

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SARS-CoV-2 ANTİJENİK PEPTİDİ YÜKLÜ
NANOPARTİKÜLLERİN ÜRETİMİ VE AŞI UYGULAMASI AMAÇLI
BİYOLOJİK DEĞERLENDİRMESİ

Ramazan MADEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Programı

Danışman
Prof. Dr. Serap DERMAN
Eş Danışman
Doç Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Temmuz, 2022

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SARS-CoV-2 ANTİJENİK PEPTİDİ YÜKLÜ
NANOPARTİKÜLLERİN ÜRETİMİ VE AŞI UYGULAMASI AMAÇLI
BİYOLOJİK DEĞERLENDİRMESİ**

Ramazan MADEN tarafından hazırlanan tez çalışması 27.07.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Serap DERMAN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Doç. Dr. Şefik Emrah ABAMOR
Yıldız Teknik Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Serap DERMAN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Alper YILMAZ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Sezen CANIM ATEŞ, Üye
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Serap DERMAN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Aşı Uygulaması Amaçlı Antijenik Peptid Yüklü Nanopartiküllerin Üretimi Ve Biyolojik Değerlendirmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Ramazan MADEN

İmza



Aileme
ve
Sevdiklerime

TEŞEKKÜR

Hazırladığım bu tezde kıymetli yardımlarını benden esirgemeyen Tez Danışmanın sayın Prof. Dr. Serap DERMAN'a ve Tez Eş Danışmanı Doç. Dr. Şefik Emrah ABAMOR'a,

Labaratuvar çalışmalarımnda bana her zaman yardımcı olan Lab-307 ve Lab-306'nın kıymetli araştırmacılarına,

Tez yazımı boyunca benden maddi ve manevi yardımlarını hiç bir zaman esirgemeyen kıymetli aileme,

Bana ve bu teze emeği geçmiş herkese teşekkür ediyorum.

Ramazan MADEN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	3
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 SARS-CoV-2	4
2.1.1 SARS-CoV-2' nin Yapısal ve Yapısal Olmayan Proteinleri.....	5
2.1.2 SARS-CoV-2 Epidemiyolojisi.....	14
2.1.3 SARS-CoV-2'nin Genomik Yapısı.....	17
2.1.4 Virüsün Yaşam Döngüsü ve Patogenezi	18
2.1.5 SARS-CoV-2'yi Teşhis Yöntemleri	22
2.2 Sars-Cov-2'ye Karşı Geliştirilmekte Olan Aşılar.....	24
2.2.1 SARS-CoV-2'ye Karşı Geliştirilen Aşılar Ve Bu Aşıların Avantaj Ve Dezavantajları	25
2.2.2 Nükleik Asit Aşıları	26
2.2.3 Viral Vektör Aşılar	29
2.2.4 Protein Temelli Aşılar	30
2.3 Nanopartiküller.....	32
2.3.1 Nanopartiküllerin Sınıflandırılması.....	34
2.3.2 Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	38
2.3.3 Nanopartikül Karakterizasyonunda Kullanılan Bazı Yöntemler	44
2.4 Adjuvan Sitemleri	55
2.4.1 İdeal bir adjuvanın sahip olması gereken özellikleri	56
2.4.2 Adjuvanların aşı sistemlerinde sağladığı bazı yararlar	56
2.4.3 Adjuvanların potansiyel riskleri	57
2.4.4 Adjuvanların sınıflandırılması.....	57

2.4.5 Taşıyıcı Sistemler.....	57
3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR	60
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	60
3.2 Kullanılan Cihazlar.....	60
3.3 DeneySEL Yöntem	61
3.3.1 Çözeltilerin Hazırlanması	61
3.3.2 NO Tayini İçin Griess Reaktifi ve Standart Çözeltilerin Hazırlanması	62
3.3.3 LSPRWYFYY Peptid Dizisinin Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması	62
3.3.4 Tekli Emülsiyon (O/W Çözücü Buharlaştırma Tekniğiyle Boş PLGA Nanopartikül Sentezi).....	62
3.3.5 Tekli Emülsiyon (O/W) Çözücü Buharlaştırma Tekniğiyle Peptid Yüklü Nanopartikül Sentezi	63
3.3.6 Boyut ve Zeta Potansiyeli Ölçümleri	65
3.3.7 Enkapsülasyon Veriminin (EE) Hesaplanması.....	65
3.3.8 Reaksiyon Veriminin (RV) Hesaplanması	66
3.3.9 Yükleme Kapasitesinin (YK) Hesaplanması.....	66
3.3.10 FT-IR Ölçümleri.....	66
3.3.11 SEM Analizi.....	66
3.3.12 In-vitro Salım Çalışmaları.....	67
3.3.13 Biyouyumluluk Testi.....	68
3.3.14 Peptid ve NP2'nin NO ve Sitokin Üretme Etkinliklerinin <i>İn Vitro</i> Tayini	69
4 DENEYSEL SONUÇLAR	72
4.1 Peptid Kalibrasyon Eğrisi.....	72
4.2 Tekli Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Tekniğiyle Sentezlenen Boş ve Peptid Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	73
4.2.1 Birinci Deney Tasarımındaki Boş Nanopartiküllerin Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi	73
4.2.2 Birinci Deney Tasarımındaki NP0'ın Reaksiyon Verimi Sonucu....	74
4.2.3 Birinci Deney Tasarımındaki Peptid Yüklü Nanopartikül'lerin Boyut ve Zeta Potansiyeli Analizi	74
4.2.4 Birinci Deney Tasarımındaki Peptid Yüklü Nanopartiküllerinin Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Verimi ve İlaç Yükleme Kapasitesi	79

4.2.5 İkinci Deney Tasarımındaki Boş Nanopartiküllerin Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi	80
4.2.6 İkinci Deney Tasarımındaki NP0'ın Reaksiyon Verimi.....	82
4.2.7 İkinci Deney Tasarımındaki Peptid Yüklü Nanopartiküllerin Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi.....	82
4.2.8 İkinci Deney Tasarımındaki NP2 ve NP4'ün Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Verimi ve İlaç Yükleme Kapasitesi	85
4.2.9 NP0, Peptid Ve Peptid Yüklü NP2'nin FT-IR Analizleri.....	86
4.2.10 NP2'nin SEM Analizi.....	88
4.2.11 NP2'nin İn-Vitro Salım Çalışmaları	90
4.2.12 Peptid ve NP2'nin MTT İle Tayin Edilen Sitotoksosite Sonuçları...	90
4.2.13 Peptid ve NP2'nin NO Sonuçları	91
4.2.14 Peptid ve NP2'nin IFN- γ , IL-10, IL-12 Sitokin Seviyesi Sonuçları..	92
SONUÇ VE ÖNERİLER	96
KAYNAKÇA	99
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	134

SİMGE LİSTESİ

A	Absorbans
K	Boltzman Sabiti
I	Çıkan Işın Şiddeti
η	Çözücü Vizkozitesi
dk	Dakika
$^{\circ}\text{C}$	Derece Santigrat
cm^{-1}	Dalga Sayısı
D	Difüzyon Katsayısı
U_E	Elektroforetik Hareketlilik
ϵ	Epsilon
T	Geçirgenlik
I_0	Giren Işın Şiddeti
g	Gram
pH	Hidrojen Gücü
R_h	Hidrodinamik Yarıçap
$f(ka)$	Henry Fonksiyonu
kb	Kilobayt
kDa	KiloDalton
ml	Mililitre
M_A	Molekül Ağırlığı
mV	Milivolt
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
nm	Nanometre
π	Pi
σ	Sigma
R_0	Temel Üreme Sayısı
V	Salım Ortamı Hacmi
ζ	Zeta Potansiyeli
pg	Pikogram
nmol	Nanomol

KISALTMA LİSTESİ

ACE2	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
Ang	Anjiyotensin
ARDS	Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu
aa	Aminoasit
AT2	Alveolar Epitel Tip 2
APC	Antijen Sunan Hücreler
CTD	C-terminal Bölgesi
DMV	Çift Membranlı Veziküller
DLS	Dinamik Işık Saçılması Tekniği
E	Zarf Proteini
ELS	Elektroforetik ışık saçılması
ERGIC	Endoplazmik Retikulum Golgi Ara Bölmesinde
FT-IR	Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi
HR	Tekrarlayan Heptat Bölgesi
IFP	İç Füzyon Peptidi
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
IR	Kızılötesi Radyasyon
LKR	Bağlayıcı Bölge
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
M	Membran Protein
MERS	Orta Doğu Solunum Sendromu
N	Nükleokapsid Protein
NTD	N-terminal Bölgesi
NO	Nitrik Oksit
NP	Peptid Yüklü Nanopartikül
NP0	Boş Nanopartikül
NSP	Yapısal Olmayan Protein
ORF1a	Açık Okuma Çerçevesi 1
ORF1b	Açık Okuma Çerçevesi 2
PDI	Polidispersite İndeksi

PLGA	Poly Laktik-Ko-Glikolik Asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RBD	Reseptör Bağlanma Bölgesi
RAS	Renin-Anjiyotensin Sistemi
RTC	Replikasyon/Transkripsiyon Kompleks
RNP	Ribonükleoprotein
S	Diken Proteini
SP	Sinyal Peptid Bölgesi
SARS-CoV-2	Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs 2
SARS-CoV	Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
TMPRSS2	Transmembran proteaz serin 2
USFDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
UTR	Translate Edilmemiş Bölge
UV-Vis	Ultraviyole Görünür Işık
VLP	Virüs Benzeri Parçacıklar

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	SARS-CoV-2'nin yapısal proteinleri. Nükleokapsid Proteini (N), Membran Proteini (M), Zarf Proteini (E), Diken Protein (S) ve Genetik materyal olarak RNA [29]	5
Şekil 2.2	SARS-Cov-2 S protein yapısı[37].....	6
Şekil 2.3	SARS-CoV-2 ile Konakçı Hücre Reseptörü ACE2 arasında varsayılan moleküler arası etkileşimler [44]	8
Şekil 2.4	SARS-CoV-2 Eproteini. E protein monomeri, bir iyon kanalı olarak işlev gören bir oligomer halinde düzenlenir [56]	9
Şekil 2.5	SARS-CoV-2 Nükleokapsid Protein Yapısal Organizasyonu [68]	11
Şekil 2.6	SARS-CoV-2'nin tahmini bulaşma yolları[97].....	16
Şekil 2.7	SARS-CoV-2'nin genom organizasyonu. ORF1a ve ORF1b, 16 yapısal olmayan proteini kodlar (nsp1–16). Yapısal genler, S, E, M ve N dâhil olmak üzere dört yapısal proteini kodlar [108].....	18
Şekil 2.8	SARS-CoV-2'nin viral yaşam döngüsü. RTC: Replikaz-transkriptaz kompleksi. ER: Endoplazmik retikulum. ERGIC: ER-Golgi ara bölgesi [117]	21
Şekil 2.9	RNA aşı teknolojisi [150]	28
Şekil 2.10	PLGA'nın monomerleri [209]	37
Şekil 2.11	Nanopresipitasyon yöntemi kullanılarak polimerik nanopartiküllerin hazırlanması [221]	39
Şekil 2.12	Nanopartiküllerin Tuzsuzlaştırma Yöntemi ile hazırlanması [226]....	40
Şekil 2.13	Süperkritik akışkan teknolojisi şematik gösterimi [230].....	41
Şekil 2.14	Tekli emülsiyon (o/w) çözücü buharlaştırma tekniği kullanılarak nanopartiküllerin hazırlanması [244]	44
Şekil 2.15	Moleküler orbitallerin enerji seviyelerinin şematik bir gösterimi; dikey oklar elektronik geçişleri temsil eder [254]	47
Şekil 2.16	Yakın ve uzak UV bölgelerinde bir peptidin absorpsiyon spektrumu [259]	49
Şekil 2.17	Zeta potansiyelin şekilsel gösterimi [265]	51
Şekil 2.18	Orta-IR spektrum bölgeleri [278].....	54
Şekil 4.1	Peptid kalibrasyon grafiği.....	72

Şekil 4.2	NP0'ın boyut dağılım grafiği.....	73
Şekil 4.3	NP0'ın zeta potansiyeli.....	74
Şekil 4.4	NP1'in boyut dağılım grafiği.....	75
Şekil 4.5	NP2'nin boyut dağılım grafiği.....	76
Şekil 4.6	NP3'ün boyut dağılım grafiği.....	76
Şekil 4.7	NP4'ün boyut dağılım grafiği.....	77
Şekil 4.8	NP5'in boyut dağılım grafiği.....	77
Şekil 4.9	NP1'in zeta potansiyel grafiği.....	78
Şekil 4.10	NP2'nin zeta potansiyel grafiği.....	78
Şekil 4.11	NP3'ün zeta potansiyel grafiği.....	78
Şekil 4.12	NP4'ün zeta potansiyel grafiği.....	79
Şekil 4.13	NP5'in zeta potansiyel grafiği.....	79
Şekil 4.14	NP0'ın boyut dağılım grafiği.....	81
Şekil 4.15	NP0'ın zeta potansiyel grafiği.....	82
Şekil 4.16	NP2'nin boyut dağılım grafiği.....	84
Şekil 4.17	NP2'nin zeta potansiyel grafiği.....	84
Şekil 4.18	NP4'ün boyut dağılım grafiği.....	85
Şekil 4.19	NP4'ün zeta potansiyel grafiği.....	85
Şekil 4.20	Peptid, boş PLGA nanopartikülü (NP0) ve peptid yüklü nanopartikül (NP2)'nin karşılaştırmalı FT-IR analizi.....	87
Şekil 4.21	NP2 nanopartiküllerin 10.00 K X büyütmede alınan SEM görüntüsü	88
Şekil 4.22	NP2 nanopartiküllerin 20.00 K X büyütmede alınan SEM görüntüsü	89
Şekil 4.23	NP2 nanopartiküllerin 60.00 K X büyütmede alınan SEM görüntüsü	89
Şekil 4.24	NP2'nin salım grafiği.....	90
Şekil 4.25	96. Saatte peptid ve peptid yüklü NP2'nin J774 hücre proliferasyonuna etkisinin MTT testi ile ölçülmesi sonucu elde edilen verilerin grafiği	91
Şekil 4.26	96. Saatte peptid ve peptid yüklü NP2'nin J774 hücre hattı üzerinde NO seviyesini gösteren grafik.....	92
Şekil 4.27	96. Saatte peptid ve peptid yüklü NP2'nin J774 hücre hattı üzerinde IFN-y seviyesini gösteren grafik	93
Şekil 4.28	96. Saatte peptid ve peptid yüklü NP2'nin J774 hücre hattı üzerinde IL-10 seviyesini gösteren grafik.....	94

Şekil 4.29 96. Saatte peptid ve peptid yüklü NP2'nin J774 hücre hattı üzerinde IL-12 seviyesini gösteren grafik.....	94
---	----



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	Geliştirilmekte olan aşılardan türleri, sayısal dağılımı ve bu dağılım içindeki yüzde değerleri.....	25
Tablo 2.2	Canlı ve inaktif aşılardan avantaj ve dezavantajları	26
Tablo 2.3	DNA aşılardan avantaj ve dezavantajları.....	27
Tablo 2.4	RNA aşılardan avantaj ve dezavantajları.....	29
Tablo 2.5	Viral vektör aşılardan avantaj ve dezavantajları.....	30
Tablo 2.6	Sentetik peptid aşılardan avantaj ve dezavantajları	31
Tablo 2.7	VLP'lerin avantaj ve dezavantajları	32
Tablo 2.8	Nanoparikel boyutu için farklı organizasyonlar tarafından önerilen üst limitler	33
Tablo 2.9	Nanopartikel karakterizasyon metodları	45
Tablo 4.1	Birinci deney tasarımındaki NP0'ın boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri	73
Tablo 4.2	Birinci deney tasarımındaki NP0'ın reaksiyon verimi	74
Tablo 4.3	Peptid yüklü PLGA nanopartiküllerin boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri	75
Tablo 4.4	Peptid yüklü nanopartiküllerin reaksiyon verimi, enkapsülasyon verimi ve ilaç yükleme kapasiteleri	80
Tablo 4.5	NP0'ın boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri.....	81
Tablo 4.6	NP0'ın reaksiyon verimi	82
Tablo 4.7	NP2 ve NP4'ün boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri.....	83
Tablo 4.8	NP2 VE NP4'ün reaksiyon verimi, enkapsülasyon verimi ve ilaç yükleme kapasiteleri	86

SARS-CoV-2 Antijenik Peptidi Yüklü Nanopartiküllerin Üretimi Ve Aşı Uygulaması Amaçlı Biyolojik Değerlendirmesi

Ramazan MADEN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Serap DERMAN

Eş Danışman: Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Son birkaç yıldır Çin kaynaklı bir virüsün neden olduğu salgın, birçok ülkenin sağlık sistemini, sosyal yapısını ve ekonomisini olumsuz bir şekilde etkilemektedir. Küresel bir salgına neden olan virüs, Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) ve bu virüsün neden olduğu hastalık da Kovid-19 olarak isimlendirilir. SARS-CoV-2'nin ortaya çıkmasından bugüne kadar milyonlarca insan enfekte olurken, virüse karşı aşı geliştirme çalışmaları yoğun bir şekilde devam etmektedir. Günümüzde Kovid-19 enfeksiyonuna karşı farklı türde bazı aşılar mevcuttur.

