



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



COVID-19'A KARŞI PROTOTİP MİKROİĞNE AŞI FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Selin KURTER

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman BOZKIR**

**ANKARA
2023**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**COVID-19'A KARŞI PROTOTİP MİKROİĞNE AŞI
FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Selin KURTER

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman BOZKIR**

**ANKARA
2023**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “COVID-19’a Karşı Prototip Mikroigne Aşı Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Selin KURTER

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında Selin KURTER tarafından hazırlanan
“COVID-19’a Karşı Prototip Mikroigne Aşı Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve
Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS
TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13.06.2023

İmza
Prof. Dr. Asuman BOZKIR
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Doç. Dr. Sibel İLBASMIŞ TAMER
Gazi Üniversitesi
Üye

İmza
Dr. Öğr. Üyesi Ongun Mehmet SAKA
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Aşılar	6
1.2. Aşıların Sınıflandırılması	7
1.2.1. Canlı Attenüe Aşılar	7
1.2.2. İnaktive Aşılar	7
1.2.3. Viral Vektör Aşıları	8
1.2.4. Nükleik Asit Aşıları	8
1.2.4.1. DNA Aşıları	9
1.2.4.2. mRNA Aşıları	9
1.2.5. Subunit Aşılar	9
1.3. Adjuvanlar	10
1.3.1. Adjuvan Türleri	11
1.4. Nanoaşı	12
1.5. Nanopartikül Üretim Yöntemleri	15
1.5.1. Solvent Evaporasyon Yöntemi	16
1.5.2. Emülsifikasyon/Solvent Difüzyonu Yöntemi	16
1.5.3. Emülsifikasyon/ Tuz Etkisiyle Çözünürlük Azalması (Salting Out) Yöntemi	16
1.5.4. Nanopresipitasyon Yöntemi	17
1.5.5. İyonik Jelleşme Yöntemi	18
1.6. Tez Çalışmasında Kullanılan Polimer ve Nanopartikül Üretim Yöntemi	18
1.7. Cilt Anatomisi	20
1.8. İntradermal Aşılama	21
1.9. Mikroığneler	22
1.9.1. Mikroığnelerin Sınıflandırılması	23
1.9.1.1. Katı Mikroığneler	23
1.9.1.2. Kaplanmış Mikroığneler	23
1.9.1.3. Çözünen Mikroığneler	24
1.9.1.4. İçi Boş Mikroığneler	25
1.9.1.5. Hidrojel Oluşturan Mikroığneler	25
1.9.2. Mikroığnelerin Üretim Yöntemleri	26
1.9.2.1. Çözücü (Solvent) Kullanılarak Polimerik Mikroığne Üretimi	27
1.9.2.1.1. Mikro Kalıplama	27
1.9.2.1.2. Kalıpları Doldurmak İçin Atomize Püskürtme	28
1.9.2.1.3. Damlacık Kaynaklı Hava Üfleme (DAB)	29
1.9.2.1.4. Pipet Çekme	29

1.9.2.2. Elektromanyetik/Mikrosistem/Lazer Teknolojisi	29
1.9.2.2.1. Mikroelektromekanik Sistemler (MEMS)	29
1.9.2.2.2. Lazer Kesim	31
1.9.2.2.3. Lazer Ablasyonu	31
1.9.2.2.4. Derin Röntgen Litografisi	31
1.9.2.3. Katmanlı Üretim	32
1.9.2.3.1. İki Foton Polimerizasyonu	32
1.9.2.3.2. Mikrostereolitografi (μ SL)	32
1.9.2.3.3. Sürekli Sıvı Arayüzü (CLIP)	33
1.9.3. Mikroigne ve Aşı Uygulaması	33
1.10. COVID-19	36
1.10.1. SARS-CoV-2 giriş yolları	39
1.10.2. COVID-19 Patogenezi	39
1.10.3. SARS-CoV-2 varyantları	41
1.10.4. COVID-19 Aşıları ve Karşılaştırmaları	42
2. GEREÇ VE YÖNTEM	47
2.1. Gereçler	47
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	47
2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	48
2.1.3. Çalışmalarda Kullanılan Tamponlar	49
2.2. Yöntemler	49
2.2.1. Model Protein ve RBD Antijeninin MikroBikinkoninik Asit (MikroBCA) Yöntemiyle Kalibrasyonu	49
2.2.2. Nanopartiküllerin Hazırlanması	50
2.2.3. Nanopartikül Geliştirmek Üzere Yapılan ÖnFormülasyon Çalışmaları	51
2.2.3.1. Model Protein İle Hazırlanan Nanopartiküller İçin Ön Formülasyon Çalışmaları	51
2.3. Nanopartiküllerde Yapılan Kontroller	53
2.3.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Saptanması	53
2.3.2. Hazırlanan Formülasyonlarda Etken Madde Miktar Tayini	53
2.3.3. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini	53
2.3.4. Zeta Potansiyel Ölçümü	54
2.3.5. İn Vitro Etken Madde Salım Çalışmaları	54
2.3.6. SDS-PAGE Analizi	54
2.3.7. Nanopartikül Formülasyonunun Stabilitesi	57
2.3.8. Hazırlanan Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	58
2.3.9. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi	58
2.3.10. Hücre Kültürü Çalışmaları	58
2.3.10.1. Hücre Canlılığı Testi	58
2.3.10.2. Nitrik Oksit (NO) Tayini	59
2.4. Mikroigne Formülasyonları	60
2.4.1. Mikroigne Önformülasyon Çalışmaları	60
2.4.2. PDMS (Polidimetilsiloksan) Kalıp ile Geliştirilen Mikroigne Formülasyonları	64
2.4.3. Mikroigne Formülasyonlarının Optik Mikroskop ile Görüntülenmesi	66
2.4.4. Mikroignelerin Tekstür Analizi	66

2.4.5. Mikroigne Formülasyonlarının Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	67
3. BULGULAR	68
3.1. Nanopartikül Formülasyonunda Yapılan Kontroller	68
3.1.1. Etken Maddelerin Miktar Tayinleri İçin Kullanılan Yöntemlerin Kalibrasyonun Ait Bulgular	68
3.1.2. Model Protein İle Hazırlanan Nanopartiküllerin Ön Formülasyon Sonuçları	70
3.1.3. İn Vitro Etkin Madde Salım Çalışmaları	75
3.1.3.1. Model Protein ile Üretilen Nanopartikül Formülasyonu ile Yapılan İn Vitro Salım Çalışmasına Ait Bulgular	75
3.1.3.2. RBD Antijeni ile Üretilen Nanopartikül Formülasyonu ile Yapılan İn Vitro Salım Çalışmasına Ait Bulgular	76
3.1.4. SDS-PAGE Analizi Sonuçları	77
3.1.4.1. Model protein ile üretilen nanopartikül SDS-PAGE Analizi Sonuçları	77
3.1.4.2 RBD ile Üretilen Nanopartikül SDS-PAGE Analizi Sonuçları	79
3.1.5. Nanopartikül Formülasyonlarının Stabilité Sonuçları	81
3.1.6. Hazırlanan Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi Sonuçları	84
3.1.7. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi Sonuçları	85
3.1.8. Hücre Kültürü Çalışmaları	86
3.1.8.1. Hücre Canlılığı Çalışmaları Sonuçları	86
3.1.8.2. NO Tayini Sonuçları	88
3.2. Mikroignelerde Yapılan Kontroller	89
3.2.1. Mikroigne Önformülasyon Çalışmaları	89
3.2.1.1. Polisiloksan Kit ile Üretilen Kalıp ile Üretilen Mikroignelere Ait Önformülasyon Sonuçları	89
3.2.1.2. PDMS Kalıp İle Hazırlanan Mikroigne Formülasyonlarına Ait Sonuçlar	93
3.2.2. PDMS Mikroigne Kalıbı ile Üretilen Mikroignelerin Optik Mikroskop Analizi Sonuçları	95
3.2.3. Mikroignelerin Tekstür Analizi	96
3.2.3.1. 5 Kilogramlık Yük Hücreğine Sahip Tekstür Analizi Cihazı İle Elde Edilen Sonuçlar	96
3.2.3.2. 30 Kilogramlık Yük Hücreğine Sahip Tekstür Analizi Cihazı İle Elde Edilen Sonuçlar	99
3.2.4. Mikroigne Formülasyonlarının Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	100
3.2.4.1. Tekstür Cihazıyla Kuvvet Uygulanmadan Önceki Mikroigne SEM Görüntüleri	100
3.2.4.2. Tekstür Cihazıyla Kuvvet Uygulanması Sonucu Mikroignelerde Oluşan Morfolojik Değişikliğe Ait SEM Görüntüleri	101
3.2.5. Mikroignelerdeki Uzunluk Değişimi Sonuçları	102
4. TARTIŞMA	104
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	114
ÖZET	116
SUMMARY	117

KAYNAKLAR
ÖZGEÇMİŞ

118
128



ÖNSÖZ

Bu tez çalışması kapsamında RBD yüklü nanopartiküller geliştirilmiş ve bu formülasyonlar in vitro olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca mikroiğne formülasyonları geliştirilmiş ve in vitro karakterizasyonları yapılmıştır. Böylece COVID-19'a karşı alternatif bir aşı platformu geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasının her aşamasında ilgi ve desteğini gördüğüm, akademik yolda ve hayat yolunda bana her daim rehberlik eden çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Asuman BOZKIR'a teşekkür eder, saygı ve minnetlerimi sunarım.

Çalışmalarımı zamanında tamamlamama imkân veren Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölümü Eski Başkanı Prof. Dr. Ayşe Nurten ÖZDEMİR ve Eczacılık Teknolojisi Bölümü Yeni Başkanı Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL başta olmak üzere Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nın sayın öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında karşılaştığım problemlerde yanımda olan ve her defasında çözüm üreten Dr. Öğr. Üyesi Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN ve Dr. Öğr. Üyesi Umut Can ÖZ'e,

Büyük bir cömertlikle RBD antijenini paylaşan Prof. Dr. Mehmet İNAN'a ve hücre kültürü çalışmaları için Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR ve ekibine çok teşekkür ederim.

Tez çalışmasında formülasyon çalışmalarında sonikatör cihazını kullanmama imkân sağlayan Prof. Dr. Tansel ÇOMOĞLU'na, Zetasizer cihazını kullanmamı sağlayan Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL ve Doç. Dr. Zerrin Sezgin BAYINDIR'a, tekstür analizlerinde ve tez çalışması sırasında sürekli desteğini hissettiğim Dr. Öğr. Üyesi Özge İNAL'a, mikroiğne formülasyonlarındaki yardımı için Dr. Ecz. Özge Gün EŞİM'e, nanopartikül formülasyonundaki yardımları için Doç. Dr. Özgür EŞİM'e,

salım çalışmaları sırasındaki desteği için Uzm.Ecz. Tuğrul Mert SERİM'e, microBCA analizi için Doç. Dr. Mehmet Gökhan AğLAYAN'a ve Doç.Dr. Aslı KOÇ'a, SDS-PAGE çalışmalarındaki yardımları için Uzm. Ecz. Naile Merve GÜVEN'e, derin dondurucu kullanımındaki yardımları için Prof. Dr. Tülay ÇOBAN, Uzm. Ecz. Seda İPEK ve Uzm. Ecz. Ayşegöl KOçYİğİT'e, mikroskop kullanımı için Prof. Dr. Ayşegöl KÖROğLU ve Doç.Dr. Gülderen YILMAZ'a teşekkür ederim.

Mikroiğne önformölasyonunda kullandığım kalıp materyalinin temini için Prof. Dr. Kaan ORHAN'a, tekstür analizleri için Prof.Dr. Ebru şENEL ÖZKAN'a ve Arş. Gör. Canan ALTINAY UYSAL'a, DSC Analizleri için İLKO ARGEM Genel Müdürü Onur PINARBAşLI, Pelin GURBETOğLU ve Tolga ÖZBAY'a, dermapen temini için Güven MERTGENÇ'e teşekkür ederim.

Ankara Üniversitesi Eczacılık Faköltesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan hocalarıma,

Tez çalışmam süresince her konuda destek olan Ecz. Sena AYÇİÇEK ve Ecz. Süheyl Furkan KONCA'ya tüm kalbimle teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince manevi olarak destek olan Ecz. Büşra Naz ÇAKIR'a ve Melike TAşDEMİR'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana olan desteği ve güveniyle kendime inanmamı sağladığı için canım annem Seher BERİK'e ve ağabeyim Berker Yasin KURTER'e çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE2	Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2
APC	Antijen sunan hücre
ARD	Akut solunum sıkıntısı
CMC	Karboksi metil selüloz
COVID-19	Koronavirüs Hastalığı 2019
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
MA	Molekül ağırlığı
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür
NP	Nanopartikül
NO	Nitrik oksit
OVA	Ovalbumin
PDI	Polidispersite indeksi
PDMS	Polidimetilsiloksan
PEG-PCL	Poli(etilen glikol)-blok-poli(ε-kaprolakton)
RBD	Reseptör bağlayıcı alan
SARS-CoV-2	Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs 2
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SS	Standart sapma
TACE	TNF-alfa-dönüştürücü enzim
TMPRSS2	Transmembran proteaz serin 2
TNF-α	Tümör nekroz alfa
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. SARS-CoV-2 Virüsünün Yapısı	38
Şekil 1.2. Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs-2'nin vücuda (SARS-CoV-2) giriş yolları	41
Şekil 3.1. Ovalbuminin sodyum kolat ile kalibrasyon grafiği	68
Şekil 3.2. Ovalbuminin pH 7,4 fosfat-salin tamponu ile kalibrasyon grafiği	69
Şekil 3.3. RBD'nin sodyum kolat ile kalibrasyon grafiği	70
Şekil 3.4. RBD'nin pH 7,4 fosfat-salin tamponu ile kalibrasyon grafiği	70
Şekil 3.5. NP 11 kodlu formüle ait partikül boyutu ve dağılımına ait grafik	74
Şekil 3.6. RBD NP kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik	74
Şekil 3.7. RBD NP kodlu formülün zeta potansiyeli dağılımına ait grafik	74
Şekil 3.8. Model protein ile üretilen nanopartikül formülasyonundan in vitro salım profili	75
Şekil 3.9. RBD antijeni ile üretilen nanopartikül formülasyonundan in vitro salım profili	76
Şekil 3.10. Model proteinle üretilen nanopartikül ve saf model proteine ait SDS-PAGE jeli	78
Şekil 3.11. RBD ile üretilen nanopartikül ve RBD antijenine ait SDS-PAGE jeli	80
Şekil 3.12. +4°C'de gerçekleştirilen stabilite çalışmalarına ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel bulgularının grafiksel gösterimi	81
Şekil 3.13. -20 °C'de gerçekleştirilen stabilite çalışmalarına ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel bulgularının grafiksel gösterimi	82
Şekil 3.14. -20 °C'de trehaloz eklenerek gerçekleştirilen stabilite çalışmalarına ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel bulgularının grafiksel gösterimi	83
Şekil 3.15. Nanopartikül formülasyonu ve formülasyonda bulunan maddelere ait DSC termogramları.	84
Şekil 3.16. Hazırlanan nanopartiküllere ait TEM görüntüleri	85
Şekil 3.17. RBD hücre canlılığı sonuçları	86
Şekil 3.18. Polimer hücre canlılığı sonuçları	86
Şekil 3.19. Nanopartikül hücre canlılığı sonuçları	87

Şekil 3.20.	NO tayin sonuçları	88
Şekil 3.21.	Mikroiğne formülasyonlarına ait optik mikroskop görüntüleri	95
Şekil 3.22.	1. ve 2. mikroiğne formülasyonuna ait kuvvet-yer değiştirme grafiği	96
Şekil 3.23.	3. ve 4. mikroiğne formülasyonuna ait kuvvet-yer değiştirme grafiği	97
Şekil 3.24.	5. ve 6. mikroiğne formülasyonuna ait kuvvet-yer değiştirme grafiği	97
Şekil 3.25.	7. Mikroiğne formülasyonuna ait kuvvet-yer değiştirme grafiği	98
Şekil 3.26.	8. Mikroiğne formülasyonuna ait kuvvet-yer değiştirme grafiği	98
Şekil 3.27.	9. Mikroiğne formülasyonuna ait kuvvet-yer değiştirme grafiği	99
Şekil 3.28.	1,2,34,5,6,7,8 ve 9. Mikroiğne formülasyonlarına ait kuvvet-yer değiştirme grafiği	99
Şekil 3.29.	7. mikroiğne formülasyonuna ait SEM görüntüleri	100
Şekil 3.30.	8. Mikroiğne formülasyonuna ait SEM görüntüleri	101
Şekil 3.31.	9. Mikroiğne formülasyonuna ait SEM görüntüleri	101
Şekil 3.32.	7. Mikroiğne formülasyonuna ait SEM görüntüsü	101
Şekil 3.33.	8. Mikroiğne formülasyonuna ait SEM görüntüleri	102
Şekil 3.34.	9. Mikroiğneye ait SEM görüntüleri	102
Şekil 3.35.	Mikroiğnelerdeki uzunluk değişimi sonuçları	103

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. FDA tarafından onaylanan adjuvanlar	11
Çizelge 1.2. COVID-19'a karşı geliştirilen aşılarda karşılaştırılması	43
Çizelge 2.1. Model protein ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları	52
Çizelge 2.2. SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler	56
Çizelge 2.3. Polisiiloksan kit ile üretilen mikroiğne formülasyonları	61
Çizelge 2.4. PDMS mikroiğne kalıbı ile geliştirilen mikroiğne formülasyonları	65
Çizelge 3.1. Ovalbumin'in kalibrasyon doğrusuna ait parametreler	69
Çizelge 3.2. RBD'nin kalibrasyon doğrusuna ait parametreler	70
Çizelge 3.3. Model protein ile hazırlanan nanopartiküllerin ön formülasyon sonuçları	72
Çizelge 3.4. RBD antijeni ile üretilen nanopartiküle ait sonuçlar	73
Çizelge 3.5. RBD yüklü nanopartikül in vitro salım kinetikleri	77
Çizelge 3.6. +4 °C'de yapılan stabilite çalışması sonuçlarına ait bulgular	81
Çizelge 3.7. -20 °C'de yapılan stabilite çalışması sonuçlarına ait bulgular	82
Çizelge 3.8. -20 °C'de trehaloz eklenerek yapılan stabilite çalışması sonuçlarına ait bulgular	82
Çizelge 3.9. Polisiiloksan kit ile üretilen mikroiğnelere ait önformülasyon sonuçları	90
Çizelge 3.10. PDMS kalıp ile hazırlanan mikroiğne formülasyonlarına ait sonuçlar	94

1. GİRİŞ

11 Mart 2020'de DSÖ, elli milyondan fazla insanın ölümüne neden olan 1918 İspanyol gribinin (H1N1), bir milyondan fazla insanın ölümüne neden olan 1957 Asya gribinin (H2N2), 1968 Hong Kong bir milyondan fazla insanın ölümüne neden olan Kong gribi (H3N2) ve üç yüz bin insanın ölümüne neden olan 2009 pandemik grip (H1N1) ardından SARS-CoV-2'yi bir salgın olarak ilan etti (Hillary & Ceasar, 2023).

COVID-19 pandemisi ve buna bağlı olarak gelişen rahatsızlıklar ortaya çıktığı günden itibaren 24 Mayıs 2023 tarihine 766.895.075 vaka olgusuna ve 6.935.889 ölüme sebep olmuştur (World Health Organization, 2023).

Pandemi ortaya çıktığı günden itibaren bilim insanları tarafından bu enfeksiyona karşı ilaç ve aşı geliştirme çalışmaları büyük bir hız kazanmıştır.

Aşılama, bulaşıcı hastalıkları önlemek için en başarılı stratejilerden biri olarak kabul edilir. Bir pandemi veya salgın durumunda, aşının hızlı bir şekilde geliştirilmesi ve nüfusa dağıtılması, ölüm, hastalık ve bulaşma oranını azaltmak için esastır. COVID-19 pandemisi sırasında görüldüğü gibi, aşılamanın üretimi ve dağıtımı, özellikle kaynaklara ulaşımın kısıtlı olduğu bölgelerde zorlayıcı olmuştur ve aşılanmanın küresel boyutta etkin bir şekilde yapılma sürecini yavaşlatmıştır. Yüksek gelirli ülkelerde geliştirilen çeşitli aşılamanın fiyatlandırma, depolama, nakliye ve dağıtım gereklilikleri, düşük ve orta gelirli ülkeler için sınırlı erişime neden olmuştur. Bölgesel olarak aşı üretme kapasitesinin artırılması, küresel aşı erişimini büyük ölçüde artıracaktır (Peletta ve ark., 2023).

Salgının başından beri bu pandemi ile mücadelede farklı aşı platformları geliştirilmiştir. İnaktif virüs, mRNA tabanlı ve viral vektör platformları öne çıkmış ve SARS-CoV-2'ye karşı onaylanmış ilk aşılamanın olmuştur. SARS-CoV-2 varyantlarının hızla ortaya çıkması, endişe verici varyantların oluşmasına ve bazı varyantların mevcut aşılarla farklı derecelerde direnç göstermesine neden olmuştur.

Çeşitli platformların geliştirilmesi, dünya çapında daha hızlı ve daha verimli aşı kapsamını kolaylaştırmaktadır (Bayani ve ark., 2023).

Etkili antijenler ile üretilen aşılar, doğal ve adaptif bağışıklık yanıtını uyarabilir, böylece viral istilaya karşı direnci teşvik edebilir. Koronavirüs aşılarının antijenik hedefleri, SARS-CoV ve MERS-CoV aşıları üzerinde yapılan preklinik araştırmalarla daha net hale gelmiştir. Spike proteinine, özellikle reseptör bağlama alanına (RBD) bağlanan antikörlerin, konakçı hücreye bağlanmalarını önleyebildiği ve virüsü nötralize edebildiği görülmüştür (Miao ve ark., 2023).

RBD bazlı aşının tam uzunluktaki S proteinine kıyasla potansiyel üretim avantajları, bu aşıyı özellikle düşük ve orta gelirli ülkeler için uygun bir maliyetle uygun bir seçim haline getirmektedir. Farklı RBD bazlı immünojen platformlarının, hayvan modellerinde ve insanlarda anti-RBD nötralize edici antikörleri indüklediği gösterilmiştir. Bu nedenle RBD, terapötik virüs bağlanma inhibitörlerinin geliştirilmesi, nötralize edici antikörlerin indüklenmesi ve aşı tasarımı için en olası hedef olarak tanımlanmaktadır (Bayani ve ark., 2023).

COVID-19'un yüksek morbidite ve mortalitesini azaltmak için birden fazla aşı geliştirilmiş ve acilen kullanım onayı almış olsa da zorluklar devam etmektedir. Örneğin, mRNA aşılarının stabilitesini sağlamak için etkin soğuk zincir lojistiğinin sağlanması gerekir, inaktive virüs aşıları sıkı üretim koşulları gerektirir ve rekombinant adenovirüs aşılarının nadir fakat ciddi yan etkilere neden olduğu bulunmuştur. Öte yandan, subunit aşılar, daha iyi stabilite, daha kolay üretim ve daha düşük maliyet nedeniyle bir alternatif sağlayabilir (Chen ve ark., 2021).

SARS-CoV-2 spike (S) proteininin reseptör bağlanma alanı (RBD), virüsün hücresel girişini kolaylaştıran insan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'ye (ACE2) bağlanır. Bu nedenle RBD, virüse karşı antikörleri nötralize etmenin birincil hedefidir. Çok sayıda SARS-CoV-2 aday aşısı arasında, RBD'yi hedefleyen aşılardan, S-tam uzunlukta proteini hedefleyenlerden daha güçlü olduğu ve hatta hastalık geliştirme riskini önleyebildiği gösterilmiştir (Du ve ark., 2020).

Subunit aşılar, en güvenli ve en yaygın kullanılan aşılar arasındadır ve çeşitli yaş gruplarında hepatit B, difteri, boğmaca, tetanoz ve zona gibi çeşitli bulaşıcı hastalıklara karşı oldukça etkilidir. Bu yüzden, SARS-CoV-2'ye karşı etkin ve güvenli bir alt birim aşının geliştirilmesi, COVID 19 pandemisini kontrol etmede önemli bir adımı temsil edecektir (Arunachalam ve ark., 2021).

S proteininin RBD'si, konakçı hücreler üzerindeki ACE2 reseptörü ile doğrudan etkileşime girdiğinden, RBD immünizasyonunun neden olduğu spesifik antikorlar bu tanımayı bloke edebilir ve böylece virüsün istilasını etkili bir şekilde önleyebilir. Çalışmalar, rekombinant RBD'nin, SARS-CoV-2'ye karşı yüksek titrede nötralize edici antikorlar indükleyebilen çoklu yapısal nötralize edici epitoplardan oluştuğunu göstermiştir. Ayrıca, RBD alanının, S1 alt birimi ile karşılaştırıldığında nispeten korunur ve çoklu konformasyonel nötralize edici epitoplar içerir bu da onu aşı geliştirme için daha uygun hale getirmektedir. Şu anda geliştirilmekte olan SARS-CoV-2 alt birim aşılarının çoğu, antijen olarak RBD'yi kullanmaktadır (Zhang ve ark., 2020).

Alt birim aşılar genellikle güvenlidir ve patojenle mücadele, virülans geri kazanımı ve zararlı bağışıklık tepkilerinin indüklenmesi ile ilişkili riskleri azaltır. Bununla birlikte, bu aşılar genellikle güçlü veya uzun süreli bağışıklık tepkilerini indüklemeyen ve uygun adjuvanlar ve tekrarlanan dozlar gerektirir (Bayani ve ark., 2023).

Küresel enfeksiyonlara karşı korumanın bağışıklık bağıntılarına ilişkin sınırlı bir anlayış da dahil olmak üzere, yeni aşılar geliştirmenin önünde çok sayıda engel vardır. Patojenlere karşı tekrarlanabilir, güçlü bir bağışıklık tepkisi oluşturmak için gelişmiş nanoaşı teknolojileri araştırılmaktadır. Geleneksel aşıların aksine nanoaşılar, lenf düğümlerine gelişmiş erişim, antijenlerin optimal enkapsülasyonu ve sunumu ve kalıcı bir bağışıklık tepkisinin indüklenmesini sağlar. Polimerik nanoaşılar benzersiz avantajlar sunar: biyokimyasal olarak karakterize edilebilirler; canlı veya inaktive virüs aşılarından daha az reaktogenik olabilir ve kültür ortamının diğer bileşenleri ile

karşılaştırıldığında nispeten büyük boyuttaki nanopartiküller sayesinde yüksek derecede saflaştırılabilirler (Singh, 2021).

Nanopartiküller virüslerle boyut dağılımını paylaşır ve bu nedenle virüsler gibi nanopartiküller de virüs hedefli hücrelere girebilir. Nanopartiküller, antijen ile nükleik asitler (DNA ve mRNA) veya protein alt birimleri şeklinde yüklenebilir ve bu nedenle hedeflenen ekspresyona veya viral antijenin doğrudan iletilmesine izin verir. Nanoaşılar ayrıca gelişmiş lipofilikliklerinden dolayı hedef antijenin sürekli salımı avantajını sunar. Benzersiz fizikokimyasal özelliklere ek olarak, nanopartiküller, hücre hedefli peptitleri, proteinleri veya polimerleri yüzeylerine dahil ederek yüzey mühendisliğinin esnekliğine izin verir (Machhi ve ark., 2020).

Nanoaşılar, enfeksiyonları kontrol etmek veya ölüm ve hastalıkları önlemek için güçlü bir bağışıklık tepkisi oluştururlar. Nanopartiküller antijenin taşıyıcı sistemin yüzeyinde veya içerisinde enkapsüle olabileceği etkili bir uygulamaya izin verecek şekilde tasarlanmışlardır. Böylece, kapsüllenmiş bir antijen kolayca bozulmaz ve salım, hedef bölgede daha uzun süre kontrollü kalır. Kontrollü antijen salımı, alevlenen tepkiyi önler ve takviye dozlarına olan ihtiyacı ortadan kaldırır. Antijenlerin kontrollü salımında rol oynayan nanoaşılar, bağışıklık hücreleri ile aşıya maruz kalma süresini artırmıştır. Nanoaşılar, hem hümmoral hem de hüccresel bağışıklık sistemini aktive etme potansiyeline sahiptirler. Ayrıca nanoaşılar, partikül boyutu nedeniyle periferik dendritik hücrelere ihtiyaç duymadan lenf düğümlerine erişebilir. Alt birim aşılar, protein/peptit bazlı olanları içerir ve şu anda bulaşıcı hastalıkları önleme ve kontrol etmede ana stratejidir. Alt birim antijenlerinin rekombinant teknikler kullanılarak üretilmesi kolaydır. Bu aşılar, protein antijen dizisini modüle ederek bağışıklık tepkisinin güçlendirilebileceğini göstermiştir. Ek olarak, alt birim aşılar, bağışıklığı baskılanmış hastalar için güvenliği artırabilir ve yan etkileri azaltabilir (Rodrigues ve ark., 2021).

COVID-19 pandemisi, hastalığın kontrolü için hızlı aşı geliştirmeyi gerekli kılmıştır. Şu anda COVID-19 için onaylanmış olanlar da dahil olmak üzere çoğu aşı, intramüsküler ve intradermal uygulanmaktadır. Bununla birlikte, ağrı ve iğne batma

korkusu, iki doz gerekliliği, aşı uygulaması için eğitimli sağlık uzmanlarına ihtiyaç duyulması ve soğuk tedarik zinciri ihtiyai göz önüne alındığında küresel dağıtımın önündeki engeller gibi çeşitli dezavantajlar vardır. Son zamanlarda, COVID-19 dahil aşılar için transdermal teknikler araştırılmaktadır. Mikroığne teknolojisi, aşıyı deri üzerine yerleştirilen bir yama şeklinde uygulayan bir plakadan çoklu mikroskobik projeksiyonlar kullanır ve gelişmiş bağışıklık tepkisi ile ağrısız antijen uygulamasına izin verir (Lee ve ark., 2021).

Deri, geniş bir bağışıklık hcreti popülasyonu ve kan dolaşımına ve lenfatik sisteme yakın erişimi ile en büyük insan organıdır ve hedeflenen aşı uygulaması için muazzam bir potansiyel taşımaktadır (Cordeiro ve ark., 2021).

Intradermal aşılama ile bağışıklama için znen mikroığneli yamalar, sağlık sistemlerine ve bireysel son kullanıcılara çeşitli lojistik ve ekonomik faydalar sunar, bunlar: kullanım kolaylığı; aşının rekonstit edilmesi gerekliliğin olmaması; soğuk zinciri ortadan kaldırarak daha verimli ve uygun maliyetli lojistik; ığnelerin, şırıngaların ve tehlikeli atıkların ortadan kaldırılması; ve kk paket boyutudur (Flynn ve ark., 2021).

Mikroığnelerin bağışıklık tepkilerini indüklediği mekanizma, derideki benzersiz immünolojik bölgeden yararlanır. Uygulandıktan sonra yamalara yüklenmiş olan antijenin dermal ve epidermal katmanlara difüzyonuna izin veren mikroskobik gözenekler oluşturur. Deride, mikroığnelerden salınan antijenler, bağışıklık tepkilerini başlatmak için lenf düğümlerine giden dokuda yerleşik olarak bulunan antijen sunan hücreler (APC'ler) tarafından alınır. APC'lerin deride zenginleştirildikleri ve etkili hedeflemelerinin koruyucu bağışıklık elde etmek için kritik olduğu göz önüne alındığında, deri yoluyla aşılamanın daha kk miktarlarda antijen kullanan diğer uygulama yollarından daha verimli olduğuna inanılmaktadır. Bu, "doz koruyucu fayda" olarak bilinir ve mikroığnelerin nispeten kk yükleme kapasitelerinin potansiyel engelini üstesinden gelmelerini sağlar. Mikroığne aşılarının bir başka benzersiz özelliği de, mikroığnelerin derideki ağrı reseptörlerine

ulaşmaması ve neredeyse ağrısız bir aşı uygulama yolu sağlamasıdır (Kapnick, 2021).

Bu bilgiler değerlendirilerek, tez çalışması kapsamında SARS-CoV-2 RBD subunit/protein aşısı polimerik nanopartikül şeklinde hazırlanması amaçlanmıştır. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında biyouyumlu, biyoparçalanabilir ve insanda kullanımı için FDA tarafından onay almış polimerlerden PEG-*b*-PCL (polietilenglikol-blok-poli(ε-kaprolakton)) biyomateryal olarak kullanılmıştır. Formülasyon değişkenlerinin hazırlanan polimerik nanopartiküllerin in vitro özellikleri üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Mikroğneler ile aşı uygulamasının avantajlarından hareketle tez çalışması kapsamında çözünen mikroğne formülasyonları hazırlanarak COVID-19 pandemisine karşı prototip aşı platformları geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla hazırlanan mikroğne formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

1.1. Aşılar

Aşılar, belirli bir hastalığa karşı kazanılmış bağışıklık tepkisini indükleyen ve bu tepkiyi güvenli bir şekilde başlatmak için kullanılabilen biyolojik bir üründür (Jose ve ark., 2022; Pollard & Bijker, 2021). Bağışıklık sistemi aynı hastalık etkeni tarafından uyarıldığında, hastalık etkenini ortadan kaldırmak ve bireyi enfeksiyondan korumak için daha güçlü bağışıklık tepkisi oluşumunu sağlar. Aşılar, insan bağışıklık sisteminin hastalık etkenlerine yanıt oluşturma ve bunlara karşı immünolojik bellek oluşturma konusundaki yeteneğinden yararlanır (Pollard & Bijker, 2021 ; Sheng ve ark., 2021). Bulaşıcı hastalıklar küresel biyogüvenlik için artan bir tehdittir. Aşılama, bulaşıcı hastalıkları önlemek için basit, etkili ve ekonomik bir yol olarak kabul edilir ve bulaşıcı hastalıklara bağlı hastalık ve ölüm oranlarını önemli oranda azaltır. Aşılama sadece bireylere doğrudan koruma sağlamakla kalmaz, aynı zamanda toplumda sürü bağışıklığı oluşturarak bulaşıcı hastalıkların yayılmasını yavaşlatır ve enfeksiyon riskini azaltır (Li ve ark., 2022 ; Sheng ve ark., 2021). Aşılar yaşam süresini uzatır ve çocuklarda bulaşıcı hastalıkların yayılma oranını düşürür. Yüksek aşı programı kapsamına sahip ülkelerde, daha önce çocuk yaştaki ölümlerin

çoğundan sorumlu olan hastalıkların çoğu eradike edilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), mevcut aşılama programlarıyla her yıl 2-3 milyon kişinin bulaşıcı hastalık kaynaklı ölümlerden korunduğunu tahmin etmektedir (Pollard & Bijker, 2021).

1.2. Aşıların Sınıflandırılması

Küresel çapta en çok kullanılan aşı türleri, nükleik asit aşısı, protein alt birim aşısı, canlı atenüe aşı, inaktive aşı, viral vektör aşıları ve virüs benzeri partikül aşısıdır (Miao ve ark., 2023). Aşılar canlı ya da inaktive edilmiş hastalık etkeni mikroorganizmalardan hazırlanır. Son yıllarda, DNA ve rekombinant vektör aşıları da dahil olmak üzere birçok aşı türü geliştirme aşamasındadır (Jose ve ark., 2022).

1.2.1. Canlı Attenüe Aşılar

Canlı zayıflatılmış aşılar, vücutta çoğalma yeteneğini koruyan ve sınırlı ölçüde hastalığa neden olan zayıflatılmış canlı mikroorganizmalardan hareketle hazırlanır, güçlü bağışıklık tepkisi ve uzun süreli bağışıklık hafızası oluştururlar (Miao ve ark., 2023). Bu aşı stratejisi, sağlıklı bireylerde hastalığa neden olmadan doğal enfeksiyonu taklit eden gerçek patojenin zayıflatılmış canlı suşlarının uygulanmasına dayanmaktadır. Patojenik suşların zayıflatılması, geleneksel olarak virülans genlerinin mutasyonuna veya kaybına yol açan in vitro geçiş yoluyla elde edilir. (Nwagwu ve ark., 2022) Bir veya iki doz uygulandıktan sonra canlı zayıflatılmış aşılar, genellikle ömür boyu devam eden güçlü bağışıklık sağlar (Bayani ve ark., 2023).

1.2.2. İnaktive Aşılar

Öldürülmüş olarak da bilinen inaktive edilmiş aşılar, genetik materyalleri fiziksel olarak (ısı veya radyasyon yoluyla) veya kimyasal olarak yok edilmeden (formalin veya fenol) önce kültürde yetiştirilen bakteri, virüs partikülleri veya diğer

patojenlerden üretilir. Sonuç olarak çoğalamazlar, ancak bağışıklık sistemi tarafından tespit edilebilirler (Bayani ve ark., 2023). İnaktivasyon işlemi sırasında, bu aşı suşlarından bazıları immünojenikliklerini kaybeder ve bu durum bu aşılama stratejisini canlı zayıflatılmış aşılarından daha az verimli hale getirir ve genellikle çoklu dozlara ve immünolojik adjuvanlara ihtiyaç duyulur (Bayani ve ark., 2023 ; Nwagwu ve ark., 2022).

1.2.3. Viral Vektör Aşıları

Viral vektör aşıları, aşı geliştirme için en yeni platformlardan biridir. Bu aşılama stratejisinde patojenin genetik materyalini konak hücreye iletmek için zararsız virüsler kullanılır. Konak hücreye aktarılan genetik materyal bağışıklık tepkisini indükleyen antijenlerin üretilmesini ve bunun sonucunda bağışıklık tepkisinin oluşturulmasını sağlar (Bayani ve ark., 2023). Bu amaçla yaygın olarak kullanılanlar, adenovirüs, kızamık ve vesiküler stomatit virüsü (VSV) vektörleridir (Nwagwu ve ark., 2022). Şu anda mevcut viral vektörler arasında en çok dikkat çeken ve uygulanan adenovirüslerdir (Bayani ve ark., 2023).

1.2.4. Nükleik Asit Aşıları

Diğer aşı platformlarına göre yeni bir teknoloji olan nükleik asit aşıları, hastalık etkeninden elde edilen genetik materyalleri (DNA veya mRNA) içerir. Antijenin genetik kodu hücrelere iletilir ve alıcı hücre transkripsiyon mekanizması kullanılarak bir proteine dönüştürülür. Üretilen protein, antijen sunan hücreler tarafından işlenir ve bağışıklık hücrelerine sunulur. Nükleik asit aşıları, hem humoral hem de hücrel bağışıklık tepkilerinin güçlü bir şekilde oluşturulmasını sağlar (Miao ve ark., 2023 ; Nwagwu ve ark., 2022).

1.2.4.1. DNA Aşıları

DNA aşılarının üretiminde antijen sekansı, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak plazmitlere eklenir ve oluşturulan rekombinant plazmit, bir bakteriye verilir. Bakteriler uygun ortamda kültürlenir. Dairesel plazmitler diğer bakteri hücre bileşenlerinden saflaştırıldıktan sonra aşı olarak kullanılmaya hazır hale gelir. DNA sekansında kolay manipülasyon avantajı nedeniyle, bu aşı platformunun potensi kısa sürede artırılabilir ve yeni ortaya çıkan enfeksiyonlarda veya mevcut enfeksiyonlarda yeni mutasyonlara adaptasyon için önemli bir potansiyele sahiptir (Bayani ve ark., 2023).

1.2.4.2. mRNA Aşıları

mRNA aşıları, bağışıklık tepkisini indükleyecek olan ilgili antijeni kodlayan sentetik mRNA moleküllerinden oluşur (Bayani ve ark., 2023). mRNA, konakçı hücrelerin sitoplazmasına girdikten sonra karşılık gelen immünojenik proteinleri sentezleme yeteneğine sahiptir ve nükleik asit aşıları tarafından kodlanan protein, konakçı hücreler tarafından salgılandıktan sonra bağışıklık tepkisini indükler (Miao ve ark., 2023).

1.2.5. Subunit Aşılar

Protein alt birim aşıları, patojen bakteri veya virüslerden izole edilmiş spesifik proteinlerden oluşur (Nwagwu ve ark., 2022). Protein alt birim aşıları, rekombinant teknoloji, protein izolasyonu ve saflaştırma yöntemleriyle üretilir. Üretimde patojenin tamamı yerine, bağışıklık sistemini uyaran bir alt birimi kullanılır (Nwagwu ve ark., 2022). Rekombinant alt birim aşıda, bir patojenin bir veya daha fazla antijenik proteininin (tüm segmenti veya bir kısmı) kodlama sekansı, prokaryotik veya ökaryotik üretim hücrelerine (bakteri veya maya gibi) yerleştirilir. Daha sonra bu hücrelerden izole edilir. Canlı zayıflatılmış veya etkisizleştirilmiş

aşılar gibi diğer platformlarla karşılaştırıldığında, alt birim aşılarda rekombinant üretimi, endüstriyel üretim için hızlı ölçek büyütmeyi kolaylaştırır (Bayani ve ark., 2023).

Tek başına proteinler veya peptitler, güçlü bir immün yanıt oluşturmada yetersizdir. Bu nedenle hem adjuvan hem de aşının birden fazla dozda uygulanması gerekir. Bu platform, ciddi advers etki olasılığını ortadan kaldırır, ancak etkili ve uzun süreli bağışıklık oluşturmak için bir adjuvanın tekrar tekrar uygulanmasına ve/veya dahil edilmesine ihtiyaç duyulur (Nwagwu ve ark., 2022).

1.3. Adjuvanlar

Adjuvanlar, bir antijene karşı bağışıklık tepkilerini iyileştirmek için aşıya eklenen bileşenler olarak tanımlanır. Ek olarak, adjuvanların aşı dozu başına antijen miktarını ve aşılama sayısını azaltmak gibi birçok faydası vardır ve bazı durumlarda antijen bileşeninin stabilitesini artırarak yarı ömrünü uzatır ve dolaylı olarak immünojenliğini artırır (Facciola ve ark., 2022).

