intranazal yoldan aşılınması	74
Şekil 3.1.	Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS içindeki spektrumu	81
Şekil 3.2.	Difteri toksoidinin pH 4,5 asetat tamponu içindeki spektrumu	81
Şekil 3.3.	Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS içinde kalibrasyon grafiği	82
Şekil 3.4.	Difteri toksoidinin pH 4,5 asetat tamponu içinde kalibrasyon grafiği	82
Şekil 3.5.	Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS içinde doğrusallık grafiği	90

Şekil 3.6.	Difteri toksoidinin pH 4,5 asetat tamponu içinde doğrusallık grafiği	90
Şekil 3.7.	Difteri toksoidinin saflığını gösteren SDS-PAGE jeli	92
Şekil 3.8.	Difteri toksoidi içermeyen F14, F17, F18, F19, F20, F21 ve F32 kodlu formüllerin 25°C'de ölçülen farklı kayma hızlarındaki viskoziteleri (Jelleşmeden önce)	103
Şekil 3.9.	Difteri toksoidi içermeyen F14, F17, F18, F19, F20, F21 ve F32 kodlu formüllerin 34°C'de ölçülen farklı kayma hızlarındaki viskoziteleri (Jelleştikten sonra)	103
Şekil 3.10.	Difteri toksoidinin jelleşme sıcaklığı üzerindeki etkisi	105
Şekil 3.11.	F14, F17, F18, F19, F20, F21 ve F32 kodlu formüllerden difteri toksoidinin in vitro salım profilleri	107
Şekil 3.12.	Difteri toksoidi içermeyen ve 2-8°C'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında ölçülen jelleşme sıcaklıkları (n=3, Ortalama $\pm$ SH)	114
Şekil 3.13.	Difteri toksoidi içermeyen ve 25 $\pm$ 2°C'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında ölçülen jelleşme sıcaklıkları (n=3, Ortalama $\pm$ SH)	114
Şekil 3.14.	Saf DT'nin ve DT içeren formülasyonların başlangıçtaki SDS-PAGE jel görüntüsü	117
Şekil 3.15.	2-8°C'de saklanan saf DT'nin ve DT içeren formülasyonların III. ay sonundaki SDS-PAGE jel görüntüsü	117
Şekil 3.16.	25 $\pm$ 2°C'de saklanan saf DT'nin ve DT içeren formülasyonların III. ay sonundaki SDS-PAGE jel görüntüsü	118
Şekil 3.17.	2-8°C'de saklanan saf DT'nin (pH 7,4 PBS içinde hazırlanıp uygulanmış) III. ay sonundaki SDS-PAGE jel görüntüsü	119
Şekil 3.18.	2-8°C'de saklanan saf DT'nin (pH 4.5 asetat tamponu içinde hazırlanıp uygulanmış) III. ay sonundaki SDS-PAGE jel görüntüsü	119

Şekil 3.19.	Dokuz farklı grubun belli zaman aralıklarında serumlarında ölçülen antikor nötralizasyon titreleri (n=5, Ortalama $\pm$ SH)	122
Şekil 3.20.	Deney hayvanlarının sadece başlangıçta subkütan yoldan aşılanmaları sonrası 42. günde oluşan antikor nötralizasyon titreleri (n=5, Ortalama $\pm$ SH)	123
Şekil 3.21.	Deney hayvanlarının başlangıçta subkütan + 21. günde intranazal yoldan aşılanmaları sonrası 42. günde oluşan antikor nötralizasyon titreleri (n=5, Ortalama $\pm$ SH)	124
Şekil 3.22.	Deney hayvanlarının başlangıçta subkütan + 21. günde intranazal ya da sadece başlangıçta subkütan yoldan aşılanmaları sonrası 42. günde oluşan antikor nötralizasyon titreleri (n=5, Ortalama $\pm$ SH)	125
Şekil 3.23.	Deney hayvanlarının F18 ile başlangıçta subkütan + 21. günde intranazal yoldan aşılanmaları sonrası zamana karşı oluşan antikor nötralizasyon titreleri (n=5, Ortalama $\pm$ SH)	126
Şekil 3.24.	Deney hayvanlarının F32 ile başlangıçta subkütan + 21. günde intranazal yoldan aşılanmaları sonrası zamana karşı oluşan antikor nötralizasyon titreleri (n=5, Ortalama $\pm$ SH)	127
Şekil 3.25.	Deney hayvanlarının F32 ile sadece başlangıçta subkütan yoldan aşılanmaları sonrası zamana karşı oluşan antikor nötralizasyon titreleri (n=5, Ortalama $\pm$ SH)	128

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Aşıların sınıflandırılması	5
Çizelge 1.2.	Aşı adjuvanları	9
Çizelge 1.3.	Mukozal yoldan verilşte formülasyon örnekleri	35
Çizelge 1.4.	Difteriye karşı antitoksin düzeyleri ve bağışıklık	48
Çizelge 2.1.	Difteri toksoidine ait Lf değerinin kontrol edilmesi	53
Çizelge 2.2.	SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler	59
Çizelge 2.3.	Poloksamer 407/Poloksamer 188 karışımı içeren in-sitü jelleşen ön formülasyonlar	62
Çizelge 2.4.	Difteri toksoidi içermeyen farklı mukoadezif polimerlerin kullanıldığı Poloksamer 407/ Poloksamer 188 karışımı içeren in-sitü jelleşen ön formülasyonlar	63
Çizelge 2.5.	Kitosan içeren ön formülasyonların içeriği	65
Çizelge 2.6.	In vivo çalışma grupları, aşılama zamanları ve aşılama yolları	76
Çizelge 3.1.	Difteri toksoidinin kalibrasyon doğrularına ait parametreler	83
Çizelge 3.2.	Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS içindeki doğruluk bulguları	84
Çizelge 3.3.	Difteri toksoidinin pH 4,5 asetat tamponu içindeki doğruluk bulguları	84
Çizelge 3.4.	Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS ortamındaki tekrarlanabilirlik bulguları	85
Çizelge 3.5.	Difteri toksoidinin pH 4,5 asetat tamponu ortamındaki tekrarlanabilirlik bulguları	86
Çizelge 3.6.	Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS ortamındaki ara kesinlik bulguları	87
Çizelge 3.7.	Difteri toksoidinin pH 4,5 asetat tamponu ortamındaki ara kesinlik bulguları	87
Çizelge 3.8.	Difteri toksoidinin LOD değerleri	88

Çizelge 3.9.	Difteri toksoidinin LOQ değerleri	89
Çizelge 3.10.	Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS ve pH 4,5 asetat tamponu içerisindeki doğrusallık parametreleri	91
Çizelge 3.11.	2-8°C'de bekletilen difteri toksoidinin % kalan miktarı (n=3, Ortalama $\pm$ SH)	92
Çizelge 3.12.	Ön formülasyonların jelleşme sıcaklıkları	95
Çizelge 3.13.	Formülasyonların jelleşme süresi sonuçlarının dağılımı	98
Çizelge 3.14.	Difteri toksoidi içermeyen formüllerin pH ölçüm sonuçları (n=3)	100
Çizelge 3.15.	Difteri toksoidi içermeyen formüllerin 10 rpm ve 25°C'de ölçülen viskozite değerleri (n=3)	101
Çizelge 3.16.	Difteri toksoidi içermeyen formüllerin 10 rpm ve 34°C'de ölçülen viskozite değerleri (n=3)	101
Çizelge 3.17.	Difteri toksoidi içermeyen formüllerin 20 rpm ve 25°C'de ölçülen viskozite değerleri (n=3)	102
Çizelge 3.18.	Difteri toksoidi içermeyen formüllerin 20 rpm ve 34°C'de ölçülen viskozite değerleri (n=3)	102
Çizelge 3.19.	Difteri toksoidi içermeyen formüllerin mukoadhezif güç değerleri (n=3, Ortalama $\pm$ SH)	104
Çizelge 3.20.	Formüllerde ölçülen difteri toksoidi miktarları (n=3)	106
Çizelge 3.21.	Difteri toksoidi içermeyen ve 2-8°C'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında incelenen organoleptik özellikleri	109
Çizelge 3.22.	Difteri toksoidi içermeyen ve 25 $\pm$ 2°C'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında incelenen organoleptik özellikleri	110
Çizelge 3.23.	Difteri toksoidi içermeyen ve 2-8°C'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında ölçülen pH değerleri (n=3, Ortalama $\pm$ SH)	111

Çizelge 3.24.	Difteri toksoidi içermeyen ve $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında ölçülen pH değerleri (n=3, Ortalama $\pm$ SH)	111
Çizelge 3.25.	Difteri toksoidi içermeyen ve $2-8^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında 25°C ve 10 rpm'de ölçülen viskozite değerleri (n=3, Ortalama $\pm$ SH)	112
Çizelge 3.26.	Difteri toksoidi içermeyen ve $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında 25°C ve 10 rpm'de ölçülen viskozite değerleri (n=3, Ortalama $\pm$ SH)	112
Çizelge 3.27.	Difteri toksoidi içermeyen ve $2-8^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında ölçülen jelleşme sıcaklıkları (n=3, Ortalama $\pm$ SH)	113
Çizelge 3.28.	Difteri toksoidi içermeyen ve $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında ölçülen jelleşme sıcaklıkları (n=3, Ortalama $\pm$ SH)	113
Çizelge 3.29.	Difteri toksoidi içeren ve $2-8^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında ölçülen difteri toksoidi miktarları (n=3, Ortalama $\pm$ SH)	115
Çizelge 3.30.	Difteri toksoidi içeren ve $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında ölçülen difteri toksoidi miktarları (n=3, Ortalama $\pm$ SH)	116
Çizelge 3.31.	In vivo sonuçların Kruskal-Wallis çoklu karşılaştırma testine (Dunn Testi) göre istatistiksel açıdan değerlendirilmesi	129

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Aşıların geliştirilmesi, bağışıklamanın tıp ve halk sağlığına kazandırdığı en önemli katkılardan birisidir. Aşılama, gerek enfeksiyonel hastalıkların önlenmesi gerek ölümlerin azaltılmasında en etkili ve en güvenilir yoldur. Aşıların bağışıklamada kullanılmasıyla her yıl yaklaşık üç milyon yaşam kurtarılmaktadır (Bellamy ve Freedman, 2005; Matthias ve ark., 2007).

Modern biyoteknoloji, günümüzdeki aşı çalışmaları üzerinde oldukça etkilidir. Patojenlerin moleküler yapılarının aydınlatılması ve immünolojide son yıllardaki ilerlemeler koruyucu antijenlerin tanınmasını sağlamıştır. Aşı üretimindeki modern gelişmelere rağmen her yeni aşının maliyeti yüksek olmakta ve yan etkileri görülmektedir. Bu nedenle aşılamının temel amacı, yüksek oranda koruyuculuk sağlayan ve en düşük oranda yan etki gösteren ideal aşıya ulaşmaktır (Jiskoot ve ark., 1997).

Günümüzdeki aşıların büyük bir çoğunluğu intramüsküler ya da subkütan yolla uygulanmaktadır. Parenteral aşılama ile serumda antijene spesifik antikor ve lenfoid hücreler oluşmakta, güçlü sistemik bağışık yanıtlar elde edilmektedir. Buna karşılık parenteral aşılama uygulama açısından riskler içermekte, rahatsızlıklara yol açabilmekte ve parenteral aşılama sonucu üretilen antikorlar, birçok enfeksiyon yapıcı maddenin konağa giriş yeri olan mukozal yüzeylere yeterince ulaşamamakta ve mukozal yüzeylerdeki enfeksiyonlara karşı daha az etkili olmaktadır. Bu nedenle son yıllarda hasta güvenliliğini ve uyumunu artırmak için farklı aşı veriliş yolları üzerinde çalışmalar sürdürülmektedir (Giudice ve Campbell, 2006; Neutra ve Kozlowski, 2006).

Mukozal yolla aşılama, hem sistemik hem de mukozal bağışıklık sistemini uyarması, hem de humoral (antikora dayalı) ve hücrel tipde (sitotoksik lenfositler) yanıtlar oluşturmaları nedeniyle parenteral yola alternatif olarak düşünülmektedir (Illum ve Davis, 2001).

Mukozal yüzeyler, patojen ve konakçı arasındaki birincil etkileşim yerleridir. İnsan patojenlerinden, özellikle bakteri ve viruslar vücuda ilk olarak mukozal membranlardan giriş yapar ve mukozal bölgede çoğalırlar. Çoğalmanın ardından enfeksiyonel ajanlar, dokulara ve kan dolaşımına geçerek hastalığı uzak sistemik bölgelere taşıyabilirler (Kaul ve Ogra, 1998). Bu nedenle, bu patojenlere karşı aktif bir bağışıklama sağlamak için başarılı bir mukozal bağışık yanıt oluşturulmalıdır.

Aşıların mukozal yolla verilmesi, enjeksiyonla uygulamaya kıyasla birçok avantajı beraberinde getirmektedir. Bu avantajlar arasında; hem sistemik hem de mukozal bağışık yanıtı uyarmaları, uygulama kolaylığı, enjeksiyonların neden olduğu ağrı ve rahatsızlıkların önlenmesi, iğnelerin tekrar tekrar kullanılması veya iyi sterilize edilmemesinden kaynaklanan enfeksiyon bulaşma riskinin ortadan kaldırılması, uygulama esnasında eğitilmiş personele ihtiyaç duyulmaması ve üretimlerinin parenteral aşılarla göre daha ucuz olması yer almaktadır (O'Hagan, 1998).

Son yıllardaki gelişmeler, mukozal yolla aşı verilmesinde nazal yolla aşılamayı ilgi çekici hale getirmiştir. Nazal yolla aşılamada istenilen bağışık yanıtı elde etmek için uygun farmasötik dozaj şeklinin kullanılması gerekmektedir. Burun içine uygulanan klasik sıvı formülasyonlar mukosiliyer klerens nedeniyle hızla ortamdan uzaklaştırılmakta ve düşük bağışık yanıt oluşturmaktadırlar. Bu nedenle hem antijenlerin burun içine kolay uygulanmalarını sağlamak hem de aşıların mukozal bölgeyle temas süresini uzatmak amacıyla in-sitü jelleşen sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemler oda sıcaklığında sıvı iken, burun sıcaklığına bağlı olarak jel durumuna geçen sistemlerdir.

Çalışmamızda model etkin madde olarak difteri toksoidi kullanılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü, difteri için iyileştirilmiş bağışıklama stratejilerinin geliştirilmesinin öncelikli olduğunu bildirmiştir (World Health Organization (WHO) World Health Report, 1999).

Mukoadezif in-sitü jelleşen formülasyonlar tercih edilerek hem difteri toksoidinin stabilitesinin artırılması hem de aşının mukozal bölgede kalış süresinin uzatılması amaçlanmıştır. Bu şekilde nazal yolla verilen difteri toksoidinin oluşturacağı bağışık yanıtı artırmak mümkün olacaktır.

Bu çalışmada, difteri toksoidi içeren, Poloxamer 407, Poloxamer 188, kitosan, karbopol 934, HPMC ve HPC polimerleri kullanılarak hazırlanan in-sitü jel sistemleri ile in vitro ve in vivo araştırmalar yürütülmüştür.

1.2. Aşılar

Aşılar; canlı veya ölü antijenik mikroorganizmaları, bakteri toksinlerini, toksoidleri, bakteri ve viruslerin belirli bölgelerinden alınmış antijenik materyalleri içeren, uygulandıkları organizmada belirli bir enfeksiyon veya intoksikasyon etkenine karşı bağışıklık sağlayan farmasötik preparatlardır (Klegerman, 1992; Öner ve Eratalay, 2001).

Aşılama kavramı ilk kez Çin'de sağlıklı insanların, çiçek hastalığını geçirmekte olan hastaların yara kabuklarıyla aşılanmasıyla ortaya çıkmıştır. Dr. Edward Jenner'ın 1796 yılında çiçek hastalığını önlemedeki başarılı uygulamalarıyla ise bağışıklamanın temel ilkesi bulunmuştur (Plotkin, 2005; Riedel, 2005).

Teknolojik ilerlemelerle birlikte, biyoteknolojik gelişmelerin öncülüğünde, deneysel aşı çalışmalarından daha akılcı yaklaşımlarla aşı geliştirilmesine

geçiş gerçekleşmiştir. Modern aşı teknolojisinin en büyük hedefi; antijen epitoplarını (bağışıklık sisteminin tanıyabildiği en küçük yapılar) açıklayarak, etkili bağışık yanıt sunan antijenleri izole ederek ve sağlığa zararlı etkilere neden olan yapıları ortadan kaldırarak ideal aşıya ulaşmaktır (Jiskoot ve ark., 1997).

İdeal aşının sahip olması gereken özellikler aşağıda sıralanmıştır:

- Antijen saf ve tanımlanabilir olmalı,
- Antijene özgü immün yanıt geliştirerek nötralize edici antikorlar oluşturmali, yani aynı patojen ile tekrar karşılaştığında konağı enfeksiyondan korumalı,
- Uzun süreli koruma sağlamalı, bellek hücrelerini uyarmalı, tekrarlanan aşı dozu (rapel) gerektirmemeli,
- Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda bile güvenilir olmalı,
- Erken ve geç dönemde yan etkisi olmamalı,
- Uygulaması basit ve kolay olmalı,
- Ucuz olmalı,
- Aile, yasal bakıcı ve konak tarafından kabul edilebilir olmalı,
- Mukozal yolla antijen verilisini mümkün kılmalıdır (Ada, 1991; Camcıoğlu, 2008).

1.2.1. Aşıların Sınıflandırılması

Aşıların hazırlanmasında kullanılan antijenler değişik yöntemlerle hazırlanmaktadır. Hazırlanma yöntemlerine göre aşılar Çizelge 1.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Aşıların sınıflandırılması (Abbas ve ark, 2000)

Aşı Tipleri	Örnekler
Canlı attenüe veya ölü bakteriler	BCG (Bacille Calmette-Guérin), kolera (Dukoral®), menenjit (ACWY Vax®)
Canlı attenüe virusler	Polio virus (Polio Sabin™), kuduz (Pasteur HDCV Rabies), kızamık-kabakulak-kızamıkçık (Priorix®)
Alt birim aşılar	Tetanoz toksoidi, difteri toksoidi (Tetraxim)
Rekombinant aşılar	Hepatit B (Engerix-B®), influenza (Fluarix®), HIV, HPV (Gardasil®, Cervarix®)
DNA aşıları	Klinik çalışmalar devam etmektedir

1.2.1.1. Canlı Attenüe (Zayıflatılmış) Aşılar

Bakteri ya da viruslerin anormal kültür koşullarında üretilerek virülans ve toksisitelerinin azaltılması; ancak verildikleri organizmada çoğalabilme yeteneklerinin saklı tutulması yoluyla hazırlanırlar. Uzun süreli antikora dayalı ve hücrel bağışık yanıtı uyatabilirler. Olumsuz yanları canlı mikroorganizmanın yeniden virulans kazanma olasılığıdır. Bu nedenle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde kullanımları önerilmez (Jiskoot ve ark., 1997).

1.2.1.2. Ölü ve İnaktif Tüm Hücre Aşıları

Üreme yeteneği ısıtılarak ya da formaldehit gibi kimyasal maddelerle yok edilmiş; ancak antijenik özellikleri korunmuş mikroorganizmaları içeren aşılardır. Stabil, canlı aşıdan daha güvenilir ve buzdolabında saklanmaları gerekmeyen aşılardır. Avantajlarına karşılık bu tür aşılar zayıf bağışık yanıt oluşturur ve tekrarlanan aşı dozlarına ihtiyaç duyarlar. İnaktivasyon işlemlerinin gereğinden fazla yapılması immünojen özelliğin kaybolmasına, yetersiz inaktivasyon ise patojenin enfeksiyon yapıcı özelliğinin devamına ve

sonuçta hastalığa yol açabilir (Beyazova ve Aktaş, 2007; Keser ve Hatipoğlu, 2008).

1.2.1.3. Alt Birim Aşılar

Klinik belirtilerini ekzotoksinleri ile oluşturan difteri ve tetanoz basillerinin formaldehitte inaktive edilmiş toksinleridir. Bu aşılar toksine bağlanan ve onu nötralize eden antitoksik antikorların yapımını harekete geçirir, mikroorganizmanın canlı ya da ölü olarak kullanılmasındaki olumsuz özellikleri taşımazlar. Alt birim aşılar tüm mikroorganizmalarla kıyaslandıklarında ise immünojenisiteleri düşüktür ve etkili bağışık yanıt oluşturmaları için adjuvan kullanımına ihtiyaç vardır (Jiskoot ve ark., 1997; Aguilar ve Rodriguez, 2007).

1.2.1.4. Rekombinant Aşılar

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

1.2.1.5. DNA Aşıları

Rekombinant DNA teknolojisinin aşı alanındaki en yeni ve önemli uygulaması nükleik asit aşılarıdır. Bu aşılar, hem antikora dayalı hem de hücrel tipte bağışık yanıtların uyarılmasında kullanılacak proteini kodlayan plasmid

DNA'yı içermektedirler. DNA aşıları proteinlerin kendisini kullanmayıp patojenlerin veya tümörlerin proteinlerini kodlayan genleri kullanırlar (Donnelly ve ark., 1997).

1.2.2. Adjuvanlar

Aşılanmanın hedefi, enfeksiyona karşı uzun süreli koruma sağlayarak güçlü bir bağışık yanıt oluşturabilmektir. Zayıflatılmış canlı aşılarından farklı olarak, ölü tüm mikroorganizma ya da alt birim aşıların (örn., toksoidler) etkinliğini artırmak için formülasyonlara adjuvanlar ilave edilmektedir (Aguilar ve Rodriguez, 2007).

“Adjuvan” terimi ilk kez 1926 yılında Ramon tarafından kullanılmıştır. Adjuvan; spesifik bir antijen ile kullanılan ve antijenin kendisine karşı oluşan bağışık yanıtı artırabilen materyale denir (Edelman, 2000).

Adjuvanlar; (i) aşılar için uygun bağışık yanıtları yönlendirmek veya optimize etmek (ii) aşıların mukozal verilmesini sağlamak (iii) hücresel tipte bağışık yanıtları uyarmak (iv) yüksek derecede saflaştırılmış veya rekombinant antijenlerin immünojenisitesini artırmak (v) koruyucu bağışıklık için gerekli antijen miktarını ya da bağışıklama sayısını azaltmak (vi) aşıların yeni doğanlarda, erişkinlerde veya bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde etkinliğini artırmak için kullanılırlar (Vogel, 2000).

İdeal bir adjuvan şu özelliklere sahip olmalıdır:

- Toksik olmamalı veya etkili adjuvan özellik gösterdiği doz aralığında ihmal edilebilir toksisitede olmalı,
- Güçlü humoral (antikora dayalı) ve/veya hücresel tipte bağışık yanıtı uyaramalı,

- İyi bir immünolojik hafıza veya uzun süreli bağışıklık sağlamalı,
- Otoimm niteyi uyarmamalı,
- Mutajenik, karsinojenik veya teratojenik olmamalı,
- Pirojenik olmamalı,
- Geniş bir saklama süresi, sıcaklığı ve pH aralığında stabil olmalıdır (Marciani, 2003).

Günümüzde en çok kullanılan aşı adjuvanları  izelge 1.2’de gösterilmektedir.

Geleneksel adjuvanlar arasından “Alum” olarak bilinen ve alüminyum tuzları ile hazırlanan süspansiyon, Amerika Birleşik Devletleri’nde FDA (Food and Drug Administration) tarafından insanlarda kullanımına izin verilmiş tek adjuvandır (Marciani, 2003;  ner, 2006). Alum içeren adjuvanların dezavantajları ise; enjeksiyon bölgesinde lokal doku irritasyonuna neden olmaları, bazı antijenlerle verildiklerinde etkinlik göstermemeleri, hücresel tipte bağışıklığı düşük düzeyde uyarmaları, artmış immunoglobulin E (IgE)  retimi nedeniyle alerjiye sebep olmaları ve nörotoksik olabilmeleridir. Bu nedenlerden dolayı zayıf antijenlere karşı bağışıklığı artırmak için yeni adjuvanların geliştirilmesi üzerinde çalışılmaktadır (Qing ve ark., 2000; Bozkır ve Hayta, 2004; Aguilar ve Rodriguez, 2007).

Çizelge 1.2. Aşı adjuvanları (Edelman, 2000; Bozkır ve Hayta, 2004)

Aşı Adjuvanları	Örnekler
İnorganik tuzlar	Alüminyum (Alüminyum hidroksit, Alüminyum fosfat) Kalsiyum fosfat
Yüzey etkin maddeler ve mikropartiküller	Noniyonik blok polimer surfaktanları Virozomlar Saponin (QS-21)
Bakteriyel ürünler	Muramil dipeptidler ve tripeptidler Monofosforil lipit A CpG oligodeoksinükleotidler
Sitokinler ve hormonlar	İnterlökin-2 İnterlökin- α İnsan büyüme hormonu
Polianyonlar	Dekstran
Poliakrilikler	Polimetakrilat
Miseller	İnsan dendritik hücreler Tripalmitoil pentapeptid
Taşıyıcılar	Difteri toksoidi Kolera toksin B alt birim CpG dinükleotidler
Canlı vektörler	Adenovirus Zayıflatılmış <i>Salmonella typhi</i> Herpes simplex virusu
Veriliş sistemleri	Su/yağ emülsiyonları Lipozomlar Biyoparçalanabilir mikroküreler

1.3. Mukozal Aşılama

Patojenlerin büyük bir çoğunluğu enfeksiyonu, konakçı mukozası ile etkileşerek başlatmaktadır. Kolonizasyondan sonra, bazı mikroorganizmalar toksik maddeleri ortama salarak hastalığı meydana getirmekte, geri kalan kısım ise konakçı dokulara penetre olmakta ve sistemik ya da organa spesifik hastalıklara neden olmaktadır (Aggerbeck ve ark., 1997; Magistris, 2006). Bu nedenle enfeksiyon yapıcı maddelere karşı aktif bir bağışıklama sağlamak başarılı bir mukozal bağışık yanıtın oluşturulmasına bağlıdır (Saatçi ve Bozkır, 2003).

Aşıların mukozal yüzeyler üzerine uygulanmasıyla, sistemik bağışık yanıtların yanı sıra mukozal bağışık yanıtların uyarılması da sağlanmaktadır. Buna karşılık parenteral aşıların genelde mukozal bağışıklık üzerindeki etkileri sınırlıdır ve mukozal yüzeylerdeki enfeksiyonlara karşı daha az etkilidirler (Neutra ve Kozlowski, 2006).

Başarılı mukozal bağışıklamanın kriterleri aşağıda özet şeklinde verilmiştir:

1. Antijenin, mukozal bağışıklığın olduğu bölgeye etkili bir şekilde verilmesi (örn., Peyer plaklarının zarımsı epitel hücresi),
2. Canlı zayıflatılmış aşı suşlarının, geliştirilmiş antijen veriliş sistemlerinin ya da bakteriyel enterotoksinler ve sitokinler gibi mukozal immünomodülatörlerin kullanılmasıyla mukozal bağışık yanıtların artırılması,
3. Hem hedeflenen mukozal bölgede hem de sistemik olarak koruyucu bağışık yanıtlar oluşturabilecek bağışıklama programı ve yolunun seçilmesidir (Cripps ve ark., 2001; Dietrich ve ark., 2003).

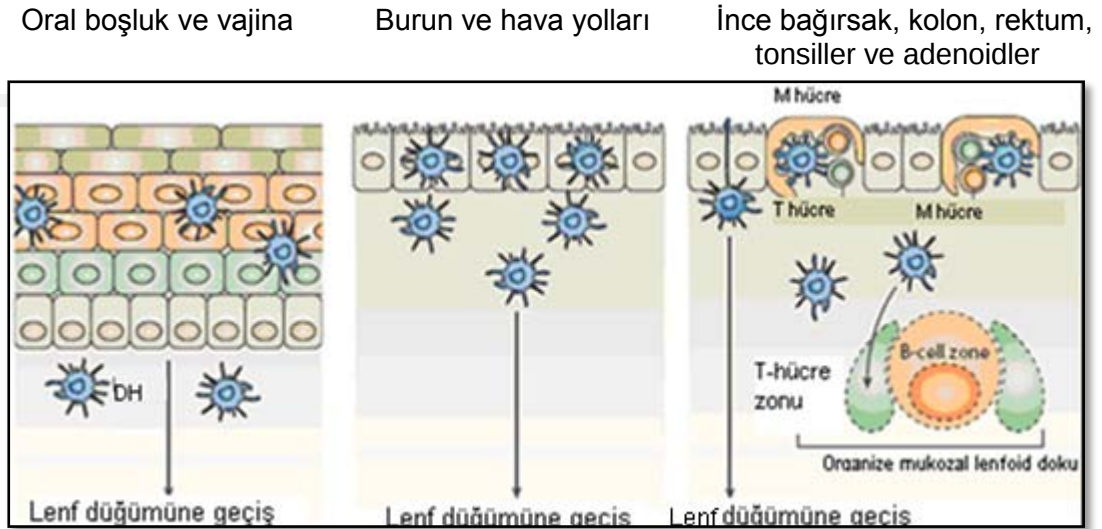
Mukozal aşılanmanın parenteral yolla aşılamaya kıyasla sahip olduğu avantajlar aşağıda sıralanmıştır:

- Mukozal aşılama enfeksiyon bölgesinde antijene spesifik lokal IgA antikorlarının oluşumunu sağlamaktadır.
- Mukozal aşılama ile lokal IgA yanıtlarına ek olarak, sistemik IgG yanıtları da oluşturulmaktadır. Hem lokal hem de sistemik bağışık yanıtların uyarılması mukozal aşılanmanın en önemli avantajıdır.
- Son yıllarda yapılan pek çok araştırma ile “ortak mukozal bağışıklık sistemi”nin varlığı ortaya konulmuştur. Bu sistem sayesinde tek bir mukozal bölgede yapılan aşı uygulaması, bu bölgeden daha uzak mukozal bölgelerde dahi bağışık yanıtı uyatabilmektedir. Bu durum özellikle oral veya nazal bağışıklama gibi pratik yollarla, cinsel yoldan bulaşan hastalıklara karşı koruyucu bağışıklık kazanılmasında önemlidir.
- Serum IgG ve mukozal IgA antikorlarının yanı sıra yardımcı CD4⁺ T hücrelerini ve CD8⁺ sitotoksik T lenfositlerini içeren hücresel tipte yanıtları da uyatabilmektedir.
- Mukozal aşı uygulamasında iğne kullanılmamakta, hasta uyumu artmaktadır.
- Gelişmekte olan ülkelerde iğnelerin tekrar tekrar kullanımı sonucu ortaya çıkan kanla enfeksiyon bulaşma riski bu yol ile önlenmektedir.
- Mukozal yolla aşılama parenteral yola kıyasla daha kolaydır ve uygulama esnasında eğitilmiş personele ihtiyaç duyulmamaktadır.
- Steriliteye ek olarak yüksek standartta saflık da gerektiren parenteral aşılarla kıyasla mukozal aşıların üretimi daha ucuzdur (Mestecky, 1997; Vajdy ve O’Hagan, 2001; Magistris, 2006).

Yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı mevcut sosyoekonomik durum ve sağlık çerçevesi altında mukozal aşılanmanın, var olan aşılama stratejilerine birçok avantaj getireceği düşünülmektedir (Csaba ve ark., 2009).

1.3.1. Mukozal Bağışıklık Sistemi

Antijenlere, mikroorganizmalara ve aşılarla karşı mukozal bağışık yanıtın uyarılması için mukozada ya da lenf düğümünde organize haldeki lenfoid dokuların varlığına ihtiyaç vardır (Şekil 1.1) (Neutra ve Kozlowski, 2006).



Şekil 1.1. Mukozal yüzeylerde antijen örnekleme: epitel ve dendritik hücrelerin (DH) işbirliği (Neutra ve Kozlowski, 2006)

Antijen alımı, mukozal yüzeyleri kaplayan çeşitli epitel bariyerler ve dendritik hücrelerin ortaklığıyla gerçekleşmektedir. Dendritik hücreler, epitel altında toplanabilir, epitel tabakasının içine göç edebilir ve dendritlerini lümene doğru uzatarak antijeni yakalayabilirler. Dendritik hücreler yakaladıkları antijeni T hücrelerine sunmak için en yakındaki lenf düğümlerine doğru yol alabilirler. Lenfoid foliküle bağlı epitelde bulunan özelleşmiş mikrofoid (M) hücreler, antijenleri epitel bariyerden alıp epitelin altındaki dendritik hücrelere götürürler. Buradan da antijenler, mukozal T hücre alanlarına sunulurlar (Neutra ve Kozlowski, 2006).

Mukozal bağışık yanıtlar, mukozaya bağlı lenfoid dokuda (MALT) oluşmaktadır. Mukozaya bağlı lenfoid doku (MALT); bağırsağa bağlı lenfoid doku (GALT), bronşlara bağlı lenfoid doku (BALT), burna bağlı lenfoid doku

(NALT) ve larinkse bağılı lenfoid dokuyu (LALT) içermektedir. GALT ve NALT'taki organize haldeki lenfoid foliküller, mukozal bağışık yanıtın başlıca uyarıcı yerleridir (Ogra ve ark., 2001).

1.3.1.1. M Hücreleri

Burun ve bağırsak mukozasının polarize epitel hücreleri boyunca “Mikrofold (M) hücreler” konumlanmıştır. M hücreleri, partikül yapısındaki antijenler için mukozal bağışıklık sisteminin “giriş kapıları” olarak kabul edilirler. M hücreleri partiküler antijenleri lümeninden lenfoid dokuya ulaştırmak için veziküler taşımayı kullanırlar (Magistris, 2006).

1.3.1.2. Makrofajlar

Fagositik makrofajlar, organizmada bulunan ve temizlenmesi gereken madde, mikroorganizma ve tümör hücrelerini ortadan kaldırarak vücudun özgül olmayan savunmasında önemli bir rol alırlar (Abbas ve ark., 2000).

Antijen sunucu hücreler (ASH) ise antijen ile ilk karşılaşan ve onları lenfositlere sunan hücreler olarak bağışık yanıtta ilk adımı başlatan hücrelerdir (Abbas ve ark., 2000).

1.3.1.3. B ve T Lenfositler

T lenfositleri hücresel tipte bağışık yanıtta sorumludur. Kemik iliğinde oluşan T öncü hücreler, timusta olgun T lenfositlerine dönüşürler. Bu olgunlaşma sırasında T lenfosit yüzeyine pek çok reseptör yerleşir (Altaş, 1998).

T hücrelerinin; yardımcı, sitotoksik ve bellek T hücreleri olmak üzere üç ana alt grubu vardır. Yardımcı T hücreleri (T_H), B hücrelerinin antikor üretmesini ve sitotoksik T hücrelerinin aktifleştirilmesini sağlar. Sitotoksik T hücreleri (STL), yabancı ve virus ile enfekte hücelere karşı iki yolla savaşırlar. Birincisinde perforin adı verilen proteinler üreterek hedef hücre zarında delikler oluştururlar ve hedef hücrenin parçalanmasına yol açarlar. İkincisinde ise, programlanmış hücre ölümünü ya da apoptozisi başlatan bazı genleri uyararak hedef hücreyi öldürürler. Bellek T hücreleri, yeniden karşılaşılan antijenlere hızlı yanıt vererek sitotoksik T hücrelerinin oluşumunu uyarırlar (Junqueira ve Carneiro, 2006).

B lenfositleri antikora dayalı bağışık yanıttan sorumlu hücrelerdir. B lenfositler, antijene karşı özgül reseptör olan immünoglobulin moleküllerini sentezler ve hücre yüzeylerindeki zarda taşırlar. Antijenle temas eden B lenfositleri, ya antijene özgü çok miktarda antikor sentezleyen plazma hücrelerine ya da uzun ömürlü bellek B hücrelerine dönüşürler (Junqueira ve Carneiro, 2006).

1.3.1.4. Antikorlar

Salgısal immünoglobulin A (IgA), mukozal bağışıklık sisteminde en çok üretilen antikor sınıfıdır (Baştürk ve Boyacıoğlu, 2005). IgA'lar mikropları ve mikrobiyal ürünleri nötralize ederek mukozadaki kolonizasyonu ve patojenlerin yayılmasını önlerler. Aynı zamanda transselüler (hücre içi) taşınmaları sırasında epitel hücrelerdeki bakteriyel ürünleri veya virusleri nötralize edebilirler. Bağ dokuda bulunan IgA ise toksinler ve virusler gibi antijenleri yakalayabilir ve bu antijenleri intraselüler dolaşım ile mukozal dokudan uzaklaştırabilirler (McNeela ve Mills, 2001; Magistris, 2006).

IgG ise, serum immünoglobulinlerinin %75'ini oluşturan bir sınıftır. Hem sistemik enfeksiyonlardan korunma sağlamakta, hem de serumdan mukozal

yüzeyle sızarak mukozada görev yapabilmektedir (McNeela ve Mills, 2001).

1.3.2. Mukozal Adjuvanlar

Çözünür antijenlerin adjuvan kullanılmadan, tek başlarına mukozal verilışı genellikle zayıf bağışık yanıt oluşturur. İnsanlarda en yaygın kullanılan adjuvan olan alüminyum tuzu mukozal aşılama için yeterince etkili değildir (Jung ve ark., 2001). Parenteral olarak verildiklerinde etkili olan adjuvanların genelde mukozal yoldan verildiklerinde toksik oldukları veya stabil olmadıkları bildirilmiştir (Nagler-Anderson, 2001).

Bağışık yanıtın artırılmasında ümit verici mukozal adjuvanlar; partiküler sistemler ve bağışıklığı uyaran adjuvanlar olarak iki ana grup altında toplanabilir.

1.3.2.1. Partiküler Sistemler

1.3.2.1.1. Mikro- ve Nano- partiküller

Antijenler, mikro- ve nanopartiküler taşıyıcı sistemlere yüklenmekte ve hedeflenen antijen sunucu hücrelere ulaştırılmaktadırlar. Antijenlerin enkapsülasyonunda kullanılan başlıca sentetik polimer PLGA (poli-laktik-koglikolik asitleri)'dir. Bu polimerler biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak geçimlidir. Antijeni parçalanmaktan korur ve mukozal epitel ile etkileşimini artırır (Peek ve ark., 2008).

Partiküler antijenler, yaygın olarak emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanırlar (Spiers ve ark., 1999). Bozkır ve ark., etkin madde

olarak influenza virus yüzey antijeni olan hemagglutininini kullandıkları bir çalışmada çoklu emülsiyon yapısındaki formüllerin, emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmış nanopartiküllere kıyasla daha etkili bağışık yanıt oluşturdıklarını göstermişlerdir (Bozkır ve ark., 2004). Sentetik polimerlerin kullanıldığı enkapsülasyon süreci sırasında antijenler yüksek kayma gerilimine, organik çözücülere, kavitasyona ve yüksek sıcaklığa maruz kalmakta ve denatüre olmaktadır (Sharma ve ark., 2009). Enkapsülasyonun antijen molekülüne zarar verdiği bu tür durumlarda, antijenin mikro- ve nanopartiküllerin yüzeyine adsorbe edildiği yöntemden yararlanılmaktadır (Jung ve ark., 2001).

Partiküler veriliş sistemlerinin mukoadezif polimerlerle kaplanması, bu tür aşılarda mukoza tarafından alıkonma süresini artırabilir. Mukosilyer klerensi yavaşlatabilecek polimerlere örnek olarak hidroksipropil selüloz, kitosan, karbopol, hiyaluronik asit ve poliakrilik asit verilebilir (Alpar ve ark., 2005; Devrim ve ark., 2007).

Sayın ve ark., kitosan ve türevlerinden (polikasyonik kitosan türevi TMC, amfifilik kitosan türevi MCC) hareketle partikül boyutları 40-400 nm arasında değişen nanopartiküller hazırlamışlar ve nanopartiküler veriliş sistemlerinin mukozal bağışıklamada etkili olduklarını göstermişlerdir (Sayın ve ark., 2007).

1.3.2.1.2. Lipozomlar

Lipozomların çift tabakalı kesecik şeklindeki yapıları amfifilik moleküllerden oluşur. Hidrofilik uçları lipozomun ortasına gelecek şekilde düzenlenmiştir. Sulu tabakanın etrafı ise fosfolipitler ve kolesterolü içeren lipid tabakasıyla çevrilidir. Hem suda hem de yağda çözünen maddeler sırasıyla lipozomların içine veya yüzeyine adsorbe olabilirler (Jain ve ark., 2003). Lipozomların

partikül boyutu 50 nm ile birkaç mikrometre arasında değişmektedir (Kersten ve Crommelin, 2003).

Lipozomların etkinlikleri, immünolojik adjuvan ve veriliş sistemi olarak yüksektir; ancak verildikleri organizmadaki enzimlere duyarlı olmaları, saklanma süresince stabil olmamaları ve yüksek üretim maliyetleri nedeniyle kullanımları sınırlıdır (Sharma ve ark., 2009).

1.3.2.1.3. Virozomlar ve Virus-Benzeri Partiküller

Virozomlar; fonksiyonel viral membran glikoproteinlerini (hemaglutinin ve/veya nöroamidaz) içeren ve o virusün partikül boyutuna (yaklaşık 80-120 nm) sahip lipozomlardır. Virozomlar, hepatit A ve influenzaya karşı sistemik aşılama da Avrupa'da onaylanmış ve ayrıca intranazal aşılama için formüle edilmişlerdir (Kensil ve ark., 2004).

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

1.3.2.1.4. Bağışıklığı Uyaran Kompleksler (ISCOM'lar)

ISCOM'lar; *Quillaja* saponinler, kolesterol, fosfolipit ve antijen karışımından oluşan yaklaşık 40 nm boyutunda kafes benzeri yapılardır. ISCOM'ların bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerini düzenleyen ve artıran asıl bileşenleri *Quillaja* saponinleridir (Hu ve ark., 2001).

ISCOM'lar viral, bakteriyel ve parazit kaynaklı antijenlerle sistemik aşılamada değerlendirilmiş ve antiviral sitotoksik T lenfositlerinin uyarılmasında, ASH aktivasyonunda etkili oldukları gösterilmiştir. Bunun yanı sıra mukozal aşılamada etkili adjuvan ve veriliş sistemi olarak görev almaktadırlar (Kersten ve Crommelin, 2003).

1.3.2.2. Bağışıklığı Uyarıcı Adjuvanlar

1.3.2.2.1. Bakteriyel Toksinler ve Türevleri

Vibrio cholerae'den elde edilen kolera toksini (KT) ve *Escherichia coli*'den elde edilen ısıya dayanıksız enterotoksin (LT) en aktif mukozal adjuvanlar olarak tanımlanmış iki bakteriyel toksindir. Buna karşılık her iki toksin de insanlarda kullanım için oldukça toksik olarak kabul edilirler. Günümüzde toksik aktiviteden, adjuvan aktiviteyi ayırmanın mümkün olup olmadığı üzerinde çalışmalar yürütülmektedir. Bu amaçla son yıllarda bu toksinlerin toksisiteleri azaltılmış ya da tamamen ortadan kaldırılmış çeşitli mutantları üzerinde çalışmalar sürdürülmektedir (Holmgren ve ark., 2003; Vajdy ve ark., 2004).

1.3.2.2.2. CpG Motifleri

Memeli DNA'sından farklı olarak, bakteriyel DNA'lar metillenmemiştir ve CpG dinükleotidlerce zengindir. CpG terimi, bağışıklık sistemini uyarma özellikleri olan CpG motiflerini içeren sentetik oligodeoksinükleotidlerden (ODN'ler) oluşan bir sınıf molekülü ifade etmektedir. CpG ODN'ler çeşitli hayvan modellerinde ve insanlarda sistemik ve mukozal adjuvanlar olarak kullanılmışlardır. Oral, intranazal, intrarektal ve intravajinal verilişten sonra lokal IgA ve sistemik bağışık yanıtları uyarmışlardır (Ryan ve ark., 2001; Magistis, 2006).