Bu tez çalışmasında, SARS-CoV-2'ye karşı antijenik peptid yüklü nanopartiküllerin aşı uygulaması için üretimi ve biyolojik olarak değerlendirilmesi araştırıldı. Bu amaçla, SARS CoV-2'nin Nükleokapsid proteininin (N protein₁₀₄₋₁₁₂, epitop ID 39576) *LSPRWYFYY* peptid dizisi üzerinde çalışıldı. Daha önce literatürde bu peptid dizisinin SARS-CoV-2'ye karşı aşı üretiminde kullanılması ile ilgili bir araştırma mevcut değildir. Sadece yapılan bazı çalışmalarda *LSPRWYFYY* peptid

dizisinin *in siliko* olarak potansiyelinin araştırıldığı görülmektedir. Serbest antijenik peptid molekülü, bir biyopolimer olan Poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA) içine su içinde yağ (oil-in-water) tekli emülsiyon/çözücü buharlaştırma tekniği ile enkapsüle edilerek nanopartiküllerin oluşturulması amaçlandı. Oluşacak bu nanopartiküllerin fizikokimyasal ve morfolojik özellikleri ile birlikte, *in vitro* salım özellikleri, biyolojik aktivasyon değerlendirmesi için MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür), Nitrik oksit (NO) ve sitokin testlerinin yapılması hedeflendi.

Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonu; partikül boyutu, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi (PDI) dinamik ışık saçılması tekniği (DLS) ve zeta potansiyeli de elektroforetik ışık saçılması (ELS) tekniği ile yapıldı. Enkapsülasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini tespit etmek için Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, yükleme kapasiteleri ve enkapsülasyon etkinliklerinin analizi için Ultraviyole Görünür Işık (Uv-Vis) spektroskopisi kullanıldı. Oluşan nanopartiküllerin morfolojik karakterizasyonu Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile gerçekleştirilmiş olup, peptid salımının analizi yapıldı. Son olarak biyolojik aktivasyonun değerlendirilmesi kapsamında MTT ile biyoyumluluk, NO ve sitokin düzeylerinin ölçülmesi ile de antijenik peptid molekülünün immünojenitesi araştırıldı.

Bu çalışmada SARS-CoV-2'ye karşı ilk defa aşı geliştirme amaçlı *LSPRWYFYF* antijenik peptid yüklü PLGA nanopartikülleri değerlendirildi.

Anahtar kelimeler: Koronavirüs, Sars-CoV-2, Kovid-19, plga, aşı

Production Of SARS-CoV-2 Antigenic Peptide Loaded Nanoparticles And Biological Evaluation For Vaccine Application

Ramazan MADEN

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Serap DERMAN

Co-Supervisor: Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR

In the last few years, the pandemic caused by a virus originating from China has adversely affected the health system, social structure and economy of many countries. The virus that causes a global epidemic is called Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and the disease caused by this virus is called Covid-19. While millions of people have been infected since the emergence of SARS-CoV-2, efforts to develop a vaccine against the virus continued intensively. Today, there are some different types of vaccines available against Covid-19 infection.

In this thesis, the production and biological evaluation of peptide-loaded nanoparticles for vaccine application against SARS-CoV-2 were investigated. For this purpose, a specific peptide sequence *LSPRWYFY* of the Nucleocapsid protein (N protein₁₀₄₋₁₁₂, epitope ID 39576) of SARS CoV-2 was studied. There is no previous research in the literature on the use of this peptide sequence in the

production of vaccines against SARS-CoV-2. Only some studies have investigated the potential of the LSPRWYFYY peptide sequence *in silico*. It was aimed to form nanoparticles by encapsulating the free antigenic peptide molecule into a biopolymer, Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA), with oil-in-water, o/w single emulsion/solvent evaporation technique. It was aimed to determine the physicochemical and morphological properties of these nanoparticles and to conduct an *in vitro* release properties. Finally, it was aimed to perform MTT (3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium-bromide) and Nitric oxide (NO) tests for biological activation evaluation.

Characterization of synthesized nanoparticles; particle size, zeta potential and polydispersity index (PDI) were measured by dynamic light scattering technique (DLS) and zeta potential was measured by electrophoretic light scattering (ELS) technique. Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy was used to determine whether the encapsulation has taken place successfully, and Ultraviolet Visible Light (Uv Vis) spectroscopy was used for the analysis of loading capacities and encapsulation efficiencies. Morphological characterization of the formed nanoparticles was performed with Scanning Electron Microscopy (SEM), and *in vitro* release of peptide from nanoparticles was analyzed. Finally, within the scope of the evaluation of biological activation, biocompatibility with MTT, whether an immune response occurred against the antigenic peptide molecule with the measurement of NO and cytokine levels was investigated.

In this study, *LSPRWYFYY* peptide-loaded PLGA nanoparticles were evaluated for the first time for vaccine development against SARS-CoV-2.

Keywords: Coronavirus, Sars-CoV-2, Covid-19, plga, vaccine

1.1 Literatür Özeti

Bugüne kadar dünya üzerinde birçok salgının yaşandığı, bu salgınların küresel ölçekte toplumların sağlığı için ciddi riskler oluşturduğu ve yaşanan bu salgınlar sonucunda bir çok insanın hayatını kaybettiği bilinmektedir. Tıp modern anlamda ne kadar gelişirse gelişsin büyük çaplı salgınların ortaya çıkma riski her zaman vardır. 2019 yılının sonuna doğru Çin’de ortaya çıkan yeni bir salgın, bugün bütün insanlığı birçok yönden tehdit etmektedir [1]. Bir koronavirüs türünün sebep olduğu salgının nasıl ortaya çıktığı bazı senaryolar üzerinden tahmin edilmeye çalışılsa da virüsün nereden kaynaklandığıyla ilgili veriler yetersizdir. SARS-CoV-2 olarak adlandırılan bu yeni koronavirüs türü, Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü (SARS-CoV) ve Orta Doğu Solunum Sendromu olarak tanımlanan (MERS) koronavirüs türleriyle aynı aileden gelir [2].

Koronavirüsler (CoV’ler), bir RNA virüsü ailesidir ve insanlarda şiddetli akut solunum sendromu ve diğer solunum yolu enfeksiyonları gibi önemli hastalıklara ve bazı memelilerde ve kuşlarda çeşitli solunum, gastrointestinal ve diğer enfeksiyonlara neden olabilir [3]. Salgının başlangıcından günümüze kadar Kovid-19 nedeniyle 520 milyondan fazla insan enfekte olduğu ve 6 milyondan fazla insan yaşamını yitirdiği bilinmektedir [4].

Pandeminin başlamasından itibaren maske, mesafe gibi bazı koruyucu tedbirler alınırken, enfeksiyona karşı aşı geliştirme çalışmaları da devam etmektedir. SARS-CoV-2’ye karşı, bir bütün olarak virüse veya virüsün alt birimlerine dayanan ve şuan geliştirilmekte olan en az 8 tip aşı türü vardır. Geliştirilen aşı türlerinin içinde geleneksel olarak başvurulmuş yöntemlerin yanında daha önce hiç ruhsatlandırılmamış yeni teknolojiler de bulunur [5].

Bugün SARS-CoV-2’ye karşı 153 aşı klinik olarak, 196 aşı da preklinik olarak geliştirilme aşamasındadır. Klinik aşamada olan 153 aşından 51’ini protein alt birim

aşıları oluşturur [6]. Protein alt birim aşıları bazı önemli avantajlara sahip olması nedeniyle üzerinde en çok çalışılan aşı türlerinden biridir. Protein alt birim aşılarında, patojenin bağışıklık sistemini uyaran ilgili epitop bölgesi kullanılır [7]. Bunun için patojenin proteinleri üzerinden seçilen peptid dizisi laboratuvar ortamında kimyasal olarak sentezlenir.

Aşı ve antiviral ilaç geliştirme çalışmalarında SARS-CoV-2'nin S proteini öncelikli hedef olarak seçilir [8]. Ancak, S proteinin hedef olarak seçilmesi bazı sınırlamalara sahiptir [9], [10]. Bunun için diğer yapısal proteinlerin de tedavi için hedef olarak seçilip araştırılması gerekir.

Bu tez çalışmasında SARS-CoV-2'nin nükleokapsid proteinine (N) ait daha önce çalışılmamış bir peptid dizisi kullanıldı. Koronavirüslerde nükleokapsid proteinleri sarmal simetrik halde bulunan yapısal bir fosfoproteindir [11]–[13]. N proteinin koronavirüsün genetik materyali olan RNA'yı boncukların ip üzerinde dizilmesi gibi RNA'nın üzerinde dizilerek bağladığı düşünülür. Aşı ve ilaç çalışmalarında N proteini önemli bir hedeftir. Bu protein yüksek bir immünojenik özelliğe sahiptir ve SARS-CoV-2'ye karşı koruyucu bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarabilir [10], [14], [15].

Protein alt birim aşıları her ne kadar diğer aşı türlerine göre üstün özelliklere sahip olsa da, bazı dezavantajlar da barındırabilir. Enzimatik bozunmalara karşı hassas olmaları ve zayıf immünojenik özellik göstermeleri en önemli dezavantajlarından. Bunun için protein alt birim aşılarında kullanılan peptid dizilerinin hem *in vivo* ortamda korunmasını sağlayacak hem de immünojenitelerini arttıracak bir tasarıma ihtiyaç vardır. Bu tasarımın sağlanması için nanopartikül taşıyıcı sistemleri oldukça kullanışlıdır.

Bu çalışmada nanopartikül taşıyıcı sistem olarak PLGA kullanıldı. PLGA ve türevleri, yapısında laktik asit ve glikolik asitin farklı oranlarda bulunduğu alifatik bir polyesterdir [16]. PLGA, biyolojik olarak parçalanabilir, biyoyumlu ve vücut içinde toksik etki göstermeyen bir polimerdir [17], [18]. Yüksek bir biyoyumluluğa sahip ve geniş bir kullanım alanı olan PLGA'nın çalışmamızda antijenik peptid dizisi için nanopartikül taşıyıcı olarak kullanılmasıyla hem peptidi vücut ortamında koruması hem de immünojenitesini arttırarak bir adjuvant olarak

görev yapması hedeflendi. Ayrıca kontrollü salıma imkan vermesi sayesinde Kovid-19 enfeksiyonuna karşı uzun süreli bağışıklığın sağlanması da çalışmanın hedefleri arasındadır.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı; SARS-CoV-2'nin nükleokapsid proteininin literatürde daha önce çalışılmamış olan *LSPRWYFY* peptid dizisinin Kovid-19 enfeksiyonuna karşı aşı uygulama amaçlı PLGA nanopartiküllerine enkapsüle edilmesi ve oluşturulan bu nanopartiküllerin fizikokimyasal ve morfolojik özellikleri ile beraber ilaç salımı ve biyolojik aktivasyonu açısından incelenmesidir.

1.3 Hipotez

İlgili tez çalışmasında Kovid-19 enfeksiyonuna karşı literatürde ilk defa çalışılan SARS-CoV-2'nin nükleokapsid proteininin *LSPRWYFY* antijenik peptid dizisinin PLGA biyopolimeri ile enkapsüle edilerek peptid-PLGA nanopartiküllerinin oluşturulmasıyla;

- Antijenik peptid dizisinin immunojenitesini arttırma
- Antijenik peptid dizisinin *in vivo* ortamdaki bozunmalara karşı koruma
- Oluşturulan nanopartikül taşıyıcı sistemi ile antijenik peptidin *in vivo* ortamda uzun süre salım yapmasını sağlayarak Kovid-19 enfeksiyonuna karşı uzun süreli bağışıklığın oluşturulması hipotezlendi.

Böylece üretilen nanopartikül sisteminin Kovid-19 enfeksiyonuna karşı geliştirilecek potansiyel bir aşıdan beklenen özellikleri karşılaması beklenir.

2.1 SARS-CoV-2

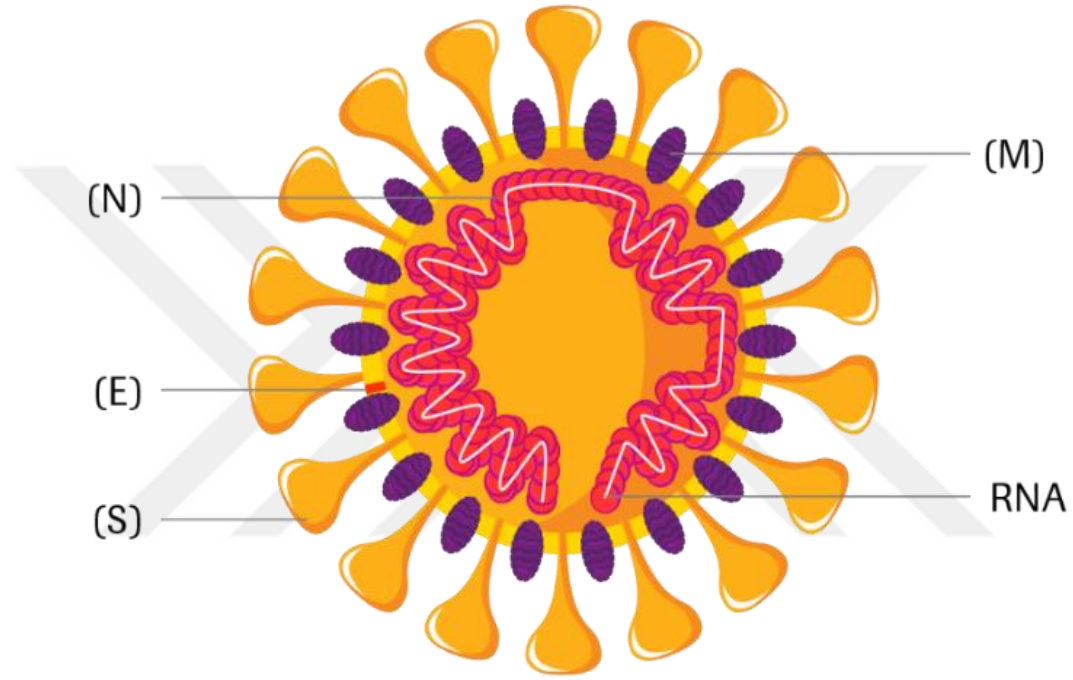
Koronavirüsler, bir RNA virüsü ailesidir [3]. Yapılan filogenetik analizlere göre SARS-CoV-2'nin *Nidovirales* takımının *Coronaviridae* ailesinin, *Coronavirinae* alt ailesine aittir [19]. *Coronavirinae* alt ailesi, Alfakoronavirüs, Betakoronavirüs, Gamakoronavirüs ve Deltakoronavirüs olmak üzere 4 türe ayrılır [20]. Memeliler genellikle Alfakoronavirüs ve Betakoronavirüs türleri ile enfekte olma eğilimine sahiptir. Kuşlar ise daha çok Gamakoronavirüs ve Deltakoronavirüs türleri ile enfekte olur, ancak bu türlerin bazıları memelileri de enfekte edebilir [12]. Genel olarak koronavirüsler zarflı, pozitif tek sarmallı ve 27-32 kilobaytlık (kb) genoma sahiptirler [21].