Adjuvanların aşılarda formülasyonlarındaki etkisinin daha iyi anlaşılmasıyla birlikte, yeni hastalıklara karşı yeni adjuvanların geliştirilmesine acil bir ihtiyaç vardır. Yeni nesil aşı adjuvanlarında amaçlanan, zayıf antijenlerin bağışıklık yanıtı oluşturmada artış sağlaması, istenen tipte geliştirilmiş T lenfosit yanıtının oluşturulması ve güvenli çok yönlü güçlendirilmiş bağışıklık tepkilerinin oluşturulmasıdır. Aşılar da kullanılan adjuvanlar iki gruba ayrılır:

1. Spesifik reseptörlerle etkileşime girerek immün yanıtları uyaran bakteriyel toksinler, sitokinler ve Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) gibi immünojenik moleküller;
2. Polimerik mikropartiküller, nanopartiküller ve lipozomlar içinde enkapsüle olmuş antijenleri in vivo bozunmadan koruyabilen ve spesifik özelliklerine

dayalı olarak immün yanıtı geliştirebilen taşıyıcı sistemler ve mineral tuzlar (Facciola ve ark., 2022 ; Jin ve ark., 2019).

Aşı adjuvanları, hedef bağışıklık tepkilerinin ihtiyaçlarına ve hedef hücredeki etkilerinin zamansal ve uzamsal konumuna göre seçilebilir. Aynı zamanda lipozomlar, emülsiyonlar, kalsiyum fosfat nanopartiküller, silika partiküller vb. gibi bazı aşı taşıyıcı vektörler adjuvan etkiye sahiptir (Hou ve ark., 2023).

1.3.1. Adjuvan Türleri

Adjuvanlar, fizikokimyasal özellikleri, kökenleri ve etki mekanizmaları gibi farklı kriterlere göre gruplandırılabilir. En çok yapılan sınıflandırma, etki mekanizmalarına dayanır ve adjuvanları taşıyıcı sistemler (partikül) ve bağışıklık güçlendiriciler olarak iki ana kategoriye ayırır (Facciola ve ark., 2022).

ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA, ABD), aşağıda Çizelge 1.1’de verilen insanlarda kullanılan adjuvanları ve bunların kullanıldığı bazı aşıları onayladı (Patarroyo, 2023).

Çizelge 1.1. FDA tarafından onaylanan adjuvanlar.

Adjuvan	İçeriği	Etki mekanizması	Aşılar
Alum	Alum hidroksit oksit/ Alum hidroksi fosfat	Depo etkisi, NLRP3 enflamatuvar aktivasyonu ve aşılama bölgesinde indüklenen hücre ölümü.	Şarbon, difteri, hepatit A ve B, japon ensefaliti, pnömokok hastalığı, diğerleri.
MF59	Squalene, Tween 80 & Span 85	Sitokin ve kemokin indüksiyonu ve RIPK3 stimülasyonu	İnfluenza
AS01	MPL, QS21 & Lipozomlar	TLR4 ve kaspaz-1 bağışıklık uyarımı	Zona hastalığı
AS03	Squalen, α -Tocoferol & Tween 80	Sitokin (IL-6) ve kemokin (CXCL10) indüksiyonu	Domuz gribi
AS04	Alum & MPL	Aşılama yerinde depo etkisi, NLRP3 inflamatuvar aktivasyonu, TLR4 immün stimülasyonu ve hücre ölümü indüksiyonu.	HPV
CpG 1018	Tek sarmallı DNA	TLR9 bağışıklık uyarımı ve IFN- γ	Hepatit B
Matrix M*	QS 21 saponin, kolesterol ve fosfolipidler	Bilinmiyor.	COVID-19 Novavax

* Acil kullanım onayı verilmiştir.

1.4. Nanoaşı

Yıllar boyunca aşılarda geliştirilmesinde çeşitli nano boyutlu formülasyonlar araştırılmıştır. Aşıların geliştirilmesinde nano tabanlı sistemlerin kullanılması, geleneksel moleküler formülasyonlara göre çeşitli faydalar göstermiştir. Bu faydalar, nano-sistemlerin, kapsüllenmiş antijenlerin erken bozunmadan ve makrofajlar gibi hedef olmayan bölgelerden korunmasını sağlarken çeşitli aşı türlerinin verilebilmesini içerir. Ayrıca nanoteknolojinin boyut, morfoloji, çözünürlük gibi gerekli fizikokimyasal ve biyolojik özelliklere sahip nano boyutlu malzemelerin tasarımına ve geliştirilmesine izin vermesi, onu aşı taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesinde oldukça faydalı kılmaktadır. Bu nano boyutlu malzemelerin hedefleme parçalarıyla yüzey modifikasyonunun fagositik antijen sunan hücreler tarafından alımı arttırdığı bilinmektedir. Bu sistemler aynı zamanda antijenlerin ve adjuvanların immünojenikliğini geliştirirken antijen toksisitesini azaltabilir. Ayrıca, aşılar karşı bağışıklık tepkilerini güçlendiren adjuvanlar olarak da hareket edebilirler. Bu nano boyutlu formülasyonlar ayrıca termostabiliteyi sağlamak, böylece aşının etkinliğini artırmak ve aşı başarısızlıklarını azaltmak için kullanılmıştır. Termo-stabiliteye ek olarak, nano-boyut, bu formülasyonlara, istenen hücrelerde veya dokularda kolay hedefli alım yeteneği sağlar ve böylece virüse karşı optimal bir bağışıklık tepkisini tetikler.

Antijen iletimi için nano-taşıyıcıların kullanımı genellikle iki şekilde yapılır; antijenleri nanotaşıyıcıların içine veya yüzeyine yükleyerek. İki seçenek arasındaki seçim genellikle antijenlerin biyolojik stabilitesine, fizikokimyasal özelliklerine, hedef bölgelerine ve gerekli immünojen salımına bağlıdır. Polimerlere, ilaç yüklenmesi ve uygulaması kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Biyouyumluluk ve biyobozunurluk, ilaç salımı için polimer seçiminde çok aranan iki temel özelliktir. Bu sistemler, antijenlerin ve adjuvanların kontrollü salımını sağlama yeteneklerinden dolayı aşılar için taşıyıcı sistemler olarak da kullanılmıştır (Nwagwu ve ark., 2022).

Aşı antijeninin polimerik partiküller tarafından taşınması, kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve aşı tasarımında kullanılmıştır. Rekombinant proteinler gibi çözünür

antijenlerin, kısa yarı ömürleri nedeniyle nispeten daha az immünojenik oldukları bilinir. Bunun yerine, çözünür antijenin biyolojik olarak parçalanabilen bir polimerik matris içinde kapsüllenmesi, antijenin degradasyondan korunmasını ve etkili bir şekilde sunumunu sağlaması nedeniyle antijen sunan hücreler (APC'ler) tarafından artan hücrel alımı sergilemiştir (Patil ve ark., 2023).

Nanopartiküller virüslerle aynı boyut dağılımına sahiptir ve bu nedenle virüsler gibi nanopartiküller de virüs hedefli hücelere girebilir. Nanopartiküller, antijenle nükleik asitler (DNA ve mRNA) veya protein alt birimleri biçiminde yüklenebilir ve bu nedenle viral antijenin hedeflenen ekspresyonuna veya doğrudan taşınmasına izin verir. Son zamanlarda nanopartiküller, SARS-CoV-2 dahil olmak üzere çeşitli patojenlere karşı etkili aşılarda geliştirilmesi için büyük ilgi görmüştür. Etkili aşı yanıtları için, hem doğal hem de adaptif bağışıklık sisteminin senkronize olarak aktive edilmesi gerekir; bu, şimdi katı-lipid nanopartiküller, lipozomlar, polimerik nanopartiküller, protein nanopartiküller ve virüs benzeri partiküller (VLP) gibi yenilikçi nanoaşı formülasyonlarının yardımıyla başarılı bir şekilde elde edilmiştir. Adjuvanlar, hedef antijen sunan hücelere antijen verilmesine yardımcı olur ve hedef dışı yan etkileri azaltır böylece nanoaşı aracılı istenen bağışıklık tepkilerinde hayati bir rol oynar. Hedefli antijen iletimi, etkili bağışıklık tepkisini ortaya çıkarmak için gereken aşı dozunu azaltır. Nanoaşılar ayrıca, gelişmiş lipofiliklikleri nedeniyle hedef antijenin sürekli salınması avantajını sunar. Eşsiz fizikokimyasal özelliklere ek olarak, nanopartiküller, yüzeylerine hücre hedefli peptitler, proteinler veya polimerler dahil ederek yüzey mühendisliğinde esneklik sağlar. Antijenin lenfatik sisteme iletilmesi, aşı etkinliği için en ön gerekliliktir. Nanoaşıların bağırsak boşluğunu geçme ve lenfatik dokuya ulaşma yeteneği vardır (Machhi ve ark., 2020).

Antijenleri/ilaçları zorlu üretim süreçleri sırasında oluşan olası fiziksel baskılardan korumak için onlara ek bir koruyucu tabaka sağlamak çok önemlidir. Bunun, depolama ve nakliye sırasında fonksiyonel etkinliklerini en üst düzeye çıkarması beklenmektedir. Farklı aşılarda/ilaçların mikro/nano formülasyonlarının ana yapı iskelesi polimeri içinde kapsüllenmesi, doğal işlevselliklerini korumak için iyi araştırılmış bir stratejidir. Korumanın (fiziksel baskılara karşı) yanı sıra, ilaçları

mikro/nano formülasyonlarda kapsüllemek ayrıca istenen etkin madde salımının sağlanmasına yardımcı olur (Pahal ve ark., 2021).

Nanopartikül aşıları, antijenleri sürdürülebilir bir şekilde salma yeteneğine sahiptir, bu da antijenlerin bağışıklık sistemine daha uzun süre maruz kalmasına izin verir, böylece nanoaşıların adjuvan özellikleriyle birleşerek sürekli ve güçlü bir bağışıklık tepkisi ile sonuçlanır ve antijen sunan hücreler tarafından etkin bir şekilde alınmalarını sağlar (Sheng ve ark., 2021).

Polimerik nanopartiküller, geniş bir boyut aralığına (10-1000 nm) sahip koloidal sistemlerdir. Polimerik nanopartiküller, çekirdek içine yüklenebilen ve yüzeye konjüge edilebilen antijenin verimli kapsüllenmesi ve gösterilmesi için yüksek immünojenisiteye ve stabiliteye sahiptir. Ayrıca kontrol edilebilir boyutlara sahiptirler ve kendi kendilerine adjuvan olabilirler ve fagositoz veya endositoz yoluyla antijen sunan hücreler tarafından antijen alımının etkinliğini artırabilir. Nanoaşıların geliştirilmesi için kitosan ve dekstran gibi doğal polimerik nanomalzemeler ve PLA ve PLGA gibi sentetik polimerik nanomalzemelerin her ikisi de faydalı araçlardır (Feng ve ark., 2022).

Pek çok aşı, tam bağışıklamayı tamamlamak için birden fazla doz gerektirir, bu da ekonomik açıdan dezavantajlı ve tıbbi kaynağın yetersiz olduğu bölgelerde daha önemli olan enjeksiyona bağlı ağrı, nispeten yüksek maliyet ve karmaşık enjeksiyon planı nedeniyle ekonomik yüke ve düşük hasta uyumuna neden olabilir. Polimerik nanopartiküllere dayalı aşı taşıyıcı sistemler, benzersiz avantajlar göstermektedir. İlk olarak, polimer yapılarının çeşitliliği, çoklu bağışıklık moleküllerinin birlikte tesliminin gerçekleştirilmesi için bir temel sağlar. Çevreye duyarlı bileşenlerin dahil edilmesinin, farklı hastalıkların patolojik özelliklerine dayalı akıllı bir aşı taşıyıcı sistemi oluşturması beklenmektedir. İkincisi, bazı polimerler, bağışıklık modülasyon özelliklerinden dolayı bağışıklık adjuvanları olarak işlev görebilir. Ayrıca, boyut, sertlik, yük ve kimyasal bileşimi ayarlayarak polimerik nanopartikülleri tasarlama esnekliği, etkili aşı taşıyıcı platformu optimize etmeyi kolaylaştırır (Ding ve ark., 2021).

1.5. Nanopartikül Üretim Yöntemleri

Genel olarak, polimerik nanopartiküller, önceden oluşturulmuş polimerlerden veya monomerlerin doğrudan polimerizasyonu ile sentezlenir (Castro ve ark., 2022). Polimerik nanopartiküllere yüklenecek etken maddenin tipine ve uygulama yoluna bağlı olarak, nanopartiküllerin üretimi için farklı yöntemler kullanılabilir. Genel olarak, önceden sentezlenen polimerlerin dispersiyonu veya polimeri oluşturan monomerlerin polimerizasyonu olmak üzere iki ana metod kullanılır (Zielinska ve ark., 2020). Önceden oluşturulmuş polimerlerden kullanılan yöntemler, emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma, tuzlama, diyaliz, iyonik jelleştirme ve çözücü emülsifikasyon-difüzyondur. Öte yandan, polimerik nanopartiküller, mikro/nano emülsiyon, sürfaktan içermeyen emülsiyon ve arayüzey polimerizasyonu gibi çeşitli teknikler kullanılarak monomerlerin polimerizasyonu ile doğrudan sentezlenebilir. Sentez metodunun seçimi, polimerik yapının türü, uygulama yolu ve partikül boyutu gereksinimi gibi çeşitli parametrelerin modifikasyonu ile yapılmalıdır. Kural olarak, sentez yönteminin seçimi, aktif maddenin çözünürlük özelliklerine göre belirlenir (Castro ve ark., 2022). Önceden sentezlenen polimerlerin kullanıldığı yöntemlerin çoğunda, polimeri çözmek için genel olarak organik çözücüler kullanılır. Organik çözücüler, çevresel risk ve toksisite ile ilgili problemler oluşturabilir. Ayrıca nihai formülasyondan organik çözücü kalıntılarının uzaklaştırılması gerekir (Zielinska ve ark., 2020).

Önceden oluşturulmuş polimerler kullanılarak sentez, monomerlerin polimerizasyonundan polimerik nanopartiküllerin üretimine kıyasla kontrol kolaylığı ve daha yüksek verim sunar (Castro ve ark., 2022). Monomerlerin polimerizasyonu kullanılarak üretilen nanopartikül formülasyonları daha yüksek verim ve tek bir adımda yükleme avantajı ile etken maddelerin yüklenmesine izin verir. Kullanılan hazırlama yönteminden bağımsız olarak, ürünler genellikle sulu koloidal süspansiyonlar olarak elde edilir (Zielinska ve ark., 2020).

1.5.1. Solvent Evaporasyon Yöntemi

Solvent evaporasyon, önceden sentezlenmiş hazır bir polimerden polimerik nanopartikül oluşturmak için kullanılan ilk yöntemdir. Bu yöntemde, öncelikle bir su/ yağ emülsiyonu hazırlanır. İlk adım olarak, polimer organik bir çözücünde çözülür ve etken madde eklenir. Organik çözelti, sulu fazda bir sürfaktan ile emülsifiye edilir ve daha sonra yüksek hızlı homojenizasyon veya ultrasonikasyon kullanılarak işlenir. Emülsiyonun dış fazının evaporasyonu ile bir nanopartikül süspansiyonu elde edilir. Çözücü ya oda sıcaklığında sürekli karıştırılarak veya yavaş bir düşük basınç işleminde buharlaştırılır. Çözücü buharlaştıktan sonra, katılmış nanoparçacıklar yıkanabilir ve santrifüjleme yoluyla toplanabilir, ardından uzun süreli depolama için dondurarak kurutma yapılabilir (Castro ve ark., 2022 ; Zielinska ve ark., 2020).

1.5.2. Emülsifikasyon/Solvent Difüzyonu Yöntemi

Emülsifikasyon/solvent difüzyonu yöntemi, polimer ve etken madde içeren kısmen suyla karışabilen bir çözücü ile sürfaktan içeren sulu bir çözelti arasında bir y/s emülsiyonunun oluşturulmasıdır. Bu emülsiyonun iç fazı, önceden suyla karıştırılmış bir organik solvandır. Bu yöntemde fazla miktarda su ile seyreltme yapılarak oluşan damlacıklardan dış faza organik çözücü difüzyonunda artış olur ve sonuç olarak kolloidal partiküller elde edilir. Son aşamada buharlaştırma veya süzme yapılabilir. Bu yöntemin dezavantajları kolloidal dispersiyondan yüksek miktarda sulu faz çıkarılması gerekmesi ve hidrofilik etken maddenin sulu faza geçişi ve miktarındaki azalma riskidir (Zielinska ve ark., 2020).

1.5.3. Emülsifikasyon/ Tuz Etkisiyle Çözünürlük Azalması (Salting Out) Yöntemi

Emülsifikasyon/çözücü difüzyon yöntemi, emülsifikasyon/ters tuzlama yönteminin bir modifikasyonu olarak düşünülebilir. Tuz etkisiyle çözünürlük

azalması yöntemi, su ile karışabilen bir çözücünün sulu bir çözeltiden, nanopartiküllerin oluşumuyla sonuçlanabilecek bir tuz etkisi yoluyla ayrılmasına dayanır. Bu yöntemi diğer metoddan ayıran aseton veya etanol vb. suyla karışabilen organik çözücü ile oluşturulan y/s emülsiyonunun yapısıdır. Dış faz bir jel, tuzlama maddesi ve bir koloidal stabilizatör içerir. Bu yöntemde kullanılan tuzlama maddelerinin örnekleri arasında magnezyum klorür ($MgCl_2$), kalsiyum klorür ($CaCl_2$) veya magnezyum asetat [$Mg(CH_3COO)_2$] gibi elektrolitlerin yanı sıra elektrolit olmayan maddeler örneğin sukroz bulunur. Aseton ve su birbiriyle karışabilir ve bu da sulu fazı doyurarak azaltır, bu durum diğer su ile karışabilen fazlardan bir y/s emülsiyonunun oluşmasını sağlar. y/s emülsiyonu, yüksek hızda karıştırma altında, oda sıcaklığında hazırlanır. Daha sonra emülsiyon, nanopartiküllerin oluşumuna izin vermek için uygun hacimde deiyonize su veya sulu bir çözelti kullanılarak seyreltilir. Kalan organik çözücü ve tuzlama maddesi, çapraz akışlı filtrasyonla elimine edilir (Zielinska ve ark., 2020). Yüksek sıcaklık artışı gerektirmedikinden, ısıya duyarlı bileşikleri korumak için yararlı bir tekniktir. Bir dezavantaj olarak, nanoparçacıkların ve safsızlıkların çözünürlüğü birbirine yakın olabilir ve bu da etkinliği azaltır (Castro ve ark., 2022).

1.5.4. Nanopresipitasyon Yöntemi

Nanopresipitasyon veya çözücü yer değiştirme yöntemi olarak da bilinen bu yöntem ile nanopartikül üretimi için iki karışabilir çözücü gerektirir. İç faz, aseton veya asetonitril gibi diğer organik çözücülerle karışabilen ve bir organik çözücü içinde çözülmüş polimerden oluşur. Aseton veya asetonitril vb. çözücüler su ile karışmadığı için, evaporasyonla kolayca uzaklaştırılabilir. Bu methodda, organik çözücü lipofilik bir çözeltiden sulu faza geçiş yaparken polimer arayüzeyde çöker.

Polimer, suyla karışabilen bir çözücü içinde çözülür ve bu çözelti, sulu bir çözeltiye karıştırma altında (damla damla) veya kontrollü ekleme hızıyla adım adım eklenir.

Polimer çözeltisi sulu faza hızla difüze olur ve bu nedenle nanopartiküller su moleküllerinden kaçınmak için anında nanopartikül oluşturur. Çözücü oluşan nano boyuttaki damlacıklardan dışarı yayılırken, polimer nanokapsül veya nanoküre yapısı oluşturarak çöker. Genel olarak, organik faz sulu faza eklenir, ancak protokol ayrıca nanopartikül oluşumundan ödün vermeden tersine çevrilebilir. Genellikle, yüzey aktif maddeler koloidal süspansiyonun stabilitesini garanti etmek için sürece dahil edilebilir, ancak nanopartiküllerin oluşumunu sağlamak için bunların varlığı gerekli değildir (Zielinska ve ark., 2020).

1.5.5. İyonik Jelleşme Yöntemi

İyonik jelleşme, aljinat veya kitosan gibi hidrofilik iyonojenik polimerlere dayanan basit bir yöntemdir. Genellikle polielektrolitlerin zıt yüklü polielektrolitlerle kompleksleştirilmesi sonucunda proteinler, peptitler ve oligonükleotidler gibi makromolekülleri kapsüllemek için kullanılan bir süreçtir. Çözücü emülsifikasyon-difüzyon yöntemi, çözücü buharlaştırma yönteminin değiştirilmiş bir versiyonudur. Polimer, kısmen suda çözünür bir çözücü içinde çözülür ve her iki sıvının da termodinamik dengesini sağlayarak suyla doyurulur. Polimer çökmesi ve nanoparçacık oluşumunun meydana gelmesi için, organik çözücü suyla kısmen karışabilir olduğunda, dağılmış faz çözücünün fazla su ile yayılması gerekir. Avantajları arasında basit olması, iyi partikül boyutu dağılımı, iyi verim ve homojenleştirmeye gerek olmaması yer alır. Dezavantajı, süspansiyondan çıkarılması gereken büyük miktarda sudur (Castro ve ark., 2022).

1.6. Tez Çalışmasında Kullanılan Polimer ve Nanopartikül Üretim Yöntemi

Poli(etilen glikol)-blok-poli(ϵ -kaprolakton) (PEG-*b*-PCL), biyomedikal uygulamalar için kullanılan FDA onaylı nontoksik ve biyoyumlu polimerdir (Deng ve ark., 2019). (PEG-*b*-PCL) kopolimeri, biyobozunurluğu, biyoyumluluğu ve yükleme verimliliği sayesinde ilaç verme uygulamalarında kullanılan iyi bilinen bir amfifilik kopolimer sınıfıdır. Ayrıca, bazı kimyasalların kullanımı ve karmaşık

adımlar atıldığından, suda dağılabilen nanopartiküller oluşturmak için bu kopolimerin kullanılması konusunda kesinlikle büyük bir avantaj sunar (Risangud ve ark., 2022).

PEG monomer birimi, hem polar oksijen atomundan hem de polar olmayan $(CH_2)_2$ biriminden oluşur. Bu nedenle, PEG hem polar hem de polar olmayan çözücülerin geniş bir yelpazesinde çözünür ve suda çözünürlüğünü veya parçalanma özelliklerini geliştirmek için hidrofobik ilaçlar için bir taşıyıcı sistem olarak yaygın kullanıma sahiptir. Poli (PEG-PCL) kopolimerleri biyolojik olarak parçalanabilir, amfifiliktir, sentezlenmesi kolaydır ve ilaç taşıyıcı sistemlerinde potansiyel uygulamalara sahiptir. PEG-PCL'nin iki bloklu kopolimerinde, PEG'in hidrofilik doğası ve PCL'nin hidrofobik doğası nedeniyle PEG dış kabuğu ve PCL bir iç çekirdeği oluşturur. PCL (poli ϵ -kaprolakton), yarı kristal özelliği nedeniyle düzenli bir yapıya sahiptir ve vücutta implante edilebilir bir biyomateryal olarak kullanılmasına yardımcı olan ester bağlarının hidrolizi ile insan vücudunda bozunmaya uğrar. Uzun süreli implante edilebilir yapılar, PCL'nin yavaş bozunma profili özelliğine sahip olarak hazırlanabilir. PCL'nin yüksek erime noktası ve düşük cam geçiş sıcaklığı, amorf bölgenin kauçuksu durumda olması nedeniyle insan sisteminde yüksek dayanıklılık ile sonuçlanan yarı kristal yapı ile sonuçlanır. Ayrıca PCL'nin biyoyumumluluk ve biyobozunurluk gibi özellikleri, kontrollü ilaç verme uygulamaları için çok uygundur. PCL geniş bir ilaç yelpazesine afiniteye sahip olduğundan, ilaçlar formülasyon matrisinde eşit olarak dağılır, böylece ilaç salımının birkaç gün/aya varan uzun vadeli bozunmasını kolaylaştırır. PCL'nin bozunması, bir asidik yan ürün ile sonuçlanmaz bu da onu diğer polimerlerden daha üstün kılar. Yavaş bozunma ve yumuşak dokularla daha az biyoyumumluluk, PCL'yi klinik uygulamalarda çok yetkin kılar. PCL'nin iyileştirilmesi, istenmeyen uzun vadeli bozunmasını artıran PEG gibi hidrofilik polimerlerle kopolimerizasyon şeklinde yapılmıştır. PEG-PCL diblok kopolimerleri, hem PEG hem de PCL'nin avantajlarına sahiptir; biyoyararlanımda artış, yüksek ilaç yükleme ve kapsülleme etkinliği, hedef bölgeye ulaşırken moleküler boyutta düşüş ve patlama deşarjı, kanda maksimum kullanım için mevcut ilacı dışarı çekme ve görünmezlik yeteneği. PEG-PCL koblok

polimerik nanopartiküller, proteinler için taşıyıcılar olarak da kullanılmıştır (Behl ve ark., 2020).

Yukarıda bahsedilen avantajları sebebiyle nanopartikül üretimi için Poli(etilen glikol)-blok-poli(ϵ -kaprolakton) (PEG-*b*-PCL) kullanılmıştır.

Nanopartikül üretim metodu olarak da solvent evaporasyon metodu kullanılarak su/yağ/su emülsiyonu oluşturulmuştur.

1.7. Cilt Anatomisi

Deri, sahip olduğu 1.8 m²'lik alanla insan vücudunun en büyük organıdır. Çok yönlü bir organdır. Vücudu su kaybına, kimyasallara, mikroorganizmalara, ultraviyole (UV) ışınlar ve patojenlere karşı korur. Yapısında bulunan antijen sunan birimler sayesinde, aynı zamanda immünolojik yanıtlar için bir ateşleme pimi görevi görür (Karim ve ark., 2022 ; Sheng ve ark., 2021; Yu ve ark., 2022). Derinin üç ana tabakası, stratum corneum, dermis (orta tabaka) ve hipodermis (en iç tabaka) barındıran epidermistir. Bu tabakalar, iç organları mekanik basınç ve toksinler gibi çeşitli dışsal etkilerden korur (Karim ve ark., 2022).

Deri, üç önemli katmandan oluşan çok boyutlu bir organdır. İlk deri tabakası, epidermis tabakası, yaklaşık 150-200 mm kalınlığındadır ve canlı hücrelerden oluşur. Hücre keratinizasyon derecesine göre beş tabakadan oluşur: stratum corneum (SC, boynuz katman), stratum lucidum (berrak katman), stratum granulosum (granüler katman), stratum spinosum (dikenli katman) ve stratum germinativum (bazal katman). En dıştaki tabaka stratum corneum (SC) (10-20 μ m), olarak adlandırılır. Stratum corneum tabakasının altında, keratinositleri ve melanositleri içeren canlı epidermis tabakası bulunur. Bu katman, ilaca bağlanma, metabolizma, aktif taşıma gibi eylemlerin çoğundan sorumludur. Bu katman ayrıca Merkel ve Langerhans hücreleri gibi özel hücreler içerir. İkinci cilt tabakası dermistir (3-100 mm). Bu tabakada bağ dokusu, damar dokusu, lenfatik damar ağı, ter ve sebum bezleri, saç

kökleri ve makrofajlar gibi farklı işlevlere sahip hücreler bulunur. Bu katman aynı zamanda fibroblastların varlığı nedeniyle cilde yapısal destek sağlar. Üçüncü deri tabakası, hipodermis (subcutis), gevşek bağ dokusu içeren dermis tabakasını takip eder. Burada bulunan başlıca hücreler, soğukta vücut ısısının regülasyonunda ve dış etkenlere karşı korumada görevi alan yağ depolama işlevi gören adipositlerdir (Guillot ve ark., 2020).

1.8. İntradermal Aşılama

Epidermis ve dermiste bulunan keratinositler, Langerhans hücreleri, dermal dendritik hücreler, makrofajlar, mast hücreleri ve derideki lenf düğümlerindeki T ve B lenfositleri cildin bağışıklık sistemini oluştururlar (Sheng ve ark., 2021).

İntradermal bağışıklama, olumsuz sistemik bağışıklık tepkisini azaltmak için cilde lokal olarak antijen ve adjuvan verilmesine olanak sağlayan yeni bir aşılama stratejisidir. Bu yöntem, enjeksiyon ile aşılanmanın dezavantajlarını aşabilir. Bununla birlikte, stratum corneum'un bariyer işlevi nedeniyle antijenlerin stratum corneum'dan geçerek aktif epidermal tabakaya ulaşması zordur. Transdermal etkiyi artırmaya yönelik yöntemler arasında kimyasal yöntemler olarak yüzey aktif maddeler ve ozmotik arttırıcılar olarak lipozomlar kullanılırken fiziksel yöntemler arasında iyontoforez, elektroporasyon ve mikroiğne yer alır. Mikroiğne teknolojisi, stratum corneumun bariyer fonksiyonunun üstesinden gelebilir ve makromoleküler yapıdaki antijenlerin etkili transdermal iletimini teşvik edebilir (Yu ve ark., 2022).

Aşı intradermal yolla uygulandığında, epidermis ve dermisteki antijen sunan hücreler etkili bir şekilde onu alır ve T hücrelerinin hazırlanması için yardımcı hücrelerin yardımıyla lenf düğümlerine göç eder. Daha sonra, T hücreleri, B hücrelerini aktive eder ve B hücrelerini plazma hücrelerine dönüştürür. Plazma hücreleri çoğalır ve büyük miktarlarda antikör salgılar. B hücreleri ayrıca, hedef antijenle yeniden temasa geçerek ve ardından patojene karşı hedef alan antikörleri hızla salgılayarak etkinleştirilen bir bellek tipi üretir (Sheng ve ark., 2021).

1.9. Mikroigneler

Mikroigneler tipik olarak, bir destek tabanının veya yamanın tek bir tarafına yerleştirilmiş, yüksekliği 2000 µm'den kısa olan çoklu mikroskobik çıkıntılardan oluşur. Literatürde mikroigne dizileri veya mikro dizi yaması olarak da adlandırılırlar (Vora ve ark., 2021). Mikroigneler cilt bariyeri içine ilaç penetrasyonunu artırmak için en yaygın olarak araştırılan fiziksel cilt penetrasyon aracıdır. Geleneksel hipodermik iğnelerin aksine, mikroigneler, cildin en dış tabakasını, ilaçların transdermal penetrasyonu için birincil bariyer görevi gören stratum corneum'u kıran minimal invaziv cilt delme cihazlarıdır. Mikroigneler, stratum corneum boyunca mikrokannallar oluşturarak, ilaç moleküllerini epidermal tabaka boyunca ağrı hissi oluşturmadailetme potansiyeline sahiptir. Bu, deriden absorpsiyonu sınırlı olan ilaçlar da dahil olmak üzere geniş bir ilaç yelpazesinin intradermal yolla hedef bölgelere iletilmesine izin verir. Mikroigneler ayrıca, enkapsüle olmuş ilaçları biyolojik degradasyondan koruyarak stabilitesini arttırabilir, steril uygulama ve soğuk zincir depolama ihtiyacını azaltabildiği için de çok çeşitli uygulamalar için umut verici bir taşıyıcı sistem haline gelmiştir (Ali ve ark., 2022).

Mikroigneler, ağrıyı en aza indirme, düşük maliyetli ve daha ucuz üretim, iğne fobisini ortadan kaldırma, daha hızlı ilaç verme, kontrollü ilaç verme ve kendi kendine uygulama gibi birçok avantaja sahiptir (S.B.V.J. & Mannayee, 2022).

Mikroigneler, küçük moleküler ilaçlar, peptidler/proteinler ve nükleik asitler gibi küçük boyutlu ilaçlardan büyük boyutlu nanopartiküllere, virüslere, eksozomlara, mikroparçacıklara ve hatta yüzlerce mikrometre boyutundan dolayı hücrelere kadar çok çeşitli etken maddenin iletilmesine yardımcı olabilir (Le ve ark., 2022).

1.9.1. Mikroignelerin Sınıflandırılması

Mikroignelerin sınıflandırılması, gerçekleştirdiği işleve göre yapılmıştır. Mikroigneler genel olarak beş kategoride sınıflandırılabilir:

1. Katı mikroigneler,
2. Kaplanmış mikroigneler,
3. Çözünen mikroigneler,
4. İçi boş mikroigneler ve
5. Hidrojel oluşturan mikroigneler (Guillot ve ark., 2020).

1.9.1.1. Katı Mikroigneler

Katı mikroigneler cildin stratum corneum (SC) tabakasını delerek ve epidermin en derin katmanlarına ulaşarak geçici mikrokanallar oluşturur. Mikroigneler tarafından cilt bariyerinin bozulmasının ardından, bu mikro kanallardan pasif difüzyon için bir harici ilaç rezervuarı olarak cilde geleneksel bir transdermal yama, ilaç solüsyonu veya jel uygulanır. Bu uygulamanın birincil dezavantajı, iki aşamalı bir uygulama gerektirmesidir. Ek olarak, mikroigneler tarafından üretilen mikro gözenekler hızla kapanarak ilaç geçirgenliğinin azalmasına neden olur. Katı mikroigne üretmek için kullanılan suda çözünmeyen ve mekanik olarak sağlam malzemeler klasik olarak silikon, metaller ve polimerlerdir. Silikon ve metal bazlı mikroigneler hastanın cildinden çıkarıldıktan sonra katı kalabilir, bu da uygunsuz yeniden kullanım tehlikelerine ve kontaminasyona neden olabilir (Vora ve ark., 2021).

1.9.1.2. Kaplanmış Mikroigneler

İki aşamalı bir uygulama sürecinden kaçınmak için, kaplanmış mikroigneler elde etmek için katı mikroignelerin yüzeyi ilaç formülasyonu ile kaplanır. Kaplanmış

mikroiğneler, transdermal ilaç iletimi için daha uygun ve kontrol edilebilir bir yol sağlar. Kaplanmış mikroiğneler yerleştirildiğinde, kaplama tabakası çözülür ve etkin maddeleri cilde bırakır, uygulamanın ardından mikroiğneler çıkarılabilir. Kaplanmış mikroiğneler tipik olarak metal veya silikondan hazırlanır. Biyouyumlu malzemelerin kullanılmasını artırmak amacıyla, polimerik kaplanmış mikroiğneler de geniş çapta araştırılmıştır. Bu amaçla hazırlanan mikroiğneler, cilde yerleştirildiğinde yapısal bütünlüğünü koruyabilen güçlü mekanik dayanıklılığa sahip bir polimer tarafından hazırlanır (Liu ve ark., 2021).

1.9.1.3. Çözünen Mikroiğneler

Çözünen mikroiğneler, ilaçları veya partikülleri suda çözünür bir polimer matrise enkapsüle edecek şekilde ve cilde uygulandıktan sonra, formülasyona göre değişen bir çözünme süresiyle tamamen çözünecek şekilde tasarlanmıştır. Kaplanmış mikroiğnenin aksine, çözünen mikroiğneler, kullanımdan sonra herhangi bir biyolojik olarak tehlikeli kesici atık bırakmadan ciltte çözünecek şekilde oluşturulmuştur. Bu yaklaşımda, ilaç formülasyonları deriye yerleştirildikten sonra çözünen mikroiğne matrisinden polimer bileşimine bağlı olarak yavaş veya hızlı olarak zamanla salınabilir (Vora ve ark., 2021). Çözünebilir transdermal mikroiğneler, çok çeşitli aktif bileşikleri cilde taşımak için kullanılan umut verici mikro cihazlardır (Ali ve ark., 2022).

Çözünen mikroiğneler genellikle, iğne matrisinin çözülmesiyle ilaçları cilde etkili bir şekilde iletebilen, iğnelere dahil edilen terapötik maddelerle birlikte çözünebilir malzemelerden hazırlanır. Dekstran, karboksimetilselüloz sodyum tuzu, hyaluronik asit (HA), kondroitin sülfat, polivinilpirolidon (PVP) ve polivinilalkol (PVA) dahil olmak üzere düşük moleküler ağırlıklı karbonhidratlardan yüksek moleküler biyolojik olarak parçalanabilir polimerlere kadar çözünen mikroiğneleri hazırlamak için birçok malzeme kullanılır (Liu ve ark., 2021).

1.9.1.4. İçi Boş Mikroİğneler

Gelişmiş mühendislik tekniklerinin yardımıyla, içi boş mikroİğneler, ilaçları kontrollü bir basınçla yönlendirilen akış yoluyla intradermal olarak vermek için tasarlandı. İçi boş mikroİğne yaklaşımı, bir ilaç solüsyonunu veya partiküllerini mikroİğnelerle ağrısız bir şekilde deriye vermek için tasarlandı. Bu tür mikroİğneler, basınç veya difüzyon veya elektrikle aktive edilen akış gibi farklı teknikler kullanılarak ilaçların mikroİğne yoluyla deri veya oküler boşluk boyunca sürekli olarak verilmesine izin verir. Bu sistem katı, kaplanmış ve çözünen mikroİğnelere kıyasla daha büyük miktarlarda ilaç maddesi verme yeteneğine sahiptir. Bununla birlikte, kullanımlarındaki önemli bir kısıtlama, dermal doku girişi sırasında iğne açıklıklarının potansiyel olarak tıkanması ve akış direncidir, dolayısıyla bu durum ilaç salımını azaltır. Bu nedenle, mikroİğne tasarımları cilde yerleştirildikten sonra iğneleri tıkamadan optimum iyi bir sıvı akış modeli elde etmek için araştırılmıştır. İçi boş mikroİğneler, silikon ve metal, cam, polimerler ve seramik dahil olmak üzere çeşitli malzemelerden üretilir (Vora ve ark., 2021). İçi boş mikroİğnelerin daha karmaşık bir üretim teknolojisine ihtiyaç duyması ve ilaç rezervuarı ile birleştirilmesi gerekliliği dezavantajları arasındadır (Liu ve ark., 2021).

1.9.1.5. Hidrojel Oluşturan Mikroİğneler

Hidrojel oluşturucu mikroİğneler, hidrojel oluşturucu polimerlerden hazırlanan yeni geliştirilmiş bir mikroİğne türüdür. Hidrojel oluşturan mikroİğne sistemi, mikroİğne taban plakasının üstünde bir ilaç rezervuarı (film veya tablet şeklinde) ile entegre edilmiştir ve ilaç uygulaması, mikroİğnede yüklü olanla sınırlı değildir. Bu nedenle, miligram dozda etkin maddeler bile nispeten küçük bir yama aracılığıyla bile verilebilir. Entegre ilaç rezervuarı-mikroİğne yamasının cilde uygulanmasından sonra, iğne uçları intradermal boşluktan interstisyel sıvıyı hızla emer ve ardından ilacın şişmiş mikroİğneden yayılmasına izin verir. Ayrıca, hidrojel oluşturan mikroİğnelerden ilacın interstisyel sıvıya absorpsiyon hızı ve salım kinetiği, hidrojel oluşturan mikroİğnelerin polimerik bileşimi ve şişme özellikleri değiştirilerek kontrol

edilebilir. Bu tür mikroiğnelerin çarpıcı özelliği, deriden bozulmadan çıkarılmaları ve geride ölçülebilir bir polimer kalıntısı bırakmamasıdır. Bununla birlikte, yeniden uygulamayı engelleyecek kadar yumuşak bir hal alırlar, böylece çapraz kontaminasyon riskini azaltırlar. Bu sistemler, Gantrez® AN-139 (metil vinil eter ve maleik anhidrit), Gantrez® S-97 (metil vinil eter ve maleik asit) ve polivinil alkol (PVA) dahil olmak üzere çeşitli polimerik malzemelerin sulu karışımları kullanılarak üretilir (Vora ve ark., 2021).

1.9.2. Mikroiğnelerin Üretim Yöntemleri

Mikroiğneleri üretmek için kullanılan malzemeler, immünojenik, tahriş edici, korozyif olmayan; biyouyumlu ve yüksek gerilme ve mekanik dayanıma sahip olmalıdır. Şu anda silikon, cam, seramik, metal (titanyum, nikel), polimer ve diğer malzemeler mikroiğnelerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Malzemeye bağlı olarak, mikroiğneleri üretmek için en yaygın kullanılan yöntemler lazerle kesme, atomize püskürtme, mikro kalıplama, damlacıkla taşınan hava üfleme, üç boyutlu (3D) baskı, sıcak kabartma, derin reaktif iyon aşındırma ve elektrokimyasal işlemdir (Jin ve ark., 2022).

Silikon, cam, metal, seramik, polisakkarit ve çeşitli polimerler (çözünen, biyodegradabl ve çapraz bağlanan polimerler) dahil olmak üzere mikroiğneleri üretmek için geniş çapta test edilmiş altı ana malzeme türü vardır.

Polimer malzemelerin esnekliği, düşük üretim maliyeti ve üretim kolaylığı nedeniyle mikroiğne üretimi için silikon, cam, metal, seramik ve şeker malzemelerine göre polimer kullanmanın avantajları vardır. Polimerler ağırlıklı olarak katı, çözünen/biyobozunur ve hidrojel oluşturunucu mikroiğneler üretmek için kullanılır. Çözünen/biyobozunur polimerler arasında sentetik polimerler, doğal polisakkaritler, polipeptitler ve çeşitli protein polimerleri bulunur. Doğal polimerlerin metabolitleri toksik değildir ve insan vücudundan güvenli bir şekilde elimine edilebilir. Yaygın olarak kullanılan polisakkaritler arasında kitosan,

hyaluronik asit (HA), kondroitin sülfat, pullulan, karboksimetil selüloz ve hidroksiproil metil selüloz bulunur. Jelatin, kollajen, zein ve ipek fibroinin polipeptitleri ile de mikroıǵnelerin üretimi rapor edilmiştir. Doğal polimerlere ek olarak, poli(laktik asit) (PLA), poli(metilvinil eter-ko-maleik asit) (PMVE/MA), poli(vinil alkol) (PVA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli(vinil pirolidon) (PVP) ve poli(glikolik asit) (PGA) yoğun bir şekilde araştırılmıştır (Le ve ark., 2022).