1.3.2.2.3. Monofosforil Lipit A

Monofosforil lipit A, gram negatif bir bakteri olan *Salmonella minnesota* R595'in lipopolisakkaritinden izole edilir. Toksik etki göstermeden lipopolisakkaritin bağışıklık sistemini uyarabilme özelliğini korur (Baldrige ve ark., 2000).

Baldrige ve ark., monofosforil lipit A'nın mukozal adjuvan özelliğini üç farklı antijeni (tetanoz toksoidi, hepatit B yüzey antijeni, influenza) intranazal yoldan dişi farelere vererek değerlendirmişlerdir. Monofosforil lipit A, sistemik bağışık yanıt oluşturma yanısıra antijene spesifik lokal IgA antikorlarının sayısını, hem lokal hem de uzak mukozal bölgelerde artırmıştır (Baldrige ve ark., 2000).

1.3.2.2.4. Saponinler

Saponinler, triterpenoid glikozitler olup, *Quillaja saponaria* ağacının kabuğundan elde edilirler. Quil A, saponinin bağışıklığı uyaran fraksiyonunu temsil etmektedir. Saponinler, kolesterol ile etkileşir ve hücre membranlarına eklenerek porlu yapılar oluştururlar. Saponinlerin adjuvan etkilerinin bu özelliklerinden ileri gelip gelmediği bilinmemektedir. QS21, Quil A'nın yüksek derecede saflaştırılmış fraksiyonu olup diğer saponinlerden daha az toksiktir. İmmünolojik adjuvan olarak parenteral yoldan verilen alt birim aşılarla kullanımının yanı sıra, son yıllarda tetanoz toksoidi ile oral yoldan verililişi üzerinde çalışmalar sürdürölmektedir (Kensil ve ark., 2004).

1.3.2.2.5. Endojen Moleküller: Sitokinler ve Kemokinler

Sitokinler, bağışık yanıtlar süresince salgılanır ve antijen verililişi sırasında bağışık yanıtı teşvik etmek, modifiye etmek ve yeniden yönlendirmek için

kullanılırlar. Mukozal aşılama da kullanılan sitokinler; IL-1, IL-12 ve tip I interferondur (Magistris, 2006).

Kemokinler ise adjuvan olarak daha az çalışılmış olup aralarından, lenfotaktin, RANTES, MIP1 α ve MIP1 β 'nın mukozal adjuvan olarak davrandıkları saptanmıştır (Magistris, 2006).

1.3.2.2.6. Canlı Vektörler

Canlı zayıflatılmış mikroorganizmalar, adjuvan aktivitesine ve konakçı dokulara geçebilme yeteneğine sahiptirler. Genellikle heterolog aşılama için kullanılan bakteriyel ve viral zayıflatılmış vektörler *Salmonella*, BCG ve adenoviruslerdir (Magistris, 2006).

Viral vektör aşının avantajları; üretimlerinin kolaylığı, güvenlik profillerinin iyi olması, güçlü bağışık yanıtları uyarmaları, nazal yolla veriliş ve mukozal aşılama için uygun olmalarıdır (Peek ve ark., 2008).

Mielcarek ve ark., bakteriyel vektörlerin viral vektörlere kıyasla ek avantajlar içerdiğini ifade etmektedir. Bakterilerin genomlarının, çok sayıda yabancı geni muhafaza edebilmesine karşılık viruslerin yabancı DNA'yı enkapsüle etme yeteneklerinin sınırlı düzeyde olduğu belirtilmektedir (Mielcarek ve ark., 2001).

1.3.2.2.7. Noniyonik Blok Kopolimerler

Mukozal aşılama da, antijen dozunun uygun ve tam verilebilmesi için fosfat tampon tuzu (PBS) kullanılmaktadır. Buna karşılık aşının intranazal ve intravajinal yolla PBS içinde verilişinde immünojenisite sınırlıdır. Antijenlerin

uygulama bölgesine veriliş kolaylığı ve uygulama bölgesinde uzun süre tutulabilmeleri için in-sitü jelleşen mukozal veriliş sistemleri üzerinde çalışılmaktadır (Han ve ark., 2006).

Bu amaçla noniyonik blok kopolimerlerden yararlanılmaktadır. Poloksamer 407 (Pluronik F127), non-iyonik polioksietilen-polioksiipropilen kopolimeri olup farmasötik formölasyonlarda surfaktan ve proteinleri stabilize edici özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır (Escobar-Chavez ve ark., 2006).

1.3.3. Mukozal Aşı Uygulama Yolları

Lokal aşılama için mukozal yollar; oral, pulmoner, genital, rektal ve nazal yoldur (Sharma ve ark., 2009). İntranazal ve oral yolla veriliş, mukozal aşılama için en pratik yollar olarak gösterilmelerine rağmen diğer mukozal bölgeler üzerinde de çalışmalar devam etmektedir.

1.3.3.1. Oral Yol

Oral yol, hasta uyumu ve veriliş kolaylığı nedeniyle ilgi çekicidir. Oral yoldan aşılamada hem sistemik hem de mukozal bağışık yanıt elde edilebilmektedir. Çözünür antijenlerin hücreler tarafından yetersiz miktarda alınması ve mukozal tolerans oral yolun dezavantajları arasında yer alır (Slütter ve ark., 2008). Aynı zamanda gastrointestinal sistemin geniş yüzey alanından dolayı antijenlerin seyrelmesi ve dolayısıyla yüksek miktarda antijen/adjuvan formölasyonuna ihtiyaç duyulması, yüksek maliyeti beraberinde getirmektedir (Magistris, 2006).

1961 yılında uygulanan oral polio (ocuk felci) aşısı mukozal aşılamının ilk örneğidir. Bu aşı halen uygulanmakta olup canlı attenüe Sabin polio virusünü içermektedir (Giudice ve Campbell, 2006). Günümüzde oral polio aşısının

yanı sıra canlı attenüe virusleri içeren oral tifüs, oral kolera (Dukoral®) ve oral rotavirus aşılıarı (Rotateq®) piyasada mevcuttur (Slütter ve ark., 2008).

1.3.3.2. Genital ve Rektal Yol

Genital ve rektal yolun, nazal ve oral verilışten farklı olarak hasta uyumu ve kabul edilebilirliğı daha düşüktür. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak için farklı farmasötik formlar üzerinde çalışılmaktadır.

Genital bölgenin fizyolojik koşulları ise formüllerin uygulandıkları bölgede uzun süre alıkonmasını sınırlamakta ve istenilen terapötik etkiye ulaşılammamaktadır. Bilensoy ve ark., sıcaklığa bağılı olarak vajinada jel hale geçen mukoadezif jel formülleri hazırlamışlar ve formüllerin uygulama bölgesinde daha uzun süre kalacağını destekleyen veriler elde etmişlerdir (Bilensoy ve ark., 2006b).

Nazal yol ile bağışıklama sonrası “ortak mukozal bağışıklık sistemi” sayesinde genital bölgede etkili bağışık yanıtlar elde etmek mümkündür (Vajdy ve O’Hagan, 2001). Rekombinant adenovirus ile intranazal bağışıklamanın, mukozal bağışık yanıtları indüklediğı ve farelerde uzun süreli koruma sağladığı gösterilmiştir. Aynı vektör, nazal yoldan verildiğinde genital bölgede de spesifik salgısal bağışık yanıtlar üretebilmişken, intravajinal aşılama ile vajinal sıvılarda düşük düzeyde spesifik IgG ve IgA yanıtlarını uyatabilmiştir (Davis, 2001).

Polio virus, SIV ve influenza virusü ile yürütölen çalışmalar intrarektal verilen antijenlerin bağırsakta ve ortak mukozal sistemdeki diğör bölgelerde spesifik antikor yanıtlarını uyardığını göstermiştir (Ogra ve ark., 2001).

1.3.3.3. Pulmoner Yol

Pulmoner yolla aşı verilişinde iğnelere ihtiyaç duyulmaz ve oral verilise kıyasla antijenler daha az parçalanmaya uğrar (Slütter ve ark., 2008). Aşıların, akciğerlerin alt loblarına ulaştırılma zorluğu ve gelişmiş teknolojiye ihtiyaç duyulması ise bu uygulama yolunun olumsuz yönleridir (Vajdy ve O'Hagan, 2001).

1.3.3.4. Nazal Yol

Nazal mukoza, mukozal bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır. İnhalasyonla organizmaya alınan antijenler için ilk temas noktasıdır ve böylelikle nazal aşılama ile patojenler organizmaya ilk girdikleri noktada nötralizasyona uğramaktadır. Bunun sonucu olarak hem periferik hem de mukozal bağışık yanıt elde edilebilmektedir (Saatçi ve Bozkır, 2003; Vila ve ark., 2004).

1.4. Nazal Yolla Aşı Verilişi

Mukozal aşı veriliş yolları arasında avantaj ve dezavantajlar yönünden kıyaslama yapıldığında intranazal yol en ilgi çekici olanlarındandır. Nazal yolla aşılamamanın avantajları aşağıda liste şeklinde verilmektedir.

- Burun mukozası epiteli damar ağı açısından zengindir.
- Nazal epiteli kaplayan çok sayıda mikrovilus geniş bir absorpsiyon alanı oluşturmaktadır.
- Nazal geçitler lenfoid dokularca (NALT-Burna bağlı lenfoid doku) zengindir.
- Absorbe edilen maddeler direkt olarak sistemik dolaşıma geçmekte ve aşıların karaciğerde ilk geçiş etkisine uğraması önlenmektedir.

- Nazal aşılar özellikle adjuvanlarla birlikte uygulandığında hem mukozal (IgA) hem de sistemik (IgG) bağışık yanıtı uyatabilmektedir.
- Ortak mukozal bağışıklık sistemi sayesinde uzak mukozal bölgelerde dahi bağışık yanıtlar oluşturabilmektedir.
- Nazal yolla verilen antijenlerin oral yola kıyasla, düşük pH'ya maruz kalmamaları ve nazal bölgede enzimatik aktivitenin daha az olması düşük dozları yeterli kılmaktadır.
- Uygulama kolaylığı ve iğnelere gerek duyulmaması hasta uyumunu artırmaktadır.
- Nazal aşıların üretim ve kalite kontrolü parenteral aşılarla göre daha ucuzdur (Davis, 2001; Illum, 2003; Türker ve ark., 2004; Somavarapu ve ark., 2005).

Nazal yolun dezavantajları arasında ise mukosiliyer klerens, çözünür antijenlerin hücreler tarafından yetersiz alınması ve uygulama aygıtına gerek duyulması sayılabilir (Slütter ve ark., 2008).

Günümüzde soğuğa adapte trivalan canlı attenüe influenza aşısı (FluMist™, Medimmune Inc., Gaithersburg, Maryland tarafından üretilen) FDA tarafından 2003 yılında onay almış tek nazal aşıdır. Bu aşı, 5-49 yaş arasındaki sağlıklı insanlara uygulanmaktadır. Kullanıma hazır, dolu ve tek kullanımlık aşı püskürtücü kullanılarak, burun deliklerine uygulanmaktadır (Harper ve ark., 2003).

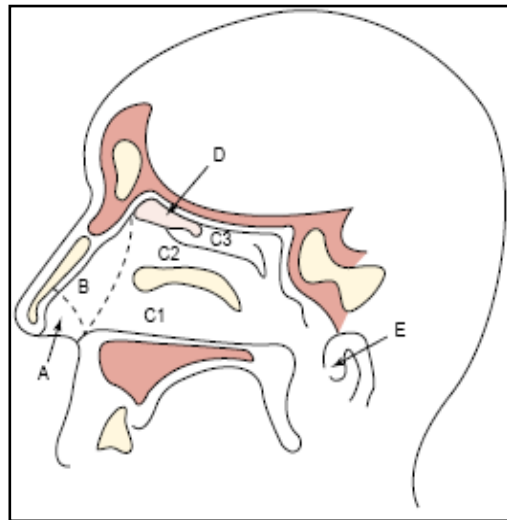
1.4.1. Burun Anatomisi ve Fizyolojisi

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

1.4.1.1. Burun Boşluğu

Burunun görünen dış yüzeyi, burun deliklerini ve burun boşluğunun üçte birini çevrelemektedir. Burun boşluğunun toplam yüzey alanı yaklaşık 150 cm² ve toplam hacmi yaklaşık 15 ml'dir (Mygind ve Dahl, 1998). Burun boşluğu "septum" adı verilen burnun orta kısmında bulunan ve dikey yönde uzanan yapı ile iki ayrı parçaya bölünmektedir (Ugwoke ve ark., 2005).

Her bir burun boşluğunda beş farklı bölge mevcuttur. Bunlar: (A) vestibül (B) atriyum (C) solunum bölgesi (D) koku bölgesi (E) nazofarinkstir. Vestibül, burun boşluğunun en önde bulunan ve en geniş bölümüdür. Atriyum, vestibül ile solunum bölgesi arasındaki ara bölgedir. Burun boşluğunun büyük bir kısmını oluşturan solunum bölgesinin yan duvarında "konka" adı verilen raf şeklinde üç kemiksi çıkıntı vardır. Bu konkalar tarafından oluşturulan dar şerit şeklindeki yolaklar, solunum epiteli içeren yüzey alanının artmasına ve hava akımında dalgalanmaya yol açarak solunan havanın ısıtılarak ve nemlendirilerek uygun hale getirilmesine katkıda bulunurlar. Sonuç olarak, hava akımı ile mukoz tabaka arasındaki temas artar. Nazofarinks ise yutağın ilk bölümüdür ve aşağıya doğru yutağın ağza ait bölümüne kadar devam eder (Şekil 1.2) (Arora ve ark., 2002; Junqueira ve Carneiro, 2006).



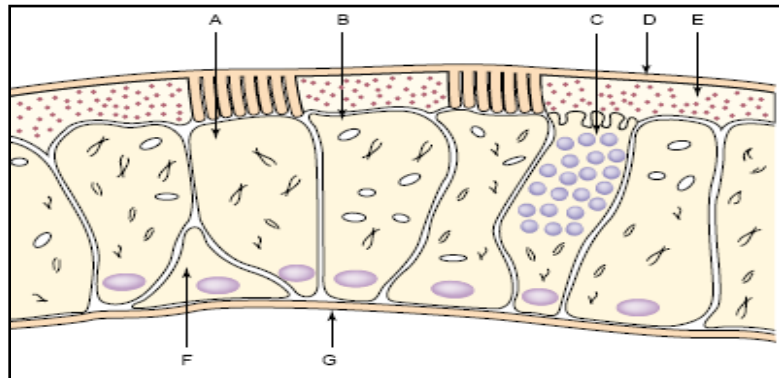
- (A) Nazal vestibül
- (B) Atriyum
- (C) Solunum bölgesi:
- (C1) Alt konka
- (C2) Orta konka
- (C3) Üst konka
- (D) Koku bölgesi
- (E) Nazofarinks

Şekil 1.2. İnsan burnunun anatomik yapısı (Arora ve ark., 2002)

1.4.1.2. Burundan Mukus Salgılanması ve Mukosiliyer Klerens

Burun vestibülü çok katlı yassı epitel ile kaplıdır. İlerleyen bölümlerde yavaş yavaş solunum epitelini kaplayan yalancı çok katlı prizmatik epitele dönüşür. Solunum epitel hücreleri, mikroviluslar ve büyük bir kısmı ayrıca titrete tüyler ile kaplıdır (Şekil 1.3) (Illum, 2003).

Üzerinde en çok çalışılan mukus salgı hücresi ise goblet hücresidir. Mukus salgısı %95 su; %2 müsin; %1 tuz; %1 albumin, immunoglobulinler, lizozim ve laktoferin gibi diğer proteinler ve %1'den az lipit içerir. Normal dinlenme halindeki burundan her gün yaklaşık 20-40 ml mukus üretilir. Bu mukoza örtüsü, altta düşük viskozitedeki sıvı tabaka ve üstte daha yüksek viskozitedeki jel tabakasından meydana gelmektedir (Jones, 2001; Ugwoke ve ark., 2005). Titrete tüyler bu jelimsi tabakayı sürekli nazofarinkse taşımaktadır. Mukus taşıma hızı 8 mm/dak. olarak bulunmuştur. Mukus tabakası ve tüylerin kombine bu hareketine "mukosiliyer klerens" adı verilir. Mukosiliyer klerens, solunum yoluyla vücuda giren bakteri, irritan ve partiküllere karşı solunum sistemini koruyan etkili bir savunma mekanizmasıdır. İnsana nazal yolla uygulanan basit bir toz veya sıvı bir formülasyon yaklaşık 15 dakikalık bir yarı ömürle burun boşluğundan temizlenmektedir (Illum, 2002; Saatçi ve Bozkır, 2003).



Şekil 1.3. Nazal epiteldeki hücre tipleri A- titrete tüylü hücre, B- titrete tüy içermeyen hücre, C- goblet hücreleri, D- jel mukus tabakası, E- sıvı tabaka, F- bazal hücre, G- basement zarı (Arora ve ark., 2002)

1.4.1.3. Burundan Absorpsiyon

Nazal yol, ilaç verilisinde geçirgenliği yüksek ve zengin damar ağına sahip bölgelerden biri olup absorpsiyonun hızlı olmasını ve terapötik etkinin başlamasını sağlamaktadır. Burun mukozasından etkin maddenin absorpsiyonunu etkileyen biyolojik faktörler ve formülasyona ait faktörler takip eden sayfalarda sıralanmıştır.

1.4.1.3.1. Burun Mukus Membranın Alanı

İlacın bir burun deliğine uygulanmasıyla, her iki burun deliğine uygulanması arasında absorpsiyon farkının olduğu bilinmektedir. Bu durumun nedeni, ilaca maruz kalan mukus membran alanındaki artış sonucu burnun geçirgenliğinin artmasıdır (Arora ve ark., 2002).

1.4.1.3.2. Uygulama Hacmi

Burun boşluğuna verilebilecek sıvı hacmi 0.02 ml ile 0.15 ml arasındadır. Bu hacmi etkili bir şekilde kullanmak için çözücülerin, jelleşen maddelerin ya da viskozluk artırıcı maddelerin kullanımı üzerinde durulmaktadır. Çözücülerin kullanımı çözünmeyen bileşiklerin sudaki çözünürlüğünü artırmakta ve ilacın absorpsiyonunu yükseltmektedir. Jelleşen maddeler ise, formülasyonun burun boşluğundan temizlenmesini yavaşlatmakta ve ilacın mukus membranda alıkonma süresini uzatmaktadır (McNeela ve ark., 2001; Park ve ark., 2001; Arora ve ark., 2002).

1.4.1.3.3. Dozaj Formu

Nazal damlalar en basit ve en uygun dozaj formu olmalarına rağmen kişiye verilecek ilaç miktarı tam ve kolay bir şekilde verilememekte, genelde aşırı doz uygulamasıyla sonuçlanmaktadır. Damlaların bir diğer problemi burun boşluğundan hızla temizlenmeleridir. Jeller, postnazal ve anterior sızmayı azaltmakta, formülasyonu mukozaya lokalize etmektedir (Arora ve ark., 2002). Emülsiyonlar (Mitra ve ark., 2000), mikropartiküller (Vajdy ve O'Hagan, 2001), nanopartiküller (Amidi ve ark., 2006), lipozomlar (Baca-Estrada ve ark., 2000) gibi farklı dozaj formları üzerinde de çalışmalar sürdürülmektedir.

1.4.1.3.4. Mukosiliyer Klerens

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

1.4.1.3.5. Etkin Maddeye Bağlı Faktörler

Etkin maddenin lipofilikliği, çözünürlüğü, molekül ağırlığı, partikül boyutu, partisyon katsayısı ve iyonlaşma derecesi gibi fizikokimyasal özellikleri burundan geçiş hızını ve yolunu etkilemektedir (Arora ve ark., 2002).

1.4.1.3.6. pH

İnsan burun boşluğunun pH'sı ortalama 6,3 olup 5,2 ile 8,1 arasında değişkenlik göstermektedir (Washington ve ark., 2000). Bir başka literatür de bu veriyi destekler niteliktedir. Burun sıvılarının normal pH'larının erişkinlerde 5,5-6,5 arasında, bebek ve çocuklarda ise 5,0-6,7 arasında değiştiği belirtilmektedir. Buna karşılık burun salgısının pH'sı; hava sıcaklığı, enfeksiyon ve uyku gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir. Soğuk hava alkali, sıcak hava asidik pH'a neden olmaktadır. Akut alerjik rinit ve akut sinüzit süresince ise nazal sıvıların pH'sı alkali iken, klinik iyileşme gerçekleştiğinde pH asidik olmaktadır. İdeal bir formülasyonun pH'sı 4,5-6,5 arasında değişmelidir (Chien ve ark., 1989; Arora ve ark., 2002).

1.4.1.3.7. Tonisite

Tonisite, sulu çözeltilerin içindeki tuzlar tarafından oluşturulan ozmotik basıncı tanımlar. Genellikle izotonik çözeltiler nazal yolla veriliş için tercih edilmektedir (Arora ve ark., 2002).

1.4.1.3.8. Viskozite

Viskozluk; bir sıvının akmaya karşı gösterdiği dirençtir. Direnç ne kadar büyük ise viskozluk o denli yüksektir. Sıvıların akış özellikleri kantitatif olarak ilk kez Newton tarafından incelenmiştir.

Yüksek viskozluktaki formülasyon etkin madde ile nazal mukoza arasındaki temas süresini uzatmakta, böylelikle absorpsiyon için süreyi artırmaktadır.

Denklem 1.1.

$$F/A = \eta (dv/dx)$$

dv/dx : Birbiri üzerinde kaymakta olan iki sıvı tabakası arasındaki kayma hızı

F/A : Kayma hızı oluşturmak için birim alana düşen kuvvet veya kayma gerilimi

η : Dinamik viskozluk katsayısı veya dinamik viskozluk

Newton akış yasasına uyan sıvılar Newtonian, uymayanlar ise non-Newtonian sıvılar olarak adlandırılmıştır. Su, gliserin, sıvı parafin gibi yalın sıvıların viskozlukları sayısal bir değer ile ifade edilebilirken süspansiyon, emülsiyon, krem, merhem gibi non-Newtonian sistemlerin viskoziteleri akış eğrileri (reogram) ile ifade edilebilmektedir. Kinematik viskozluk, dinamik viskozluğun yoğunluğa bölünmesiyle elde edilen bir değerdir. Farklı birim sistemlerine göre dinamik viskozluk birimleri: Pa.s, dyn.cm⁻².s, poise, centipoise, kinematik viskozluk birimleri ise; m².s⁻¹, stoke, centistoke'tur.

Viskozluk tayininde kullanılan aletler başlıca iki grupta toplanır.

1. Tek noktada ölçüm yapan aletler

- Kılcal viskozimetreler: Ostwald viskozimetresi, Ostwald Cannon-Fenske viskozimetresi, Ubbelohde tüpü
- Düşen bilye viskozimetresi: Hopppler düşen bilye viskozimetresi

2. Çok noktada ölçüm yapan aletler

- Rotasyonel Cup and Bob viskozimetresi esasına dayanan Couette tipi MacMichael viskozimetresi, Searle tipi Rotovisco viskozimetre, Stormer viskozimetresi,
- Rotasyonel koni ve tabak viskozimetresi esasına dayanan Ferranti-Shirley viskozimetresi, Brookfield viskozimetresi ve penetrometreler (Bozkır ve ark., 2007, s.: 77-78).

1.4.2. Nazal Bağışıklık Sistemi

1.4.2.1. Burna Bağlı Lenfoid Doku (NALT)

Sıçanlardaki burna bağlı lenfoid doku (NALT), B ve T hücre alanları ile M hücrelerini içeren epitel tabakayla kaplı çok iyi organize olmuş bir yapıdır (Davis, 2001). NALT, morfolojik ve işlevsel yönden GALT ve BALT gibi diğer merkezi lenfoid dokulara benzerlik gösterir. NALT'ta bulunan M hücreleri, hem Peyer plakları hem de BALT'ta yer alan M hücreleriyle aynı olup benzer immünolojik fonksiyonlara sahiptirler. Antijenin yakalanması ve ardından antijene spesifik mukozal bağışık yanıtların ortaya çıkması NALT'ın görevleri arasındadır (Ogra ve ark., 2001).

İnsanlarda NALT'a eşdeğer dokular Waldeyer halkası olarak bilinir. Waldeyer halkası; bir çift tubal tonsil, bir çift palatin tonsil, lingual tonsil ve adenoidten oluşmaktadır. İnsan tonsilleri ve adenoidal dokular mukozal bağışıklığın önemli bileşenleridir. Tonsiller epiteli, çok sayıda dendritik hücre, M hücreleri, B ve T hücrelerini içermektedir. Bu hücreler antijenlerin alınmasından ve bağışıklığın oluşturulmasından sorumludur (Illum, 2007; Sharma ve ark., 2009).

1.4.2.2. Intranazal Bağışıklama Sonrası Bağışık Yanıtın Oluşması

Intranazal bağışıklamadan sonra hem antikora dayalı hem de hücresel tipte bağışık yanıt oluşabilir. Antijen organizma tarafından alındıktan sonra submukozadaki lenfoid hücrelere geçer. Böylelikle plazma hücrelerinde IgA oluşturulmasında görevli B hücrelerine yardımcı T hücrelerinin aktivasyonu gerçekleşmiş olur (Davis, 2001).

etkin maddelerin büyük bir çoğunluğu basit çözeltiler şeklinde burna verildiklerinde burun boşluğundan biyoyararlanımları %1'in altında olmaktadır. Nazal yolla verilen proteinlerin absorpsiyonunu etkileyen majör faktörler: (i) antijenlerin nazal membranlardan geçiş yeteneklerinin zayıf olması (ii) protein çözeltilerini absorpsiyon bölgesinden hızlıca uzaklaştıran mukosilyer klerens mekanizmasıdır (Soane ve ark., 1999; Amidi ve ark., 2006; Bertram ve Bodmeier, 2006).

Nazal aşıların etkinliği antijenin fiziksel doğasına ve seçilen veriliş sistemine bağlıdır (Davis, 2001). Özellikle rekombinant proteinler ve DNA içeren yeni aşılar geleneksel aşılarla göre daha güvenilir; fakat daha az immünojeniktir. Bu nedenle aktif ve güvenilir adjuvanların ve yeni nesil aşılarla kullanılabilecek veriliş sistemlerinin geliştirilmesine gereksinim duyulmaktadır (Shahiwala ve ark., 2007).

İdeal bir formülasyon ve veriliş sistemi, antijenin nazal mukozadaki stabilitesini ve kalma süresini artırmalı, NALT tarafından alınmasını sağlamalı ve toksik etki oluşturmada adjuvan etki göstermelidir (Sharma ve ark., 2009).

1.5.1. Jel Yapısındaki Formülasyonlar

Mukozal bağışıklamada genellikle antijenin uygun ve tam dozda verilebilmesi için fosfat tampon tuzu (PBS) kullanılmaktadır. Buna karşılık aşıların intranazal ve intravajinal yoldan PBS içinde verilişinde immünojenisite sınırlı olmaktadır. Bu durumun nedeni serbest akış çözeltisi tipindeki aşıların uygulama bölgesinden hızla uzaklaşması ve korunmasız kalan antijenlerin mukozal salgılardaki enzimler tarafından parçalanmaya uğramasıdır (Oh ve ark., 2003; Han ve ark., 2006). Bu sebeplerden dolayı nazal dozaj formları hazırlanırken burun mukozasının anatomik ve fizyolojik özellikleri ve mukosilyer klerens dikkate alınmalıdır (Zaki ve ark., 2007).

Jeller, küçük inorganik partiküllerden oluşmuş süspansiyonları veya sıvı tarafından penetre edilmiş büyük organik molekülleri içeren yarı katı sistemlerdir. Jel kütlesi, küçük farklı partikül ağını içeriyorsa iki fazlı sistem olarak sınıflandırılır (örn., alüminyum hidroksit jeli). İki fazlı sistemde, disperse fazın partikül boyutu büyük ise, jel kütlesi bazen “magma” olarak adlandırılır (örn., bentonit magma). Tek fazlı jeller organik makromolekülleri içerirler. Bunlar sıvı boyunca tekdüze bir şekilde dağılmış olup disperse makromoleküllerle sıvı arasında görünen sınırlar bulunmamaktadır. Tek fazlı jeller sentetik makromoleküllerden (örn., karbomer) veya doğal zamklardan (örn., tragacantha) oluşabilirler (USP, 2009).

Hidrojeller ise üç boyutlu, hidrofilik çapraz bağlı polimerik ağlar olup, suyu veya biyolojik sıvıları absorbe ederek şişme yeteneğine sahiptirler (Gupta ve ark., 2002). Hidrojellerden etkin madde salımının; düşük molekül ağırlığına sahip proteinler için difüzyon, büyük molekül ağırlığına sahip proteinler için polimerin parçalanması ile gerçekleştiği belirlenmiştir (Packhaeuser ve ark., 2004; Alğın ve Baykara, 2005). Son yıllarda hidrojeller, kullanıma hazır hidrojeller ve in-sitü oluşan jeller olarak iki gruba ayrılmıştır (Nanjawade ve ark., 2007).

Mukozal verilişte jel yapısındaki formülasyonlara ait örnekler Çizelge 1.3'te sunulmaktadır.

Çizelge 1.3. Mukozal yoldan verilişte formülasyon örnekleri

Etkin Madde	Uygulama Yolu	İnsan/Hayvan Modeli	Sonuç	Kaynak
Tetanoz toksoidi	Nazal	Fare	Poloksamer 407/kitosan yeni bir mukozal aşı veriliş sistemi olup bağışık yanıtı aditif ve sinerjik etki kazandırmıştır.	Westerink ve ark., 2002
Plazmid DNA	Nazal	Fare	In-sitü jelleşen ve mukoadezif polimer içeren sistemlerin kullanımı plazmid DNA'nın burunda alıkonmasını ve absorpsiyonunu etkili ve güvenilir bir şekilde artırmıştır.	Park ve ark., 2001
Sumatriptan süksinat	Nazal	Koyun	%0,3 Karbopol içeren Poloksamer 407 jel formülasyonu sumatriptan süksinat etkin maddesi için ümit vericidir. Etkin maddenin burunda alıkonma süresini ve absorpsiyonunu artırmıştır.	Majithiya ve ark., 2006

Çizelge 1.3. Devam Mukozal yoldan verilişte formülasyon örnekleri

Etkin Madde	Uygulama Yolu	İnsan/Hayvan Modeli	Sonuç	Kaynak
İnsülin	Nazal	Sıçan	Absorpsiyon artırıcı EDTA ile verilen kitosan jeli insülinin nazal verilişi için ilgi çekicidir ve parenteral yolun yerini alabileceği düşünülmektedir.	Varshosaz ve ark., 2006
Bovin serum albümini	Nazal	-	Karbopol jelleri proteinlerin solunum mukozasına verilişi için umut verici biyoadeziv yapılardır.	Witschi ve Mrsny, 1999
Kısa zincirli yağ asitleri	Rektal	-	Poloksamer 407 suda %18'lik konsantrasyonda oda sıcaklığında sıvı, 37°C'de jelleşebilen bir çözüldür. Adeziv özellikleri nedeniyle kısa zincirli yağ asitlerinin kontrollü salımını sağlar.	Charreaue ve ark., 2001
Hepatit B yüzey antijeni	Vajinal	Fare	Sıcaklığa duyarlı ve mukoadesif polimer bazlı vajinal aşı veriliş sisteminin, Hepatit B yüzey antijenine karşı bağışık yanıtların artırılmasında faydalı olabileceği belirlenmiştir.	Oh ve ark., 2003

1.5.2. In-sitü Aktivasyonla Jel Oluşturan Sistemler

İnsan nazal mukozasında, mukosilyer klerens süresinin 10-15 dakika aralığında olduğu belirlenmiştir (Zhou ve Donovan, 1996). Biyoadezif jel formülasyonları kullanılarak mukosilyer klerensin yavaşlatılması, böylece formülasyonun nazal absorpsiyon bölgesinde alıkonma süresinin uzatılması ve biyoyararlanımının artırılması planlanmaktadır. Bu durumda nazal yolla uygulanan, in-sitü jelleşen mukozal veriliş sistemleri ilgi çekici gözükmetedir (Majithiya ve ark., 2006).

Avantajları:

- In-sitü oluşan sistem nazal çözeltiye benzer uygulama kolaylığına sahiptir.
- In-sitü jellerin, jel formülasyonlarına üstünlükleri tam ve tekrarlanabilir uygulamanın mümkün olmasıdır.
- In-sitü oluşan depo sistemler, sabit “infüzyona benzer” plazma seviyesi-zaman profilleri oluşturmaları nedeniyle yan etkileri azaltabilirler. Bu özellik dar terapötik indekse sahip etkin maddeler için önemlidir.
- Antijenlerin burun mukozasında kalış sürelerini uzatırlar.
- In-sitü jel sistemlerinin hasta uyumu iyidir.
- Kontrollü ilaç salımı sağlarlar.
- In-sitü oluşan jellerin uzun süre burunda kalmaları sonucu ilaçların biyoyararlanımı ve terapötik etki süresi artar.
- Hazırlandıktan sonra yıkanmaları ve izole edilmeleri gerekli mikrokürelere kıyasla yatırım ve üretim maliyetleri düşüktür (Kumar ve Himmelstein, 1995; Lang ve ark., 2002; Pakhaeuser ve ark., 2004; Zaki ve ark., 2007).

In-sitü aktivasyonla jel oluşturan sistemler çözelti, koloidal sol ya da süspansiyon olarak uygulanan, fizyolojik koşullara maruz kaldığında jel hale geçen viskoz sıvılar olarak tanımlanırlar (Nanjawade ve ark., 2007).

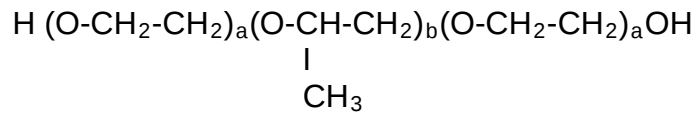
1.5.2.1. In-sitü Jel Oluşum Mekanizmaları

Terapötik aktif bileşiklerin verilişinde; prensipte polimerik çözelti olup fizyolojik koşula yakın sıcaklıkta in-sitü jelleşebilen taşıyıcı sistemlerin kullanılması ilgi çekicidir. Polimerik çözeltilerin jel faza geçişlerinde etkili mekanizmalar, kullanılan polimere göre değişiklik göstermektedir (Mayol ve ark., 2008).

1.5.2.1.1. Sıcaklık Değişimi ile Jelleşen Sistemler

Nazal yolla verilen in-sitü jelleşen sistemlerde, sıcaklık değişimiyle jelleşen formülasyonlar üzerinde çalışmalar yürütülmektedir. Bu amaçla kullanılan polimerler arasında poloksamerler, tetronikler, etil (hidroksi etil) selüloz, hidroksipropil metil selüloz ve metil selüloz yer alır (Lin ve Sung, 2000; Srividya ve ark., 2001; Nanjawade ve ark., 2007).

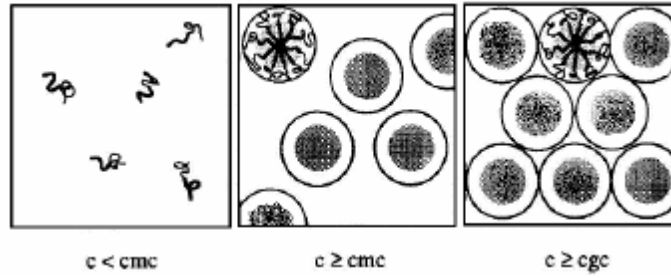
Sıcaklık değişimiyle faz geçiş mekanizmasına Poloksamer çözeltisi örnek verilebilir. Poloksamer çözeltisinin fizyolojik koşullarda jel faza geçişi Poloksamer'in yapısal özellikleri vasıtasıyla açıklanabilir. Poloksamer, poli(oksietilen) ve poli(oksipropilen) birimlerinden oluşan blok kopolimerlerin bir sınıfıdır (Şekil 1.5). Genel formülü poli(oksi-etilen)_x-poli(oksi-propilen)_y-poli(oksi-etilen)_x'dir (Escobar-Chavez ve ark., 2006).



Şekil 1.5. Poloksamer 407'nin kimyasal yapısı

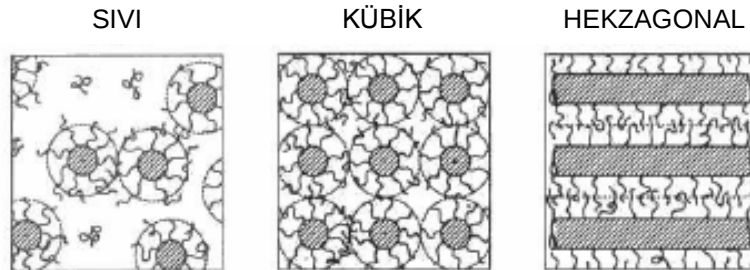
(a: etilen oksit bölümü, b: propilen oksit bölümü) (Escobar-Chavez ve ark., 2006)

Poloksamer'in sulu çözeltilerde misel oluşumu sıcaklığa bağlıdır. Düşük sıcaklıklarda, propilen oksit ve etilen oksit bloklarının etrafını su tabakası çevreler. Sıcaklık yükseldikçe polimer zincirlerinin hidrofobik bölgelerinin (propilen oksit bloğu) çevresindeki su molekülleri düzensiz hale gelir. Karşı karşıya gelen hidrofobik bölgeler bağ oluşturmak üzere birbirini çekerken, aynı zamanda hidrofilik bölgeler sulu ortamla temaslarını artırmak üzere tekrar düzene girerler. Polimer konsantrasyonu ve sıcaklık kritik noktanın üzerindeyse, tri-blok kopolimer miseller oluşur (Şekil 1.6). Misellerin oluştuğu sıcaklık "kritik misel sıcaklığı" olarak tanımlanır (Kabanov ve ark., 2002; Escobar-Chavez ve ark., 2006).



Şekil 1.6. Blok kopolimer çözeltisindeki kritik misel konsantrasyonu (cmc) ve kritik jel konsantrasyonunun (cgc) şematik görünümü (Escobar-Chavez ve ark., 2006)

Jelin miseller yapıda olduğu düşünülür. Sıvı miseller faz, düşük sıcaklıklarda stabildir; fakat sıcaklığın artması ile kübik yapıya dönüşürler. Daha yüksek sıcaklıklarda silindirik yapı oluşur (Şekil 1.7) (Escobar-Chavez ve ark., 2006).



Şekil 1.7. Sıcaklığın artmasıyla Poloksamerler tarafından oluşturulan miseller fazların şematik görünümü (Escobar-Chavez ve ark., 2006)

1.5.2.1.2. pH'ya Bağlı Olarak Jelleşen Sistemler

pH'ya bağlı olarak jelleşen polimerlere örnek olarak selüloz asetatfitalat lateks ve karbopol verilebilir (Srividya ve ark., 2001).

Karbopol çözeltisinin jel faza geçişi pH değişimiyle olur ve bu geçiş polimerin iyonizasyonuna bağlıdır. pH 7,4'te iyonize karboksil gruplarının karşılıklı birbirini itmesi daha gergin karbopol yapısı oluştururken aynı karboksil grupları hidrofobik etkileşimler aracılığıyla stabil hidrojen bağları oluşturabilir. Diğer taraftan, karbopol yapısının hidrofobik özelliği, hidrofobik bağlar arasında birleşme oluşturabilir. Bu çapraz bağlanma olayı pH 7,4 ortamında daha viskoz jel oluşumuyla sonuçlanır (Lin ve Sung, 2000).

1.5.2.1.3. İyon Etkisiyle Jelleşen Sistemler

İyon etkisiyle jelleşen polimerlere örnek olarak gellan zamkı ve aljinat verilebilir (Srividya ve ark., 2001; Mayol ve ark., 2008).

Gellan zamkı, *Pseudomonas elodea* tarafından salgılanmaktadır ve anyonik polisakkarit yapısındadır. İnsan burun mukozası 0,1 ml mukusla kaplı olup sodyum, potasyum ve kalsiyum iyonlarını içermektedir. Bu katyonlar, gellan zamkının jelasyonunun başlamasını sağlamaktadır (Cao ve ark., 2009).

Aljinat polimeri, iki tip monomer içeren doğrusal, dallanmamış bir polisakkarittir. Monomerleri; beta-D-mannuronik asit ve alfa-L-glukuronik asittir. Divalan katyonlarla (örn., Ca^{+2}) çapraz bağlanarak suda çözünmeyen jelleri oluşturur (Moebus ve ark., 2009).

1.5.2.2. Çalışmamızda Formülasyonların Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

1.5.2.2.1. Poloksamerler (Pluronik F127 ve Pluronik F68)

Poloksamer; noniyonik, hidrofilik ABA-tipi kopolimer olup poli(oksietilen) ve poli(oksipropilen) ünitelerinden meydana gelmektedir (Matschke ve ark., 2002; Kang ve ark., 2007).

Tüm poloksamerlerin kompozisyonları kimyasal açıdan benzerdir; ancak farklı molekül ağırlıkları ve polimerde bulunan oksietilen oranlarına göre polimer sınıfları mevcuttur. Bu nedenle poloksamerlerin farklı tipleri ticari olarak piyasada bulunmaktadır. Poloksamerler; toksik ve iritan değildir. Köpek ve tavşanlar üzerinde yürütülen çalışmalarda, %5 ve %10 konsantrasyonlarda göz, dişeti ve cilde uygulanan poloksamerlerin irritasyona ve hassasiyete neden olmadıkları görülmüştür (Pharmaceutical Excipients, 2009). Roques ve ark., DNA içeren poloksamer jelini perikardiyal kese içine enjekte etmişler ve morfolojik analizlerle kalp bölümlerinde toksik etki görülmediğini doğrulamışlardır (Roques ve ark., 2007).

İlaç sanayisinde en sık kullanılan poloksamerler, Poloksamer 407 (Pluronik F127) ve Poloksamer 188 (Pluronik F68)'dir. Poloksamer 407'nin ortalama molekül ağırlığı 9840 ile 14,600; Poloksamer 188'in ise 7680 ile 9510 arasında değişmektedir (European Pharmacopoeia Online, 2009).

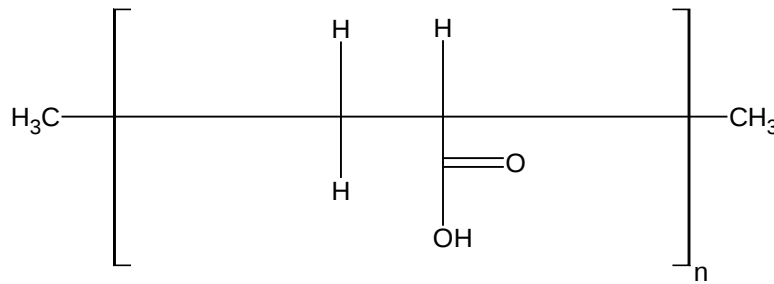
Poloksamer 407, %70 hidrofilik etilenoksit birimlerini ve %30 hidrofobik propilenoksit birimlerini içerir. Bu noniyonik polimerin konsantre sulu çözeltileri (%20-30 a/a) 4°C'den, oda sıcaklığına veya vücut sıcaklığına ısıtıldığında viskozitelerinde artış gözlenmiştir. Poloksamer'in konsantre çözeltileri sıcaklık artışıyla jel oluşumu göstermektedir ve oluşan bu jeller

sıcaklığa bağlı olarak geri dönüşümlüdür (Cho ve ark., 1997; Pisal ve ark., 2004).