Zarflı virüslerin, lipit çift tabakalı zarfı, zar proteinleri ve nükleokapsidi, konakçı hücrelerinin dışında bu virüslere koruma sağlayan önemli unsurlardır. Ancak zarflı virüslerin hücre zarındaki lipit çift tabakası, kolesterol ve fosfolipitlerden oluştuğu için virüs konakçı hücre dışında yalnızca belli bir süre hayatta kalabilir [22]. Koronavirüsler hayvandan hayvana bulaşabilir. Ancak, 2002/2003'teki SARS-CoV ve 2012'de MERS salgınları, yeni ortaya çıkan koronavirüslerin hayvandan insana ve insandan insana bulaşabileceğini de göstermektedir [23].

HCoV 229E, HCoV NL63, HCoV HKU1 ve HCoV OC43, SARS-CoV, MERS-CoV olmak üzere 6 farklı koronavirüs türünün insanları enfekte ettiği bilinir [21]. İnsan koronavirüsleri Alfakoronavirüs ve Betakoronavirüs olmak üzere iki aileye ayrılır. HCoV-229E, HCoV-NL63 virüsleri Alfakoronavirüs ailesine aittir, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV ve MERS-CoV in ise Betakoronavirüs ailesine ait olduğu bilinir. İnsanlarda sıkça görülen mevsimsel soğuk algınlığının yaklaşık olarak %10 nundan Alfakoronavirüs ve Betakoronavirüslerinin sorumlu olduğu düşünülür [24]. Ancak bunun aksine, son 20 yılda insan popülasyonunda ortaya çıkan SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2, gibi türler çok daha patojeniktir [25].

Yeni bir koronavirüs türü olan SARS-CoV-2, küresel veya eliptik şekilli ve pleomorfik, 60-140 nm çapında ve zarflı bir RNA virüsüdür [26]. SARS-CoV-2'nin genetik materyali, çift katmanlı fosfolipid bir zarf içine sarılmış halde bulunur [27]. SARS-CoV-2, Betakoronavirüs ailesine ait bir virüstür. SARS-CoV-2 genom dizisi, SARSCoV ile ~% 80 ve MERS-CoV ile ~% 50 düzeyinde sekans benzerliğine sahiptir [28].

SARS-CoV-2'nin yapısal proteinleri Şekil 2.1'de gösterildi.



Şekil 2.1 SARS-CoV-2'nin yapısal proteinleri. Nükleokapsid proteini (N), membran proteini (M), zarf proteini (E), diken proteini (S) ve genetik materyal olarak RNA [29]

2.1.1 SARS-CoV-2' nin Yapısal ve Yapısal Olmayan Proteinleri

SARS-CoV-2 birçok yapısal olmayan proteinle beraber 4 farklı yapısal protein taşır [30]. Bu 4 yapısal protein, Spike proteini (S), Zarf protein (E), Membran proteini (M) ve Nükleokapsid proteini (N) olarak isimlendirilir [31]. En dışta bulunan S proteinlerinin homotrimerleri viral yüzeydeki sivri uçları oluşturur ve konakçı reseptörlere bağlanmadan sorumludur.

M proteinleri üç transmembran bölgesine sahip olup virüse ana şeklini kazandırır, membran yapısını koruma, destekleme ve nükleokapside bağlanma gibi bir takım

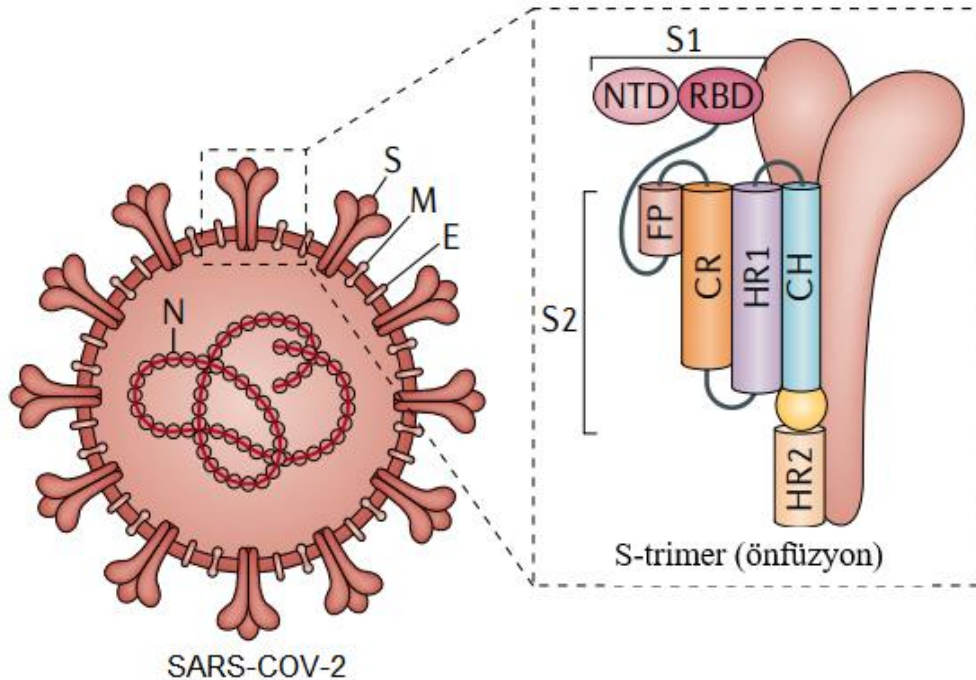
önemli görevleri yürütür. E proteini, virüsün konakçı hücreye bağlanması, enfekte olmuş konakçı hücreden yeni virionların salınması gibi bazı önemli olaylarda görev alır. Son olarak N proteini, virüsün genetik materyali olan RNA'nın etrafında bulunur ve farklı mekanizmalar yoluyla RNA genomuna bağlanır [23].

2.1.1.1 Diken (S) Proteini

Koronavirüslerde konakçı hücreye giriş sınıf 1 füzyon proteini olan ve yüzeyde virüsün zarfına gömülü olarak bulunan S proteinleri tarafından sağlanır [32], [33]. S proteini S1 ve S2 olmak üzere 2 alt birimden oluşur [1]. S1 alt birimi konakçı hücre reseptörüne bağlanmadan sorumlu iken S2 alt birimi virüsün ve konakçı hücre membranlarının füzyonunda görev yapar [34].

S1 alt birimi; N ucunda sinyal peptid bölgesi (SP), reseptör bağlanma bölgesi (RBD) ve bir N-terminal bölgesinden (NTD) oluşur. S2 alt birimi ise; bir füzyon peptid (FP) bölgesi, iç füzyon peptidi (IFP), iki tekrarlayan heptad bölgesi (HR1 ve HR2), ve bir C-terminal bölgesi içerir [35], [36].

SARS-CoV-2'nin S proteinin yapısı Şekil 2.2'de gösterildi.



Şekil 2.2 SARS-Cov-2 S protein yapısı [37]

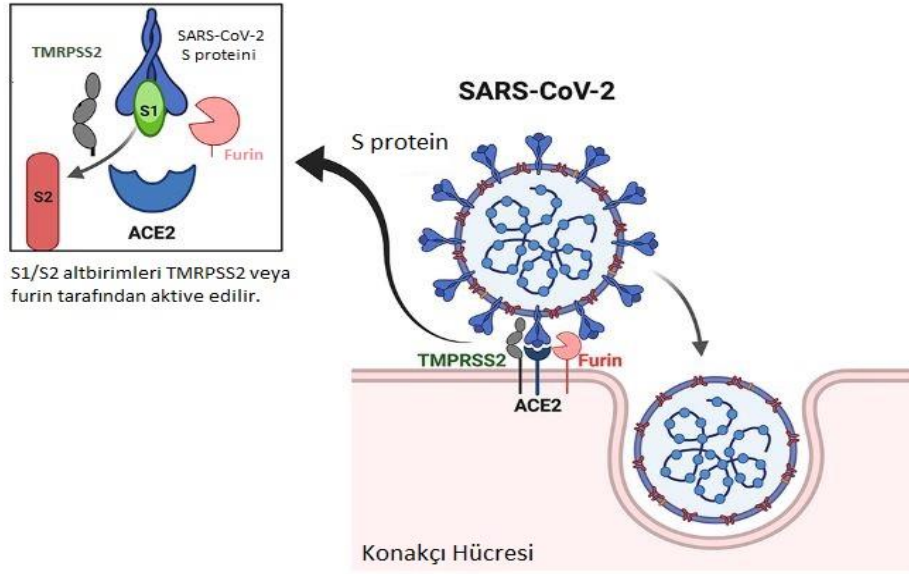
S1 alt biriminde bulunan RBD hem SARS-CoV hem de SARS-CoV-2 de konakçı hücre reseptörü olan Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2 (ACE2) ile bağlanmadan sorumludur [38]. ACE2 reseptörü ve konakçı hücre yüzeyi proteazı olan transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2) veya furin proteaz, virüsün konakçı hücreye girişinde önemli bir rol üstlenir.

ACE2 akciğer, böbrek, kalp ve bağırsakta dağılım gösteren bir hücre yüzey reseptörüdür. ACE2 farklı substratlara karşı katalitik aktivite göstermek, aminoasit taşıyıcısı olmak, SARS koronavirüsleri için fonksiyonel reseptör olarak işlev görmek gibi farklı rollere sahiptir. ACE2 nin temel görevi anjiyotensin 1 (Ang 1) ve anjiyotensin 2'yi (Ang 2) sırasıyla anjiyotensin 1-9 (Ang 1-9) ve anjiyotensin 1-7'ye (Ang 1-7) dönüştürerek renin-anjiyotensin sisteminin (RAS) ana düzenleyicisi olarak işlev görmesidir [36], [39].

İnsan TMPRSS2 proteini, esas olarak prostat, kolon, mide ve tükürük bezinde eksprese edilen geniş bir serin proteaz süper ailesinin üyesi olan 70 kDa'lık bir proteindir [40]. Furin proteaz ise tip I transmembran proteini olan ve proprotein dönüştürücüler adı verilen bir gruba aittir [41]. TMPRSS2 ve furin proteaz viral giriş ve virüs-konakçı hücre membranlarının füzyonu için gerekli olan S proteini aktivasyonunu sağlar [36], [42], [43].

SARS-CoV için geçerli olan bu mekanizmalar SARS-CoV-2 için de aynı şekilde geçerlidir. Ancak bazı farklılıklar söz konusudur. İlk olarak SARS-CoV-2 S proteinin RBD'si SARS-CoV S proteini RBD'sinden daha yüksek bir ACE2 bağlanma afinitesine sahiptir. İkinci farklılık ise SARS-CoV'den farklı olarak SARS-CoV-2'nin konakçı hücreye girişi proprotein konvertaz furin tarafından önceden aktive edilir ve böylece virüsün hedef konakçı hücrenin proteazlarına olan bağımlılığı azalır [33].

SARS-CoV-2 ile Konakçı Hücre Reseptörü ACE2 arasında varsayılan moleküler arası etkileşimler Şekil 2.3'te gösterildi.



Şekil 2.3 SARS-CoV-2 ile konakçı hücre reseptörü ACE2 arasında varsayılan moleküler arası etkileşimler [44]

2.1.1.2 Membran (M) Protein

Diğer koronavirüs türleri ve SARS-CoV-2’de en bol miktarda bulunan yapısal protein M proteinidir. En önemli görevi virüsü karakteristik şeklinde yapısal olarak muhafaza etmektir [45]. M proteini virüs membranının dışında kısa bir NH₂ terminal alanı ve virüsün membranının iç kısmında uzun bir bir COOH terminal bölgesinden oluşur. Ayrıca yapılan in siliko analizlerde M proteinin sarmal bir demet olan üç hidrofobik transmembran bölgesinden oluştuğu gösterilir. M proteinin uzunluğu yaklaşık olarak 220-260 amino aside kadar uzanır [46]–[49].

M proteini virüsün ana yapısal şeklini sağlaması yanında bazı bir takım önemli görevleri de bulunur. M proteini diğer tüm yapısal proteinlerle etkileşime sahip olduğu için enfekte olan konakçı hücrede yeni oluşacak virüslerin yapısal açıdan merkezi düzenleyicisi olduğu düşünülür. Örneğin enfekte olmuş konakçı hücrede yeni virüslerin oluşma aşamasında ER-Golgi ara bölmesinde S proteinin tutulması ve entegrasyonu için M proteinin S proteini ile etkileşimi oldukça önemlidir. Ayrıca M proteini N proteinin yapı stabilizasyonunda önemli bir rol oynar [48], [50]. SARS-CoV-2’deki M proteininin MERS ve SARS-CoV ile karşılaştırıldığında, sırasıyla % 39,2 ve % 90,1 yapısal benzerliğe sahiptir [12].

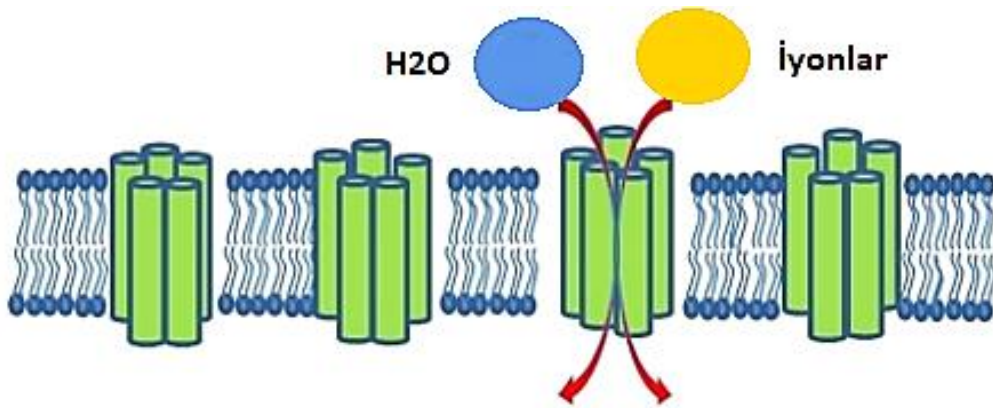
2.1.1.3 Zarf (E) Proteini

E proteini SARS-CoV-2 yapısal proteinlerinin en küçüğü olan, yaklaşık 8-12 kDa ağırlığında bütünleşik bir zar proteinidir. E proteini oligomerize olabilir ve bir iyon kanalı oluşturabilir. Kısa hidrofilik N-terminal bölgesi (NTD), hidrofobik transmembran bölgesi ve hidrofilik C-terminal bölgesi (CTD) olmak üzere üç bölgeden oluşur [51], [52]. Hidrofobik transmembran bölgesi oligomerleri oluşturarak zar boyunca iyonik gözenekler meydana getirir [49].

E proteini viral yaşam döngüsünün kritik aşamalarında rol oynar [53]. Enfekte olmuş konakçı hücrelerde yeni oluşacak olan virüslerin yapısal olarak birleşmesi, yeni oluşan virüslerin salımı ve viral patogeneze olmak üzere E proteini viral replikasyon döngüsünde birden çok role sahiptir [52], [53]. Enfekte olmuş konakçı hücrede yeni virüslerin oluşması sırasında E proteini bol miktarda eksprese edilir. Ancak bol miktarda eksprese edilen bu E proteinlerin az bir kısmı, yeni oluşan virüslerin yapısına dahil edilir [54].

E proteini içermeyen rekombinant virüsler, bozulmuş viral olgunlaşma ve yetersiz viral yayılma sergilerler. Ayrıca, E proteinleri patojenik süreçlere aracılık eder ve sitotoksositeye neden olurlar [55].

SARS-CoV-2'nin E proteini Şekil 2.4'te gösterildi.



Şekil 2.4 SARS-CoV-2 E proteini. E protein monomeri, bir iyon kanalı olarak işlev gören bir oligomer halinde düzenlenir [56]

2.1.1.4 Nükleokapsid (N) Proteini

Koronavirüslerde genel olarak N proteinleri 14-16 nm çapında, 43-46 kDa ağırlığında, sarmal simetrik halde yapısal bir fosfoproteindir [11]–[13]. Enfekte

olan konakçı hücrenin Endoplazmik retikulum-Golgi bölgesinde lokalize olan N proteinlerin, yeni oluşan virionların konakçı hücreden tomurcuklanmasında önemli görevleri bulunur [57]–[59].