Deri, önemli bir gerilme mukavemetine sahip elastik bir organdır. Mikroıǵnelerin etkili bir şekilde nüfuz edebilmesi için, yerleştirme sırasında çatlamadan veya kırılmadan nüfuz etmek için optimum güce sahip olmaları gerekir. Bu nedenle, mikroıǵnelerin üretimi zorlu bir iştir. Üretim metodolojisi, seçilen malzemeye, mikroıǵne geometrisine ve yüzey derinliğı gereksinimine göre değışir. Örneğın, polimerik mikroıǵneler için solvent dökümü uygun olabilirken, metal mikroıǵneleri tasarlamak için mikroeletromekanik sistemler daha iyi bir seçenektir. Üretim teknikleri, üretim için kullanılan teknolojiye göre sınıflandırılmıştır (Nagarkar ve ark., 2020).

1.9.2.1. Çözücü (Solvent) Kullanılarak Polimerik Mikroıǵne Üretimi

1.9.2.1.1. Mikro Kalıplama

Mikro kalıplama yöntemi, kolay üretimi, maliyet etkinliğı ve sanayileşme potansiyeli nedeniyle mikroıǵne imalatında en çok kullanılan yöntemdir. Mikro kalıplama yöntemi altı ana adımdan oluşur:

1. MN'lerin erkek kalıbının üretilmesi;
2. Bir dişi MN kalıbının hazırlanması;

3. Polimer solüsyonunu dişi kalıplara dökmek ve polimer solüsyonunu santrifüjleme veya polimer solüsyonunu dişi kalıpların oyuklarına doğrudan vakumlayarak deliklere dolmaya zorlamak;
4. Santrifüjleme veya vakumla kabarcıkların çıkarılması;
5. Mikroİğneleri kurutma veya çapraz bağlama yoluyla kütleme;
6. Mikroİğnelerin dişi kalıplardan çıkarılması.

Adım 2'de dişi mikroİğne kalıbını hazırlamak için en yaygın kullanılan malzeme, mükemmel stabilitesi, iyi kopyalama yeteneği ve düşük derecede yapışması (Mikroİğneleri dişi kalıptan soymak için faydalıdır) temelinde polidimetilsiloksandır (PMDS). İlaç veya ilaç yüklü mikropartiküller ve nanopartiküller polimer çözeltisiyle karıştırarak ve ardından karışımı kalıba zorlayarak yüklenebilir (Yang ve ark., 2022).

Mikro kalıplama, pektinden (doğal polimerler) PVA ve PVP'ye (sentetik veya yarı sentetik polimerler) kadar çeşitli polimerleri imal etmek için kullanılır. Teknik, bir sıvı polimerik çözeltiyi kalıba düzgün bir şekilde dökmek ve ardından hava boşluklarını ortadan kaldırmak için çoklu yaklaşımlardan yararlanır. Hava boşluklarının çıkarılması, bir vakum (veya alternatif olarak bir santrifüj) kullanılarak, ardından bir etüvde kurutma ve nihai olarak kalıptan çıkarma ile kolaylaştırılabilir (Nagarkar ve ark., 2020).

1.9.2.1.2. Kalıpları Doldurmak İçin Atomize Püskürtme

Mikro kalıplama teknikleriyle sürekli mikro iğne üretimi, santrifüjleme veya vakumlama adımı nedeniyle zor olabilir. Bunun üstesinden gelmek için polimer çözeltisinin kalıplara atomize püskürtülmesi yöntemi geliştirilmiştir (Nagarkar ve ark., 2020).

1.9.2.1.3. Damlacık Kaynaklı Hava Üfleme (DAB)

Bu yöntemde, polimer damlacığına hava üfleme kullanılarak mikroiğne şekli verilir ve ısı ve UV ışıması gibi harici sert koşullar kullanılmadan yumuşak koşullar sağlanır. İşlem, çözeltinin üst ve alt olmak üzere iki farklı plakaya dağıtılmasıyla başlar. İki plaka temas halinde tutulur ve kademeli olarak birbirinden ayrılır, böylece viskoz çözelti uzar. Uzatılmış viskoz çözelti daha sonra kontrollü koşullar altında üfleme havasına maruz bırakılır. Bu kurutma aşamasında gerekli şekil verilir. Mikroiğne başına tek bir polimer damlası, damlacığın boyutunu ve konsantrasyonunu ve ayrıca ilaç kaybı olmadan kontrollü ilaç yüklemesini kontrol etmek için kullanılır (Nagarkar ve ark., 2020).

1.9.2.1.4. Pipet Çekme

Pipet çekme tekniği yalnızca içi boş cam mikroiğnelerin üretimi için geçerlidir. Cam yüksek sıcaklıklara maruz bırakıldıktan sonra sıcak cam mikropipet çekici ile çekilerek mikroiğne dizileri oluşturulur. Bu teknik, çekme işleminin programlanabilir hali kullanılarak daha sağlam ve tutarlı hale getirilebilir (Nagarkar ve ark., 2020).

1.9.2.2. Elektromanyetik/Mikrosistem/Lazer Teknolojisi

1.9.2.2.1. Mikroelektromekanik Sistemler (MEMS)

Mikroelektromekanik sistemler ya da kısaca MEMS geleneksel olarak entegre devre teknolojisinin oluşturulması için kullanılmıştır. MEMS, (1) biriktirme, (2) desenleme, (3) aşındırma olmak üzere aşağıdaki ana işlemlere ayrılır (Nagarkar ve ark., 2020).

1. Biriktirme, substrat adı verilen bir temel malzeme üzerinde film oluşumunu içerir. Filmler fiziksel veya kimyasal bir işlemle oluşturulur. Fiziksel biriktirme tekniğinde, malzemeler kaynaktan uzaklaştırılır ve alt tabaka üzerinde biriktirilirken, kimyasal biriktirme tekniğinde sıcak alt tabaka ve taşıyıcı gazlar haznede kimyasal olarak reaksiyona sokulur.
2. Modelleme işlemi, mikroiğne geometri modelinin aktarılmasını içerir, örn. film üzerinde yükseklik, taban genişliği, uç açısı, delik boyutu vb. parametreleri ayarlanır. Litografi, desenleme için kullanılan yaygın bir işlemdir. Kısaca, ışık gibi bir radyasyon kaynağı, ışığa duyarlı bir substrat üzerine çarparak bir mikroiğne deseni aktarır. Radyasyon kaynağı elektron ışını litografisi, iyon ışını litografisi veya X-ışını litografisi gibi farklı olabilir. Yaygın olarak kullanılan fotolitografidir. Işığa duyarlı kaplanmış substrat üzerine aktarımda genellikle aşağıdaki sıralı adımlar yer alır:

İlk adım, buhar veya nemlendirilmiş oksijen varlığında ısıtılarak oksit tabakasının oluşturulmasını içerir. Bunu, ışığa duyarlı/fotorezist veya dirençli malzeme (UV radyasyona duyarlı) olarak bilinen ince bir organik polimer tabakasının döndürülerek kaplanması takip eder. Daha sonra solventi uzaklaştırmak için dirençli tabakaya ısı uygulanır. Bunu, UV ışınına maruz bırakma takip eder ve bu görüntünün dirençli kaplı gofrete benzeyen yapı üzerine neredeyse mükemmel bir şekilde aktarılmasına/ basılmasına olanak tanır.

1. Aşındırma, ilgilenilen bir mikroiğne tasarımı oluşturmak için alt tabakanın korumasız kısımlarını aşındırmak için sert bir yakıcı madde kullanılması işlemidir. Aşındırma ıslak ve kuru bir teknikle yapılabilir.
 - Kuru işlem, reaktif iyon veya iyon ışını öğütme gibi aşındırma yöntemlerini içerebilir. Kuru aşındırma işlemi ile katı ve içi boş mikro iğneler üretilir.
 - Islak aşındırma işleminde, alt tabaka kimyasal sıvıya daldırılır ve bu da ekstra maddenin ortadan kaldırılmasına yardımcı olur. Metalik ve silikon mikroiğneleri üretmek için kullanılır (Nagarkar ve ark., 2020).

1.9.2.2.2. Lazer Kesim

Bu yöntemde, metalik levhaları mikroığneler şeklinde kesmek için kızılötesi bir lazer kullanılır. AutoCAD yazılımı, mikroığnenin geometrisini tasarlamak için kullanılır. Lazer ışını daha sonra, düzlem mikroığne üreten tasarıma göre metal levhayı kaldırır. Üretilen mikroığneler temizlenir ve sacın 90° açısında bükölür. Uçlar daha sonra elektro-parlatma ile ayarlanır. Bu yöntem, metalik mikroığnelerin imalatı için kullanılır. En sık kullanılan malzeme paslanmaz çeliktir (Nagarkar ve ark., 2020).

1.9.2.2.3. Lazer Ablasyonu

Adından da anlaşılabacağı gibi, bu yöntemde lazer bir metal plakaya çarparak bir çıkıntı oluşturur. Bir mikroığne oluşturmak ve çıkıntıya tanımlanmış bir şekil vermek için ışık darbeleri kullanılır. Lazer kesmeye benzer şekilde, katı metalik dizilerin üretilmesi için lazer ablasyon da kullanılır. Tantal gibi metaller de üretilir (Nagarkar ve ark., 2020).

1.9.2.2.4. Derin Röntgen Litografisi

Bu teknikte, bir polimer çözeltisi kaplanır ve silikon gofret yapısındaki madde üzerinde kurlenir. Silikon gofret dikey derin röntgen ışınına maruz bırakılarak bir dizi üçgen sütun ve kanal oluşturulur. X-ışını maskesi ve substrat, istenen mikroığne geometrisini sağlamak için sürekli olarak ayarlanır ve hizalanır. Bu teknik, yüksek hassasiyetli içi boş mikroığneler için kullanılır. Metalik, polimerik ve seramik ve cam mikroığne dizileri üretilir (Nagarkar ve ark., 2020).

1.9.2.3. Katmanlı Üretim

1.9.2.3.1. İki Foton Polimerizasyonu

İki fotonlu polimerizasyon, düşük maliyetle yüksek verim sunan üç boyutlu yapıların katman katman üretim sürecidir. Reçinelerin mikroiğne yapısına polimerizasyonu için femtosaniye veya pikosaniye lazer darbeleri uygulanır. Polimerizasyon, lazer odak noktasında ortalanan bir enerji üreten iki foton absorpsiyonu ile başlatılır. İstenen yapı öncelikle bilgisayar destekli tasarım (CAD) modeli yardımıyla dilimlenir. Daha sonra, her katman için doldurulacak kontur için lazerin yolunu eski haline getirerek ışığa duyarlı reçineye yazılır. Mikroiğnenin imalatından sonra, reçine bir çözücü ile yıkanır ve ultraviyole ışık kullanılarak sertleştirilir (Nagarkar ve ark., 2020).

1.9.2.3.2. Mikrosterolitografi (μ SL)

Mikro-sterolitografi (μ SL), yüksek verimli bir üretim tekniğidir. Aşağıdan yukarıya ekleme tarzında 3D mikro yapılar oluşturur. Bu teknoloji, biyomedikal ve doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Üretim, bir sıvının fotopolimerizasyon yoluyla uzamsal olarak katılaşmasının kontrol edilmesiyle yapılır. Lazer ışını, bir reçinenin yüzeyinde, reçinenin belirli bir derinliğe sahip olmasına neden olan mikroiğne deseni oluşturur. Bu, bir destek platformuna bağlı kalmaya yardımcı olur. Birinci katmanın foto-polimerizasyonunu ayırma ve yeniden hizalama takip eder ve bundan sonra ilk inşa edilen katmanın yeniden kaplanması gerçekleşir. Desen bu ikinci katmanda kürlenir. Bu adımlar katı, üç boyutlu bir nesne oluşturmak için tekrarlanır (Nagarkar ve ark., 2020).

1.9.2.3.3. Sürekli Sıvı Arayüzü (CLIP)

Sürekli sıvı arayüzü, mikroiğneleri sayısal olarak tasarlamak için kullanılır. Yukarıda belirtilen geleneksel katman katman yaklaşımına karşı sürekli ekleme yöntemini kullanan yeni bir yaklaşımdır. Sürekli sıvı arayüzü yönteminin geleneksel yaklaşıma göre ana avantajı, önemli ölçüde daha yüksek çözünürlükte mikroiğneler üretmesidir. Sürekli sıvı arayüzü işlemi temel olarak herhangi bir mikroiğneli yamayı iki ila 10 dakikada tasarlamak için kullanılabilir. Bu yaklaşım, mikroiğne tasarımı ve boyut, şekil ve bileşim gibi çeşitli sayıda farklı parametrelerin bir üretim sürecinde araştırılmasını sağlayan hızlı prototipleme için büyük esneklik sağlar (Nagarkar ve ark., 2020).

1.9.3. Mikroiğne ve Aşı Uygulaması

Aşıların hastalıkları önlemede etkili olmasına rağmen, hala pek çok insan aşılamayı reddetmekte veya ertelemektedir (Sheng ve ark., 2021). Çoğu aşı, bir iğne ile intradermal veya intramüsküler uygulanır ve bu da hastaları iğnelerden ve enjeksiyon yerlerinde ağrıdan korkutur (Rai ve ark., 2023). Parenteral enjeksiyonların yaygın kullanımına rağmen, iğne fobisi ve atılan iğnelerin neden olduğu sorunlar da dahil olmak üzere iğneler ve şırıngalarla ilgili sorunlar artmaktadır (Jose ve ark., 2022). Bu sorunları ele almak için araştırmacılar dikkatlerini, ilaçları deriden ağrısız ve minimal invaziv bir şekilde taşıyarak oral veya subkutan enjeksiyonlara bir alternatif olarak ortaya çıkan transdermal ilaç taşıyıcı sistemlerine vermişlerdir (Sheng ve ark., 2021). Deride makrofajlar, dermal dendritik hücreler ve Langerhans hücreleri gibi çok sayıda antijen sunan hücre popülasyonları vardır ve bu da cildi immünomodülasyon için benzersiz bir hedef haline getirir (Liu ve ark., 2021).

Aşı uygulaması için mikroiğnelerin kullanılması yeni bir yaklaşımdır. Genel olarak, kendi kendine uygulanan mikroiğne bazlı aşılar, pandemiler sırasında büyük ölçekli aşılamalar için çekici olan bir teknik olasılığını sunar. Hasta dostu olmanın

yanı sıra, mikroiğneler bir dizi viral ve bakteriyel enfeksiyona karşı güçlü bir bağışıklık tepkisini geliştirmede etkilidir (Jose ve ark., 2022).

Mikroiğneler kullanılarak aşı uygulamasıyla indüklenen bağışıklık tepkisi, geleneksel aşı uygulamasıyla (kas içi enjeksiyon) sağlanandan önemli ölçüde daha iyidir. Bunun nedeni, Langerhans hücreleri ve dermal dendritik hücreler gibi insan derisinde bulunan çok sayıda antijen sunan hücrelerdir. Antijen sunan hücreler olarak, her iki hücre tipi de yabancı antijenler tarafından uyarıldığında antijeni alır ve sonra drenaj yapan lenf düğümlerine göç eder, böylece T lenfositlerini aktive eder ve güçlü bir bağışıklık etkisi gösterir (Jin ve ark., 2022).

Aşıların verilmesi için mikroiğnelerin kullanılması, derinin yapısı nedeniyle nadiren ağrıya veya kanamaya neden olur. Deri altı, deri içi veya kas içi olsun, şırınga iğneleri dermisteki veya deri altı dokudaki sinirleri ve kan damarlarını uyararak ağrıya ve kanamaya neden olabilir. Bununla birlikte mikroiğneler, aşırı belirli bir derinlikte deriye vermek için epidermise nüfuz eder. Küçük boyutları nedeniyle, mikroiğneler daha az kan damarı ve siniri uyararak herhangi bir ağrı veya kanama olasılığını en aza indirir (Jin ve ark., 2022).

Mikroiğne dizisinin başparmak veya bir presleme cihazı ile kol derisine veya başka bir yere birkaç dakika basılmasıyla aşılama tamamlanır. Aynı zamanda mikroiğneler çocuklar için idealdir çünkü ağrı minimaldir. Mikroiğneler yalnızca tek kullanımlıdır ve küçük bir yara oluşturur, bu da çapraz enfeksiyon veya kan yoluyla bulaşan hastalık riskini en aza indirir (Jin ve ark., 2022).

Birkaç intradermal ilaç veriliş yönteminden, çözünen mikroiğneler, minimal invaziv bir intradermal yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Burada kullanılan mikroiğneler, derinin en dış tabakasını (stratum corneum) fiziksel olarak kırmak için mekanik olarak güçlü yapıda suda çözünür polimerlerden geliştirilir ve uygulama sonucunda etkin madde/maddeleri derinin alt bölümlerine iletmek için alttaki canlı epidermis ve dermiste hızla çözünür (E. Kim ve ark., 2020).

Çözünen mikroıǵneler, potansiyel olarak geleneksel aşılama yöntemlerinin sınırlamalarının üstesinden gelebilir ve daha iyi bir bağışıklık yanıtı oluşturabilir. Sürekli salım kinetiğine sahip adjuvan ile formüle edilmiş mikroıǵnelerin, antijenleri bozunmaya karşı koruyarak ve bağışıklık hücrelerine sunumlarını geliştirerek uzun süreli bağışıklık tepkisi oluşturduğu bilinmektedir. Enkapsüle edilmiş adjuvanlar, bağışıklık sisteminin aktivasyonuna yol açan yerleşik dendritik hücreler, makrofajlar ve nötrofiller üzerinde hareket eder (Pahal ve ark., 2021).

Çözünebilir mikroıǵnelerin bileşiminde, ilaç çözünme profilini, salım kinetiğini, mikroıǵnelerin çözünme hızını, cildin penetrasyonunu kontrol etmek ve cilt dokularındaki biyoyumluluğu artırmak çeşitli modifikasyonlar yapılabilir (Ali ve ark., 2022).

Mikroıǵnelere dayalı aşıları geliştirmek için sürekli yeni çalışmalar yapılmaktadır. Aşının nano formülasyonlarının kapsüllenmesi, hüморal ve hücre aracılı immünomodülatör sinyallerin üretilmesinde etkili olan akıllı bir yaklaşımdır. Preklinik çalışmalar, sürekli salımlı mikroıǵneler ile uygulanan aşılardan, tekrarlayan dozları ve kliniklere tekrarlanan ziyaretleri ortadan kaldırma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Ek olarak, mikroıǵnelere dayalı aşılardan implante edilebilir formatları, aşı dozlarının hızlı, doğru ve daha güvenli bir şekilde verilmesini de sağlar (Pahal ve ark., 2021).

Mikroıǵneler aracılığıyla aşı iletimi, lokal deri mikroçevresinde yüksek konsantrasyonlarda aşı bileşenlerinin birikmesiyle sonuçlanır, böylece etkili bağışıklama için gerekli aşı dozlarını, maliyeti ve toksisiteyi önemli ölçüde azaltabilecek bir doz koruyucu etkiye katkıda bulunur. Mevcut literatür, mikroıǵne ile uygulanan aşılardan, pahalı "soğuk zincir" gereklilikleri olmadan uzun süre stabil kalma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, önceki hayvan ve klinik araştırmalar, mikroıǵnelerin etkili aşılama stratejileri için güvenli ve iyi tolere edilen bir taşıyıcı platformu sağlayabileceğini göstermektedir (E. Kim ve ark., 2020).

Mikroiğnelerin geliştirilmesi, aşı tasarımı ve geliştirme dünyasında çok güçlü bir araç haline geldi. Bunun başlıca nedeni, bu cihazların sürekli bir aşı antijeni salımını ortaya çıkarma yeteneğine sahip olması ve böylece çoklu doz ihtiyacını ortadan kaldırmasıdır. Bu, özellikle sürekli salımlı polimerlerle yapılan veya nanopartiküllerle gömülü mikroiğneler için daha da önem kazanmaktadır (Nwagwu ve ark., 2022).

1.10. COVID-19

2019 yılının sonunda Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Çin'in Wuhan şehrinde ortaya çıkan bulaşıcı hastalık şüpheleri konusunda uyarıda bulundu. Bu solunum yolu hastalığı semptomları viral pnömoni gibiydi ve öksürük, nefes darlığı ve ateş olarak kendini gösteriyordu. Kısa bir süre sonra, bilim adamları bu bilinmeyen virüsü izole ettiler, Aralık 2019'da yüksek verimli dizileme gerçekleştirdiler ve yeni bir Beta tipi koronavirüs (β -CoV) suşu belirlediler. Bu yeni CoV suşu, mevcut SARS-CoV-1 ve Orta Doğu solunum sendromuna (MERS) kalıtsal olarak paraleldi. Önceki CoV suşlarıyla genetik benzerliği nedeniyle, Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) ve DSÖ bu yeni β -CoV suşunu yeni bir SARS-CoV-2 virüsü türü olarak resmen ilan etti (Hillary & Ceasar, 2023).

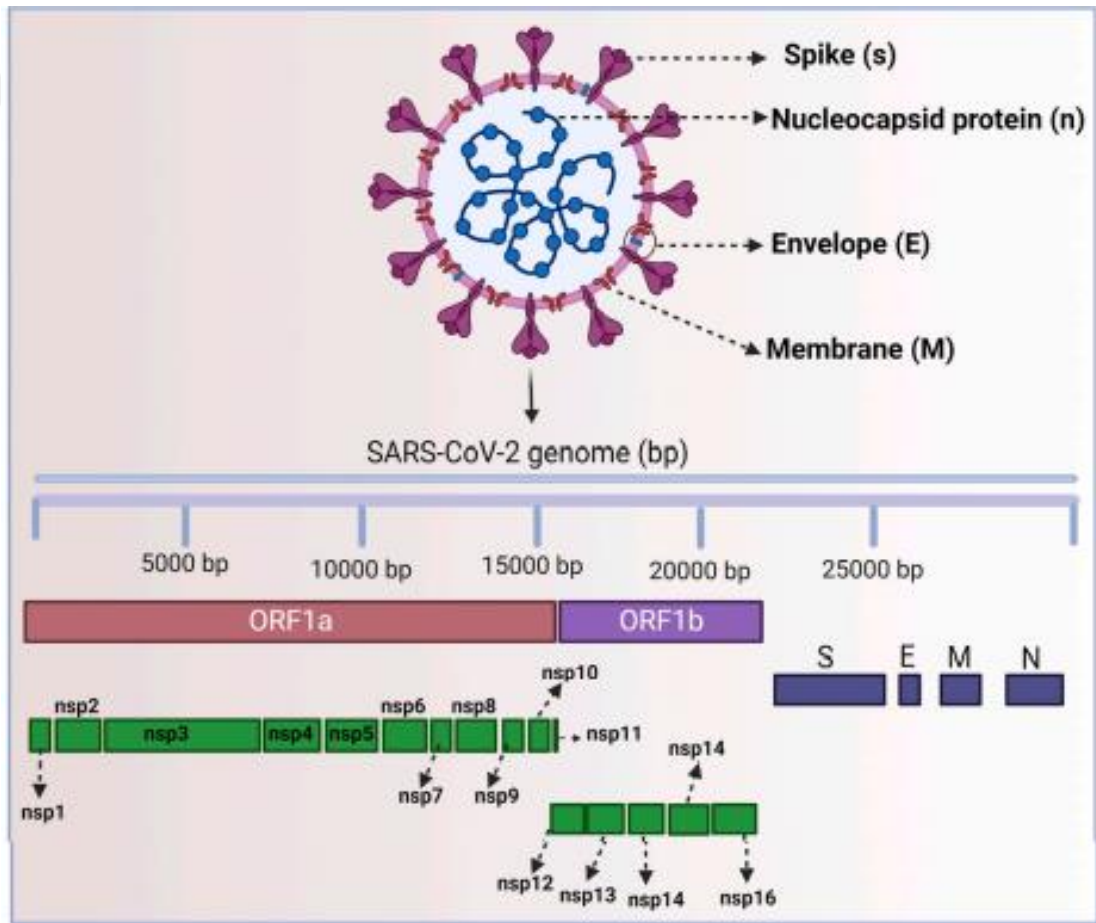
SARS-CoV-2, insanların alt solunum yollarını (nefes borusu ve akciğerler) ve üst solunum yollarını (sinüs, burun ve boğaz) doğrudan enfekte eder. SARS-CoV-2 enfeksiyonu olan hastalar tipik olarak akut solunum yolu hastalığı ve baş ağrısı, mide bulantısı, öksürük, kusma, ishal ve ateş gibi semptomlar gösterir. SARS-CoV-2 enfeksiyonunun şiddeti çoğu insanda hafiftir, ancak bazı yaşlılar ve başka sağlık sorunları olan kişiler çoklu organ işlev bozukluğu ve akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) gibi büyük sorunlarla karşı karşıyadır. SARS-CoV-2'nin hastalık şiddeti de asemptomatik kişiden semptomatik kişiye farklılık gösterir. Yüksek vaka-ölüm oranı ve sık görülen SARS-CoV-2 salgınları, etkili ilaçlar veya aşılar geliştirme çağrılarını tetikledi. Bu nedenle bilim adamları, dünya çapında SARS-CoV-2 ile mücadele etmek için başlıca hafifletme stratejisi olarak acil durum aşıları geliştirdiler

ve halen yeni SARS-CoV-2 varyantları için aşılar ve ilaçlar geliştirmeye çalışıyorlar (Hillary & Ceasar, 2023).

SARS-CoV-2, 30 kbp'lik Coronaviridae ailesine ait genoma sahip kapalı, küresel, segmentsiz, pozitif tek sarmallı bir RNA'dır (ssRNA). SARS-CoV-2, nükleokapsid (N) proteini tarafından yapılan sarmal kapsid tarafından korunur ve bir zarf proteini (E) tarafından çevrelenir. SARS-CoV-2 proteininin yapısı, virüs oluşumuna yardımcı olan E ve zar (M) proteinlerini içerir ve spike (S) proteini, virüsün konakçılara girmesine izin verir. Bu E, M ve S proteinleri arasında S protein boyutu çok büyüktür (180–200 kDa) ve bir taç gibi görünür. Araştırmacılar, "taç benzeri" başak görünümü nedeniyle yeni SARS-CoV-2 suşunu bir koronavirüs olarak adlandırdı. (Latince korona kelimesi "taç" anlamına gelir). SARS-CoV-2, yapısal proteinlere (S, E, M ve N) ek olarak, çeşitli işlevlerde yer alan yapısal olmayan proteinler (nsp 1 ila 16) de içerir. nsp1, viral RNA'nın işlenmesine ve replikasyonuna yardımcı olur. nsp2, konakçı hücrenin hayatta kalma sinyal yolunu düzenler. nsp3, çevrilmiş proteini böler. nsp4, endoplazmik retikulum zarlarını değiştiren transmembran alan 2'yi (TM2) içerir. nsp5, poliproteinlerin replikasyonunda önemli bir rol oynar. nsp6, bir transmembran olarak işlev görür. Hem nsp7 hem de nsp8 proteinleri, nsp12 RNA'nın düzenini önemli ölçüde geliştirir. nsp9, bir ssRNA bağlayıcı protein görevi görür. nsp10, virüse ait mRNA metilasyonunu içerir. nsp11 özünde düzensiz bir proteindir ve nsp12, virüs replikasyonu ve transkripsiyonunun hayati bir bileşeni olan RNA'ya bağımlı RNA polimerazı (RdRp) içerir. nsp13, ATP ve çinko bağlayıcı alanlar ile etkileşime girer ve RNA transkripsiyonu ve virüs replikasyonunda yer alır. nsp14, viral RNA sentezi sırasında büyük ölçüde prova okumasını içeren bir eksoribonükleazdır (EXoN). nsp15, Mn²⁺ bağımlı olan bir endoribonükleaz aktivitesine sahiptir. nsp16, bir 2'-O-riboz metil transferazdır ve mRNA eklenmesini önlemek için SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında U1 ve U2 snRNA'ların mRNA tanıma alanlarıyla etkileşime girer (Hillary & Ceasar, 2023).

SARS-CoV-2, bir beta-koronavirüs ve CoV'lerin genomundaki (27-32 kb) diğer RNA virüslerinden daha büyük olan tek sarmallı bir pozitif sens RNA'dır

(+ssRNA). Genomun dışındaki kapsid, nükleokapsid proteini (N) tarafından oluşturulur ve genom ayrıca üç yapısal proteinden oluşan bir zarftan oluşur: zar proteini (M), spike proteini (S) ve zarf proteini (E). SARS-CoV-2'nin genetik yapısında, dört yapısal protein (S, E, M ve N) ve on altı yapısal olmayan protein (nsp1–16) bulunur. M proteini, virionları (zarfı) şekillendiren ve zarın kıvrılmasını teşvik eden ve nükleokapsidi sabitlemeye yardımcı olan üç transmembran bölgeden oluşan en bol proteindir. E proteini ise en küçük yapısal proteindir ve virüslerin bir araya gelmesinde ve atılmasında önemli roller üstlenir (Nwagwu ve ark., 2022).



Şekil 1.1. SARS-CoV-2 Virüsünün Yapısı. (Hillary & Ceasar, 2023)

1.10.1. SARS-CoV-2 giriş yolları

SARS-CoV-2'nin konakçı hücelere girişı, viral bulaşıma ve patogenezin hayati bir nedenidir. Virüs konakçı hücelere giriş yapabilmek için S glikoproteini kullanır. S glikoproteini, enfekte olmuş hücelerde S1 ve S2 olmak üzere iki alt birimden oluşur. SARS-CoV-2 S1 alt birimi, anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörüne bağlanan bir reseptör bağlama alanı (RBD) ve N-terminal alanı (NTD) içerir ve SARS-CoV-2 S2 alt birimi virüse bağlanır parçacıklar konakçı hücre zarına girer.

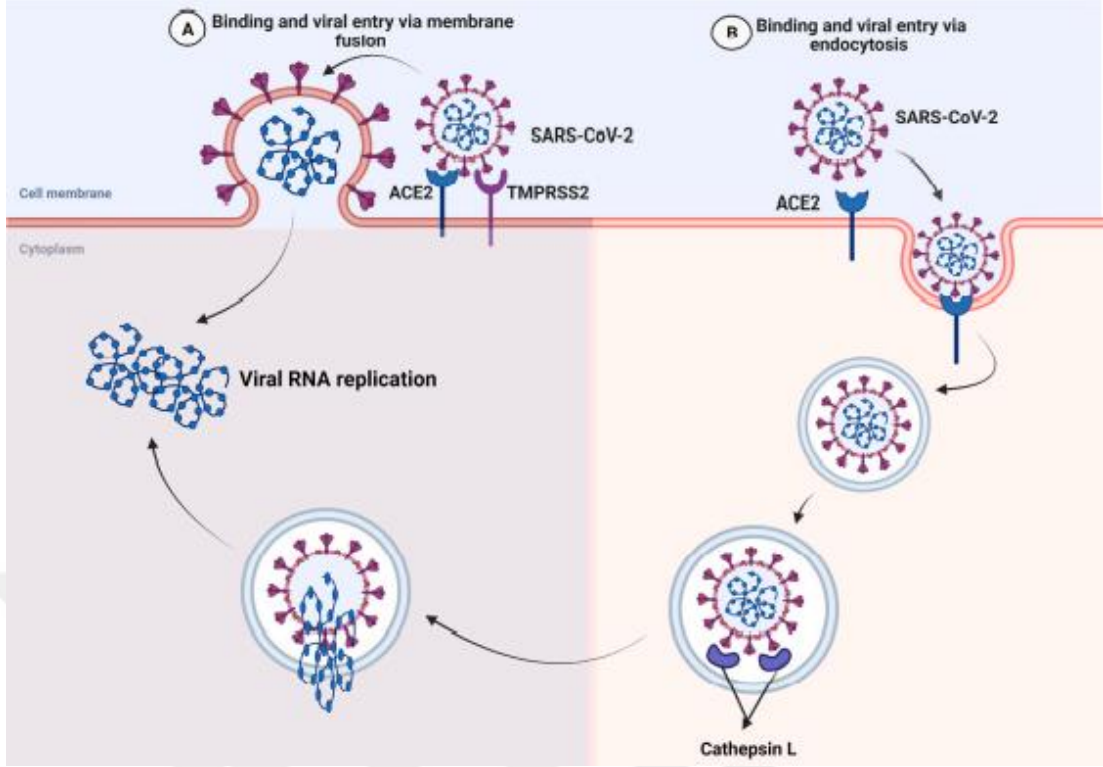
SARS-CoV-2'nin S proteini, önce S1 RBD yoluyla konakçı hücelerin yüzeyindeki ACE2 reseptörüne bağlanır. S1 daha sonra viral yüzeyden salınır ve S2'nin konakçı hücre zarına kaynaşmasına izin verir. Bu işlem, iki proteaz furin ve TMPRSS2'nin yardımıyla iki bölgede (S1/S2) yarılarak S proteininin aktive edilmesini gerektirir. Furin, S1/S2 sitlerinde bölünür ve viral S proteinlerinde konformasyonel değişiklikler yaratır ve S1/S2 sitlerinde TMPRSS2 bölünmesi, virüsün konakçı hücelere girmesine izin verir. Bu süreç sırasında SARS-CoV-2, konakçı hücelere girer ve enfekte kişilerde hızlı yayılmasına, şiddetli semptomlara ve yüksek ölüm oranlarına katkıda bulunur (Hillary & Ceasar, 2023).

1.10.2. COVID-19 Patogenezi

SARS-CoV-2, COVID-19 hastalığına neden olan etkidir. (Nwagwu ve ark., 2022) COVID-19 hastalığının altında yatan mekanizma kısmen, transmembran proteaz TMPRSS2 tarafından başak bölünmesine neden olan spike glikoproteini ile virüsün girmesi nedeniyle ACE2'nin (anjiyotensin dönüştürücü enzim 2) azalmasıyla ilişkilidir. TNF-alfa-dönüştürücü enzim (TACE) tarafından ACE2'nin C-terminali bölünmesi yoluyla iltihaplanmaya, TNF- α üretimine ve doku hasarına yol açan bir kaskadı tetikler. Sodyuma bağımlı nötr amino asit taşıyıcı (SLC6A19 veya B0AT1), C-terminal bölünme bölgesini işgal eder ve TACE'nin ACE2 üzerindeki etkilerini inhibe eder. TACE'nin, renin-anjiyotensin yolunun, ACE2'nin C-terminal

bölünmesinin, TNF- α 'nın ve enflamatuvar inhibitörlerin inhibisyonu, virüs enfeksiyonu ve doku hasarı seviyesini azaltacaktır. Virüs, hedef hücrelerin hücre yüzeyindeki ACE2 reseptörüne bağlanarak girer ve konakçı hücreleri enfekte eder. Bununla birlikte, SARS-CoV ve MERS-CoV'nin en önemli patogeneze mekanizmalarından biri, konakçıda doğuştan gelen bağışıklığın azalmasına yol açan gecikmeli interferon, TNF- α ve proinflamatuvar yanıtlardır (Tavakol ve ark., 2021).

SARS-CoV-2 enfeksiyonunun üç aşaması, etkilenen hücelere bağlı olarak COVID-19 hastalığının farklı klinik aşamalarıyla eşleşir. İlk aşama asemptomatik durumdur, bu noktada solunan SARS-CoV-2 virüsü burun boşluğundaki epitel hücrelerine bağlanır ve replike olmaya başlar. Virüsün vücuttaki varlığı, burun boşluğundan sürüntü alınarak doğrulanabilir. Bu aşamadaki viral yük, çok düşük olmasına rağmen çok bulaşıcıdır ve sınırlı bir doğuştan gelen bağışıklık tepkisi sunar. Bu noktada virüs, semptomlar ortaya çıkmadan önce bile bulaşabilir. İkinci aşama, virüsün çoğaldığı ve solunum yolunda ilerlediği zamandır. Bu, doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde bir artışı tetikler. Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin virüs ve erken belirteçleri, burun sürüntüleri veya balgam ile tespit edilebilir. Bu aşamada, COVID-19'un hafif bir klinik tezahürü vardır. Bu noktada etkilenen bireyler, hastaların semptomlarının geleneksel tedavisi ile evde yönetilebilir. SARS-CoV-2, T hücreleri içinde çoğalarak, hücreleri kaspaz aracılı hücre ölümüyle karşılaşmaya ve ölmeye teşvik eden çok miktarda viral partikül yayar. Bu aşama, akut solunum sıkıntısı (ARD), pnömoni, böbrek yetmezliği ve ölüme kadar ilerleyebilen şiddetli grip benzeri semptomları başlatır (Nwagwu ve ark., 2022).



Şekil 1.2. Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs-2'nin vücuda (SARS-CoV-2) giriş yolları. (Nwagwu ve ark., 2022)

1.10.3. SARS-CoV-2 varyantları

Virüsle ilişkili genomdaki adaptif mutasyonlar, virüsün patojenik potansiyelini değiştirebilir. Tek bir amino asit varyasyonu bile virüsün bağışıklık sisteminden kaçma yeteneğini önemli ölçüde bozabilir ve virüse karşı aşı geliştirmeyi zorlaştırabilir. SARS-CoV-2 gibi virüsler, bir veya daha fazla mutasyonun etkisiyle yeni insan konakçılara alışıırken kalıtsal evrime yatkındır, bu da atasal suşlardan farklı özelliklere sahip çok sayıda yeni varyantın ortaya çıkmasına neden olur. SARS-CoV-2'nin birden fazla yeni varyantı bulunduğundan, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi ve Dünya Sağlık Örgütü SARS-CoV-2'nin ortaya çıkan varyantlara (VOC'ler) ve ilgili varyantların alt tiplerine (VOI'ler) ayırmak için bir kataloglama sistemi oluşturmuştur. DSÖ'nün yakın tarihli raporlarına göre, Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1) ve Delta (B.1.617.2) ve Omicron (B. 1.1.529) ve Epsilon (B.1.427 ve B.1.429), Eta (B.1.525), Kappa (B.1.617.1), Mu (B.1.621), Lambda (C)

gibi sekiz varyantı, Theta (P.3), Zeta (P.2) ve Lota (B.1.526) gibi alt varyantları bulunmaktadır (Hillary & Ceasar, 2023).

1.10.4. COVID-19 Aşıları ve Karşılaştırmaları

Aşı, insanları zararlı virüslerin veya bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlardan koruyan organik bir maddedir. Bu zararlı patojenlere (virüsler veya bakteriler) karşı yeni aşılar geliştirmek yaklaşık 10 ila 15 yıl sürer. Bu nedenle, mevcut SARS-CoV-2 türüne karşı bir aşı geliştirmek, araştırmacılar için çok önemli bir zorluk haline gelmiştir. Ancak çeşitli ülkelerden bilim insanları SARS-CoV-2'ye karşı acil durum aşıları geliştirdiler ve acil kullanım izni onayı aldılar. (Hillary & Ceasar, 2023) Mevcut onaylı COVID-19 aşıları, hastaneye yatış ve ölüme karşı önemli ölçüde etkinlik göstermiştir. Bununla birlikte, pandeminin iki yıldan fazla bir süredir devam etmesi ve aşılanmanın küresel olarak yaygınlaşmasına rağmen yeni suşların ortaya çıkma olasılığı, aşıların geliştirilmesine ve iyileştirilmesine yönelik acil ihtiyacın altını çizmektedir (Bayani ve ark., 2023).

COVID-19 oldukça bulaşıcıdır ve bağışıklık sistemi için yıkıcıdır. İmmünoterapinin bulaşıcı hastalıkları önlemede etkili olduğu doğrulanmıştır. Aşılama, immünoterapinin çok önemli bir parçasıdır ve aşı, virüsün bir kısmının veya tamamının immünojenik özelliklerini simüle ederek bağışıklık sisteminin işlevini düzenler. İmmünojenik proteinlerin yanı sıra, COVID-19'un RNA veya DNA'sı, konakta immün proteinlerin veya peptitlerin heterolog ekspresyonunu indükleyerek ortaya çıkan antijenik özelliklere de sahiptir. Salgının başından beri bu pandemi ile mücadelede farklı aşı platformları üzerinde çalışılmıştır. İnaktif virüs, mRNA tabanlı ve viral vektör platformları SARS-CoV-2'ye karşı onaylanmış ilk nesil aşılar olmuştur. Bununla birlikte, mevcut aşılarla farklı derecelerde direnç gösteren varyantlar ortaya çıkmıştır (Miao ve ark., 2023).

Çizelge 1.2. COVID-19’a karşı geliştirilen aşılardan karşılaştırılması (Bayani ve ark., 2023; Peletta ve ark., 2023).