Poloksamer 407, surfaktan ve proteinin stabilitesini artırıcı özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir. Poloksamer 407, farelerde intraperitoneal enjeksiyonla interlökin-2 ve üreaz proteinlerinin jel matriksinden sürekli salımlarını sağlamak için kullanılmıştır. Poloksamer jellerin aynı zamanda üreaz ve interlökin-2'nin stabilitelerini artırdığı bilinmektedir (Katakam ve Banga, 1997).

1.5.2.2.2. Karbopol

Karbopol (karbomer), akrilik asitin sentetik yüksek molekül ağırlıklı polimeridir. Bu polimer %56 ile %68 arasında karboksilik asit gruplarını (-COOH) içerir. Polimerin monomeri akrilik asit olup polimer zincirleri alil sükroz ve alil pentaeritrol ile çapraz bağlıdır (Şekil 1.8) (The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009).



Şekil 1.8. Karbomer resindeki akrilik asit monomer birimi

Karbomerler düşük viskoziteli asidik koloidal dispersiyonları oluşturmak için suda disperse edilirler. Nötralize olduklarında ise yüksek viskozitedeki jelleri oluştururlar. Nötralize sulu jelleri pH 6-11 arasında daha viskozken, 3'ten daha düşük veya 12'den büyük pH'da viskozitesi azalır. Karbopolün, farklı viskozitedeki sınıfları (örn., C940, C941) mevcuttur. Karbomerlerin genellikle

toksik ve iritan olmadıkları kabul edilir (Pharmaceutical Excipients, 2009). Karbopoller, mukoadezif polimerler olup formülasyonların mukozal bölgeyle temasını artırır (Han ve ark., 2006).

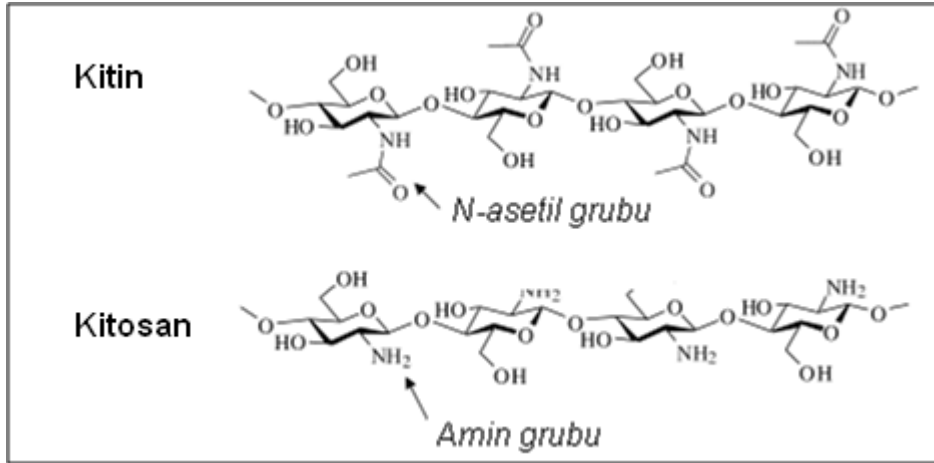
1.5.2.2.3. Hidroksipropil Selüloz ve Hidroksipropil Metil Selüloz

Talasaz ve ark., selüloz ailesinden hidroksipropil metil selüloz (HPMC) ve hidroksipropil selülozun (HPC) poloksamer 407'nin sulu çözeltilerine ilave edildiğinde sıcaklıkla jelleşebilen jeller oluşturduklarını göstermişlerdir. HPC ve HPMC'nin kullanımıyla in-sitü jelleşen sistemlerin hazırlanmasında gerekli poloksamer konsantrasyonu düşürülmüştür. Bu durum özellikle yüksek molekül ağırlıklı etkin maddeler için ilgi çekicidir (Talasaz ve ark., 2008).

HPC ve HPMC, viskoziteyi artırıcı etkilerinden dolayı in-sitü jelleşen sistemlerin mukozayla temas sürelerini uzatmaktadır (Bilensoy ve ark., 2006a; Zaki ve ark., 2007). Haşçıçek ve ark., mukoadezif polimer olarak HPMC'nin kullanıldığı mikroküreler hazırlamışlar ve mikrokürelerin mukoadezif özelliklerinden dolayı nazal mukozaya mukoadezyonlarının yüksek olduğunu göstermişlerdir (Haşçıçek ve ark., 2003).

1.5.2.2.4. Kitosan

Kitosan, glukozamin ve *N*-asetilglukozamin kopolimerlerinden oluşan katyonik bir polisakkarittir (Şekil 1.9). Kitosan, kabuklu hayvanlarda çok miktarda bulunan bir polimer olan kitinin deasetilasyonu ile elde edilir. Alkali deasetilasyon kitosanın yüksek sıcaklıklarda sodyum hidroksit ile muamele edilmesiyle gerçekleşmektedir. Deasetilasyon derecesi, artan sıcaklık veya sodyum hidroksit konsantrasyonu ile artmaktadır. Kitosan, aynı zamanda bazı mikroorganizmalarda ve maya mantarlarında doğal olarak bulunur (Felt ve ark., 1998; Illum, 1998; Şenel ve McClure, 2004).



Şekil 1.9. Kitin ve kitosanın yapısı (Illum ve ark., 2001)

Kitosan; biyogeçimli, biyoparçalanabilir, düşük toksisiteli, üretim maliyeti düşük ve bağışıklık sistemi üzerinde adjuvan özellikler gösterebilen doğal bir polimerdir. Kitosanın kimyasal modifikasyonlara açık olması bu polimeri ilgi çekici kılmaktadır (van der Lubben ve ark., 2001; Issa ve ark., 2005).

Kitosan alkali ve nötral pH'larda çözünmez; fakat inorganik ve organik asitlerle (hidroklorik asit, laktik asit, asetik asit ve glutamik asit) tuzları oluşturur. Çözeltide kitosanın amino grupları protonlanır ve meydana gelen çözünür kitosan pozitif yüklüdür. Kitosanın çözünürlüğü serbest amino ve *N*-asetil gruplarının dağılımına bağlıdır. Genellikle %1-3 arasındaki sıvı asidik çözeltiler kitosanı çözünür hale getirmek için kullanılmaktadır. Kitosan piyasada farklı molekül ağırlıklarında (10,000 ile 20 milyon Dalton arası) ve asetilasyon derecelerinde mevcuttur (Illum ve ark., 2001; Agnihotri ve ark., 2004; Şenel ve McClure, 2004).

Günümüzde kitosan ve türevlerinin kullanıldığı farklı antijenleri içeren mukozal aşılar geliştirilmiştir. Bu sistemlerin hayvan modelleri ve insanlar üzerindeki etkileri halen test edilmektedir. Kitosan mukoadesif özelliği sayesinde formülasyonların nazal boşluktan klerenslerini yavaşlatmakta ve böylelikle mukozal yüzeylerde alıkonma sürelerini uzatmaktadır. Kitosanın bir diğer önemli özelliği absorpsiyon artırıcı etkisidir. Kitosanın pozitif yüklü

amino grupları, negatif yüklü hücre membranları ve mukozal hücreler arasındaki sıkı bağlantılarla (tight junctionlar) etkileşmekte, sıkı bağlantıların bütünlüğü bozularak bileşiklerin paraselüler yoldan taşınması sağlanmaktadır. Kitosan bilindiği kadarıyla toksik ve immünojenik değildir ve kitosanın sıkı bağlantılar üzerindeki etkisi geçicidir (Kotze ve ark., 1998; Davis, 2006; Andrews ve ark., 2009).

Fare ve kobaylarda (guinea pig) yapılan çalışmalar kitosanın, nazal yoldan verilen influenza, boğmaca ve difteri aşılarının hem humoral hem de hücresel tipte bağışık yanıtlarını anlamlı ölçüde artırdığını ortaya koymuştur (Read ve ark., 2005). Bacon ve ark., kitosan çözeltilerinin influenza virusüne karşı hem mukozal hem de sistemik bağışık yanıtları uyardıklarını göstermiştir. Intranazal yoldan verilen kitosan içeren aşı formülasyonu farelerin nazal sıvılarında yüksek IgA titreleri oluşturmuştur. Bu antikorlar antijeni subkütan enjeksiyonla alan farelerde ise görülmemiştir (Bacon ve ark., 2000).

1.6. Difteri

Difteri, gram pozitif *Corynebacterium diphtheriae* basilinin neden olduğu akut bulaşıcı bakteriyel bir üst solunum yolu enfeksiyonudur (Wharton ve Vitek, 2004). Bu hastalık, enfeksiyon bölgesinde bakterinin tipik kolonizasyonu ve pseudomembran oluşturması yanında ürettiği potent bir toksin, difteri toksini ile tipik sistemik toksemi karakterindedir (Özcengiz ve ark., 1998). Difteriye karşı tam bağışıklama için çoklu aşılama programının uygulanması gerekmektedir (Diwan ve ark., 1997).

1.6.1. Difteri Toksini

Corynebacterium diphtheriae basili 1883 yılında Klebs ve 1884 yılında Loeffler tarafından tanımlanmıştır. Bu pleomorfik basil spor oluşturmaz,

aerobiktir ve hareketsizdir (Nandi ve ark., 2003; Weisberg, 2007). Basil tarafından üretilen karakteristik ekzotoksin, hem basilin inokülasyon yerinde hem de kan dolaşımında absorbe edilir ve hücrel hasar ile normal protein sentezine engel olarak ölüme yol açar (Nandi ve ark., 2003). Bu nedenle difteriden korunma, toksini nötralize eden antikorlarla (antitoksin) sağlanabilir. Bu antikorlar, toksinin toksik olmayan formları ile yapılan aktif bağışıklamayla uyarılabilir (Isaka ve ark., 2000).

Difteri toksini iki yapısal formda bulunur. Bu formlar; tek zincir (58,3 kDa) veya birbirlerine disülfid bağlarıyla bağlı A (21,0 kDa) ve B (37,3 kDa) fragmanları şeklindedir (Johansen ve ark., 1998; Metz ve ark., 2007).

1.6.2. Difteri Toksoidinin Hazırlanması

Toksoid; antitoksin oluşturabilme özelliği olup, toksik olmayan bir yapıya sahip, modifiye bakteri toksinleridir (Tabak, 1998). Difteri toksininin formaldehit ile muamelesi sonucu toksik olmayan; fakat immünojenik difteri toksoidi (DT) elde edilmektedir. Difteri toksoidinin kalitesi esas olarak detoksifikasyon prosesine bağlıdır. Formaldehit konsantrasyonu, reaksiyon süresi, reaksiyon sıcaklığı ve matriksin kompozisyonu en önemli reaksiyon koşullarıdır. Toksoidin kalitesi rutin olarak aktivite ve güvenilirlik testleriyle tayin edilmelidir (Metz ve ark., 2003).

1.6.3. Difteri Toksoidi ile Aşılama ve Beraberindeki Sorunlar

Difteri toksoidi aşısı, Batı Avrupa'da rutin aşılama programlarına 1940 ve 1950'lerde dahil edilmiştir (Cameron ve ark., 2007). Gelişmiş ülkelerde bu hastalığın tamamen ortadan kaldırılması ise 1970'lerde gerçekleşmiştir. Buna karşılık Avrupa popülasyonunun büyük oranında, difteri antitoksini titresi önerilen koruma düzeyinin (0.01 IU/ml) altındadır (McNeela ve ark., 2001).

Özellikle son on yıl içinde, bazı ülkelerde difteri epidemisiyle ilgili raporların yeniden ortaya çıkması endişe yaratmıştır. Ek olarak, son yıllarda difterinin sıklık pikiinde çocuklardan daha ileri yaş gruplarına geçiş söz konusudur. Aynı zamanda bu hastalıkta antikorlarla uzun süreli hafıza oluşumu düşüktür. Bu nedenle difteri için destek dozunun (aşıların güçlendirilmesi ve korunmanın devamı için aralıklı olarak verilen doz, booster doz) her on yılda bir uygulanması önerilmektedir. Difteri aşısında Alum adjuvanının kullanımı ise IgE ile ilişkili advers etkilere neden olmakta ve bu durum alternatif adjuvanların araştırılması ihtiyacını doğurmaktadır (Aguila ve ark., 2006; Kara, 2008).

Difteri toksoidini içeren preparatlar 2-8°C arası sıcaklıklarda (buzdolabında) saklanmalı, dondurulmamalıdır (Wharton ve Vitek, 2004; Şensoy ve Belet, 2008). Difteri gibi donmaya duyarlı aşının dondurulması aktivite kaybına yol açabilmektedir (Matthias ve ark., 2007).

Difteri hastalığını geçiren bireylerde dolaşan antitoksin düzeyleri hakkında gözlemler ve birtakım araştırmalar takip eden sayfalarda verilen, difteriye karşı antitoksin düzeyleri üzerine yaygın olarak kabul edilmiş yorumlar ile sonuçlanmıştır (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4. Difteriye karşı antitoksin düzeyleri ve bağışıklık (WHO The Immunological Basis for Immunization Series/Module 2: Diphtheria, 2003; WHO Weekly epidemiological record, 2006)

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

1.6.4. Difteri Toksoidinin Mevcut Preparatları ve Gelecekteki Yaklaşımlar

Difteri ve tetanoz toksoidi ile tüm hücre ya da aselüler boğmaca içeren üçlü karma aşılar, bebeklere ve 7 yaşın altındaki çocuklara belirli aralıklarla intramüsküler enjeksiyonla uygulanmaktadır. Son yıllarda difteri toksoidinin mukozal yoldan verilmesiyle ilgili çalışmalar sürdürülmektedir. Mukozal aşılama, geleneksel parenteral aşılamaya kıyasla hem sistemik hem de mukozal bağışıklığı uyarabilmektedir. Aşıların mukozal verilmesi advers etkileri en aza indirmekte ve daha kolay bir verilme yolu sağlamaktadır. Bu nedenle mukozal aşılama, difteri gibi sıkı aşılamaların gerekli olduğu durumlarda dikkate değer öneme sahiptir (McNeela ve ark., 2001).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

2-merkapt etanol	Sigma
Akrilamid	Sigma
Amonyum sülfat	Merck
Amonyum persülfat	Sigma
Anti-guinea pig IgG peroksidaz konjugat	Sigma
Asetik asit	Merck
Asetik asit (glasiyel)	Merck
Aljinik asit	Sigma
Bakır (II) sülfat pentahidrat	Riedel-de Haén
Bikinoninik asit	Fluka
Bromfenol mavisi (pH 3-4,6)	Merck
Coomassie Brilliant Blue G (CBBG-250)	Sigma Aldrich
D(-) Mannitol	Merck
Difteri toksini (9230 CD ₅₀ /ml)	Lot 2000 Japon
Difteri toksoidi (2000 µg/ml, 675 Lf/ml)	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı
Disodyum hidrojen fosfat	Merck
Etanol (Absolut)	Riedel-de Haén
Gliserol	Aklar Kimya
Glisin	Sigma
Hidroklorik asit	Analar
Hidroksipropil selüloz (M.A.: 80,000; Viskozite: ~150-700 cP)	Aldrich
Hidroksipropil metil selüloz (Viskozite: ~4,000 mPa.s)	Fluka

İzopropanol	Merck
Karbopol 934	B.F. Goodrich Chem. Co.
Kitosan, düşük molekül ağırlığı (M.A.: 150,000; Viskozite: ~100 mPa.s)	Fluka
Kitosan, orta molekül ağırlığı (M.A.: 400,000; Viskozite: ~200 mPa.s)	Fluka
Metanol	Lab-Scan
N,N' metil-bis-akrilamid	Sigma
N-N'-N'-N' tetrametil etilendiamin (TEMED)	Sigma
o-Fenildiamin Dihidroklörür (OPD)	Sigma
Pluronik F68 (Ort. M.A.: 8400)	Sigma
Pluronik F127 (Ort. M.A.: 12500)	Sigma
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck
Skim milk, dry	Oxoid
Sodyum asetat-3H ₂ O	Merck
Sodyum azid	Merck
Sodyum dodesil sülfat	Merck
Sodyum hidrojen karbonat	Merck
Sodyum hidroksit	Kimetsan
Sodyum karbonat monohidrat	Merck
Sodyum klorür	Merck
Sodyum tartarat dihidrat	Sigma
Standart serum (1060 ünite/vial)	Lot 9 Japon
Trizma base (Tris)	Sigma

Hücre

Vero Hücresi (Afrika yeşil maymun böbrek hücresi)

Hücre Kültürü Ortamı

Eagle MEM (Minimum Essential Medium)

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çalkalayıcı su banyosu	Memmert
Çoklu manyetik karıştırıcı	IKA Werke RT10 power
ELISA okuyucu	Molecular Devices Spectra Max190
ELISA plakları	Biofil
Filtre	Sartorius 0,2 µm
Filtre	Sartorius 0,45 µm
Hassas terazi	Sartorius BL 210S
Isıticılı su banyosu	Hake E 12
Karbondioksitli inkübatör	Sanyo
Karıştırıcı	Stirpac
Laminar Air Flow Kabin	Holten LaminAir
Manyetik karıştırıcı	Cimarec
Mikropipet (10 µl'ye kadar)	Rainin
Mikropipet (100 µl'ye kadar)	Rainin
Mikropipet (1000 µl'ye kadar)	Kartell
Mikroskop	Olympus Invert CK-2
pHmetre	SenTix 82
Santrifüj aleti	Hitachi Himac CT5DL
Santrifüj aleti	Kubota 3500
Santrifüj aleti	Mikro 12-24
Sonikatör	Bandelin
Su banyosu	Heto HMT 200
Viskozimetre	Brookfield DV-II
Vorteks	IKA Vortex Genius 3

2.2. Yöntemler

2.2.1. Difteri Toksoidi Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.1.1. Difteri Toksoidinin Lf Değerinin Kontrol Edilmesi

Difteri toksoidinin, örnekteki toksoid (ve toksin) içeriğinin yanı sıra antijenik gücü ve saflığı flokülasyon değeri (Lf birimler) olarak ifade edilir. 1 Lf, standart referans difteri antitoksininin 1 ünitesini floküle eden toksoid miktarıdır. Tüm aşı üreticileri, toksoidlerin Lf değerlerini belirlemede, orijinal Ramon flokülasyon testini kullanır (Wharton ve Vitek, 2004; Preneta-Blanc ve ark., 2008).

Difteri toksoidinin Lf değerinin kontrol edilmesinde öncelikle difteri toksoidi ile serum fizyolojik 1:2 oranında karıştırılmıştır. Difteri toksoidinin önceden bilinen Lf değeri 675 Lf/ml olduğundan seyreltme ile değerin 225 Lf/ml olması beklenmiştir. Bu nedenle 225 Lf/ml'yi içine alan bir çizelge oluşturulmuştur (Çizelge 2.1). Difteri toksoidinin Lf değerinin belirlenmesinde, farmakope gereklilikleri uyarınca ml'sinde 100 Lf antitoksin içeren standart kullanılmıştır. Bu çalışma standartı gittikçe artan konsantrasyonlarda flokülasyon tüplerine (7 cm x 1 cm) konulmuş ve sabit hacme ulaşmak amacıyla 1 ml'ye serum fizyolojik ile tamamlanmıştır. Ardından 1 ml seyreltilmiş antijen her bir tüpe ilave edilmiştir. Tüpler 50°C'lik su banyosuna yerleştirilmiş ve belirli aralıklarla flokülasyonun oluşup oluşmadığı gözlenmiştir. Flokülasyonun gözlemlendiği ilk tüp, örnekteki antijen miktarına en yakın antitoksin miktarını içeren tüptür. Birçok durumda bu tüpün Lf içeriği, örneğin Lf değeri olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda difteri toksoidi serum fizyolojik ile seyreltildiğinden ilk flokülasyonun gözlemlendiği tüpün Lf değeri 3 ile çarpılmıştır (WHO, 1997).

Çizelge 2.1. Difteri toksoidine ait Lf değerinin kontrol edilmesi

Tüp numarası	Antitoksin miktarı (Lf/ml)	1/5 oranında çalışıldı (Lf/ml)	Antitoksin miktarı (ml)	Serum fizyolojik miktarı (ml)	Difteri toksoidi (ml)
1	100	20	0,20	0,80	1,0
2	125	25	0,25	0,75	1,0
3	150	30	0,30	0,70	1,0
4	175	35	0,35	0,65	1,0
5	200	40	0,40	0,60	1,0
6	225	45	0,45	0,55	1,0
7	250	50	0,50	0,50	1,0
8	275	55	0,55	0,45	1,0
9	300	60	0,60	0,40	1,0
10	325	65	0,65	0,35	1,0
11	350	70	0,70	0,30	1,0
12	375	75	0,75	0,25	1,0

2.2.1.2. Difteri Toksoidinin Spektrumu

Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS ve pH 4,5 asetat tamponu içinde hazırlanmış, konsantrasyonu bilinen çözeltilerinin 350-750 nm aralığında ELISA okuyucusunda spektrumları alınmış ve maksimum absorbands gösterdikleri dalga boyları ($\lambda_{\max}$) belirlenmiştir.

2.2.1.3. Difteri Toksoidinin MikroBikininik Asit (MikroBCA) Yöntemiyle Kalibrasyonu

Bikininik asit yöntemi, peptid ve protein yapısındaki maddelerin miktar tayininde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Çok düşük miktarların tayininde çok daha hassas olan mikrobikininik asit yöntemi tercih edilmektedir. BCA yöntemi ile 100-1200 $\mu\text{g/ml}$ 'ye kadar hassaslıkta ölçüm yapılırken, mikroBCA yöntemi ile 5-250 $\mu\text{g/ml}$ 'ye kadar duyarlılıkta toplam protein miktar tayini yapılabilmektedir (Smith ve ark., 1985).

Reajan A+B:

Sodyum karbonat monohidrat ----- 4 g
 Sodyum tartarat ----- 0,8 g
 Bikinoninik asit ----- 2 g

Sodyum karbonat monohidrat ve sodyum tartarat 60-80 ml distile suda çözülür. Üzerine bikinoninik asit ilave edilir ve 40°C'de çözünene kadar karıştırılır. Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır ve oda sıcaklığında saklanır.

Reajan C:

Bakır sülfat (5xH₂O) ----- 4 g
 Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Difteri toksoidinin, PBS (fosfat tampon tuzu, pH 7,4) ve asetat tamponunda (pH 4,5) hazırlanan ve konsantrasyonları bilinen çözeltilerinin mikroBCA yöntemi ile absorbansları ölçülmüştür. Difteri toksoidinin stok antijen çözeltisinden (200 µg/ml) seyreltmeler yapılarak 6-42 µg/ml arasında yedi dilüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan bu dilüsyonlardan, ELISA plağı kuyucuklarına üç paralel şekilde 150'şer µl ilave edilmiştir. Ardından Reajan A+B ile Reajan C (50:1) karıştırılmış ve her bir kuyucuğa bu karışımdan da 150'şer µl eklenmiştir. ELISA plağı 60°C'de 1 saat 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda plak oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve ELISA okuyucusunda (Molecular Devices, Spectra Max 190) 560 nm'de dilüsyonların absorbansları ölçülmüştür.

Konsantrasyonları bilinen dilüsyonların okunan absorbans değerleri ile kalibrasyon denklemleri hesaplanmıştır. Bu denklemlerden faydalanarak örneklerin toplam protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

2.2.1.4. Difteri Toksoidinin MikroBikininik Asit (MikroBCA) Yöntemiyle Kalibrasyonunun Validasyonu

Validasyon, analitik yöntemin, planlanan (amaçlanan) kullanıma uygun olması için, o sistemin kullanımını onaylama işlemidir. Performans karakteristikleri analitik parametrelere dayanarak açıklanır. Miktar tayinlerinin validasyonunda kullanılan analitik parametreler doğruluk, kesinlik, özgünlük, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı, doğrusallık ve aralıktır (ICH Q2(R1)).

2.2.1.4.1. Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, o yöntem ile elde edilen sonuçların gerçek değere yakınlığıdır. Doğruluk, belirli miktarda analitin bilinen miktar tayini yöntemi ile % geri kazanım değerleri bulunarak hesaplanır. Doğruluk, belirli aralığı kapsayan en az üç konsantrasyon noktasında en az üçer kez hazırlanan numune miktarlarının % geri kazanım değerlerinin belirlenmesiyle tayin edilmektedir (ICH Q2(R1)).

2.2.1.4.2. Kesinlik

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

1. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, kısa zaman aralıklarında aynı işlem koşulları altındaki kesinliği ifade eder. Belirli aralığı kapsayan en az üç konsantrasyon noktasında en az üçer kez ya da test konsantrasyonunun %100'ünde en az

altı ölçümle belirlenir. Sonuçlar, hesaplanan konsantrasyonların ortalaması, standart sapması ve % bağıl standart sapması olarak verilir (ICH Q2(R1)).

2. Ara Kesinlik

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

3. Tekrar Üretilebilirlik

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

2.2.1.4.3. Özgünlük

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

2.2.1.4.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD)

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

Denklem 2.1. $LOD=3,3 \cdot \sigma/S$

σ : Regresyon doğrularının y kesişim değerlerinin standart sapması

S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

2.2.1.4.5. Alt Tayin Sınırı (LOQ)

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

Denklem 2.2. $LOQ=10 \cdot \sigma / S$

σ : Regresyon doğrularının y kesişim değerlerinin standart sapması

S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

2.2.1.4.6. Doğrusallık ve Aralık

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

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

2.2.1.5. Difteri Toksoidinin Safılık Tayini

Sulu bir çözelti içinde, süspande ya da çözünmüş küçük elektrik yüklü parçacıkların, uygulanan elektrik alanının etkisi ile göç etmesi sürecine

“elektroforez” denir (Kaya, 2002). Elektroforez, proteinlerin kompleks karışımlarını ayırmak, alt birim bileşimlerini incelemek ve proteinlerin saflığını tayin etmek için kullanılır. Poliakrilamid jel elektroforezlerinde, proteinler poliakrilamid jel matriksindeki gözenekler arasında elektriksel alanın etkisi ile göç ederler. Gözenek büyüklüğü, artan akrilamid konsantrasyonu ile azalmaktadır. Gözenek büyüklüğü, protein yükü, boyutu ve şekli proteinlerin göç hızını belirlemektedir (Chakavarti ve Chakavarti, 2008).

SDS-PAGE için %10'luk ayırma jeli hazırlanmış ve cam sandviçin arasına dökülmüştür. Ardından jelin üzerine izopropanol ilave edilmiş ve havayla teması önlenmiştir. Jelin bu şekilde yaklaşık 15 dakika bekletilerek donması sağlanmış ve bu süre sonunda izopropanol ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bir sonraki aşamada %5'lik yükleme jeli hazırlanmış ve plaklar arasına dökülüp taraklar yerleştirilmiştir. Dökülen jel 10 dakika içinde donmuş ve taraklar çıkartılmıştır.

Örnekler için difteri toksoidinin farklı konsantrasyondaki çözeltileri pH 7,4 PBS'te hazırlanmıştır. Protein çözeltilerine (20 µl) örnek tamponu (5 µl) ilave edilmiş ve 100°C'de 10 dakika bekletilmişlerdir. Denatürasyon işleminden sonra her bir bant için 20 µl örnek, mikropipet yardımıyla kuyucuklara uygulanmıştır. Örnekler jele uygulandıktan sonra cam plaklar içindeki jel, mini dikey jel sistemine yerleştirilmiştir. İç ve dış rezervuarlar tampon çözeltisi ile gerekli yerlere kadar doldurulmuştur. Bu işlemlerin ardından 60 voltluk sabit gerilim uygulanarak elektroforez işlemi başlatılmıştır. Sürüklemeye işlemi yaklaşık üç saat sürdürülmüş ve bromfenol mavisine ait bandın alt sınırın 1 cm üzerinde durduğu gözlemlendiğinde güç kaynağı kapatılmıştır. Jel, cam plaklar arasından dikkatlice çıkartılarak diğer işlemlere devam edilmiştir. Jel, bir saat fiksasyon, iki saat sensitizasyon çözeltisiyle çalkalandıktan sonra boyama çözeltisinde bir gece bekletilmiştir. Bir sonraki gün jel, bir saat destaining I çözeltisinde (boyayı geri alma çözeltisi), arka plan temiz olana kadar da destaining II çözeltisinde bekletilmiştir. Boyanın uzaklaştırılmasının

ardından jelin fotoğrafı çekilmiş ve %5 h/h'lik asetik asit çözeltisinde aylarca saklanmıştır.

Çalışmamızda denatüre edici koşullar altında kesintili sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), difteri toksoidinin yapısını ve fragmanlarını tayin etmek için uygulanmıştır (Bollag ve ark., 1996). SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler Çizelge 2.2'de listelenmiştir.

Çizelge 2.2. SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler

Ayırma Jeli (%10'luk)	5 ml için
%30 akrilamid karışımı	1,7 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,3 ml
Distile su	1,9 ml
%10 a/h'lik SDS	0,05 ml
%10 a/h'lik amonyum persülfat	0,05 ml
TEMED	0,003 ml
TEMED polimerizasyonu başlattığı için en son ilave edilmelidir.	
Yükleme Jeli (%5'lik)	5 ml için
%30 akrilamid karışımı	0,83 ml
1,0 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,63 ml
Distile su	3,4 ml
%10 a/h'lik SDS	0,05 ml
%10 a/h'lik amonyum persülfat	0,05 ml
TEMED	0,003 ml
TEMED polimerizasyonu başlattığı için en son ilave edilmelidir.	
Örnek Tamponu	10 ml için
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,6 ml
%50'lik gliserol	5,0 ml
%1'lik bromfenol mavisi	2,0 ml
2-merkapto etanol	0,5 ml
Distile su	0,9 ml
%30 Akrilamid Karışımı	100 ml için
Akrilamid	29 g
N,N'-metil-bis-akrilamid	1 g
100 ml'ye distile su ile tamamlanır.	
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	100 ml için
Tris	18,2 g
Konsantre HCl ile pH'sı 8,8'e ayarlanır. +4°C'de saklanır.	

Çizelge 2.2. Devam SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler

1,0 M Tris (pH 6,8)	100 ml için
Tris Konsantre HCl ile pH'sı 6,8'e ayarlanır. +4°C'de saklanır.	12,1 g
%10'luk SDS	100 ml için
Sodyum dodesil sülfat (SDS) 10 gram SDS tartılır ve üzerine 90 ml distile su eklenir. 68°C'ye ısıtılır ve karıştırılır. 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.	10 g
%1'lik Bromfenol mavisi	5 ml için
Bromfenol mavisi 0,05 gram bromfenol mavisi tartılır ve üzerine 5 ml distile su eklenir. Bir gece boyunca karıştırılır. Bir sonraki gün 0,45 µm'den süzülür.	0,05 g
Elektroforez Tamponu	1000 ml
Tris Glisin SDS Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.	3 g 14,4 g 1 g
Fiksasyon çözeltisi	100 ml için
Etanol Metanol Distile su Asetik asit	40 ml 10 ml 40 ml 10 ml
Sensitizasyon çözeltisi	100 ml için
Amonyum sülfat Distile su Asetik asit	10 ml 89 ml 1 ml
Boyama çözeltisi	100 ml için
Etanol Distile su CBBG-250 Asetik asit	45 ml 50 ml 0,125 g 5 ml
Destaining çözeltisi-I	100 ml için
Etanol Distile su Asetik asit	40 ml 55 ml 5 ml
Destaining çözeltisi-II	100 ml için
Etanol Distile su Asetik asit	30 ml 67 ml 3 ml

2.2.1.6. Difteri Toksoidinin Stabilitesi

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

2.2.2. In-sitü Jelleşen Ön Formülasyonların Hazırlanması

Ön formülasyon çalışmalarında iyi bir in-sitü jel formülü geliştirmek için farklı polimer ve çözücülerin değişen oran ve konsantrasyonları denenmiştir. Ön formülasyon çalışmalarında difteri toksoidi kullanılmamıştır.

2.2.2.1. Poloksamer 407/Poloksamer 188 İçeren Ön Formülasyonların Hazırlanması

Poloksamer polimerlerinin istenilen sıcaklıklarda jel oluşturma oranlarının tespiti için, Poloksamer 407'nin tek başına ve Poloksamer 188 ile distile su veya PBS (pH 7,4) içinde değişen oranlarda çözeltileri hazırlanmıştır (Çizelge 2.3).

Formüllerin hazırlanmasında soğuk metot kullanılmıştır (Bochot ve ark., 1998; Han ve ark., 2006). Formülasyon hazırlanmasında kullanılacak hesaplı miktardaki çözücü 4°C'ye soğutulmuş ve 2 dakikalık sürekli karıştırma ile belirli miktarlardaki Poloksamer 407 ve Poloksamer 188 yavaş yavaş ilave edilmiştir. Hazırlanan dispersiyonlar berrak ve viskoz çözelti elde edilene kadar buzdolabında bekletilmiştir. En son olarak ileriki çalışmalarda difteri toksoidinin formüllere hesaplı miktarda ilave edilebilmesi için boş formülasyonların hacimleri ölçülmüştür.

Çizelge 2.3. Poloksamer 407/Poloksamer 188 karışımını içeren in-sitü jelleşen ön formülasyonlar

Formül Kodu	Poloksamer 407 (% a/a)	Poloksamer 188 (% a/a)	PBS (pH 7.4) (% a/a)	Distile su (% a/a)
F1	20	---	---	80
F2	17,5	---	---	82,5
F3	16	---	---	84
F4	18	12	---	70
F5	12	20	---	68
F6	17	---	83	---
F7	16,25	---	83,75	---
F8	12	20	68	---
F9	14	20	66	---
F10	14	18	68	---
F11	16	14	70	---
F12	18	12	70	---
F13	18	10	72	---
F14	18	10	72	---
F15	20	10	70	---

2.2.2.2. Farklı Mukoadezif Polimerlerin Kullanıldığı Poloksamer 407/Poloksamer 188 Ön Formülasyonlarının Hazırlanması

Poloksamer 407 ve Poloksamer 188 ile hazırlanan in-sitü jelleşen ön formülasyonlara, mukoadezif anyonik polimer karbopol 934, katyonik polimer kitosan, nötral polimerler HPC veya HPMC, %0,1 a/a ile %0,5 a/a arasında değişen oranlarda ilave edilmiştir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Difteri toksoidi içermeyen farklı mukoadhezif polimerlerin kullanıldığı Poloksamer 407/ Poloksamer 188 karışımını içeren in-sitü jelleşen ön formülasyonlar

Formül Kodu	PF 127 (% a/a)	PF 68 (% a/a)	HPC (% a/a)	HPMC (% a/a)	Karbopol 934 (% a/a)	Kitosan (LMW) (% a/a)	Kitosan (MMW) (% a/a)	Mannitol (%a/a)	Distile su (%a/a)	PBS (pH7,4) (%a/a)	Asetat Tamponu (pH 4,5) (%a/a)
F16	17,75	---	---	0,5	---	---	---	---	81,75	---	---
F17	18	10	---	---	0,2	---	---	---	19,9	51,9	---
F18	18	10	---	0,2	---	---	---	---	---	71,8	---
F19	18	10	0,2	---	---	---	---	---	---	71,8	---
F20	18	10	---	---	---	0,1	---	---	---	71,9	---
F21	18	10	---	---	---	0,2	---	---	---	71,8	---
F22	18	10	---	---	---	---	0,2	---	---	71,8	---
F23	18	10	---	---	---	---	0,5	---	---	71,5	---
F24	18	10	---	---	0,2	---	---	---	---	71,8	---
F25	20	10	---	0,2	---	---	---	---	69,8	---	---
F26	20	10	---	---	0,15	---	---	---	69,85	---	---
F27	20	10	---	---	0,2	---	---	---	69,8	---	---
F28	20	10	---	---	0,2	---	---	---	---	69,8	---
F29	17,75	---	---	---	---	0,5	---	---	81,75	---	---
F30	18	---	---	---	---	0,5	---	---	81,5	---	---
F31	18	---	---	---	---	0,2	---	---	81,8	---	---
F32	18	10	---	---	---	0,1	---	4	---	---	67,9
F33	18	10	---	---	---	0,1	---	---	---	---	71,9

Formüllerin hazırlanmasında öncelikle mukoadezif polimerler, hesaplı miktarda çözücü içinde oda sıcaklığında karıştırılmıştır. HPC, HPMC ve karbopol 934 polimerleri için distile su veya PBS kullanılmıştır. Kitosan içeren formülasyonlar için ise Bölüm 2.2.2.3'te anlatılan stok kitosandan hesaplı miktarda alınmış ve PBS veya asetat tamponu (pH 4,5) çözücü olarak kullanılmıştır. Dispersiyonlar 4°C'ye soğutulmuş ve 2 dakikalık sürekli karıştırma ile belirli miktarlardaki Poloksamer 407 ve Poloksamer 188 yavaş yavaş ilave edilmiştir. Hazırlanan dispersiyonlar berrak ve viskoz çözelti elde edilene kadar buzdolabında (2-8°C) bekletilmiştir (Şekil 2.1). En son olarak ileriki çalışmalarda difteri toksoidinin formüllere hesaplı miktarda ilave edilebilmesi için boş formülasyonların hacimleri ölçülmüştür.



Şekil 2.1. Formülasyonların hazırlanması

2.2.2.3. Kitosan İçeren Ön Formülasyonların Hazırlanması

Suda çözünür olmayan düşük molekül ağırlıklı ve orta molekül ağırlıklı kitosanların kullanıldığı formülasyonların hazırlanmasında öncelikli olarak stok kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. %3 kitosan, %0,1 h/h asetik asit içeren %0,9'luk salinde hazırlanmaya çalışılmış; fakat çözünmeyen parçacıkların

kaldığı görülmüş ve oluşan çözelti çok viskoz olmuştur. Bu nedenle çözücü ve kitosan konsantrasyonu değiştirilerek çalışmalara devam edilmiştir. Bir başka denemede 3 gram kitosan (orta molekül ağırlıklı) 100 ml asetat tamponunda (pH 4,5) çözülmeye çalışılmış, çözünmenin sağlanması için ara ara glasiyel asetik asit ilave edilmiş; fakat çözünme sağlanamamıştır. Son olarak 2,5 gram kitosan (orta molekül ağırlıklı ve düşük molekül ağırlıklı) 100 ml %2 asetik asit çözeltisinde çözülmüş ve hazırlanan stok kitosan çözeltisinden gerekli miktarda alınarak Çizelge 2.5'de anlatılan formüller hazırlanmıştır.

Yalnızca kitosan içeren formüllerin hazırlanması için stok kitosan çözeltisinden hesaplı miktarda alınmıştır. Sonraki aşamalarda ilave edilecek difteri toksoidi miktarı (198 µl) göz önüne alınarak ön çalışmalarda difteri toksoidi yerine asetat tamponu (pH 4,5) ilave edilmiştir.

Çizelge 2.5. Kitosan içeren ön formülasyonların içeriği

Formül Kodu	Kitosanın molekül ağırlığı	%2,5 stok kitosan çözeltisi	Asetat tamponu (pH 4,5)
F34	Düşük (LMW)	0,802 ml	0,198 ml
F35	Orta (MMW)	0,802 ml	0,198 ml

2.2.3. In-sitü Jelleşen Ön Formülasyonların Karakterizasyonu

Ön formülasyonların karakterizasyonu için formülasyonların jelleşme sıcaklıkları, jelleşme süreleri ve ozmolariteleri incelenmiştir.

2.2.3.1. Ön Formülasyonların Jelleşme Sıcaklıklarının Ölçülmesi

Jelleşme sıcaklığı, sıvı fazın jelle geçiş yaptığı sıcaklık olarak tanımlanır (Han ve ark., 2006). Jelleşme sıcaklığının tespiti için 2 gram in-sitü jel sistemi

transparan bir flakona alınıp içerisine magnet atılmıştır ve alttan ısıtılmalı su banyosunda 90 rpm hızda karıştırılarak sıcaklık 15°C'den 40°C'ye kademeli olarak artırılmıştır. Magnet durduğunda termometrede okunan sıcaklık jelleşme sıcaklığı olarak kaydedilmiştir (Ryu ve ark., 1999; Yong ve ark., 2004; El-Kamel ve El-Khatip, 2006).

2.2.3.2. Ön Formülasyonların Jelleşme Sürelerinin Ölçülmesi

Difteri toksoidi içermeyen ön formülasyonlar, 100 rpm'de çalışan 37°C'deki ısıtıcılı su banyosuna yerleştirilmiştir. Her bir dakikada formülasyonlar su banyosundan çıkarılmış ve flakonlar baş aşağı çevrildiklerinde akışkan olup olmadıkları kontrol edilmiştir. Formüllerin başlangıçtan ters çevrilip akmadıkları ana kadar geçen süre jelleşme süresi olarak kabul edilmiştir.

2.2.3.3. Ozmolaritenin Belirlenmesi

Ön formülasyonların ozmolariteleri aşağıdaki formül kullanılarak teorik olarak hesaplanmıştır.

Denklem 2.3.

$$mOzmol/litre = \frac{\text{Madde miktarı (gram/litre)}}{\text{Katı maddenin molekül ağırlığı}} \times 1000 \times \text{Çözeltideki mevcut iyon sayısı}$$

(Bozkır ve ark., 2007, s.: 258)

Aynı zamanda formülasyonların yapısına giren polimer dışındaki maddelerin, formülasyonlardaki kullanım oranları dikkate alınarak hazırlanan çözeltilerinin ozmotik basınçları Wescor model 5500 Vapor Pressure ozmometresi ile ölçülmüştür.

2.2.4. Ön Formülasyonların Değerlendirilmesi ve Uygun Formüllerin Seçimi

Ön formülasyonların jelleşme sıcaklıkları, jelleşme süreleri ve ozmolariteleri intranazal uygulamalar açısından değerlendirilmiş ve F14, F17, F18, F19, F20, F21 ve F32 kodlu formüller ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

2.2.5. F14, F17, F18, F19, F20, F21, F32 Kodlu Difteri Toksoidi İçermeyen Formüller Üzerinde Yürütülen Çalışmalar

Difteri toksoidi içermeyen uygun formüller üzerinde, organoleptik inceleme, pH tayini, reolojik davranış ve viskozite ölçümleri ve mukoadezif gücün ölçüm çalışmaları yürütülmüştür.

Elimizde yeterli miktarda difteri toksoidi bulunmadığından, difteri toksoidinin formüllere ilave edilmesinden önce yüksek hacimde çalışılması gereken testler uygun difteri toksoidi içermeyen boş formülasyonlarla yapılmıştır.

2.2.5.1. Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Organoleptik Özellikleri

F14, F17, F18, F19, F20, F21 ve F32 kodlu difteri toksoidi içermeyen formüllerin organoleptik özellikleri görsel olarak incelenmiştir.

2.2.5.2. Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin pH Tayini

Difteri toksoidi içermeyen formülasyonların pH'sı SenTix 82 pH elektrodu ile ölçülmüştür. Her ölçümden önce elektrot ucu distile su ile yıkanmış ve kurulanmıştır. Ölçümler üç kez tekrarlanarak ortalamaları alınmıştır.

2.2.5.3. Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerde Reolojik Değerlendirme ve Viskozite Ölçümü

Difteri toksoidi içermeyen uygun formüllerin viskoziteleri, Brookfield RVTDV-II viskozimetresi T-C ve T-F spindle'ları kullanılarak ölçülmüştür.

Sıcaklığa bağlı olarak jelleşen formüllerin viskozlukları başlangıçta oda sıcaklığında (25°C) çözelti, ardından 34°C'de jel halindeyken ölçülmüştür. Ölçümler 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alınmıştır.