N proteinin temel görevi sarmal bir yapı oluşturup koronavirüsün genetik materyali olan RNA'yı konakçı hücre ortamında korumak ve enfekte olan konakçı hücrede yeni oluşacak virionlara aktarmak için RNA'yı ribonükleoprotein (RNP) yapısında paketlemektir [9]–[11], [60]–[62].

N proteinin koronavirüsün genetik materyali olan RNA üzerinde boncukların ip üzerinde dizilmesi gibi dizilerek bağladığı düşünülür. N proteini replikasyon-transkripsiyon olaylarında dinamik bir görev üstlenir. Örneğin N protein, enfekte olmuş konakçı hücreden yeni virionların oluşumu sırasında viral membran proteini ile etkileşime girer, virüs transkripsiyonu ve oluşan yeni virüs bileşenlerin bir araya toplanmasında önemli bir rol oynar.

Koronavirüs N proteinleri NTD, bağlayıcı bölge (LKR) ve CTD olmak üzere yüksek oranda korunmuş 3 farklı bölgeye sahiptir [9], [11], [59], [62]–[65]. NTD ve CTD LKR ile birbirine bağlanır. LKR bölgesi Serin ve Arginin zengini bir bölge içerir [10], [15], [63], [66]. NTD RNA'nın bağlanmasından, CTD hem RNA'nın bağlanmasından hem de dimerizasyondan sorumlu iken LKR de NTD ve CTD'nin RNA ya bağlanma aktivitesini düzenlemekten sorumludur [10], [12], [63], [64], [67].

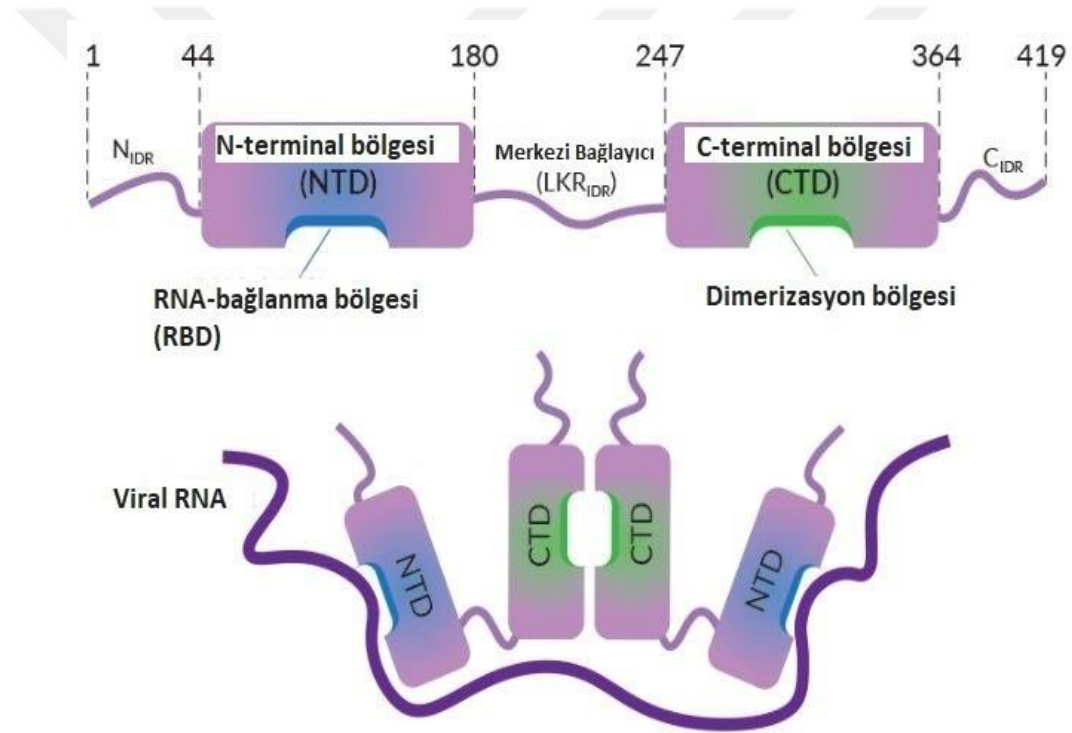
N-proteinde üç LKR vardır; LKR1 (N terminal ucunda), LKR2 (NTD ile CTD arasında) ve LKR3 (C terminal ucunda). LKR2, NTD'nin Reseptör Bağlanma bölgesini (RBD) ve dimerizasyon bölgesini bağladığı için bağlayıcı bölge olarak da adlandırılır [63], [64].

N protein ayrıca interferon (IFN) antagonisti olarak çalışır ve sağlıklı hücrelerde IFN tarafından viral replikasyonun durdurulmasını engellemek ve enfekte olmuş hücrelerin yok edilmesini önlemek gibi virüsün bağışık sisteminden kaçınma mekanizmalarına bazı katkılarda bulunur. N proteinin bir görevi de vücudun virüslere karşı bağışıklık tepkisinin önemli bir parçasını oluşturan konakçı hücre RNA'larının bastırılmasında görev almaktır [13]. Konakçı RNA'nın bastırılmasında

çift sarmallı RNA bağlama aktivitesi yoluyla RNA susturmanın viral bir baskılayıcısı olarak işlev görür [63].

Betakoronavirüs nükleokapsid proteinleri genel olarak ortak bir yapıyı paylaşırlar [67]. Yapılan bazı aminoasit dizisi araştırmalarında SARS-CoV-2 N proteinini dizisinin, SARS-CoV'nin N protein dizisi ile % 90 benzerlik taşıdığı görülür [49], [61], [63]. Yine yapılan bir araştırma sonucuna göre SARS-CoV-2 N protein kodlama bölgesi genomik dizisinin; SARS-CoV, MERS-CoV ve HCoV-OC43 N protein kodlama bölgesi genomik dizisi ile sırasıyla % 89,74, % 48,59, % 35,62 oranında benzerdir [10].

Şekil 2.5'te SARS-CoV-2 nükleokapsid proteinini gösterildi.



Şekil 2.5 SARS-CoV-2 nükleokapsid protein yapısal organizasyonu [68]

SARS-CoV-2 'nin N proteinini 419 aminoasit (aa) uzunluğunda, pozitif yüklü, 45,6 kDa ağırlığında, zayıf ısı direncine sahip olan hidrofobik bir proteindir [15], [61]. SARS-CoV-2'nin N proteinini, diğer koronavirüslerde olduğu gibi NTD, LKR ve CTD olmak üzere üç farklı bölgeden oluşur. NTD 44-180 aa dizisi arasında yer alırken, Serin/Arginin açısından zengin bir bölge içeren LKR bölgesi 180-247 aa ve CTD bölgesi de 247-364 aa arasındaki dizilerde yer alır. Diğer koronavirüs türlerinde olduğu gibi N proteinini SARS-CoV-2'de de aynı görevlere sahiptir. Özetle N

proteini; genomun paketlenmesi sırasında ribonükleoprotein sarmal yapının oluşumu, virüs genetik materyali olan RNA'nın konakçı hücre ortamında korunması, replikasyonda RNA sentezinin düzenlenmesi, transkripsiyonun ve konakçının hücresel metabolizmasının düzenlenmesinde bazı belli başlı görevleri üstlenir [14], [58], [61], [62].

Aşı ve antiviral ilaç geliştirme çalışmalarında SARS-CoV-2'nin S proteini öncelikli hedef olarak seçilir [8]. Ancak, S proteinin hedef olarak seçilmesi bazı sınırlamalara sahiptir. SARS-CoV-2'nin ortaya çıkan bazı yeni varyantlarının S proteinlerinde mutasyonların olduğu bilinen bir durumdur. Bu mutant virüsler konak hücre reseptörüne bağlanmada farklı yollar kullanabildiği için geliştirilen tedavilere direnme eğilimindedirler [9], [61]. Ayrıca, virüsün konakçı hücreye girişindeki karmaşık moleküler ayrıntılar aşı yanıtında bazı komplikasyonlara yol açabilir [69]. Bu ve benzeri bazı sınırlamalardan kaçınmak için, SARS-CoV-2'nin diğer yapısal proteinlerinin de tedavi için hedef olarak seçilip araştırılması gerekir. Aşı ve ilaç çalışmalarında N proteini önemli bir hedeftir. Bu protein yüksek bir immünojenik özelliğe sahiptir ve SARS-CoV-2'ye karşı koruyucu bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarabilir [10], [14], [15].

2000'li yılların başında ortaya çıkan SARS-CoV vakalarında hastalardan alınan serumlarda N proteinine karşı yüksek seviyelerde immunoglobulin G antikorların bulunduğu ve N proteinin SARS-CoV'a özgü T hücre çoğalmasını ve sitotoksik aktiviteyi indüklediği bilinmektedir [69]. Yapılan bir çalışmanın sonucu SARS-CoV-2 N proteinin T ve B hücre epitoplarının, SARS-CoV'unla benzerlik taşıdığını gösterir [64]. SARS-CoV Nükleokapsid protein geninin; % 90 amino asit homolojisi ve zaman içinde daha az mutasyon geçirmesi ile daha stabil ve oldukça iyi korunmuş bir haldedir [69]. SARS-CoV-2 ve SARS-CoV'un N protein dizilerinin %90 benzer olması aynı durumun SARS-CoV-2 içinde geçerli olabileceği fikrini güçlendirir. Ayrıca, Kovid-19 hastalarından alınan serumlarda N proteinine karşı yüksek seviyelerde immunoglobulin A, immunoglobulin M ve immunoglobulin G antikorları bulunmaktadır [64].

Sonuç olarak, N protein dizisinin mutasyonlara karşı yüksek bir korunmaya sahip olması, genetiği ve biyokimyası hakkındaki genişleyen bilgi ve güçlü

immünojenitesi, enfeksiyondan sonra hem humoral hem de hücrel bağışıklık tepkilerini indükleyebilmesi, etkili bir ilaç adayı için birincil gereksinim olan genetik olarak stabil bir protein olması gibi bazı önemli özelliklerinden ötürü, SARS-CoV-2 için aşı adayı olarak güçlü bir şekilde düşünülmelidir [61], [63], [64], [69].

Bu araştırmada SARS CoV-2'nin Nükleokapsid proteininin (N protein₁₀₄₋₁₁₂, epitop ID 39576) *LSPRWYFYY* peptid dizisi üzerinde çalışıldı. Daha önce literatürde bu peptid dizisinin SARS-CoV-2'ye karşı aşı üretiminde kullanılması ile ilgili bir araştırma mevcut değildir. Sadece yapılan bazı çalışmalarda *LSPRWYFYY* peptid dizisinin *in siliko* olarak potansiyelinin araştırıldığı görülmektedir. Yapılan bu *in-siliko* çalışmalarda, *LSPRWYFYY* peptid dizisinin MHC reseptörlerine bağlanma afinitesine sahip olabileceği, belirli düzeyde antijenik özellik gösterebileceği, alerjik olmadığı ve non-toksik olabileceği ifade edilmektedir ve ilgili peptid dizisinin aşı geliştirme çalışmaları için potansiyel bir hedef olarak kullanılabileceği belirtilmektedir [70]–[74].

2.1.1.5 SARS-CoV-2'nin Yapısal Olmayan Proteinleri

Koronavirüs türlerinin hepsinde genomun 3' terminal ucundan yapısal proteinler sentezlenirken, 5' terminal ucundan da genomun yaklaşık üçte ikisini oluşturan ve birbiriyle örtüşen 2 açık okuma çerçevesinden (ORF1a ve ORF1b) bir replikaz proteini kodlanır [75]. Bu iki açık okuma çerçevesinden kodlanan pp1a ve pp1ab isimli iki polipeptid, enfekte olmuş konakçı hücrede yeni oluşan virionların yapısına dâhil edilmez. Bu iki polipeptid, viral proteazlar tarafından genom replikasyonu ve transkripsiyonunda yer alan 16 farklı yapısal olmayan proteine (Nsp) bölünür. Yapısal olmayan proteinler birincil, ikincil ve üçüncül protein yapılarına sahip olmayan polipeptidlerdir [75]–[77].

2.1.1.6 Yapısal Olmayan Proteinlerin Görevleri

SARS-CoV-2, yapısal olmayan 16 proteine sahiptir. Yapısal olmayan bu proteinler nsp1, nsp2, nsp3, nsp4, nsp5 vb. şeklinde kısaca ifade edilirler. Nsp1 konakçı hücre mRNA degradasyonunu teşvik ederek ve konakçı proteinlerin translasyonunu inhibe ederek, konakçının gen ekspresyonunun bastırılmasına aracılık eder [78]. Nsp2'nin görevi tamamen bilinmemekle beraber mitokondriyal

biyogenezde yer alan konakçı protein kompleksleri ile etkileşime girdiği düşünülür [79]. Virüsün replikasyon ve transkripsiyonu replikasyon/transkripsiyon kompleks (RTC) ile meydana gelir. Nsp3 RTC kompleksin en büyük parçasıdır. Nsp3, konakçının doğuştan gelen bağışıklık cevabını azaltmak için sitokin ekspresyonunu değiştirir [80]. Nsp4 viral RNA sentezini desteklemek için çift membranlı vezikülleri (DMV'ler) oluşturur [23]. Nsp5 ilk olarak olgun enzimleri üretmek için poliproteinlerden otomatik olarak ayrılır ve daha sonra nsp4-nsp6'yı serbest bırakmak için belirli bölgelerdeki nsp'leri ayırır [81]. Nsp6, Endoplazmik retikulumdan otofagozomlar üretir ve otofajiye katılır [82]. RNA bağımlı RNA polimeraz olarak da bilinen nsp12; nsp7 ve nsp 8 ile beraber büyük bir protein kompleksi oluşturur. Ayrıca nsp12 RNA replikasyonunda yer alır ve RTC nin önemli bir parçasını oluşturur [83]. Nsp9, virüsün genetik materyallerini insan hücrelerine taşıyan yapılara girebilir ve virüs çoğalmasına aracılık eder.

RNA replikasyonunda yer alan diğer önemli bir protein olan nsp10 yalnızca virüslerde bulunan 140 aa dizilik bir proteindir ve nsp14 ve nsp16'nın uyarılması için gereklidir [23]. Nsp11, replikasyon için gerekliken, Nsp13 helikaz aktivitesi gösterir ve nsp15 te endoribonükleaz aktivitesine sahiptir [82]. Nsp14'ün de 3'-5' ekzoribonükleaz aktivitesine ve N7-metiltransferaz aktivitesine sahiptir. Nsp16, viral replikasyona karşı bağışıklık yanıtında görev alan melanom farklılaşma ilişkili proteinden kaçınmayı sağlar [23].

2.1.2 SARS-CoV-2 Epidemiyolojisi

Kovid-19 salgının başlamasından bugüne kadar geçen sürede 510 milyondan fazla insanın enfekte olduğu ve 6 milyondan fazla insanın da yaşamını yitirdiği bilinmektedir [84]. Genel olarak vakaların önemli bir bölümü hafif seyreder ve hastaların birçoğunda tam iyileşme gözlenir. Ancak bazı vakalarda Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu (ARDS), çoklu organ yetmezliği ve daha ileri safhalarda ölümler yaşanabilir. Uluslararası düzeyde vaka oranları %0,7-7 arasında değişiklik gösterir. Vaka oranlarındaki bu farklılık, ülkelerin aldığı farklı önlemler, nüfuslardaki yaş dağılımları ve ülkelerin sahip oldukları sağlık sistemi kalitelerinin farklı olması gibi nedenlerden dolayıdır [85].

Salgın bütün yaş gruplarını farklı derecede etkiler ve hem belirti gösteren hem de belirti göstermeyen hastalar virüsü yayabilir. Kovid-19 salgınından en çok etkilenen yaş grubu 60 yaş ve üzeridir. En az etkilenen yaş grubu ise çocuklar ve bebeklerdir. Böbrek ve karaciğer rahatsızlığı, hipertansiyon, diyabet, astım, rahatsızlığı olanlar, kalp hastaları ve sigara içenler de yüksek risk altındadır. Cinsiyet bazında ele alındığında erkeklerde kadınlara göre daha fazla vaka görülür [86], [87].