Aşı tipi	Avantajları	Dezavantajları
Subunit aşı	Bağışıklığı baskılanmış hastalara uygulanabilir Daha az yan etki olasılığı ile nispeten güvenli İnaktif virüs aşılarna kıyasla yüksek nötralize edici antikor titresi Toplu aşılama için soğuk zincir depolamaya gerek yoktur. Bazı alt birim aşılarda heterolog veya homolog booster doz yoluyla olumlu immünojenisite ve mRNA aşılarna benzer etkinlik.	Canlı zayıflatılmış aşılardan daha az immünojeniktir ve immün yanıtları uyarmak için adjuvana ihtiyaç duyar Uygun etkinlik için yüksek immünojenik antijen(ler)in tanımlanması gerekir. Uzun süreli bağışıklık için çoklu dozlar gerekir.
Canlı zayıflatılmış (attenüe) aşı	Bağışıklık sistemi için iyi bir öğrenme sağlayan doğal enfeksiyonun en yakın taklidi Genellikle hücresel ve humoral bağışıklığın güçlü indüksiyonu ile ömür boyu bağışıklık sağlar. Bağışıklama için adjuvan içermeyen bir veya birkaç doz Burun içi sprej yoluyla uygulama ve mukozal antikor bağışıklık tepkilerini uyarır	Geri mutasyonlar nedeniyle virülansın tersine dönme riski Potensi korumak için kritik saklama koşulları gerektir (ör. sıcaklık) Bağışıklığı baskılanmış hastalarda uygulanması uygun değildir.
Öldürülmüş/inaktif aşı	Zayıflamış aşılara kıyasla bağışıklığı baskılanmış hastalarda kullanım için güvenlidir Canlı attenüe aşılara kıyasla daha az seviyede depolama koşulları gerektirir	Canlı attenüe aşılardan daha az immünojeniktir, hücresel tepkileri indüklemeye kapasitesi düşüktür ve bağışıklığı güçlendirmek için adjuvana ihtiyaç duyar. İstenen bağışıklığı elde etmek için büyük miktarlarda antijen ve güçlendirici dozların kullanılmasını gerektirmesi İnaktivasyon, zaman alıcı ve maliyetli bir süreçtir ve inaktivasyondan sonra tüm virüsler immünojenik hale gelmez.
DNA aşısı	Tasarım ve geliştirme kolaylığı, nispeten ucuz ve ölçeklenebilir, depolama ve nakliye için oda sıcaklığında nispeten karardır Hem MHC I hem de II molekülleri tarafından antijen sunumu ve humoral ve hücresel bağışıklık tepkilerini indükler.	Konak genomuna entegrasyon riski vardır. Konak vücut içindeki ekspresyon, immünolojik toleransı indükleyebilir. Çıplak DNA aşılarının nükleazlar ve farklı biyolojik bariyerler tarafından hızla bozunması nedeniyle düşük etkinlik olasılığı riski vardır.

Çizelge 1.2. Devam. COVID-19’a karşı geliştirilen aşılardan karşılaştırılması (Bayani ve ark., 2023; Peletta ve ark., 2023)

Aşı tipi	Avantajları	Dezavantajları
RNA aşısı	Antijenler, tıpkı bir RNA virüsünün doğal enfeksiyonu gibi konakçı hücreler tarafından üretilir. Aşılanmış konakçıda üretim sırasında daha az biyolojik değişiklik olasılığı Vücutta kısa sürede parçalanır ve genomu zar zor değiştirme şansı vardır. mRNA aşısı, güçlü Th1 hücre yanıtlarını ve GC B hücre yanıtlarını ortaya çıkarabilir ve ayrıca, sonuç olarak SARS-CoV-2 nötralize edici antikorları ortaya çıkarabilen uzun ömürlü plazma hücreleri ve hafıza B hücreleri üretir. Zamanında güncellemeyi basitleştirmek için, mRNA aşısı doğrudan orijinal sekans üzerinde değiştirilebilir.	RNA moleküllerinin yüksek sıcaklıklarda düşük stabilitesi, küresel dağılımı zorlaştırır. Miyokardit dahil olmak üzere mRNA aşılarından kaynaklanan komplikasyonlar meydana gelebilir.
Viral Vektör Aşısı	Pek çok canlı zayıflatılmış virüs aşısından daha iyi güvenlik profillerine sahiptir ve etkisizleştirilmiş virüs aşılarından daha fazla immünojeniktir. Taşıyıcı, B hücrelerine ve T hücrelerine karşı iyi bir uyarıcı tepkiye sahiptir ve bağışıklığı artırabilir. İstenen antijenleri bağışıklık sistemine doğal konformasyonda sunar Yüksek verimli viral vektör transdüksiyonu, DNA aşısına kıyasla in vivo olarak daha yüksek miktarlarda antijen üretimine yol açar İnaktive aşılarla karşılaştırıldığında, viral vektör aşılarının üretim süreci, canlı SARS CoV-2 içermediği için nispeten güvenlidir.	Konakçı genom entegrasyonu riski Daha önce virüse maruz kalma ve nötralize edici antikorların üretimi nedeniyle vektöre önceki bağışıklık, aşının etkinliğini azaltabilir Adenovirüs bazlı virüs vektör aşısı, trombositopeni dahil yan etkileri tetikleyebilir.
Virüs benzeri parçacık (VLP) aşısı	Rekombinant protein ile karşılaştırıldığında, VLP’ler doğal virüslere benzer adaptif epitoplar gösterir ve bağışıklık tepkilerini daha etkili bir şekilde indükler. Kendinden adjuvan özelliği vardır. VLP’ler, üretim koşulları açısından esnek olmalarını sağlayan çok çeşitli üretim sistemlerinde üretilebilir. VLP aşısı, içlerinde viral genom olmadığı için bulaşıcı değildir. Ağızdan verilen aşılar, bitki bazlı VLP aşılarından yapılabilir.	Zor downstream işlemler ve yüksek üretim maliyeti VLP aşısı aynı anda birçok protein yüklüdür ve bunun neden olduğu bağışıklık tepkisinin derecesi net olarak bilinmemektedir.

Koronavirüs aşılarının antijenik hedefleri, SARS-CoV ve MERS-CoV aşıları üzerinde yapılan preklinik araştırmalarla daha net hale gelmiştir. Spike proteinine, özellikle reseptör bağlama alanına (RBD) bağlanan antikorlar, konakçı hücreye bağlanmalarını önleyebilir ve virüsü nötralize edebilir. Mevcut araştırmalar, spike proteinine yönelik antikorların, RBD'yi veya S proteininin diğer bölgelerini hedef almalarından bağımsız olarak, virüsü nötralize ettiğini ileri sürmüştür (Miao ve ark., 2023).

SARS-CoV-2'ye karşı klinik deneylerde bulunan veya bazı ülkelerde onaylanmış birkaç protein alt birim aşı adayı vardır. Bu tür aşıların başarısı, seçilen antijene ve ekspresyon sisteminin seçimine bağlıdır (Bayani ve ark., 2023).

SARS-CoV-2, S proteinindeki S1 alt biriminin RBD alanı (331 ila 524 kalıntıları) aracılığıyla konak hücrelerdeki ACE2 reseptörünü tanır. RBD, "aşağı" ve "yukarı" durumları olarak adlandırılan iki konformasyon arasında geçici olarak dalgalanır ve ACE2'ye yalnızca açıkta olan durum olan yukarı konformasyonunda bağlanır. Rekombinant RBD uygulamasının hayvan modellerinde ve insan çalışmalarında nötralize edici antikorları ve uzun vadeli koruyucu bağışıklığı indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca, RBD'nin dışında bulunan potansiyel ADE'yi teşvik eden S proteini epitoplarının silinmesi, onu daha güvenli bir aşı adayı yapabilir. RBD bazlı aşının tam uzunluktaki S proteinine kıyasla potansiyel üretim avantajları, bu aşıyı özellikle düşük ve orta gelirli ülkeler için uygun bir maliyetle uygun bir seçim haline getiriyor. Antijen gösteriminin monomerik, dimerik veya multimerik formlarına sahip farklı RBD bazlı immünojen platformlarının, hayvan modellerinde ve insanlarda anti-RBD nötralize edici antikorları indüklediği gösterilmiştir. Bu nedenle RBD, terapötik virüs bağlanma inhibitörlerinin geliştirilmesi, nötralize edici antikorların indüklenmesi ve aşı tasarımı için en olası hedef olarak tanımlanır (Bayani ve ark., 2023).

Aşı antijeninin sonraki bağışıklık basamaklarını başlatmak için APC'ler tarafından verimli bir şekilde içselleştirilmesi gerekir. APC'ler tarafından alım, boyut, yüzey yükü, şekil, pürüzlülük, hidrofobiklik, hidrofiliklik ve reseptörler ile

ligandlar arasındaki etkileşimler gibi parametrelere bağlıdır. Parçacık boyutu, APC'ler tarafından etkili antijen içselleştirmesi için çok önemlidir. Antijenler, patojen boyutlu parçacıklar veya protein kümeleri oluşturabilen nano/mikro parçacıklar halinde kapsülendirilir. APC'ler onları çözünür antijenlerden daha verimli bir şekilde alabilir (Hou ve ark., 2023).

Akut enfeksiyonun, antijen sinyallerinin sürekli olarak bağışıklık sistemini uyardığı bağışıklık tepkilerini uyandırması genellikle haftalar alır. Antijenik kinetik, potansiyel olarak koruyucu etkiye sahip efektör T hücrelerini ve hafıza T hücrelerini indüklemek için gereklidir. Genel olarak, hızlı ilk replikasyonun ardından virüsün yetersiz bir miktara indirgenmesinin, koruyucu antiviral bağışıklığı güçlendirmek ve sürdürmek için genellikle çok önemli olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, koruyucu bağışıklığı gerçekleştirmek için aşılarda alt birim antijen salım kinetikleri dikkate alınmalıdır. Son araştırmalar, yavaş ve sürekli antijen maruziyetinin düzenlenmesinin bağışıklık yanıtlarını önemli ölçüde artırdığını göstermiştir.

Koruyucu bağışıklığın indüksiyonu genellikle enjeksiyon ağrısına ve kötü uyuma neden olan çoklu bağışıklamalar gerektirir. Bu nedenle, yeterli aşılama etkinliğine sahip tek enjeksiyonlu aşılarda, aşı kapsamını artırmak ve küresel olarak bulaşıcı hastalıklarla savaşmak için mükemmel bir seçim olacaktır. Polimerlerin sürekli bozunma özellikleri ve antijen aktivitesi, tek enjeksiyonlu aşı tasarımı için önemli zorluklardır. FDA tarafından onaylanan spesifik materyallerin seçilmesi bu durumu aşmaya yardımcı olabilir. Son zamanlarda, mikroiğneler, farklı salma davranışlarına sahip parçacıkları yükleyebilen antijen salma hızını tam olarak kontrol eden mükemmel taşıyıcılardır (Hou ve ark., 2023).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Akrilamid	Sigma, Almanya
Amonyum persülfat	Sigma, Almanya
Amonyum sülfat	Merck
Asetik asit	Sigma Aldrich
BCA re ajanları	Thermo Scientific, ABD
Brilliant Blue R	Sigma, Almanya
Centrisart santrifüj tüpü	Sartorius, Fransa
Polisiloksan kit	Zhermack Zetaplus
Eudragit RS100	Röhm, Almanya
Etanol 96°	Carlo Elba, İtalya
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biomatik, ABD
Glisin	Sigma, Almanya
Hidroklorik asit	Sigma, Almanya
Karboksimetil selüloz	Sigma, Almanya
Kloroform	Sigma Aldrich
MTT	Biomatik, ABD
Marker	Biolegend, ABD
N,N'-Metilen-Bis-Akrilamid	Sigma, Almanya
N,N,N',N' - Tetrametiletilediamin	Sigma Aldrich
N-(1-Naftil) etilediamin dihidroklorür	Merck
Ovalbumin	Sigma Aldrich
Örnek tamponu	Sigma Aldrich
Penisilin-streptomisin	Capricorn, Almanya
Polidimetilsiloksan kalıp	Smicna, Singapur
Polivinil alkol (PVA) MW:13000-23000	Sigma, Almanya
Polivinil alkol (PVA) (4-88)	Fluka
Polivinil alkol (PVA) MW: 72000	Merck
Polivinil pirolidon K 90 MW: 360000	Fluka
Potasyum dihidrojen fosfat	Sigma Aldrich
Roswell Park Memorial Institute	Capricorn, Almanya

(RPMI) besiyerleri	
Sodyum aljinat (Yüksek viskoziteli)	Sigma, Almanya
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma, Almanya
Sodyum hidroksit	Sigma, Almanya
Sodyum klorür	Merck, Almanya
Trehaloz	Sigma, Almanya
Trietil sitrat	Merck
Tris bazı	Sigma, Almanya

2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Cam malzeme	İldam, Türkiye
Çalkalayıcı su banyosu	Jeio Tech, Kore
Derin dondurucu	Heto, Almanya
DSC cihazı	TA DSC Q2000, Çin
Elektrikli terazi	Mettler Toledo, Almanya
Filtre	İsolab, Türkiye
Geçirimli Elektron Mikroskobu	ZEISS EVO 40
Laminar flow	Holten 1.2, ABD
Liyofilizatör	Christ Gamma 2-16 LSC, Kanada
Manyetik karıştırıcı	IKA, Almanya
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
Mikroplak okuyucu	Molecular Devices, Spectra Max 190, İngiltere
Mikroplak (96 kuyucuklu)	Greiner Bio-One, Almanya
Mikroskop	Leica DM 4000B
Parafilm	Bemis Packaging, ABD
Partikül büyüklüğü analizi cihazı	Malvern Zetasizer, İngiltere
Plastik enjektör	Set inject, Türkiye
pH metre	Mettler Toledo, İsviçre
Santrifüj	Sigma 2-16 P, Almanya
Sonikatör	Bandelin Sonoplus
Taramalı Elektron Mikroskobu	FEI Tecnai G2, Japonya
Ultrasonik banyo	Ultrasonic LC 30, Almanya
Vorteks cihazı	Heidolph Reax Top, Almanya
Zeta potansiyeli ölçüm cihazı	Malvern Zetasizer, İngiltere

2.1.3. Çalışmalarda Kullanılan Tamponlar

Etken maddelerin üretilen formülasyonlardan açığa çıkışının incelenmesinde pH 7,4 fosfat- salin tamponu (PBS) kullanılmıştır. Tampon Avrupa Farmakopesi 9'a (EP 9) göre hazırlanmıştır (EP9, 2016).

➤ pH 7,4 Fosfat-Salin Tamponu (PBS)

Disodyum hidrojen fosfat.....	2,38 g
Potasyum dihidrojen fosfat.....	0,19 g
Sodyum klorür.....	8 g
Distile su.....y.m.....	1000 ml

2.2. Yöntemler

2.2.1. Model Protein ve RBD Antijeninin MikroBikinkoninik Asit (MikroBCA) Yöntemiyle Kalibrasyonu

Bikinkoninik asit yöntemi, protein ve peptid yapısında bulunan maddelerin kantitatif analizinde yoğun olarak kullanılan bir yöntemdir. Çok az miktarda bulunan protein ve peptit yapılı maddelerin miktar tayininde çok daha hassas olan mikrobikinkoninik asit yöntemi tercih edilmektedir. BCA yöntemi ile 100-1200 µg/ml konsantrasyona kadar hassaslıkta ölçüm yapılırken, mikroBCA yöntemi ile 5-250 µg/ml hassasiyete kadar toplam protein miktar tayini yapılabilmektedir (Smith ve ark., 1985).

Ovalbumin ve RBD proteinlerinin, PBS (pH 7,4 fosfat salin tamponu) ile hazırlanan ve içerdiği protein miktarı bilinen çözeltilerinin mikroBCA yöntemi ile miktar tayini yapılmıştır. Stok protein çözeltisinden (500 µg/ml) dilüsyonlar yapılarak 0,5-50 µg/ml konsantrasyonlar arasında sekiz farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerden, mikrolakada bulunan

kuyucuklara üç paralel şeklinde 100'er µl koyulmuştur. Ardından analiz protokolü gereğince Reajan A ile Reajan B 50:1 oranında karıştırılmış ve her bir kuyucuğa bu karışımdan da 100'er µl eklenmiştir. Mikrolaka 60°C'deki etüvde buharlaşmayı önlemek amacıyla alüminyum folyoya sarılı şekilde 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda plak oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve mikrolaka okuyucusunda (Molecular Devices, Spectra Max 190) 562 nm'de çözeltilerin absorbansları ölçülmüştür. İçerdiği protein miktarı bilinen çözeltilerden okunan absorbans değerleri ile kalibrasyon denklemleri hesaplanmıştır. Bu denklemlerden hareketle örneklerin toplam protein miktarları hesaplanmıştır.

2.2.2. Nanopartiküllerin Hazırlanması

Nanopartiküllerin hazırlanmasında solvent evaporasyon yöntemi kullanılmıştır (Spiers ve ark., 2010).

Kullanılacak polimer miktarına literatürdeki formülasyondan hareketle karar verilmiştir. (Volpatti ve ark., 2021) Ayrıca nanopartikül formülasyonu için Fievez ve ark., kullandığı metodda bazı değişiklikler yapılarak formülasyonlar üretilmiştir. (Fievez ve ark., 2009) Bu çalışmada nanopartiküllerin hazırlanması şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Öncelikle çalışmada kullanılan 20 mg PEG-PCL polimeri kloroformda çözülmüş, üzerine etkin madde çözeltisi eklenmiş ve %30 güçte buz üzerinde 1 dakika boyunca sonike edilmiştir. Daha sonra bu karışım enjektörle %1 sodyum kolat içeren flakona aktarılmıştır. %30 güçte buz üzerinde 2 dakika boyunca sonike edilmiştir. Elde edilen su/yağ emülsiyonu manyetik karıştırıcı üzerinde 600 rpm'de karışan %0,3 sodyum kolat içeren behere enjektörle aktarılmıştır. Nihai formülasyon 3 saat boyunca 600 rpm'de karıştırılmıştır. Daha sonra su/yağ/su emülsiyonu 35000 rpm'de 5°C'de 1 saat boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant enkapsülasyon etkinliği ve miktar tayininde kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Elde edilen çökelti ise nanopartikül karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

2.2.3. Nanopartikül Geliştirmek Üzere Yapılan ÖnFormülasyon Çalışmaları

2.2.3.1. Model Protein İle Hazırlanan Nanopartiküller İçin Ön Formülasyon Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmalarında iç ve dış fazda kullanılacak olan sodyum kolatın miktarı ve % konsantrasyonu, sonikasyon süresi ve sonikasyon gücü gibi parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Formülasyon parametreleri Tablo 1’de verilmektedir. Bu formüllerden hareketle enkapsülasyon etkinliği ve partikül boyutu sonuçlarına göre nihai formül seçilmiş ve RBD proteini kullanılarak nihai formülasyon üretilmiştir.

Kullanılan RBD suşu olarak diğer varyantlara göre daha fazla hastaneye yatışa sebep olan Delta Plus seçilmiştir (Kalyoncu et al., 2023).

Çizelge 2.1. Model protein ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları

Formül No	Ovalbumin (µg)	PEG-PCL (mg)	İç Faz Sodyum Kolat (%)	İç Faz Sodyum Kolat (ml)	Dış Faz Sodyum Kolat (%)	Dış Faz Sodyum Kolat (ml)	1. Sonikasyon (sn)	2. Sonikasyon (sn)	Sonikasyon Gücü (%)	Karıştırma süresi (saat)
NP 1	50 µg	20,39	1	2	0,3	17	30	120	30	3
NP 2	50 µg	20,56	1	2,5	0,3	5	30	120	30	3
NP 3	100 µg	20,03	1	2	0,3	17	30	120	30	3
NP 4	100 µg	20,09	1	2,5	0,3	5	30	120	30	3
NP 5	50 µg	20,07	1	2	1	17	30	120	30	3
NP 6	50 µg	20,32	1	2	0,5	17	30	120	30	3
NP 7	50 µg	20,18	1	2	0,3	10	30	120	30	3
NP 8	50 µg	20,39	1	2	0,3	17	30	90	30	3
NP 9	50 µg	20,4	1	2	0,3	17	30	60	30	3
NP 10	50 µg	20,33	1	2	0,3	17	30	120	30	3
NP 11	50 µg	20,13	1	2	0,3	17	60	120	30	3
NP 12	50 µg	20,1	1	2	0,3	17	90	120	30	3
NP 13	50 µg	20,25	1	2	0,3	10	30	120	60	3
NP 14	50 µg	20,51	1	2	0,3	17	30	120	90	3
NP 15	50 µg	20,08	1	2	0,3	17	60	120	30	3
NP 16	50 µg	20,06	1	2	0,3	17	60	120	30	3
NP 17	50 µg	20,18	1	2	0,3	17	60	120	90	3

2.3. Nanopartiküllerde Yapılan Kontroller

2.3.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Saptanması

Elde edilen nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve dağılımını saptamak için dinamik ışık saçılımı yöntemi (Malvern Zetasizer NanoZS) kullanılmıştır. Nanopartiküller distile su ile 50 µg/mL konsatrasyon elde edilecek şekilde seyreltilmiştir. Pipetaj ile disperse edildikten sonra, ölçüm küvetine alınmış ve 3 seri şeklinde ölçümler gerçekleştirilmiştir.

2.3.2. Hazırlanan Formülasyonlarda Etken Madde Miktar Tayini

Nanopartikül formülasyonlarında etken madde miktar tayini indirekt yöntemle hesaplanmıştır. Bu amaçla formülasyon 35000 rpm’de 1 saat santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatanda yer alan etken madde microBCA yöntemi kullanılarak 3 seri şeklinde mikropilaya okuyucuda ölçülmüştür.

2.3.3. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini

Bölüm 2.5.2’de anlatılan şekilde indirekt yöntem kullanılarak elde edilen örnekler, Bölüm 2.2.1’de anlatılan miktar tayini metoduna göre ölçülmüştür ve Eşitlik 2.1’e göre enkapsülasyon etkinliği (EE) hesaplanmıştır.

$$\% EE = (A/B) \times 100 \quad (2.1)$$

A: Nanopartiküle yüklenen etken madde miktarı (µg) – Süpernatanda bulunan etken madde miktarı (µg)

B: Nanopartiküle yüklenen etken madde miktarı (µg)

2.3.4. Zeta Potansiyel Ölçümü

Nanopartiküllerin yüzeyinde bulunan yüklerin değişimi belirlemek için zeta potansiyel ölçümü yapılmıştır. Çalışmalarda üretimi yapılan farklı nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyelinin ölçümü için Malvern Zetasizer NanoZS cihazı kullanılmıştır. Nanopartiküller distile su ile 50 µg/mL konsantrasyon elde edilecek şekilde seyreltilmiştir. Pipetaj ile disperse edildikten sonra, ölçüm küvetine alınmış ve 3 seri şeklinde ölçümler gerçekleştirilmiştir.

2.3.5. İn Vitro Etken Madde Salım Çalışmaları

İn vitro etken madde salım çalışmalarında numune alma ve ayırma yöntemi kullanılmıştır. (Y. Kim ve ark., 2021) İn vitro etken madde salım hızı çalışmaları için membran kullanılmayan bir çözünme yöntemi kullanılmıştır. Çözünme ortamı olarak pH 7,4 fosfat salin tamponu kullanılmıştır. Santrifüj sonrası oluşan çökelti pH 7.4 fosfat salin tamponuyla disperse edilip eppendorf tüplere 500 µl hacimde dispersiyon aktarılmıştır. Eppendorf tüpler hızı 50 rpm'e ve sıcaklığı 37 °C' ye önceden ayarlanmış çalkalayıcıya yerleştirilmiştir. 30. dakika, 1 saat, 2 saat, 4. saat, 6. saat, 8. saat, 24. saat, 48. saat ve 72. saatlerde eppendorf tüpler 15000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant alınmıştır. Sink koşulu sağlamak amacıyla alınan süpernatant kadar yerine taze tampon ilave edilmiştir. Alınan örnekler mikroBCA yöntemiyle hesaplanmış ve bu verilerden hareketle in vitro etkin madde salım hızı grafiği hazırlanmıştır.

2.3.6. SDS-PAGE Analizi

Proteinler genel olarak pozitif veya negatif bir yük içerir; bu, bir protein molekülünün, molekülün net yükünün olmadığı izoelektrik noktaya doğru hareketini sağlar. Proteinleri denatüre ederek ve onlara tekdüze bir negatif yük vererek, pozitif elektrota doğru göç ederken boyutlarına göre ayırmak mümkündür. Bu amaçla SDS-

PAGE analizi yapılmıştır. Tez çalışması kapsamında sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), nanopartikül yapısını ve formülasyon aşamasında proteinlerin bozunup bozunmadığını anlamak için yapılmıştır.

SDS-PAGE için %10'luk ayırma jeli hazırlanmış ve cam kasetler arasına dökülmüştür. Hazırlanan jelin bekletilerek donması sağlanmıştır. İn vitro salım hızı çalışmalarından elde edilen verilerden hareketle nanopartikül formülasyonları 24 ve 96 saat boyunca salım ortamında bekletilmiştir. 24. ve 96. saat sonunda eppendorf tüplerdeki örnekler santrifüj edilmiş ve süpernatant ayrılmıştır. Ayrılan süpernatantlar -40 °C'de bir gece dondurulmuştur. Sonra liyofilize edilmiştir. Liyofilize tozlar distile su ile disperse edilmiş ve dispersiyondan 20 µl alınmış, üzerine 5 µl örnek tamponu ilave edilmiş ve 100 °C'de 5 dakika bekletilerek redüksiyon işlemi yapılmıştır. Redüksiyon işleminden sonra her bir formülasyon için 20 µl örnek kuyucuklara uygulanmıştır. Örnekler jele uygulandıktan sonra cam kasetler içindeki jel, elektroforez tankına yerleştirilmiştir. İç ve dış rezervuarlar elektroforez tamponu ile gerekli yerlere kadar doldurulmuştur. Bu işlemlerin ardından ilk 20 dakika 30 volt, daha sonra 20 dakika 60 volt ve sonrasında bromfenol mavisine ait bandın cam kasete ait alt sınırın 1 cm üzerinde durduğu gözlenene kadar 100 volt gerilim uygulanarak elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Sürüklenme işlemi yaklaşık iki saat sürdürülmüş ve bromfenol mavisine ait bandın cam kasetin alt sınırının 1 cm üzerinde durduğu gözlemlendiğinde güç kaynağı kapatılmıştır. Jel, cam kasetler arasından dikkatlice çıkartılarak bir saat fiksasyon, iki saat sensitizasyon çözeltisiyle çalkalanmış ve sonrasında boyama çözeltisinde bir gece bekletilmiştir. Bir sonraki gün jel, bir saat destaining I çözeltisinde (boyayı geri alma çözeltisi), jelin arka planı temiz olana kadar da yaklaşık 2 saat boyunca destaining II çözeltisinde bekletilmiştir. Boyanın uzaklaştırılmasının ardından jelin fotoğrafı çekilmiş ve %5 h/h'lik asetik asit çözeltisinde aylarca saklanmıştır.

SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler Çizelge 2.2'de listelenmiştir.

Çizelge 2.2. SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler.

Ayırma Jeli (%10'luk)	5 ml/10 ml
%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 SDS	0,05 ml
%10 a/h Amonyum persülfat	0,05 ml
TEMED TEMED ve %10 a/h amonyum persülfat polimerizasyonu başlattığı için en son ilave edilmelidir.	0,082 ml
%30 Akrilamid Karışımı	100 ml için
Akrilamid	29 g
N,N'-metilenbisakrilamid	1 g
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	100 ml
Tris	18,2 g
Distile su y.m. Konsantre HCl ile pH'sı 8,8'e ayarlanır.	100 ml
%10 SDS	100 ml
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	10 g
Distile su y.m. pH 7,2'ye ayarlanır.	100 ml
%10'luk Amonyum persülfat	2 ml
Amonyum persülfat	0,2 g
Distile su y.m.	2 ml
Elektroforez tamponu	1000 ml
Tris	3 g
Glisin	14,4 g
SDS	1 g
Distile su y.m. pH 8,3'e ayarlanır.	1000 ml
Fiksasyon çözeltisi	100 ml
Etanol	40 ml
Metanol	10 ml
Distile su	40 ml
Asetik asit	10 ml
Sensitizasyon çözeltisi	100 ml
Amonyum sülfat	10 g
Distile su	89 ml
Asetik asit	1 ml

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

Boyama çözeltisi	100 ml
Etanol	45 ml
Distile su	50 ml
CBBR-250	0,125 g
Asetik asit	5 ml
Destaining çözeltisi-I	100 ml
Etanol	40 ml
Distile su	55 ml
Asetik asit	5 ml
Destaining çözeltisi-II	100 ml
Etanol	67 ml
Distile su	30 ml
Asetik asit	3 ml

2.3.7. Nanopartikül Formülasyonunun Stabilitesi

Nanopartiküllerin stabilitesi için üç ayrı fomülasyon hazırlanmış ve +4 °C ve -20 °C’de 90 gün boyunca takip edilmiştir. Bunun için su/yağ/su çift emülsiyonu santrifüj edildikten sonra elde edilen çökelti distile su ile disperse edilmiş ve bu fomülasyonun stabilitesi +4 °C ve -20 °C’de 90 gün boyunca takip edilmiştir.

Aşılar sıcaklık değişimlerine karşı hassas yapıdadırlar. Bu nedenle formülasyona kriyoprotektan ilavesi aşılarda stabilitesini artırmaya yardımcı olabilir (Küçüktürkmen & Bozkır, 2018). Sefidi ve ark., tarafından yapılan çalışmada trehalozun aşı stabilitesi üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (Sefidi ve ark., 2017). Bu bilgilerden hareketle kriyoprotektan maddenin stabilizeye etkisini görmek için elde edilen çökelti %1 a/h oranında trehaloz içeren distile su ile disperse edilmiş bu dispersiyon -20 °C’de 90 gün süreyle takip edilmiştir. Her stabilize ölçüm zamanında her bir numunenin partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ölçülmüştür.

2.3.8. Hazırlanan Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Ovalbumin, boş nanopartikül, ovalbumin yüklü nanopartikül ve PEG-PCL kopolimerinin termal özellikleri TA Q2000 DSC cihazı ile incelenmiştir. Yaklaşık 2 mg ağırlığındaki örnekler alüminyum pana yerleştirilerek preslenmiştir. Azot gazı 50 ml/dakika akış hızında kullanılarak, örnekler 20-300 °C sıcaklık aralığında 5°C/dak doğrusal ısıtma hızında analiz edilmiştir. Analizde kör olarak boş pan kullanılmıştır.

2.3.9. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi

Nanopartikül formülasyonu distile su ile disperse edilmiştir. Daha sonra 200 mesh bakır grid üzerine damlatılarak oda sıcaklığında kuruması beklenmiştir. FEI Tecnai G2 marka TEM (120 Kw) cihazı ile görüntülenmiştir.

2.3.10. Hücre Kültürü Çalışmaları

2.3.10.1. Hücre Canlılığı Testi

Fibroblastlar immün sistemde pek çok görev almaktadırlar (Bautista-hernández ve ark., 2017). Bu nedenle hücre canlılığı çalışmalarında fibroblastlardan üretilen L929 hücre hattı kullanılmıştır. RBD yüklü nanopartikül, boş nanopartikül, PEG-PCL polimeri ve saf RBD'nin farklı konsantrasyonlarının, L929 hücre hattında hücrelerin canlılığına olan etkisi MTT adı verilen yöntem ile test edildi. MTT analizi hücre canlılığı testleri için altın standart olarak kabul edilmektedir. (Pınar Erkekoğlu & Terken Baydar, 2021) MTT analizi için 96 kuyucuklu plakaya her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre/ml olacak şekilde ekim yapıp 24 saat inkübasyona bırakıldı. Seçilen konsantrasyon aralıkları bu hücrelerin üzerine ekildi. Hücrelerin canlılıklarının belirlenmesi için 72 saat inkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 10 mg/ml MTT solüsyonundan 10 µl eklendi. 4 saatlik inkübasyonun ardından canlı hücrelerin

içerisinde oluşacak formazan kristallerinin çözülmesi için her bir kuyucuğa 100 µl DMSO aktarıldı. 30 dakika karanlık ortamda oda sıcaklığında tutulan mikrolakların her bir kuyucuğundaki optik yoğunluk değeri bu sürenin ardından 540 nm’de ELISA Reader’da okutuldu.

2.3.10.2. Nitrik Oksit (NO) Tayini

Nitrik oksit (NO), vücutta sitokin üretimini uyarır ve makrofajlar aracılığıyla hücre içi patojenlerin yok edilmesini ve enfeksiyonlara karşı bağışıklık tepkinin artmasına yardımcı olur. Bu nedenle NO, aşı çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Antijen ile etkileşimin ardından NO seviyelerinde artış görülmesi, bağışıklık yanıtının oluştuğunun göstergesidir (Derman ve ark., 2015).

NO analizi, J774 fare makrofaj hücre hattı kullanılarak hücre canlılığı analizi sonrası belirlenen toksik olmayan konsantrasyondaki RBD antijeni ve antijen yüklü nanopartikül formülasyonu ile gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu mikrolaklar J774 makrofaj hücre hatlarıyla kaplanarak belirlenen 3 farklı konsantrasyondaki örnekten 50 µl alınarak kuyucuklara ekilmiştir. Mikrolaklar 37 °C’de 72 saat inkübe edilmiş, ardından kuyucuklardaki süpernatantlar yeni bir plakaya ekilmiştir. Analiz için hazırlanan standartlardan da 50’şer µl kuyucuklara ekilmiştir. Her bir kuyucuk üzerine 50 µl Griess reaktifi eklenmiştir. Mikrolaka 10 dakika karanlıkta bekletildikten sonra 540 nm’de UV ölçümü yapılmıştır. Standart kalibrasyon eğrisi oluşturularak her bir örnek için NO üretim miktarı hesaplanmıştır.

2.4. Mikroigne Formülasyonları

2.4.1. Mikroigne Önformülasyon Çalışmaları

Çözünen mikroigne üretimi için mikro kalıplama yöntemi kullanılmıştır. Ön formülasyon çalışmalarında mikroigne kalıbını oluşturmak için polisiloksan yapılı kit olan Zhermack ZetaPlus C Tipi Silikon Takım kullanılmıştır. Kalıbı oluşturmak için polisiloksan ve aktivatör 10:1 a/a oranında karıştırılmıştır (Aykaç K., 2020)

Hamur haline getirilen karışım cam bir flakona koyulmuş ve yüzeyi düzgün hale getirilmiştir. Daha sonra kalıba 10*10 iğneye sahip dermapen iğnesi batırılmış ve kalıp sertleşene kadar (yaklaşık 30 dakika) bekletilmiştir. Daha sonra dermapen iğnesi kalıptan çıkarılmıştır. Elde edilen mikroigne kalıbı oda sıcaklığında desikatörde saklanmıştır.

Mikroigne kalıbına Çizelge 2’de belirtilen kaynak literatürlerden hareketle çeşitli polimer çözeltileri iğnesiz insülin enjektörü ile uygulanmış ve çeşitli rpm’lerde santrifüj uygulanarak polimer çözeltisinin mikroigne kalıbındaki boşluklara dolması sağlanmıştır. Daha sonra kurutma işlemi yapılmıştır. Kurumadan sonra destek tabaka olarak ikinci bir polimer çözeltisi aynı kalıp üzerine uygulanmış ve ikinci bir santrifüj işlemi uygulanmıştır. Daha sonra kurutma işlemi uygulanmıştır. Kurutma işleminin ardından mikroigneler çift taraflı bant kullanılarak kalıptan çıkarılmıştır. Mikroigneler oda sıcaklığında desikatörde saklanmıştır.

Çizelge 2.3. Polisiloksan kit ile üretilen mikroigne formülasyonları.

Kalp No	Polisiloksan (g)	Aktivatör (g)	İğne ucu polimer	İğne ucu (polimer oranı)	Destek tabaka polimer	Destek tabaka polimer oranı	Santrifüj hızı	Santrifüj süresi	Kurutma koşulu	Kurutma Süresi	Kaynak
1	1,6 g	0,16 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA	%30 a/h	PVP K-90	%40 a/h	3500 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	24 saat+ 24 saat	(Ziesmer ve ark., 2021)
2	1,6 g	0,16 g	Sodyum hyaluronat	% 20 a/h	Sodyum hyaluronat	% 20 a/h	4000 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	24 saat+ 24 saat	(Kuwentrai ve ark., 2021)
3	1,49 g	0,13 g	Yüksek viskoziteli CMC sodyum tuzu	%3 a/h	Yüksek viskoziteli CMC sodyum tuzu	%3 a/h	4000 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	24 saat+ 24 saat	(Aykaç K., 2020)
4	1,89 g	0,19 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA	%30 a/h	PVP K-90	%40 a/h	3500 rpm	30 dk	+4°C	24 saat+ 24 saat	(Ziesmer ve ark., 2021)
5	2,06 g	0,21 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA	%30 a/h	PVP K-90	%40 a/h	3500 rpm	30 dk	-20°C	24 saat+ 24 saat	(Ziesmer ve ark., 2021)
6	2,59 g	0,25 g	Eudragit RS100 / PVP K-90	Eudragit RS100 + %40 a/h PVP K-90 (1:4 oranda)	-	-	3000 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	48 saat	(Aung ve ark., 2021)
7	2,63 g	0,27 g	Karboksimetil selüloz	%3 a/h	CMC	%3 a/h	4000 rpm	30 dk	40°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	2 saat	(Aykaç K., 2020)
8	3,71 g	0,38 g	Sodyum aljinat (yüksek viskoziteli)+ Maltoz + %15 CaCl ₂ çözeltisi	(Sodyum aljinat+ Maltoz =0,97 g) (CaCl ₂ çözeltisi= 24 µl)	Sodyum aljinat (yüksek viskoziteli)+ Maltoz + %15 CaCl ₂ çözeltisi	(Sodyum aljinat+ Maltoz =0,97 g) (CaCl ₂ çözeltisi= 24 µl)	4000 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	24 saat+ 24 saat	(Y. Zhang ve ark., 2018)
9	1,61 g	0,17 g	Sodyum aljinat (yüksek viskoziteli)+ Maltoz + %15 CaCl ₂ çözeltisi	(Sodyum aljinat+ Maltoz =0,97 g) (CaCl ₂ çözeltisi= 24 µl)	-	-	15000 rpm	12 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	24 saat	(Y. Zhang ve ark., 2018)
10	1,75 g	0,17 g	Sodyum aljinat (yüksek viskoziteli)+ Maltoz	(Sodyum aljinat= 412,1 mg) (Maltoz= 750,51 mg) (5 ml'de)	-	-	15000 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	16 saat	(Y. Zhang ve ark., 2018)

Çizelge 2.3. Devam. Polisiloksan kit ile üretilen mikroigne formülasyonları.

Kalp No	Polisiloksan (g)	Aktivatör (g)	İğne ucu polimer	İğne ucu (polimer oranı)	Destek tabaka polimer	Destek tabaka polimer oranı	Santrifüj hızı	Santrifüj süresi	Kurutma koşulu	Kurutma Süresi	Kaynak
11	1,61 g	0,17 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA + Maltoz	%30 a/h PVA + %15 a/h Maltoz	PVP K90	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	25 saat+ 24 saat	(Y. Zhang ve ark., 2018)
12	1,54 g	0,16 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA	%40 a/h PVA	PVP K90	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	25 saat+ 24 saat	(Ziesmer ve ark., 2021)
13	1,99 g	0,19 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA+ Maltoz	%30 a/h PVA+ %15 a/h Maltoz	PVP K90	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	24 saat+ 24 saat	(Y. Zhang ve ark., 2018)
14	2,43 g	0,24 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA	%40 a/h PVA	PVP K90	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	24 saat+ 24 saat	(Ziesmer ve ark., 2021)
15	2,12 g	0,22 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA + Maltoz	%30 a/h PVA+ %15 a/h Maltoz	PVP K90	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+ 48 saat	(Y. Zhang ve ark., 2018)
16	2,96 g	0,3 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA	%40 a/h PVA	PVP K90	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+ 48 saat	Ziesmer ve ark., 2021
17	2,51 g	0,25 g	PVA (4-88)	%50 a/h PVA	-	-	4000 rpm	20 dk	60 °C,3 bar basınçta vakumlu etüvde	72 saat	(Nguyen ve ark., 2018)
18	2,58 g	0,25 g	Sodyum aljinat (yüksek viskoziteli)+ 1M CaCl ₂	%2 a/h sodyum aljinat+ 100 µl 1 M CaCl ₂	-	-	2500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat	(W. Chen ve ark., 2017)
19	2,5 g	0,25 g	PVP K90	%40 a/h PVP K90	PVP K90	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+ 48 saat	(A. A. Ali ve ark., 2017)
20	2,5 g	0,25 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA + Maltoz	%30 a/h PVA+ %15 a/h Maltoz	PVP K90	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+48 saat	(Y. Zhang ve ark., 2018)
21	2,5 g	0,25 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA	%40 a/h PVA	PVP K90	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+ 48 saat	(Ziesmer ve ark., 2021)
22	2,5 g	0,25 g	PVA (4-88)	%50 a/h PVA	-	-	4000 rpm	20 dk	60 °C,vakum olmadan vakumlu etüvde	48 saat	(Nguyen ve ark., 2018)

Çizelge 2.3. Devam. Polisiloksan kit ile üretilen mikroigne formülasyonları.