2.2.5.4. Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerde Mukoadezif Gücün Tayin Edilmesi

Difteri toksoidi içermeyen formülasyonların mukoadezif güçleri, iki tarafı da müsin kaplı yüzeylerin ayrılması sırasında oluşan gerilim kuvveti ölçülerek saptanmıştır.

Çalışmada kullanılan alet Choi ve arkadaşlarının tanımladığı aletin modifikasyonu ile tasarlanmıştır (Choi ve ark., 1998). Alette, formülasyonların üzerine uygulandığı alt bölümü oluşturan ve 1,1 cm çaplı üzeri alüminyum folyoyla kaplı içine ağırlık konmuş flakon kullanılmıştır. Üst tarafında ise yine alt kısım ile aynı şekilde alüminyum folyoyla kaplı flakon kapağı ince bir tel yardımı ile sağ kefeye asılmıştır.

Deneylerde müsin yerine, müsin özelliklerine en yakın değerleri vermiş olan aljinik asitin sudaki %1'lik çözeltisi kullanılmıştır (Saettone ve ark., 1989; Aydın, 1995). 0,125 ml'lik aljinik asit çözeltisi hem üst hem de altta bulunan flakon kapaklarına homojen bir şekilde yayılmıştır. Formüllerden 50 µl'lik örnekler alınarak alt bölmenin üstüne homojen bir şekilde yayılmıştır. Bu tabakalar 5 dakika boyunca saç kurutma makinesinde soğuk hava ile kurutulmuştur. Alt bölüm hareketli bir platforma yerleştirilip, iki yüzey birbirine

değene kadar yavaşça yükseltilmiştir. Üst bölümün kuvveti ile bir dakikalık süre içinde yüzeylerin birbirine teması sağlanmıştır. Ardından 10 mg/s olacak şekilde ağırlıklar sol kefeye ilave edilmiştir. İki yüzeyin birbirinden ayrıldığı andaki kopmayı sağlayan ağırlıklar “mg” olarak belirlenmiştir. Deneyler sabit sıcaklıkta (34°C) gerçekleştirilmiş ve ölçümler üç kez tekrarlanarak ortalamaları alınmıştır. Aletin şematik görünümü Şekil 2.2’de görülmektedir.



Şekil 2.2. Mukoadeziflik ölçümünde kullanılan aletin fotoğrafı

2.2.6. F14, F17, F18, F19, F20, F21, F32 Kodlu Formüllerin Difteri Toksoidi ile Hazırlanmaları

Difteri toksoidi içermeyen uygun formüller üzerinde Bölüm 2.2.5’te anlatılan testler tamamlandıktan sonra formüllerin optimizasyonu sağlanmış ve formüllere difteri toksoidi ilave edilmiştir.

2.2.6.1. Difteri Toksoidinin Formüllere İlave Edilmesi

Difteri toksoidinin formüllere hesaplı miktarda ilave edilebilmesi için boş formülasyonların hacimleri ölçülmüştür. Ardından ilave edilecek difteri toksoidi miktarı çözücü miktarından düşülerek formülasyonlar hazırlanmıştır.

Kullanımdan hemen önce 396 µg/ml difteri toksodi (133,65 Lf/ml) 4°C'de sürekli karıştırma ile yavaş yavaş ilave edilmiştir.

2.2.6.2. Difteri Toksodi İlavesinin Formüllerin Jelleşme Sıcaklığı Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

Formüllere hesaplı miktarda difteri toksodi ilave edildikten sonra, formüllerin jelleşme sıcaklıklarının değişip değişmediği Bölüm 2.2.3.1'de tarif edilen yöntemle göre tayin edilmiştir.

2.2.6.3. Difteri Toksodi İçeren Formüllerin Organoleptik Özellikleri

F14, F17, F18, F19, F20, F21 ve F32 kodlu difteri toksodi içeren formüllerin organoleptik özellikleri görsel olarak incelenmiştir.

2.2.7. F14, F17, F18, F19, F20, F21, F32 Kodlu Difteri Toksodi İçeren Formüllerde In vitro Testler

Difteri toksodi içeren formüllerde difteri toksodi miktar tayini ve in vitro salım çalışmaları yürütülmüştür.

2.2.7.1. Difteri Toksodi Miktar Tayini

Formülasyonların difteri toksodi içeriği mikroBCA yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Bu amaçla her bir formülden alınan 26 µl örnek eppendorflara konulmuş ve hacim pH 7,4 PBS veya pH 4,5 asetat tamponu ile 1000 µl'ye tamamlanmıştır. Difteri toksodi içeren ve içermeyen numunelerin absorbansları 560 nm'de okunmuş ve kalibrasyon denkleminde hareketle

difteri toksoidi konsantrasyonu belirlenmiştir. Difteri toksoidi miktar tayini her formül için üç paralel yapılmış ve ortalamaları alınmıştır.

2.2.7.2. Difteri Toksoidi İçeren Formüllerde In vitro Salım Çalışmaları

Difteri toksoidinin formüllerden in vitro salımı, membran içermeyen bir çözünme yöntemi kullanılarak incelenmiştir (Barichello ve ark., 1999).

Difteri toksoidi içeren ve içermeyen formülasyonlar (150'şer µl) eppendorflara konulmuş ve 37°C'ye ayarlı çalkalayıcı su banyosuna yerleştirilmişlerdir. Formülasyonların 3 dakika içinde jelleşmesinin ardından, çalışma sıcaklığına önceden ayarlanmış 1000'er µl çözünme ortamı (PBS, pH 7,4) jellerin üzerine ilave edilmiştir. In vitro salım çalışmaları 100 rpm'de yürütülmüştür. Belirli zaman aralıklarında supernatant tamamen alınmış ve sink koşullarını sağlamak için aynı miktar (1 ml) taze ortam ilave edilmiştir. Alınan örneklerin 4000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmesinden sonra mikroBCA miktar tayini yöntemiyle absorbansları 560 nm'de okunmuştur. Saptanan absorbans değerleri, difteri toksoidinin pH 7,4 PBS'teki kalibrasyon grafiğine konularak her bir zaman aralığında açığa çıkan difteri toksoidi konsantrasyonları hesaplanmıştır. Her bir deney için 3 paralel olarak yapılan okumalar sonucunda difteri toksoidinin % açığa çıkan miktarlarına göre salım profilleri çizilmiştir.

2.2.8. Stabilité Çalışmaları

Difteri toksoidi içeren ve içermeyen formüller üzerinde sırasıyla Bölüm 2.2.5, Bölüm 2.2.6 ve Bölüm 2.2.7'de anlatılan testler yapıldıktan sonra F14, F17, F18, F19 ve F32 kodlu formüller ideal formüller olarak değerlendirilmiş ve stabilite çalışmalarına başlanmıştır.

2.2.8.1. Difteri Toksoidi İçermeyen F14, F17, F18, F19, F32 Kodlu Formüllerin Stabilite Çalışmaları

Difteri toksoidi içermeyen F14, F17, F18, F19, F32 kodlu formüller 2-8°C buzdolabında ve 25±2°C, %60 bağıl nemdeki iklim dolabında altı ay süreyle bekletilmiştir. Stabilite çalışmalarında 0., 1., 3. ve 6. aylarda formüllerin organoleptik özellik, pH, reolojik davranış ve jelleşme sıcaklıkları incelenmiştir.

Elimizde yeterli miktarda difteri toksoidi bulunmadığından ve Bölüm 2.2.5'teki deneylere paralel olması amacıyla yüksek hacimde çalışılması gereken stabilite testleri difteri toksoidi ilave edilmeden yapılmıştır.

2.2.8.2. Difteri Toksoidi İçeren F14, F17, F18, F19, F32 Kodlu Formüllerin Stabilite Çalışmaları

Difteri toksoidi (DT) içeren F14, F17, F18, F19 ve F32 kodlu formüller 2-8°C buzdolabında ve 25±2°C, %60 bağıl nemdeki iklim dolabında üç ay süreyle bekletilmiştir. Stabilite çalışmalarında 0., 1. ve 3. aylarda formüllerin difteri toksoidi miktar tayini ve difteri toksoidinin formülasyon içindeki protein bütünlüğünün korunup korunmadığı incelenmiştir.

Difteri toksoidi içeren formüllerde, difteri toksoidi içermeyenlere göre daha kısa süreli stabilite çalışması yapılmasının nedeni, difteri toksoidinin boş formüllerde optimizasyon tamamlandıktan sonra ilave edilmesi ve ilgili formüller üzerinde çalışmalar yapıldıktan sonra stabiliteye konmalarıdır.

2.2.9. In vivo Çalışmalar

2.2.9.1. Deney Hayvanlarının Seçimi

In vivo aşılama çalışmalarında fare, kobay (guinea pig) ve sıçanlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Aşılama programımızda her hayvandan toplam üç kez kan alınacağı ve hayvanların burun içine aşılama yapılacağından, difteri toksoidine iyi yanıt verdiği bilinen kobaylar ile çalışılmıştır. Bu amaçla Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Bilim Kurulu ve Etik Kurulu'ndan onay alınmış ve çalışmalar yerel etik kurul ilkeleri çerçevesinde Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Biyolojik Kontrol Bölümü'nde yürütülmüştür (24.03.2009/5510).

2.2.9.2. Deney Hayvanlarının Özellikleri

In vivo çalışmalar için ağırlıkları 300 gram ile 350 gram arasında değişen 7-8 haftalık 45 adet dişi Albino kobay (guinea pig) kullanılmıştır. Kobayların barındırıldıkları ortamda sıcaklık $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (%50-60 nem) olup havalandırma sistemi mevcuttur. Kobaylar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık periyodunda saklanmıştır. Hayvanların kafes bakımları yapılmış, günlük olarak su ihtiyaçları karşılanmış ve kobaylara *ad libitum* diyeti uygulanmıştır.

2.2.9.3. Formülasyonların Seçimi ve Hazırlanması

F14, F17, F18, F19 ve F32 kodlu formüllerin; organoleptik özellikleri, jelleşme sıcaklıkları ve süreleri, in vitro salım profilleri, pH'ları, viskozite değerleri, mukoadezif güçleri ve stabilite sonuçları dikkate alındığında F18 ve F32 kodlu formüllerin deney hayvanlarına uygulanmalarına karar verilmiştir. Kontrol grubu olarak ise PBS (pH 7,4) içinde difteri toksoidi tercih edilmiştir.

Intranazal verilecek formülasyonlar normal koşullarda, subkütan verilecek formüller ise aseptik koşullar altında laminar air flow kabiniinde hazırlanmıştır. Sterilizasyon için PBS, 0,22 µm'lik filtreden, boş formülasyonlar ise yoğunluklarından dolayı 0,45 µm'lik filtreden süzülerek filtrasyonla sterilizasyon yapılmıştır. Difteri toksoidi içermeyen boş formüller ve saf difteri toksoidi ayrı kaplarda saklanmış, uygulama esnasında birleştirilmiştir.

2.2.9.4. Uygulama Dozunun Belirlenmesi

Difteri toksoidi içeren formüllerin birçoğu pediatrik popülasyon için 25-30 Lf, erişkinler için 2 Lf ve üzeri difteri toksoidi içermektedir (Dittman, 2004; Wharton ve Vitek, 2004).

Örnekler doğrultusunda intranazal aşılama için 4 Lf/20 µl (10 µl/burun deliği) formülasyon anestezi yapılmadan dişi kobayların burun deliklerine mikropipet yardımıyla uygulanmıştır (Şekil 2.3) (Alpar ve ark., 2005). Burun mukus membran alanı arttıkça formüllerin absorpsiyonları artacağından her iki burun deliğine de uygulama yapılmıştır. Aşının kobayların burun içine verilışinden sonra kayıpların oluşmaması için hayvanlar yaklaşık iki dakika sabit tutulmuş ve formüllerin burun sıcaklığında jelleşmesi sağlanmıştır. Subkütan aşılama için ise 4 Lf/200 µl formülasyon anestezi yapılmadan dişi kobaylara enjekte edilmiştir.



Şekil 2.3. Kobayların intranazal yoldan aşılması

2.2.9.5. In vivo Aşılama Planı ve Deney Hayvanlarından Kan Alma

In vivo çalışmalarda difteri toksoidi içeren formüller, dokuz farklı grup (n=5) dişi kobaya belirli günlerde ve belirli yollarla uygulanmıştır (Çizelge 2.6).

Kobayların daha önce difteri toksoidi ile karşılaşmış ve karşılaşmadıkları hakkında bilgi sahibi olabilmek için aşılamadan bir hafta önce her birinden kan örnekleri alınmıştır. Bu işlem birinci aşılamadan bir hafta önce yapılarak kobayların stres koşullarına maruz kalmaları önlenmiş ve aşılama sonrası optimum immün yanıt elde edilmesi amaçlanmıştır.

Deney hayvanlarının zamana karşı oluşan bağışık yanıtlarındaki farklılıkları tespit etmek için sırasıyla IgA ve IgG antikor oluşumunun tam olarak gerçekleştiği zamanlar olan 20. ve 42. günlerde kobayların kalplerinden kan örnekleri alınmıştır (Sayın ve ark., 2008). Toplanan kan örnekleri steril kan tüplerinde 1 saat oda sıcaklığında, 1 saat buzdolabında (2-8°C) bekletildikten sonra 10,000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst kısımda toplanan serumlar eppendorflara alınarak analiz edilene kadar -20°C'de saklanmıştır.

Çizelge 2.6. In vivo çalışma grupları, aşılama zamanları ve aşılama yolları

	I. bağışıklama (Sıfıncı günde)	II. bağışıklama (Yedinci günde)	III. bağışıklama (Yirmi birinci günde)
I. grup: PBS içinde DT (Kontrol grubu)	+	+	+
	(i.n., 4 Lf/20 µl)	(i.n., 4 Lf/20 µl)	(i.n., 4 Lf/20 µl)
II. grup: DT içeren PF 127/PF 68+HPMC (F18)	+	+	+
	(i.n., 4 Lf/20 µl)	(i.n., 4 Lf/20 µl)	(i.n., 4 Lf/20 µl)
III. grup: DT içeren PF 127/PF 68+Kitosan (F32)	+	+	+
	(i.n., 4 Lf/20 µl)	(i.n., 4 Lf/20 µl)	(i.n., 4 Lf/20 µl)
IV. grup: PBS içinde DT(Kontrol grubu)	+	-	+
	(s.c., 4 Lf/200 µl)		(i.n., 4 Lf/20 µl)
V. grup: DT içeren PF 127/PF 68+HPMC (F18)	+	-	+
	(s.c., 4 Lf/200 µl)		(i.n., 4 Lf/20 µl)
VI. grup: DT içeren PF 127/PF 68+Kitosan (F32)	+	-	+
	(s.c., 4 Lf/200 µl)		(i.n., 4 Lf/20 µl)
VII. grup: PBS içinde DT(Kontrol grubu)	+	-	-
	(s.c., 4 Lf/200 µl)		
VIII. grup: DT içeren PF 127/PF 68+HPMC	+	-	-
	(s.c., 4 Lf/200 µl)		
IX. grup: DT içeren PF 127/PF 68+Kitosan	+	-	-
	(s.c., 4 Lf/200 µl)		

2.2.9.6. Subkütan ve Intranazal Toksisite Testi

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

2.2.10. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Aşılanan hayvanlardan elde edilen serumlardaki difteri toksoidine spesifik IgG antikor titreleri, modifiye edilmiş ELISA yöntemi ile tespit edilmiştir (European Pharmacopoeia Online, 2009).

ELISA plaklarının toplam 96 kuyucuğu 100 µl'lik difteri toksoidi çözeltisi (pH 9,6 karbonat kaplama tamponu ile 2 Lf/ml olacak şekilde seyreltilmiş) ile kaplanmış ve 4°C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bir sonraki gün her bir kuyucuk yıkama tamponu (0,5 g/l Tween 20 içeren PBS) ile üç kez yıkanmış ve kuyucuklara 200 µl blokaj tamponu (%5,0'lık skim milk içeren yıkama tamponu) ilave edildikten sonra 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonu takiben üç kez yıkanan kuyucuklara %2 skim milk içeren yıkama tamponu eklenmiştir. Serum örneklerinin iki katlı dilüsyonları son hacim 100 µl olacak şekilde kuyucuklara uygulanmıştır. Plaklar 37°C'de 1,5 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyondan sonra yıkama tamponuyla beş kez yıkanmıştır. 1:5000 oranında %2'lik skim milk içeren çözelti ile seyreltilmiş anti-guinea pig IgG peroksidaz konjugattan her bir kuyucuğa 100 µl ilave edilmiş ve 37°C'de 1,5 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda bağlanmamış konjugat, yıkama tamponuyla beş kez yıkanarak uzaklaştırılmış ve enzim aktivitesi, o-Fenildiamin Dihidroklörür (OPD) tablet çözeltisinden (%0,03 sodyum perborat içeren 0,05 M fosfat sitrat (pH 5,0) ile hazırlanan çözelti) her bir kuyucuğa 100 µl ilave edilmesiyle tespit edilmiştir. Plaklar karanlıkta 30 dakika bekletilmiş ve 100'er µl 1 N H₂SO₄ çözeltisi ilave

edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Absorbanslar 450 nm'de ELISA okuyucusunda okunmuştur.

2.2.11. Hücre Kültüründe Antikor Nötralizasyon Testi

Aşılanan hayvanların serumlarındaki antitoksin titrelerinin tayini için ELISA'ya kıyasla daha hassas bir yöntem olan hücre kültüründe antikor nötralizasyon testi ile çalışılmıştır. Bu yöntem, difteri toksininin Vero hücreleri (Afrika yeşil maymun böbrek hücreleri) üzerinde lizise neden olarak sitopatojenik etki göstermesi, oluşan antikorların bu sitopatojenik etkiyi inhibe etmeleri esasına dayanır. Antikor nötralizasyon testi ile bağışıklanmış hayvanların farklı serum dilüsyonları, sabit toksin konsantrasyonu ile kültüre edilerek indirekt olarak difteri aşısının potansi tayin edilebilir (European Pharmacopoeia Online, 2009).

Vero hücreleri, yüzeylerindeki çok sayıda reseptör sayesinde difteri toksinine yüksek duyarlılık göstermektedir. Hücre kültüründe nötralizasyon testi, yüksek duyarlılıkta (tayin edilebilen en küçük düzey 0,005 IU/ml) olup, tekrar üretilebilirdir ve bu testte minimum miktarda serum kullanılmaktadır (WHO, 1993).

Hücre kültürü çalışmaları laminar air flow kabini içinde aseptik koşullar altında yürütülmüştür. Hücreleri difteri toksininin etkisinden koruyan en yüksek serum dilüsyonu olan endpoint tayini için ünitesi bilinen standart serum (1060 ünite/vial) kullanılmıştır. Aşılanan hayvanlardan elde edilen serumların ve ünitesi bilinen serumun %3'lük fetal serum bovin içeren eagle MEM vasatı içinde iki katlı dilüsyonları hazırlanmıştır. Bu amaçla plağın A sırasına 50 µl serum, B sırasından itibaren tüm kuyucuklara 25 µl vasat ilave edilmiş, en son sıradan 25 µl dışarı atılmıştır. Ardından tüm kuyucuklara 9230 CD₅₀/ml'lik toksinden 25'er µl ilave edilmiş, plaklar çalkalanmış ve 37°C'de yaklaşık 1 saat nötralizasyona bırakılmıştır. Nötralizasyondan sonra her bir

kuyucuğa 100 µl vasat eklenmiştir. Bu işlemi takiben tüm kuyucuklara, önceden çoğaltmış olan Vero hücrelerinden (3×10^5 hücre/ml) 50'şer µl ilave edilmiş ve plakların üzeri transparan film ile kaplanmıştır. Plaklar 37°C'lik etüvde beş gün inkübasyona bırakılmış ve beşinci günün sonunda mikroskopta canlı hücreler sayılarak hesaplamalar yapılmıştır.

2.2.12. İstatistiksel Analizler

In vivo çalışma sonuçları Kruskal-Wallis testi ile değerlendirilmiş, gruplar arasında farklılık olup olmadığı tespit edilmiştir. Bu testten alınan sonuca göre de Kruskal-Wallis Çoklu Karşılaştırma Testi (Dunn Testi) yapılarak hangi gruplar arasında fark olduğu incelenmiştir. Bağımlı grupların zamana bağlı değerlendirilmesi ise Wilcoxon testi ile yapılmıştır. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir (Alpar, 2006).

3. BULGULAR

3.1. Difteri Toksoidi Özelliklerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

3.1.1. Difteri Toksoidinin Lf Değerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

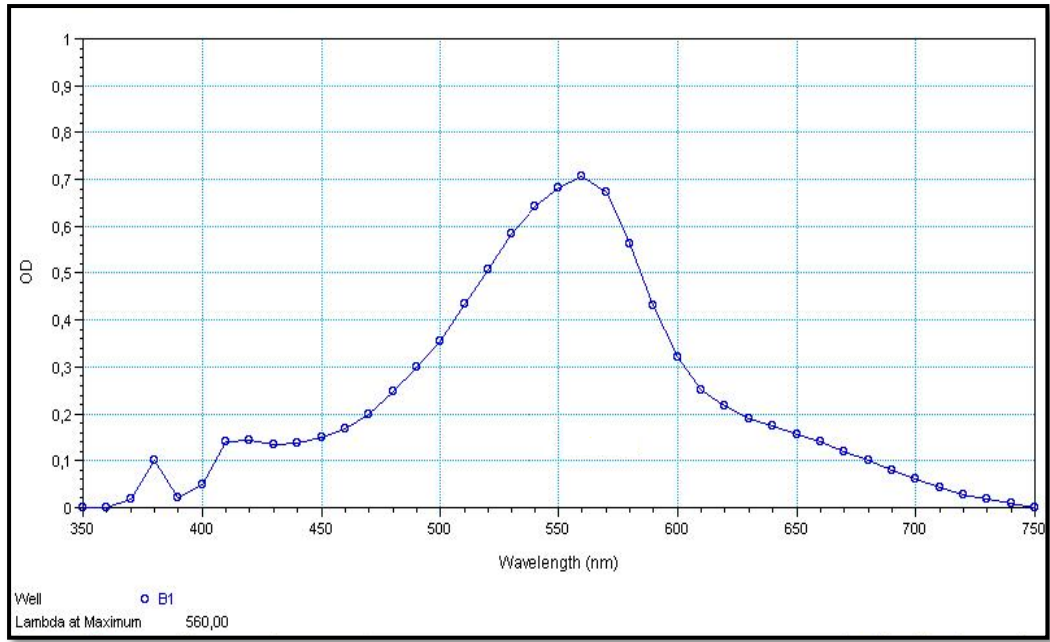
Bölüm 2.2.1.1’de anlatıldığı şekilde difteri toksoidinin Lf değeri belirlenmiştir. Flokülasyonun ilk ve en çok gözlemlendiği tüp 6 numaralı tüp olmuştur. Çalışmamızda antitoksin içeren standart ile 1/5 oranında çalışıldığından 6 nolu tüpün Lf değeri ilk olarak 5 ile çarpılmış, difteri toksoidi serum fizyolojik ile 1:2 oranında seyreltildiğinden son değer 3 katı alınmıştır.

Sonuç olarak, Ramon flokülasyon testine göre ileriki çalışmalarda kullanılacak olan difteri toksoidinin Lf değeri 675 Lf/ml olarak belirlenmiştir. Difteri toksoidinin protein miktarı ise Lf değerinden hareketle hesaplanmış ve 2000 µg/ml bulunmuştur.

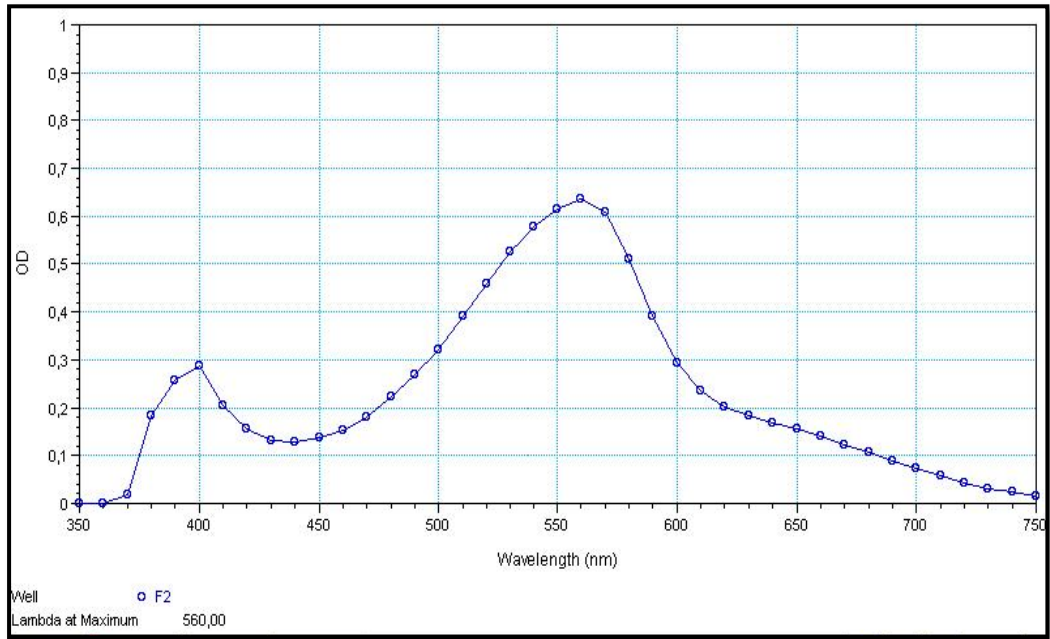
3.1.2. Difteri Toksoidinin UV Spektrumuna Ait Bulgular

Bölüm 2.2.1.2’de anlatıldığı şekilde ELISA okuyucusundan alınan difteri toksoidine ait spektrumlar Şekil 3.1 ve Şekil 3.2’de gösterilmiştir.

Çalışmamızda, difteri toksoidinin çeşitli özelliklerinin, formüllerdeki miktarının ve formüllerden in vitro salımının incelenebilmesi için pH 7,4 PBS; diğer polimerlerden farklı olarak kitosan içeren formüllerdeki miktarının saptanabilmesi için pH 4,5 asetat tamponu kullanılmıştır. Difteri toksoidinin bu ortamlar içindeki λ_{max} değeri, ELISA okuyucusundan alınan spektrumlardan yararlanılarak 560 nm bulunmuştur.



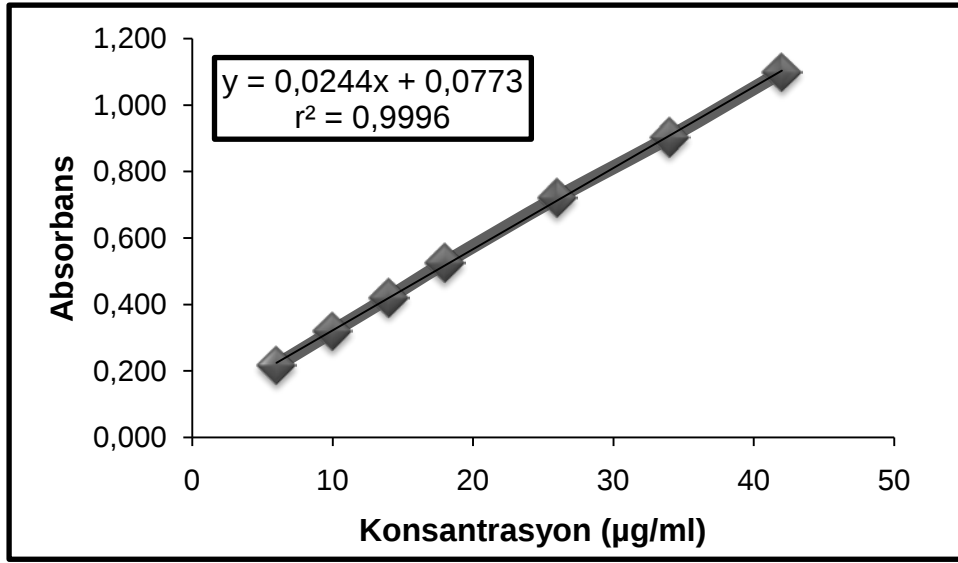
Şekil 3.1. Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS içindeki spektrumu



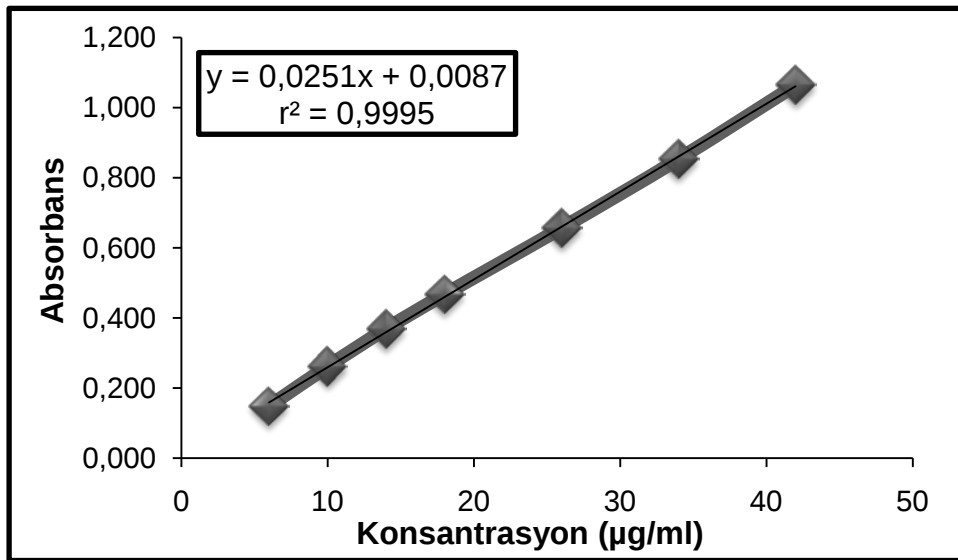
Şekil 3.2. Difteri toksoidinin pH 4,5 asetat tamponu içindeki spektrumu

3.1.3. Difteri Toksoidinin MikroBikininik Asit (MikroBCA) Yöntemiyle Kalibrasyonuna Ait Bulgular

Bölüm 2.2.1.3'te anlatıldığı şekilde difteri toksoidinin PBS (pH 7,4) ve asetat tamponu (pH 4,5) içinde yapılan ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon doğruları ve kalibrasyon parametreleri sırasıyla Şekil 3.3, Şekil 3.4 ve Çizelge 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS içinde kalibrasyon grafiği



Şekil 3.4. Difteri toksoidinin pH 4,5 asetat tamponu içinde kalibrasyon grafiği

Çizelge 3.1. Difteri toksoidinin kalibrasyon doğrularına ait parametreler

Ortam	Eğim $\pm$ SH*	Kesişim $\pm$ SH*	r^2
PBS (pH 7,4)	0,0244 $\pm$ 0,0002	0,0773 $\pm$ 0,0052	0,9996
Asetat tamponu (pH 4,5)	0,0251 $\pm$ 0,0003	0,0087 $\pm$ 0,0064	0,9995

*SH: Standart Hata

Kalibrasyon doğrularına ait r^2 değerlerinin 1'e yakın, standart hata değerlerinin düşük olması, okunan absorbanlardan belirlenen konsantrasyon değerlerinin güvenilir sonuçlar olacağını göstermektedir (Çizelge 3.1).

3.1.4. Difteri Toksoidinin MikroBikinoninik Asit (MikroBCA) Yöntemiyle Kalibrasyonunun Validasyonuna Ait Bulgular

3.1.4.1. Doğruluk

Farklı ortamlarda yapılan doğruluk testi için üç farklı konsantrasyon noktasında altışar kez okunan numunelerin hesaplanan ve bulunan konsantrasyon, % geri kazanım ve % geri kazanım değerlerinin ortalama, standart sapma ve % bağıl standart sapma değerleri Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'te verilmiştir.

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

Çözünme Ortamı: pH 7,4 PBS					
Teorik Konsantrasyon: 6 µg/ml		Teorik Konsantrasyon: 18 µg/ml		Teorik Konsantrasyon: 34 µg/ml	
Pratik Konsantrasyon	% Geri Kazanım	Pratik Konsantrasyon	% Geri Kazanım	Pratik Konsantrasyon	% Geri Kazanım
5,643	94,01	16,299	90,55	32,775	96,40
5,807	96,79	16,668	92,60	32,324	95,07
5,766	96,11	16,381	91,01	32,010	94,71
5,725	95,43	16,586	92,15	32,857	96,64
5,848	97,47	16,422	89,87	31,422	92,42
5,807	96,79	16,586	92,15	32,119	94,47
Ort. % Geri Kazanım	96,10	Ort. % Geri Kazanım	91,39	Ort. % Geri Kazanım	94,95
± SS*	1,237	± SS*	1,075	± SS*	1,527
% Bağlı Standart Sapma	1,287	% Bağlı Standart Sapma	1,176	% Bağlı Standart Sapma	1,608

*SS: Standart Sapma

Çizelge 3.3. Difteri toksoidinin pH 4,5 asetat tamponu içindeki doğruluk bulguları

Çözünme Ortamı: pH 4,5 Asetat Tamponu					
Teorik Konsantrasyon: 6 µg/ml		Teorik Konsantrasyon: 18 µg/ml		Teorik Konsantrasyon: 34 µg/ml	
Pratik Konsantrasyon	% Geri Kazanım	Pratik Konsantrasyon	% Geri Kazanım	Pratik Konsantrasyon	% Geri Kazanım
5,749	95,82	17,900	99,45	31,167	91,67
5,550	92,50	18,020	100,11	31,884	93,78
5,550	92,50	18,378	102,10	31,406	92,37
5,669	94,49	18,020	100,11	31,167	91,67
5,629	93,83	17,821	99,00	32,283	94,45
5,590	93,16	17,940	99,67	31,685	93,19
Ort. % Geri Kazanım	93,72	Ort. % Geri Kazanım	100,07	Ort. % Geri Kazanım	92,94
± SS	1,289	± SS	1,078	± SS	1,293
% Bağlı Standart Sapma	1,375	% Bağlı Standart Sapma	1,077	% Bağlı Standart Sapma	1,391

*SS: Standart Sapma

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

3.1.4.2. Kesinlik

Difteri toksoidinin PBS (pH 7,4) ve asetat tamponu (pH 4,5) içindeki kalibrasyonunun kesinliğinin tayin edilmesinde tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik parametreleri incelenmiştir.

3.1.4.2.1. Tekrarlanabilirlik

Üç farklı konsantrasyonda altışar kez yapılan ölçümlere ait ortalama, standart sapma ve % bağıl standart sapma değerleri Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS ortamındaki tekrarlanabilirlik bulguları

Çözünme Ortamı: pH 7,4 PBS					
Teorik Konsantrasyon: 6 µg/ml		Teorik Konsantrasyon: 18 µg/ml		Teorik Konsantrasyon: 34 µg/ml	
Absorbans	Kons.*	Absorbans	Kons.*	Absorbans	Kons.*
0,216	5,684	0,495	17,119	0,840	31,258
0,212	5,520	0,489	16,873	0,857	31,955
0,215	5,643	0,488	16,832	0,860	32,078
0,217	5,725	0,495	17,119	0,852	31,750
0,218	5,766	0,500	17,324	0,845	31,463
0,215	5,643	0,506	17,570	0,857	31,955
Ortalama	5,664	Ortalama	17,140	Ortalama	31,743
± SS**	0,085	± SS**	0,278	± SS**	0,321
% Bağıl Standart Sapma	1,501	% Bağıl Standart Sapma	1,622	% Bağıl Standart Sapma	1,011

*Kons.: Konsantrasyon; **SS: Standart Sapma

Çizelge 3.5. Difteri toksoidinin pH 4,5 asetat tamponu ortamındaki tekrarlanabilirlik bulguları

Çözünme Ortamı: pH 4,5 Asetat Tamponu					
Teorik Konsantrasyon: 6 µg/ml		Teorik Konsantrasyon: 18 µg/ml		Teorik Konsantrasyon: 34 µg/ml	
Absorbans	Kons.*	Absorbans	Kons.*	Absorbans	Kons.*
0,153	5,749	0,438	17,104	0,813	32,044
0,154	5,789	0,454	17,741	0,815	32,124
0,155	5,829	0,448	17,502	0,821	32,363
0,158	5,948	0,457	17,861	0,831	32,761
0,158	6,028	0,461	18,020	0,812	32,004
0,160	5,882	0,448	17,502	0,806	31,765
Ortalama	5,882	Ortalama	17,622	Ortalama	32,177
± SS**	0,109	± SS**	0,325	± SS**	0,345
% Bağlı Standart Sapma	1,849	% Bağlı Standart Sapma	1,841	% Bağlı Standart Sapma	1,073

*Kons.: Konsantrasyon; **SS: Standart Sapma

Tekrarlanabilirlik için Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'te gösterilen veriler % bağlı standart sapma değerlerinin %2'den küçük olma şartına göre yorumlanmış ve uygun oldukları tespit edilmiştir.

3.1.4.2.2. Ara Kesinlik

Üç farklı konsantrasyonda birbirini takip eden iki farklı günde altışar kez yapılan ölçümlere ait ortalama, standart sapma ve % bağlı standart sapma değerleri Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.6. Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS ortamındaki ara kesinlik bulguları

Çözünme Ortamı: pH 7,4 PBS						
Teorik Konsantrasyon: 6 µg/ml			Teorik Konsantrasyon: 18 µg/ml		Teorik Konsantrasyon: 34 µg/ml	
I. Gün (µg/ml)	II. Gün (µg/ml)	I. Gün (µg/ml)	II. Gün (µg/ml)	I. Gün (µg/ml)	II. Gün (µg/ml)	
5,684	5,848	17,119	17,406	31,258	31,816	
5,520	5,766	16,873	16,627	31,955	31,488	
5,643	5,684	16,832	16,914	32,078	31,734	
5,725	5,561	17,119	16,885	31,750	31,570	
5,766	5,725	17,324	17,078	31,463	31,242	
5,643	5,602	17,570	17,201	31,955	31,996	
Ortalama	5,664	5,700	17,140	17,020	31,743	31,640
± SS*	0,085	0,106	0,278	0,272	0,321	0,266
% Bağlı Standart Sapma	1,501	1,860	1,622	1,598	1,011	0,977

*SS: Standart Sapma

Çizelge 3.7. Difteri toksoidinin pH 4,5 asetat tamponu ortamındaki ara kesinlik bulguları

Çözünme Ortamı: pH 4,5 Asetat Tamponu						
Teorik Konsantrasyon: 6 µg/ml			Teorik Konsantrasyon: 18 µg/ml		Teorik Konsantrasyon: 34 µg/ml	
I. Gün (µg/ml)	II. Gün (µg/ml)	I. Gün (µg/ml)	II. Gün (µg/ml)	I. Gün (µg/ml)	II. Gün (µg/ml)	
5,749	5,759	17,104	17,183	32,044	32,717	
5,789	5,750	17,741	17,462	32,124	32,275	
5,829	5,829	17,502	17,542	32,363	32,076	
5,948	5,869	17,861	17,900	32,761	32,518	
5,948	5,710	18,020	17,143	32,004	32,478	
6,028	5,830	17,502	17,502	31,765	32,558	
Ortalama	5,882	5,790	17,622	17,460	32,177	32,440
± SS*	0,109	0,061	0,325	0,275	0,345	0,227
% Bağlı Standart Sapma	1,849	1,813	1,841	1,575	1,073	1,017

*SS: Standart Sapma

Ara kesinlik için Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7’de gösterilen veriler % bağıl standart sapma değerlerinin %2’den küçük olma şartına göre yorumlanmış ve uygun oldukları tespit edilmiştir. Ara kesinlikte elde edilen bulgulara SPSS istatistik programı kullanılarak ortalamalar arası farkın önem testi uygulandığında, ortalamalar arası farkın önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).

3.1.4.3. Özgünlük

Özgünlük testi için formülasyonlarda yer alan tüm maddelerin hem formülasyonda kullanılan miktarları üzerinden ayrı ayrı çözeltileri, hem de difteri toksoidi içermeyen boş in-sitü jel formülasyonları hazırlanmıştır. ELISA plaklarıyla yapmış olduğumuz rutin mikroBCA yöntemi ile çözeltilerin ve formülasyonların 350-750 nm aralığında spektrumları alınmış ve difteri toksoidinin maksimum absorbands gösterdiği dalga boyu olan 560 nm’de pik verip vermediklerine bakılmıştır. Kullanılan maddelerden hiçbiri bu aralıkta belirgin pik vermemiş olup böylece bu yöntemin difteri toksoidi miktarını tam olarak belirleyebildiği saptanmıştır.