Kovid-19'un klinik şiddeti; asemptomatik, hafif, orta, şiddetli ve kritik olmak üzere 5 grupta tanımlanır. Asemptomatik, virüsle enfekte olduğu halde herhangi bir belirti göstermez. Hafif düzeyde ise hasta, basit üst solunum yolu enfeksiyonu belirtileri gösterebilir. Orta grup zatürreye varan rahatsızlıklarla tanımlanırken, şiddetli grup hastalığın hızlı ilerlemesi ve nefes alamama, gibi belirtiler gösterir. Kritik grupta ise ARDS veya solunum yetmezliği, şok, çoklu organ disfonksiyonu gibi çok ciddi ve ölümcül belirtiler gözlemlenebilir [88].

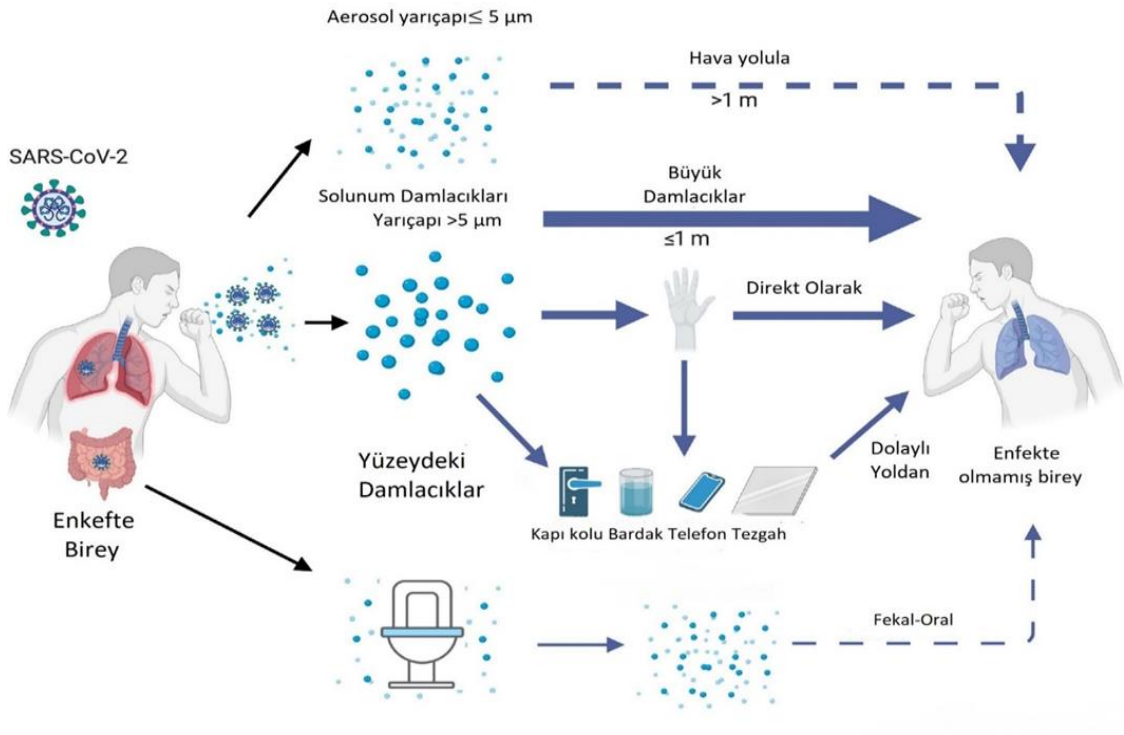
Konakçının hastalık ajanına maruz kalmasından klinik belirtilerin ortaya çıkışına kadar geçen süreye kuluçka süresi denir. Dünya Sağlık Örgütünün Kovid-19 için kuluçka dönemi tahmini 1-14 gün arasında değişmekle beraber, yaygın olarak 5 gün olduğu kabul edilir [89]. Epidemiyolojide, temel üreme sayısı olarak kabul edilen R_0 , tüm bireylerin enfeksiyona duyarlı olduğu bir popülasyonda, bir vaka tarafından doğrudan oluşturulabilecek vaka sayısını gösterir. Erken SARS-CoV-2 salgın verilerine uygulanan çeşitli modellere göre enfekte bir kişi hastalığı ortalama 2,6 kişiye (R_0 : 2.6) bulaştırabilir. Dolayısıyla bir vakanın yaklaşık 2 ay içinde 3000 binden fazla kişiye hastalığı bulaştıma ihtimali vardır [90].

SARS-CoV-2 virüsü hayvansal kaynaklıdır ancak insanlara ilk defa nasıl bulaştığı tam olarak bulunamadı. Bazı bulgular, virüsün insana, yılan, pangolin ve özellikle yarasa türü hayvanlardan bulaştığı konusunda güçlü kanıtlara sahiptir. Virüsün insana ilk bulaştığı kaynağın oldukça önemli olması yanında bugün gelinen noktada, insan-insan arası bulaşma yollarının belirlenmesi ve buna göre uygun önlemlerin alınması da oldukça önemlidir [91]–[93]. Virüs insandan insana bulaşma özelliği kazandıktan sonra, ana enfeksiyon kaynağı, enfekte pnömoni hastalarıdır [94].

SARS-CoV-2 insan-insan arası bulaşmalarda 3 temel yol vardır. Birincisi, damlacık iletim yoludur. SARS-CoV ile yapılan önceki çalışmalar solunum damlacıklarının Betakoronavirüsler için temel iletim yolu olduğunu gösterir. Damlacık iletimi enfekte olmuş bireylerin, konuştuklarında, hapşırdıklarında ve öksürdüklerinde ortaya çıkan damlacıkların çevredeki enfekte olmamış bireyler tarafından solunması veya yutulmasıdır [95], [96]. İkincisi, temasla iletimdir. Temasla iletim eşya yüzeylerinin virüsle kontamine olması ve kontamine olmuş bu eşyalara sağlıklı bireyler tarafından temas edilmesi sonucu sağlıklı bireye virüsün bulaşmasıdır. Son olarak üçüncü temel bulaşma yolu ise aerosolle iletimdir. Aerosolle iletimde, enfekte olmuş bireyin solunum damlacıkları ortam havasına yayılıp aerosoller oluşturduklarında meydana gelir. Kapalı bir ortamda virüs yüklü bu aerosollerin sağlıklı bireyler tarafından solunmasıyla hastalık bulaşabilir [95], [97].

SARS-CoV-2'nin havada üç saate kadar, plastik-paslanmaz çelik yüzeyde iki ila üç güne kadar aerosol olarak hayatta kalabilir. Ayrıca, virüsün fekal-oral bulaşma riski de bulunur. Kovid-19 hastalarının idrarında ve dışkısında virüs tespit edildi [27].

Şekil 2.6'da SARS-CoV-2'nin tahmini bulaşma yolları gösterildi.



Şekil 2.6 SARS-CoV-2'nin tahmini bulaşma yolları [97]

2.1.3 SARS-CoV-2'nin Genomik Yapısı

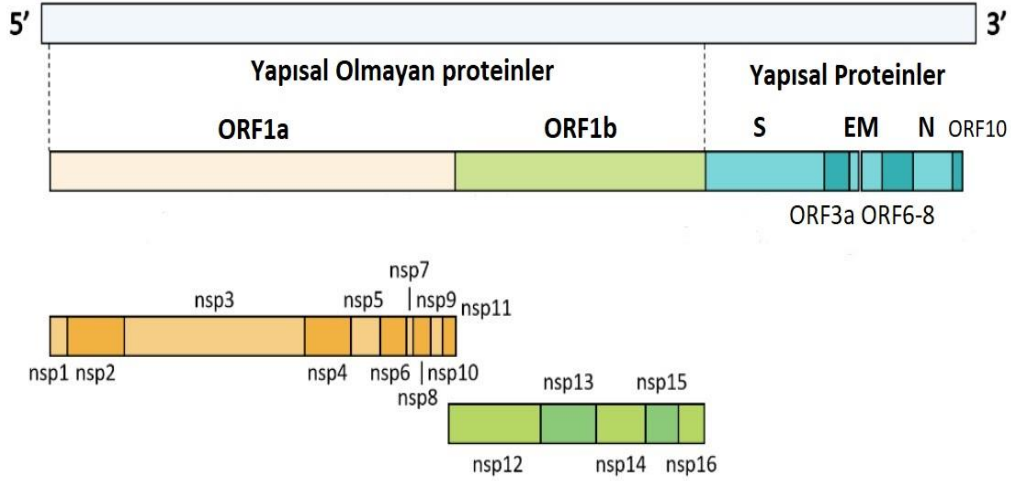
Betakoronavirüsler, *Coronaviridae* ailesinin diğer tüm üyelerine benzer şekilde büyük RNA genomlarına (yaklaşık olarak 30 kb) sahip virüslerdir. Genomlar, 5' metillenmiş başlık ve 3' poliadenile edilmiş kuyruk ve translate edilmemiş (UTR) bölgelere sahiptir. Genomlar korunmuş ve sıralı açık okuma çerçevelerini (ORF) içerir [98]. Pozitif tek sarmallı RNA virüsü olan SARS-CoV-2 de yaklaşık 30 kb'lık bir genoma sahiptir [99]–[101]. N proteinleri tarafından RNP kompleksi olarak paketlenen genom, lipidler ve S, M, E viral proteinleri tarafından çevrelenmiş küresel bir yapıdadır [102].

SARS-CoV-2'nin viral çapı yaklaşık olarak 150-160 nm'dir. SARS-CoV-2, yarasalara ait bat-SL-CoVZC45 ve bat-SL-CoVZXC2 virüs türleriyle yüksek dizi benzerliği gösterirken (sırasıyla $\approx$ %88 ve %87), SARS-CoV ve MERS-CoV ile daha az dizi benzerliği (sırasıyla $\approx$ 79 % ve %50) gösterir [103].

Sars-Cov-2'de 3 ana genomik bölge bulunur. Bunlar; replikaz genini içeren bölge, yapısal proteinleri kodlayan genleri içeren bölge ve bu yapısal proteinleri kodlayan genlerin arasında dağılmış bir şekilde bulunan ve aksesuar proteinlerini kodlayan genlerdir [104]. Virüs genomunun 5' uç tarafı açık okuma çerçeveleri olan ORF1a ve ORF1b'den oluşur. Bu iki bölge genomun yaklaşık üçte ikisini oluşturur. ORF1a ve ORF1b, pp1a pp1ab poliproteinlerine çevrilir. Bu poliproteinler daha sonra replikaz/transkriptaz RTC'yi meydana getiren 16 yapısal olmayan proteine dönüştürülür. Genomun 3' uç tarafı ise 4 adet yapısal proteinin (S, E, N, M) ve sayıları 7-9 arasında değişen aksesuar proteinlerin kodlanmasından sorumludur [105]–[107].

SARS-CoV-2 genomunun 5' UTR'si 265 nükleotid uzunluğundayken, 3' UTR'si 337 nükleotid uzunluğundadır. Virüsün genomu yüksek oranda A+U bazlarını (%62) içerirken, düşük oranda G+C (%38) bazlarını içerir. Bu yüzden virüs yüksek sıcaklıklarda kararsızdır [102].

Şekil 2.7'de SARS-CoV-2'nin genom organizasyonu gösterildi.



Şekil 2.7 SARS-CoV-2'nin genom organizasyonu. ORF1a ve ORF1b, 16 yapısal olmayan proteini kodlar (nsp1–16). Yapısal genler, S, E, M ve N dâhil olmak üzere dört yapısal proteini kodlar [108]

2.1.4 Virüsün Yaşam Döngüsü ve Patogenezi

SARS-CoV-2 nin de dahil olduğu patojenik koronavirüs enfeksiyonları, ARDS, böbrek yetmezliği, zatürre ve daha ileriki aşamada ölüme kadar ilerleyen semptomlara neden olabilir [28]. Kovid-19'un klinik evreleri hakkında şöyle bir sıralama yapılır: Virüsün kanda yayıldığı viremi evresi, akut evre ve son olarak enfeksiyonun ölümle sonuçlanması veya iyileşme evresidir [109]. Hastalığın semptomları kişiden kişiye değişiklik gösterse de, ateş, öksürük, yorgunluk hissi, iştahsızlık, tat ve koku kaybı, nefes alamama ve balgam üretimi enfekte bireyler tarafından genel olarak belirtilen semptomlardır [110].

SARS-CoV-2 enfeksiyonun genel olarak seyri şu şekildedir: Virüsün konakçı hücreyi istila etmesi ve hücre içinde replikasyonu, düzensiz bağışıklık tepkisi ve çoklu organ hasarı [109]. İlk olarak SARS-CoV-2 akciğerlere solunum yoluyla girer ve alveolar epitel tip 2 (AT2) hücrelerine saldırır. SARS-CoV-2'nin S proteinleri AT2 hücrelerindeki ACE-2 reseptörlerine bağlanır [93], [95], [111]. Virüsün S proteini aracılığı ile ACE-2 reseptörüne bağlanmasından sonra virüsün ve konakçı hücrenin membranları kaynaşır. SARS-CoV-2 S proteini konakçı hücrenin ACE-2 reseptörüne bağlanabilmesi için bazı serin proteazlar tarafından aktif edilmesi gerekir [112], [113]. Koronavirüs S proteinleri, furin, tripsin, katepsin, TMPRSS-

2, TMPRSS-4 veya insan hava yolu tripsin benzeri proteazlar dahil, bir veya birkaç konakçı proteazı tarafından aktive edilebilirler. Koronavirüslerin hücrelere plazma membranından mı veya endositoz yoluyla mı giriş yapacağı bu proteazların konakçı hücre üzerinde bulunup bulunmamasıyla belirlenir [114].

SARS-CoV-2'nin yaşam döngüsü temelde 2 bölüme ayrılır. 1. aşama, Başlangıç aşaması diyebileceğimiz virüsün konakçı hücreye tutunması ve hücreye giriş aşamasıdır. 2. aşama ise İleri aşama olarak adlandırılabilir. İleri aşamada, yapısal olmayan ve yapısal olan proteinlerin translasyonu, RNA'nın replikasyonu ve yeni oluşan virionların konakçı hücreden ayrılması gibi olaylar yaşanır [41]. SARS-CoV-2'nin konakçı hücreye tutunması ve girişi S proteini aracılığı ile gerçekleşir. S proteinin konakçı reseptörü ACE2'ye tutunup, virüsün hücreye girişini sağlamak için bazı yapısal değişiklikler geçirmesi gerekir. Bu değişiklikler sonucu S proteini S1 ve S2 alt birimlerine ayrılır. S1 alt birimi konakçı hücre reseptörüne bağlanmayı sağlar ve S2 alt birimi de virüsün ve konakçı hücre membranlarının füzyonunda görev yapar [34]. S proteinin ACE2 reseptörüne bağlanması ayrıca Heparan Sülfat tarafından kolaylaştırılır [115]. S proteinin S1 ve S2 alt birimlerine ayrılması, katepsinler, solunum yolu tripsin benzeri proteazlar, tripsin, furin ve TMPRSS2 gibi proteazlar aracılığıyla gerçekleşir [25]. SARS-CoV-2 ve konakçı hücre membranlarının birleşmesinin 2 yolu vardır; 1. si endositozdur, 2. si ise doğrudan füzyondur. Furin proteaz aracılığıyla sağlanan konakçı hücreye giriş endositoz olarak adlandırılır. Doğrudan füzyon ise TMPRSS2 aracılığıyla gerçekleştirilir [41].