Kalp No	Polisiloksan (g)	Aktivatör (g)	İğne ucu polimer	İğne ucu (polimer oranı)	Destek tabaka polimer	Destek tabaka polimer oranı	Santrifüj hızı	Santrifüj süresi	Kurutma koşulu	Kurutma Süresi	Kaynak
23	2,5 g	0,25 g	PVA (%87-89 hidroksillenmiş)+ Glutaraldehit (%50 a/h suda)+ Glukoz monohidrat + Mısır nişastası	PVA (%87-89 hidroksillenmiş) (2,24 g)+ Glutaraldehit (%50 a/h suda) (0,13 g) + Glukoz monohidrat (0,45 g)+ Mısır nişastası (0,45 g)	PVP K90	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+48 saat	(Gadhav ve ark., 2019)
24	2,5 g	0,25 g	PVA + D-Sorbitol	750,2 mg PVA + 112,13 mg D-Sorbitol/5 ml su	PVA+ D-Sorbitol	750,2 mg PVA(MA=72000)+ 112,13 mg D-Sorbitol/5 ml su	4500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+48 saat	(Arshad ve ark., 2021; Zafar ve ark., 2021)
25	2,5 g	0,25 g	PVA (%87-89 hidroksillenmiş)+ PVP K90+ PEG 400	200 mg PVA (%87-89 hidroksillenmiş)+ 300 mg PVP K-90+ 158,02 mg PEG400/5 ml suda	PVA (%87-89 hidroksillenmiş) + PVP K-90+ PEG 400	200 mg PVA (%87-89 hidroksillenmiş) + 300 mg PVP K90+ 158,02 mg PEG400/5 ml suda	4500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+48 saat	(Chellathurai ve ark., 2021)
26	2,5 g	0,25 g	%40 PVA (%87-89 hidroksillenmiş) + Trietil sitrat	%40 PVA (%87-89 hidroksillenmiş) + %40'lık PVA'nın %50'si ağırlıkta Trietil sitrat	PVP K90	%40 a/h PVP K90	4500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+24 saat	(Küçüktürkmen ve ark., 2021)
27	2,5 g	0,25 g	%40 PVA (%87-89 hidroksillenmiş) + Trietil sitrat	%40 PVA (%87-89 hidroksillenmiş) + %40'lık PVA'nın %1'i ağırlıkta Trietil sitrat	PVP K90	%40 a/h PVP K90	4500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+24 saat	(Küçüktürkmen ve ark., 2021)

2.4.2. PDMS (Polidimetilsiloksan) Kalıp ile Geliştirilen Mikroığne Formölasyonları

Polisiloksan kit ile oluşturulan mikroığne kalıbıyla üretilen formölasyonlardan kalıptan çıkma ve sertlik parametrelerine göre en iyi sonuç verenleri seçilmiştir. Bu formölasyonlar PDMS kalıba yüklenmiş ve buradan hareketle nihai mikroığne formölasyonu seçilmiştir. Mikroığne formölasyonunun sertliğini etkileyip etkilemediğini anlamak için PDMS kalıp ile üretilen tüm formölasyonlara model protein çözeltisinden eklenmiştir. Polimer çözeltisini belirli bir konsantrasyonda hazırlarken kullanılan distile su miktarından model protein çözeltisinin miktarı düşölmüştür. Kalıptan çıkarılan mikroığneler +4 °C’de bulunan desikatörde saklanmıştır.

Geliştirilen formölasyonlar Çizelge 2.4’te verilmiştir.

Çizelge 2.4. PDMS mikroigne kalıbı ile geliştirilen mikroigne formülasyonları.

Formül No	İğne ucu polimer oranı	Ovalbumin miktarı	Destek tabaka polimer oranı	Santrifüj hızı	Santrifüj süresi	Kurutma süresi	Kurutma koşulu
1	%15 a/h PVA	50 µg	%40 a/h PVP	3500 rpm	20 dk	48 saat+48 saat	+4°C'de desikatörde
2	%17,5 a/h PVA	50 µg	%40 a/h PVP	3500 rpm	20 dk	48 saat+48 saat	+4°C'de desikatörde
3	%20 a/h PVA	50 µg	%40 a/h PVP	3500 rpm	20 dk	48 saat+48 saat	+4°C'de desikatörde
4	%30 a/h PVA	50 µg	%40 a/h PVP	3500 rpm	20 dk	24 saat+24 saat	+4°C'de desikatörde
5	%35 a/h PVA	50 µg	%40 a/h PVP	3500 rpm	20 dk	24 saat+24 saat	+4°C'de desikatörde
6	%40 a/h PVA	50 µg	%40 a/h PVP	3500 rpm	20 dk	24 saat+24 saat	+4°C'de desikatörde
7	%1,5 a/h sodyum hyaluronat	50 µg	%1,5 a/h sodyum hyaluronat	4500 rpm	20 dk	24 saat+24 saat	+4°C'de desikatörde
8	%3 a/h sodyum hyaluronat	50 µg	%3 a/h sodyum hyaluronat	4500 rpm	20 dk	24 saat+24 saat	+4°C'de desikatörde
9	%5 a/h sodyum hyaluronat	50 µg	%5 a/h sodyum hyaluronat	4500 rpm	20 dk	24 saat+24 saat	+4°C'de desikatörde

PDMS kalıp ile mikroiğne formülasyonları geliştirilirken iğnesiz insülin enjektörü ile 0,02 , 0,04 , 0,06 , 0,08 ve 0,1 ml polimer çözeltisi kalıba uygulamış ve santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında madde kaybının en az olduğu ve kalıp yüzeyinin düzgün şekilde kaplanması parametrelerine bakılarak en iyi sonucun 0,1 ml polimer çözeltisi ile elde edildiği görülmüştür. Bu nedenle daha sonra geliştirilen mikroiğne formülasyonlarında kalıba hep 0,1 ml polimer çözeltisi uygulanmıştır.

PDMS kalıp ile geliştirilen mikroiğne formülasyonlarından kalıptan çıkma ve mikroskop görüntülerinde en iyi sonuç verenleri seçilmiş ve mikroiğnelere nanopartikül formülasyonu yüklenmiştir.

2.4.3. Mikroiğne Formülasyonlarının Optik Mikroskop ile Görüntülenmesi

Mikroiğne formülasyonları Leica DM 4000B mikroskop ile 4 ve 10'luk objektif ile görüntülenmiştir.

2.4.4. Mikroiğnelerin Tekstür Analizi

Mikroiğnelerin tekstür analizi için TA.XT Plus Cihazı kullanılmıştır. Analiz 10 mm çapa silindirik P/10 probuyla gerçekleştirilmiştir. Mikroiğnelerin dayanaklılığını test etmek için mikroiğne dizisi, iğneler aşağı bakacak şekilde çift taraflı bir bant kullanılarak proba tutturulmuştur. Tekstür analizi cihazı sıkıştırma moduna ayarlanmıştır. P/10 prob, 0,049 N'lik bir tetikleme kuvveti ile metal yüzeye ulaşmak için 1 mm/s hızla aşağı doğru hareket ettirilmiştir (Panda ve ark., 2022).

Ayrıca aynı analiz cilt dokusunu simüle edecek şekilde sekiz katman oluşturacak şekilde kesilmiş parafilm kullanılarak tekrarlanmıştır. Parafilm tabakası metal yüzey üzerine çift taraflı bant kullanılarak sabitlenmiş ve cihaz aynı çalışma prensibiyle çalıştırılarak analiz tekrarlanmıştır (Paredes ve ark., 2022).

Her iki analiz de hem 5 kg'lık hem de 30 kg'lık yük hücresine sahip TA.XT Plus Cihazı ile tekrarlanmıştır. Elde edilen verilerden hareketle kuvvet- yer değiştirme grafiği oluşturularak mikroiğnelerin dayanıklılığı ile ilgili değerlendirme yapılmıştır. Elde edilen grafiklerden en dayanıklı mikroiğne formülü seçilmesi ve ileriki deneylerde bu formül üzerinden ilerlenmesi amaçlanmıştır.

2.4.5. Mikroiğne Formülasyonlarının Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

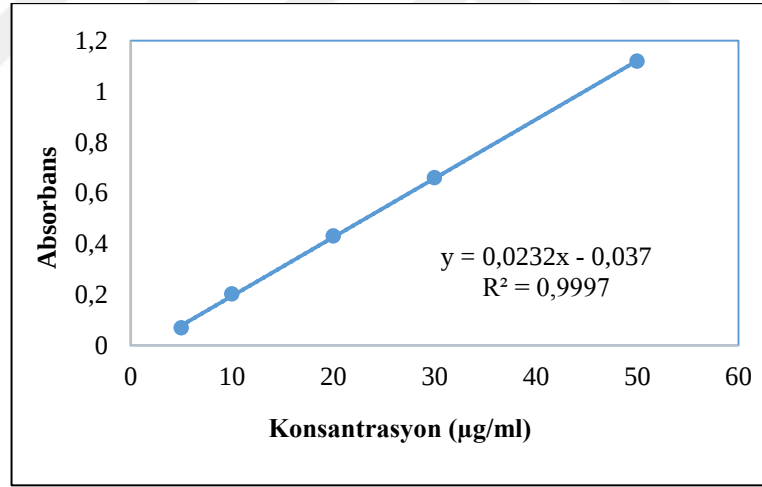
Seçilen mikroiğne numuneleri, dairesel diskler üzerine monte edildi ve ETD dedektörü kullanılarak 10^{-5} mbar 15 kV ile yüksek vakum modlu çevresel taramalı elektron mikroskobu ZEISS EVO 40 ile morfolojik olarak karakterize edildi. Örnekler önce K550X püskürtmeli altın kaplayıcı ile 0,33 nm/saniye hızla altın ile kaplandı. Ardından 15 kV ile yüksek vakum modlu çevresel taramalı elektron mikroskobu ile incelendi.

3. BULGULAR

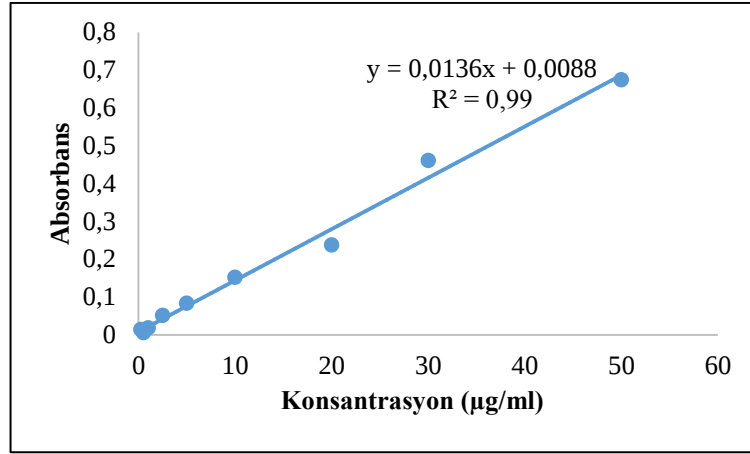
3.1. Nanopartikül Formülasyonunda Yapılan Kontroller

3.1.1. Etken Maddelerin Miktar Tayinleri İçin Kullanılan Yöntemlerin Kalibrasyonun Ait Bulgular

Ovabumin'in sodyum kolat ve pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki ölçümü 2.2.1'de açıklanan şekilde yapılmış ve kalibrasyona ait grafik ve denklem bulunmuştur. Grafikler sırasıyla sodyum kolat için Şekil 3.1 'de ve pH 7,4 fosfat-salin tampon için Şekil 3.2'de verilmiştir. Doğrulara ait parametreler Çizelge 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Ovalbuminin sodyum kolat ile kalibrasyon grafiği.

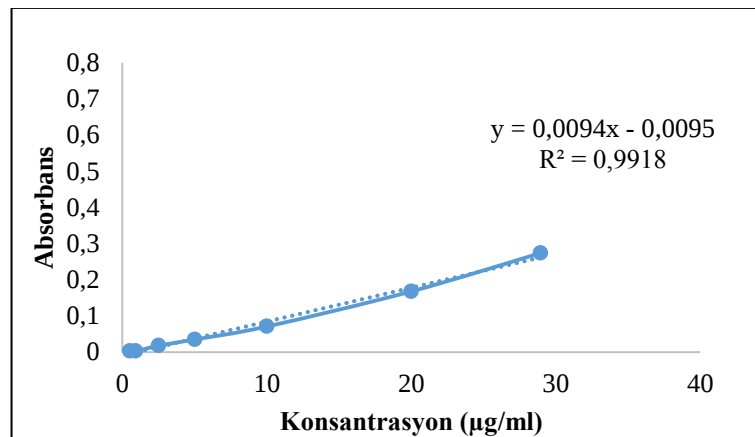


Şekil 3.2. Ovalbuminin pH 7,4 fosfat-salin tamponu ile kalibrasyon grafiği.

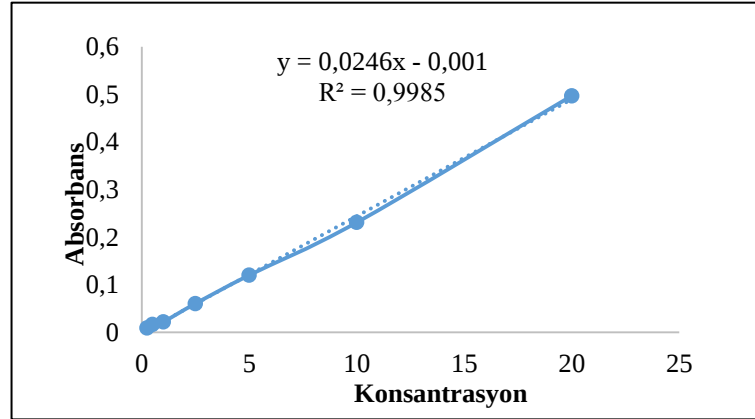
Çizelge 3.1. Ovalbumin'in kalibrasyon doğrusuna ait parametreler.

Ortam	Sodyum kolat	pH 7,4 fosfat-salin tamponu
Eğim	0,0232	0,0136
Kesişim	0,037	0,0088
Doğru Denklemi	$y = 0,0232x - 0,037$	$y = 0,0136x + 0,0088$
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0,9997	0,99

RBD'nin sodyum kolat ve pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki ölçümü 2.2.1'de açıklanan şekilde yapılmış ve kalibrasyona ait grafik ve denklem bulunmuştur. Grafikler sırasıyla sodyum kolat için Şekil 3.3'te pH 7,4 fosfat-salin tampon için Şekil 3.4.'de verilmiştir. Doğrulara ait parametreler Çizelge 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.3. RBD'nin sodyum kolat ile kalibrasyon grafiği.



Şekil 3.4. RBD'nin pH 7,4 fosfat-salin tamponu ile kalibrasyon grafiği.

Çizelge 3.2. RBD'nin kalibrasyon doğrusuna ait parametreler.

Ortam	Sodyum kolat	pH 7,4 fosfat-salin tamponu
Eğim	0,0094	0,0246
Kesişim	0,0095	0,0001
Doğru Denklemi	$y = 0,0094x - 0,0095$	$y = 0,0246x - 0,001$
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0,9918	0,9985

3.1.2. Model Protein İle Hazırlanan Nanopartiküllerin Ön Formülasyon Sonuçları

Model protein ile hazırlanan nanopartiküllerin ön formülasyon sonuçları Çizelge 3.3'te listelenmiştir. Nanopartikül formülasyonu seçerken enkapsülasyon etkinliği ve partikül büyüklüğü parametreleri değerlendirilmiştir. Enkapsülasyon etkinliğinin 50 µg protein yüklendiğinde daha yüksek olduğu bulunmuştur. İç faz sodyum kolat oranının %1, miktarının 2 ml ve dış faz sodyum kolat oranının %0,3 ve miktarının 17 ml olduğu formülasyonun enkapsülasyon etkinliği daha yüksek bulunmuştur. Nihai formül seçilirken sadece enkapsülasyon etkinliği değil aynı zamanda partikül büyüklüğü verileri de dikkate alınmıştır. Antijen sunan hücreler tarafından antijenin daha etkili bir şekilde alınabilmesi için partikül büyüklüğü 200

nm'nin altında olan daha küçük partikül boyutuna sahip formülasyon seçilmiştir. Bu sonuca da sonikasyon gücü %30 ve birinci sonikasyon süresi 60 saniye, ikinci sonikasyon süresi 120 saniye olan formülle ulaşılmıştır. Bu parametreler değerlendirilerek NP 11 formülasyonu nihai formülasyon olarak seçilmiştir. RBD antijeni içeren formülasyon NP 11 formülasyonundan hareketle hazırlanmıştır.



Çizelge 3.3. Model protein ile hazırlanan nanopartiküllerin ön formülasyon sonuçları.

Formül No	OVA (µg)	PEG-PCL (mg)	İç Faz Sodyum Kolat Oranı(%)	İç Faz Sodyum Kolat (ml)	Dış Faz Sodyum Kolat Oranı (%)	Dış Faz Sodyum Kolat (ml)	1.Sonikasyon (sn)	2. Sonikasyon (sn)	Sonikasyon Güç (%)	Karıştırma Süresi (Saat)	Enkapsülasyon Sonuçları (%)	Partikül Boyutu Sonuçları	PDI
NP 1	50 µg	20,39	1	2	0,3	17	30	120	30	2	101,91±5,33	151,9±1,652	0,174±0,017
NP 2	50 µg	20,56	1	2,5	0,3	5	30	120	30	2	61,49±3,68	*	*
NP 3	100 µg	20,03	1	2	0,3	17	30	120	30	2	93,59±9,041	148,4±1,873	0,174±0,016
NP 4	100 µg	20,09	1	2,5	0,3	5	30	120	30	2	60,56±2,41	167,8±2,818	0,236±0,012
NP 5	50 µg	20,07	1	2	1	17	30	120	30	2	118,93±5,62	229,7±2,425	0,183±0,030
NP 6	50 µg	20,32	1	2	0,5	17	30	120	30	2	89,72±2,80	162,8±1,790	0,173±0,005
NP 7	50 µg	20,18	1	2	0,3	10	30	120	30	2	52,63±22,44	185,8±4,293	0,242±0,002
NP 8	50 µg	20,39	1	2	0,3	17	30	90	30	2	**	206,4±10,37	0,428±0,035
NP 9	50 µg	20,4	1	2	0,3	17	30	60	30	2	**	237,5±4,800	0,331±0,040
NP 10	50 µg	20,33	1	2	0,3	17	30	120	30	2	80,3±8,94	227,2±0,7000	0,280±0,024
NP 11	50 µg	20,13	1	2	0,3	17	60	120	30	2	98,81±0,68	156,4±2,974	0,231±0,014
NP 12	50 µg	20,1	1	2	0,3	17	90	120	30	2	116,88±3,52	213,03±0,5000	0,305±0,036
NP 13	50 µg	20,25	1	2	0,3	17	30	120	60	2	75,55±7,96	201,2±1,595	0,266±0,009

Çizelge 3.3. Devam. Model protein ile hazırlanan nanopartiküllerin ön formülasyon sonuçları.

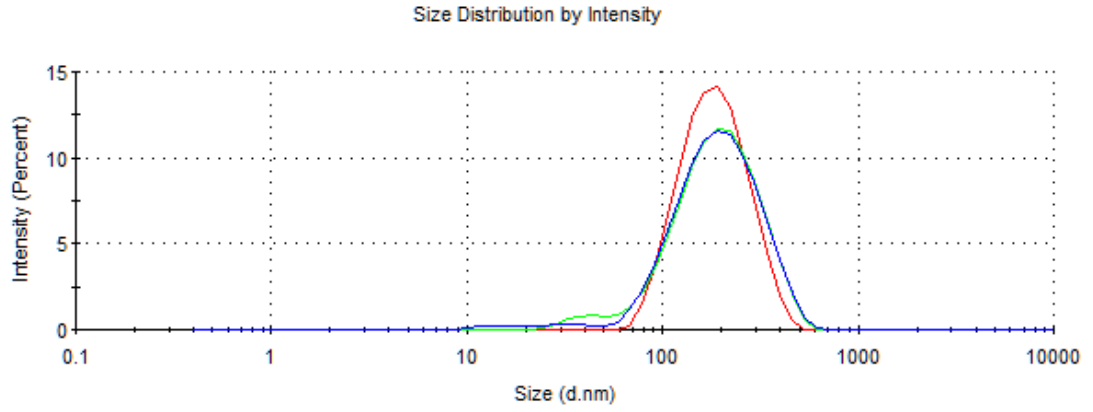
Formül No	OVA (µg)	PEG-PCL (mg)	İç Faz Sodyum Kolat Oranı(%)	İç Faz Sodyum Kolat (ml)	Dış Faz Sodyum Kolat Oranı (%)	Dış Faz Sodyum Kolat (ml)	1.Sonikasyon (sn)	2. Sonikasyon (sn)	Sonikasyon Güç (%)	Karıştırma Süresi (Saat)	Enkapsülasyon Sonuçları (%)	Partikül Boyutu Sonuçları	PDI
NP 14	50 µg	20,51	1	2	0,3	17	30	120	90	2	83,99±3,33	191,7±1,724	0,295±0,050
NP 15	50 µg	20,08	1	2	0,3	17	60	120	30	2	101,6±4,03	185,0±1,664	0,251±0,004
NP 16	50 µg	20,06	1	2	0,3	17	60	120	30	2	106,93±8,47	189,2±3,623	0,247±0,012
NP 17	50 µg	20,18	1	2	0,3	17	60	120	90	2	106,4±12,43	181,7±3,139	0,254±0,007

* ile işaretli formülasyonun partikül büyüklüğü nm boyutundan büyük gelmiştir.

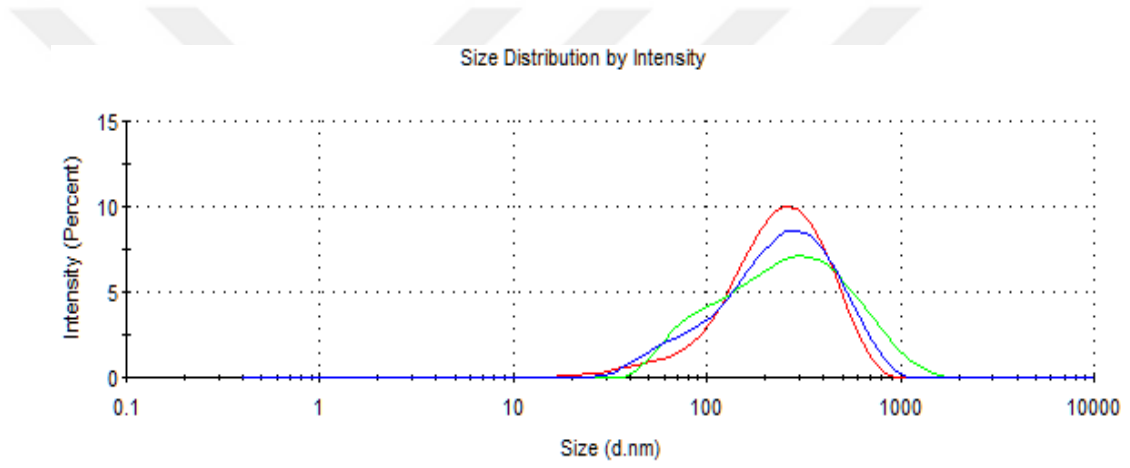
** ile işaretli formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri çok düşük bulunmuştur.

Çizelge 3.4. RBD antijeni ile üretilen nanopartiküle ait sonuçlar

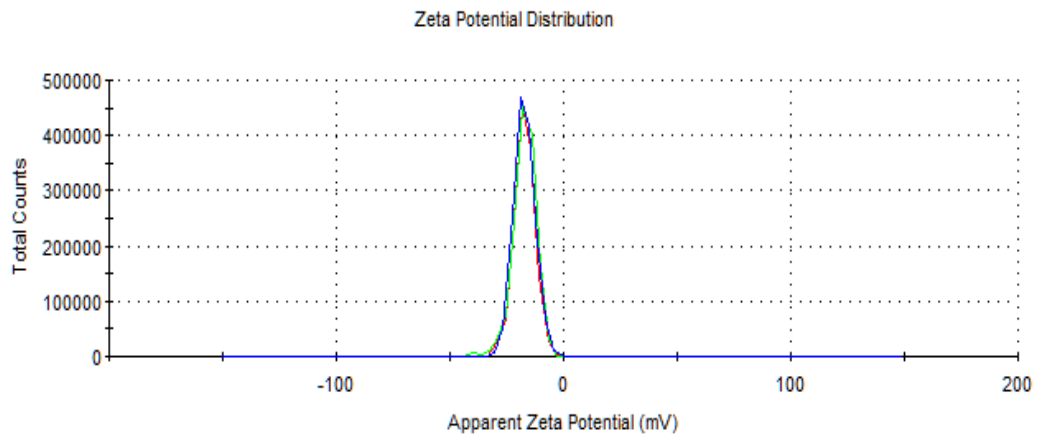
Formül No	RBD (µg)	PEG-PCL (mg)	İç Faz Sodyum Kolat Oranı(%)	İç Faz Sodyum Kolat (ml)	Dış Faz Sodyum Kolat Oranı (%)	Dış Faz Sodyum Kolat (ml)	1.Sonikasyon (sn)	2. Sonikasyon (sn)	Sonikasyon Güç (%)	Karıştırma Süresi (Saat)	Enkapsülasyon Sonuçları (%)	Partikül Boyutu Sonuçları	Pdi	Zeta potansiyel
RBD NP	50 µg	20,39	1	2	0,3	17	30	120	30	2	95,58308±1,107371	192,8±0,3215	0,331±0,058	-17,2±1,349



Şekil 3.5. NP 11 kodlu formüle ait partikül boyutu ve dağılımına ait grafik.



Şekil 3.6. RBD NP kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik.

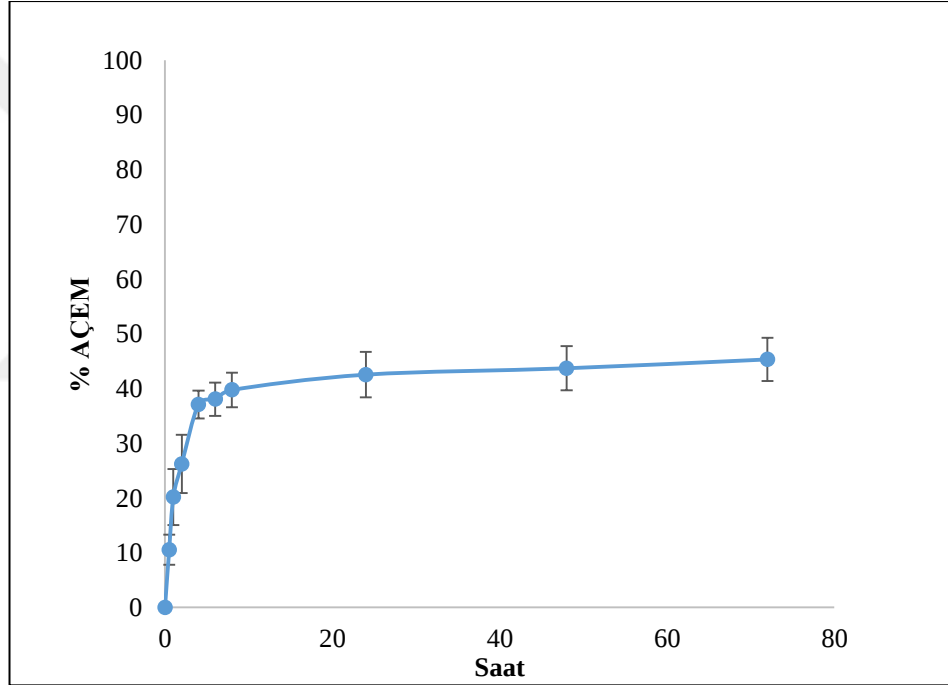


Şekil 3.7. RBD NP kodlu formülün zeta potansiyeli dağılımına ait grafik.

3.1.3. İn Vitro Etkin Madde Salım Çalışmaları

3.1.3.1. Model Protein ile Üretilen Nanopartikül Formülasyonu ile Yapılan İn Vitro Salım Çalışmasına Ait Bulgular

Bölüm 2.5.5.'te anlatıldığı şekilde örnek al ve ayır yöntemiyle yapılan in vitro salım çalışması sonucu elde edilen sonuçlar Şekil 3.8.'de gösterilmiştir.

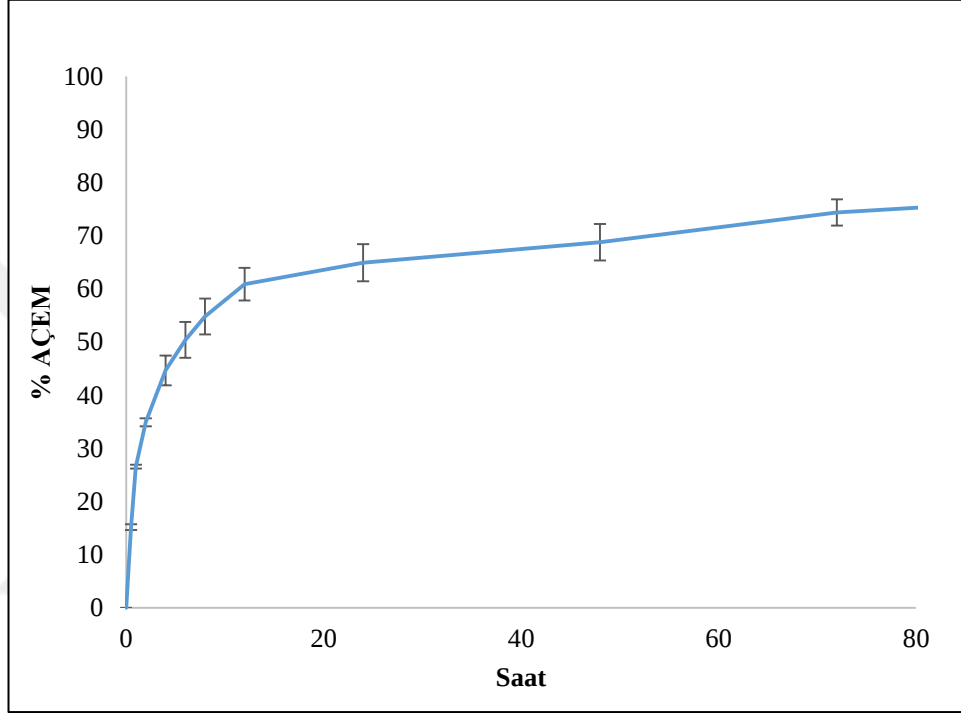


Şekil 3.8. Model protein ile üretilen nanopartikül formülasyonundan in vitro salım profili.

İn vitro salım çalışmalarından elde edilen veriler sonucunda salımın 24. saate kadar hızlı bir şekilde gerçekleştiği ve platoya ulaştığı görülmüştür. Daha sonrasında ise salımın 72 saate kadar devam ettiği bulunmuştur. Salım çalışmaları üç paralel olarak yürütülmüştür.

3.1.3.2. RBD Antijeni ile Üretilen Nanopartikül Formülasyonu ile Yapılan İn Vitro Salım Çalışmasına Ait Bulgular

Bölüm 2.5.5.'te anlatıldığı şekilde örnek al ve ayır yöntemiyle yapılan in vitro salım çalışması sonucu elde edilen sonuçlar Şekil 3.9'da gösterilmiştir.



Şekil 3.9. RBD antijeni ile üretilen nanopartikül formülasyonundan in vitro salım profili.

İn vitro salım çalışmalarından elde edilen veriler sonucunda salımın 24. saate kadar hızlı bir şekilde gerçekleştiği ve platoya ulaştığı görülmüştür. Daha sonrasında ise salımın 72 saate kadar devam ettiği bulunmuştur. Salım çalışmaları üç paralel olarak yürütülmüştür.

İn vitro salım çalışmalarından elde edilen veriler sonucunda model protein ve RBD antijeni ile üretilen nanopartikül formülasyonlarının salım profillerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Salım kinetikleriyle ilgili veriler Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. RBD yüklü nanopartikül in vitro salım kinetikleri.

	0. derece	1.derece	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Weibull
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0,675	0,931	0,870	0,914	0,942
Kesişim	0,291	0,011	4,710	0,232	0,371

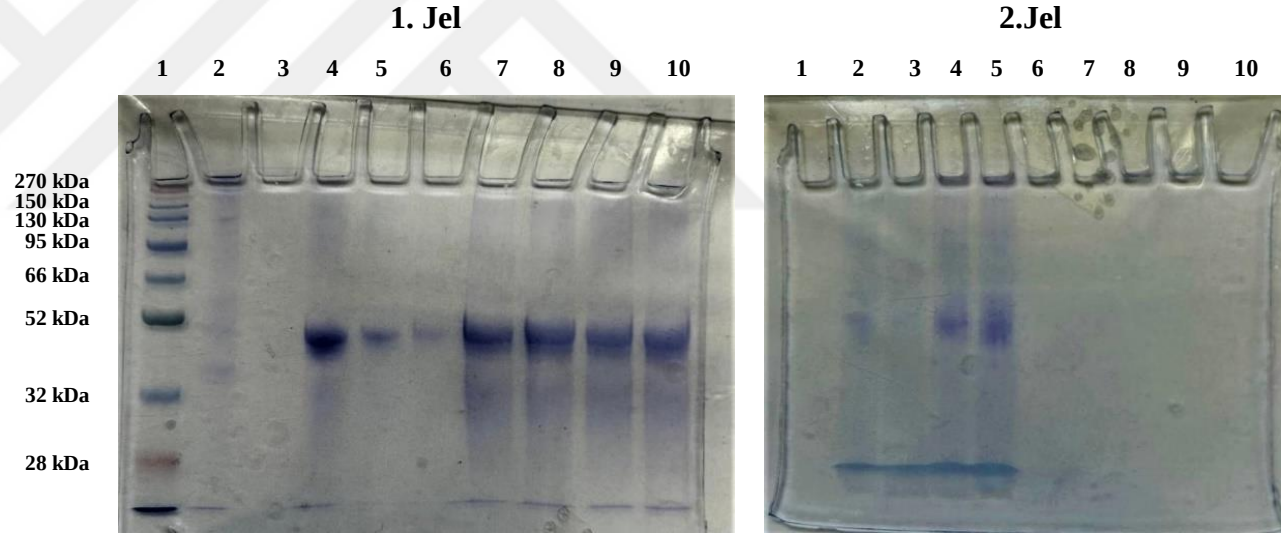
RBD yüklü nanopartiküllerden yapılan in vitro salım çalışmaları sonucunda elde edilen verilerden hareketle yapılan kinetik hesaplamalar sonucunda salımın birinci derece, Korsmeyer-Peppas ve Weibull kinetiklerine uyum sağladığı görülmüştür.

Yukarıda bahsedilen üç kinetiğe de uyum görülmesine karşın en yüksek uyum Weibull kinetiğinde görülmüştür. İn vitro salım grafiklerinden elde edilen sonuçların kinetik sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür.

3.1.4. SDS-PAGE Analizi Sonuçları

3.1.4.1. Model protein ile üretilen nanopartikül SDS-PAGE Analizi Sonuçları

Bölüm 2.3.6’da anlatıldığı biçimde SDS-PAGE çalışmaları yürütülmüştür. Kuyucuklara sırasıyla birinci jel için marker, 500 ppm Ovalbumin, 100 ppm Ovalbumin, 50 ppm Ovalbumin, 100 ppm Ovalbumin 24. saat numunesi, 100 ppm Ovalbumin 96. saat numunesi, 50 ppm Ovalbumin 24.saat numunesi ve 50 ppm Ovalbumin 96. saat numunesi uygulanmıştır. İkinci jel için 100 µg Ovalbumin içeren nanopartikül 24. saat salım numunesi, 100 µg Ovalbumin içeren nanopartikül 96. saat salım numunesi, 50 µg Ovalbumin içeren nanopartikül 24. saat salım numunesi ve 50 µg Ovalbumin içeren nanopartikül 96. saat salım numunesi uygulanmıştır. Analiz sonucunda ovalbuminin molekül ağırlığına ait 44 kDa’lık bantlar tüm numunelerde görülmüştür. Nanopartiküllere etkin bir şekilde ovalbumin yüklendiği görülmüştür.

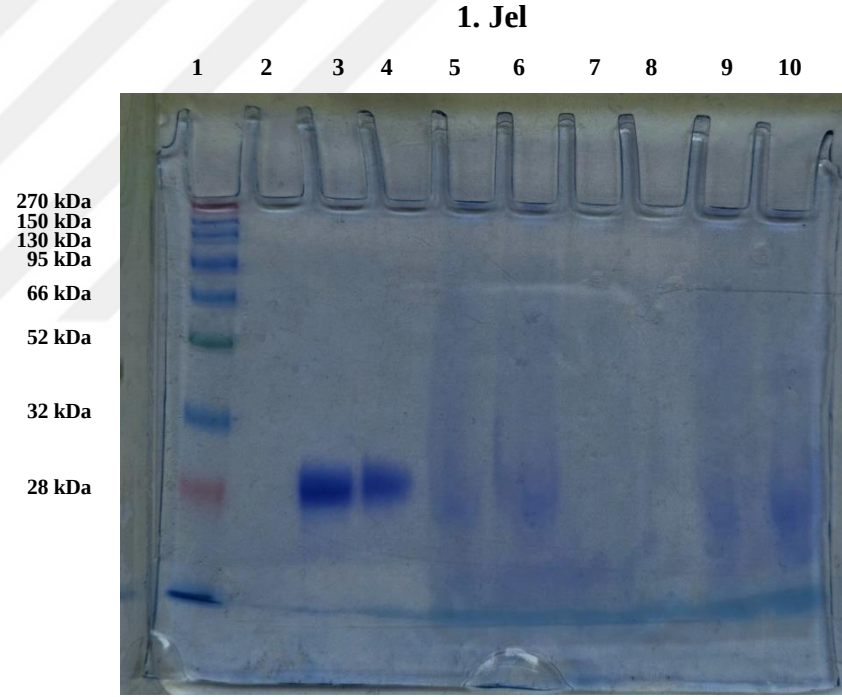


Şekil 3.10. Model proteinle üretilen nanopartikül ve saf model proteine ait SDS-PAGE jeli.

1. jel uygulama sırası: 1.kuyucuk: Marker , 2.kuyucuk: Boş , 3.kuyucuk: Boş , 4. Kuyucuk: 500 ppm Ovalbumin , 5. Kuyucuk: 100 ppm Ovalbumin , 6. Kuyucuk: 50 ppm Ovalbumin , 7. Kuyucuk: 100 ppm Ovalbumin 24.saat numunesi , 8. Kuyucuk: 100 ppm Ovalbumin 96.saat numunesi , 9. Kuyucuk: 50 ppm Ovalbumin 24.saat numunesi , 10. Kuyucuk: 50 ppm Ovalbumin 96.saat numunesi. **2.jel uygulama sırası:** 1. Kuyucuk: Boş , 2.kuyucuk: 100 µg Ovalbumin içeren nanopartikül 24. Saat salım numunesi , 3. Kuyucuk: 100 µg Ovalbumin içeren nanopartikül 96. Saat salım numunesi , 4.kuyucuk: 50 µg Ovalbumin içeren nanopartikül 24. Saat salım numunesi , 5. Kuyucuk: 50 µg Ovalbumin içeren nanopartikül 96. Saat salım numunesi, 6.,7.,8.,9. Ve 10. Kuyucuklar: Boş

3.1.4.2 RBD ile Üretilen Nanopartikül SDS-PAGE Analizi Sonuçları

Bölüm 2.3.6’da anlatıldığı şekilde SDS-PAGE çalışmaları yürütülmüştür. Jele sırasıyla marker, 500 ppm RBD, 250 ppm RBD, 50 µg RBD içeren nanopartikül 24. saat salım numunesi, 50 µg RBD içeren nanopartikül 96. saat salım numunesi, boş nanopartikül 96. saat numunesi, boş nanopartikül, 50 µg RBD içeren nanopartikül 24. saat salım numunesi ve 50 µg RBD içeren nanopartikül 96. saat salım numunesi uygulanmıştır. Analiz sonucunda RBD antijeninin molekül ağırlığına ait 25 kDa’lık bantlar tüm numunelerde görülmüştür. Nanopartiküllere etkin bir şekilde RBD yüklendiği görülmüştür. Boş nanopartiküllerin jelde herhangi bir kirlilik oluşturmadığı ve elde edilen sonuçlara göre görülen bantların sadece antijene ait olduğu görülmüştür.



Şekil 3.11. RBD ile üretilen nanopartikül ve RBD antijenine ait SDS-PAGE jeli.

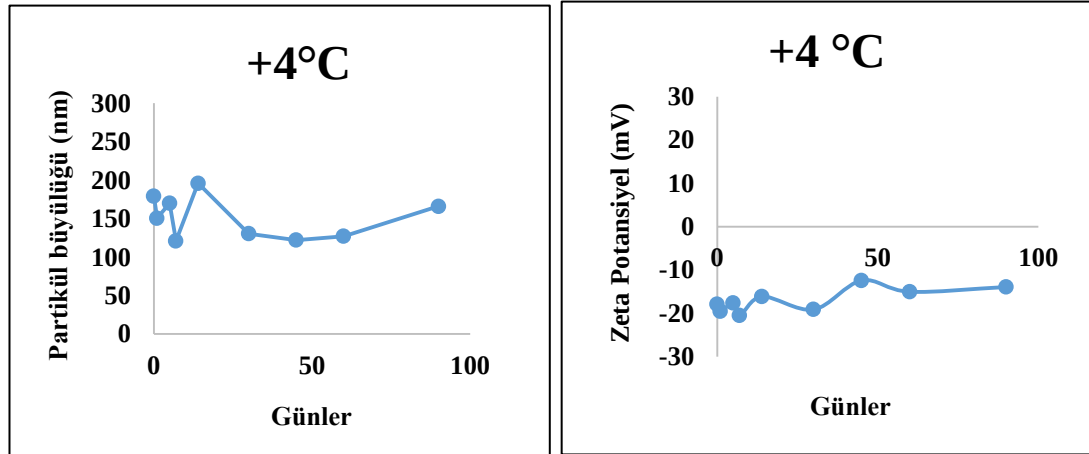
Jel uygulama sırası: 1.kuyucuk: Marker , 2.kuyucuk: Boş , 3.kuyucuk: 500 ppm RBD , 4. Kuyucuk: 250 ppm RBD , 5. Kuyucuk: 50 µg RBD içeren nanopartikül 24. Saat salım numunesi , 6. Kuyucuk: 50 µg RBD içeren nanopartikül 96. Saat salım numunesi, 7. Kuyucuk: Boş nanopartikül 96.saat numunesi , 8. Kuyucuk: Boş nanopartikül , 9. Kuyucuk: 50 µg RBD içeren nanopartikül 24. saat salım numunesi , 10. Kuyucuk: 50 µg RBD içeren nanopartikül 96. saat salım numunesi.

3.1.5. Nanopartikül Formülasyonlarının Stabilité Sonuçları

Stabilite çalışmaları Bölüm 2.3.7’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş ve Çizelge 3.6, 3.7 ve 3.8’de verilen sonuçlar elde edilmiştir. Stabilite değerlendirmesi partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel sonuçlarına göre yapılmıştır.

Çizelge 3.6. +4 °C’de yapılan stabilite çalışması sonuçlarına ait bulgular.