3.1.4.4. Gözlenebilme Sınırı

Difteri toksoidinin Bölüm 2.2.1.4.4’te gösterildiği şekilde hesaplanan LOD değerleri Çizelge 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Difteri toksoidinin LOD değerleri

	Gözlenebilme Sınırı (LOD) ($\mu\text{g/ml}$)
pH 7.4 PBS	0,331
pH 4,5 Asetat Tamponu	0,330

3.1.4.5. Alt Tayin Sınırı

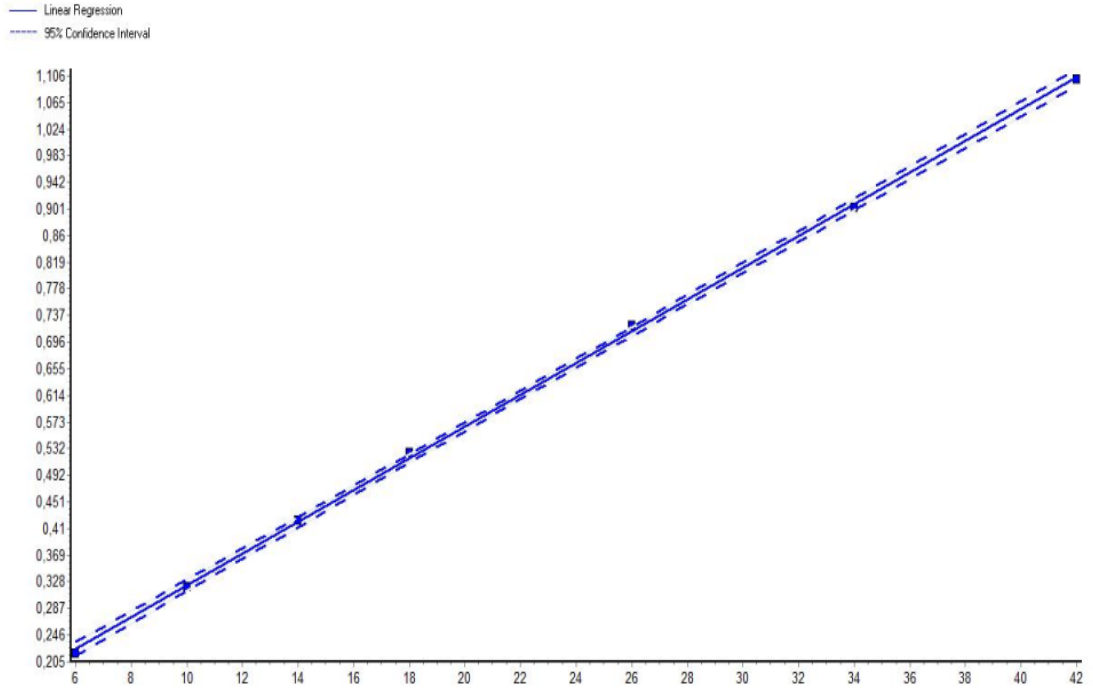
Difteri toksoidinin Bölüm 2.2.1.4.5'te gösterildiği şekilde hesaplanan LOQ değerleri Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Difteri toksoidinin LOQ değerleri

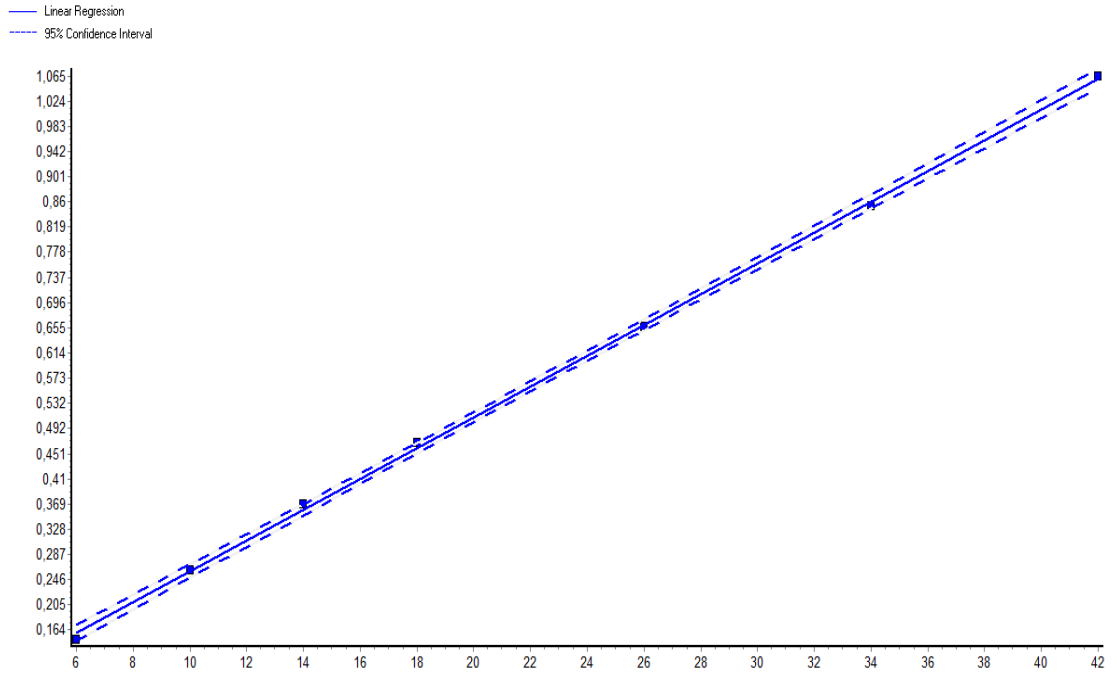
	Alt Tayin Sınırı (LOQ) (µg/ml)
pH 7.4 PBS	1,004
pH 4,5 Asetat Tamponu	0,999

3.1.4.6. Doğrusallık ve Aralık

Difteri toksoidinin devamlı okunabileceği minimum ve maksimum konsantrasyonları arasından yedi nokta seçilmiş, PBS (pH 7,4) ve asetat tamponu (pH 4,5) içinde 200 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan difteri toksoidinin stok çözeltilerinden hareketle 6 µg/ml ve 42 µg/ml arasındaki konsantrasyonlara seyreltmeler yapılmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerin absorban değerleri 560 nm dalga boyunda okunmuştur. Bu verilerden hesaplanmış doğrusallık ve doğrusallık aralığına ait doğrular Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da, bu doğrulara ait parametreler ise Çizelge 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.5. Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS içinde doğrusallık grafiği



Şekil 3.6. Difteri toksoidinin pH 4,5 asetat tamponu içinde doğrusallık grafiği

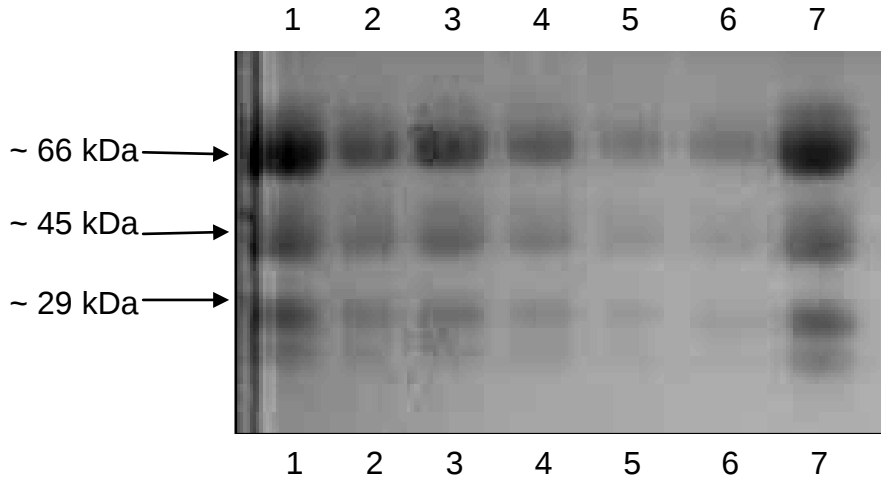
Çizelge 3.10. Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS ve pH 4,5 asetat tamponu içerisindeki doğrusallık parametreleri

	pH 7,4 PBS	pH 4,5 Asetat Tamponu
Eğim	0,0244	0,0251
Eğimin Standart Hatası	0,0002	0,0003
Güven Aralığı (%95)	0,0239 → 0,0249	0,0244 → 0,0257
Korelasyon Katsayısı (r)	0,9998	0,9997
Regresyon Katsayısı (r^2)	0,9996	0,9995
Kesişim (n)	0,0773	0,0087
Kesişimin Standart Hatası	0,0052	0,0064
Kesişimin Güven Aralığı (%95)	0,0641 → 0,0906	- 0,0076 → 0,0251
Regresyon Doğrusundan Sapmanın Standart Hatası	0,0067	0,0083
Doğrusallıktan sapmaların kareler toplamı	$2,267 \times 10^{-4}$	$3,446 \times 10^{-4}$
Artık Kareler Toplamı (RMS)	$4,53 \times 10^{-5}$	$6,891 \times 10^{-5}$

Doğrusallık deneyi sonucunda her bir ortam için elde edilen doğrulara ait r^2 değerlerinin yüksek, regresyon doğrusundan sapmanın standart hatasının düşük oluşu, elde edilen verilerin güvenilirliğini göstermektedir.

3.1.5. Difteri Toksoidinin Saflık Tayinine Ait Bulgular

Bölüm 2.2.1.5'te anlatıldığı şekilde SDS-PAGE çalışmaları denatüre edici koşullar altında yürütülmüştür. Difteri toksoidi antijeninin tek zinciri 66 kDa, A fragmanı 29 kDa, B fragmanı 45 kDa dolaylarında görülmüştür (Şekil 3.7). Bu bantların dışında safsızlıkların varlığını gösteren ek bir bant bulunmadığı belirlenmiştir.



Şekil 3.7. Difteri toksoidinin saflığını gösteren SDS-PAGE jeli

Yükleme sırası: 1: 0,4 µg/ml (dondurulmuş); 2: 0,3 µg/ml (2-8°C'de saklanan); 3: 0,4 µg/ml; 4: 0,2 µg/ml; 5: 0,1 µg/ml; 6: 0,05 µg/ml; 7: 1 µg/ml

3.1.6. Difteri Toksoidinin Stabilitesine Ait Bulgular

Stabilite çalışması kapsamında difteri toksoidinin miktar tayini Bölüm 2.2.1.3'te anlatıldığı şekilde mikroBCA yöntemiyle yürütülmüştür. Elde edilen bulgular Çizelge 3.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.11. 2-8°C'de bekletilen difteri toksoidinin % kalan miktarı (n=3, Ortalama $\pm$ SH)

Aylar	Kalan difteri toksoidi miktarı (%)
	2-8°C (Buzdolabı) $\pm$ SH*
Başlangıç	99,40 $\pm$ 0,19
I. ay	99,19 $\pm$ 0,25
III. ay	99,26 $\pm$ 0,27

*SH: Standart Hata

3.2. In-sitü Jelleşen Ön Formülasyonların Hazırlanmasına Ait Bulgular

Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı şekilde ön formülasyonlar soğuk metot kullanılarak hazırlanmıştır. Başlangıçta Poloksamer 407/ Poloksamer 188 karışımını ve farklı mukoadezif polimerleri distile su içinde içeren formülasyonlar üzerinde çalışılmıştır. Bu formüller izotonik olmadıklarından ozmotik basınçlarını ayarlama da antijen üzerinde olumsuz etkisinin olmadığı bilinen PBS (pH 7,4)'ten yararlanılmıştır.

Mukoadezif polimer olarak karbopol 934'ü içeren ve PBS içinde hazırlanan formüllerde bir süre sonra beyaz renkli çökeleklerin olduğu gözlenmiştir. Bu sorunu ortadan kaldırmak için çözücüsü hem distile su hem de PBS olan formülasyonlar üzerinde çalışılmıştır.

Poloksamer karışımına ek olarak mukoadezif polimerlerden düşük veya orta molekül ağırlıklı stok kitosan çözeltisinden içeren ön formüller, PBS (pH 7,4) veya asetat tamponu içinde (pH 4,5) hazırlanmıştır.

Bölüm 2.2.2.3'te anlatıldığı şekilde yalnızca kitosan polimerini içeren formüller üzerinde de çalışılmıştır. Bu formüllerin hem viskozitelerinin burundan veriliş için uygun olmamaları hem de ön değerlendirme amacıyla yürütülen in vitro salım çalışmalarında açığa çıkan difteri toksoidi miktarının 9 saat sonunda %28 civarında olmasından dolayı bu formüller üzerinde yeni incelemeler yapılmamıştır.

3.3. In-sitü Jelleşen Ön Formülasyonların Karakterizasyonu

Ön formülasyonların karakterizasyonlarında jelleşme sıcaklıkları, jelleşme süreleri ve ozmolariteleri incelenmiştir. Bu parametrelere ait sonuçlar ilerleyen bölümlerde sunulmaktadır.

3.3.1. Ön Formülasyonların Jelleşme Sıcaklıklarına Ait Bulgular

Bölüm 2.2.3.1’de anlatıldığı şekilde ön formülasyonların jelleşme sıcaklıkları tayin edilmiştir. Çizelge 3.12’de koyu renk ile gösterilen ve 29-33°C sıcaklık aralığında jelleşen formüllerin intranazal veriliş için uygun olduklarına karar verilmiş ve çalışmalara bu formüllerle devam edilmiştir.

Çizelge 3.12. Ön formülasyonların jelleşme sıcaklıkları

Formül Kodu	PF 127 (% a/a)	PF 68 (% a/a)	HPC (% a/a)	HPMC (% a/a)	Karbopol 934 (% a/a)	Kitosan (LMW) (% a/a)	Kitosan (MMW) (% a/a)	Distile su (% a/a)	PBS (pH 7,4) (% a/a)	Asetat tamponu (pH 4,5) (% a/a)	Jelleşme Sıcaklığı (°C)
F1	20	---	---	---	---	---	---	80	---	---	28
F2	17,5	---	---	---	---	---	---	82,5	---	---	28,5
F3	16	---	---	---	---	---	---	84	---	---	34
F4	18	12	---	---	---	---	---	70	---	---	34
F5	12	20	---	---	---	---	---	68	---	---	39
F6	17	---	---	---	---	---	---	---	83	---	24
F7	16,25	---	---	---	---	---	---	---	83,75	---	25
F8	12	20	---	---	---	---	---	---	68	---	37
F9	14	20	---	---	---	---	---	66	---	---	30
F10	14	18	---	---	---	---	---	68	---	---	37
F11	16	14	---	---	---	---	---	70	---	---	35,5

Çizelge 3.12. Devam Ön formülasyonların jelleşme sıcaklıkları

Formül Kodu	PF 127 (% a/a)	PF 68 (% a/a)	HPC (% a/a)	HPMC (% a/a)	Karbopol 934 (% a/a)	Kitosan (LMW) (% a/a)	Kitosan (MMW) (% a/a)	Distile su (% a/a)	PBS (pH 7,4) (% a/a)	Asetat tamponu (pH 4,5) (% a/a)	Jelleşme Sıcaklığı (°C)
F12	18	12	---	---	---	---	---	---	70	---	32
F13	18	10	---	---	---	---	---	72	---	---	34
F14	18	10	---	---	---	---	---	---	72	---	33
F15	20	10	---	---	---	---	---	70	---	---	30
F16	17,75	---	---	0,5	---	---	---	81,75	---	---	30
F17	18	10	---	---	0,2	---	---	19,9	51,9	---	31,5
F18	18	10	---	0,2	---	---	---	---	71,8	---	30,5
F19	18	10	0,2	---	---	---	---	---	71,8	---	32
F20	18	10	---	---	---	0,1	---	---	71,9	---	31,5
F21	18	10	---	---	---	0,2	---	---	71,8	---	32,5
F22	18	10	---	---	---	---	0,2	---	71,8	---	33,5

Çizelge 3.12. Devam Ön formülasyonların jelleşme sıcaklıkları

Formül Kodu	PF 127 (% a/a)	PF 68 (% a/a)	HPC (% a/a)	HPMC (% a/a)	Karbopol 934 (% a/a)	Kitosan (LMW) (% a/a)	Kitosan (MMW) (% a/a)	Distile su (% a/a)	PBS (pH 7,4) (% a/a)	Asetat tamponu (pH 4,5) (% a/a)	Jelleşme Sıcaklığı (°C)
F23	18	10	---	---	---	---	0,5	---	71,5	---	34
F24	18	10	---	---	0,2	---	---	---	71,8	---	Çökme mevcut
F25	20	10	---	0,2	---	---	---	69,8	---	---	30
F26	20	10	---	---	0,15	---	---	69,85	---	---	31
F27	20	10	---	---	0,2	---	---	69,8	---	---	30
F28	20	10	---	---	0,2	---	---	---	69,8	---	Çökme mevcut
F29	17,75	---	---	---	---	0,5	---	81,75	---	---	40
F30	18	---	---	---	---	0,5	---	81,5	---	---	24
F31	18	---	---	---	---	0,2	---	81,8	---	---	26
F32	18	10	---	---	---	0,1	---	---	---	67,9	29
F33	18	10	---	---	---	0,1	---	---	---	71,9	30

3.3.2. Ön Formülasyonların Jelleşme Sürelerine Ait Bulgular

Bölüm 2.2.3.2’de anlatıldığı şekilde ön formülasyonların jelleşme süreleri tespit edilmiş ve Çizelge 3.13’te verildiği gibi gruplandırılmıştır.

Çizelge 3.13. Formülasyonların jelleşme süresi sonuçlarının dağılımı

Jelleşme Sıcaklıkları (°C)	Jelleşme Süreleri (dak.)
24°C ile 27°C arasında jelleşen formüller	1 dakikadan kısa sürede
28°C ile 29°C arasında jelleşen formüller	1-2 dakika içinde
30°C’de jelleşen formüller	3 dakika içinde
31°C ile 32°C arasında jelleşen formüller	3-4 dakika içinde
33°C ile 34°C arasında jelleşen formüller	5-6 dakika içinde
35°C ve üzerinde jelleşen formüller	10 dakika içinde jelleşmedi

3.3.3. Ön Formülasyonların Ozmolaritelerine Ait Bulgular

Ön formülasyonların ozmolariteleri Bölüm 2.2.3.3’te anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. Teorik olarak hesaplanan ve pratik olarak ölçülen ozmolarite değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmüştür. Çözücü olarak yalnızca distile su içeren formüller hipotonik iken, çözücüsü pH 4,5 asetat tamponu olan F32 kodlu formülün ozmolaritesinin 290 mOsmol/l; çözücü olarak PBS veya distile su:PBS karışımını içeren formüllerin ozmolaritelerinin 300-325 mOsmol/l değerleri arasında olduğu bulunmuştur. Elde edilen değerlerin 280-328 mOsmol/l olarak belirlenmiş olan izotonisite sınırları içinde olduğu gösterilmiştir (Wendorf ve ark., 2006).

3.4. Ön Formülasyonların Değerlendirilmesi ve Uygun Formüllerin Seçimi

Ön formülasyonlar arasından görünürde yabancı partikül içermeyen, biyoyararlanımın yüksek olması için izotonik hazırlanan ve 32-35°C'deki burun sıcaklığına uygun olarak 29-33°C dolaylarında jelleşen F14, F17, F18, F19, F20, F21 ve F32 kodlu formüller üzerinde çalışılmasına karar verilmiştir.

3.5. F14, F17, F18, F19, F20, F21, F32 Kodlu Difteri Toksoidi İçermeyen Formüller Üzerinde Yürütülen Çalışmalara Ait Bulgular

Bölüm 2.2.5'te anlatıldığı şekilde difteri toksoidi içermeyen formüller üzerinde, organoleptik inceleme, pH tayini, reolojik davranış ve viskozite ölçümleri ile mukoadhezif gücün ölçüm çalışmaları yürütülmüştür.

3.5.1. Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Organoleptik Özelliklerine Ait Bulgular

Difteri toksoidi içermeyen F14, F18, F19, F20, F21 ve F32 kodlu formüller berrak ve renksiz, F17 kodlu formül ise bulanık olup görünürde yabancı partikül madde içermemektedir.

3.5.2. Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin pH Değerlerine Ait Bulgular

Bölüm 2.2.5.2'de anlatıldığı şekilde formüllerin pH ölçümleri 25°C'de yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.14'te gösterilmektedir.

Çizelge 3.14. Difteri toksoidi içermeyen formüllerin pH ölçüm sonuçları (n=3)

Formül Kodu	pH	± SS*	± SH**	± Güven Aralığı (%95)
F14	7,4	0,0	0,0	7,4 ± 0,0
F17	5,1	0,0	0,0	5,1 ± 0,0
F18	7,5	0,0	0,0	7,5 ± 0,0
F19	7,5	0,0	0,0	7,5 ± 0,0
F20	5,6	0,0	0,0	5,6 ± 0,0
F21	5,5	0,0	0,0	5,5 ± 0,0
F32	5,2	0,0	0,0	5,2 ± 0,0

*SS: Standart Sapma, **SH: Standart Hata

3.5.3. Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerde Reolojik Değerlendirme ve Viskozite Ölçümüne Ait Bulgular

Bölüm 2.2.5.3'de anlatıldığı şekilde difteri toksoidi içermeyen formüllerin jelleşmeden önce ve jelleştikten sonra 10 ve 20 rpm'de ölçülen viskozluk değerleri sırasıyla Çizelge 3.15, Çizelge 3.16, Çizelge 3.17 ve Çizelge 3.18'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.15. Difteri toksoidi içermeyen formüllerin 10 rpm ve 25°C'de ölçülen viskozite değerleri (n=3)

Formülasyon Kodu	Viskozite (cP)	± SS*	± SH**
F14	283,3	28,9	16,7
F17	500,0	0,0	0,0
F18	400,0	0,0	0,0
F19	300,0	0,0	0,0
F20	510,0	10,0	5,8
F21	520,0	0,0	0,0
F32	500,0	0,0	0,0

*SS: Standart Sapma, **SH: Standart Hata

Çizelge 3.16. Difteri toksoidi içermeyen formüllerin 10 rpm ve 34°C'de ölçülen viskozite değerleri (n=3)

Formülasyon Kodu	Viskozite (cPx10 ³)	± SS*	± SH**
F14	206,3	6,5	3,7
F17	250,0	2,0	1,1
F18	263,3	3,1	1,8
F19	222,3	5,7	3,3
F20	366,7	5,8	3,3
F21	376,0	4,0	2,3
F32	349,7	5,0	2,9

*SS: Standart Sapma, **SH: Standart Hata

Çizelge 3.17. Difteri toksoidi içermeyen formüllerin 20 rpm ve 25°C'de ölçülen viskozite değerleri (n=3)

Formülasyon Kodu	Viskozite (cP)	± SS*	± SH**
F14	250,0	0,0	0,0
F17	425,0	25,0	14,4
F18	350,0	0,0	0,0
F19	250,0	0,0	0,0
F20	450,0	0,0	0,0
F21	460,0	10,0	5,8
F32	441,7	14,4	8,3

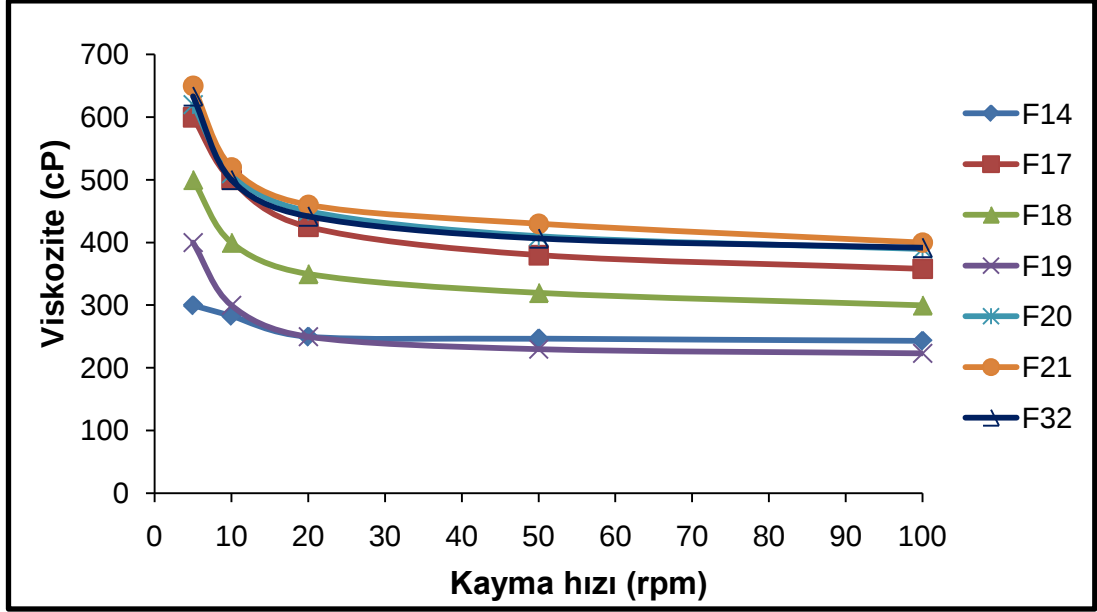
*SS: Standart Sapma, **SH: Standart Hata

Çizelge 3.18. Difteri toksoidi içermeyen formüllerin 20 rpm ve 34°C'de ölçülen viskozite değerleri (n=3)

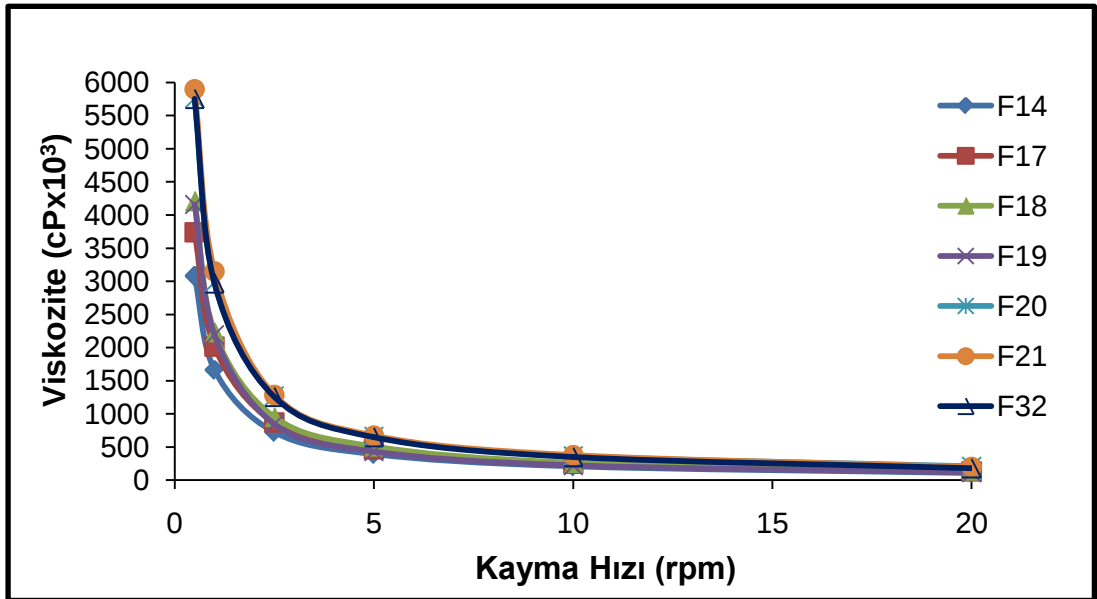
Formülasyon Kodu	Viskozite (cPx10 ³)	± SS*	± SH**
F14	107,7	2,5	1,4
F17	132,3	2,5	1,4
F18	147,7	2,5	1,4
F19	115,7	5,9	3,4
F20	196,0	4,0	2,3
F21	200,7	4,0	2,3
F32	181,0	4,6	2,6

*SS: Standart Sapma, **SH: Standart Hata

Formüllerin viskozluk ölçümleri sonucunda çizilen kayma hızına karşı viskozluk grafikleri Şekil 3.8 ve Şekil 3.9'da gösterilmiştir.



Şekil 3.8. Difteri toksoidi içermeyen F14, F17, F18, F19, F20, F21 ve F32 kodlu formüllerin 25°C'de ölçülen farklı kayma hızlarındaki viskoziteleri (Jelleşmeden önce)



Şekil 3.9. Difteri toksoidi içermeyen F14, F17, F18, F19, F20, F21 ve F32 kodlu formüllerin 34°C'de ölçülen farklı kayma hızlarındaki viskoziteleri (Jelleştikten sonra)

Yapılan ölçümler sonucunda in-sitü jel formülasyonlarının psödoplastik akış gösterdikleri tespit edilmiştir.

3.5.4. Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Mukoadezif Güçlerine Ait Bulgular

Bölüm 2.2.5.4'te anlatıldığı şekilde difteri toksoidi içermeyen formüllerin mukoadesif güçleri tayin edilmiştir. Sonuçlar üç paralel deneyin ortalaması olup Çizelge 3.19'da görülmektedir.

Çizelge 3.19. Difteri toksoidi içermeyen formüllerin mukoadesif güç değerleri (n=3, Ortalama $\pm$ SH)

Formül Kodu	Kopma için gerekli ağırlık (mg) $\pm$ SH*	Kuvvet (dyn) $\pm$ SH*	Kuvvet/Alan (dyn/cm ²) $\pm$ SH*
F14	1856,7 $\pm$ 23,3	1821,4 $\pm$ 22,9	1917,3 $\pm$ 24,1
F17	2666,7 $\pm$ 14,5	2616,0 $\pm$ 14,3	2753,7 $\pm$ 15,0
F18	2420,0 $\pm$ 15,3	2374,0 $\pm$ 15,0	2499,0 $\pm$ 15,8
F19	2276,7 $\pm$ 26,7	2233,4 $\pm$ 26,2	2351,0 $\pm$ 27,5
F20	3136,7 $\pm$ 18,6	3077,1 $\pm$ 18,2	3239,0 $\pm$ 19,2
F21	3186,7 $\pm$ 6,7	3126,1 $\pm$ 6,5	3290,7 $\pm$ 6,9
F32	3113,3 $\pm$ 13,3	3057,5 $\pm$ 11,8	3218,4 $\pm$ 12,4

*SH: Standart Hata

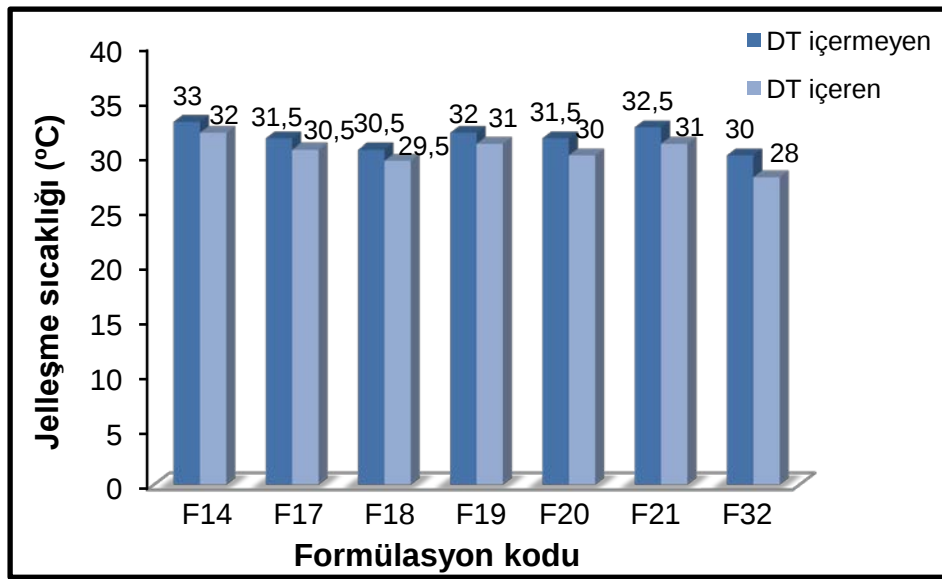
3.6. F14, F17, F18, F19, F20, F21, F32 Kodlu Formüllerin Difteri Toksoidi ile Hazırlanmalarına Ait Bulgular

3.6.1. Difteri Toksoidinin Formüllere İlave Edilmesine Ait Bulgular

Formüllere 4°C'de sürekli karıştırmayla teorik olarak 396 µg/ml (133,65 Lf/ml) difteri toksoidi ilave edilmiştir. Eklenen difteri toksoidinin formüldeki çözücü miktarından düşülmemesi durumunda istenen sıcaklıklarda ve özelliklerde jelleşen formüller elde edilememiştir.

3.6.2. Difteri Toksoidi İlavesinin Formüllerin Jelleşme Sıcaklığı Üzerindeki Etkisine Ait Bulgular

Bölüm 2.2.6.2’de anlatıldığı şekilde hesaplı miktarda difteri toksoidi formülasyonlara ilave edildikten sonra formüllerin jelleşme sıcaklıkları yeniden ölçülmüştür. Difteri toksoidinin formülasyonların jelleşme sıcaklığını 0,5-2°C düşürdüğü, dolayısıyla jelleşme sıcaklığı üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Difteri toksoidinin jelleşme sıcaklığı üzerindeki etkisi

3.6.3. Difteri Toksoidi İçeren Formüllerin Organoleptik Özelliklerine Ait Bulgular

Difteri toksoidi içeren F14, F17, F18, F19, F20, F21 ve F32 kodlu formüller berrak ile çok açık sarımsı renkte olup görünürde yabancı partikül madde içermemektedir.

3.7. F14, F17, F18, F19, F20, F21, F32 Kodlu Difteri Toksoidi İçeren Formüllerde In vitro Testlere Ait Bulgular

Difteri toksoidi içeren formüllerde difteri toksoidi miktar tayini ve in vitro salım çalışmaları yürütülmüştür.

3.7.1. Difteri Toksoidi Miktar Tayinine Ait Bulgular

Bölüm 2.2.1.3'te anlatıldığı şekilde formülasyonlardaki difteri toksoidi miktarı mikroBCA yöntemiyle tayin edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.20'de gösterilmektedir.

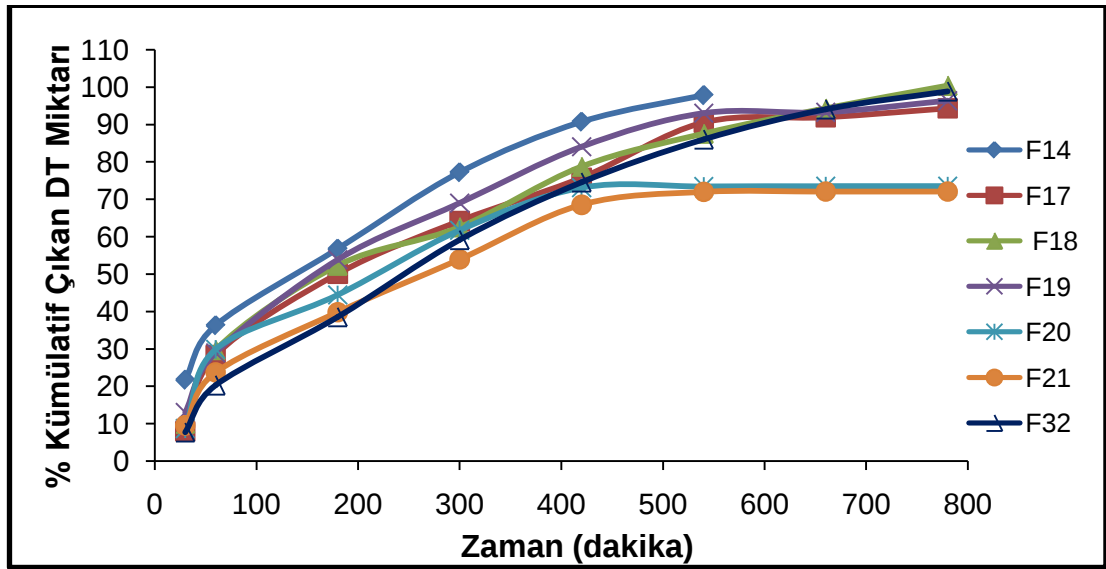
Çizelge 3.20. Formüllerde ölçülen difteri toksoidi miktarları (n=3)

Formül Kodu	Difteri Toksoidi Miktarı (%)	± SS*	± SH**	± Güven Aralığı (%95)
F14	97,83	0,46	0,26	97,83 ± 1,13
F17	95,92	0,20	0,11	95,92 ± 0,49
F18	100,45	0,73	0,42	100,45 ± 1,82
F19	96,42	0,1,8	0,10	96,42 ± 0,43
F20	99,64	0,80	0,46	99,64 ± 1,98
F21	101,82	0,39	0,22	101,82 ± 0,96
F32	96,36	0,62	0,36	96,36 ± 1,54

*SS: Standart Sapma, **SH: Standart Hata

3.7.2. Difteri Toksoidi İçeren Formüllerin In vitro Salım Çalışmalarına Ait Bulgular

Bölüm 2.2.7.2'de anlatıldığı şekilde membran içermeyen yöntemin kullanıldığı in vitro salım çalışmaları sonucunda difteri toksoidinin formülasyonlardan zamana karşı salım profili Şekil 3.11'de görülmektedir.



Şekil 3.11. F14, F17, F18, F19, F20, F21 ve F32 kodlu formüllerden difteri toksoidinin in vitro salım profilleri

F20 ve F21 kodlu formüllerden, 780. dakikanın sonunda salınan difteri toksoidi miktarı %72-73 civarında kalmıştır. F20 ve F21'den istenilen sürede yeterli difteri toksoidi salımı gerçekleşmediğinden bu formüllerin ileriki çalışmalarda kullanılmamalarına karar verilmiştir.

3.8. Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular

Stabilite çalışmaları formüllerin 2-8°C buzdolabında ve 25±2°C, %60 bağıl nemdeki iklim dolabında bekletilmesiyle yapılmıştır.

F17, F18, F19 ve F32 kodlu formüller organoleptik özellikleri, pH değerleri, viskozlukları formülasyona yüklenen difteri toksoidi miktarları ve difteri toksoidinin formüllerden in vitro salım sonuçları nedeniyle ideal formüller olarak değerlendirilmiş ve stabilite çalışmalarına başlanmıştır.

F14 kodlu formül ise mukoadezif polimer içermemesine rağmen diğer formüller için karşılaştırma yapmak amacıyla stabilite çalışmalarına alınmıştır.

3.8.1. Difteri Toksoidi İçermeyen F14, F17, F18, F19, F32 Kodlu Formüllerin Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular

Bölüm 2.2.8.1’de anlatıldığı şekilde 2-8°C ve 25±2°C’de saklanan difteri toksoidi içermeyen F14, F17, F18, F19 ve F32 kodlu formüllerin organoleptik özellikleri, pH’ları, reolojik davranışları ve jelleşme sıcaklıkları altı ay süresince incelenmiştir.

3.8.1.1. Stabilite Çalışmasında Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Organoleptik Özelliklerine Ait Bulgular

Difteri toksoidi içermeyen in-sitü jel formülasyonlarının stabilite çalışması süresince belirlenen organoleptik özellikleri Çizelge 3.21 ve Çizelge 3.22’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.21. Difteri toksoidi içermeyen ve 2-8°C'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında incelenen organoleptik özellikleri

Formül Kodu	Görünüş			
	Başlangıç	I. ay	III. ay	VI. ay
F14	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen
F17	Bulanık, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Bulanık, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Bulanık, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Bulanık, görünür yabancı partikül madde içermeyen
F18	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen
F19	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen
F32	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen

Çizelge 3.22. Difteri toksoidi içermeyen ve $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında incelenen organoleptik özellikleri

Formül Kodu	Görünüş			
	Başlangıç	I. ay	III. ay	VI. ay
F14	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen
F17	Bulanık, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Bulanık, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Bulanık, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Bulanık, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen
F18	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen
F19	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, az miktarda görünür yabancı partikül içeren	Bulanık, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, az miktarda görünür yabancı partikül içeren
F32	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, görünür yabancı partikül madde içermeyen	Berrak, renksiz, az miktarda görünür yabancı partikül içeren

3.8.1.2. Stabilité Çalışmasında Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin pH Değerlerine Ait Bulgular

Difteri toksoidi içermeyen in-sitü jel formülasyonlarının stabilite çalışması süresince ölçülen pH değerleri Çizelge 3.23 ve Çizelge 3.24'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.23. Difteri toksoidi içermeyen ve 2-8°C'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında ölçülen pH değerleri (n=3, Ortalama $\pm$ SH)

Formül Kodu	pH Değeri $\pm$ SH*			
	Başlangıç	I. ay	III. ay	VI. ay
F14	7,4 $\pm$ 0,0	7,4 $\pm$ 0,0	7,4 $\pm$ 0,0	7,4 $\pm$ 0,0
F17	5,1 $\pm$ 0,0	5,2 $\pm$ 0,0	5,1 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,0
F18	7,5 $\pm$ 0,0	7,5 $\pm$ 0,0	7,5 $\pm$ 0,0	7,4 $\pm$ 0,0
F19	7,5 $\pm$ 0,0	7,4 $\pm$ 0,0	7,1 $\pm$ 0,0	7,3 $\pm$ 0,0
F32	5,2 $\pm$ 0,0	5,1 $\pm$ 0,0	5,2 $\pm$ 0,0	5,1 $\pm$ 0,0

*SH: Standart Hata

Çizelge 3.24. Difteri toksoidi içermeyen ve 25 $\pm$ 2°C'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında ölçülen pH değerleri (n=3, Ortalama $\pm$ SH)

Formül Kodu	pH Değeri $\pm$ SH*			
	Başlangıç	I. ay	III. ay	VI. ay
F14	7,5 $\pm$ 0,0	7,4 $\pm$ 0,0	7,4 $\pm$ 0,0	7,3 $\pm$ 0,0
F17	5,1 $\pm$ 0,0	5,2 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,0
F18	7,4 $\pm$ 0,0	7,5 $\pm$ 0,0	7,4 $\pm$ 0,0	7,4 $\pm$ 0,0
F19	7,5 $\pm$ 0,0	7,2 $\pm$ 0,0	7,1 $\pm$ 0,1	7,1 $\pm$ 0,0
F32	4,9 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,0	4,9 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,0

*SH: Standart Hata

3.8.1.3. Stabilite Çalışmasında Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Reolojik Davranış ve Viskozitelerine Ait Bulgular

In-sitü jel formülasyonlarının stabilite çalışması süresince ölçülen viskozite değerleri Çizelge 3.25 ve Çizelge 3.26'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.25. Difteri toksoidi içermeyen ve 2-8°C'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında 25°C ve 10 rpm'de ölçülen viskozite değerleri (n=3, Ortalama $\pm$ SH)

Formül Kodu	Viskozite (cP) $\pm$ SH*			
	Başlangıç	I. ay	III. ay	VI. ay
F14	283,3 $\pm$ 16,7	316,7 $\pm$ 8,3	300,0 $\pm$ 0,0	300,0 $\pm$ 0,0
F17	500,0 $\pm$ 0,0	533,3 $\pm$ 16,7	341,7 $\pm$ 22,1	300,0 $\pm$ 0,0
F18	400,0 $\pm$ 0,0	483,3 $\pm$ 16,7	400,0 $\pm$ 0,0	396,8 $\pm$ 2,9
F19	300,0 $\pm$ 0,0	333,3 $\pm$ 16,7	300,0 $\pm$ 0,0	333,3 $\pm$ 16,7
F32	500,0 $\pm$ 0,0	466,7 $\pm$ 33,3	473,3 $\pm$ 23,3	490,0 $\pm$ 10,0

*SH: Standart Hata

Çizelge 3.26. Difteri toksoidi içermeyen ve 25 $\pm$ 2°C'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında 25°C ve 10 rpm'de ölçülen viskozite değerleri (n=3, Ortalama $\pm$ SH)

Formül Kodu	Viskozite (cP) $\pm$ SH*			
	Başlangıç	I. ay	III. ay	VI. ay
F14	250,0 $\pm$ 28,9	350,0 $\pm$ 28,9	300,0 $\pm$ 0,0	416,7 $\pm$ 16,7
F17	500,0 $\pm$ 0,0	600,0 $\pm$ 16,7	666,7 $\pm$ 8,3	666,7 $\pm$ 16,7
F18	383,3 $\pm$ 16,7	400,0 $\pm$ 0,0	400,0 $\pm$ 0,0	466,7 $\pm$ 16,7
F19	300,0 $\pm$ 0,0	366,7 $\pm$ 33,3	316,7 $\pm$ 16,7	333,3 $\pm$ 16,7
F32	500,0 $\pm$ 0,0	483,3 $\pm$ 16,7	465,0 $\pm$ 0,0	480,0 $\pm$ 28,9

*SH: Standart Hata

3.8.1.4. Stabilite Çalışmasında Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Jelleşme Sıcaklıklarına Ait Bulgular

Difteri toksoidi içermeyen in-sitü jel formülasyonlarının stabilite çalışması süresince tayin edilen jelleşme sıcaklıklarına ait çizelgeler Çizelge 3.27 ve 3.28'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.27. Difteri toksoidi içermeyen ve 2-8°C'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında ölçülen jelleşme sıcaklıkları (n=3, Ortalama $\pm$ SH)

Formül Kodu	Jelleşme Sıcaklığı (°C) $\pm$ SH*			
	Başlangıç	I. ay	III. ay	VI. ay
F14	33,0 $\pm$ 0,0	32,5 $\pm$ 0,3	32,7 $\pm$ 0,3	32,0 $\pm$ 0,0
F17	31,5 $\pm$ 0,5	32,0 $\pm$ 0,0	32,0 $\pm$ 1,0	31,0 $\pm$ 0,0
F18	30,3 $\pm$ 0,2	30,0 $\pm$ 0,0	30,0 $\pm$ 0,0	30,0 $\pm$ 0,0
F19	32,0 $\pm$ 0,0	31,7 $\pm$ 0,2	31,8 $\pm$ 0,2	31,5 $\pm$ 0,0
F32	30,0 $\pm$ 0,0	29,2 $\pm$ 0,3	30,3 $\pm$ 0,6	30,7 $\pm$ 0,3

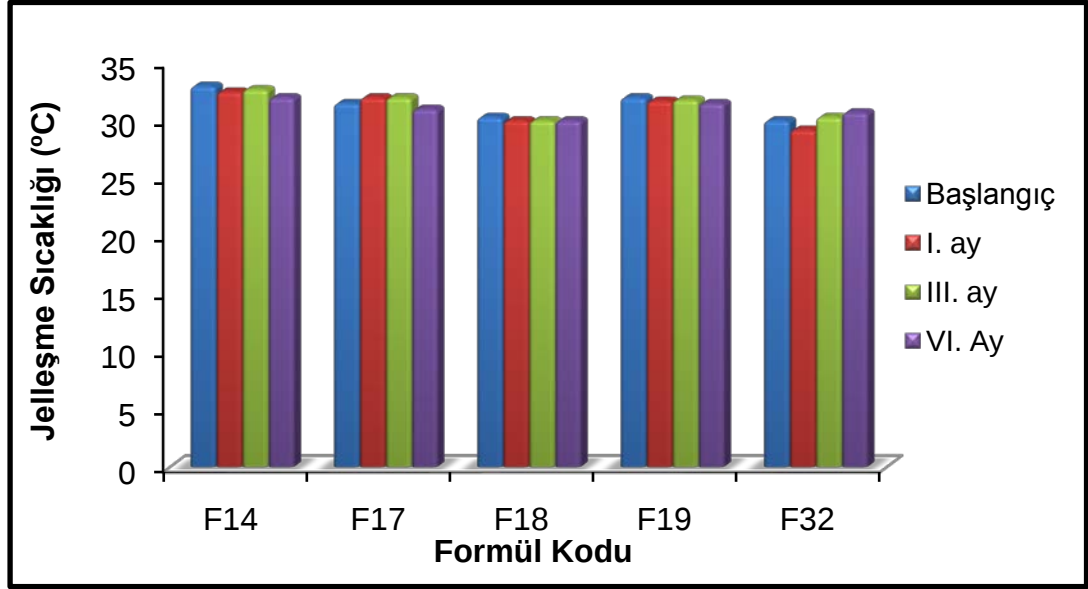
*SH: Standart Hata

Çizelge 3.28. Difteri toksoidi içermeyen ve 25 $\pm$ 2°C'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında ölçülen jelleşme sıcaklıkları (n=3, Ortalama $\pm$ SH)

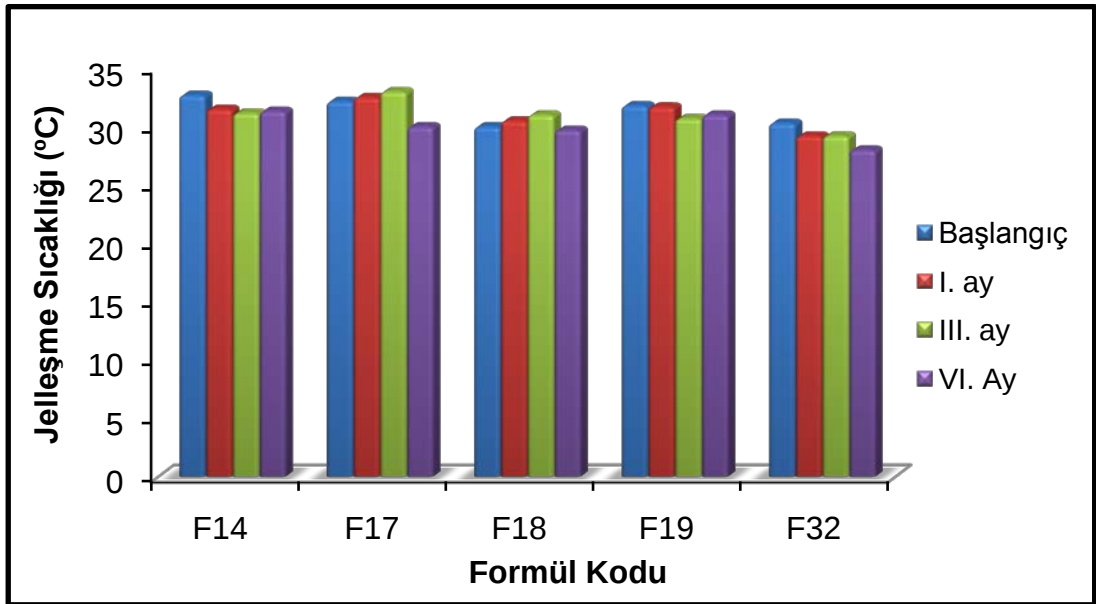
Formül Kodu	Jelleşme Sıcaklığı (°C) $\pm$ SH*			
	Başlangıç	I. ay	III. ay	VI. ay
F14	32,7 $\pm$ 0,3	31,5 $\pm$ 0,0	31,2 $\pm$ 0,2	31,3 $\pm$ 0,3
F17	32,2 $\pm$ 0,2	32,5 $\pm$ 0,3	33,0 $\pm$ 0,0	30,0 $\pm$ 0,0
F18	30,0 $\pm$ 0,0	30,5 $\pm$ 0,3	31,0 $\pm$ 0,6	29,7 $\pm$ 0,2
F19	31,8 $\pm$ 0,2	31,7 $\pm$ 0,2	30,7 $\pm$ 0,3	31,0 $\pm$ 0,0
F32	30,3 $\pm$ 0,3	29,2 $\pm$ 0,2	29,2 $\pm$ 0,3	28,0 $\pm$ 0,0

*SH: Standart Hata

Difteri toksoidi içermeyen in-sitü jel formülasyonlarının stabilite çalışması süresince tayin edilen jelleşme sıcaklıklarına ait grafikler ise Şekil 3.12 ve Şekil 3.13'te verilmiştir.