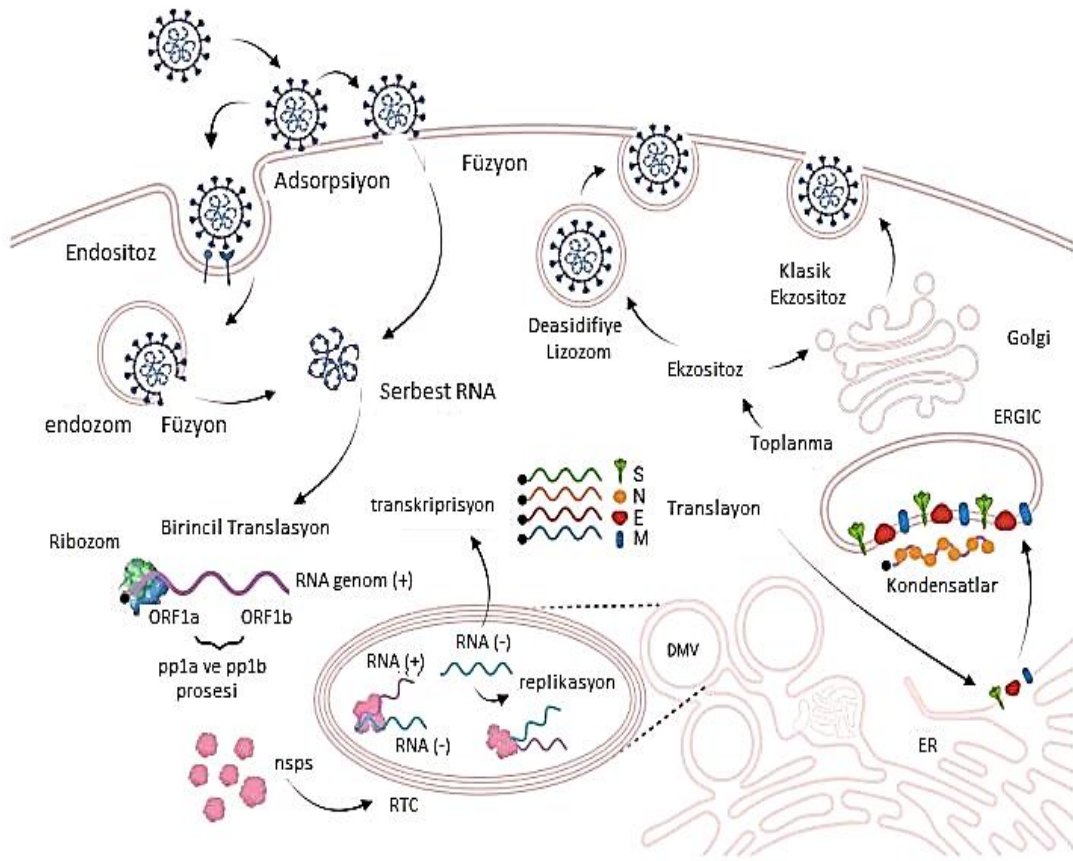
Virüsün konakçı hücreye girişinin ardından genetik materyal olan (+) ss RNA, sitoplazma ortamında serbest bırakılır. Serbest kalan RNA'daki iki büyük okuma çerçevesi olan, ORF1a ve ORF1b genleri hızlı bir şekilde pp1a ve pp1ab poliproteinlerine çevrilir (translasyon). Bu aşamada translasyonun gerçekleştirilip pp1a ve pp1ab poliproteinlerin sentezlenmesi için konakçı hücrenin ribozomu kullanılır. Oluşan pp1a ve pp1ab poliproteinleri viral proteazlar olan papain benzeri proteaz ve 3 kimotripsin benzeri proteaz tarafından daha sonra replikasyon transkripsiyon kompleksine (RTC) katılacak olan yapısal olmayan proteinlere dönüştürülür [25], [28], [41], [116]. 16 adet yapısal olmayan protein (nsp1-16) sentezlenirken, bunlardan 15'i RTC oluşumuna katılır. RTC RNA-

işleme, RNA-modifiye edici enzim ve RNA-okuma-düzeltilme işlevlerini yerine getiren kompleks bir yapıdır [115].

RTC'nin bazı aktiviteleri sonucu genomik RNA'lar ve bir dizi subgenomik RNA sentezlenir. Koruyucu çift membranlı keseciklerde (DMV), virüsten konakçı hücre sitoplazmasına salınan (+) ss RNA'nın RTC sayesinde replikasyonu gerçekleşir ve (-) ss RNA elde edilir. Elde edilen (-) ss RNA'nın transkripsiyonu sonucu bir dizi subgenomik RNA elde edilir. Subgenomik RNA'lar konakçı ribozomuna tutunur ve mRNA gibi görev yaparak translasyonla Endoplazmik Retikulum Golgi Ara Bölmesinde (ERGIC) yeni virionları oluşturmak üzere birleşecek olan yapısal ve aksesuar proteinlerine çevrilir [117]–[119].

DMV içerisinde (-) RNA tekrar replike edilir ve yeni oluşacak virionların genetik materyalini oluşturacak olan (+) RNA elde edilir. N proteini ERGIC'e geçmez, yeni oluşan (+) ss RNA'yı paketler. N proteini ve (+) ss RNA, M ve E proteini ile etkileşime girer. Yapısal proteinlerin yeni virionların oluşumu için ERGIC'te bir araya gelmesinde M proteini bir iskele görevi görür ve proteinlerin kendi aralarındaki etkileşimlerde önemli bir rol oynar. M proteini yeni virionların oluşumu için gerekli olan hemen hemen bütün protein-protein etkileşimlerini yönetir. Ancak yine de M proteini tek başına yeterli değildir ve sürece E proteini de dâhil olur [117]–[119]. Bir araya getirilen viral bileşenler, lipid zarflı olgun virionun oluşumu için golgi vezikülünde olgunlaşmaya tabi tutulur. Daha sonra, ekzositoz, tomurcuklanma veya hücre ölümü sonucu olgun virionlar serbest kalır [41], [120]. Serbest kalan virionlar kan dolaşımına katılarak viremi ve hematogen yayılmaya neden olurlar. Böylece SARS-CoV-2 konakçının akciğer, böbrek, kalp, çizgili kas, karaciğer ve endokrin bezleri gibi yüzeyinde ACE-2 reseptörü taşıyan diğer organ dokularını enfekte edebilir [121].

Şekil 2.8'de SARS-CoV-2'nin viral yaşam döngüsü gösterildi.



Şekil 2.8 SARS-CoV-2'nin viral yaşam döngüsü. RTC: Replikaz-transkriptaz kompleksi. ER: Endoplazmik retikulum. ERGIC: ER-Golgi ara bölümü [117]

Konakçı hücrenin SARS-CoV-2 ile enfekte olmasının ardından ilk olarak doğuştan gelen bağışıklık elemanları hareket geçer. Virüs akciğerde ilk olarak epitel hücrelere saldırır. Hava yolunda bulunan epitel hücreleri, dentrik hücreler ve alveolar makrofajlar doğuştan gelen bağışıklığın üç ana bileşeni olarak hizmet ederler. Makrofajlar ve dentrik hücreler adaptif bağışıklık oluşana kadar virüslere ve diğer patojenlere karşı savaşır [122]. Adaptif bağışıklıkta ise T hücre aracılı yanıt baskın bir rol oynar. B hücre aracılı immun yanıt da ise nötralize edici antikorlar üretilir. Bu antikorlar virüse karşı koruyucu bir rol oynar [123].

Bazı Kovid-19 hastalarında yüksek düzeyde kemokin ve interlökin gibi plazma proteinlerinin tespit edildiği bilinmektedir [123]. Hızlı gelişen viral replikasyonun ardından, konakçı tarafından düzensiz bir bağışıklık reaksiyonu başlatılabilir. Proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin immun efektör hücreleri tarafından salınmasıyla meydana gelen bu düzensiz sistemik inflamatuvar yanıt sitokin fırtınası olarak adlandırılır [124]. İlerleyen aşamalarda lökositlerin aktive olması,

B-lenfositlerin azalması ve proinflamatuvar sitokinlerin zincirleme olarak salınması epitel ve endotel hücre ölümüne neden olur böylece vasküler geçirgenlik artar, pulmoner yani akciğere ait inflamasyon, ödem, ARDS ve ani ölümle sonuçlanabilir [27]. Kovid-19'da görülen en yaygın tıbbi komplikasyon ARDS'dir. Hastalıkla ilişkili ölümlerde ARDS'nin yüksek payı vardır [125].

2.1.5 SARS-CoV-2'yi Teşhis Yöntemleri

Teşhis, enfekte bireylerin tespit edilmesini sağlar ve böylece enfeksiyonun önüne geçilebilmesi için gerekli önlemlerin alınması kolaylaşır. Hastalığın teşhis edilmesi ile hasta birey, ihtiyaç duyduğu bakımı alabilir ve hastalığın yayılması engellenir. Bir salgın hastalıkta enfekte olduğu tespit edilmeyen bireyler, salgının toplumda çok daha hızlı yayılmasına neden olabilirler [126].

Kovid-19 teşhisinde, genellikle burun çubuğu kullanılarak enfekte bireyden örnek alınır ve polimeraz zincir reaksiyonu testi (PCR) kullanılarak yapılır. Bununla birlikte, burun sürüntülerinin PCR testinin ihmal edilemeyecek düzeydeki yanlış test sonucu oranları nedeniyle daha sağlıklı bir teşhisin ortaya konabilmesi için, klinik, laboratuvar ve görüntüleme bulguları da kullanılması gereken yöntemlerdir [127].

2.1.5.1 Viral Test

PCR testi, SARS-CoV-2 nin nükleik asidinin kalitatif tespiti için kullanılır. Özel olarak geliştirilmiş bir çubuk yardımıyla, enfekte olabileceğine dair şüphe taşıyan bireyin, burun-boğaz sürüntülerinden, balgam, alt solunum yolu salgıları, dışkı ve kan numuneleri kullanılarak SARS-CoV-2'nin ribonükleik asitlerinin tespiti yapılabilir [128]. PCR testinin sonucunun pozitif çıkması çoğunlukla virüsün varlığını gösterir ve hastalığa ait klinik tablonun gözlemlenmesi ile de teşhis desteklenir [30].

PCR testinin özgüllüğü yüksek olmakla beraber testin hassasiyeti, virüse maruziyet zamanına göre değişebilir. Yapılan bir modelleme çalışması, testin duyarlılığını virüse maruziyetten 4 gün sonra %33, belirtilerin başlangıcında %62 ve belirtilerin başlangıcından 3 gün sonra % 80 olduğunu gösterir. Testin sonucunun yanlış çıkmasına katkıda bulunan faktörlerin; örnek toplama tekniğinin yetersiz olması, farklı örnek kaynaklarının olması ve maruziyetten itibaren geçen süre olduğu

düşünülür. PCR testinin duyarlılık oranı net değildir, ancak %66-80 civarında olduğu tahmin edilir [2], [127]. Kovid-19'un yüksek bulaşıcılığı nedeniyle, enfekte olan hastaların en kısa sürede teşhis edilmesi, izolasyona alınıp tedavi edilmesi için hızlı ve doğru tanı yöntemlerine acilen ihtiyaç duyulur, bunun da ölüm oranlarını ve insan popülasyonundaki kontaminasyon riskini azaltabilceği düşünülmektedir [129].

2.1.5.2 Laboratuvar Bulguları

PCR testinin sonucunun yüksek doğruluk oranına sahip olmaması başka destekleyici testleri de gerekli kılar. Laboratuvar bulgularının değerlendirilmesi bu destekleyici testlerden biridir.

Kovid-19 hastalarında aşağıdaki laboratuvar anormallikleri gözlemlenir:

Rutin kan testi: Beyaz kan hücresi sayısı genellikle normaldir veya azalmış lenfosit sayısı ile birlikte düşüktür,

C-reaktif protein: Enfekte bireylerde normal veya artış gösterir,

Prokalsitonin: Çoğu durumda normaldir,

Diğerleri: Şiddetli vakalarda karaciğer enzimlerinde, kas enzimlerinde ve miyoglobinde yükselme ve D-dimer düzeyinde artış görülebilir [26], [130].

2.1.5.3 Görüntüleme Testleri

Görüntüleme teknikleri de Kovid-19 hastalığının teşhisinde önemlidir. Örneğin PCR test sonucu 5-6 saat içinde elde edilebilirken, tomografi sonuçları bundan çok daha hızlı bir sürede elde edilebilir [129]. Görüntüleme testleri sonucunda elde edilen bulgular Kovid-19 hastalığına özgü değildir ancak uyumlu bir klinik tablo ve/veya bir temas durumunda tanıya yardımcı olabilirler. Görüntüleme testleri için röntgen, pulmonar ultrasonografi ve tomografi gibi görüntüleme teknikleri kullanılabilir. Bilgisayarlı tomografi, göğüs röntgenine göre daha hassastır. Ayrıca pulmoner ultrasonografi de iyi bir hassasiyete sahiptir [131].

2.1.5.4 Serolojik Testler

Serolojik çalışmalardan elde edilen veriler, PCR testlerin sonuçlarının desteklenmesinde büyük ölçüde yardımcı olur [132]. Mevcut kullanımda olan birçok serolojik kit, SARS-CoV-2 'ye karşı antikörlerin tespitini yapmak üzere kullanılmak için Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi tarafından acil

kullanım lisansı almıştır. Bu tür testler, IgG veya IgG ve IgM gibi antikorların test edilmesinde genellikle ELISA, kemilüminesans ve immünokromatografi gibi yöntemlerin prensiplerine dayanır [133].

Serolojik test, viral test mevcut olmadığında faydalıdır. Klinik tablonun da dikkate alınması testin güvenilirliğini artırır. Ayrıca serolojik test viral testten daha hızlı sonuç verir. Virüs yayılımının azaldığı bazı hastalarda PCR test sonuçları yanlış çıkabilir, bu durumda serolojik testin kullanılması önem arz edebilir [30]. Bazı önemli yararlarının yanı sıra serolojik testlerin önemli kısıtlamaları da mevcuttur.

Serolojik testler virüse karşı vücudun ürettiği antikorların tespitine dayandığı için, asemptomik, hastalığın erken evresinde olan veya yeterli semptom göstermeyen hastalar yeterli antikor üretemeyebilirler. Bu durumda birey enfekte olsa bile serolojik testin sonucu negatif çıkabilir [134].

Serolojik testlerin özgüllüğünü ve duyarlılığını çapraz reaktivite ciddi bir şekilde etkileyebilir. SARS-CoV-2'ye filogenetik olarak oldukça yakın olan SARS-CoV un ve diğer endemik insan koronavirüslerinin insan popülasyonunda bulunması ihtimali, Kovid-19 hastalarının doğru şekilde teşhis edilmesinde sorun oluşturabilir [132].

2.2 Sars-Cov-2'ye Karşı Geliştirilmekte Olan Aşılar

Dünyada SARS-CoV-2'ye karşı 196'sı prelinik, 153'ü klinik olmak üzere toplamda 349 aşı adayı bulunur [6]. Ayrıca, Daha önce lisanslı bir aşıda kullanılmayan farklı teknolojiler de araştırmaların kapsamı içindedir. Bir bütün olarak virüse veya virüsün alt birimlerine dayanan ve şu an geliştirilmekte olan en az 8 tip aşı türü vardır.

Geliştirilmekte olan aşı türleri, sayısal dağılımı ve bu sayısal dağılımı içindeki yüzde değerleri Tablo 2.1'de gösterildi.

Tablo 2.1 Geliştirilmekte olan aşıların türleri, sayısal dağılımı ve bu dağılım içindeki yüzde değerleri [6]

Aşı Türleri	Sayısal Dağılımı	Yüzde Değerleri
Protein subunit	51	34%
Viral Vektör (non-replike)	21	14%
DNA	16	11%
İnaktif Virüs	21	14%
RNA	28	18%
Viral Vektör (replike)	4	3%
Virüs Benzeri Partikül	6	4%
Canlı (Zayıflatılmış) Virüs	2	1%
Diğerleri	2	1%

2.2.1 SARS-CoV-2'ye Karşı Geliştirilen Aşılar Ve Bu Aşıların Avantaj Ve Dezavantajları

2.2.1.1 Virüs Aşıları

Virüs aşıları, geleneksel olarak canlı-zayıflatılmış ve inaktif (ölü) aşılar olmak üzere iki şekilde hazırlanır.

Canlı-zayıflatılmış Aşılar: Canlı-zayıflatılmış aşılar bazı viral hastalıklara karşı oldukça etkili bir aşı türüdür. Su çiçeğinin eradike edilmesi, çocuk felci ve kızamığın önemli ölçüde kontrol altına alınması bu aşı türünün başarısını göstermesi açısından önemlidir [135]. Canlı-zayıflatılmış aşılar farklı hücre kültürlerinde pasajlanarak adaptasyonu sağlanır ve daha az virülan hale getirilir. Bu zayıflatılmış organizma insan hücrelerini enfekte edebilir, ancak bu enfeksiyon hafif seyreder ve doğadaki vahşi virüse karşı bağışıklık üretir [136]. Canlı-zayıflatılmış aşidaki mikroorganizma doğal enfeksiyon oluşturan haline en yakın durumdadır.