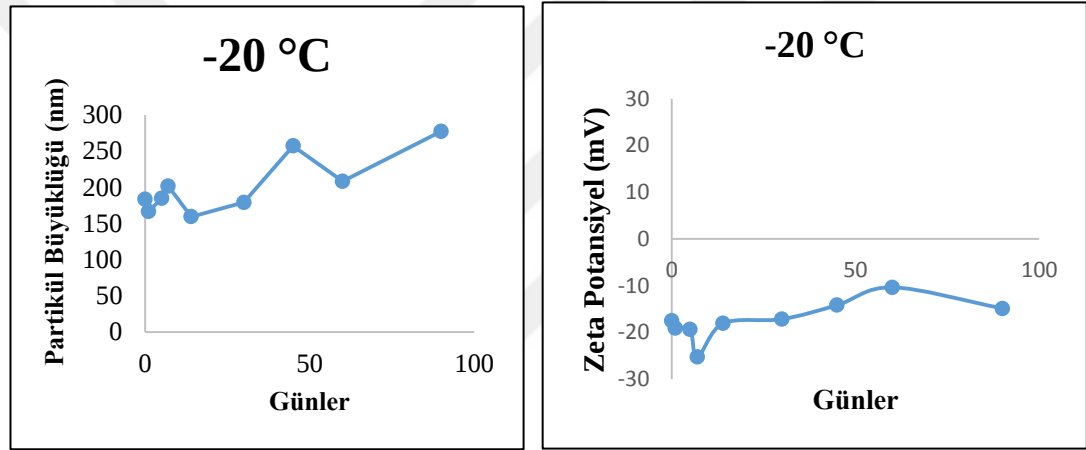
Günler	Partikül büyüklüğü (nm)±SS	Zeta potansiyel (mV)±SS	PDI±SS
0	179±2,621	-17,9±0,950	0,271±0,008
1	150,5±1,069	-19,5±0,306	0,252±0,006
5	169,9±0,5508	-17,6±0,874	0,264±0,003
7	121,0±3,122	-20,5±1,00	0,114±0,004
15	196,0±2,371	-16,1±0,100	0,264±0,018
30	130,3±0,5774	-19,1±5,50	0,138±0,009
45	122,1±1,286	-12,4±0,702	0,121±0,031
60	127,1±1,53	-15±0,2	0,137±0,004
90	166±0,8718	-13,9±1,75	0,271±0,010



Şekil 3.12. +4°C’de gerçekleştirilen stabilite çalışmalarına ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel bulgularının grafiksel gösterimi.

Çizelge 3.7. -20 °C’de yapılan stabilite çalışması sonuçlarına ait bulgular.

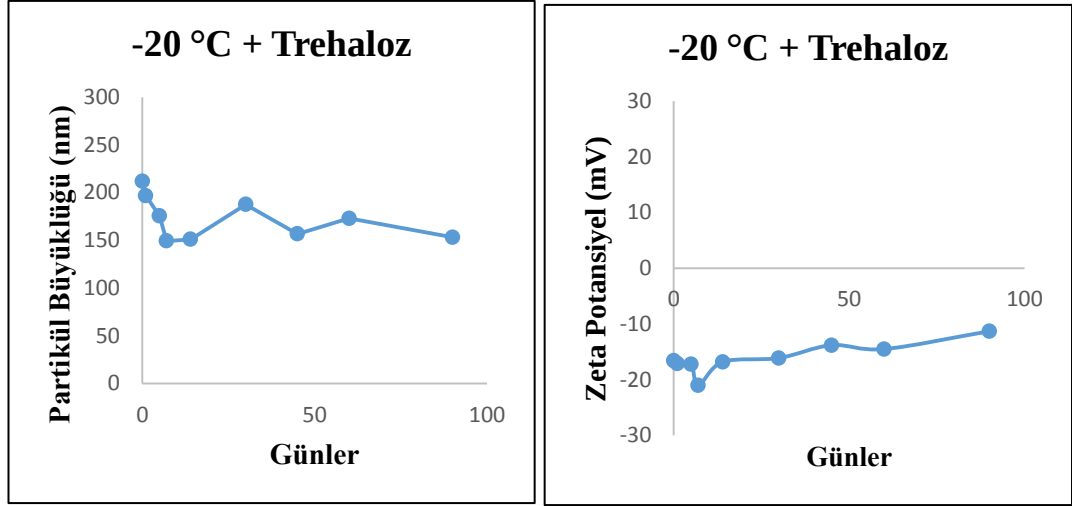
Günler	Partikül büyüklüğü (nm)±SS	Zeta potansiyel (mV)±SS	PDI±SS
0	183,2±0,8083	-17,5±0,681	0,192±0,013
1	166,4±1,872	-19,1±0,874	0,135±0,002
5	184,7±7,622	-19,4±2,31	0,241±0,010
7	201,6±3,500	-25,3±1,44	0,298±0,021
15	159,3±1,308	-18,1±0,755	0,103±0,007
30	179,1±1,677	-17,2±1,50	0,227±0,009
45	257,2±5,380	-14,2±1,04	0,233±0,032
60	208,3±10,94	-10,4±2,30	0,274±0,032
90	277,4±3,927	-14,9±0,721	0,172±0,013



Şekil 3.13. -20 °C’de gerçekleştirilen stabilite çalışmalarına ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel bulgularının grafiksel gösterimi.

Çizelge 3.8. -20 °C’de trehaloz eklenerek yapılan stabilite çalışması sonuçlarına ait bulgular.

Günler	Partikül büyüklüğü (nm)±SS	Zeta potansiyel (mV)±SS	PDI±SS
0	211,9±2,291	-16,6±0,153	0,308±0,032
1	196,9±0,4163	-17,1±0,173	0,279±0,015
5	175,6±1,387	-17,2±0,513	0,279±0,022
7	149,4±7,016	-21±0,100	0,181±0,015
15	151,0±2,926	-16,8±0,346	0,154±0,029
30	187,6±9,532	-16,1±2,46	0,321±0,031
45	156,7±0,9713	-13,8±0,529	0,199±0,011
60	173±0,8083	-14,5±0,757	0,252±0,009
90	153,3±2,312	-11,3±1,06	0,172±0,011



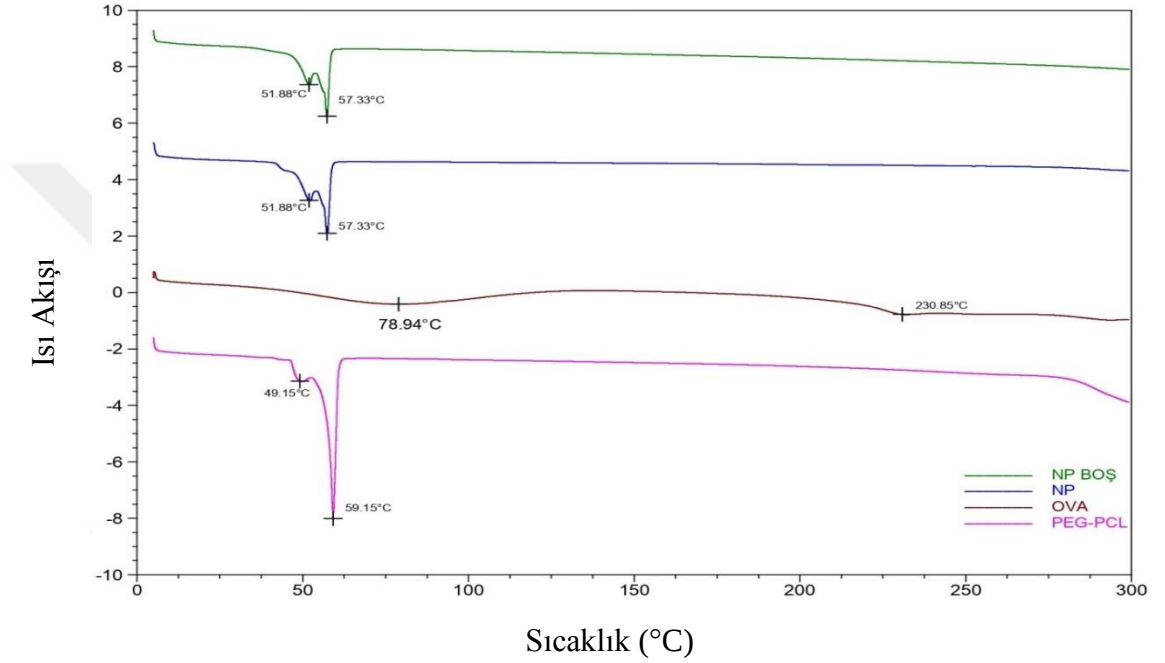
Şekil 3.14. -20 °C’de trehaloz eklenerek gerçekleştirilen stabilite çalışmalarına ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel bulgularının grafiksel gösterimi.

Elde edilen sonuçlara göre tüm ortam koşulları altında nanopartikül formülasyonlarının 90 gün boyunca yapılan stabilite çalışmalarında partikül büyüklüğü 150-300 nm aralığında bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlara göre nanopartikül formülasyonlarının 90 gün boyunca yapılan stabilite çalışmalarında zeta potansiyel değerleri (-10) - (-25) mV aralığında bulunmuştur.

3.1.6. Hazırlanan Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi Sonuçları

Bölüm 2.5.8’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizi sonuçları Şekil 3.15’de gösterilmiştir.

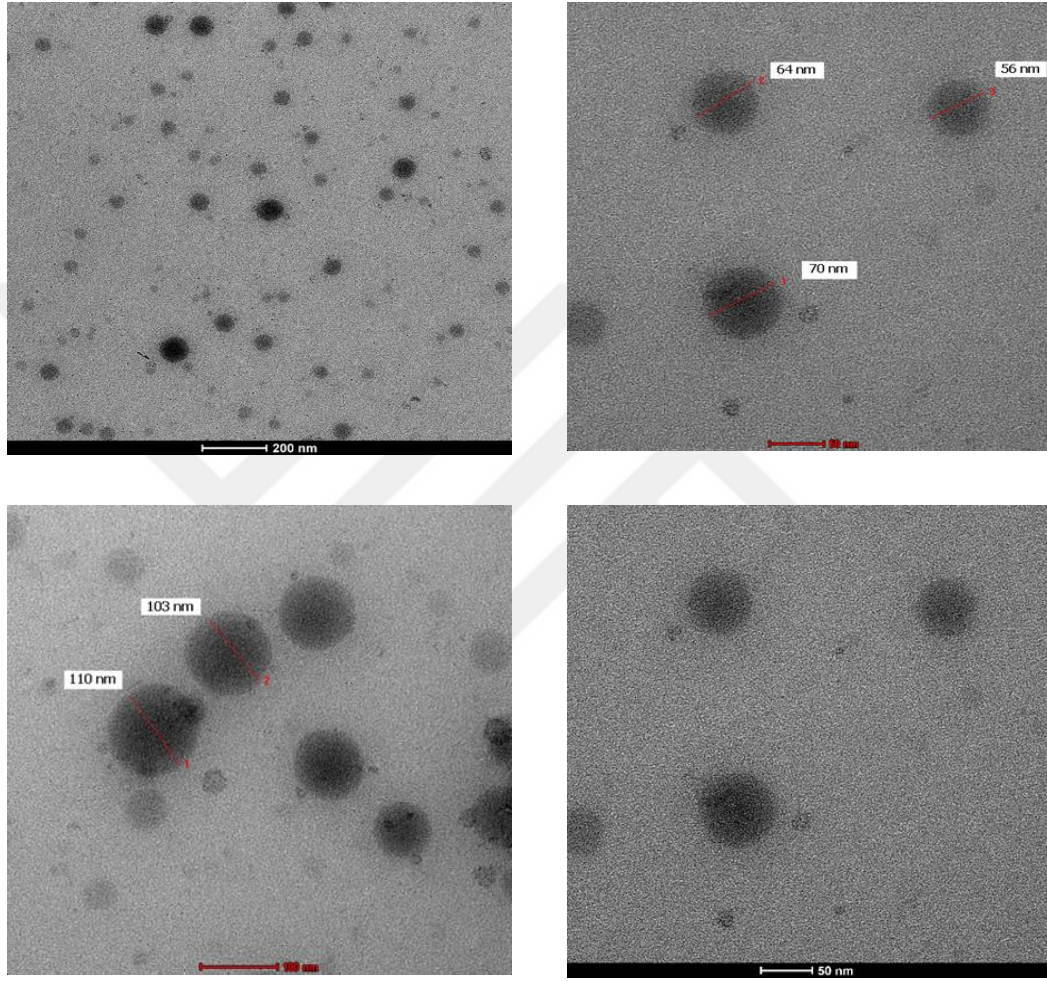


Şekil 3.15. Nanopartikül formülasyonu ve formülasyonda bulunan maddelere ait DSC termogramları. Yukarıdan aşağıya; Boş nanopartikül, nanopartikül, Ovalbumin ve PEG-PCL’ye ait DSC termogramları.

Şekil 3.15’te verilen sonuçlara göre üretilen nanopartikül formülasyonunda sadece nanopartiküle ait sıcaklık değerlerine sahip pikler görülmüştür. Formülasyonda yer alan model protein, polimer ve dış faza ait pikler görülmemiştir. Bu sonuç formülasyondaki maddelerin bir araya gelerek nanopartikül yapısını oluşturduğu ve yapıya enkapsüle olduklarını göstermektedir.

3.1.7. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi Sonuçları

Bölüm 2.3.9’da anlatıldığı şekilde Geçirimli Elektron Mikroskobu(TEM) Analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara ait görüntüler aşağıda verilmiştir.

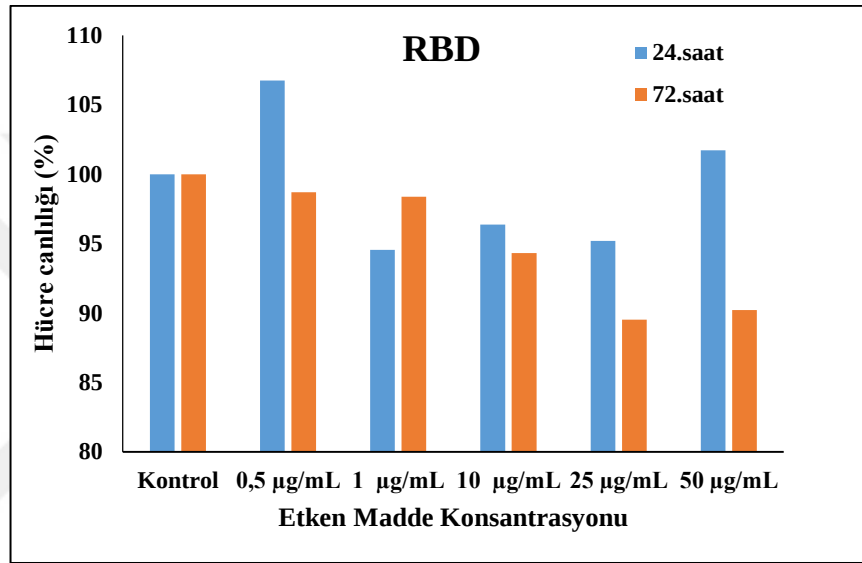


Şekil 3.16. Hazırlanan nanopartiküllere ait TEM görüntüleri.

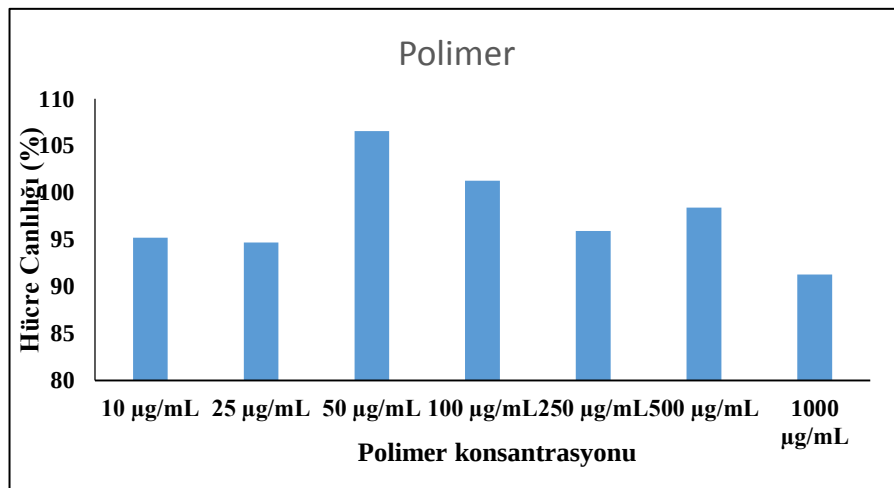
3.1.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.1.8.1. Hücre Canlılığı Çalışmaları Sonuçları

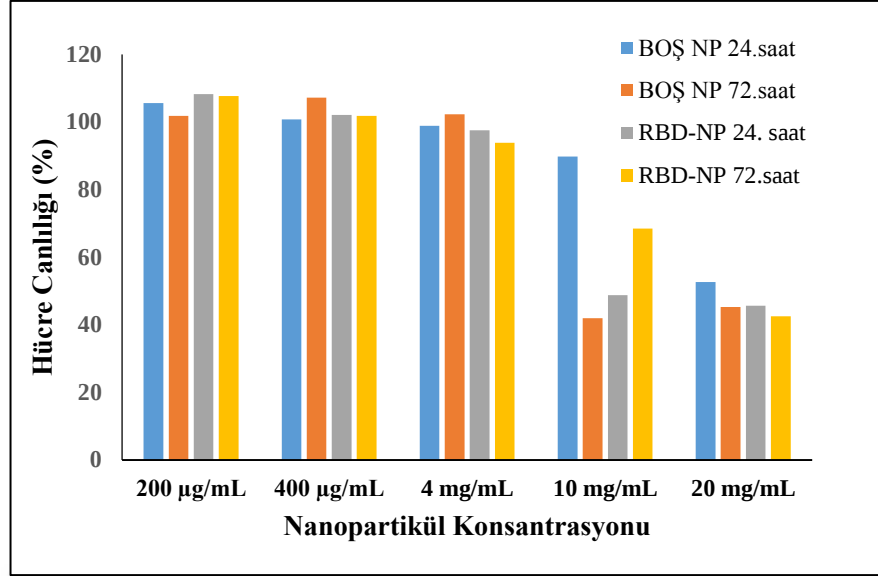
Bölüm 2.3.10.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen çalışma sonucu elde edilen sonuçlar Şekil 3.17, Şekil 3.18 ve Şekil 3.19’da verilmiştir.



Şekil 3.17. RBD hücre canlılığı sonuçları.



Şekil 3.18. Polimer hücre canlılığı sonuçları.



Şekil 3.19. Nanopartikül hücre canlılığı sonuçları.

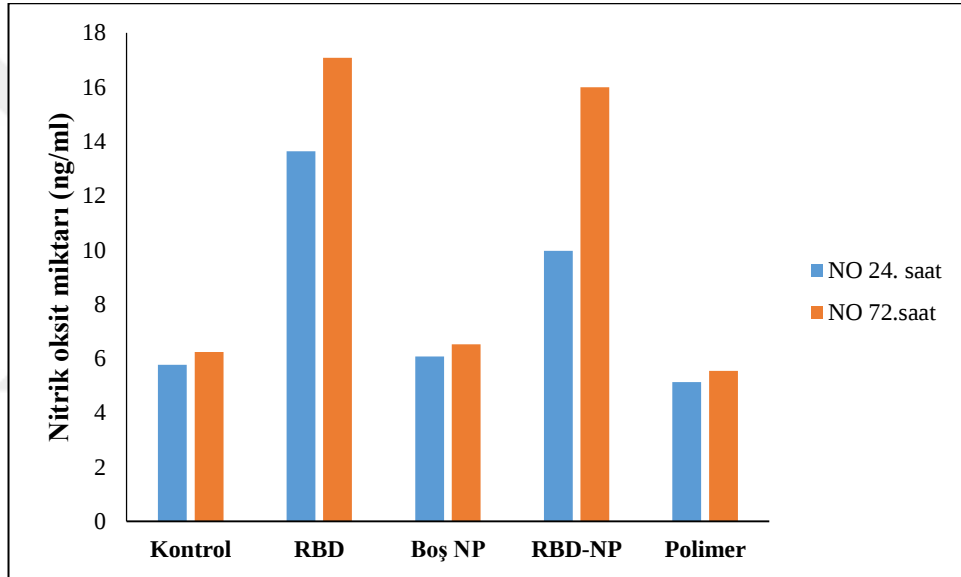
Sentezlenen örneklerin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksisiteyi MTT yöntemi ile incelenmiştir. Örneklerin farklı konsantrasyonları ile muamele edilen hücrelerin 24. saat ve 72. saatlik inkübasyonları sonucu canlılık değerleri ölçülmüştür. Buna göre RBD proteini tek başına uygulandığında incelenen tüm konsantrasyonlarda L929 hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etki göstermemiştir. Her iki inkübasyon süresi içinde de sitotoksositeye rastlanmamıştır. Polimerin 10 ila 1000 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının etkinliği incelendiğinde hiçbir konsantrasyonun incelenen zaman aralıklarında L929 hücreleri üzerinde toksik bir etkiye neden olmadığı görülmektedir.

Boş NP'ler özellikle 24 saat sonrasında 20 mg/ml konsantrasyonunda ve 72 saatlik inkübasyon sonrasında ise hem 10 hem de 20 mg/ml konsantrasyonlarda hücre canlılığında azalma göstermiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrasında 20 mg/ml uygulanan gruplarda hücre canlılığı % 52 seviyelerine düşmüştür. 72 saatlik uygulama sonrasında ise 10 mg/ml ve 20 mg/ml konsantrasyonlarına maruz kalan hücrelerde canlılık oranı % 40 seviyelerinde ölçülmüştür. Benzer bir durum RBD-NP formülasyonlarında da yaşanmıştır. İncelenen yüksek konsantrasyonlarda bu formülasyonlara maruz kalan hücrelerin canlılık oranları % 40 seviyelerindedir. Bu konsantrasyona maruz kalan gruplarda hücre morfolojilerindeki değişim mikroskopik

olarak da gözlenmiştir. Bu nedenle nitrik oksit tayini uygulamalarında RBD-NP için toksik etki göstermeyen en yüksek konsantrasyon olan 4 mg/ml konsantrasyonunun kullanılmasına karar verilmiştir.

3.1.8.2. NO Tayini Sonuçları

Çalışma 2.3.10.2’de belirtildiği şekilde yapılan Nitrik Oksit (NO) tayini sonucunda elde edilen verilen Şekil 3.20’da verilmiştir.



Şekil 3.20. NO tayin sonuçları.

J774 makrofaj hücreleri 24 ve 72 saat boyunca Boş-NP, RBD, RBD-NP ve polimer formülasyonları ile muamele edilmiş ve süpernatanttaki nitrik oksit miktarları Griess reaktif kullanılarak ölçülmüştür. Yapılan incelemelerde Boş NP ve polimer formülasyonlarının kontrol grupları ile kıyaslandığında makrofajlardan salgılanan nitrik oksit miktarında herhangi bir kayda değer artışa neden olmadıkları görülmüştür. Sonuçlar incelendiğinde tek başına RBD proteinine maruz kalan gruplarda nitrik oksit seviyesinin en yüksek düzeyde olduğu görülmektedir. Bu grupta nitrik oksit seviyesi 24 saatin sonunda yaklaşık 2,5 kat ve 72 saatin sonunda ise yaklaşık 3 kat artış göstermiştir. Diğer taraftan RBD-NP sonuçları incelendiğinde

buradan elde edilen sonuçların serbest haldeki RBD proteinini içeren gruptaki sonuçlar ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. 72 saatlik inkübasyonun ardından makrofajların üretmiş oldukları nitrik oksit seviyelerinin kontrol grubuna göre 2,5 katlık bir artış gösterdiği belirlenmiştir. 72 saatlik inkübasyon sonrası RBD-NP'lere maruz kalan gruplardaki nitrik oksit seviyelerinin RBD proteinine maruz kalan gruplara oldukça yakın oldukları tespit edilmiştir.

3.2. Mikroığnelerde Yapılan Kontroller

3.2.1. Mikroığne Önformölasyon Çalışmaları

3.2.1.1. Polisiloksan Kit ile Üretilen Kalıp ile Üretilen Mikroığnelere Ait Önformölasyon Sonuçları

Bölüm 2.4.1’de anlatıldığı şekilde üretilen mikroığnelere ait önformölasyon sonuçları Çizelge 3.9’da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Polisiloksan kit ile üretilen mikroığnelere ait önformülasyon sonuçları.

Kalp No	Polisiloksan (g)	Aktivatör (g)	İğne ucu polimer	İğne ucu (polimer oranı)	Destek tabaka polimer oranı	Santrifüj hızı	Santrifüj süresi	Kurutma koşulu	Kurutma Süresi	Kalıptan çıkma	Sertlik
1	1,6 g	0,16 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA	%30 a/h	%40 a/h	3500 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	24 saat+ 24 saat	+	++
2	1,6 g	0,16 g	Sodyum hyaluronat	% 20 a/h	% 20 a/h	4000 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	24 saat+ 24 saat	+	+
3	1,49 g	0,13 g	Yüksek viskoziteli CMC sodyum tuzu	%3 a/h	%3 a/h	4000 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	24 saat+ 24 saat	+	-
4	1,89 g	0,19 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA	%30 a/h	%40 a/h	3500 rpm	30 dk	+4°C	24 saat+ 24 saat	+	+
5	2,06 g	0,21 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA	%30 a/h	%40 a/h	3500 rpm	30 dk	-20°C	24 saat+ 24 saat	+	+
6	2,59 g	0,25 g	Eudragit RS100 / PVP K90	Eudragit RS100 + %40 a/h PVP K90 (1:4 oranda)	-	3000 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	48 saat	-	-
7	2,63 g	0,27 g	Karboksimetil selüloz	%3 a/h	%3 a/h	4000 rpm	30 dk	40°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	2 saat	-	-
8	3,71 g	0,38 g	Sodyum aljinat (yüksek viskoziteli)+ Maltoz + %15 CaCl ₂ çözeltisi	(Sodyum aljinat+ Maltoz =0,97 g) (CaCl ₂ çözeltisi= 24 µl)	(Sodyum aljinat+ Maltoz =0,97 g) (CaCl ₂ çözeltisi= 24 µl)	4000 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	24 saat+ 24 saat	-	-
9	1,61 g	0,17 g	Sodyum aljinat (yüksek viskoziteli)+ Maltoz + %15 CaCl ₂ çözeltisi	(Sodyum aljinat+ Maltoz =0,97 g) (CaCl ₂ çözeltisi= 24 µl)	-	15000 rpm	12 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	24 saat	-	-
10	1,75 g	0,17 g	Sodyum aljinat (yüksek viskoziteli)+ Maltoz	(Sodyum aljinat= 412,1 mg) (Maltoz= 750,51 mg) (5 ml'de)	-	15000 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	16 saat	-	-
11	1,61 g	0,17 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA + Maltoz	%30 a/h PVA + %15 a/h Maltoz	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	25 saat+ 24 saat	+	+
12	1,54 g	0,16 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA	%40 a/h PVA	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	25 saat+ 24 saat	+	+
13	1,99 g	0,19 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA+ Maltoz	%30 a/h PVA+ %15 a/h Maltoz	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	24 saat+ 24 saat	+	++

Çizelge 3.9. Devam Polisiloksan kit ile üretilen mikroğnelere ait önformülasyon sonuçları.

Kalıp No	Polisiloksan (g)	Aktivatör (g)	İğne ucu polimer	İğne ucu (polimer oranı)	Destek tabaka polimer oran	Santrifüj hızı	Santrifüj süresi	Kurutma koşulu	Kurutma Süresi	Kalıptan çıkma	Sertlik
14	2,43 g	0,24 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA	%40 a/h PVA	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, 3 bar basınçla vakumlu etüvde	24 saat+ 24 saat	+	++
15	2,12 g	0,22 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA + Maltoz	%30 a/h PVA+%15 a/h Maltoz	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+ 48 saat	+	++
16	2,96 g	0,3 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA	%40 a/h PVA	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+ 48 saat	+	++
17	2,51 g	0,25 g	PVA (4-88)	%50 a/h PVA	-	4000 rpm	20 dk	60 °C,3 bar basınçta vakumlu etüvde	72 saat	+	++
18	2,58 g	0,25 g	Sodyum aljinat (yüksek viskoziteli)+ 1M CaCl ₂	%2 a/h sodyum aljinat + 100 µl 1 M CaCl ₂	-	2500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat	+	+
19	2,5 g	0,25 g	PVP K90	%40 a/h PVP K90	%40 a/h PVP K-90	3500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+ 48 saat	+	++
20	2,5 g	0,25 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA + Maltoz	%30 a/h PVA+%15 a/h Maltoz	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+ 48 saat	+	++
21	2,5 g	0,25 g	%87-89 hidroksillenmiş PVA	%40 a/h PVA	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+ 48 saat	+	++
22	2,5 g	0,25 g	PVA (4-88)	%50 a/h PVA	-	4000 rpm	20 dk	60 °C,vakum olmadan vakumlu etüvde	48 saat	-	-
23	2,5 g	0,25 g	PVA (%87-89 hidroksillenmiş)+ Glutaraldehit (%50 a/h suda)+ Glukoz monohidrat + Mısır nişastası	PVA (%87-89 hidroksillenmiş) (2,24 g)+ Glutaraldehit (%50 a/h suda) (0,13 g) + Glukoz monohidrat (0,45 g)+ Mısır nişastası (0,45 g)	%40 a/h PVP K90	3500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+ 48 saat	+	++
24	2,5 g	0,25 g	PVA + D-Sorbitol	750,2 mg PVA + 112,13 mg D-Sorbitol/5 ml suda	750,2 mg PVA+ 112,13 mg D-Sorbitol/5 ml su	4500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+ 48 saat	+	-

Çizelge 3.9. Devam. Polisiloksan kit ile üretilen mikroığnelere ait önformülasyon sonuçları.

Kalıp No	Polisiloksan (g)	Aktivatör (g)	İğne ucu polimer	İğne ucu (polimer oranı)	Destek tabaka polimer oranı	Santrifüj hızı	Santrifüj süresi	Kurutma koşulu	Kurutma Süresi	Kalıptan çıkma	Sertlik
25	2,5 g	0,25 g	PVA (%87-89 hidroksillenmiş)+ PVP K-90+ PEG 400	200 mg PVA (%87-89 hidroksillenmiş)+ 300 mg PVP K-90+ 158,02 mg PEG400/5 ml suda	200 mg PVA (%87-89 hidroksillenmiş)+ 300 mg PVP K-90+ 158,02 mg PEG400/5 ml suda	4500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+ 48 saat	+	+
26	2,5 g	0,25 g	%40 PVA (%87-89 hidroksillenmiş) + Trietil sitrat	%40 PVA (%87-89 hidroksillenmiş) + %40'lık PVA'nın %50'si ağırlıkta Trietil sitrat	%40 a/h PVP K90	4500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+ 24 saat	+	-
27	2,5 g	0,25 g	%40 PVA (%87-89 hidroksillenmiş) + Trietil sitrat	%40 PVA (%87-89 hidroksillenmiş) + %40'lık PVA'nın %1'i ağırlıkta Trietil sitrat	%40 a/h PVP K90	4500 rpm	30 dk	25°C, desikatörde	48 saat+ 24 saat	+	++

Mikroiğne formülasyonlarının sertliği ampirik olarak değerlendirilmiştir.

+++ = sert, ++= yumuşak , += çok yumuşak , - = iğne oluşmamış

Kalıptan çıkma ve sertlik parametreleri değerlendirildiğinde en iyi sonuç veren formülasyonlar PVA, sodyum hyaluronat ve PVP polimerleri kullanılarak elde edilmiştir. PDMS kalıp ile mikroiğne formülasyonu üretimi için bu polimerler kullanılmıştır.

3.2.1.2. PDMS Kalıp İle Hazırlanan Mikroigne Formülasyonlarına Ait Sonuçlar

Bölüm 2.4.2’de anlatıldığı gibi PDMS kalıbı kullanılarak mikroigne formülasyonları geliştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.10’da verilmiştir.

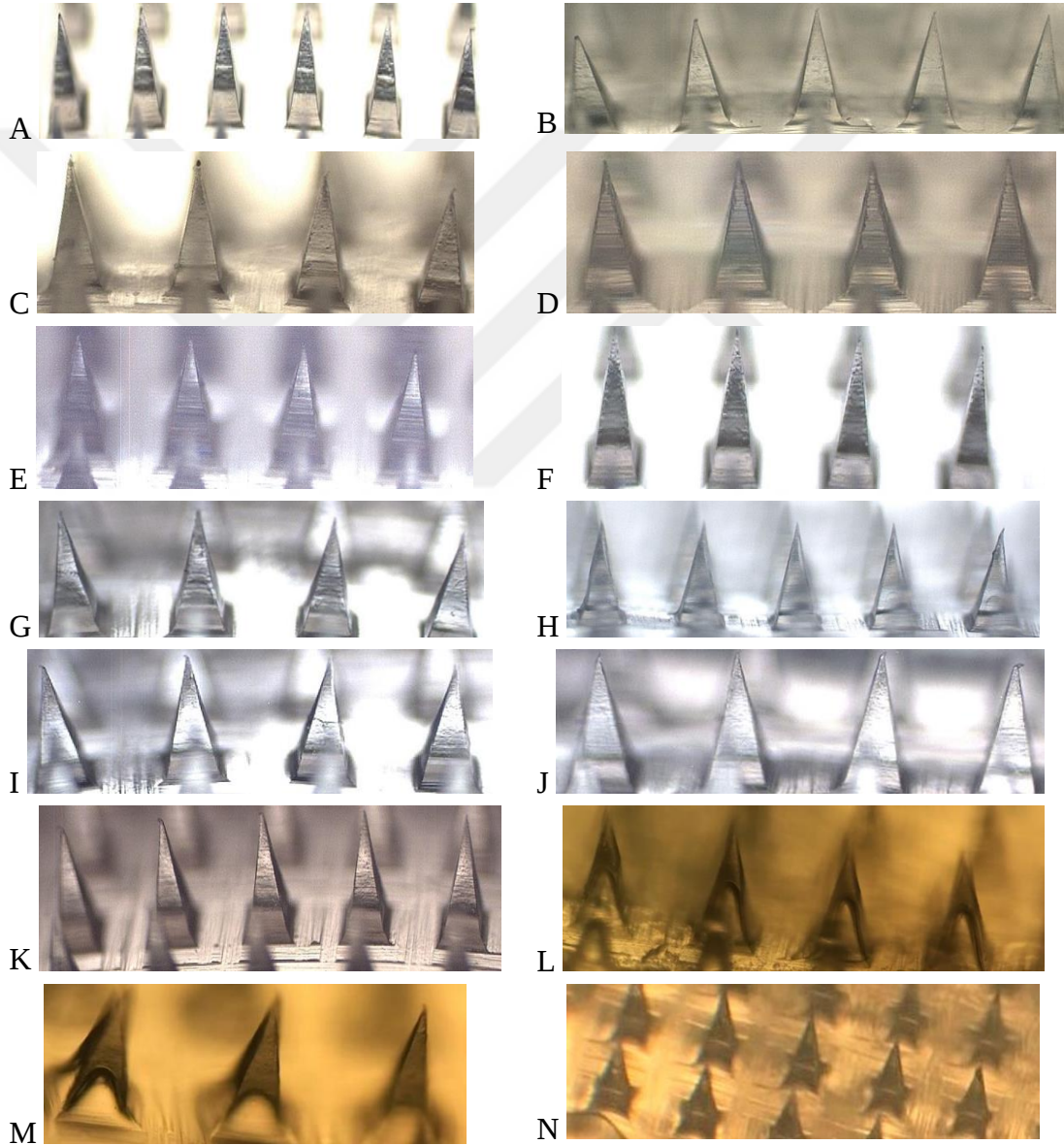


Çizelge 3.10. PDMS kalıp ile hazırlanan mikroiğne formülasyonlarına ait sonuçlar .

Formül No	İğne ucu polimer oranı	Ovalbumin miktarı	Destek tabaka polimer oranı	Santrifüj hızı	Santrifüj süresi	Kurutma süresi	Kurutma koşulu	Kalıptan çıkma	Sertlik
1	%15 a/h PVA	50 µg	%40 a/h PVP	3500 rpm	20 dk	48 saat+48 saat	+4°C'de desikatörde	+	+++
2	%17,5 a/h PVA	50 µg	%40 a/h PVP	3500 rpm	20 dk	48 saat+48 saat	+4°C'de desikatörde	+	+++
3	%20 a/h PVA	50 µg	%40 a/h PVP	3500 rpm	20 dk	48 saat+48 saat	+4°C'de desikatörde	+	+++
4	%30 a/h PVA	50 µg	%40 a/h PVP	3500 rpm	20 dk	24 saat+24 saat	+4°C'de desikatörde	+	+++
5	%35 a/h PVA	50 µg	%40 a/h PVP	3500 rpm	20 dk	24 saat+24 saat	+4°C'de desikatörde	+	+++
6	%40 a/h PVA	50 µg	%40 a/h PVP	3500 rpm	20 dk	24 saat+24 saat	+4°C'de desikatörde	+	+++
7	%1,5 a/h sodyum hyaluronat	50 µg	%1,5 a/h sodyum hyaluronat	4500 rpm	20 dk	24 saat+24 saat	+4°C'de desikatörde	+	++
8	%3 a/h sodyum hyaluronat	50 µg	%3 a/h sodyum hyaluronat	4500 rpm	20 dk	24 saat+24 saat	+4°C'de desikatörde	+	++
9	%5 a/h sodyum hyaluronat	50 µg	%5 a/h sodyum hyaluronat	4500 rpm	20 dk	24 saat+24 saat	+4°C'de desikatörde	+	++

3.2.2. PDMS Mikroığne Kalıbı ile Üretilen Mikroığnelerin Optik Mikroskop Analizi Sonuçları

Bölüm 2.4.5’de anlatıldığı şekilde mikroığneler optik mikroskop ile görüntülenmiştir (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. Mikroığne formülasyonlarına ait optik mikroskop görüntüleri.

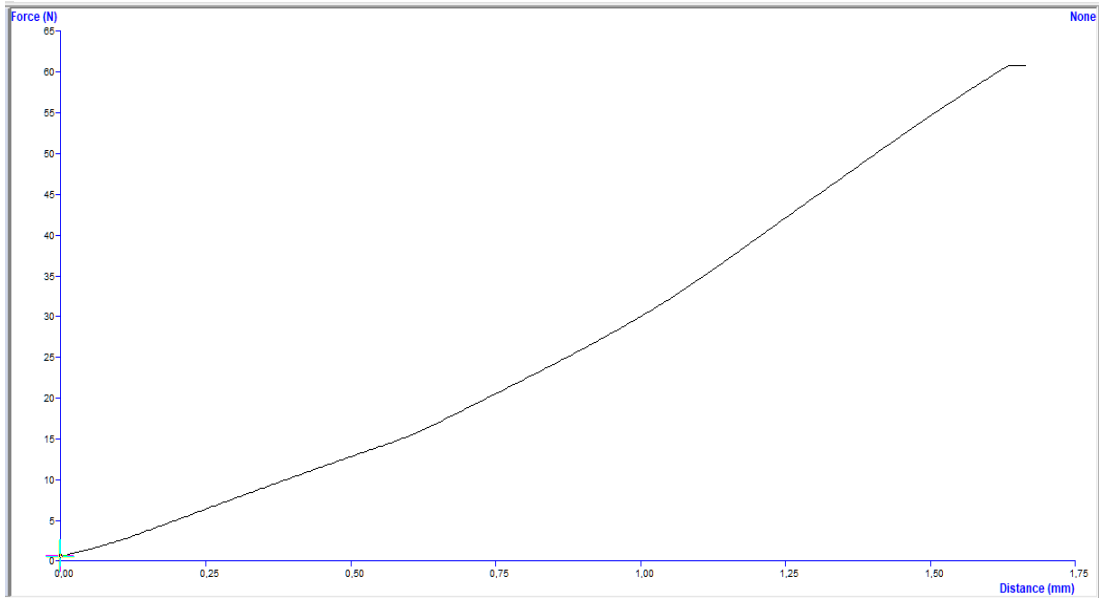
Sırasıyla A ve B: 1. Mikroığne , C ve D: 2. Mikroığne , E ve F: 3. Mikroığne, G: 4. Mikroığne , H ve I: 5. Mikroığne , J ve K: 6. Mikroığne, L: 7. Mikroığne , M: 8. Mikroığne , N: 9. Mikroığne.

Elde edilen optik mikroskop verilerinden hareketle tüm mikroiğnelerin düzgün morfolojiye sahip oldukları görülmüştür.

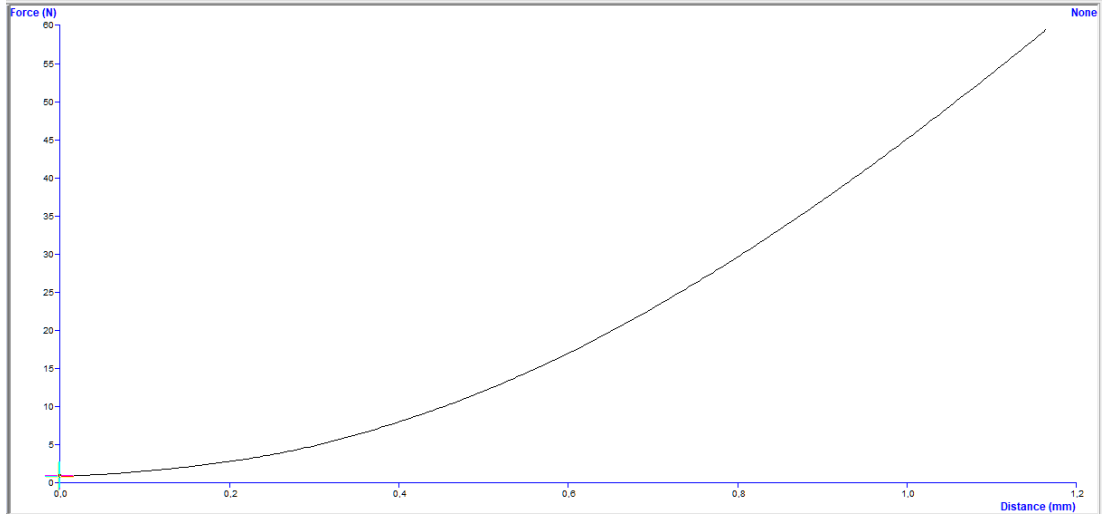
3.2.3. Mikroiğnelerin Tekstür Analizi

Elde edilen optik mikroskop verilerinden hareketle tüm mikroiğnelerin düzgün morfolojiye sahip oldukları görülmüştür. Aralarından seçim yapıp nihai formülasyonu belirlemek için tekstür analizi yapılmıştır. Bölüm 2.6.5'te anlatıldığı şekilde mikroiğneler için tekstür analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.22, Şekil 3.23, Şekil 3.24, Şekil 3.25, Şekil 3.26 ve Şekil 3.27'de gösterilmektedir. İlk analiz 5 kg'lık yük hücresine sahip tekstür analizi cihazıyla yapılmıştır. Ancak grafiklerde de görüldüğü üzere mikroiğnelere ait bir kırılma piki elde edilememiştir. Bu nedenle 30 kg'lık yük hücresine ait TA.XT Plus cihazı ile aynı şartlarda analiz tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.28'de gösterilmiştir.