Şekil 3.12. Difteri toksoidi içermeyen ve 2-8°C'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında ölçülen jelleşme sıcaklıkları (n=3, Ortalama $\pm$ SH)



Şekil 3.13. Difteri toksoidi içermeyen ve 25 $\pm$ 2°C'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında ölçülen jelleşme sıcaklıkları (n=3, Ortalama $\pm$ SH)

Sonuçlardan anlaşılacağı üzere formülasyonların jelleşme sıcaklıklarında stabilite sonrası anlamlı değişiklikler saptanmamıştır.

3.8.2. Difteri Toksoidi İçeren F14, F17, F18, F19, F32 Kodlu Formüllerin Stabilité Çalışmalarına Ait Bulgular

Bölüm 2.2.8.2’de anlatıldığı şekilde difteri toksoidi içeren F14, F17, F18, F19 ve F32 kodlu formüllerin difteri toksoidi miktar tayinleri ve difteri toksoidinin formülasyon içindeki protein bütünlüğünün korunup korunmadığı üç ay boyunca incelenmiştir.

3.8.2.1. Stabilité Çalışmasında Difteri Toksoidi İçeren Formüllerin Miktar Tayinine Ait Bulgular

Stabilité çalışması süresince in-sitü jel formülasyonlarında kalan difteri toksoidi miktarları Çizelge 3.29 ve Çizelge 3.30’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.29. Difteri toksoidi içeren ve 2-8°C’de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında ölçülen difteri toksoidi miktarları (n=3, Ortalama $\pm$ SH)

Formül Kodu	Kalan difteri toksoidi miktarı (%) $\pm$ SH*		
	Başlangıç	I. ay	III. ay
F14	96,74 $\pm$ 0,13	96,87 $\pm$ 0,39	97,67 $\pm$ 0,47
F17	98,51 $\pm$ 1,54	92,57 $\pm$ 0,69	40,75 $\pm$ 1,69
F18	95,40 $\pm$ 1,06	95,54 $\pm$ 1,53	96,63 $\pm$ 0,82
F19	96,33 $\pm$ 0,11	94,52 $\pm$ 0,15	91,34 $\pm$ 0,20
F32	98,71 $\pm$ 1,28	95,73 $\pm$ 0,86	91,82 $\pm$ 0,22

*SH: Standart Hata

Çizelge 3.30. Difteri toksoidi içeren ve $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formüllerin belirli zaman aralıklarında ölçülen difteri toksoidi miktarları ($n=3$, Ortalama $\pm$ SH)

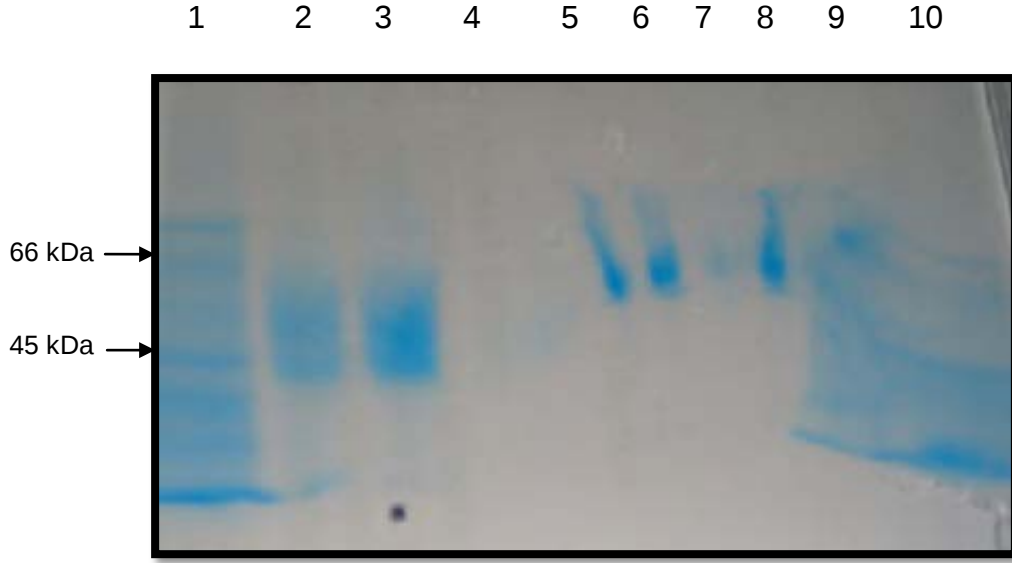
Formül Kodu	Kalan difteri toksoidi miktarı (%) $\pm$ SH*		
	Başlangıç	I. ay	III. ay
F14	98,25 $\pm$ 1,90	95,39 $\pm$ 0,15	90,67 $\pm$ 0,03
F17	97,57 $\pm$ 0,12	48,62 $\pm$ 0,14	42,03 $\pm$ 1,00
F18	95,38 $\pm$ 0,66	97,35 $\pm$ 0,99	95,81 $\pm$ 1,15
F19	97,33 $\pm$ 0,43	90,73 $\pm$ 0,50	91,06 $\pm$ 0,57
F32	97,74 $\pm$ 1,72	99,32 $\pm$ 0,70	95,94 $\pm$ 0,12

*SH: Standart Hata

3.8.2.2. Stabilité Çalışmasında Difteri Toksoidi İçeren Formüllerde Protein Bütünlüğü Tayinine Ait Bulgular

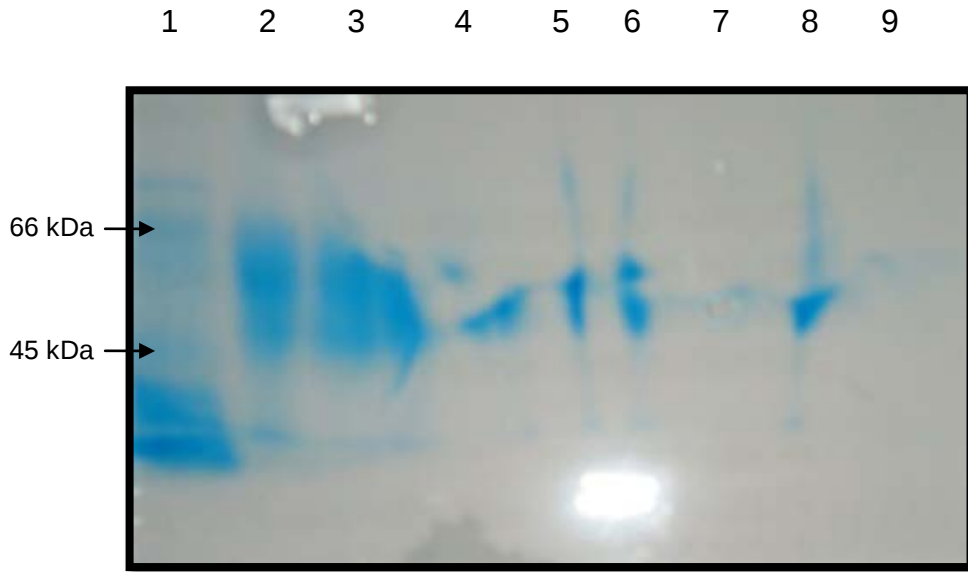
Stabilite çalışmasında difteri toksoidi içeren formüllerde protein bütünlüğü, denatüre edici olmayan koşullar altında SDS-PAGE yöntemi ile tayin edilmiştir. Bu çalışma literatür bilgileriyle desteklenmektedir (Spiers ve ark., 1999).

İn-sitü jel formülasyonlarının başlangıçta ve üçüncü ayda uygulandığı jellerde eğrilik oluştuğu gözlenmiş, sonuçların aynı jelde yer alan ve sadece difteri toksoidini içeren çözeltilerin bantlarını dahi etkilediği tespit edilmiştir (Şekil 3.14; Şekil 3.15; Şekil 3.16).



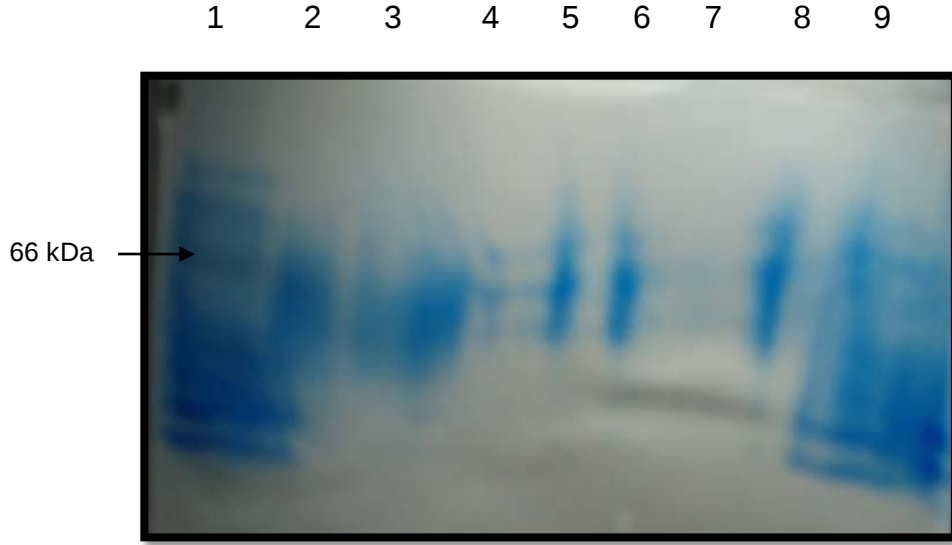
Şekil 3.14. Saf DT'nin ve DT içeren formülasyonların başlangıçtaki SDS-PAGE jel görüntüsü

Yükleme sırası: 1: molekül ağırlık belirteci; 2: saf difteri toksoidi (0,4 µg/ml); 3: saf difteri toksoidi (0,8 µg/ml); 4: boş; 5: F18; 6: F19; 7: boş; 8: F32; 9: F14; 10: molekül ağırlık belirteci



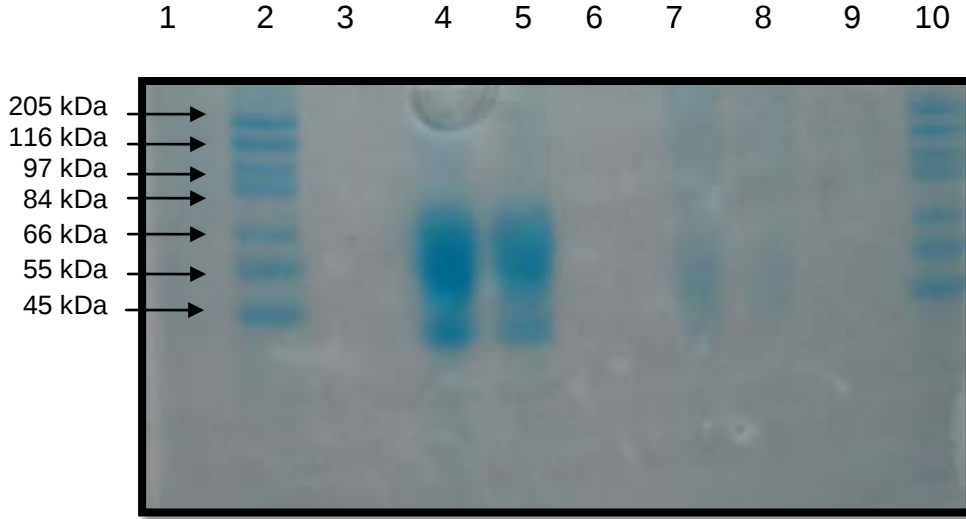
Şekil 3.15. 2-8°C'de saklanan saf DT'nin ve DT içeren formülasyonların III. ay sonundaki SDS-PAGE jel görüntüsü

Yükleme sırası: 1: molekül ağırlık belirteci; 2: saf difteri toksoidi (0,4 µg/ml); 3: saf difteri toksoidi (0,8 µg/ml); 4: F14; 5: F18; 6: F19; 7: F14; 8: F32; 9: F17



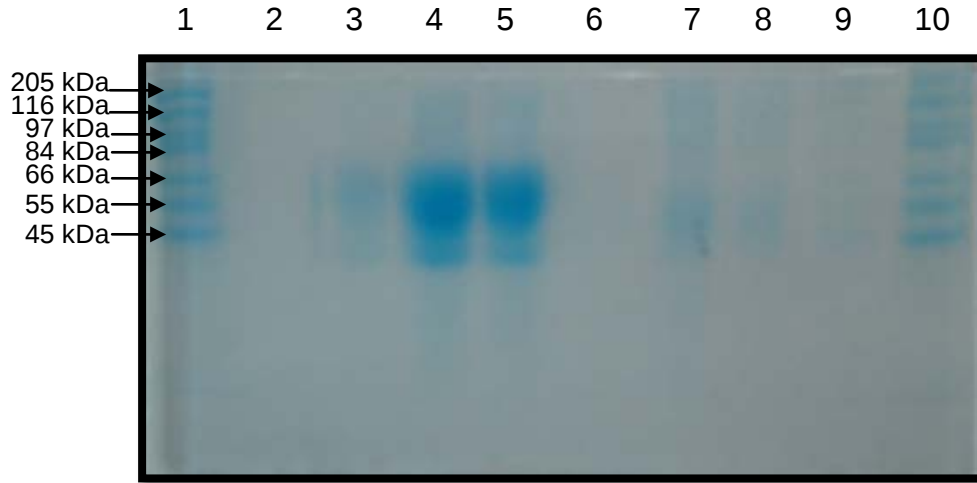
Şekil 3.16. $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan saf DT'nin ve DT içeren formülasyonların III. ay sonundaki SDS-PAGE jel görüntüsü
Yükleme sırası: 1: molekül ağırlık belirteci; 2: saf difteri toksoidi ($0,4\ \mu\text{g/ml}$); 3: saf difteri toksoidi ($0,8\ \mu\text{g/ml}$); 4: F14; 5: F18; 6: F19; 7: F17; 8: F32; 9: molekül ağırlık belirteci

In-sitü jel formülasyonu ve akrilamid arasındaki muhtemel ilişkiyi kanıtlamak için, denatüre edici olmayan koşullar altında, sadece difteri toksoidini pH 7,4 PBS veya pH 4,5 asetat tamponunda içeren çözeltiler üçüncü ayın sonunda, jellere uygulanmış ve bantlarda eğrilik oluşumunun söz konusu olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.17; Şekil 3.18).



Şekil 3.17. 2-8°C'de saklanan saf DT'nin (pH 7,4 PBS içinde hazırlanıp uygulanmış) III. ay sonundaki SDS-PAGE jel görüntüsü

Yükleme sırası: 1: boş; 2: molekül ağırlık belirteci; 3: boş; 4: saf difteri toksoidi (0,4 µg/ml); 5: saf difteri toksoidi (0,8 µg/ml); 6: boş; 7: saf difteri toksoidi (0,1 µg/ml); 8: saf difteri toksoidi (0,2 µg/ml); 9: boş; 10: molekül ağırlık belirteci



Şekil 3.18. 2-8°C'de saklanan saf DT'nin (pH 4.5 asetat tamponu içinde hazırlanıp uygulanmış) III. ay sonundaki SDS-PAGE jel görüntüsü

Yükleme sırası: 1: molekül ağırlık belirteci; 2: boş; 3: boş; 4: saf difteri toksoidi (0,4 µg/ml); 5: saf difteri toksoidi (0,8 µg/ml); 6: boş; 7: saf difteri toksoidi (0,1 µg/ml); 8: saf difteri toksoidi (0,2 µg/ml); 9: boş; 10: molekül ağırlık belirteci

3.9. In vivo Çalışmalara Ait Bulgular

3.9.1. Formülasyonların Seçimi ve Hazırlanmasına Ait Bulgular

In vivo hayvan deneylerinde uygulanacak formüller, fiziksel özellikleri, stabiliteleri, in vitro salım özellikleri ve mukoadezif güçleri dikkate alınarak seçilmiştir. Değerlendirmeler sonucu F18 ve F32 kodlu formüllerin kobaylara uygulanmasına karar verilmiştir.

3.9.2. Subkütan ve Intranazal Toksisite Testine Ait Bulgular

Bu test için kobayların enjeksiyon ve burun bölgeleri başlangıçtan itibaren 42 gün süreyle izlenmiştir. Intranazal veya subkütan uygulama sonrası hayvanların aşı uygulama bölgelerinde enflamasyon, ödem ya da farklı yan etkiler oluşmamıştır.

3.9.3. ELISA Testine Ait Bulgular

Deney hayvanlarına uygulanan formülasyonların sistemik bağışıklamada oluşturdukları IgG titreleri Bölüm 2.2.10'da anlatıldığı şekilde ELISA ile ölçülmüştür. ELISA testi çalışmalarında, ünitesi bilinen uygun standart serum temin edilemediğinden okunan absorbanslar kendi aralarında karşılaştırılarak değerlendirilmiş, ardından ELISA'ya göre daha hassas bir yöntem olan hücre kültüründe antikor nötralizasyon testine geçilmiştir.

Kobaylardan 42. gün sonunda alınan kan örnekleri ELISA ile analiz edildiğinde intranazal yoldan üç kez aşılanan hayvan gruplarında sistemik bağışık yanıtın yeterince uyarılamadığı görülmüştür. Bu gruplar kendi

aralarında değerlendirildiğinde ise F18 ve F32 kodlu formüllerin oluşturdukları sistemik bağışık yanıtlar birbirine yakın çıkmıştır.

F18 ve F32 kodlu formüllerle başlangıçta subkütan, 21. günde intranazal olmak üzere toplam iki kez aşıl原因 hayvanlarda (V. ve VI. gruplar), kontrol grubu olan PBS içinde DT'ye (IV. grup) göre anlamlı ölçüde yüksek IgG yanıtlar oluşmuştur. V nolu gruba uygulanan F18 ile VI nolu gruba uygulanan F32 kodlu formüllerin etkileri kendi aralarında kıyaslandığında, F32 ile bağışıklanan hayvanlarda daha yüksek bağışık yanıt elde edildiği görülmüştür.

3.9.4. Hücre Kültüründe Antikor Nötralizasyon Testine Ait Bulgular

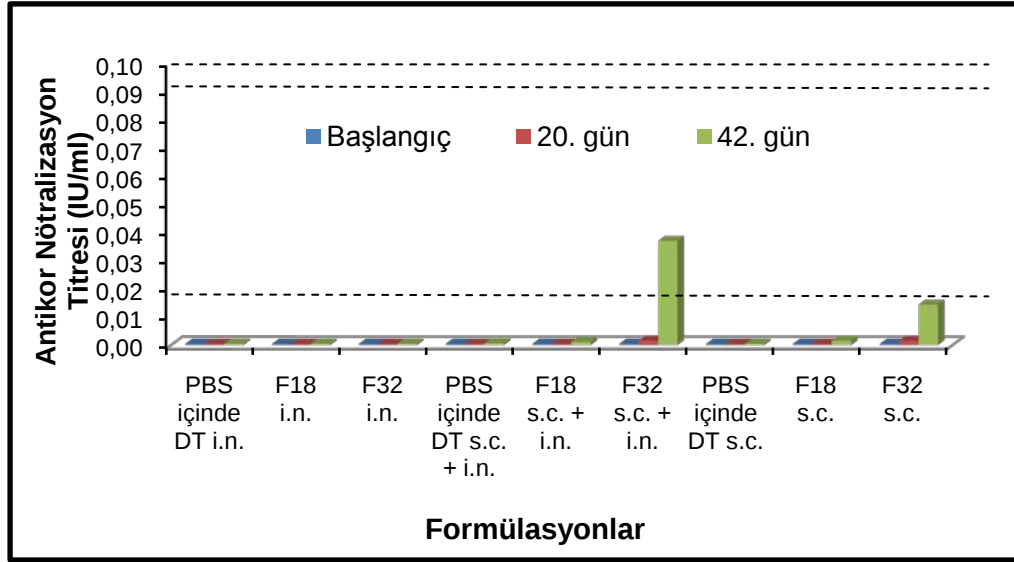
Bölüm 2.2.11'de anlatıldığı şekilde serumlardaki antitoksin titreleri ELISA'dan daha hassas bir yöntem olan hücre kültüründe antikor nötralizasyon testi ile tayin edilmiştir.

Toplam dokuz hayvan grubunun (n=5) 20. ve 42. günde oluşturdukları antitoksin titreleri Kruskal-Wallis testi ile değerlendirilmiş ve her iki zaman noktasında, gruplar arasında istatistiksel açıdan farklılık bulunmuştur ($p<0,05$). Bu sonuç doğrultusunda Kruskal-Wallis Çoklu Karşılaştırma Testi yapılarak hangi gruplar arasında fark olduğu incelenmiştir.

Her bir deney hayvanından üçer kez alınan serum örnekleri Hücre Kültüründe Antikor Nötralizasyon Testi ile ölçülmüş ve dokuz hayvan grubuna ait toplu sonuçlar Şekil 3.19'da gösterilmiştir.

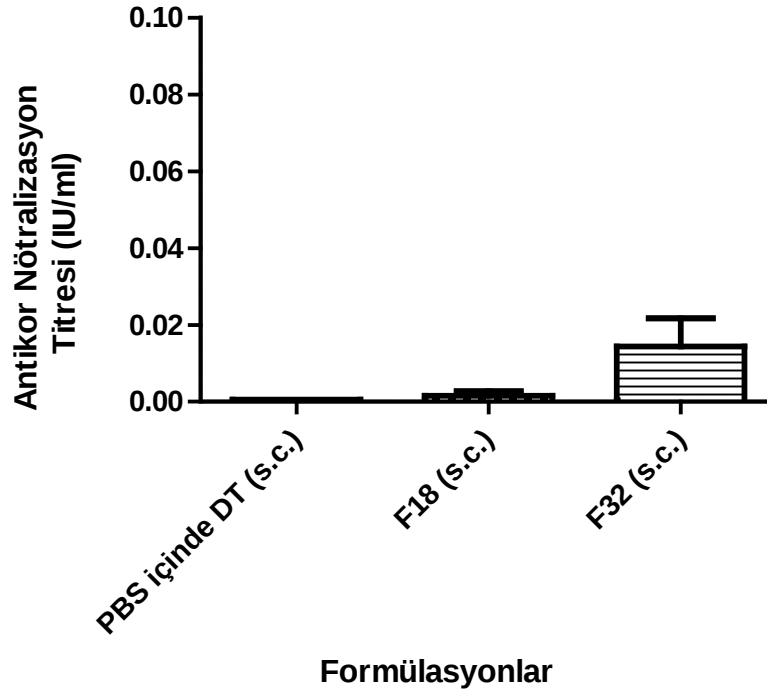
Aşılamadan bir hafta önce kobaylardan alınan kan örnekleri incelendiğinde, hayvanların bu çalışmadan önce difteriyle karşılaşmadıkları tespit edilmiştir.

Şekil 3.19’da görüldüğü üzere F18 ve F32 kodlu formüller ile toplam üç kez intranazal yoldan aşılanan kobaylarda, bağışık yanıt oluşumu yetersiz kalmış ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı yanıtlar meydana gelmemiştir ($p>0,05$).



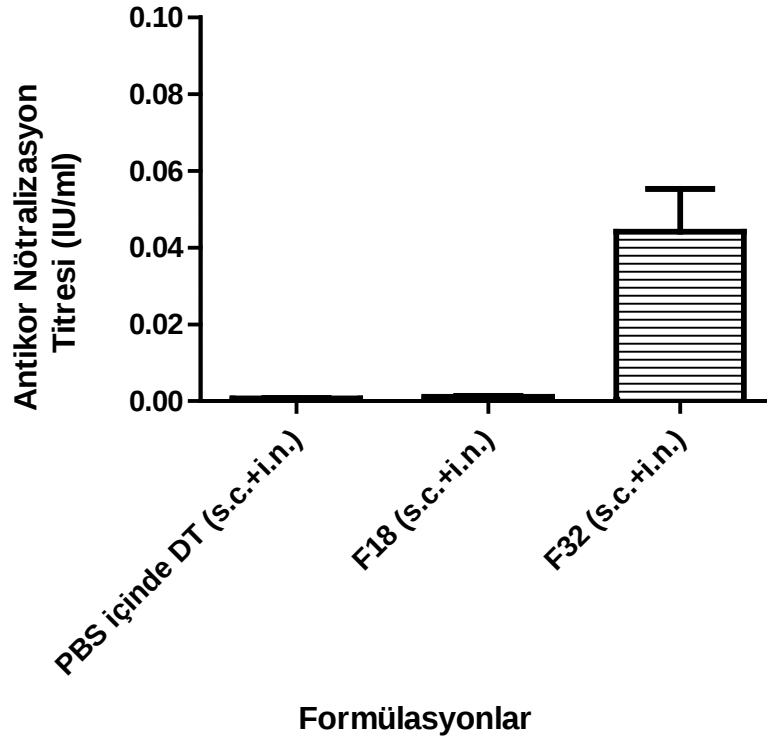
Şekil 3.19. Dokuz farklı grubun belli zaman aralıklarında serumlarında ölçülen antikör nötralizasyon titreleri (n=5, Ortalama $\pm$ SH)
i.n.: intranazal, s.c.: subkütan

PBS içinde DT, F18 veya F32 kodlu formüller ile sadece bir kez subkütan yoldan aşılanan kobaylarda 42. gün sonunda oluşan antitoksin titreleri karşılaştırılmıştır (Şekil 3.20). F32 kodlu formülün uygulandığı grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı farklılık görülürken ($p<0,05$), F18 kodlu formülün uygulandığı grup ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).



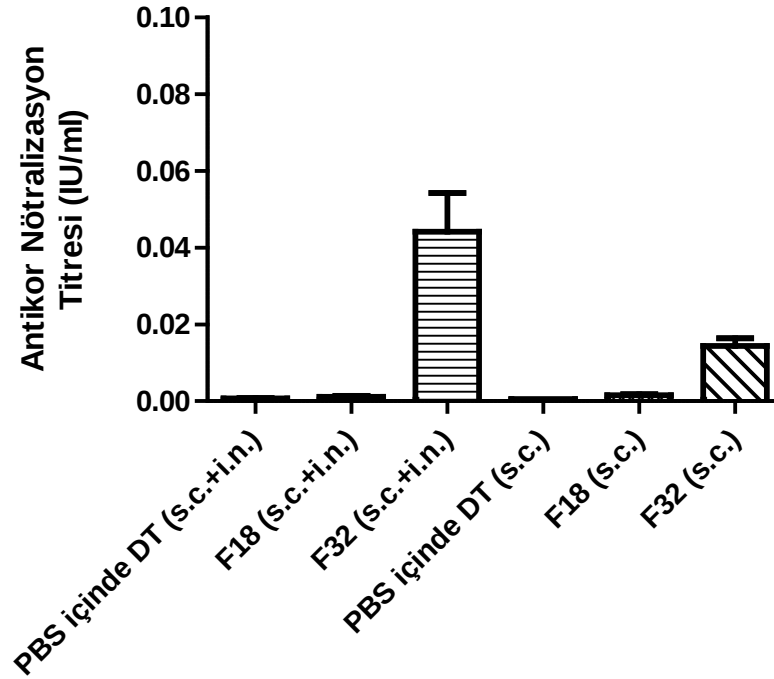
Şekil 3.20. Deney hayvanlarının sadece başlangıçta subkütan yoldan aşılınmaları sonrası 42. günde oluşan antikör nötralizasyon titreleri (n=5, Ortalama $\pm$ SH)

F18 ve F32 kodlu formüllerin deney hayvanlarına başlangıçta subkütan, 21. günde destek doz olarak intranazal verilmeleri sonucu 42. günde oluşturdukları antitoksin titreleri kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır (Şekil 3.21). F32 kodlu formülün uygulandığı grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı farklılık görülürken ($p < 0,05$), F18 kodlu formül grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 3.21. Deney hayvanlarının başlangıçta subkütan + 21. günde intranazal yoldan aşılanmaları sonrası 42. günde oluşan antikör nötralizasyon titreleri (n=5, Ortalama $\pm$ SH)

F18 ve F32 kodlu formüllerin hem subkütan hem de intranazal uygulanmaları sonucu 42. günde oluşturdukları antitoksin titreleri sadece subkütan verildiklerinde oluşturdukları yanıtlarla karşılaştırılmıştır (Şekil 3.22). Bu test ile F32 kodlu formülün kontrol gruplarına kıyasla antitoksin titrelerinde anlamlı artışlara neden olduğu gösterilmiştir ($p < 0,05$). Şekil 3.22’de görüldüğü üzere F32 kodlu formül en yüksek antitoksin titrelerini oluşturuyorken ($p < 0,05$); F18 kodlu formül kontrol gruplarına göre bağışık yanıt uyaramamıştır ($p > 0,05$).

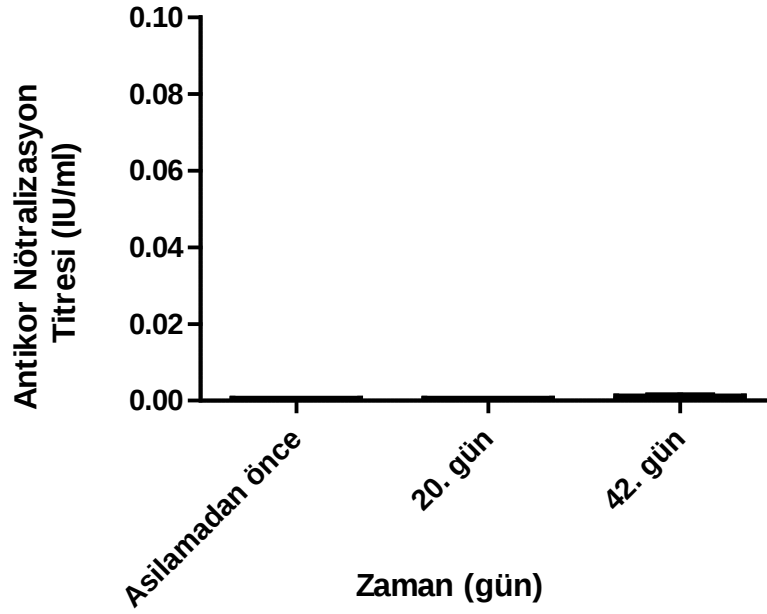


Formülasyonlar

Şekil 3.22. Deney hayvanlarının başlangıçta subkütan + 21. günde intranazal ya da sadece başlangıçta subkütan yoldan aşılantıları sonrası 42. günde oluşan antikör nötralizasyon titreleri (n=5, Ortalama $\pm$ SH)

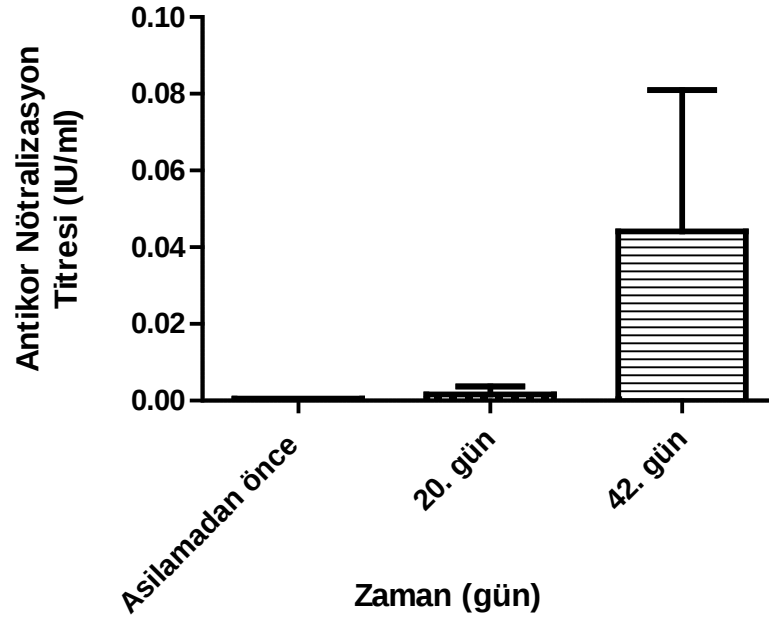
Wilcoxon testi ile ise her bir formülasyonun kendi grubu içinde aşı öncesi, 20. gün ve 42. günde oluşturdukları bağışık yanıtların istatistiksel açıdan farklılık gösterip göstermedikleri tayin edilmiştir.

18 kodlu formülün kobaylara başlangıçta subkütan, 21. günde intranazal yoldan verilmesi sonucu ortaya çıkan antitoksin titreleri Şekil 3.23'de gösterilmiş olup zamana karşı oluşan cevaplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).



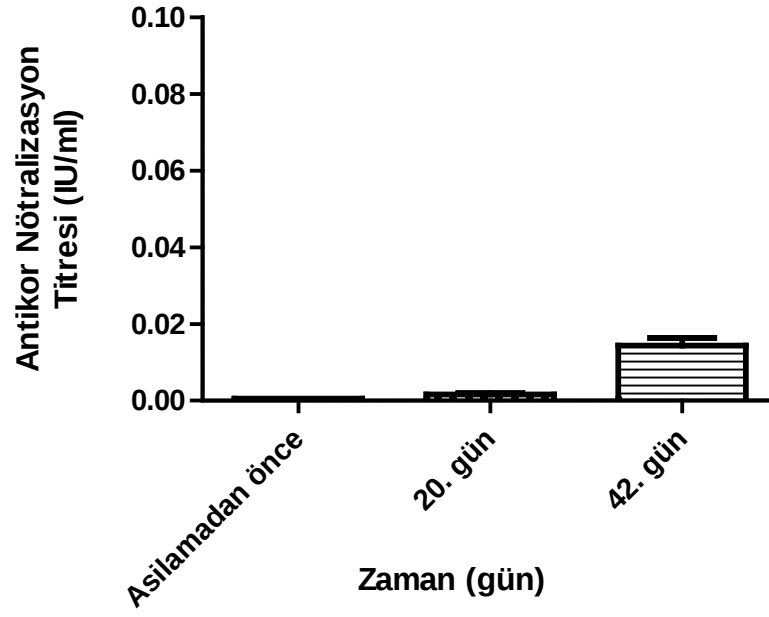
Şekil 3.23. Deney hayvanlarının F18 ile başlangıçta subkütan + 21. günde intranazal yoldan aşılanmaları sonrası zamana karşı oluşan antikör nötralizasyon titreleri (n=5, Ortalama $\pm$ SH)

F32 kodlu formülün kobaylara başlangıçta subkütan, 21. günde intranazal yoldan verilmesi sonucu ortaya çıkan antitoksin titreleri Şekil 3.24'te gösterilmiştir. Bu grafik istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde aşılama öncesi ile 20. gün arasında anlamlı fark bulunmazken ($p>0,05$), aşılama öncesi-42. gün ve 20. gün-42. gün arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 3.24. Deney hayvanlarının F32 ile başlangıçta subkütan + 21. günde intranazal yoldan aşılantıları sonrası zamana karşı oluşan antikör nötralizasyon titreleri (n=5, Ortalama $\pm$ SH)

F32 kodlu formülün kobaylara yalnızca subkütan verilmesi sonucu ortaya çıkan antitoksin titreleri Şekil 3.25'te gösterilmiştir. Bu grafiğe göre başlangıça kıyasla 20. günde anlamlı farklılık göstermeyen antitoksin miktarlarında ($p>0,05$), aşılama öncesi-42. gün ve 20. gün-42. gün arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 3.25. Deney hayvanlarının F32 ile sadece başlangıçta subkütan yoldan aşılanmaları sonrası zamana karşı oluşan antikör nötralizasyon titreleri (n=5, Ortalama $\pm$ SH)

In vivo çalışmalarda kullanılan gruplar arasındaki test sonuçlarının ikili gruplar halinde karşılaştırılması Çizelge 3.31’de özetlenmiştir.

Çizelge 3.31. In vivo sonuçların Kruskal-Wallis çoklu karşılaştırma testine (Dunn Testi) göre istatistiksel açıdan değerlendirilmesi

20. gün	Uygulama yolu								
	Kontrol (3xi.n.)	F18 (3xi.n.)	F32 (3xi.n.)	Kontrol (s.c.+i.n.)	F18 (s.c.+i.n.)	F32 (s.c.+i.n.)	Kontrol (s.c.)	F18 (s.c.)	F32 (s.c.)
Kontrol (3xi.n.)									*
F18 (3xi.n.)									*
F32 (3xi.n.)									*
Kontrol (s.c.+i.n.)									*
F18 (s.c.+i.n.)									*
F32 (s.c.+i.n.)									
Kontrol (s.c.)									*
F18 (s.c.)									*
F32 (s.c.)	*	*	*	*	*		*	*	

“*” simgesi iki grup arasında anlamlı farklılık ($p < 0,05$) olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.31. Devam In vivo sonuçların Kruskal-Wallis çoklu karşılaştırma testine (Dunn Testi) göre istatistiksel açıdan değerlendirilmesi

42. gün	Uygulama yolu								
	Kontrol (3xi.n.)	F18 (3xi.n.)	F32 (3xi.n.)	Kontrol (s.c.+i.n.)	F18 (s.c.+i.n.)	F32 (s.c.+i.n.)	Kontrol (s.c.)	F18 (s.c.)	F32 (s.c.)
Kontrol (3xi.n.)						*			*
F18 (3xi.n.)						*			*
F32 (3xi.n.)						*			*
Kontrol (s.c.+i.n.)						*			*
F18 (s.c.+i.n.)						*			
F32 (s.c.+i.n.)	*	*	*	*	*		*		
Kontrol (s.c.)						*			*
F18 (s.c.)									
F32 (s.c.)	*	*	*	*			*		

“*” simgesi iki grup arasında anlamlı farklılık ($p < 0,05$) olduğunu göstermektedir.

4. TARTIŞMA

4.1. Difteri Toksoidinin Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda model etkin madde olarak difteri toksininin formaldehit ile muamelesi sonucu elde edilen, toksik olmayan; fakat immünojenik özellik gösteren difteri toksoidi kullanılmıştır. Difteri toksoidi, bulaşıcı bakteriyel bir üst solunum yolu enfeksiyonu olan difteriye karşı aktif bağışıklama sağlamaktadır (Metz ve ark., 2003).

Difteri toksoidinin antijenisitesi Ramon flokülasyon testine göre 675 Lf/ml olarak ölçülmüştür. Difteri toksoidinin protein miktarı ise Lf değerinden yola çıkılarak hesaplanmış olup 2000 µg/ml'dir. Bu ölçüm ve hesaplamalar literatür yöntemleriyle uyumlu olarak gerçekleştirilmiştir (WHO, 1997).

Difteri toksoidinin çeşitli özelliklerinin belirlenebilmesi, formüllerden difteri toksoidi salımının incelenebilmesi ve miktar tayininin yapılabilmesi için fosfat tampon tuzu (PBS; pH 7,4) kullanılmıştır. Diğer polimerlerden farklı olarak mukoadezif polimer olarak kitosan (stok kitosan çözeltisinden hesaplı miktarda alınan) içeren formüllerde çözünmenin sağlanabilmesi ve difteri toksoidinin miktar tayini amacıyla pH 4,5 asetat tamponunun kullanımı tercih edilmiştir. Çalışmalar difteri toksoidinin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu ve mikroBCA miktar tayin yönteminin esas özellikleri dikkate alınarak yürütülmüştür. Difteri toksoidinin her iki ortamda da maksimum absorbans verdiği dalga boyu 560 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 3.1; Şekil 3.2).