İnaktif (Ölü) Aşılar: İnaktif aşılar hastalık etkeni olan organizma, tamamen etkisiz hale getirilir ancak yine de bağışıklık sistemini uyarabilir. Enfeksiyöz olmayan bu tür aşılar güvenlidir ama bağışık yanıtı oluşturmak için büyük miktarlarda enjekte edilmeleri gerekir [137]. İnaktif aşılar, organizmanın bulaşıcılığını ve replikasyon yeteneğini etkisiz hale getiren kimyasal veya fiziksel ajanlar kullanılarak elde edilir [136]. İnaktivasyon sırasında kritik olan nokta, antijenin üzerindeki epitop yapısının korunmasıdır. Isı ile inaktivasyon genellikle istenildiği gibi sonuçlanmaz. Formaldehit veya formalin ile yapılan kimyasal inaktivasyon işlemleri daha başarılıdır. Grip aşısı ilk inaktive virüs aşısıdır. İnaktive edilmiş aşılar etkisiz hale getirilmiş patojenler içerse bile bazı riskler barındırabilir [138].

Tablo 2.2’de canlı-zayıflatılmış aşıların ve inaktif aşıların avantaj ve dezavantajları verildi.

Tablo 2.2 Canlı ve inaktif aşıların avantaj ve dezavantajları [139], [140]

Kriter	Canlı (zayıflatılmış) aşı	İnaktive aşı
Tekli dozlarda	Güçlü bağışıklık sağlar	Zayıf bağışıklık sağlar
Bağışıklık süresi	Uzun	Kısa
Adjuvan kullanımı	Gerekmez	Gerekir
Aşı güvenliği	Değişiklik gösterir	Genellikle güvenlidir.
Potansiyel kontamasyon	Mümkün	Düşük ihtimal
Stabilite ve saklanması	Düşük ve zor	Yüksek ve kolay
Aşı maliyeti	Daha az	Aşı maliyeti
Aşı suşunun patojene dönüşümü	Mümkün	Aşı suşunun patojene dönüşümü

2.2.2 Nükleik Asit Aşıları

Nükleik asit aşıları ile bağışıklama sağlamak için genetik materyal olarak plazmit DNA veya mRNA kullanılır. Kullanılan genetik materyal istenen antijenin konakçı

hücrede eksprese edilmesini sağlar ve eksprese edilen antijene karşı immün tepki oluşur [141]. Nükleik asit temelli aşılarda bağışıklık sistemini uyarma konusunda kısmen canlı-zayıflatılmış aşılarda benzerlik gösterir. Ancak bu aşılama sisteminde, ilgili antijeni taklit eden viral proteinlerin konakçı hücrede üretilmesi sağlanır [142].

2.2.2.1 DNA Aşıları

Plazmid DNA'nın koruyucu bağışıklık tepkileri oluşturma yeteneğinin deneysel olarak ispatlanmasından sonraki yıllarda DNA aşılarının, çeşitli bulaşıcı, otoimmün hastalıklara, alerji ve kansere karşı kullanılmak üzere klinik denemeleri vardır [143]. Bu aşı türünde istenilen antijenik kısımların kodlarını taşıyan DNA plazmidi bazı teknikler kullanılarak konakçı hücreye verilir. Daha sonra bu antijenik kısımların konakçı tarafından eksprese edilip üretilmesi sağlanır. Böylece üretilen antijenlere karşı bağışıklık yanıt oluşturulur [144].

Tablo 2.3'te DNA aşılarının avantaj ve dezavantajları verildi.

Tablo 2.3 DNA aşılarının avantaj ve dezavantajları [145]–[148]

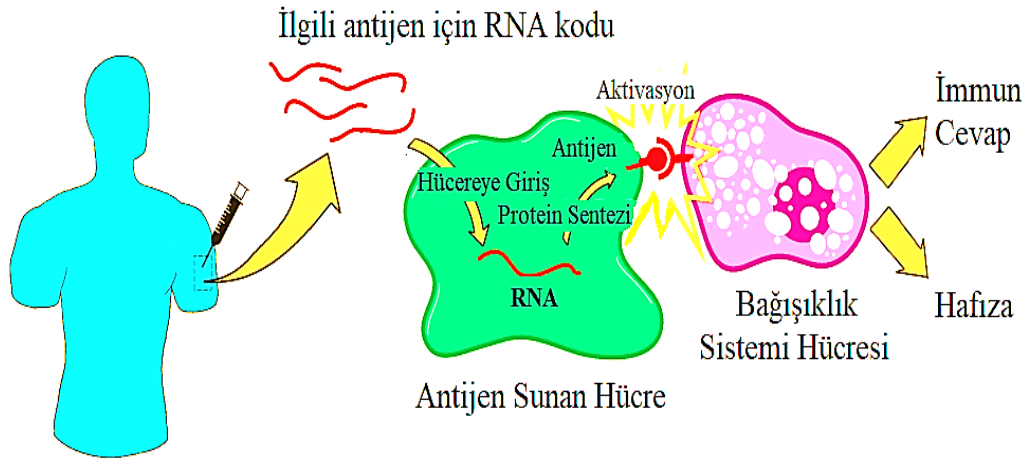
Avantajları	Dezavantajları
Hem MHC sınıf I hem de sınıf II moleküller tarafından antijen sunumu yapılır	DNA aşıları nispeten zayıf bir immünojeniteye sahiptir. Verilen plazmid DNA'ya karşı antikor üretimi başlayabilir
Bağışıklık yanıtın sadece ilgili antijene odaklanabilmesi söz konusudur	Konakçı içinde eksprese edilen antijenler yüzünden immünolojik tolerans gelişebilir
Ucuz, ısıya dayanıklı ve üretimleri kolaydır. Depolama ve nakliye işlemlerinde aşı stabilitesini korur	Protein immünojenleriyle sınırlıdır (bakteriyel polisakkaritler gibi protein bazlı olmayan antijenler için kullanılamaz)
Hem koruyucu hem de hücreyel bağışıklığı harekete geçirebilir	Konakçı genom içine yabancı DNA eklenmesi hücrelerin kanserleşmesine neden olabilir

DNA aşıları ümit verici bazı özelliklere sahip olmasına rağmen, genel olarak, bağışıklık sistemini uyarma konusunda diğer aşı türlerinden daha zayıftırlar [144].

2.2.2.2 RNA Aşıları

RNA Aşıları: Normalde hücrelerimiz protein sentezi için DNA yı kalıp olarak kullanır ve mRNA sentezlenir. Daha sonra sentezlenen bu mRNA translate edilir ve böylece hedef proteinin sentezi yapılmış olur. Bir RNA aşısı, hastalığa özgü antijeni kodlayan bir mRNA ipliğinden oluşur. mRNA vücuda enjekte edilip hücre içine girdiğinde tıpkı doğal mRNA mekanizmasında olduğu gibi süreç, hedef antijenin sentezi ile sonuçlanır [149].

RNA aşı teknolojisine ait genel mekanizma Şekil 2.9'da verildi.



Şekil 2.9 RNA aşı teknolojisi [150]

Aşı olarak iki ana RNA türü incelenir. Bunlar, kopyalanamayan (non-replicating) mRNA ve viral olarak türetilmiş, kendi kendini çoğaltan (self-amplifying) RNA'dır. Kodlanamayan mRNA bazlı aşılar sadece ilgili antijeni kodlayan ve 5 've 3' UTR'leri içerirken, kendi kendini çoğaltan RNA'lar sadece antijeni değil, aynı zamanda hücre içi RNA amplifikasyonu ve yüksek protein ekspresyonunu mümkün kılan viral replikasyon mekanizmasını da kodlayan genetik bölgeyi içerir [151].

RNA aşılarının avantaj ve dezavantajları Tablo 2.4'te verildi.

Tablo 2. 4 RNA aşılarının avantaj ve dezavantajları [150], [152]–[156]

Avantajları	Dezavantajları
RNA konakçı genomu ile bütünleşemez ve bu nedenle onkojenik potansiyeli yoktur ve DNA aşılarına göre daha güvenlidirler	Vücuda verilen genetik materyal (mRNA) doğal bağışıklık sistemini güçlü bir şekilde uyarması sonucu tip 1 interferon (IFN) üretimi başlar. Tip 1 IFN, konakçı üzerinde ateş veya grip benzeri belirtilerin oluşması gibi istenmeyen etkilere sahip olabilir
Viral vektör sistemlerine nazaran RNA yaklaşımı daha uzun bir yarı ömre, daha uzun ekspresyon süresine ve daha basit formülasyonlara sahiptir	Proses karakterizasyonu, mRNA aşıları için önemli bir sorundur ve son ürünün oluşum aşamasında RNA dizisinin uzunluğu, kompozisyonu ve kimyasında bazı zorluklar yaşanabilir
Basittirler, doğrudan sitoplazmaya verilebilir ve ekspresyon oluşturmak için nükleer lokalizasyon gerektirmezler, üretimleri hızlıdır	Serbest ekstraselüler mRNA toksik olma riski taşır ve mRNA aşılarının otoimmün hastalık oluşturma riski bulunur. Ayrıca Kovid-19 salgınından önce mRNA aşılarının onaylanmış bir insan kullanımı olmadığı için uzun vadede ne tür etki göstereceği kestirilemez

2.2.3 Viral Vektör Aşılar

Viral vektör aşılarında bir çok farklı virüs ailesinden bazı virüslerin vektör olarak kullanılmasıyla çeşitli yeni viral vektörler oluşturulur. Bu viral vektörler hem beşeri tıpta hemde veterinerlikte aşı uygulamaları için kullanılır. Ancak viral vektör aşılarının insan uygulamaları veterinerlikteki uygulamaları kadar başarılı değildir [157]. Viral vektör aşılarında, hedef patojene karşı üretilmek istenen antijeni kodlayan genetik material, vektör olarak kullanılan virüs içinde vücuda verilir. Örneğin adenovirüs gibi bir virüs, vücutta koronavirüs proteinleri üretebilmesi için genetik olarak tasarlanır. Bu virüsler zayıflatılmış oldukları için hastalığa neden olamazlar [158]. Bu teknolojiye kullanılan virüsler hücre içinde replike olabilen (replicating) ve replike olamayan (non-replicating) olmak üzere ikiye ayrılırlar.

Tablo 2.5'te viral vektör aşılarının avantaj ve dezavantajları verildi.

Tablo 2.5 Viral vektör aşıların avantaj ve dezavantajları [159], [160]

Avantajları	Dezavantajları
Hem humoral hem de hücrel bağışıklığı uyarabilir ve bir çok hastalığa karşı potansiyel kullanımları mevcuttur	Konakçıda viral vektöre karşı üretilen antikorlar kullanılan aşının verimliliğini düşürebilir.
Viral vektör aşılar ilave adjuvanlar olmadan verilebilir.	Üretimleri için farklı hücrel sistemler gerekir.
Büyük miktarda üretilebilir olmaları pandemi salgınlarına karşı avantaj sağlar.	Vektör taşımış olduğu genetik materyalin konakçı genom ile bütünleşmesi sonucu çeşitli hastalıklara yol açma riski vardır.
Fiziksel olarak kararlıdır ve soğuk depolama gerektirmezler.	Zamanla rekombinasyon, virülansa geri dönüş ve bunun sonucunda da patogeneze riski taşıyabilirler.
Bağışıklık sistemini güçlü bir şekilde uyarabilirler	Üretimleri oldukça karmaşık ve nispeten maliyetli bir işlemdir.
Hedef antijenin birebir taklit edilmesini sağlarlar	Genetik olarak modifiye edilmiş organizmalardır, bu nedenle bu organizmaların kullanımı insan sağlığı ve çevre için potansiyel riskler taşır.

2.2.4 Protein Temelli Aşılar

Protein alt birim aşıları (Sentetik peptid aşıları): Sentetik peptid aşılarında bir bütün olarak patojen yerine o patojenin bağışıklık sistemini uyaran antijen bölgesinin ilgili epitop bölgesi kullanılır [7]. Sentetik peptid aşıları enfeksiyon ve/veya kronik hastalığa neden olan mikroorganizmanın 20-30 aminoasitlik spesifik epitop bölgesinin aşı olarak kullanılmak üzere laboratuvar koşullarında uygun bir yöntemle peptid dizisi olarak sentezlenmesidir [161].

Peptid aşılar, hem üretimde hem de uygulamada güvenli oldukları, kullanımı, depolanması ve nakliyesi kolay oldukları için ideal aşı tipidirler. Bu aşılar, alt birim veya tam protein aşılarına kıyasla ucuzdur [162], [163]. Ayrıca, sentetik peptid aşıların önemli bir avantajı, kimyasal olarak tanımlanmış olmaları ve bulaşıcı

materyal içermemeleri ve dolayısıyla biyolojik tehlike faktörü olarak herhangi bir risk içermemeleridir. Yüksek miktarlarda kolaylıkla üretilebilirler [164], [165].

Tablo 2.6’da sentetik peptid aşılarının avantaj ve dezavantajları verildi.

Tablo 2.6 Sentetik peptid aşılarda avantaj ve dezavantajları [7], [163], [166]–[168]

Avantajları	Dezavantajları
Biyolojik kontaminasyon içermez, üretimleri basit ve maliyetleri de uygundur	Peptidler zayıf immunojenlerdir
Peptidlerin kimyasal olarak sentezlenebilmesi, antijenlerin biyolojik kontaminasyonu ile ilgili tüm sorunları ortadan kaldırır	Doğal konformasyonlarını kaybedebilirler
Bu aşılarda tipik olarak suda çözünür, basit depolama koşullarında kararlıdır, dondurularak kurutulabilir ve stabiliteleri kolayca değerlendirilebilir	Enzimatik bozunmalara karşı hassastırlar
Peptitler çok spesifik hedefler için özelleştirilebilir. Çoklu epitop yaklaşımının kullanılmasıyla, tek bir peptid temelli aşı, birkaç suşu, farklı yaşam döngüsünün aşamalarını ve hatta farklı patojenleri hedefleyecek şekilde tasarlanabilir	Ek olarak bağışıklık uyarıcılara (adjuvanlar) veya taşıyıcı sistemlere ihtiyaç vardır
Peptit antijenlerinin, gereksiz unsurları barındırmaması nedeniyle alerjik veya otoimmün tepkilere neden olma olasılığı düşüktür ve herhangi bir hastalık sınırlaması yoktur	Kalıtsal çeşitliliğin fazla olduğu populasyonlar tarafından aynı derecede bağışıklık uyarısı oluşturamazlar

Virüs Benzeri Parçacıklar: Virüs benzeri parçacıklar (VLP'ler), yapı ve şekil açısından doğal virüslere benzeyen ancak viral genom içermeyen multiprotein yapılardır [169]–[171]. VLP'lerin yüzeyindeki epitopların yüksek yoğunluğu, antijen sunan hücreler tarafından tanınabilir ve bağışıklık sistemine sunulabilir, böylece orijinal patojenlerin yaptığı gibi humoral ve hücreli bağışıklığı etkin bir şekilde uyarır [172]. Birçok VLP virüsü DNA veya RNA içermediği için virulent özelliklere geri dönme, replikasyon, rekombinasyon ve yeniden çeşitlenme (karışık enfeksiyonda iki ayrı virüsün genomlarından melez virüs oluşumu) gibi

dezavantajlar olmadan, inaktive edilmiş ve zayıflatılmış virüs aşılarında görülen viral kapsid proteinlerinin orijinal konformasyonuna sahiptir [171], [173], [174]. VLP'ler, virüs parçacıklarının yapısını taklit ettiklerinden dolayı düşük dozlarda antijen, bağışıklık sisteminde koruyucu bir tepki ortaya çıkarmak için yeterlidir. B hücreleri aracılığıyla bağışıklık cevabını uyarma yeteneklerine ek olarak, VLP'ler sitotoksik T lenfosit tepkilerini uyarmada da oldukça etkilidir [171]. VLP'ler de doğal virüslere benzer şekilde zarfsız veya zarflı olabilir ve farklı yapılarda üretilir. VLP'ler, güvenlikleri, basitlikleri ve hem humoral hem de hücreli immün yanıtları indüklemek için uygun immünolojik özelliklere sahip olmaları nedeniyle bulaşıcı patojenlere karşı geleneksel aşılar bir alternatif olarak geliştirilen aşılar [170].