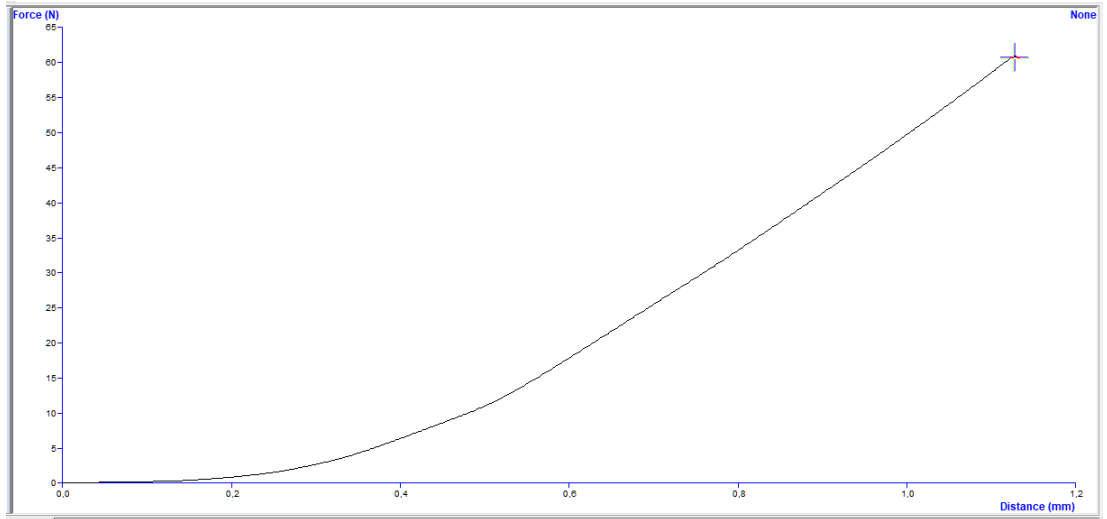
3.2.3.1. 5 Kilogramlık Yük Hücresine Sahip Tekstür Analizi Cihazı İle Elde Edilen Sonuçlar



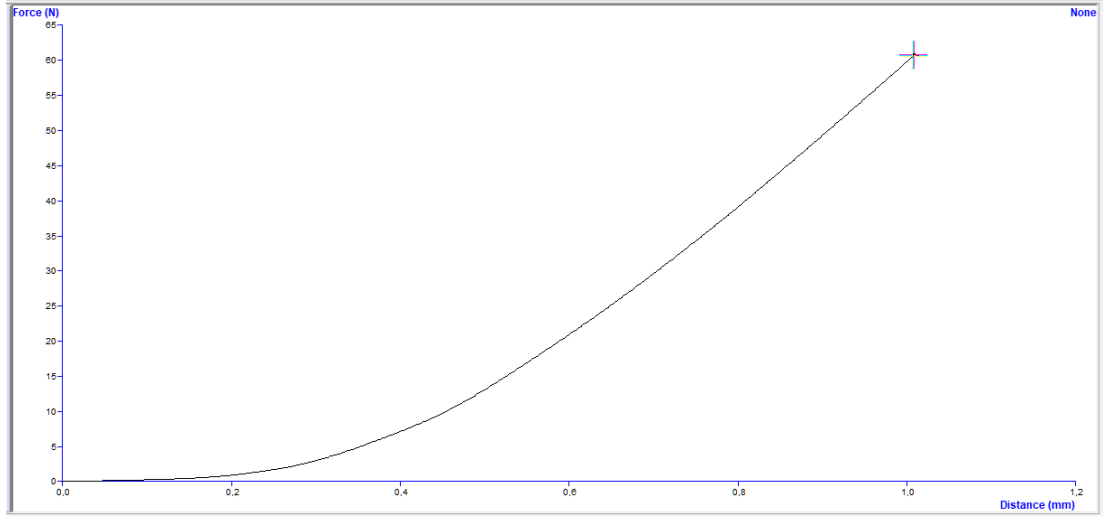
Şekil 3.22. 1. ve 2. mikroiğne formülasyonuna ait kuvvet-yer değiştirme grafiği.



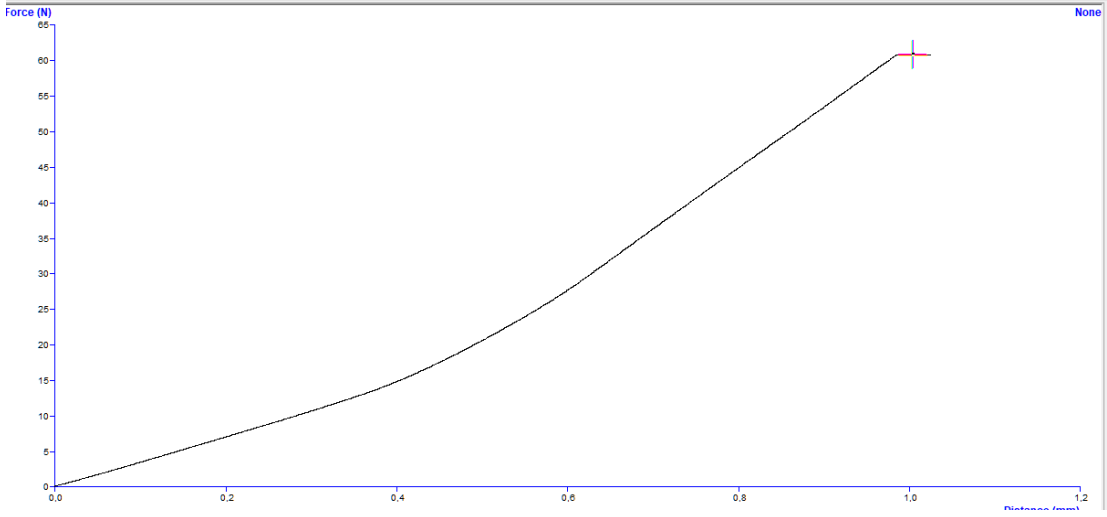
Şekil 3.23. 3. ve 4. mikroigne formülasyonuna ait kuvvet-yer değiştirme grafiği.



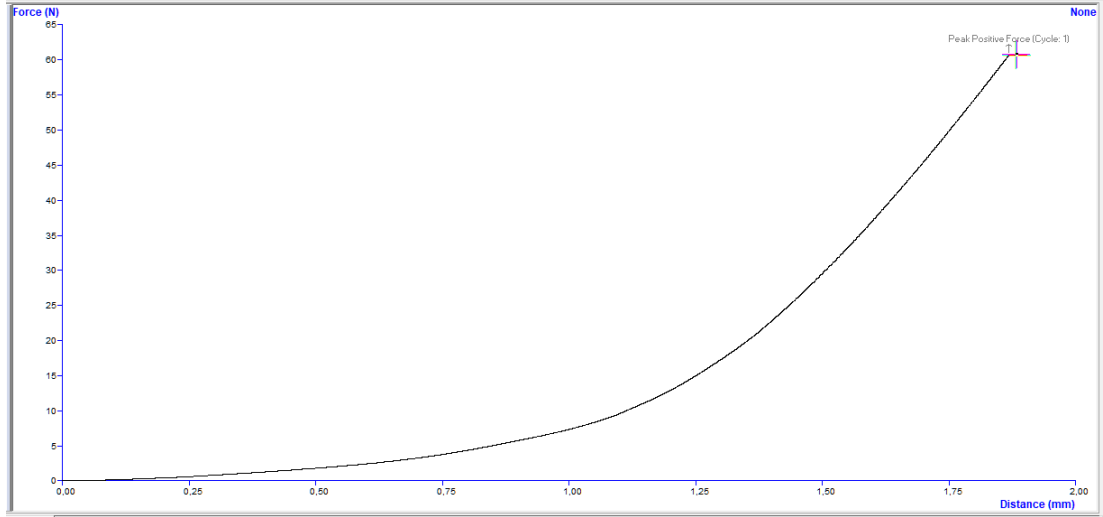
Şekil 3.24. 5. ve 6. mikroigne formülasyonuna ait kuvvet-yer değiştirme grafiği.



Şekil 3.25. 7. Mikroigne formülasyonuna ait kuvvet-yer değiştirme grafiği.

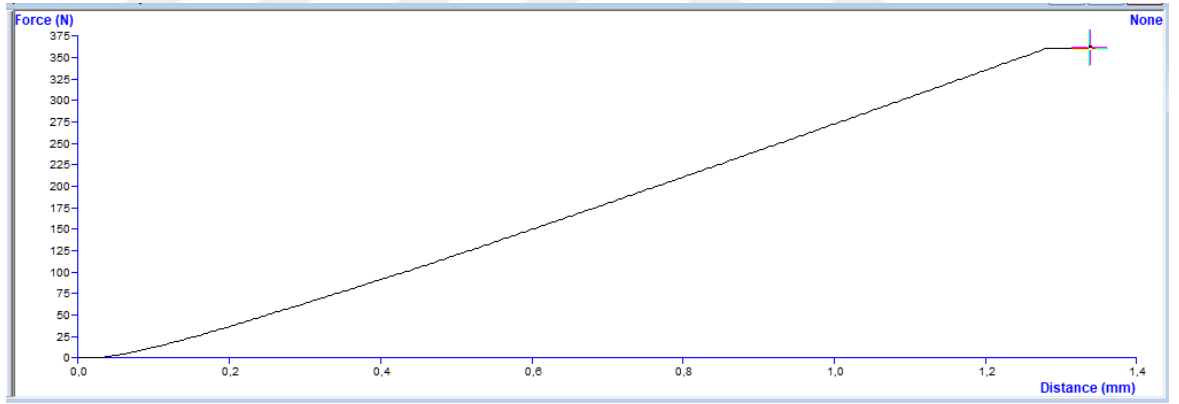


Şekil 3.26. 8. Mikroigne formülasyonuna ait kuvvet-yer değiştirme grafiği.



Şekil 3.27. 9. Mikroigne formülasyonuna ait kuvvet-yer değiştirme grafiği.

3.2.3.2. 30 Kilogramlık Yük Hücreesine Sahip Tekstür Analizi Cihazı İle Elde Edilen Sonuçlar



Şekil 3.28. 1,2,34,5,6,7,8 ve 9. Mikroigne formülasyonlarına ait kuvvet-yer değiştirme grafiği.

Tüm mikroigne formülasyonlarında aynı sonuç elde edildiği için tek bir grafik koyulmuştur.

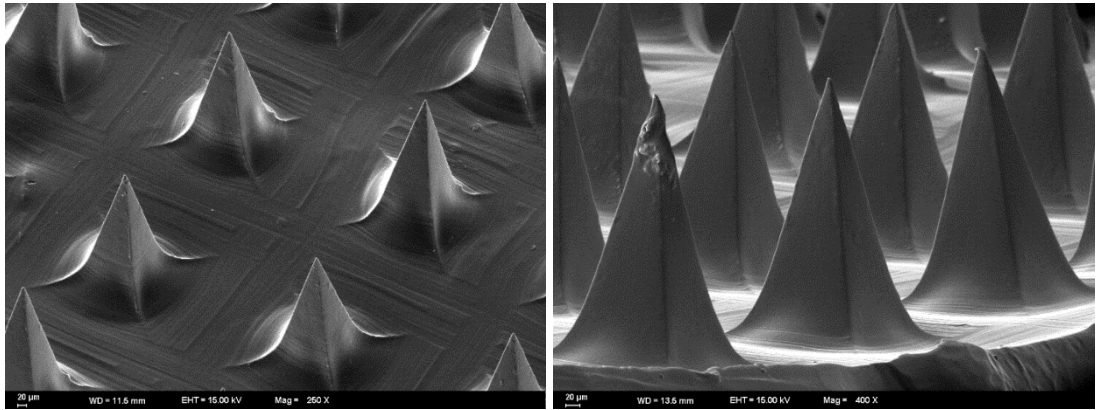
Analizler öncelikle 5 kg'lık yük hücresi bulunan tekstür analiz cihazıyla yapılmıştır. Tüm mikroignelerde cihaz aşırı yükleme uyarısı vermiş ve mikroignelerin kırıldığına dair bir pik elde edilememiştir. Mikroignelerin uygulanan

65 N kuvvete dayanıklı olduğu görölmüştür. Daha sonra 30 kg'lık yük hücresine sahip tekstür analiz cihazı ile analiz tekrar yapılmıştır. Ancak yine mikroiğnelere ait bir kırılma piki görölmemiştir. Mikroiğnelerin 375 N kuvvete de dayanıklı olduğu görölmüştür. Tekstür cihazı ile kuvvet uygulanmasından sonra mikroiğneler optik mikroskopta incelenmiş ve iğnelerin kırılmadığı ancak eğildiğı görölmüştür. Bu nedenle uygulanan kuvvet sonrası mikroiğne boyundaki azalmaya göre nihai mikroiğne formülasyonu seçilmiştir.

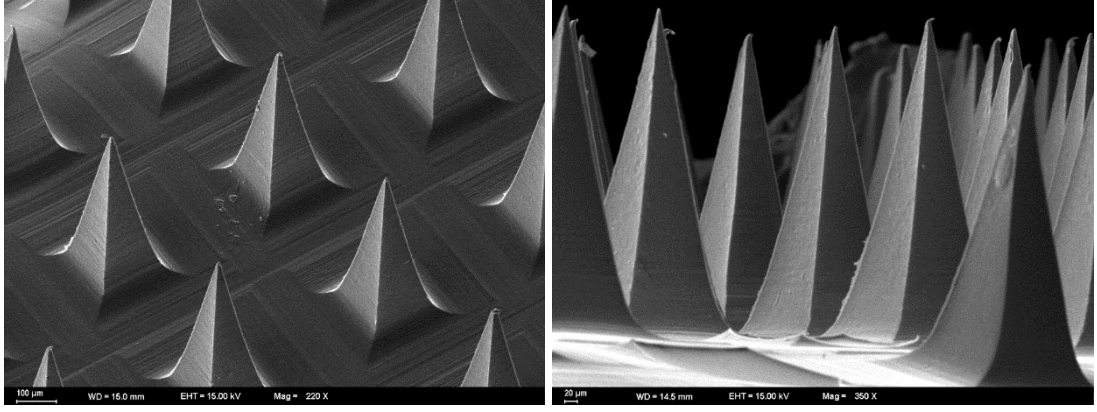
3.2.4. Mikroiğne Formülasyonlarının Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Mikroiğne Formülasyonlarının Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi Bölüm 2.4.7'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.

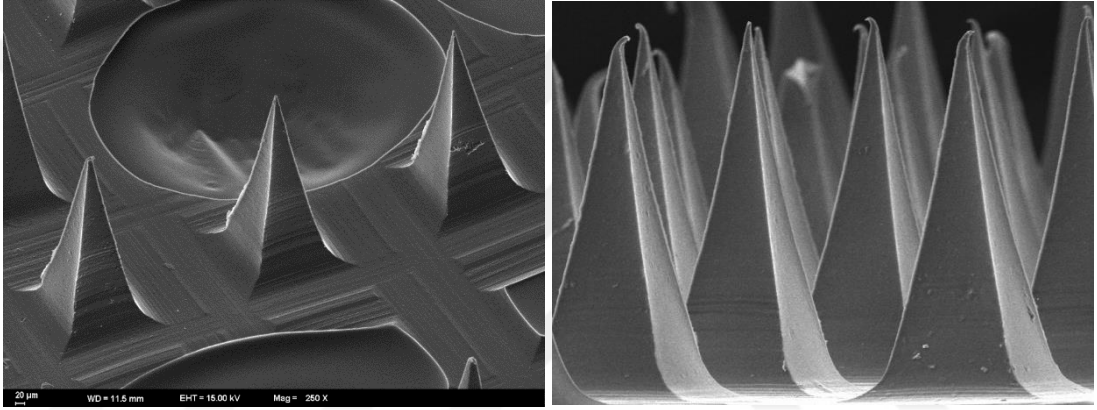
3.2.4.1. Tekstür Cihazıyla Kuvvet Uygulanmadan Önceki Mikroiğne SEM Görüntüleri



Şekil 3.29. 7. mikroiğne formülasyonuna ait SEM görüntüleri.

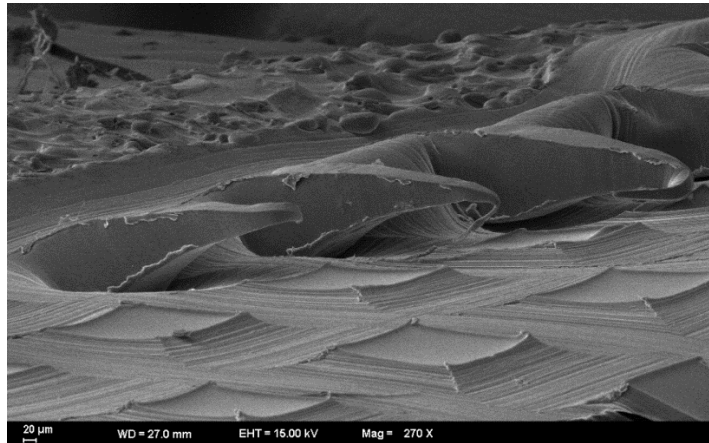


Şekil 3.30. 8. Mikroigne formülasyonuna ait SEM görüntüleri.

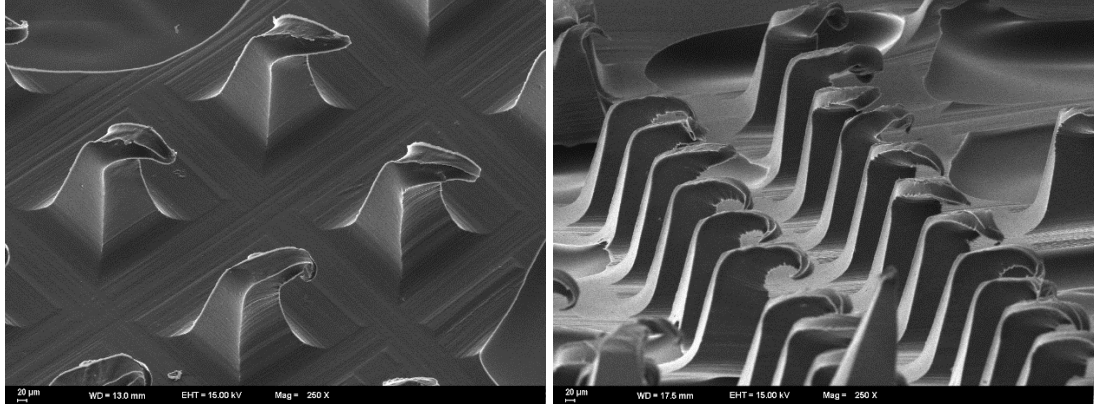


Şekil 3.31. 9. Mikroigne formülasyonuna ait SEM görüntüleri.

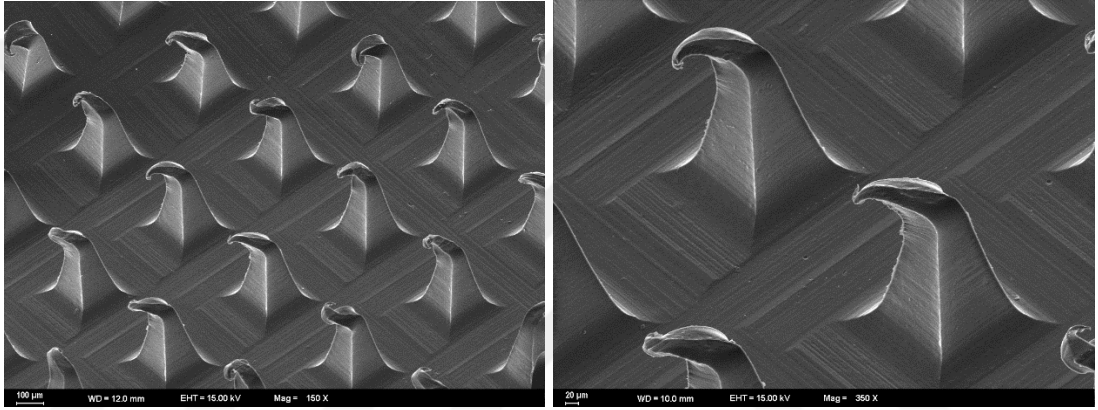
3.2.4.2. Tekstür Cihazıyla Kuvvet Uygulanması Sonucu Mikroignelerde Oluşan Morfolojik Değişikliğe Ait SEM Görüntüleri



Şekil 3.32. 7. Mikroigne formülasyonuna ait SEM görüntüsü.



Şekil 3.33. 8. Mikroğne formülasyonuna ait SEM görüntüleri.

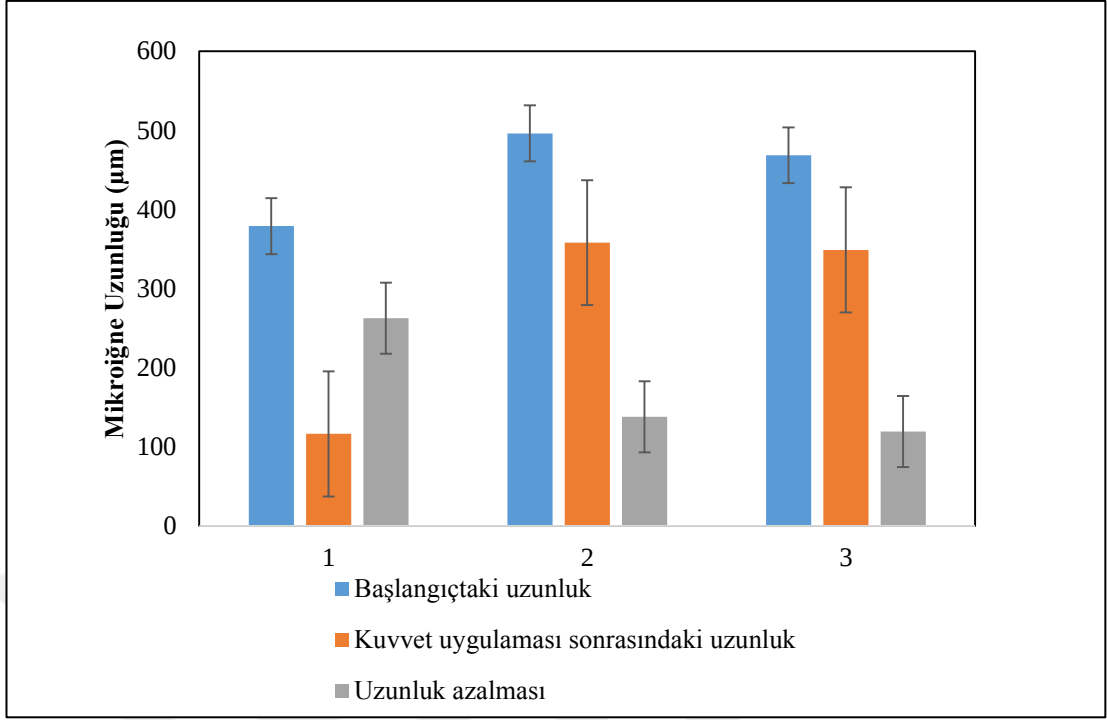


Şekil 3.34. 9. Mikroğneye ait SEM görüntüleri.

Elde edilen SEM görüntülerinden görüldüğü üzere hiçbir mikroğnede kırılma görülmemiştir. Ancak tüm mikroğnelerde eğilmeler görülmektedir. Eğilmeye bağlı olarak en fazla uzunluk azalması görülen mikroğne %1,5 a/h sodyum hyaluronat ile üretilen mikroğne olmuştur. En az uzunluk azalması görülen mikroğne %5 a/h sodyum hyaluronat ile üretilen mikroğne olmuştur. Ancak nihai formülasyonun seçimi için tüm mikroğne formülasyonlarındaki uzunluk azalması ölçülmüş ve grafiğe geçirilip değerlendirilmiştir.

3.2.5. Mikroğnelerdeki Uzunluk Değişimi Sonuçları

Kuvvet uygulamasından önce ve sonra elde edilen mikroğne uzunluklarına ait veriler Şekil 3.35'te gösterilmiştir.



Şekil 3.35. Mikroiğnelerdeki uzunluk değişimi sonuçları. 1. 7. Mikroiğne, 2. 8. mikroiğne, 3. 9. mikroiğne.

Elde edilen sonuçlara göre kuvvet uygulaması sonrasında mikroiğne uzunluğunda en fazla değişim 1. formülde, %1,5 a/h sodyum hyaluronat ile üretilen mikroiğne, görülmüştür. En az değişiklik ise 3. formülde, %5 a/h sodyum hyaluronat ile üretilen mikroiğne, görülmüştür. Üç mikroiğne formülasyonu arasında en dayanıklı olan formül 3. formül olarak bulunmuştur. Nihai formülasyon olarak %5 a/h sodyum hyaluronat içeren formül seçilmiştir.

4. TARTIŞMA

Bir alt birim aşı tasarımı, uygun antijen birincil faktördür. Model antijen ovalbumin genellikle taşıyıcı vektörlerin ve adjuvanların etkinliğini doğrulamak için alt birim aşı çalışmalarında kullanılır (Hou ve ark., 2023). Bu nedenle tez çalışmasında geliştirilen alt birim aşı formülasyonunda model protein olarak ovalbumin seçilmiştir.

Model protein, ovalbumin ile hazırlanan formülasyon çalışmalarının sonunda seçilecek formülün mikroiğneye yüklemek için uygun özellikte olması göz önünde bulundurularak çalışmalar yürütülmüştür.

Nanopartikül üretiminde solvent evaporasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, globüllerin emülsifikasyonu ve stabilizasyonu iki önemli faktördür (Sharma et al., 2016). Genel olarak, araştırmacılar nanopartiküllerin stabilizasyonunda bir yüzey aktif madde kullanırlar. Sodyum kolat (SC), hidrofobik bir steroid çekirdeğe ve hidrofilik parçalara sahip bir tür safra tuzudur. Safra asitlerinin hidrofobik çekirdeği, enkapsülasyonu artırıcı bir faktördür (Esim et al., 2020).

Mikroiğnelerin cildi başarılı bir şekilde delmesi antijenin vücuda verilmesini sağlaması gerekir. Ancak bunu başarmak her zaman mümkün değildir. Aşının etkili olabilmesi için belli bir eşik doz değerinde kan dolaşımında bulunması gerekir. Bu sağlanamadığı takdirde etkin bir bağışıklık yanıtı elde edilemez (Avcil & Çelik, 2021).

Literatürde RBD ile üretilen nanopartikülün immünojenikliğini test etmek için Rhesus makaklarına 25 µg RBD antijeni verilerek değerlendirme yapılmıştır (Arunachalam ve ark., 2021).

Formülasyon çalışmalarında bu risk göz önünde bulundurularak nanopartiküllere yüklenecek antijen miktarı belirlenmiştir. Model protein ile öncelikle 50 µg ve 100 µg ile nanopartikül üretilmiştir. Çizelge 3.3’de verilen sonuçlara göre enkapsülasyon etkinliği 50 µg ovalbumin kullanılan formülasyonda daha yüksek bulunmuştur.

Esim ve ark., ve Fievez ve ark., tarafından yapılan çalışmalarda %0,3 sodyum kolat kullanımı sonucu enkapsülasyon etkinliği daha yüksek ve partikül boyutu daha küçük nanopartiküller elde edilmiştir. Tez kapsamında elde edilen bulgular bu sonuçlarla uyumludur. (Esim et al., 2020; Fievez et al., 2009)

Nanopartikül üretim çalışmalarında sonikasyon gücü, iç ve dış faz % a/h oranları ve miktarları, sonikasyon süresi parametreleri değiştirilmiştir. Sadece enkapsülasyon etkinliği değil aynı zaman partikül büyüklüğü verileri de dikkate alınarak nihai formülasyon seçilmiştir.

Bölüm 3.1.3.1’de elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde nanopartikül formülasyonundan antijenin 24 saat içinde bir burst salım gösterdiği daha sonrasında ise salımın platoya ulaştığı görülmüştür. 24 saatten sonra ise kontrollü salım gerçekleştiği görülmüştür. Yuan Gao ve ark., tarafından geliştirilen nanopartikül formülasyonu ile tez çalışması sırasında yapılan in vitro salım çalışmasına benzer bir profil elde edilmiştir (Gao ve ark., 2022). Ayrıca Chen ve ark., tarafından üretilmiş olan ovalbumin yüklü PLGA nanopartikülleri ile yapılan in vitro salım tayininde benzer profil elde edilmiştir (Chen ve ark., 2020). Bu sonuçlara ek olarak Alqahtani ve ark., tarafından üretilen ovalbumin yüklü lipid nanopartiküller ile yapılan in vitro salım çalışması sonuçları da elde edilen profile benzerlik göstermektedir (Alqahtani ve ark., 2020).

Literatürde yapılan çalışmalarda bu profil benzerliğinin elde edilmesi önemlidir. Çünkü yukarıda bahsedilen literatürlerde bulunan nanopartikül formülasyonları kullanılan üretim yöntemiyle paralel olan çift emülsiyon yöntemiyle hazırlanmıştır.

Bölüm 3.1.3.2’de elde edilen sonuçlara göre RBD antijeni ile yapılan in vitro salım çalışmaları ovalbumin ile yapılan in vitro salım çalışmalarına paralel sonuç göstermiştir.

Yapılan kinetik hesaplamaları sonucunda elde edilen kinetik modelin birinci derece kinetiğe uyum sağlaması salımın uzatılmış salım olduğunu göstermektedir.

Korsmeyer-Peppas modeline göre yapılan kinetik hesaplama sonucunda n değeri 0,232 olarak bulunmuştur. Bu değer 0,45’ten küçük olduğu için salım difüzyonla gerçekleşmektedir.

Yukarıda bahsedilen üç kinetiğe de uyum görülmesine karşın en yüksek uyum Weibull kinetiğinde görülmüştür. Weibull kinetiğinin hesaplanması sonucunda β değeri olarak 0,371 bulunmuştur. Bulunan bu değer $\beta \leq 1$ olduğu için başlangıçta etken madde salımı hızlı olarak gerçekleşmiş daha sonrasında birinci derece kinetik ile uyumlu hızda platoya ulaşmıştır. Bu durum elde edilen salım grafiğinde de görülmektedir.

Etken madde çıkışının başlangıçta hızlı olması güçlü bir bağışıklık yanıtının elde edilmesine ve daha sonrasında da uzatılmış salım ile bu yanıtın uzun süreli devam etmesine katkı sağlamaktadır. Bu açıdan hazırlanan nanopartikül formülasyonunun amaçladığımız hedefe uygun olduğu görülmektedir.

Yapısal bütünlük tespiti için SDS-PAGE analizi yürütülmüştür. Belli konsantrasyonlardaki ovalbumin çözeltisi ve formülasyonlardan elde edilen salım numuneleri jele uygulanmış ve görüntüsü değerlendirilmiştir. Konsantrasyonların çok düşük olması nedeniyle nanopartiküllerden elde edilen salım numunelerine ait bantlar belirgin şekilde elde edilememiştir; ancak bütün bantların aynı şekilde sürüklendiği anlaşılmaktadır. Belli konsantrasyonlardaki ovalbumin çözeltisi ve formülasyonlardan elde edilen salım numunelerine ait bantların aynı seviyede

olması, ovalbuminin yapısal bütünlüğünü koruduğunu ve üretim basamaklarından etkilenmediğini göstermektedir.

Model protein için yürütülen SDS-PAGE analizinin aynısı RBD antijeni ile üretilen nanopartiküller için de yapılmıştır. Belli konsantrasyonlardaki RBD çözeltisi ve nanopartiküllerden elde edilen salım numuneleri jelle uygulanmış ve görüntüsü değerlendirilmiştir. Jelle ayrıca boş nanopartikül ve boş nanopartikül salım numunesi de uygulanmıştır. Konsantrasyonların çok düşük olması nedeniyle nanopartiküllerden elde edilen salım numunelerine ait bantlar belirgin şekilde elde edilememiştir; ancak bütün bantların aynı şekilde sürüklendiği anlaşılmaktadır. Ayrıca boş nanopartikülün uygulandığı kuyucukta bir kirlilik olmadığı görülmüştür. Bu veriden hareketle jelde görülen bantların sadece RBD antijenine ait olduğu görülmüştür. Belli konsantrasyonlardaki RBD çözeltisi ve formülasyonlardan elde edilen salım numunelerine ait bantların aynı seviyede olması, RBD antijeninin yapısal bütünlüğünü koruduğunu ve üretim basamaklarından etkilenmediğini göstermektedir.

Kullanılan RBD kaynağına ait literatürde de görüldüğü üzere jelde görülen bantlar 25 kDa molekül ağırlığına sahip RBD'ye aittir (Kalyoncu ve ark., 2023).

Bölüm 2.3.7'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen stabilite çalışmaları sonucunda 90 günün sonunda nanopartiküllerin partikül büyüklüğünün 200 nm altında olduğu görülmüştür. Literatürde bulunan bilgiden hareketle 90 gün sonunda nanopartiküllerin antijen sunan hücreler tarafından etkili bir şekilde alınabileceğini göstermektedir (Dong et al., 2021). Zeta potansiyel ve PDI verilerindeki değişime bakılarak nanopartiküllerin 90 gün boyunca +4°C'de stabil olduğunu söylenebilmektedir.

Bölüm 2.3.7'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen stabilite çalışmaları sonucunda 90 günün sonunda nanopartiküllerin partikül büyüklüğünün giderek arttığı görülmüştür. -20°C'de donan nanopartiküllerin agregatlar oluşturduğu bu nedenle partikül büyüklüğünün arttığı düşünülmektedir (Bhatnagar et al., 2007).

-20°C’de nanopartiküllerin partikül büyüklüğü verilerine göre 3 ay sonunda stabilitelerinde azalma görülmüştür. Zeta potansiyel ve PDI verilerinde ise partikül büyüklüğü verilerine kıyasla çok fazla değişim görülmemiştir.

Bölüm 2.3.7’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen stabilite çalışmaları sonucunda 90 günün sonunda -20°C’de trehaloz ilavesinin partiküllerin agregat oluşturarak partikül büyüklüğünün artmasını engellediği görülmüştür. 90 günün sonunda nanopartiküllerin partikül büyüklüğü yaklaşık olarak 200 nm bulunmuştur. Bu da aşı formülasyonunun antijen sunan hücreler tarafından etkili bir şekilde alınabileceğini göstermektedir. Zeta potansiyel ve PDI verilerinde de partikül büyüklüğü verilerine benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre aşı formülasyonun +4°C’de ve -20°C’de trehaloz eklenmiş halinin 90 gün süreyle stabil olduğu bulunmuştur. Ancak protein yapısındaki değişimin ve bu süre boyunca aşının etkinliğinin tayini için ileri karakterizasyon çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

DSC analizi sonuçları Bölüm 2.3.8’de anlatılan şartlar altında yapılan çalışmalarla elde edilmiştir.

Öncelikle, ovalbumine ait termogramda erime sıcaklığında 78,94°C’de endotermik pik görülmektedir. PEG-PCL’ye ait termogramda 49,15°C’de ve 59,15°C’de iki endotermik pik görülmektedir. Bu piklerin PEG-PCL’ye ait olduğu yapılan literatür taraması ile doğrulanmıştır (Li ve ark., 2018). Formülasyonların termogramları incelendiğinde ovalbumin içeren formülasyon için ovalbumine ait pik kaybolmuştur ve sadece polimere ait pikler görülmektedir. Aynı şekilde boş nanopartikülde de sadece polimere ait pikler görülmektedir.

Bu sonuç nanopartikül yapısında bulunan maddelerin homojen bir şekilde polimer ile nanopartikül yapısı içine enkapsüle olduğunu göstermektedir.

Nanopartiküllerin morfolojik özelliklerini incelemek amacıyla TEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin TEM görüntüleri incelendiğinde küresel ve yüzeyleri düzgün nanopartiküller elde edildiği gözlenmektedir. Ayrıca formüllerde TEM ile gözlenen partikül boyutunun foton korelasyon spektroskopisi yöntemi ile ölçülen ortalama partikül boyutundan daha küçük olduğu görülmüştür. Bunun sebebi ise analiz sırasında nanopartiküllere kurutma işleminin yapılması nedeniyle partiküllerin boyutunun küçülmesidir. Elde edilen görüntülerdeki düzgün morfolojideki partiküllere dayanarak başarılı bir şekilde nanopartikül formülasyonu hazırlandığını söylememiz mümkündür.

Bölüm 3.1.8.1’de verilen sonuçlar değerlendirildiğinde L929 hücrelerine uygulanan RBD’nin formülasyonda kullanılan konsantrasyonu olan 50 µg miktarında herhangi bir sitotoksikite gözlenmemiştir. 1 mg’lık yüksek bir konsantrasyonda bile hücre canlılığı incelendiğinde polimerin sitotoksikite oluşturmadığı görülmüştür.

Ancak boş NP ve RBD yüklü NP’lerde ise 24.saat sonunda 20 mg/ml nanopartikül konsantrasyonunda ve 72.saatte 10 mg/ml ve 20 mg/ml nanopartikül konsantrasyonlarında sitotoksikite gözlenmiştir. Bunun sebebinin yüksek miktarda nanopartikül konsantrasyonunun hücre üzerinde bir kütle artışına sebep olup hücre canlılığında azalmaya yol açmış olabileceği düşünülmektedir.

Bölüm 3.1.8.1’de elde edilen sonuçlara göre sitotoksik etki göstermeyen nanopartikül konsantrasyonu nitrik oksit tayininde kullanılmıştır. RBD-NP için toksik etki göstermeyen en yüksek konsantrasyon olan 4 mg/ml konsantrasyonu kullanılmıştır.

Bölüm 3.1.8.2’de verilen sonuçlara bakıldığında hem boş NP hem de RBD-NP örnekleriyle yapılan NO tayini sonuçlarından hareketle 72 saatlik inkübasyon sonrası RBD-NP’lere maruz kalan gruplardaki nitrik oksit seviyelerinin RBD proteinine maruz kalan gruplara oldukça yakın oldukları görülmüştür. 24 saatlik süre içerisinde RBD-NP’lerin RBD proteinine göre daha düşük immünostimulan özellik göstermelerine rağmen, 72 saatin sonunda yakın sonuçların elde edilmesi, zamanla

nanopartiküler sistemlerin daha fazla miktarda RBD proteini salımına imkan sağladığı şeklinde yorumlanmıştır. Bölüm 3.1.4.2’de verilen in vitro salım çalışması sonuçları da nanopartiküler sistemin 72. saatin sonunda daha fazla RBD açığa çıkmasına izin verdiğini göstermektedir. İn vitro salım çalışması sonuçları NO tayini sonuçları ile uyum göstermektedir. Sonuç olarak RBD NP’lerin non-toksik konsantrasyonlarının J774 makrofaj hücreleri üzerinde kayda değer bir düzeyde immünostimulan aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu da geliştirilen aşı formülasyonunun immün yanıt oluşturabileceğini göstermektedir.

Polisiloksan kit ile oluşturulan mikroigne kalıbına çeşitli konsantrasyonlarda polimer çözeltileri uygulanmıştır. Kullanılan polimerler literatürde çözünen mikroigne üretiminde sıklıkla kullanılan polimerlerden seçilmiştir (Mbituyimana et al., 2022).

Mikroiğneler kalıptan çıkarıldığında sertlik ve görünüş açısından en iyi sonuç PVA, PVP ve sodyum hyaluronat polimerleri ile elde edilmiştir. Bu nedenle ileriki çalışmalara bu polimerler ile devam edilmiştir. Yapılan bu çalışma PDMS kalıp ile üretilmesi planlanan mikroigne formülasyonları için önformülasyon çalışması olmuştur.

Bölüm 2.4.1’de belirtilen çalışmalar sonucunda elde edilen veriler ışığında PDMS kalıp ile mikroiğneler üretilmiştir. Çözünen mikroiğnelerin üretimi için kullanılan en yaygın üretim yöntemi, polidimetilsiloksan (PDMS) kalıbı kullanılarak yapılan mikro kalıplamadır. PDMS, mikroiğneleri ana yapıya göre doğru bir şekilde üretmek için kullanılabilen esnek bir hidrofobik malzemedir. Bu yöntem, çok az ek ekipman gerektirmesi nedeniyle laboratuvar boyutundaki çalışmalar için uygundur. Ayrıca, yüksek sıcaklık veya organik çözücü gibi zorlu koşullar içermemesi nedeniyle biyofarmasötiklere veya antijenlere uygulanabilen bir yöntemdir (Kang et al., 2021). Bu avantajları nedeniyle tercih edilen bu yöntem sonucunda PDMS kalıp ile üretilen mikroiğnelerin polisiloksan kit ile oluşturulan kalıba göre görünüş olarak çok daha muntazam olduğu görülmüştür. Optik ve taramalı elektron mikroskobu görüntüleri ile tekstür analizi sonuçları da bu sonuçları desteklemektedir.