Miktar tayini ölçümlerinin yapılacağı dalga boyunun belirlenmesinden sonra difteri toksoidinin pH 7,4 PBS ve pH 4,5 asetat tamponunda belirli konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir.

Elde edilen kalibrasyon doğrularına ait r^2 değerlerinin yüksek, standart hataların düşük olması, okunan absorbanslardan bulunan konsantrasyon değerlerinin güvenilir sonuçlar olacağını göstermiştir (Çizelge 3.1).

Analitik yöntemin validasyon çalışmasında; doğruluk, kesinlik, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı, özgünlük, doğrusallık ve aralık parametreleri incelenmiştir.

Yöntemin validasyonuna ilişkin olarak her iki ortam için incelenen parametrelerden doğruluk tayini için Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'te gösterilen veriler, % bağıl standart sapma değerlerinin %2'den küçük olma şartına göre yorumlanmış ve yöntemin doğru sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

Kesinlik; tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik parametreleri üzerinden değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, % bağıl standart sapma değerlerinin %2'den küçük olma şartına göre yorumlanmış ve her iki ortam için tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik kanıtlanmıştır (Çizelge 3.4; Çizelge 3.5; Çizelge 3.6; Çizelge 3.7). Günler arası tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesinde ise SPSS istatistik programı kullanılarak ortalamalar arası farkın önemlilik testi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar üç şekilde yorumlanmıştır. $p > 0,05$ bulunduğundan, $t_{hesap} < t_{tablo}$ olduğundan ve güven sınırlarından biri (+) iken diğeri (-) bulunduğundan ortalamalar arası farkın önemsiz olduğu kanıtlanmıştır.

Yöntemin difteri toksoidine özgü olduğunun belirlenebilmesi için formülasyonda yer alan her bir yardımcı maddenin formülasyonlarda kullanıldıkları oranlardaki çözeltileri ve difteri toksoidini içermeyen boş in-sitü jel formülasyonları hazırlanmıştır. Rutin ELISA plaklarıyla yapmış olduğumuz mikroBCA yöntemi kullanılarak, hazırlanan çözelti ve formüllerin 350-750 nm dalga boyları aralığında alınan spektrumları difteri toksoidinin maksimum absorbanı verdiği 560 nm'deki spektrumla karşılaştırılmış, herhangi bir

girişimin olmadığı, dolayısıyla yöntemin difteri toksoidine özgü olduğu belirlenmiştir.

Difteri toksoidinin pH 7,4 PBS ve pH 4,5 asetat tamponu çözeltisinde LOD değerleri sırasıyla 0,331 µg/ml ve 0,330 µg/ml bulunmuştur. LOQ değerleri ise sırasıyla 1,004 µg/ml ve 0,999 µg/ml'dir (Çizelge 3.8; Çizelge 3.9).

Doğrusallık deneyi sonucunda iki ortama ait veriler Çizelge 3.10'da, lineer regresyon grafikleri ise Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te verilmektedir. Her bir ortam için elde edilen doğruların regresyon doğrusundan sapmalarına ait standart hata, artık kareler toplamı ve doğrusallıktan sapmaların kareler toplamının küçük, regresyon katsayılarının (r^2) ise 1'e yakın olması verilerin güvenilirliğini göstermektedir.

Bölüm 2.2.1.5'te anlatıldığı şekilde difteri toksoidinin saflık tayininde denatüre edici koşullar altında SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. Difteri toksoidi antijeninin tek zinciri yaklaşık 66 kDa, A fragmanı 29 kDa, B fragmanı 45 kDa dolaylarında görülmüştür (Şekil 3.7). Formaldehitte muamele sonucu, akrilamid jel üzerinde gözlenen difüze haldeki protein bantları literatür verileri ile uyumludur (Metz ve ark., 2003).

Difteri toksoidi stabilitesinin incelenmesi amacıyla üç ay süreyle 2-8°C'de buzdolabında bekletilmiştir. Stabilité çalışmalarında difteri toksoidinin pH 7,4 PBS tamponu içinde belirli zaman aralıklarında tayin edilen protein miktarlarında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Çizelge 3.11). Difteri toksoidinin 2-8°C'de saklandığında yıllarca stabil kaldığını gösteren literatür verileri mevcuttur (World Health Organization (WHO) Temperature sensitivity of vaccines, 2006).

4.2. Ön Formülasyon Hazırlama Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Difteri toksoidinin terapötik etkinliğinin artırılması, uygun ve tam dozlamının yapılabilmesi ve kolay uygulanabilmesi amacıyla burun içine damla şeklinde uygulanabilen ve burun sıcaklığına bağlı olarak jelleşen bir dozaj formunun geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Ön formülasyon çalışmaları difteri toksoidi içermeyen nihai dozaj formundaki polimer çözeltileri üzerinde yürütülmüştür. İn-sitü jel sistemlerinin geliştirilmesi için sıcaklık etkisiyle jelleşebilen polimerler olan Poloksamer 407 ve Poloksamer 188'den yararlanılmıştır (Çizelge 2.3; Çizelge 2.4). Mukozadezif polimerlerden ise karbopol 934, HPMC, HPC veya kitosan (düşük ve orta molekül ağırlıklı) ile çalışılmıştır. Mukoadezif polimer kullanılarak mukosiliyer klerensi yavaşlatmak ve biyoyararlanımı artırmak amaçlanmıştır (Majithiya ve ark., 2006; Sezgin ve ark., 2007).

Poloksamer 407/ Poloksamer 188 karışımını ve farklı mukoadezif polimerleri içeren ön formülasyonlar Han ve arkadaşlarının (2007) çalışmaları temel alınarak başlangıçta distile su içinde hazırlanmıştır. Distile suda hazırlanan formülasyonlar arasından görünüşleri ve jelleşme sıcaklıkları istenilen özelliklere sahip formüller belirlenmiştir. Buna karşılık intranazal verilişte biyoyararlanımın artırılması ve deney hayvanlarında hem intranazal hem de subkütan verilişte ağrı, rahatsızlık oluşturmamaları için formüllerin izotonik hazırlanmalarına karar verilmiştir. Bu amaçla izotonisiteyi sağlamada PBS (pH 7,4)'ten yararlanılmıştır.

Mukoadezif polimerlerden düşük molekül ağırlıklı veya orta molekül ağırlıklı kitosan içeren formüller için önce stok kitosan çözeltisinden hesaplı miktarda alınmış, ardından diğer maddeler ve kitosan PBS (pH 7,4) içinde çözülmüştür. Ön çalışmalardan sonra kitosanın çözünürlüğünü artırmak ve sonraki aşamalarda in vitro salım çalışmalarından daha iyi yanıt almak

düşüncesiyle kitosan içeren formülasyonların asetat tamponu içinde (pH 4,5) hazırlanmasına karar verilmiştir (Çizelge 3.12).

Ön çalışmalar sonrası görülmüştür ki mukoadezif polimerlerin %0,2'den yüksek konsantrasyonlarda kullanıldıkları formülasyonlar, yüksek viskozlukta olup, pipet ucundan verilişleri zor olmuştur. Bu nedenle mukozal uygulama için mukoadezif polimerlerin %0,2'den yüksek konsantrasyonlarının uygun olmadığı sonucuna varılmış ve çalışmalar bu esasa dayalı olarak yürütülmüştür. Bu sonucu destekleyen literatür örnekleri mevcuttur (Park ve ark., 2001; Bilensoy ve ark., 2006a).

Çalışmamızda yalnızca kitosan polimerini içeren formüller de hazırlanmıştır. Bu formüllerin hem viskozitelerinin burundan veriliş için uygun olmamaları hem de ön değerlendirme amacıyla yürütülen in vitro salım çalışmalarında açığa çıkan difteri toksoidi miktarının 9 saat sonunda %28 civarında olmasından dolayı bu formüller üzerinde yeni incelemeler yapılmamıştır. Kitosan polimerinin kullanıldığı jel yapısındaki bu sistemlerden istenilen yanıtın alınamamasının çözünürlük kitosanın kullanılmamış olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

4.3. In-sitü Jelleşen Ön Formülasyonların Karakterizasyonlarının Değerlendirilmesi

4.3.1. Ön Formülasyonların Jelleşme Sıcaklıklarının Değerlendirilmesi

İn-sitü jeller için ideal jelleşme sıcaklığı aralığının 25°C ile 37°C arasında olduğu kabul edilmektedir. Jelleşmenin 25°C'nin altında gerçekleşmesi oda sıcaklığında jel oluşumuna, 37°C'nin üstünde gerçekleşmesi sıvı dozaj formunun vücut sıcaklığında jel hale geçememesine ve nazal klerensle kısa zamanda vücuttan atılmasına neden olacaktır (Majithiya ve ark., 2006).

Burun boşluğunun fizyolojik sıcaklığı 32-35°C arasında değişmektedir (Mygind ve Dahl, 1998). Bu nedenle 34°C'den düşük sıcaklıkta, 25°C'den yüksek sıcaklıkta jelleşen formüller bu çalışmada esas alınmıştır.

Tek başına Poloksamer 407 polimerini içeren formüllerde istenilen jelleşme sıcaklıklarına ulaşılamamıştır. Mukoadezif polimerlerin kullanılmadığı Poloksamer 407 ve Poloksamer 188 karışımlarının jelleşme sıcaklıkları ise polimerlerin oranına ve çözücüye bağlı olarak 29-39°C arasında değişmiştir. Bu formüllere mukoadezif polimerlerden karbopol 934, HPMC, HPC ya da kitosanın (LMW) ilavesi jelleşme sıcaklığında düşüş meydana getirmiştir. Mukoadezif polimer konsantrasyonu arttıkça jelleşme sıcaklığı azalmaya devam etmiştir. Örneğin, %0,15 a/a karbopol 934 polimerini içeren F26 kodlu formül 31°C'de jelleşiyorken, %0,2 a/a karbopol 934 polimerini içeren F27 kodlu formül 30°C'de jelleşmiştir (Çizelge 3.12). Jelleşme sıcaklığındaki azalmalar literatür verileriyle uyumludur (Zaki ve ark., 2007).

Mukoadezif polimerlerin jelleşme sıcaklığını düşürücü etkilerinin, bu polimerlerin çözünmelerinden sonra viskozitedeki artıştan ileri geldiği belirtilmektedir (Park ve ark., 2001).

İzotonisiteyi sağlamak için distile su yerine PBS (pH 7,4)'in kullanılması (örn., F4-F12, F5-F8) veya formüllere mannitolün ilave edilmesi (örn., F32-F33) jelleşme sıcaklığını 1-2°C düşürmüştür (Çizelge 3.12).

Burun sıcaklığı, sıcaklık değişimiyle jelleşen polimerlerin kullanım oranı (Poloksamer 407/ Poloksamer 188), mukoadezif polimerlerin varlığı ve miktarları esas alındığında, 29-30°C arasında jelleşen formüller uygun olarak seçilmiş ve çalışmalara bu formüllerle devam edilmiştir.

4.3.2. Ön Formülasyonların Jelleşme Sürelerinin Değerlendirilmesi

Poloksamer içeren formüllerin burun içine verildikten sonra 5 dakika içinde jelleşmeleri ideal olarak kabul edilmektedir (Park ve ark., 2001). Hazırladığımız ön formülasyonlardan jelleşme sıcaklığı 28-29°C aralığında olanların 1-2 dakika içinde, 30°C olanların 3 dakika içinde, 31-32°C olanların 3-4 dakika içinde jelleştiği görülmüştür. Bu formüllerin jelleşme sürelerinin uygulama esnasında geçecek sürenin de hesap edilmesine uygun oldukları kabul edilmiştir. Buna karşılık 1 dakikadan kısa sürede jelleşen veya 10 dakika sonra dahi jelleşmeyen formüllerin ya uygulama esnasında zorluklara neden olacağı ya da burun boşluğundan hızla temizlenecekleri sonucuna varılmıştır (Çizelge 3.13).

4.4. Ön Formülasyonların ve Uygun Formüllerin Seçimi

F14, F17, F18, F19, F20, F21 ve F32 kodlu formüller, görünüşlerinde yabancı partikül içermediklerinden, 32-35°C civarındaki burun sıcaklığına uygun olarak 29-33°C dolaylarında jelleştiklerinden ve izotonik olduklarından dolayı uygun formüller olarak seçilmiştir.

4.5. F14, F17, F18, F19, F20, F21, F32 Kodlu Difteri Toksoidi İçermeyen Formüller Üzerinde Yürütülen Çalışmalara Ait Bulgular

4.5.1. Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin pH Ölçümlerinin Değerlendirilmesi

İnsan burun boşluğunun pH'sı ortalama 6,3 değerinde olup 5,2 ile 8,1 arasında değişkenlik gösterebilmektedir (Washington ve ark., 2000). Burun boşluğunun pH'sı formülasyonun pH'sını değiştirebileceğinden veya tam tersi

gerçekleşebileceğinden, mümkünse formülasyonun tamponlama kapasitesi olmalıdır.

pH 7,4 PBS içinde hazırlanan formüllerden F14, F18 ve F19 kodlu formüllerin pH'ları 7,4-7,5; kitosan içeren ve PBS'te hazırlanan F20 ve F21'in pH'ları 5,6-5,5; karbopol 934 içeren F17'nin pH'sı 5,1 dolaylarındadır. pH 4,5 asetat tamponunda hazırlanan F32 kodlu formülasyonun pH'sı ise 5,2 civarındadır (Çizelge 3.15).

Burunda irritasyon oluşmasını engellemek için formülasyonun pH'sının 4,5-6,5'e ayarlanması gerektiği belirtilmiştir (Arora ve ark., 2002). Buna karşılık gönüllülere pH'sı 7,4 olan çözelti içinde intranazal verilen formüllerin kişilerde irritasyona neden olmadığını gösteren literatür verileri mevcuttur (Yates ve ark., 2002). Sonuç olarak, hazırladığımız formülasyonların pH'larının literatür verileriyle uyumlu oldukları kararına varılmıştır.

4.5.2. Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Reolojik Deneyleri ve Viskozitelerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Difteri toksoidi içermeyen F14, F17, F18, F19, F20, F21 ve F32 kodlu formüllerin kayma hızlarının artışıyla viskozluklarının azaldığı, yani psödoplastik akış özelliği gösterdikleri bulunmuştur (Şekil 3.8; Şekil 3.9). Bu durum literatür bilgisiyle paralellik göstermektedir (Ricci ve ark., 2005).

Hazırladığımız formüllerin 25°C'deki reolojik özellikleri Çizelge 3.15 ve Çizelge 3.17'de görülmektedir. 25°C, 10 rpm ve 20 rpm'de ölçülen viskozite değerlerine bakıldığında en düşük viskoziteye sahip formülün mukoadhezif polimer içermeyen F14 olduğu tespit edilmiştir. Mukoadhezif polimerlerden düşük molekül ağırlıklı kitosanı içeren F20, F21, F32 ve karbopol 934'ü içeren F17 kodlu formüllerin viskozitelerinin, diğer formüllere oranla daha

yüksek oldukları tespit edilmiştir. HPMC içeren F18 kodlu formül ise F14 ve F19'dan daha yüksek, F32 ve F17'den daha düşük viskozlukta bulunmuştur.

Aynı konsantrasyonda kitosanı (%0,1 a/a) farklı çözücülerde içeren F20 ve F32'nin viskozlukları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. %0,2 a/a kitosan içeren F21'in viskozluğu ise F20 ve F32'ye göre daha yüksektir. Bu verilerden anlaşıldığı üzere mukoadezif polimer konsantrasyonunun artmasıyla viskozluk artmaktadır.

Mukoadezif polimerlerin, viskozitede neden oldukları artışı sayısal olarak ifade edecek olursak F17 ve F32'nin viskoziteleri F14'ün yaklaşık 1,8 katı; F18'in ise F14'ün yaklaşık 1,4 katıdır.

Formülasyonların jelleştikten sonraki viskozitelerini incelemek için 34°C'de ölçümler yapılmıştır. Çizelge 3.16 ve Çizelge 3.18'deki 10 rpm ve 20 rpm sonuçlarına bakıldığında en düşük viskozitenin jelleşmeden önce olduğu gibi jelleştikten sonra da mukoadezif polimer içermeyen F14'e ait olduğu belirlenmiştir. Düşük molekül ağırlıklı kitosan içeren F20, F21 ve F32'nin viskoziteleri diğer formüllerden belirgin bir şekilde yüksek olup viskoziteler $F21 > F20 > F32 > F18 > F17 > F19 > F14$ şeklinde sıralanmıştır. Şekil 3.9'da da görüldüğü üzere formüllerin viskoziteleri arasındaki farklılıklar düşük kayma hızlarında daha fazla oluşmuştur. Literatürlerde de belirtildiği üzere formülasyonların reolojik özellikleri, formüllerin polimer içeriklerinden ve formüllerde kullanılan mukoadezif polimerlerin kalınlaştırıcı davranışlarından etkilenmektedir (Bilensoy ve ark., 2007).

4.5.3. Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Mukoadezif Güçlerinin Değerlendirilmesi

Bölüm 2.2.5.4'te anlatıldığı şekilde yapılan testler sonucu formüllerin mukoadezif güçlerinin, viskozluklarıyla paralellik gösterdiği belirlenmiştir

(Çizelge 3.19). Örn., mukoadezif polimer içermeyen F14 yalnızca Poloksamer polimerlerini içerdiğinden mukoadezif gücü en düşüktür. Mukoadezif polimerler arasından kitosan ise, diğer polimerlere kıyasla daha düşük konsantrasyonda kullanılmasına rağmen mukoadezif gücü en çok yükselten polimerdir.

Mukoadezif güç, mukosiliyer klerensi yavaşlatan bir faktör olduğundan mukoadezif güç arttıkça formüllerin nazal mukozada alıkonma sürelerinin ve sistemik absorpsiyonlarının artacağı düşünülmektedir. Bu iddiayı destekleyen literatür bilgileri mevcuttur (Han ve ark., 2006).

4.6. F14, F17, F18, F19, F20, F21, F32 Kodlu Formülasyonların Difteri Toksoidi ile Hazırlanmalarına Ait Bulgular

4.6.1. Difteri Toksoidi İlavesinin Formülasyonların Jelleşme Sıcaklığı Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

Hesaplı miktarda difteri toksoidinin formülasyonlara ilavesi formülasyonların jelleşme sıcaklıklarında 0,5-2°C azalmaya neden olmuştur (Şekil 3.10). Jelleşme sıcaklığındaki bu azalmanın formüllerin jelleşmesi ve uygulanması üzerinde olumsuz bir etkisi bulunmamakta olup, bu değişim literatür verileriyle desteklenmektedir (Han ve ark., 2006).

4.7. F14, F17, F18, F19, F20, F21, F32 Kodlu Difteri Toksoidi İçeren Formüllerde In vitro Testlerin Değerlendirilmesi

4.7.1. Difteri Toksoidi Miktar Tayini Bulgularının Değerlendirilmesi

Formüllere ilave edilen pratik difteri toksoidi miktarları mikroBCA yöntemiyle tayin edilmiştir. F14, F17, F18, F19, F20, F21 ve F32 kodlu formüllerdeki

difteri toksoidi miktarları %95,92 ile %101,82 değerleri arasında değişmiştir (Çizelge 3.20). Formülasyonlardaki difteri toksoidi miktarlarının % geri kazanım değerlerinin, %95 güven sınırları içinde bulunduğu ve standart hatalarının küçük olduğu saptanmıştır. Bu verilere dayanarak difteri toksoidinin formülasyon içinde homojen olarak dağıldığı ve istenilen dozun tam olarak verilebileceği sonucuna varılmıştır.

4.7.2. Difteri Toksoidi İçeren Formüllerin In vitro Salım Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Difteri toksoidinin, formüllerden in vitro salım profilleri membran içermeyen yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. Şekil 3.11’de görüldüğü üzere hazırlanan tüm formülasyonlardaki difteri toksoidlerinin %50’si, 300. dakikaya kadar ortama salınmıştır.

Formüller arasındaki en hızlı salım, mukoadezif polimer içermeyen F14 kodlu formülde gerçekleşmiştir. 180. dakikada difteri toksoidinin %50’sinden fazlası, 540. dakikada ise yaklaşık %98’i ortama salınmıştır. Bu sonuç jelleşme öncesi ve jelleştikten sonra saptanan viskozluk değerleriyle paralellik göstermektedir.

Mukoadezif polimer içeren tüm formüllerde (F17, F18, F19, F20, F21 ve F32) difteri toksoidi salımı mukoadezif polimer içermeyen F14’e göre daha yavaş olmuştur (Şekil 3.11). Bu etkinin, mukoadezif polimerlerin viskoziteyi artırmalarından ve bu polimerlerin poloksamer misellerindeki difteri toksoidinin difüze olduğu su kanallarını sıkıştırarak difteri toksoidi salımında gecikmeye neden olmalarından ileri geleceği düşünülmektedir. Bu bulgularımız Ryu ve arkadaşlarının yaptığı benzer bir çalışmada da teyid edilmiştir (Ryu ve ark., 1999).

F17 ve F18'in in vitro salım profilleri birbirine benzerdir. Buna karşılık 780. dakika sonunda F17'den %94 oranında salım gerçekleşirken, F18'den difteri toksoidinin tamamı ortama salınmıştır. F19 ise mukoadhezif polimer içeren formüllere oranla en hızlı salımın gerçekleştiği formüldür. Bu bulgu viskozite sonuçlarıyla uyumludur.

Sırasıyla %0,1 a/a ve %0,2 a/a kitosan içeren F20 ve F21 kodlu formüllerde difteri toksoidi salımı, diğer formüllere kıyasla daha yavaş gerçekleşmiştir. 420. dakikaya kadar bu farklılık beklenen düzeylerde ortaya çıkarken, sonraki saatlerde difteri toksoidi salımının gerçekleşmediği veya çok az miktarda difteri toksoidinin açığa çıktığı görülmüştür. 780. dakikanın sonunda her iki formülden de salınan difteri toksoidi miktarı %72-73 civarında kalmıştır (Şekil 3.11). Bu nedenle F20 ve F21 formüllerinin ileriki çalışmalarda kullanılmamalarına karar verilmiştir. Difteri toksoidinin formüllerden düşük salımına, çözünme ortamı pH'sının yanı sıra formülün hazırlanmasında kullanılan pH 7,4 PBS içinde kitosanın yeterince çözünmemesinin neden olduğu düşünülmektedir. Jelin hazırlanmasında kullanılan çözücü tipinin ve çözünme ortamı pH'sının etkin madde salım oranını etkilediğini gösteren literatürler mevcuttur (Oungbho ve Müller, 1997; Duman ve Şenel, 2004).

Hem jelleşme öncesi hem de jelleşme sonrası en yüksek viskozluğa sahip F32 formülasyonunda difteri toksoidi salımı viskozluk değerleriyle paralellik göstermiştir. Difteri toksoidinin salımı özellikle 300. dakikaya kadar diğer formüllere kıyasla daha yavaş gerçekleşmiştir. F20 ve F32 kodlu formüller aynı miktarda kitosan (düşük molekül ağırlıklı) içermektedir. Buna karşılık 780. dakika sonunda F20'den açığa çıkan miktar %70 dolaylarındayken, F32'de bu değer %98 civarındadır (Şekil 3.11). Bu farklılığın, formülasyonların hazırlanmasında kullanılan farklı çözücülerden ileri geldiği düşünülmektedir.

Sonuçlardan anlaşıldığı üzere mukoadezif polimer içermeyen F14 formülünde difteri toksoidi salımı en hızlı olmuştur. Nazal klerens dikkate alındığında hem formülün mukozada daha uzun süre kalması hem de difteri toksoidi salımının daha yavaş olması nedeniyle mukoadezif polimer kullanımının gerekliliği ortaya konulmuştur.

4.8. Stabilité Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

F17, F18, F19 ve F32 kodlu formüller görünürde yabancı partikül içermemeleri, pH'larının intranazal veriliş için uygun olması, oda sıcaklığındaki viskozluklarının düşük, burna uygulandıktan kısa süre içinde jelleşerek burundan akmayacak kadar viskoz olmaları, formülasyona yüklenen difteri toksoidi miktarının yüksek olması ve difteri toksoidinin in vitro salımının maksimum 12 saat içinde gerçekleşmesi nedenleriyle ideal formüller olarak kabul edilmiştir. F14 kodlu formül ise mukoadezif polimer içermemesine rağmen diğer formüller ile karşılaştırma yapmak amacıyla stabilite çalışmasına alınmıştır.

4.8.1. Difteri Toksoidi İçermeyen F14, F17, F18, F19 ve F32 Kodlu Formüllerin Stabilité Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Difteri toksoidi içermeyen nihai dozaj formundaki polimer çözeltilerinin stabiliteleri altı ay süreyle incelenmiştir. Difteri toksoidi içermeyen formüller ile stabilite çalışması yapılmasının nedeni in-sitü jel formülasyonu içinde difteri toksoidinin aktivite kaybına uğrayıp uğramama olasılığıdır. Böyle bir etkileşim ile karşılaşılması durumunda formülasyonlarımızın raf ömrünü uzatmak amacıyla saf difteri toksoidinin ve difteri toksoidi içermeyen nihai dozaj formundaki polimer çözeltisinin ayrı ayrı saklanıp, kullanılacakları anda birleştirilmeleri önerilebilir. İn-sitü jel sistemlerinde polimer çözeltisi ve etkin maddenin ayrı iki enjektör içinde saklandığı piyasa preparatı olduğu gibi

(Eligard®), bu yöntemi destekleyen literatürler de mevcuttur (Packhaeuser ve ark., 2004).

4.8.1.1. Stabilité Çalışmasında Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Organoleptik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Difteri toksoidi içermeyen ve 2-8°C'de altı ay boyunca saklanan formüllerin organoleptik özelliklerinde gözle görülür bir değişiklik meydana gelmemiştir (Çizelge 3.21).

Difteri toksoidi içermeyen ve 25±2°C'de altı ay boyunca saklanan formüllerden; F19 kodlu formülde I. aydan itibaren, F32 kodlu formülde ise altıncı ayda az miktarda görünür yabancı partikül oluşmuştur. F14, F17 ve F18 kodlu formüllerin organoleptik özelliklerinde değişiklik meydana gelmemiştir (Çizelge 3.22).

4.8.1.2. Stabilité Çalışmasında Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin pH Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Difteri toksoidi içermeyen F14, F17, F18 ve F19 kodlu formüller pH 7,4 PBS; F32 kodlu formül ise pH 4,5 asetat tamponunda hazırlandıklarından hem 2-8°C'de hem de 25±2°C'de saklanan formüllerin pH'larındaki değişiklikler ±0,1-0,3 civarında gerçekleşmiştir. (Çizelge 3.23; Çizelge 3.24). pH değerleri zamana bağlı bir miktar artma ya da azalma göstermesine rağmen burna uygulamada uygun limitler içerisinde kalmıştır (Arora ve ark., 2002; Yates ve ark., 2002).

4.8.1.3. Stabilité Çalışmasında Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Reolojik Davranış ve Viskozite Bulgularının Değerlendirilmesi

2-8°C'de veya 25±2°C'de altı ay saklanan difteri toksoidi içermeyen formüllerin belirli zaman noktalarındaki viskozite değerleri değerlendirilmiştir (Çizelge 3.25; Çizelge 3.26).

2-8°C'de saklanan F14, F18, F19 ve F32 kodlu difteri toksoidi içermeyen formüllerin belli zaman aralıklarındaki viskozitelerinde anlamlı bir değişiklik olmazken, F17 kodlu formülün viskozitesinde üçüncü aydan itibaren azalma görülmüştür.

25±2°C'de saklanan F19 ve F32 kodlu difteri toksoidi içermeyen formüllerin viskozitelerinde anlamlı bir değişiklik olmazken, F14, F17 ve F18 kodlu formüllerin viskozitelerinde zamana bağlı olarak artış meydana gelmiştir.

4.8.1.4. Stabilité Çalışmasında Difteri Toksoidi İçermeyen Formüllerin Jelleşme Sıcaklıklarının Değerlendirilmesi

Difteri toksoidi içermeyen formüllerin 2-8°C'de veya 25±2°C'de altı ay süresince saklanmaları sonucu, oda sıcaklığında jelleşmelerine neden olacak ya da burun içine uygulandıklarında jelleşme sürelerini değiştirecek bir değişiklik tespit edilmemiştir (Çizelge 3.27; Çizelge 3.28).

4.8.2. Difteri Toksoidi İçeren F14, F17, F18, F19, F32 Kodlu Formüllerin Stabilite Çalışmalarının Değerlendirilmesi

4.8.2.1. Stabilite Çalışmasında Difteri Toksoidi İçeren Formüllerin Miktar Tayini Bulgularının Değerlendirilmesi

2-8°C ve 25±2°C'de saklanan difteri toksoidi içeren formüllerde üç ay sonra kalan antijen miktarları mikroBCA yöntemi ile tayin edilmiş ve Çizelge 3.29 ile Çizelge 3.30'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.29'da görüldüğü üzere 2-8°C'de üç ay boyunca saklanan F14 ve F18 kodlu formüllerin DT miktarları sırasıyla %96-97 ve %95-96 arasında değişmiştir. F19 kodlu formüldeki DT miktarı başlangıçta %96 iken, üçüncü ayın sonunda %91'e; F32 kodlu formüldeki DT miktarı başlangıçta %98 iken, üçüncü ayın sonunda %91'e düşmüştür. Karbopol 934 içeren F17 kodlu formüldeki DT miktarı ise başlangıçta %98 iken üçüncü ayın sonunda %40'lara düşmüştür. Difteri toksoidi miktarındaki bu azalmanın karbopol 934 ile difteri toksoidi arasındaki muhtemel bir etkileşimden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Sonuçların standart hataları düşük bulunmuştur.

Çizelge 3.30'da görüldüğü üzere 25±2°C'de üç ay boyunca saklanan F14 kodlu formüldeki DT miktarı başlangıçta %98 iken, üçüncü ayın sonunda %90'a; F18 kodlu formüldeki DT miktarı başlangıçta %97 iken, üçüncü ayın sonunda %91'e; F32 kodlu formüldeki DT miktarı başlangıçta %97 iken, üçüncü ayın sonunda %95'e düşmüştür. Karbopol 934 içeren F17 kodlu formüldeki DT miktarı ise başlangıçta %97 iken üçüncü ayın sonunda %42'lere düşmüştür. Sonuçların standart hataları düşük bulunmuştur.

Yüksek sıcaklıklar antijenin denatürasyonuna ve parçalanmasına neden olabilir. Donmanın altındaki sıcaklıklar ise antijeni denatüre edebilen buz kristal formunun oluşumuna yol açabilir ve ayrıca aşı-adjuvan komplekslerinin

yapısını değiştirebilir. Bu nedenle aşıların etkili olabilmeleri için dar bir sıcaklık aralığında saklanmaları gerekir (Zweig, 2006).

Protein yapısındaki bir etkin maddenin, poloksamerlerin kullanıldığı in-sitü jel yapısındaki formül içinde 4°C’de üç aydan uzun süre saklandığında miktarının anlamlı değişikliğe uğramadığını gösteren literatür verileri mevcuttur (Yun ve ark., 1999).

4.8.2.2. Stabilité Çalışmasında Difteri Toksoidi İçeren Formüllerde Protein Bütünlüğü Tayini Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Stabilite çalışmasında difteri toksoidi içeren formüllerdeki protein bütünlüğü, denatüre edici olmayan koşullar altında SDS-PAGE yöntemi ile tayin edilmiştir.

Başlangıçta ve üçüncü ayda elde edilen jel görüntülerinden anlaşılacağı üzere formüllerde bulunan difteri toksoidinin sürüklenmiş ve dağılmış şekilde bant oluşturduğu; fakat bant izlerinin yoğunlaştığı bölgelerin, beklenen yerlere yakın olduğu gözlenmiştir (şekil 3.14; şekil 3.15; şekil 3.16). Bantların oluşumundaki farklılığın Poloksamerler ile jelin yapısını oluşturan akrilamid arasındaki muhtemel bir etkileşimden kaynaklanabileceği düşünölmektedir. Bu iddiayı doğrulamak için denatüre edici olmayan koşullar altında hem saf DT (pH 7,4 PBS veya pH 4,5 asetat tamponunda) hem de formüller içindeki DT için SDS-PAGE çalışması yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır (şekil 3.14; şekil 3.15; şekil 3.16; şekil 3.17; şekil 3.18).

Saf difteri toksoidi üçüncü ayda tek başına uygulandığında 66 kDa dolaylarında görölmüş olup literatür bulgularıyla uyumlu olduğu belirlenmiştir (Özcengiz ve ark., 1998; Singh ve ark., 2006). İn-sitü jel formüllerinin uygulandığı SDS-PAGE jellerinde ise formüllerin yanı sıra hem difteri toksoidi hem de molekül belirtecinin oluşturdukları bantlarda karışmalar meydana

gelmiştir. Literatürlerde, in-sitü jel formülasyonları için SDS-PAGE yönteminin kullanıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle in-sitü jelleşen formülasyonlarımızdaki difteri toksoidi bütünlüğünü SDS-PAGE ile göstermemiz orijinal bir bulgu niteliğindedir.

SDS-PAGE sonuçları, üçüncü ay sonunda formüllerde kalan difteri toksoidi miktarıyla karşılaştırılarak da değerlendirilmiştir. Difteri toksoidi miktarı %90-98 civarında olan formüllerde bantlar koyu renkli görülürken, difteri toksoidi miktarının 1. aydan itibaren %40'lara düştüğü F17 formülünün bantları ya hiç görülmemiş ya da soluk görülmüştür. Bu sonuçlar miktar tayini bulgularıyla uyumludur.

4.9. In vivo Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi

4.9.1. Formülasyonların Seçimi ve Hazırlanmasına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

In vivo hayvan deneylerinde F18 ve F32 kodlu formüller ile kontrol amaçlı PBS içinde DT kobaylara belirli zaman noktalarında subkütan veya intranazal uygulanmıştır (Çizelge 2.6). F18 ve F32 kodlu formüllerin seçilme nedenleri; fiziksel özellikleri, stabiliteleri, in vitro salım profilleri, mukoadezif güçleri ve hazırlanmalarında kullanılan mukoadezif polimerleridir.

4.9.2. ELISA'ya Ait Bulguların Değerlendirilmesi

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

42. günün sonunda kobaylardan alınan kan örnekleri analiz edildiğinde, intranazal yoldan üç kez aşıl原因an hayvan gruplarında sistemik bağışık yanıtın yeterince uyarılamadığı görülmüştür. Bu nedenle sadece intranazal aşılamanın sistemik bağışık yanıtı uyarmada yetersiz kaldığı sonucuna varılmıştır.

F18 ve F32 ile başlangıçta subkütan, 21. günde intranazal olmak üzere toplam iki kez aşıl原因an hayvanlarda, PBS içinde DT'nin uygulandığı kontrol grubuna (IV. grup) kıyasla yüksek IgG yanıtları oluşmuştur. V nolu gruba uygulanan F18 ile VI nolu gruba uygulanan F32 kodlu formüllerin etkileri kendi aralarında kıyaslandığında, F32 ile bağışıklanan hayvanlarda daha yüksek bağışık yanıt elde edildiği belirlenmiştir. Bu yüksek yanıt kitosanın yüksek mukoadhezif gücü, in vitro salım profili ve hücreler arası bağlantıları açabilme yeteneğinin neden olduğu düşünülmektedir.

Formülleri kendi aralarında değerlendirdiğimizde, kontrol grubu olarak kullanılan pH 7,4 PBS içinde difteri toksoidinin kısa bir süre sonra serbest kaldığı ve enzimler tarafından parçalandığı, bu nedenle hem subkütan hem de intranazal verilişte düşük bağışık yanıt oluşturduğu sonucuna varılmıştır. Kitosan ve HPMC polimerini içeren formüllerin ise subkütan uygulandıktan sonra intranazal yoldan destek dozları verildiğinde, oluşturdukları sistemik bağışık yanıtların arttığı gösterilmiştir.

4.9.3. Hücre Kültüründe Antikor Nötralizasyon Testine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Kruskal-Wallis Çoklu Karşılaştırma Testi (Dunn Testi) ile formülasyonların 20. ve 42. günde oluşturdukları bağışık yanıtların istatistiksel açıdan farklılık gösterip göstermedikleri tayin edilmiştir. Bu amaçla serumlarda ölçülen antitoksin miktarları birbirleri ile karşılaştırılarak farklılıklar tespit edilmiş ve formülasyonların etkinlikleri kendi aralarında değerlendirilmiştir.

Kobaylara sadece nazal yolla toplam üç kez verilen F18, F32 formülasyonlarının veya kontrol grubunun (PBS içinde DT) oluşturduğu antitoksin titreleri arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Bu bilgilerden yola çıkılarak tek başına intranazal verilişin difteriye karşı koruma sağlayacak sistemik bağışık yanıtı oluşturmada yetersiz kaldığı sonucuna ulaşılmıştır.

En yüksek antitoksin titresi başlangıçta subkütan, 21. günde intranazal verilen F32 formülasyonu ile elde edilmiştir. F32 formülasyonun subkütan ve intranazal yoldan uygulandığı VI. gruptaki antitoksin miktarı, F32'nin tek başına intranazal verildiği III. gruba göre hem 20. günde hem de 42. günde anlamlı ölçüde yüksektir ($p<0,05$) (Şekil 3.19).

VI. gruptaki antitoksin titresindeki bu artışın, intranazal verilen destek aşından mı ya da başlangıçtaki subkütan aşılardan mı ileri geldiği araştırılmıştır (Şekil 3.20; Şekil 3.21; Şekil 3.22). Sonuçlar göstermiştir ki, antijenin in-sitü jel formülasyonunda parenteral doz ile birincil aşılamanın yapılması, ardından aşının destek doz olarak intranazal verilmesi hem sistemik hem de mukozal bölgelerde güçlü yanıtların eldesi için geçerli bir stratejidir. Intranazal aşılamanın destek doz (booster) etkisi ile ilgili bu bulgu literatürlerle paralellik göstermektedir (Westerink ve ark., 2002; Csaba ve ark., 2009).

Wilcoxon testi ile ise her bir formülasyonun kendi grubu içinde aşı öncesi, 20. gün ve 42. günde oluşturdukları bağışık yanıtların istatistiksel açıdan farklılık gösterip göstermedikleri tayin edilmiştir.

F18 formülasyonunun tüm veriliş yollarında aşı öncesi-20. gün, aşı öncesi-42. gün ve 20. gün-42. gün verileri arasında bu teste göre istatistiksel açıdan bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 3.23).

F32 kodlu formülasyonun başlangıçta subkütan, ardından güçlendirici olarak intranazal verilmesi sonrası kobaylarda zamana karşı oluşan bağışık yanıtlarda anlamlı farklılık olup olmadığı istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Sonuçlar göstermiştir ki F32 formülasyonu aşılama öncesinden 42. güne kadar kobayların antitoksin titrelerinde anlamlı bir artış meydana getirmiş ($p<0,05$) ve hayvanların difteri toksoidine karşı 42. günün sonunda kısmi koruma kazanmasını sağlamıştır. F32 formülasyonunun aşı öncesi-20. gün antitoksin titreleri arasında ise anlamlı fark bulunmamışken ($p>0,05$), 20. gün-42. gün arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Bu durumun nedeni ise sistemik antikor (IgG) oluşumunun uzun dönemde gerçekleşmesi ve antikorların 20. günden itibaren toksin üzerinde etkili olup yanıt oluşturmalarıdır (Şekil 3.24).

F32 kodlu formülasyonun yalnızca subkütan verilmesinde de aşı öncesi-42. gün ve 20. gün-42. gün verileri arasında anlamlı farklılıklar bulunması aşılama sonucu deney hayvanlarının difteriye karşı oluşan antikor titrelerinde değişim olduğunu göstermektedir ($p<0,05$) (Şekil 3.25). Bu durumda oluşan antitoksin titresi, başlangıçta subkütan, ardından güçlendirici olarak intranazal verilmesi sonrası oluşan yanıtla kıyasla düşük olmakla beraber hayvanların difteri toksoidine karşı 42. günün sonunda kısmi koruma kazanması sağlanmıştır.

Hem Kruskal-Wallis hem de Wilcoxon testi değerlendirildiğinde kitosan ile Poloksamer jelinin kombine kullanılmasının difteri toksoidi ile sistemik bağışık yanıtı artırdığı görülmüştür. %18 a/a Poloksamer 407 ile %10 a/a Poloksamer 188 karışımı, jelleşme özelliklerinden dolayı antijen için depo görevi görmek ve antijeni polimer ağından difüze olana kadar proteazlar tarafından parçalanmaktan korumaktadır. Kitosanın ise adjuvan özelliklerinden dolayı parenteral aşılamada yüksek yanıtlar verdiğini destekleyen literatür bilgileri mevcuttur (Coeshott ve ark., 2004). Kitosanın intranazal verilişteki etkisinin ise, HPMC'ye kıyasla daha iyi olan mukoadesif özellikleri sayesinde mukosilier klerensi önlemesi ve hücreler arası bağlantıları açarak absorpsiyonu artırmasından ileri geldiği düşünülmektedir (Kotze ve ark., 1998; Davis, 2006; Andrews ve ark., 2009).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında bulaşıcı bir üst solunum yolu enfeksiyonu olan difteriye karşı aktif bağışıklama sağlamada difteri toksoidi içeren ve intranazal verilen formülasyonların geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Difteri toksoidinin mukozada kalış süresinin uzatılması, terapötik etkinliğinin artırılması, kolay uygulanabilmesi ve hem mukozal hem de sistemik bağışık yanıt oluşturabilmesi amacıyla burun içine damlatılarak uygulanabilen in-sitü jel formülasyonları geliştirilmiştir. Poloksamer 407 ve Poloksamer 188 polimerlerinin kullanılarak formülasyonların burun sıcaklığına bağlı jelleşmeleri sağlanmış, mukoadhezif polimerlerden karbopol 934, HPMC, HPC veya kitosan ilavesi ile formüllerin mukozada uzun süre alıkonmaları hedeflenmiştir.

Ön formülasyon çalışmaları sonucu seçilen formüllerden F14, F17, F18, F19 ve F32 kodlu formüllerin difteri toksoidinin intranazal verilmesi için uygun oldukları, yapılan testlerle desteklenmiş ve bu formüller üzerinde stabilize çalışmaları yürütülmüştür.

In vivo çalışmalarda, reolojik özellikleri, difteri toksoidi salımları ve stabiliteleri diğer formüllere kıyasla daha üstün bulunan F18 ve F32 kodlu formüllerin oluşturacakları bağışık yanıtın tespit edilmesine karar verilmiştir.

Kobaylardan toplanan serumlardaki antitoksin titreleri, Vero hücrelerinin kullanıldığı antikor nötralizasyon testi ile tayin edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre F18 ve F32 kodlu formüllerin tek başlarına intranazal uygulanmalarının sistemik bağışık yanıtı oluşturmada yetersiz kaldıkları gösterilmiştir. Diğer bir taraftan başlangıçta subkütan, 21. günde intranazal verilen in-sitü jel

formülasyonlarının antitoksin titrelerinin destek dozuyla anlamlı ölçüde arttığı belirlenmiştir.

Poloksamer jelini ve kitosan (düşük molekül ağırlıklı) mukoadezif polimerini içeren in-sitü jel formülasyonlarının subkütan uygulamadan sonra intranazal verildiklerinde, oluşturdukları antitoksin titrelerine bakıldığında Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği aralıklara göre kısmen koruma sağlayacakları ve belirli dönemlerde destek aşılama yapılması gerektiği görülmüştür (Çizelge 1.4). Bu nedenle bu formülün oluşturacağı bağışık yanıtı artırma üzerine çalışmaların sürdürülmesine ve hazırlanan in-sitü jellerin kobaylarda oluşturdukları mukozal bağışık yanıtların (salgısal Ig A antikor oluşumu) ELISA ile tespitine karar verilmiştir.