Bölüm 2.4.3'te belirtilen şekilde optik mikroskop analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda düzgün morfolojiye sahip mikroıǵnelerin elde edildiği görölmüştür. Bu da mikro kalıplama metodunda kullanılan formölasyonun düzgün bir şekilde gerçekteştiiğini göstermektedir.

Bölüm 2.4.4'te anlatılan şekilde tekstür analizi yapılmıştır.

Analizler öncelikle 5 kg'lık yük hücresi bulunan tekstür analiz cihazıyla yapılmıştır. Tüm mikroıǵnelerde cihaz aşırı yükleme uyarısı vermiş ve mikroıǵnelerin kırıldığına dair bir pik elde edilememiştir. Mikroıǵnelerin uygulanan 65 N kuvvete dayanıklı olduğu görölmüştür. Daha sonra 30 kg'lık yük hücresine sahip tekstür analiz cihazı ile analiz tekrar yapılmıştır. Ancak yine mikroıǵnelere ait bir kırılma piki görölmemiştir. Mikroıǵnelerin 375 N kuvvete de dayanıklı olduğu görölmüştür. Tekstür cihazı ile kuvvet uygulanmasından sonra mikroıǵneler optik mikroskopta incelenmiş ve iǵnelerin kırılmadığı ancak eğildiği görölmüştür.

Tek bir mikroıǵne dizisindeki iǵnenin cildi delmesi için gereken minimum kuvvet 0,058 N'dir ve bunun üzerindeki kuvvet, mikroıǵnelerin cildi delme kabiliyetini göstermektedir (Younas ve ark., 2023). Tekstür analizi sonucu elde edilen değer ise her bir mikroıǵne dizisindeki tek bir iǵne için 0,29 N olarak bulunmuştur. Elde edilen değer literatürde belirtilen değerin çok üzerindedir. Bu da mikroıǵnelerin yeterince dayanıklı olduğunu göstermektedir.

Mikroıǵneler klinik çalışmalarda başparmak ile basınç uygulanarak cilde uygulanmıştır. Literatürde bu uygulamayı taklit edecek ortalama kuvvet değerı 32 N olarak bulunmuştur (Larrañeta ve ark., 2014).

Mikroıǵnelerin 65 N ve 325 N kuvvet uygulamasına rağmen kırılmadığı elde edilen kuvvet-yer değiştirme grafiklerinden görölmektedir. Üretilen mikroıǵnelerin cildi delebilde yeteneğine ve yeterli dayanıklılığa sahip olduğu görölmektedir.

Bölüm 2.4.5'te anlatıldığı gibi Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile görüntüleme yapılmıştır. Elde edilen görüntüler sonucunda mikroiğnelerin düzgün morfolojide olduğu görülmüştür. Mikroiğnelerin uç kısımlarının sivri olduğu ve desikatörde saklama sırasında uçlarının eğilmediği görülmüştür. Elde edilen sonuçlar optik mikroskopi sonuçlarıyla tutarlılık göstermektedir.

Bölüm 2.4.4'te anlatıldığı şekilde tekstür analiz cihazıyla mikroiğnelere kuvvet uygulanmış ve uygulama sonrası mikroiğnelerin morfolojilerindeki değişim görülmüştür. Mikroiğnelerin hiçbirinde kırılma gözlenmemiş tüm mikroiğneler eğilmiştir. Bölüm 3.2.3'de görüldüğü üzere tüm mikroiğnelerin cildi delebilecek yeterli kuvvete sahip olduğu görülmüştür. Ancak mikroiğnelerin mekanik dayanıklılığını tespit edebilmek için literatürde de belirtildiği gibi tekstür analizi tek başına yeterli değildir. Kuvvet uygulamasından sonra mikroiğne boyutlarındaki değişimin mikroskop ile incelenmesi gerekmektedir (Zhang ve ark., 2021). Bu nedenle mekanik dayanıklılık için tekstür analizinin yanı sıra Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile de kuvvet uygulaması öncesi ve sonrasında mikroiğneler incelenmiştir.

Tekstür analizi sonucunda PVA ve sodyum hyaluronat ile hazırlanan tüm mikroiğne formülasyonlarının hepsinin cildi delebileme kabiliyetine sahip olduğu görülmüştür. Ancak ciltte doğal olarak bulunması sebebiyle mikroiğne formülasyonuna çeşitli konsantrasyonda sodyum hyaluronat ile devam edilmeye karar verilmiştir (Zhang ve ark., 2021).

Mikroiğnelere kuvvet uygulamasından önce ve sonra Taramalı Mikroskop Analizi (SEM) sonuçları birbiri ile karşılaştırıldığında en fazla uzunluk değişiminin 7. Mikroiğnede daha sonra 8. Mikroiğnede ve diğerleriyle karşılaştırıldığında en az miktarda 9. Mikroiğnede olduğu görülmektedir. Bonfante ve ark., yaptığı çalışmada da bulunduğu üzere sodyum hyaluronat konsantrasyonu arttıkça mikroiğnenin mekanik dayanıklılığı artmaktadır (Bonfante et al., 2020) Elde ettiğimiz sonuçlar literatürde verilen veriler ile uyumludur.

Tekstür cihazı ile kuvvet uygulamasının ardından yapılan SEM analizi sonucunda elde edilen görüntülerindeki eğilme miktarları ile uzunluk değişimleri paralellik göstermektedir. Ramadan ve ark., tarafından yapıldığı şekilde tekstür analizi cihazıyla kuvvet uygulanmış ve daha sonrasında mikroiğnelerdeki uzunluk değişimi taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir (Ramadon et al., 2023).

Bölüm 3.2.5'te belirtilen sonuçlar değerlendirildiğinde en az uzunluk değişiminin 9.mikroiğnede olduğu görülmüştür. Bu nedenle nihai mikroiğne formülasyonu olarak %5 a/h sodyum hyaluronat ile üretilen mikroiğne seçilmiştir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

COVID-19'a karşı prototip mikroiğne aşı formülasyonlarının geliştirilmesine yönelik yapılan bu tez çalışmasında şu sonuçlar elde edilmiştir:

- Aşı geliştirmek için hayvan deneylerinde etkinliği kanıtlanmış RBD ile daha önce çalışılmamış bir nanopartikül formülasyonu hazırlanmış ve antijenin formülasyona etkin bir şekilde yüklendiği görülmüştür.
- Nanopartiküllerin hazırlanmasında solvent evaporasyon yöntemi kullanılmıştır. Birçok formülasyon parametresi karşılaştırılmış ve enkapsülasyon etkinliğinin yüksek ve boyutu 200 nm'nin altında olan formüller üretilmiştir.
- +4 °C ve -20 °C'de yapılan stabilite çalışmaları sonucunda 3 ay süreyle nanopartikül formülasyonlarının stabilitelerini koruduğu bulunmuştur.
- RBD'nin üretim aşamalarından ne ölçüde etkilendiğini görebilmek için yapılan SDS-PAGE çalışmaları yapılmış ve RBD'nin üretim yönteminden etkilenmediği görülmüştür.
- Formülasyonların karakterizasyon çalışmalarında NP 11 formülü nihai formül olarak seçilmiştir.
- Yapılan MTT Analizi sonucunda toksik olmayan konsantrasyonlar belirlenmiş ve NO tayininde bu konsantrasyon üzerinden ilerlenmiştir. NO tayini sonucunda üretilen formülasyonların NO üretimini artırdığı ve bağışıklık yanıtı oluşturduğu görülmüştür.

- Mikroigne tipi olarak çözünen mikroignelerin üretilmesi uygun görülmüştür. Çözünen mikroigne üretimi için mikro kalıplama yöntemi kullanılmıştır.
- Mikroignelerin ön formülasyonunda polisiloksan ve aktivatör karışımı ve dermapen iğnesi kullanılarak kalıp oluşturulmuştur. Bu kalıp ile çeşitli polimerler kullanılarak mikroigne üretimi yapılmıştır. Kalıptan çıkma ile sertlik özelliklerine göre PVA, PVP ve sodyum hyaluronat polimerleri ile ilerlenmesine karar verilmiştir.
- PVA ve sodyum hyaluronat ile PDMS kalıp ile üretim yapılmıştır.
- Her iki polimer ile de istenen sertlik ve morfolojide mikroigneler elde edilmiştir. Ancak cilt dokusunda hali hazırda bulunması sebebiyle sodyum hyaluronat mikroigne üretimi için seçilmiştir.
- Hazırlanan nanopartikül ve mikroigne formülasyonları üzerinde yapılan in vitro karakterizasyon çalışmaları sonucunda hedeflenen başarılı sonuçlar elde edilmiştir.
- Sonuçlarımız nanopartikül formülasyonlarına antijenin uygun şekilde yüklendiğini ve mikroignelerin de cildi delebilecek yeterli mukavemete ve morfolojiye sahip olduğunu göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlar sonrasında in vivo çalışmaların yapılması planlanmaktadır.

ÖZET

COVID-19'a Karşı Prototip Mikroigne Aşı Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi

COVID-19 enfeksiyonu ve buna bağlı olarak gelişen rahatsızlıklar hem hastayı hem de tüm dünyayı sağlık, ekonomi, sosyal ve psikolojik açılardan etkilemektedir. Pandemi başlangıcından bu yana yaklaşık 7 milyon ölüm ve 800 milyon vaka görülmüştür. Bu enfeksiyon için toplumsal bağışıklığın sağlanması çok önemlidir. Bu amaçla pek çok aşı platformu geliştirilmiştir. Ancak varyantların hızla mutasyona uğraması ve yeni oluşan varyantlara karşı geliştirilen aşıların etkisiz hale gelmesi çok büyük bir risk oluşturmaktadır. Bu nedenle bu enfeksiyona karşı etkili aşı platformlarının geliştirilmesine acilen ihtiyaç vardır.

Polimerik nanopartiküller, aşılar da antijenin vücutta degradasyonunu önlemeye yardımcı olur ve bu sayede antijenin vücutta kalış süresini uzatarak bağışıklık yanıtının daha uzun süre oluşmasını sağlarlar. Ayrıca taşıyıcı olarak formülasyonda kullanılmalarına ek olarak adjuvan görevi yaparak bağışık yanıtın etkisini artırma yetenekleri vardır. Bu nedenle ilgi çekici taşıyıcı sistemdir.

Çalışmamızda polimerik nanopartiküller FDA onaylı PEG-*b*-PCL (polietilenglikol-blok-poli(ε-kaprolakton)) polimeri kullanılarak solvent evaporasyon yöntemiyle üretilmiştir.

Nanopartikül formülasyonunda öncelikle model protein kullanılarak önformülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında iç ve dış faz % konsantrasyonu ve miktarı, sonikasyon süresi ve gücü, karıştırma süresi gibi parametreler değiştirilerek formülasyonların enkapsülasyon etkinliği ve partikül büyüklüğü özelliklerine bakılarak uygun olan formül seçilmiştir.

Daha sonra bu formüle RBD antijeni yüklenerek aynı karakterizasyon çalışmaları yürütülmüştür.

Mikroiğneler ile aşı uygulaması son dönemlerde ilgi çekici konulardan biri olmuştur. Ciltte bağışıklık hücrelerinin yüksek oranda bulunması, mikroiğnelerin yapısı gereği ağrısız uygulamaya izin vermesi, kendi kendine uygulama imkânı sayesinde sağlık personeline duyulan ihtiyacın ortadan kalkması, soğuk zincir uygulamasına ihtiyaç duyulmaması sebebiyle bu ilgi giderek artmaktadır.

Uygulama sonrası artık bırakmaması, uygulama sonrası tekrar uygulamanın mümkün olmaması ve bu sayede kontaminasyon riskini azaltması sebebiyle tez çalışmasında çözünen mikroiğne formülasyonu geliştirilmiştir.

Mikroiğne formülasyonu geliştirilirken uygun morfoloji ve sertliğe sahip formüller arasından en iyi sonuç verenleri seçilmiş ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Sonuçlarımız nanopartikül formülasyonlarına antijenin uygun şekilde yüklendiğini ve mikroiğnelerin de cildi delebilecek yeterli mukavemete ve morfolojiye sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Aşı, COVID-19, Mikroiğne, Nanopartikül, SARS-CoV-2.

SUMMARY

Development and Evaluation of Prototype Microneedle Vaccine Formulations Against Covid-19

COVID-19 infection and related disorders affect both the patient and the whole world in terms of health, economy, social and psychological aspects. Since the beginning of the pandemic, there have been approximately 7 million deaths and 800 million cases. Ensuring herd immunity is very important for this infection. Many vaccine platforms have been developed for this purpose. However, the rapid mutation of variants and the ineffectiveness of vaccines developed against newly formed variants pose a great risk. Therefore, there is an urgent need to develop effective vaccine platforms against this infection.

Polymeric nanoparticles help prevent the degradation of the antigen in the body in vaccines, thus prolonging the residence time of the antigen in the body and providing a longer immune response. In addition to being used in the formulation as a carrier, they have the ability to increase the effect of the immune response by acting as an adjuvant. Therefore, it is an interesting carrier system.

In our study, polymeric nanoparticles were produced by solvent evaporation method using FDA approved PEG-b-PCL (polyethyleneglycol-block-poly(ϵ -caprolactone)) polymer.

In nanoparticle formulation, firstly, preformulation studies were carried out using model protein. In the prepared nanoparticle formulations, parameters such as % concentration and amount of inner and outer phase, sonication time and power, mixing time were changed and the appropriate formula was selected by considering the encapsulation efficiency and particle size properties of the formulations.

Then, the same characterization studies were carried out by loading the RBD antigen into this formula.

Vaccine application with microneedles has been one of the interesting topics recently. This interest is increasing due to the high rate of immune cells in the skin, the fact that microneedles allow painless application due to their structure, the need for healthcare personnel is eliminated thanks to the possibility of self-administration, and there is no need for cold chain application.

A dissolving microneedle formulation was developed in the thesis study because it leaves no residue after application, it is not possible to re-application after application, and thus reduces the risk of contamination.

While developing the microneedle formulation, the best results were selected among the formulas with suitable morphology and hardness, and characterization studies were carried out.

Our results show that the nanoparticle formulations are properly loaded with antigen and that the microneedles have sufficient strength and morphology to pierce the skin.

Key words: COVID-19, Microneedle, Nanoparticle, SARS-CoV-2, Vaccine.

KAYNAKLAR

- ALI, A. A., MCCRUDDEN, C. M., MCCAFFREY, J., MCBRIDE, J. W., COLE, G., DUNNE, N. J., ROBSON, T., KISSENFENNIG, A., DONNELLY, R. F., & MCCARTHY, H. O. (2017). DNA vaccination for cervical cancer; a novel technology platform of RALA mediated gene delivery via polymeric microneedles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **13**(3): 921–932. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.11.019>
- ALI, M., NAMJOSHI, S., BENSON, H. A. E., MOHAMMED, Y., & KUMERIA, T. (2022). Dissolvable polymer microneedles for drug delivery and diagnostics. *Journal of Controlled Release*, **347**(April): 561–589. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.04.043>
- ALQAHTANI, M. S., KAZI, M., AHMAD, M. Z., SYED, R., ALSENAIDY, M. A., & ALBRAIKI, S. A. (2020). Lignin nanoparticles as a promising vaccine adjuvant and delivery system for ovalbumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, **163**: 1314–1322. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.026>
- ARSHAD, M. S., ZAHRA, A. T., ZAFAR, S., ZAMAN, H., AKHTAR, A., AYAZ, M. M., KUCUK, I., MANIRUZZAMAN, M., CHANG, M. W., & AHMAD, Z. (2021). Antibiofilm Effects of Macrolide Loaded Microneedle Patches: Prospects in Healing Infected Wounds. *Pharmaceutical Research*, **38**(1): 165–177. <https://doi.org/10.1007/s11095-021-02995-0>
- ARUNACHALAM, P. S., WALLS, A. C., GOLDEN, N., ATYEO, C., FISCHINGER, S., LI, C., AYE, P., NAVARRO, M. J., LAI, L., EDARA, V. V., RÖLTGEN, K., ROGERS, K., SHIRREFF, L., FERRELL, D. E., WRENN, S., PETTIE, D., KRAFT, J. C., MIRANDA, M. C., KEPL, E., ... PULENDRAN, B. (2021). Adjuvanting a subunit COVID-19 vaccine to induce protective immunity. *Nature*, **594**(7862): 253–258. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03530-2>
- AUNG, N. N., NGAWHIRUNPAT, T., ROJANARATA, T., PATROJANASOPHON, P., OPANASOPIT, P., & PAMORNPATHOMKUL, B. (2021). Enhancement of transdermal delivery of resveratrol using Eudragit and polyvinyl pyrrolidone-based dissolving microneedle patches. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **61**(October 2020): 102284. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102284>
- AVCIL, M., & ÇELİK, A. (2021). Microneedles in drug delivery: Progress and challenges. *Micromachines*, **12**(11): 1–15. <https://doi.org/10.3390/mi12111321>
- AVRUPA FARMAKOPESİ 9 (EP9) (2016). Avrupa Komisyonu, Strazburg, Fransa.
- AYKAÇ, K. (2020). *Epilepsi tedavisinde kullanılmak üzere yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin formülasyonu çalışmaları* (Tez No. 625427) [Yüksek Lisans Tezi Anadolu Üniversitesi]. YÖK Tez Merkezi. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>

- BAUTISTA-HERNÁNDEZ, L. A., GÓMEZ-OLIVARES, J. L., BUENTELLO-VOLANTE, B., & LUCIO, V. M. B. (2017). *Review article FIBROBLASTS: THE UNKNOWN SENTINELS ELICITING IMMUNE RESPONSES AGAINST MICROORGANISMS*. **7**: 151–157. <https://doi.org/10.1556/1886.2017.00009>
- BAYANI, F., HASHKAVAEI, N. S., ARJMAND, S., REZAEI, S., USKOKOVIĆ, V., ALIJANIANZADEH, M., UVERSKY, V. N., RANAEI SIADAT, S. O., MOZAFFARI-JOVIN, S., & SEFIDBAKHT, Y. (2023). An overview of the vaccine platforms to combat COVID-19 with a focus on the subunit vaccines. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **178**(September 2022): 32–49. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2023.02.004>
- BEHL, A., PARMAR, V. S., MALHOTRA, S., & CHHILLAR, A. K. (2020). Biodegradable diblock copolymeric PEG-PCL nanoparticles: Synthesis, characterization and applications as anticancer drug delivery agents. *Polymer*, **207**(May): 122901. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.122901>
- BHATNAGAR, B. S., BOGNER, R. H., & PIKAL, M. J. (2007). Protein stability during freezing: Separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharmaceutical Development and Technology*, **12**(5): 505–523. <https://doi.org/10.1080/10837450701481157>
- BONFANTE, G., LEE, H., BAO, L., PARK, J., TAKAMA, N., & KIM, B. (2020). Comparison of polymers to enhance mechanical properties of microneedles for bio-medical applications. *Micro and Nano Systems Letters*, **8**(1). <https://doi.org/10.1186/s40486-020-00113-0>
- CASTRO, K. C. DE, COSTA, J. M., & CAMPOS, M. G. N. (2022). Drug-loaded polymeric nanoparticles: a review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, **71**(1): 1–13. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1798436>
- CHELLATHURAI, M. S., LING, V. W. T., & PALANIRAJAN, V. K. (2021). Fabrication and evaluation of transdermal microneedles for a recombinant human keratinocyte growth factor. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, **18**(1): 96–103. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2020.21033>
- CHEN, W., TIAN, R., XU, C., YUNG, B. C., WANG, G., LIU, Y., NI, Q., ZHANG, F., ZHOU, Z., WANG, J., NIU, G., MA, Y., FU, L., & CHEN, X. (2017). Microneedle-array patches loaded with dual mineralized protein/peptide particles for type 2 diabetes therapy. *Nature Communications*, **8**(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01764-1>
- CHEN, Z., ZHANG, Q., ZENG, L., ZHANG, J., LIU, Z., ZHANG, M., ZHANG, X., XU, H., SONG, H., & TAO, C. (2020). Light-triggered OVA release based on CuS@poly(lactide-co-glycolide acid) nanoparticles for synergistic photothermal-immunotherapy of tumor. *Pharmacological Research*, **158**(March): 104902. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104902>
- CHEN, J., WANG, B., CASERTO, J. S., SHARIATI, K., CAO, P., PAN, Y., XU, Q., & MA, M. (2021). Sustained Delivery of SARS-CoV-2 RBD Subunit Vaccine Using a

High Affinity Injectable Hydrogel Scaffold. *Advanced Healthcare Materials*, **2101714**: 1–13. <https://doi.org/10.1002/adhm.202101714>

CORDEIRO, A. S., PATIL-SEN, Y., SHIVKUMAR, M., PATEL, R., KHEDR, A., & ELSAWY, M. A. (2021). Nanovaccine delivery approaches and advanced delivery systems for the prevention of viral infections: From development to clinical application. *Pharmaceutics*, **13**(12). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122091>

DERMAN, S., MUSTAFAEVA, Z. A., ABAMOR, E. S., BAGIROVA, M., & ALLAHVERDIYEV, A. (2015). Preparation, characterization and immunological evaluation: Canine parvovirus synthetic peptide loaded plga nanoparticles. *Journal of Biomedical Science*, **22**(1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0195-2>

DING, Y., LI, Z., JAKLENEC, A., & HU, Q. (2021). Vaccine delivery systems toward lymph nodes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **179**: 113914. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113914>

DONG, Z., LIU, W., LIU, K., LU, Y., WU, W., QI, J., & CHEN, Z. (2021). Effects on immunization of the physicochemical parameters of particles as vaccine carriers. *Drug Discovery Today*, **26**(7): 1712–1720. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.03.007>

DU, Y., XU, Y., FENG, J., HU, L., ZHANG, Y., ZHANG, B., GUO, W., & MAI, R. (2020). Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ’ s public news and information . January.

ESIM, O., BAKIRHAN, N. K., SARPER, M., SAVASER, A., OZKAN, S. A., & OZKAN, Y. (2020). Influence of emulsifiers on the formation and in vitro anticancer activity of epirubicin loaded PLGA nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **60**(January): 102027. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102027>

FACCIOLÀ, A., VISALLI, G., LAGANÀ, A., & DI PIETRO, A. (2022). An Overview of Vaccine Adjuvants: Current Evidence and Future Perspectives. *Vaccines*, **10**(5): 1–26. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050819>

FENG, C., LI, Y., FERDOWS, B. E., PATEL, D. N., OUYANG, J., TANG, Z., KONG, N., CHEN, E., & TAO, W. (2022). Emerging vaccine nanotechnology: From defense against infection to sniping cancer. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **12**(5): 2206–2223. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.12.021>

FIEVEZ, V., PLAPIED, L., DES RIEUX, A., POURCELLE, V., FREICHELS, H., WASCOTTE, V., VANDERHAEGHEN, M. L., JÉRÔME, C., VANDERPLASSCHEN, A., MARCHAND-BRYNAERT, J., SCHNEIDER, Y. J., & PRÉAT, V. (2009). Targeting nanoparticles to M cells with non-peptidic ligands for oral vaccination. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **73**(1): 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.04.009>

- FLYNN, O., DILLANE, K., LANZA, J. S., MARSHALL, J. M., JIN, J., SILK, S. E., DRAPER, S. J., & MOORE, A. C. (2021). Low adenovirus vaccine doses administered to skin using microneedle patches induce better functional antibody immunogenicity as compared to systemic injection. *Vaccines*, **9**(3). <https://doi.org/10.3390/vaccines9030299>
- GADHAVE, R. V., MAHANWAR, P. A., & GADEKAR, P. T. (2019). Effect of glutaraldehyde on thermal and mechanical properties of starch and polyvinyl alcohol blends. *Designed Monomers and Polymers*, **22**(1): 164–170. <https://doi.org/10.1080/15685551.2019.1678222>
- GAO, Y., GONG, X., YU, S., JIN, Z., RUAN, Q., ZHANG, C., & ZHAO, K. (2022). Immune enhancement of N-2-Hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride chitosan/carboxymethyl chitosan nanoparticles vaccine. *International Journal of Biological Macromolecules*, **220**(June): 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.073>
- GUILLOT, A. J., CORDEIRO, A. S., DONNELLY, R. F., MONTESINOS, M. C., GARRIGUES, T. M., & MELERO, A. (2020). Microneedle- based delivery: An overview of current applications and trends. *Pharmaceutics*, **12**(6): 1–28. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060569>
- HILLARY, V. E., & CEASAR, S. A. (2023). An update on COVID-19: SARS-CoV-2 variants, antiviral drugs, and vaccines. *Heliyon*, **9**(3): e13952. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13952>
- HOU, Y., CHEN, M., BIAN, Y., ZHENG, X., TONG, R., & SUN, X. (2023). Advanced subunit vaccine delivery technologies: from vaccine cascade obstacles to design strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **xxx**: 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.01.006>
- JIN, Z., GAO, S., CUI, X., SUN, D., & ZHAO, K. (2019). Adjuvants and delivery systems based on polymeric nanoparticles for mucosal vaccines. *International Journal of Pharmaceutics*, **572**(May): 118731. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118731>
- JIN, Z., ZHAO, B., WAN, W., LI, Y., BAI, X., HU, C., WANG, J., LI, Y., XIN, W., KANG, L., YANG, H., WANG, J., & GAO, S. (2022). Application of microneedle-based vaccines in biosecurity. *Journal of Biosafety and Biosecurity*, **4**(1): 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.jobbs.2022.04.001>
- JOSE, J., KHOT, K. B., SHASTRY, P., GOPAN, G., BANDIWADEKAR, A., THOMAS, S. P., MUHAMMAD T, S., UGARE, S. R., CHOPRA, H., PRIYANKA, & CHOUDHARY, O. P. (2022). Recent advancements in microneedle-based vaccine delivery. *International Journal of Surgery*, **107**(October). <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2022.106973>
- KALYONCU, S., YILMAZ, S., KUYUCU, A. Z., SAYILI, D., MERT, O., SOYTURK, H., GULLU, S., AKINTURK, H., CITAK, E., ARSLAN, M., TASKINARDA, M. G., TARMAN, I. O., ALTUN, G. Y., OZER, C., ORKUT, R., DEMIRTAS, A.,

- TILMENSAGIR, I., KELES, U., ULKER, C., ... INAN, M. (2023). Process development for an effective COVID-19 vaccine candidate harboring recombinant SARS-CoV-2 delta plus receptor binding domain produced by *Pichia pastoris*. *Scientific Reports*, **13**(1): 5224. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32021-9>
- KANG, N. W., KIM, S., LEE, J. Y., KIM, K. T., CHOI, Y., OH, Y., KIM, J., KIM, D. D., & PARK, J. H. (2021). Microneedles for drug delivery: recent advances in materials and geometry for preclinical and clinical studies. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **18**(7): 929–947. <https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1828860>
- KAPNICK, S. M. (2021). The Nanoparticle-Enabled Success of COVID-19 mRNA Vaccines and the Promise of Microneedle Platforms for Pandemic Vaccine Response. *DNA and Cell Biology*, **41**(1): 25–29. <https://doi.org/10.1089/dna.2021.0538>
- KARIM, Z., KARWA, P., & HIEMATH, S. R. R. (2022). Polymeric microneedles for transdermal drug delivery- a review of recent studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **77**(March): 103760. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103760>
- KIM, E., ERDOS, G., HUANG, S., KENNISTON, T. W., BALMERT, S. C., CAREY, C. D., RAJ, V. S., EPPERLY, M. W., KLIMSTRA, W. B., HAAGMANS, B. L., KORKMAZ, E., FALO, L. D., & GAMBOTTO, A. (2020). Microneedle array delivered recombinant coronavirus vaccines: Immunogenicity and rapid translational development. *EBioMedicine*, **55**: 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102743>
- KIM, Y., PARK, E. J., KIM, T. W., & NA, D. H. (2021). Recent progress in drug release testing methods of biopolymeric particulate system. *Pharmaceutics*, **13**(8): 1–23. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081313>
- KÜÇÜKTÜRKMEN, B., & BOZKIR, A. (2018). Drugs subject to special storage conditions or cold chain and evaluation in terms of applications. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, **75**(3): 305–322. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2018.67674>
- KÜÇÜKTÜRKMEN, B., ÖZ, U. C., TOPTAŞ, M., DEVRİM, B., SAKA, O. M., BİLGİLİ, H., DEVECİ, M. S., ÜNSAL, E., & BOZKIR, A. (2021). Development of Zoledronic Acid Containing Biomaterials for Enhanced Guided Bone Regeneration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **110**(9): 3200–3207. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.05.002>
- KUWENTRAI, C., YU, J., RONG, L., ZHANG, B. Z., HU, Y. F., GONG, H. R., DOU, Y., DENG, J., HUANG, J. D., & XU, C. (2021). Intradermal delivery of receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein with dissolvable microneedles to induce humoral and cellular responses in mice. *Bioengineering and Translational Medicine*, **6**(1): 1–9. <https://doi.org/10.1002/btm2.10202>
- LARRAÑETA, E., MOORE, J., VICENTE-PÉREZ, E. M., GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, P., LUTTON, R., WOOLFSON, A. D., & DONNELLY, R. F. (2014). A proposed model

membrane and test method for microneedle insertion studies. *International Journal of Pharmaceutics*, **472**(1–2): 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.05.042>

LE, Z., YU, J., QUEK, Y. J., BAI, B., LI, X., SHOU, Y., MYINT, B., XU, C., & TAY, A. (2022). Design principles of microneedles for drug delivery and sampling applications. *Materials Today*, **xxx**(xx). <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2022.10.025>

LEE, M. S., PAN, C. X., & NAMBU DIRI, V. E. (2021). Transdermal approaches to vaccinations in the COVID-19 pandemic era. *Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy*, **9**: 1–13. <https://doi.org/10.1177/25151355211039073>

LI, H. Y., ZHANG, B., CHAN, P. S., WENG, J., TSANG, C. K., & LEE, W. Y. T. (2018). Convergent synthesis and characterization of fatty acid-conjugated poly(ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for improved drug delivery to the brain. *European Polymer Journal*, **98**(November 2017): 394–401. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.11.038>

LIU, T., CHEN, M., FU, J., SUN, Y., LU, C., QUAN, G., PAN, X., & WU, C. (2021). Recent advances in microneedles-mediated transdermal delivery of protein and peptide drugs. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **11**(8): 2326–2343. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.03.003>

MACHHI, J., SHAHJIN, F., DAS, S., PATEL, M., MOHAMED, M., SAKSENA, C. G., HERSKOVITZ, J., HASAN, M., OUPICKY, D., DAS, S., DONNELLY, R. F., HETTIE, K. S., CHANG, L., GENDELMAN, H. E., & KEVADIYA, B. D. (2020). *Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . January.*

MBITUYIMANA, B., MA, G., SHI, Z., & YANG, G. (2022). Polymeric microneedles for enhanced drug delivery in cancer therapy. *Biomaterials Advances*, **142**(October): 213151. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213151>

MIAO, G., CHEN, Z., CAO, H., WU, W., CHU, X., LIU, H., ZHANG, L., ZHU, H., CAI, H., LU, X., SHI, J., LIU, Y., & FENG, T. (2023). From Immunogen to COVID-19 vaccines: Prospects for the post-pandemic era. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **158**(December 2022): 114208. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114208>

NAGARKAR, R., SINGH, M., NGUYEN, H. X., & JONNALAGADDA, S. (2020). A review of recent advances in microneedle technology for transdermal drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **59**(July): 101923. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101923>

NGUYEN, H. X., BOZORG, B. D., KIM, Y., WIEBER, A., BIRK, G., LUBDA, D., & BANGA, A. K. (2018). Poly (vinyl alcohol) microneedles: Fabrication, characterization, and application for transdermal drug delivery of doxorubicin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **129**(January): 88–103. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.05.017>

- NWAGWU, C. S., UGWU, C. N., OGBONNA, J. D. N., ONUGWU, A. L., AGBO, C. P., ECHEZONA, A. C., EZEIBE, E. N., UZONDU, S., KENECHUKWU, F. C., AKPA, P. A., MOMOH, M. A., NNAMANI, P. O., TARIRAI, C., OFOKANSI, K. C., & ATTAMA, A. A. (2022). Recent and advanced nano-technological strategies for COVID-19 vaccine development. In *Methods in Microbiology* (1st ed., Vol. 50). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2022.03.001>
- PAHAL, S., BADNIKAR, K., GHATE, V., BHUTANI, U., NAYAK, M. M., SUBRAMANYAM, D. N., & VEMULA, P. K. (2021). Microneedles for Extended Transdermal Therapeutics: A Route to Advanced Healthcare. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **159**(September 2020): 151–169. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.12.020>
- PANDA, A., SHARMA, P. K., MCCANN, T., BLOOMEKATZ, J., REPKA, M. A., & MURTHY, S. N. (2022). Fabrication and development of controlled release PLGA microneedles for macromolecular delivery using FITC-Dextran as model molecule. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **68**(November 2020): 102712. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102712>
- PAREDES, A. J., PERMANA, A. D., VOLPE-ZANUTTO, F., AMIR, M. N., VORA, L. K., TEKKO, I. A., AKHAVEIN, N., WEBER, A. D., LARRAÑETA, E., & DONNELLY, R. F. (2022). Ring inserts as a useful strategy to prepare tip-loaded microneedles for long-acting drug delivery with application in HIV pre-exposure prophylaxis. *Materials and Design*, **224**: 111416. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.111416>
- PATARROYO, M. A. (2023). *Adjuvants approved for human use : What do we know and what do we need to know for designing good adjuvants ?* **945**(December 2022). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175632>
- PATIL, S., VIJAYANAND, S., JOSHI, D., MENON, I., BRAZ GOMES, K., KALE, A., BAGWE, P., YACOB, S., UDDIN, M. N., & D'SOUZA, M. J. (2023). Subunit microparticulate vaccine delivery using microneedles trigger significant SARS-spike-specific humoral and cellular responses in a preclinical murine model. *International Journal of Pharmaceutics*, **632**(August 2022): 122583. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122583>
- PELETTA, A., LEMOINE, C., COURANT, T., COLLIN, N., & BORCHARD, G. (2023). Meeting vaccine formulation challenges in an emergency setting: Towards the development of accessible vaccines. *Pharmacological Research*, **189**(August 2022): 106699. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106699>
- PINAR ERKEKOĞLU, & TERKEN BAYDAR. (2021). Güncel In Vitro Sitotoksikite Testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, **41**(1): 45–63.
- POLLARD, A. J., & BIJKER, E. M. (2021). A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology*, **21**(2): 83–100. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>
- RAI, V. K., SAHA, I., ALAM, M., NISHCHAYA, K., GHOSH, G., & RATH, G. (2023).

Microneedle arrays for cutaneous and transcutaneous drug delivery, disease diagnosis, and cosmetic aid: Microneedle patches of cutaneous and transcutaneous uses. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **79**(November 2022): 104058. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.104058>

RAMADON, D., SUTRISNA, L. F. P., HARAHAP, Y., PUTRI, K. S. S., ULAYYA, F., HARTRIANI, P., ANJANI, Q. K., & DONNELLY, R. F. (2023). Enhancing Intradermal Delivery of Lidocaine by Dissolving Microneedles: Comparison between Hyaluronic Acid and Poly(Vinyl Pyrrolidone) Backbone Polymers. *Pharmaceutics*, **15**(1): 289. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010289>

RISANGUD, N., KUNKIT, N., SUNGKHAPHAN, P., HANKAMOLSIRI, W., SORNCHALERM, L., THONGKHAM, S., & CHANSAENPAK, K. (2022). Amphiphilic polymeric photoinitiator composed of PEG-b-PCL diblock copolymer for three-dimensional printing of hydrogels. *European Polymer Journal*, **168**(March): 111094. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111094>

RODRIGUES, G., GONÇALVES DA COSTA SOUSA, M., DA SILVA, D. C., BERTO REZENDE, T. M., DE MORAIS, P. C., & FRANCO, O. L. (2021). Nanostrategies to Develop Current Antiviral Vaccines. *ACS Applied Bio Materials*, **4**(5): 3880–3890. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01284>

S.B.V.J., C., & MANNAYEE, G. (2022). Structural analysis and simulation of solid microneedle array for vaccine delivery applications. *Materials Today: Proceedings*, **65**: 3774–3779. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.06.483>

SAADATI, R., & DADASHZADEH, S. (2014). Marked effects of combined TPGS and PVA emulsifiers in the fabrication of etoposide-loaded PLGA-PEG nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, **464**(1–2): 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.01.014>

SEFIDI, F. J., KAGHAZIAN, H., MORADLI, G. A., & HASSANZADEH, S. M. (2017). Improvement of thermal stability of BCG vaccine. *Iranian Biomedical Journal*, **21**(6): 406–410. <https://doi.org/10.18869/acadpub.ibj.21.6.406>

SHARMA, N., MADAN, P., & LIN, S. (2016). Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: A co-surfactant study. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **11**(3): 404–416. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2015.09.004>

SHENG, T., LUO, B., ZHANG, W., GE, X., YU, J., ZHANG, Y., & GU, Z. (2021). Microneedle-Mediated Vaccination: Innovation and Translation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **179**: 113919. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113919>

SINGH, A. (2021). Eliciting B cell immunity against infectious diseases using nanovaccines. *Nature Nanotechnology*, **16**(1): 16–24. <https://doi.org/10.1038/s41565-020-00790-3>

SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H.,

- PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J., & KLENK, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, **150**(1): 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- SPIERS, I. D., ALPAR, H. O., EYLES, J. E., BOZKIR, A., MILLER, J., & WILLIAMSON, E. D. (2010). Studies on the Co-encapsulation, Release and Integrity of Two Subunit Antigens: rV and rF1 from *Yersinia pestis*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **51**(9): 991–997. <https://doi.org/10.1211/0022357991773456>
- TAVAKOL, S., ZAHMATKESHAN, M., MOHAMMADINEJAD, R., MEHRZADI, S., JOGHATAEI, M. T., ALAVIJEH, M. S., & SEIFALIAN, A. (2021). The role of nanotechnology in current COVID-19 outbreak. *Heliyon*, **7**(4): e06841. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06841>
- VOLPATTI, L. R., WALLACE, R. P., CAO, S., RACZY, M. M., WANG, R., GRAY, L. T., ALPAR, A. T., BRIQUEZ, P. S., MITROUSIS, N., MARCHELL, T. M., SASSO, M. S., NGUYEN, M., MANSUROV, A., BUDINA, E., SOLANKI, A., WATKINS, E. A., SCHNORENBERG, M. R., TREMAIN, A. C., REDA, J. W., ... HUBBELL, J. A. (2021). Polymersomes Decorated with the SARS-CoV-2 Spike Protein Receptor-Binding Domain Elicit Robust Humoral and Cellular Immunity. *ACS Central Science*, **7**(8): 1368–1380. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00596>
- VORA, L. K., MOFFATT, K., TEKKO, I. A., PAREDES, A. J., VOLPE-ZANUTTO, F., MISHRA, D., PENG, K., RAJ SINGH THAKUR, R., & DONNELLY, R. F. (2021). Microneedle array systems for long-acting drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **159**(December 2020): 44–76. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.12.006>
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2023). WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Erişim :[<https://covid19.who.int/>] Erişim Tarihi: [07.06.2023]
- YANG, L., YANG, Y., CHEN, H., MEI, L., & ZENG, X. (2022). Polymeric microneedle-mediated sustained release systems: Design strategies and promising applications for drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **17**(1): 70–86. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2021.07.002>
- YOUNAS, A., DONG, Z., HOU, Z., ASAD, M., LI, M., & ZHANG, N. (2023). A chitosan/fucoidan nanoparticle-loaded pullulan microneedle patch for differential drug release to promote wound healing. *Carbohydrate Polymers*, **306**(100): 120593. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120593>
- YU, Y., WANG, H., GUO, B., WANG, B., WAN, Z., ZHANG, Y., SUN, L., & YANG, F. (2022). Microneedle-based two-step transdermal delivery of Langerhans cell-targeting immunoliposomes induces a Th1-biased immune response. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **177**(June): 68–80. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.06.004>
- ZAFAR, S., HASSAN, S., MUDASSIR, J., HUSSAIN, A., ABBAS, N., LATIF, S., ALI, E., & ARSHAD, M. S. (2021). Microneedle based transcutaneous delivery of low

molecular weight heparin. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, **34**(3): 1165–1170. <https://doi.org/10.36721/PJPS.2021.34.3.SUP.1165-1170.1>

ZHANG, J., ZENG, H., GU, J., LI, H., ZHENG, L., & ZOU, Q. (2020). Progress and prospects on vaccine development against sars-cov-2. *Vaccines*, **8**(2): 1–12. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020153>

ZHANG, L., GUO, R., WANG, S., YANG, X., LING, G., & ZHANG, P. (2021). Fabrication, evaluation and applications of dissolving microneedles. *International Journal of Pharmaceutics*, **604**(May): 120749. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120749>

ZHANG, Y., JIANG, G., YU, W., LIU, D., & XU, B. (2018). Microneedles fabricated from alginate and maltose for transdermal delivery of insulin on diabetic rats. *Materials Science and Engineering C*, **85**(September 2017): 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.006>

ZIELINSKA, A., CARREIRO, F., OLIVEIRA, A. M., NEVES, A., PIRES, B., NAGASAMY VENKATESH, D., DURAZZO, A., LUCARINI, M., EDER, P., SILVA, A. M., SANTINI, A., & SOUTO, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 16). <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>

ZIESMER, J., TAJPARA, P., HEMPEL, N. J., EHRSTRÖM, M., MELICAN, K., EIDSMO, L., & SOTIRIOU, G. A. (2021). Vancomycin-Loaded Microneedle Arrays against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Skin Infections. *Advanced Materials Technologies*, **6**(7). <https://doi.org/10.1002/admt.202001307>