ÖZET

Difteri Toksoidi İçeren In-sitü Jel Yapısındaki Adjuvan Formülasyonlarının Geliştirilmesi, In vitro ve In vivo Değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında model etkin madde olarak difteri toksoidini içeren in-sitü jel formülasyonlarının hazırlanması ve intranazal uygulanmalarına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Mukozal aşılama ile amaç hem sistemik hem de mukozal bağışık yanıtları uyarabilmektir.

In-sitü jel formülasyonları, sıcaklığa bağlı olarak jelleşen Poloksamer 407 ile Poloksamer 188 polimer karışımlarının ve mukoadezif polimerlerden karbopol 934, hidroksipropil metil selüloz, hidroksipropil selüloz veya kitosanın farklı oranlarda kullanılmalarıyla hazırlanmıştır.

Ön formülasyon çalışmalarının ardından burun sıcaklığına uygun sıcaklıkta ve sürede jelleşen F14, F17, F18, F19, F20, F21 ve F32 formülleri üzerinde daha kapsamlı çalışmalar yürütülmüştür. Bu amaçla formüllerin organoleptik özellikleri belirlenmiş, pH'ları ve mukoadezif güçleri ölçülmüş ve reolojik davranışları incelenmiştir.

Formülasyonların optimizasyonunun sağlanmasının ardından hesaplı miktarda difteri toksoidi formüllere ilave edilerek difteri toksoidi miktar tayini ve in vitro salım çalışmaları yapılmıştır. Bu formüllerden F20 ve F21'in difteri toksoidi salım hızları istenildiği gibi olmadığından stabilite çalışmalarına yalnızca F14, F17, F18, F19 ve F32 kodlu formüller üzerinden devam edilmiştir.

In vitro test ve stabilite sonuçları dikkate alındığında F18 ve F32 kodlu formüllerin diğer formüllere kıyasla daha üstün oldukları bulunmuştur. Bu nedenle bu formüllerin intranazal ve subkütan uygulama sonrası oluşturacakları bağışık yanıt kobaylarda incelenmiştir. ELISA testi ile okunan absorbans değerleri ve Vero hücrelerinin kullanıldığı antikor nötralizasyon testine göre F18 ve F32 kodlu formüllerin intranazal aşılama ile yeterli sistemik bağışık yanıtı uyaramadıkları, buna karşılık subkütan uygulamadan sonra destek doz olarak intranazal verilen F32'nin antikor nötralizasyon titrelerini anlamlı ölçüde yükselttiği görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: In-sitü jel formülasyonları, Poloksamer, Difteri toksoidi, Intranazal, Bağışıklık

SUMMARY

The Development and In vitro, In vivo Evaluation of the Adjuvant Formulations in the In-situ Gel Structure Containing Diphtheria Toxoid

Studies on preparation of in situ gel formulations containing diphtheria toxoid as the model active substance and their intranasal administration have been conducted in this thesis study. The objective of mucosal vaccination is to stimulate both systemic and mucosal immune responses.

In situ gel formulations were prepared by using, in different ratios, mixtures of Poloxamer 407 and Poloxamer 188 polymers, which gelate in a temperature-dependent manner, and mucoadhesive polymers carbopol 934, hydroxypropyl methyl cellulose, hydroxypropyl cellulose or chitosan.

Following pre-formulation studies, F14, F17, F18, F19, F20, F21 and F32 formulations, which gelate at intervals and temperatures in accordance with nasal temperatures, were subjected to more comprehensive studies. For this purpose, organoleptic characteristics of the formulations were identified, their pH and mucoadhesive potencies were measured and rheological behaviors were characterized.

Calculated amounts of diphtheria toxoid were added to formulations after optimization of formulations was achieved, and assay and in vitro release studies were carried out. Because diphtheria toxoid release from formulations F20 and F21 were not consistent with the intended rates, only formulations coded F14, F17, F18, F19 and F32 were included in stability studies.

Formulations coded F18 and F32 were considered to be superior to other formulations given the in vitro test and stability results. Therefore, these formulations were tested in guinea pigs to determine immune responses they would produce following intranasal and subcutaneous administration. Absorbance values of ELISA tests and antibody neutralization test showed that formulations coded F18 and F32 were unable to stimulate adequate systemic immune response with intranasal vaccination, whereas F32 resulted in significantly increased neutralizing antibody titers with intranasal administration as a booster dose following subcutaneous administration.

Key Words: In situ gel formulations, Poloxamer, Diphtheria toxoid, Intranasal, Immunity

KAYNAKLAR

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. (2000). Cellular and Molecular Immunology (4th Ed). Pennsylvania: W. B. Saunders Company
- ADA, G. L. (1991). The ideal vaccine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **7**: 105-109
- AGGERBECK, H., GIZURARSON, S., HEON, I., WANTZIN, J. (1997). Intranasal booster vaccination against diphtheria and tetanus in man. *Vaccine*, **15(3)**: 307-316
- AGNIHOTRI, A. S., AMINABHAVI, T.M., MALLIKARJUNA, N. N. (2004). Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **100**: 5-28
- AGUILA, A., DONACHIE, A. M., McSHARRY, C. P., MOWAT, A. Mcl., PEYRE, M., SESARDIC, D. (2006). Induction of protective and mucosal immunity against diphtheria by a immune stimulating complex (ISCOMS) based vaccine. *Vaccine*, **24**: 5201-5210
- AGUILAR, J. C., RODRIGUEZ, E. G. (2007). Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*, **25**: 3752-3762
- ALĞIN, E., BAYKARA, T. (2005). *In Situ Oluşan Enjektabl Biyoparçalanabilir İmplant Sistemler*. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, **34(4)**: 287-313
- ALPAR, R. (2006). Parametrik ve Parametrik Olmayan Hipotez Testleri. In: *Spor Bilimlerinde Uygulamalı İstatistik*. Ankara: Nobel Basımevi, p.: 130-130-180
- ALPAR, H. O., EYLES, J. E., SOMAVARAPU, S., WILLIAMSON, E. D. (2001). Intranasal vaccination against plague, tetanus and. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **51**: 173-201
- ALPAR, H. O., ATUAH, K. N., BRAMWELL, V. W., SOMAVARAPU, S. (2005). Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **57**: 411-430
- ALTAŞ, K. (1998). Aşılamanın ve Pasif Bağışıklamanın İmmunolojik Temelleri. In: *Çocuk ve Erişkinde Bağışıklama*, Ed.: Lale Sever. İstanbul: Deonta Güncel Tıp Yayınları, s.: 9-15

- AMIDI, M., BORCHARD, G., HENNINK, W. E., JISKOOT, W., JUNGINGER, H. E., ROMEIJN, S. G. (2006). Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *Journal of Controlled Release*, **111**: 107–116
- AMON, R., BEN-YEDIDIA, T. (2003). Old and new vaccine approaches. *International Immunopharmacology*, **3**: 1195-1204
- ANDREWS, G. P., JONES, D. S., LAVERTY, T. P. (2009). Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **71**: 505–518
- ARORA, P., GARG, S., SHARMA, S. (2002). Permeability issues in nasal drug delivery. *Drug Discovery Today*, **7(18)**: 967-975
- AYDINLI, A. (1995). Göze Uygulanan Jel Preparatlarının Formülasyonu Üzerine Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, s: 65-66
- BACA-ESTRADA, M. E., BABIUK, L. A., FOLDVARI, M., GRIEBEL, P., HARDING, K., KOURNIKAKIS, B., SNIDER, M. (2000). Intranasal immunization with liposome-formulated *Yersinia pestis* vaccine enhances mucosal immune responses. *Vaccine*, **18**: 2203-2211
- BACON, A., CHATFIELDS, S., HINCHCLIFFE, M., ILLUM, L., JABBAL-GILL, I., MAKIN, J., ROBERTS, M., SIZER, P. J. (2000). Carbohydrate Biopolymers Enhance Antibody Responses to Mucosally Delivered Vaccine Antigens. *Infection and Immunity*, **68(10)**: 5764-5770
- BALDRIDGE, J. R., ULRICH, J. T., WARD, J. R., YORGENSEN, Y. (2000). Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration. *Vaccine*, **18**: 2416-2425
- BARICHELO, J. M., MORISHITA, M., NAGAI, T., TAKAYAMA, K. (1999). Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, **184**: 189–198
- BAŞTÜRK, B., BOYACIOĞLU, S. Mukozal İmmün Sistem: GALT, NALT ve BALT. Güncel Gastroenteroloji, **9(2)**: 120-125
- BELLAMY, R., FREEDMAN, A. (2005). Immunization. *Medicine*, **33(3)**: 17-21
- BERTRAM, U., BODMEIER, R. (2006). In situ gelling, bioadhesive nasal inserts for extended drug delivery: In vitro characterization of a new nasal dosage form. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **27**: 62-71

- BEYAZOVA, U., AKTAŞ, F. (2007). Çocukluk Çağı Aşılamaları ve Erişkin Bağışıklaması. *Gazi Tıp Dergisi*, **18(2)**: 47-65
- BİLENSOY, E., HINCAL, A. A., ROUF, M. A., ŞEN, M., VURAL, İ. (2006a). Mucoadhesive, Thermosensitive, Prolonged-Release Vaginal Gel for Clotrimazole: β -Cyclodextrin Complex. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **7(2)**: E1-E7
- BİLENSOY, E., HINCAL, A. A., ROUF, M. A., VURAL, İ. (2006b). Thermosensitive vaginal gel formulation for the controlled release of clotrimazole via complexation to beta-cyclodextrin. *Journal of Controlled Release*, **116(2)**: e107-e109
- BİLENSOY, E., ÇALIŞ, S., ÇIRPANLI, Y., DOĞAN, A.L., ŞEN, M. (2007). Thermosensitive mucoadhesive gel formulation loaded with 5-FU:cyclodextrin complex for HPV-induced cervical cancer. *J. Inclus. Phenom. Macroc. Chem.*, **57(1-4)**: 363-370
- BOCHOT, A. COUVREUR, P. FATTAL, E., GROSSIORD, J. L., PUISIEUX, F. (1998). Characterization of a new ocular delivery system based on a dispersion of liposomes in a thermosensitive gel. *International Journal of Pharmaceutics*, **162**: 119-127
- BOLLAG, D. M., ROZYCKI, M. D., EDELSTEIN, S. J. (1996). Gel Electrophoresis under Denaturing Conditions. In: *Protein Methods* (2nd Ed.). New York: Wiley-Liss Inc., p.: 116-172
- 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)**: 157-164
- BOZKIR, A., HAYTA, G., SAKA, O. M. (2004). Comparison of biodegradable nanoparticles and multiple emulsions (water-in-oil-in-water) containing influenza virus antigen on the *in vivo* immune response in rats. *Pharmazie*, **59**: 723-725
- BOZKIR, A., YÜKSEL, N., KARATAŞ, A., GÖNÜL, N., HASÇİÇEK, C., ÖZDEMİR, N., CANEFE, K., BAYKARA, T., KILIÇARSLAN, M., KILINÇŞEN, T., TARIMCI, N., ÇOMOĞLU, T. (2007). *Farmasötik Teknoloji*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi
- CAMCIOĞLU, Y. (2008). Aşılamının İmmünolojisi. *Çocuk Enf. Derg.*, **2(1)**: 25-30
- CAMERON, C., CROWCROFT, N., POWER, D., WHITE, J. (2007). Diphtheria boosters for adults: Balancing risks. *Travel Medicine and Infectious Disease*, **5**: 35-39

- CAO, S-L., CHEN, E., CHEN, J., JIANG, X-G., LIU, L-C., REN, X-W., XU, F., ZHANG, Q-Z. (2009). In situ gel based on gellan gum as new carrier for nasal administration of mometasone furoate. *International Journal of Pharmaceutics*, **365**: 109-115
- CHAKAVARTI, B., CHAKAVARTI, D. (2008). Electrophoretic separation of proteins. *Journal of Visualized Experiments*, **12(16)**: 1
- CHARRUEAU, C., ASTRE, V., CHAUMEIL, J-C., GROSSIORD, J-L., TULEU, C. (2001). Poloxamer 407 as a Thermogelling and Adhesive Polymer for Rectal Administration of Short-Chain Fatty Acids. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **27(4)**: 351-357
- CHIEN, Y. W., CHANG, S., SU, K.S.E. (1989). Nasal systemic drug delivery. In: *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. New York: Marcel Dekker, Chapter 1
- CH'NG, H. S., KELLY, P., PARK, H., ROBINSON, J. R. (1985). Bioadhesive Polymers as Platforms for Oral Controlled Drug Delivery II: Synthesis and Evaluation of Some Swelling, Water-Insoluble Bioadhesive polymers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **74(4)**: 399-409
- CHO, C-W., SHIN, S-C., OH, I-J. (1997). Thermorheologic Properties of Aqueous Solutions and Gels of Poloxamer 407. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **23(12)**: 1227-1232
- CHOI, H-G., JUNG, J-H., KIM, C-K., OH, Y-K., RYU, J-M., YOON, S-J. (1998). Development of in situ-gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository. *International Journal of Pharmaceutics*, **165**: 33-44
- COESHOTT, C. M., BLONDER, J. M., ROSENTHAL, G. J., SAMANIEGO, A., SMITHSON, S. L., VERDERBER, E., WESTERINK, M. A. J. (2004). Pluronic® F127-based systemic vaccine delivery systems. *Vaccine*, **22**: 2396-2405
- CRIPPS, A. W., FOXWELL, A. R., JENNELLE, M. K. (2001). Vaccines and mucosal immunisation. *Vaccine*, **19**: 2513-2515
- CSABA, N., ALONSO, M. J., GARCIA-FUENTES, M. (2009). Nanoparticles for nasal vaccination. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **61**: 140-157
- DAVIS, S. S. (2006). The use of soluble polymers and polymer microparticles to provide improved vaccine responses after parenteral and mucosal delivery. *Vaccine*, **24(2)**: 7-10
- DAVIS, S. S. (2001). Nasal vaccines. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **51**: 21-42

- DE MAGISTRIS, M. T. (2006). Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **58**: 52-67
- DEVİRİM, B., BOZKIR, A., CANEFE, K. (2007). Preparation and Evaluation of Surface-Modified PLGA Microparticles with Chitosan for Pulmonary Delivery of Proteins. *Advances in Chitin Science*, **10**: 349-354
- DIETRICH, G., GRIOT-WENK, M., LANG, A.B., METCALFE, I. C., VIRET, J-F. (2003). Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine*, **21**: 678-683
- DITTMANN, S. (2004). Vaccines. In: *Side Effects of Drugs Annual 26*, Ed.: J. K. Aronson. Elsevier Science, Chapter 32
- DIWAN, M., KHAR, R. K., MISRA, A., TALWAR, G. P. (1997). Long-term high immune response to diphtheria toxoid in rodents with diphtheria toxoid conjugated to dextran as a single contact point delivery system. *Vaccine*, **15(17/18)**: 1867-1871
- DONNELLY, J. J., LIU, M. A., ULMER, J. B., SHIVER, J. W. (1997). DNA Vaccines. *Annu. Rev. Immunol*, **15**: 617-648
- DUMAN, S. S., ŞENEL, S. (2004). Kitosan ve Veteriner Alandaki Uygulamaları. *Veteriner Cerrahi Dergisi*, **10(3-4)**: 67-72
- EDELMAN, R. (2000). An overview of adjuvant use. In: *Vaccine adjuvants, Preparation Methods and Research Protocols*, Ed.: Derek T. O'Hagan. Totowa, New Jersey: Humana Pres, p.: 1-27
- EL-KAMEL, A., EL-KHATIP, M. (2006). Thermally Reversible In Situ Gelling Carbamazepine Liquid Suppository. *Drug Delivery*, **13**: 143-148
- ESCOBAR-CHAVEZ, J. J., GANEM-QUINTANAR, A., LOPEZ-CERVANTES, M., KALIA, Y. N., NAIK, A., QUINTANAR-GUERRERO, D. (2006). Applications of thermoreversible Pluronic F-127 Gels in Pharmaceutical Formulations. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **9(3)**: 339-358
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA ONLINE. (2009). Monographs: Poloxamers
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA ONLINE. (2009). Assay of diphtheria vaccine (adsorbed), p.: 217-222
- FELT, O., BURI, P., GURNY, R. (1998). Chitosan: A Unique Polysaccharide for Drug Delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **24(11)**: 979-993
- GIUDICE, G. D., PIZZA, M., RAPPUOLI, R. (1999). Mucosal delivery of vaccines. *Methods*, **19**: 148-155

- GIUDICE, E. L., CAMPBELL, J. D. (2006). Needle-free vaccine delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **58**: 68-69
- GUPTA, P., GARS, S., VERMANI, K. (2002). Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discovery Today*, **7(10)**: 569-579
- HAN, I-K., CHO, H. J., JUNG, W-W., KANG, H-S., KIM, Y. B., OH, Y-K., SUL, D. (2006). Thermosensitive and mucoadhesive delivery systems of mucosal vaccines. *Methods*, **38**: 106-111
- HARPER, S. A., BRIDGES, C. B., COX, N. J., FUKUDA, K. (2003). Using Live, Attenuated Influenza Vaccine for Prevention and Control of Influenza: Supplemental Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recommendations and Reports*, **52**: 1-8
- HASÇIÇEK, C., ERK, N., GÖNÜL, N. (2003). Mucoadhesive microspheres containing gentamicin sulfate for nasal administration: preparation and in vitro characterization. *Il Farmaco*, **58**: 11-16
- HOLMGREN, J., CZERKINSKY, C., ERIKSSON, K., MHARANDI, A. (2003). Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine*, **21(2)**: 89-95
- HU, K., LÖVGREN-BENGTSSON, K., MOREIN, B. (2001). Immunostimulating complexes (ISCOMs) for nasal vaccination. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **51**: 149-159
- ICH Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, November 2005
- ILLUM, L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research*, **15(9)**: 1326-1331
- ILLUM, L. (2002). Nasal drug delivery: new developments and strategies. *Drug Discovery Today*, **7(23)**: 1184-1189
- ILLUM, L. (2003). Nasal drug delivery-possibilities, problems and solutions. *Journal of Controlled Release*, **87**: 187-198
- ILLUM, L. (2007). Nanoparticulate Systems for Nasal Delivery of Drugs: A Real Improvement over Simple Systems? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **96(3)**: 473-483
- ILLUM, L., DAVIS, S. S. (2001). Nasal vaccination: a non-invasive vaccine delivery method that holds great promise for the future. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **51**: 1-3

- ILLUM, L., DAVIS, S. S., FISHER, A. N., HINCHCLIFFE, M., JABBAL-GILL, I. (2001). Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **51**: 81-96
- ISAKA, M., GOTO, N., KOMIYA, T., KOZUKA, S., MAEYAMA, J-ichi, MATANO, K., OHKUMA, K., TANIGUCHI, T., TOCHIKUBO, K., YASUDA, Y. (2000). Induction of systemic and mucosal antibody responses in mice immunized intranasally with aluminium-non-adsorbed diphtheria toxoid together with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine*, **18**: 743-751
- ISSA, M. M., ARTURSSON, P., KÖPING-HÖGGARD, M. (2005). Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs. *Drug Discovery Today: Technologies*, **2(1)**: 1-6
- JAIN, A., SANGHVI, T., YALKOWSKY, S. H. (2003). Liposome Formulation of NSC-639829 Using Halothane as a Solvent: A Technical Note. *AAPS PharmSciTech*, **4(4)**: 413-417
- JISKOOT, W., BEUVERY, E.C., KERSTEN, G.F.A. (1997). Vaccines. In: *Pharmaceutical Biotechnology*, Ed.: J. A. Crommelin, R. D. Sindelar. UK: Harwood Academic Publishers, p.: 255-278
- JOHANSEN, P., GANDER, B., MERKLE, H. P. (1998). Physico-chemical and antigenic properties of tetanus and diphtheria toxoids and steps towards improved stability. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1425**: 425-436
- JONES, N. (2001). The nose and paranasal sinuses physiology and anatomy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **51**: 5–19
- JUNG, T., BREITENBACH, A., HUNGERER, K., HUNDT, E., KAMM, W., KISSEL, T. (2001). Tetanus Toxoid Loaded Nanoparticles from Sulfobutylated Poly(Vinyl Alcohol)-Graft-Poly (Lactide-co-Glycolide): Evaluation of Antibody Response After Oral and Nasal Application in Mice. *Pharmaceutical Research*, **18(3)**: 352-360
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. (2006). Solunum Sistemi. In: *Temel Histoloji, Çeviri Ed.: Y. Aytekin, S. Solakoğlu*, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, s.: 349-354
- KABANOV, A. V., ALAKHOV, V. Y., BATRAKOVA, E. V. (2002). Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J. Controll. Rel.*, **82**:189-212
- KANG, M. L., CHO, C-S., GUO, D. D., JIANG, H-L., KANG, S. G., LEE, D. Y., YOO, H. S. (2007). Pluronic® F127 enhances the effect as an adjuvant of chitosan microspheres in the intranasal delivery of *Bordetella bronchiseptica* antigens containing dermonecrotin. *Vaccine*, **25**: 4602-4610

- KARA, A. (2008). Genel İmmünizasyon Prensipleri. *Çocuk Enf. Derg.*, **2(1)**: 3-14
- KATAKAM, M., BANGA, A. K. (1997). Use of Poloxamer Polymers to Stabilize Recombinant Human Growth Hormone Against Various Processing Stresses. *Pharmaceutical Development and Technology*, **2(2)**: 143-149
- KAUL, D., OGRA, PL. (1998). Mucosal responses to parenteral and mucosal vaccines. *Dev. Biol. Stand.*, **95**: 141-146
- KAYA, A. (2002). Elektroforez Yöntemleri. *Dicle Tıp Dergisi*, **29(3)**: 57-63
- KENSIL, C. R., MO, A. X., TRUNEH, A. (2004). Current vaccine Adjuvants: An overview of a diverse class. *Frontiers in Bioscience*, **9**: 2972-2988
- KERSTEN, G. F. A., CROMMELIN, D. J. A. (2003). Liposomes and ISCOMs. *Vaccine*, **21**: 915-920
- KESER, M., HATİPOĞLU, N. (2008). Bağışıklık Antijenleri ve Aşı İçeriği. *Çocuk Enf. Derg.*, **2(1)**: 15-24
- KLEGERMAN, M. E. (1992). Vaccines. In: *Pharmaceutical Biotechnology: fundamentals and essentials*. Interpharm Press, p.: 64-76
- KOTZE, A. F., de BOER, A. G., JUNGINGER, H.E., LUEBEN, H. L., VERHOEF, J. C. (1998). Chitosan for enhanced intestinal permeability: Prospects for derivatives soluble in neutral and basic environments. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **7**:145-151
- KUMAR, S., HIMMELSTEIN, K. J. (1995). Modification of In Situ Gelling Behaviour of Carbopol Solutions by Hydroxypropyl Methylcellulose. *J. Pharm. Sci.*, **84**: 344-348
- LANG, J. C., CHOWHAN, M. A., JANI, R., MISSEL, P. J., RODEHEAVER, D. P., ROEHRS, R. E. (2002). *Modern Pharmaceutics 4th Edition*. New York: Marcel Dekker, Chapter 13
- LIN, H-R., SUNG, K. C. (2000). Carbopol/pluronic phase change solutions for ophthalmic drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **69**: 379-388
- MAJITHIYA, R. J., GHOSH, P. K., MURTHY, R. S. R., UMRETHIA, M. L. (2006). Thermoreversible-mucoadhesive Gel for Nasal Delivery of Sumatriptan. *AAPS PharmSciTech.*, **7(3)**: E1-E6
- MARCIANI, D. J. (2003). Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discovery Today*, **8(20)**: 934-943

- MATSCHKE, C., FAHR, A., ISELE, U., van HOOGEVEST, P. (2002). Sustained-release injectables formed in situ and their potential use for veterinary products. *J. Controll. Rel.*, **85**: 1-15
- MATTHIAS, D. M., GARRISON, M. M., NELSON, C., NEWLAND, S., ROBERTSON, J. (2007). Freezing temperatures in the vaccine cold chain: A systematic literature review. *Vaccine*, **25**: 3980-3986
- MAYOL, L., AMBROSIO, L., BORZACCHIELLO, A., La ROTONDA, M. I. (2008). A novel poloxamers/hyaluronic acid in situ forming hydrogel for drug delivery: Rheological, mucoadhesive and in vitro release properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **70**: 199-206
- McNEELA, E. A., MILLS, K. H. G. (2001). Manipulating the immune system: humoral versus cell-mediated immunity. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **51**: 43-54
- McNEELA, E. A., DAVIS, S. S., ILLUM, L., JABBAL-GILL, I., MILLS, K. H. G., O'CONNOR, D., PEPPOLONI, S., PIZZA, M., RAPPUOLI, R. (2001). A mucosal vaccine against diphtheria: formulation of cross reacting material (CRM₁₉₇) of diphtheria toxin with chitosan enhances local and systemic antibody and Th2 responses following nasal delivery. *Vaccine*, **19**: 1188-1198
- MESTECKY, J., COMPANS, R. W., MICHALEK, S. M., MOLDOVEANU, Z., MORROW, C. D., RUSSELL, M.W., SCHAFER, D. P. (1997). Current options for vaccine delivery systems by mucosal routes. *Journal of Controlled Release*, **48**: 243-257
- METZ, B., CROMMELIN, D. J. A., HENNINK, W. E., JISKOOT, W., KERSTEN, G. F. A. (2003). Physicochemical and immunochemical techniques predict the quality of diphtheria toxoid vaccines. *Vaccine*, **22**: 156-167
- METZ, B., CROMMELIN, D. J. A., HENNINK, W. E., JISKOOT, W., KERSTEN, G. F. A., KINGMA, R., MEKKES, D. (2007). Quality control of routine, experimental and real-time aged diphtheria toxoids by in vitro analytical techniques. *Vaccine*, **25**: 6863-6871
- MIELCAREK, N., ALONSO, S., LOCHT, C. (2001). Nasal vaccination using live bacterial vectors. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **51**: 55-69
- MITRA, R., CHU, W. A., MITRA, A. K., PEZRON, I. (2000). Lipid emulsions as vehicles for enhanced nasal delivery of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, **205**: 127-134
- MOEBUS, K., BODMEIER, R., STEPMANN, J. (2009). Alginate–poloxamer microparticles for controlled drug delivery to mucosal tissue. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **72**: 42-53

- MYGIND, N., DAHL, R. (1998). Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **29**: 3-12
- NAGLER-ANDERSON, C. (2001). Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nature Reviews Immunology*, **18**: 59-67, Abstract
- NANDI, R., BHATTACHARJEE, A. K., DE, M., PURKAYASTHA, P. (2003). Diphtheria-the patch remains. *International Congress Series*, **1254**: 391-397
- NANJAWADE, B. K., MANJAPPA, A. S., MANVI, F. V. (2007). In situ-forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **122**:119-134
- NEUTRA, M. R., KOZLOWSKI, P. A. (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat. Rev. Immunol.*, **6**: 148-158
- OGRA, P. L., FADEN, H., WELLIVER, R. C. (2001). Vaccination Strategies for Mucosal Immune Responses. *Clinical Microbiology Reviews*, **14(2)**: 430-445
- OH, Y-K., KIM, C-K., PARK, J-S., YOON, H. (2003). Enhanced mucosal and systemic immune responses to a vaginal vaccine coadministered with RANTES-expressing plasmid DNA using in situ-gelling mucoadhesive delivery system. *Vaccine*, **21**: 1980-1988
- O'HAGAN, D. T. Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines. (1998). *Advanced Drug Delivery Reviews*, **34**: 305-320
- OUNGBHO, K., MÜLLER, B. W. (1997). Chitosan sponges as sustained release drug carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, **156**: 229-237
- ÖNER, F. (2006). Aşılar. *TÜFTAD Haberler*, **13(2)**: 18-22
- ÖNER, F., ERATALAY, A. (2001). Aşılar ve Adjuvanları. *FABAD J. Pharm. Sci.*, **25**: 21-33
- ÖZCENGİZ, E., AKKUŞ, M., HACİÖMEROĞLU, M., TARHAN, G. (1998). Difteri Toksininin Hızlı Saflaştırılması. *Mikrobiyol. Bült.*, **32**: 123-130
- PACKHAEUSER, C. B., KISSEL, T., OSTER, C. G., SCHNIEDERS, J. (2004). In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview. *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, **58**: 445-455
- PARK, J-S., KIM, C-K., KIM, J. M., OH, Y-K., YOON, H. (2001). In situ gelling and mucoadhesive polymer vehicles for controlled intranasal delivery of plasmid DNA. *J. Biomed. Mater. Res.*, **59(1)**: 144-151

- PEEK, L. J., BERKLAND, C., MIDDAUGH, C. R. (2008). Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **60**: 915-928
- PISAL, S. S., KADAM, S. S., MAHADIK, K. R., PARADKAR, A. R. (2004). Pluronic gels for nasal delivery of Vitamin B12. Part I: Preformulation study. *International Journal of Pharmaceutics*, **270**: 37-45
- PLOTKIN, S. A. (2005). Vaccines: past, present and future. *Nature Medicine*, **11**: 5-11
- PRENETA-BLANC, R., BIERLEY, M., RIGSBY, B., SESARDIC, D., TIERNEY, R., WILHELMSSEN, E. S. (2008). Calibration of replacement international standards of diphtheria and tetanus toxoids for use in flocculation test. *Biologicals*, **36**: 315-326
- QING, H., BELL, S. J. D., JOHNSON, S. L., MITCHELL, A. R., MORCOL, T., WAGNER-BARTAK, C. (2000). Calcium Phosphate Nanoparticle Adjuvant. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **7(6)**: 899-903
- READ, R. C., BOND, J., FISHER, A., ILLUM, L., JABBAL- GILL, I., JENNINGS, R., NAYLOR, S. C., POTTER, C. W. (2005). Effective nasal influenza vaccine delivery using chitosan. *Vaccine*, **23**: 4367-4374
- RIEDEL, S. (2005). Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc. (Bayl Univ Med. Cent.)*, **18(1)**: 21-25
- RICCI, E. J., LUNARDI, L. O., MARCHETTI, J. M., NANCLARES, D. M. A. (2005). Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. *International Journal of Pharmaceutics*, **288**: 235-244
- ROQUES, C., FATTAL, E., FISZMAN, FROMES, Y., SALMON, A. (2007). Intrapericardial administration of novel DNA formulations based on thermosensitive Poloxamer 407 gel. *International Journal of Pharmaceutics*, **331**: 220-223
- RYAN, E. J., DALY, L. M., MILLS, K. H. G. (2001). Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends in Biotechnology*, **19(8)**: 293-304
- RYU, J-M., CHUNG, S-J., KIM, C-K., LEE, M-H., SHIM, C-K. (1999). Increased bioavailability of propranolol in rats by retaining thermally gelling liquid suppositories in the rectum. *J. Controll. Rel.*, **59**: 163-172
- SAATÇI, F., BOZKIR, A. (2003). Aşıların nazal yoldan uygulanışı. *J. Fac. Pharm.*, **32(3)**: 175-193

- SAETTONE, M. F., BURGALASSI, S., CHETONI, P., GIANNACCINI, B., TORACCA, M. T. (1989). Evaluation of muco-adhesive properties and in vivo activity of ophthalmic vehicles based on hyaluronic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, **51**: 203-212
- SAYIN, B., ALPAR, H. O., LI, X. W., SOMAVARAPU, S., ŞENEL, S. (2007). A New Vaccine Delivery System With Chitosan Derivative for Intranasal Immunisation: In Vitro/In Vivo Evaluations. *Advances in Chitin Science*, **X**: 219-224
- SAYIN, B., ALPAR, H. O., LI, X. W., SESARDIC, D., SOMAVARAPU, S., ŞENEL, S., THANOU, M. (2008). Mono-*N*-carboxymethyl chitosan (MCC) and *N*-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles for non-invasive vaccine delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **363**: 139-148
- SCHIPPER, N. G. M., MERKUS, F. W. H. M., VERHOEF, J. C. (1991). The Nasal Mucociliary Clearance: Relevance to Nasal Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*, **8(7)**: 807-814
- SEZGIN, Z., BAYKARA, T., YUKSEL, N. (2007). Investigation of pluronic and PEG-PE micelles as carriers of meso-tetraphenyl porphine for oral administration. *International Journal of Pharmaceutics*, **332**: 161-167
- SHAHIWALA, A., AMIJI, M. M., VYAS, T. K. (2007). Nanocarriers for Systemic and Mucosal Vaccine Delivery. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, **1**: 1-9
- SHARMA, S., BENSON, H. A. E., CHEN, Y., MUKKUR, T. K. S. (2009). Pharmaceutical Aspects of Intranasal Delivery of Vaccines Using Particulate Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **98(3)**: 812-843
- SINGH, J., ALPAR, H. O., BRAMWELL, V. W., PANDIT, S. (2006). Diphtheria toxoid loaded poly-(ϵ -caprolactone) nanoparticles as mucosal vaccine delivery systems. *Methods*, **38**: 96-105
- SLÜTTER, B., HAGENAARS, N., JISKOOT, W. (2008). Rational design of nasal vaccines. *Journal of Drug Targeting*, **16(1)**: 1-17
- SMITH, P. K., FUJIMOTO, E. K., GARTNER, G. T., GOEKE, N. M., HERMANSON, G. T., KLENK, D. C., KROWN, R. I., OLSON, B. J., PROVENZANO, M. D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150(1)**: 76-85
- SOANE, R. J., DAVIS, S. S., JONES, N. S., FRIER, M., ILLUM, L., PERKINS, A. C. (1999). Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive. *International Journal of Pharmaceutics*, **178**: 55-65

- SOMAVARAPU, S., ALPAR, O. H., BANDERA, M., GRADASSI, G., PANDIT, S., RAVICHANDRAN, E. (2005). Effect of Vitamin E TPGS on immune response to nasally delivered diphtheria toxoid loaded poly(caprolactone) microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, **298**: 344-347
- SPIERS, I. D., ALPAR, H. O., BOZKIR, A., EYLES, J. E., MILLER, J., WILLIAMSON, E. D. (1999). Studies on the Co-encapsulation, Release and Integrity of Two Subunit Antigens: rV and rF1 from *Yersinia pestis*. *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**: 991-997
- SRIVIDYA, B., AMIN, P. D., CARDOZA, R. M. (2001). Sustained ophthalmic delivery of ofloxacin from a pH triggered in situ gelling system. *Journal of Controlled Release*, **73**: 205-211
- ŞENEL, S., McCLURE, S. J. (2004). Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **56**: 1467-1480
- ŞENSOY, G., BELET, N. (2008). Aşı Soğuk Zinciri ve Aşı Kayıtları. *Çocuk Enf. Derg.*, **2(1)**: 36-55
- TABAK, F. (1998). Erişkin Yaş Döneminde Aşılama. In: *Çocuk ve Erişkinde Bağışıklama*, Ed.: Lale Sever. İstanbul: Deonta Güncel Tıp Yayınları, s.: 33-45
- TALASAZ, A. H. H., ATYABI, F., DINARVAND, R., GHAREMANKHANI, A. A., MALEKSHAHI, M. R., MOGHADAM, S. H. (2008). In Situ Gel Forming Systems of Poloxamer 407 and Hydroxypropyl Cellulose or Hydroxypropyl Methyl Cellulose Mixtures for Controlled Delivery of Vancomycin, *J. Appl. Polym. Sci.*, **109**: 2369-2374
- THE HANDBOOK of PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS ONLINE. (2006). Monographs: Carbomer, Poloxamer.
- TÜRKER, S., ONUR, E., ÖZER, Y. (2004). Nasal route and drug delivery systems. *Pharm. World Sci.*, **26**: 137-142
- UGWOKE, M. I., AGU, R. U., KINGET, R., VERBEKE, N. (2005). Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **57**: 1640-1665
- USP 31 and NF 26, Supplement 2. (2009). Pharmaceutical Dosage Forms, USA: United States Pharmacopoeial Convention, Inc., p: 615
- VAJDY, M., O'HAGAN, D. T. (2001). Microparticles for intranasal immunization. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **51**: 127-141

- VAJDY, M., DONNELLY, J., O'HAGAN, D., POLO, J., SINGH, M., SRIVASTAVA, I. (2004). Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA-based vaccines. *Immunology and Cell Biology*, **82**: 617-627
- van der LUBBEN, I. M., BORCHARD, G., JUNGINGER, H. E., VERHOEF, J. C. (2001). Chitosan for mucosal vaccination. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **52**: 139-144
- VARSHOSAZ, J., HEIDARI, A., SADRAI, H. (2006). Nasal Delivery of Insulin Using Bioadhesive Chitosan Gels. *Drug Delivery*, **13**: 31-38
- VILA, A., ALONSO, M. J., BEHRENS, I., JANES, K., JATO, J. L. V., KISSEL, T., SANCHEZ, A. (2004). Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **57**: 123-131
- VOGEL, F. R. (2000). Improving Vaccine Performance with Adjuvants. *Clinical Infectious Diseases*, **30(3)**: 266-270
- WALKER, J. M. (2002). The Protein Protocols Handbook (2nd Ed.). USA: Elsevier, p.: 11-14
- WASHINGTON, N., BUSH, D., GILL, D. A., JACKSON, S. J., MASON, J., PITT, K., RAWLINS, D. A., STEELE, R. J. C. (2000). Determination of baseline human nasal pH and the effect of intranasally administered buffers. *International Journal of Pharmaceutics*, **198**: 139-146
- WEISBERG, S. S. (2007). Diphtheria. *Dis. Mon.*, **53**: 430-434
- WENDORF, J., CHESKO, J., KAZAZ, J., O'HAGAN, D., SINGH, M., SOEWANAN, E., UGOZZOLI, M. (2006). A Practical Approach to the use of Nanoparticles for Vaccine Delivery. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, **95(12)**: 2738-2750
- WENZEL, J. G. W., BALAJI, K. S. S., DURAN, S. H., HARDIN RAHE, C., KOUSHIK, K., KOMPELLA, U. B., NAVARRE, C. (2002). Pluronic® F127 gel formulations of Deslorelin and GnRH reduce drug degradation and sustain drug release and effect in cattle. *J. Controll. Rel.*, **85**: 51-59
- WESTERINK, M. A. J., BLONDER, J., COESHOTT, C., ROSENTHAL, G. J., SMITHSON, S. L., SRIVASTAVA, N. (2002). ProJuvant™ (Pluronic F127®/chitosan) enhances the immune response to intranasally administered tetanus toxoid. *Vaccine*, **20**: 711-723
- WHARTON, M., VITEK, C. R. (2004). Diphtheria Toxoid. In: *Vaccines* (4th Ed.). Ed.: S. A. Plotkin, W. A. Orenstein. Philadelphia: Elsevier Inc., p.: 211-228

- WITSCHI, C., MRSNY, R. J. (1999). In Vitro Evaluation of Microparticles and Polymer Gels for use as Nasal Platforms for Protein Delivery. *Pharmaceutical Research*, **16(3)**: 382-390
- World Health Organization (WHO). (1993). The Immunological Basis for Immunization Series/Module 2: Diphtheria, p.: 1-12
- World Health Organization (WHO). (1997). Manual For The Production And Control Of Vaccines, Diphtheria Toxoid
- World Health Organization (WHO). (1999). World Health Report.
- World Health Organization (WHO). (2006). Weekly epidemiological record. **81(3)**: 21-32
- YATES, R., DIXON, R., NAIRN, K., SEABER, E. (2002). Preliminary Studies of the Pharmacokinetics and Tolerability of Zolmitriptan Nasal Spray in Healthy Volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology*, **42**: 1237-1243
- YONG, C. S., CHOI, H-G., JUNG, S. H., KIM, C-K., KIM, H-D., OH, Y-K., RHEE, J-D. (2004). Preparation of ibuprofen-loaded liquid suppository using eutectic mixture system with menthol. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **23**: 347-353
- YUN, M-O., CHOI, H-G., JUNG, J-H., KIM, C-K. (1999). Development of a thermo-reversible insulin liquid suppository with bioavailability enhancement. *International Journal of Pharmaceutics*, **189**: 137-145
- ZAKI, N. M., ABD ELHADYB, S. S., AWADA, G. A., MORTADAA, N. D. (2007). Enhanced bioavailability of metoclopramide HCl by intranasal administration of a mucoadhesive in situ gel with modulated rheological and mucociliary transport properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **32(4-5)**: 296-307
- ZHOU, M., DONOVAN, M. D. (1996). Intranasal mucociliary clearance of putative bioadhesive polymer gels. *International Journal of Pharmaceutics*, **135**: 115-125
- ZWEIG, S. E. (2006). Advances in vaccine stability monitoring technology. *Vaccine*, **24**: 5977-5985

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı : Nalan Deniz
 Soyadı : Öztürk
 Doğum yeri ve tarihi : Yozgat – 18.12.1984
 Uyuğu : T.C.
 Medeni durumu : Bekar
 İletişim adresi : Kazakistan Cad. 53/14 Emek/ANKARA
 Telefonu : 0 505 388 53 88

II. Eğitimi

2009 - 2006 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
 Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
 2006 - 2002 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
 2002 - 1995 Trabzon Kanuni Anadolu Lisesi
 1995 - 1990 Cudibey İlkokulu

Yabancı Dili : İngilizce

III. Ünvanları

2006 Eczacı

IV. Mesleki Deneyimi

..... - Nisan 2009 İDE Bilgi Merkezi Eğitim ve Danışmanlık
 (Ruhsatlandırma İşleri Uzmanı)
 Mart 2009 - 2008 İDE Bilgi Merkezi Eğitim ve Danışmanlık
 (Ruhsatlandırma İşleri Asistanı)

V. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (TÜFTAD)

VI. Bilimsel İlgili Alanları

Yayınları ve Tebliğleri:

- Nalan Deniz Öztürk, Asuman Bozkır. (2008). In Situ Gel Formulations for Intranasal Delivery of Diphtheria Toxoid: I- In Vitro Characterization Study. *14th International Pharmaceutical Technology Symposium*, p.: 256-258
- Ongun M. Saka, Nalan D. Ozturk, Asuman Bozkır. (2007). Pegylated chitosan nanoparticles for gene delivery. *Advance in Chitin Science*, **X**: 281-286
- Nalan D. Öztürk, Asuman Bozkır. (2006). EMEA'nın Biyobenzerlerle ilgili Yaklaşımları. *TÜFTAD*, **13(2)**: 23-26

VII. Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı Burslar:

- TÜBİTAK Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu Bursiyeri (2006-2008)

Ödüller:

- Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Fakülte İkinciliği (2006)
- Türk Eczacıları Birliği 2. Bölge Ankara Eczacı Odası Başarı Belgesi (2007)
- Trabzon Kanuni Anadolu Lisesi Onur Öğrencisi (1999-2002)

Verdiği konferans ya da seminerler :

- « Mukozal Yolla Uygulanan Aşılar ve Nazal Adjuvanlar » başlıklı seminer

VIII. Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve katıldığı eğitim seminerleri:

- Impurities in Pharmaceuticals: Scientific and Regulatory Aspects, İstanbul (2009)
- Patent In The Pharmaceutical Industry, Ankara (2009)
- Building the eCTD, Madrid-İspanya (2009)
- PET Radiopharmaceuticals, Ankara (2008)
- 14th International Pharmaceutical Technology Symposium, Antalya (2008)
- 8th International Conference of the European Chitin Society (EUCHIS), Antalya (2007)
- Biotech and Biosimilar Products Workshop (TÜFTAD/ EUFEPS/ FIP), İstanbul (2007)