VLP'lerin avantaj ve dezavantajları Tablo 2.7'de verildi.

Tablo 2.7 VLP'lerin avantaj ve dezavantajları [161], [170], [171], [175]

Avantajları	Dezavantajları
VLP'ler, viral antijenleri doğal yapılarına benzer şekilde sunabildikleri için bağışıklığı güçlü bir şekilde uyandırabilir	Kararlılığı düşüktür ve maliyeti yüksektir
Birçok VLP virüsü DNA veya RNA içermediği için virulent özelliklere geri dönme ihtimali oldukça düşüktür	Bazı bireylerin yapısı taklit edilen virüse karşı önceden bağışıklık geliştirmiş olabilir
Hem üretim hem de uygulama sırasında viral genomik materyali olmadığı için güvenlidirler	Klinik öncesi hayvan modelleri yoktur

2.3 Nanopartiküller

Nanoteknoloji, 1974 yılından beri hızla gelişen, sağlık, tarım, kozmetik vb. birçok alanda ilgi gören ve 1-1000 nm arasındaki boyutlarda yeni malzemelerin oluşturulmasına dayanan önemli bir teknolojidir [176]. Nanoteknolojinin temel bileşenini nanopartiküller oluşturur. Nanopartiküller, karbon, metal, metal oksitler veya organik maddelerden oluşur. Nanopartiküller, daha yüksek boyutlardaki partiküllere nazaran nano seviyede benzersiz fiziksel, kimyasal ve

biyolojik özellikler sergiler [177]. Nanopartiküller, uzun süreli biyolojik aktivite göstermesi, sağlık alanındaki kullanımlarında in vivo ortamlarda bozunmaya karşı hedef molekölü koruması, kontrollü ilaç salımına izin vermesi ve gelişmiş bir biyoyararlanım kapasitesine sahip olması gibi benzersiz bazı fizikokimyasal özelliklere sahiptir [178]. Bu üstün özelliklerin yanı sıra, sağlık alanındaki kullanımlarında nanopartiküller, hedef molekölün fiziksel-kimyasal özelliklerini değiştirmek, çözünürlüğünü arttırmak, eliminasyon süresini azaltmak ve böbreklerden atılımını iyileştirmek gibi hedefler için de tasarlanabilir [179]. Nanotıp alanında kullanılan nanopartiküller, in vivo olarak aşı ve ilaç dağıtımı için umut verici taşıyıcı adaylarıdır. Nanopartiküllerin, dendritik hücreler tarafından verimli bir şekilde hücre içine alındığı, hücrel ve humoral bağışıklığı harekete geçirebilir [180].

Nanopartiköl boyutu için farklı organizasyonlar tarafından önerilen üst limitler Tablo 2.8’de gösterildi.

Tablo 2.8 Nanopartiköl boyutu için farklı organizasyonlar tarafından önerilen üst limitler [181]

Boyut Üst Limiti (nm)	Referans Organizasyon
100	ISO, ASTM Int., Royal Society, SCENIHR, Sci. Cmt. on Consumer Products, ETC Group, Swiss Re
200	Soil Association, Defra
300	Chatham House, Friends of Earth
500	Swiss Federal Office of Public Health
1000	House of Lords Science Committee

2.3.1 Nanopartiküllerin Sınıflandırılması

2.3.1.1 İnorganik Nanopartiküller

İnorganik nanopartiküller, teşhis ve görüntülme için geniş çaplı bir kullanıma sahiptir. İnorganik nanopartiküller elektririk, kimyasal ve manyetik olarak bir takım benzersiz özelliklere sahiptir [182].

Metalik Nanopartiküller: Mühendislik alanında ve biyomedikal bilimlerde yoğun bir kullanım alanı vardır. Günümüzde metalik nanopartiküller; ligandlar, antikolar ve hedef moleküllerle konjuge edilmek için çeşitli kimyasal fonksiyonel gruplarla sentezlenebilir ve modifiye edilebilir. Bu şekilde oluşturulan bu yapılar; biyoteknoloji, manyetik ayırma, ilaç ve gen hedefleme gibi geniş bir potansiyel kullanım alanına sahiptir [183], [184].

Silika Nanopartiküller: Silika nanopartiküller nanoyapıların tasarlanması ve geliştirilmesinde çeşitli uygulama alanlarına sahip olabilir. Silika nanopartiküller, polimer endüstrisinde, biyomeleküllerin adsorpsiyonu ve biyo-görüntüleme gibi biyonanoteknolojide ve çeşitli araştırmalarda yaygın olarak kullanılır. Üretiminin kolay ve ucuz olmasının yanı sıra, partikül boyutunun kontrol edilebilmesi, biyoyumluluk ve yüksek derecede aktif bir yüzeye sahip olması gibi önemli özelliklere sahiptir [185].

Quantum Noktaları: Quantum noktaları eşsiz elektronik ve optik özelliklere sahip, elektronik ve biyomedikal uygulamalar için yüksek bir potansiyel sunan, yarı iletken tabanlı inorganik nanomalzemelerdir [186]. Quantum noktaları 2-8 nm çapında, II – VI veya III – V grup elementlerin atomlarından oluşurlar. Yüksek parlaklık, uzun ömürlü, geniş ve sürekli absorpsiyon spektrumları, dar emisyon spektrumları ve yüksek floresan kuantum verimi gibi benzersiz özgün özellikleri nedeniyle, biyoanalizler için yaygın bir şekilde kullanılır [187], [188].

Karbon Nano Tüpler: Karbon nanotüpler basit konfigürasyonlu silindirik grafen tabakalardır [189]. Karbon nanotüplerinin ana uygulama alanı mikroelektronik cihaz teknolojisi. Ancak, benzersiz fiziksel ve elektronik özellikleri, hücre zarı boyunca kolay yer değiştirme ve düşük toksisiteye sahip olması karbon nanotüplerin biyomedikal alanda kullanımı için de bazı avantajlar sağlar [190].

Manyetik Nanopartiküller: Manyetik nanopartiküller, doğada ve birçok biyolojik nesnede bol miktarda bulunur [191]. Bu tür nanopartiküller manyetik alan kullanılarak manipüle edilebilir. Manyetik materyal olarak adlandırılan demir, nikel ve kobalt gibi bir mazleme ve biyokatalitik veya biyotanıma gibi işlevsel bir özelliğe sahip kimyasal bir yapı olmak üzere iki bileşenden meydana gelirler [192]. Manyetik nanopartiküller bilgi kayıt ve depolama sistemlerinde, manyetik soğutma sistemlerinde, biyokatalitik, biyoanalitik ve diğer bazı biyomedikal uygulamalar için kullanılabilir [191], [192].

2.3.1.2 Organik Nanopartiküller

Organik nanopartiküller, çapları 10 nm-1 μ m arasında değişen, organik bileşiklerden (esas olarak lipitler ve polimerler) oluşan katı partiküllerdir. inorganik nanopartiküllere yönelik önemli araştırmaların ve ticari yatırımların yapılmasına nazaran organik nanopartiküller daha az ilgi görmüşlerdir. Ancak potansiyel kullanım alanları açısından değerlendirildiğinde organik nanopartiküllerin gittikçe daha fazla önem kazandığı görülür. Nanotıp alanındaki bazı gelişmeler sonucunda ilaç sektörü açısından organik nanopartiküllerin araştırılması oldukça önemlidir [193]. Organik nanopartiküller malzeme ve yaşam bilimlerinde oldukça ilgi çekici bir alandır. Katalik arayüzler olarak DNA veya antikorlar gibi biyolojik yapılarla işlevselleştirildikten sonra, molekül tanıma, sinyal iletimi, biyoanaliz, sensör uygulamaları, ilaç dağıtım ve taşıyıcı sistemleri olarak potansiyel kullanım alanlarına sahip olabilirler [194].

Organik nanopartiküller, polimerik ve lipid bazlı nanopartikülleri içerir [195].

Lipid Bazlı Nanopartiküller: Organik nanopartikül sınıfına giren lipid bazlı nanopartiküller, hidrofobik ve hidrofilik molekülleri taşıyabilen, çok düşük toksisite gösteren, vücut içinde uzun atılım süresine sahip olan nanopartiküllerdir [196]. Lipid bazlı taşıyıcılar ilaçların bozunmasını önlemek, ilacın etki edeceği alanı hedeflemek ve taşınan molekülün toksisite ve yan etkilerini azaltmak gibi bazı önemli avantajlara sahiptir. Bunun yanında bu taşıyıcılar, düşük enkapsülleme verimliliği, kan bileşenlerin varlığında taşınan molekülün hidrofilik özelliğe sahip olduğunda taşıyıcıdan ortama sızması ve zayıf depolama kararlılığı

gibi bazı dezavantajlara sahiptir [197]. Lipozomlar ve emülsiyonlar lipid bazlı nanopartikül taşıyıcılara örnek verilebilir.

Lipozomlar, hücre membranına benzer şekilde çift katmanlı fosfolipid yapısından meydana gelir. Farklı özellikteki ilaç türlerinin çoklu kapsüllenmesine izin veren lipozomlar, hidrofobik ve hidrofilik özellik gösterebildikleri için oldukça verimli taşıyıcı sistemlerdir. Yüksek biyouyumluluğa sahip olmalarının yanısıra lipid seçimine ve hazırlanma yöntemine bağlı olarak fizikokimyasal özellikleri de kontrol edilebilir [198].

Dağıtım sistemi olarak kullanılan farklı emülsiyon bazlı nanopartikül türleri bulunur. Emülsiyonlar genel olarak sulu ortamda dağılmış lipid damlacıklarından oluşur. Eğer taşınacak hedef molekül lipofilik aktif bir bileşense, bu molekül lipid damlacıklarının hidrofobik olan merkez kısmında toplanır. Lipid merkezinin/çekirdeğinin durumuna bağlı olarak nanoemülsiyonlar ve katı lipid nanoparçacıklar oluşturabilir [199].

Polimer Bazlı Nanopartiküller: Polimerik nanopartiküller, boyutları 10-1000 nm arasında değişen, iyi bir çözünürlüğe ve stabiliteye sahip, güvenli, uzun süreli ilaç salımı için uygun ve toksik etki göstermeyen partiküllerdir. Taşıma sistemleri olarak kullanımında bir çok avantaja sahip olan polimerik nanopartiküller hedef molekülü vücut içinde biyodegradasyondan korur ve molekülün vücut içindeki dolaşım süresini arttırır. Polimerik nanopartiküller, adjuvan olarak kullanılıp immun cevabı arttırabilirler [200], [201]. Polimerik nanopartiküllerin üretiminde doğal polimerler (proteinler, polisakkaritler vb.) ve sentetik polimerler (poliakrilamid, polimetilmetakrilat vb.) kullanılır [202]. Hazırlanma metoduna göre polimerik nanopartiküller nanokapsüller ve nanoküreler olmak üzere iki kategoriye ayrılırlar. İlki, polimerik bir kabuğa ve bir iç çekirdeğe sahip veziküler sistemlerdir. İkincisi, polimerik bir matristen oluşur [203].

Bu çalışma kapsamında taşıyıcı sistemi olarak bir kopolimer olan PLGA dan elde edilen nanoküresel yapılar kullanıldı.

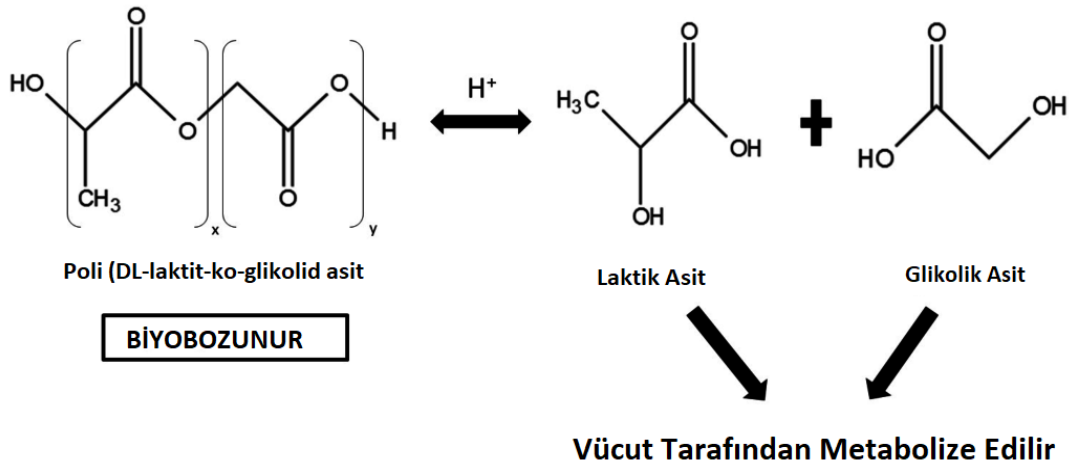
PLGA ve türevleri, yapısında laktik asit ve glikolik asitin farklı oranlarda bulunduğu alifatik bir polyesterdir [16]. Polimer PLA'nın enantiyomerik formları, poli D-laktik asit (PDLA) ve poli L-laktik asittir (PLLA). PLGA kısaltması genellikle

D- ve L- laktik asit formlarının eşit oranda olduğu poli D, L-laktik-koglikolik asit için kullanılır [204].

PLGA, biyolojik olarak parçalanabilir, biyouyumlu ve vücut içinde toksik etki göstermeyen bir polimerdir [17], [18], [205]. PLGA polimerlerinin farklı kullanım alanları mevcuttur. Bu kopolimerler, ameliyat ipliklerinin yapımı, kemik yapı malzemesi olarak ve kontrollü ilaç salım çalışmaları olmak üzere farklı biyomedikal uygulamalara sahiptir. PLGA'nın insanlarda damar yolu ile kullanımı USFDA tarafından onaylandığı bilinmektedir [16], [206].

PLGA'nın monomerleri olan laktik asit ve glikolik asit vücutta metabolize edilebilir [207]. PLGA kopolimerinden oluşan polimerik matrise, suyun nüfuz etmesiyle polimer boyunca ester bağları hidrolize uğrar ve polimer monomerlerine ayrışır. Böylece polimer erozyonla bozunmaya uğramış olur. Bu bozunma işlemi boyunca polimerik matrisin gözenekliliği artar ve böylece taşınan molekülün sürekli salımı gerçekleşir [16]. PLGA'dan elde edilen nano ve mikro ölçekteki partiküllerden, proteinler, DNA ve bazı farmakolojik ajanların sürekli salımına izin veren sistemlerin tasarlanması üzerine kapsamlı çalışmalar mevcuttur [208].

PLGA'nın monomerleri Şekil 2.10'da gösterildi.



Şekil 2.10 PLGA'nın monomerleri [209]

PLGA, aşı olarak kullanılacak hedef molekülün vücut içindeki kontrollü salımını gerçekleştirecek sistemlerinin hazırlanmasında kullanılan önemli biyopimerlerden biridir [210], [211]. Peptidler, proteinler ve diğer makromolekülleri içeren PLGA

mikro/nano partiküllerinin, hayvan deneylerinde uzun süreli immünolojik yanıtlar sağladığı rapor edilmiştir [212]. Aşı sistemlerinin hazırlamasında PLGA kullanımı, antijenlerin güvenli bir şekilde kapsüllenmesini sağlayarak *in-vivo* ortamda bozunmasını biyolojik olarak engeller. Ayrıca PLGA, adjuvan gibi görev yaparak antijenin tek başına bağışıklık sisteminde oluşturacağı cevaptan çok daha fazlasının oluşturulmasına yardımcı olur [213], [214].

2.3.2 Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Mühendislik alanında yaşanan yeni gelişmeler nano malzemelerin sentezlenmesine duyulan ilgiyi arttırmıştır. Bir malzeme için nano boyutlara inildiğinde malzeme, optik, manyetik, termal, mekanik ve kimyasal olarak çok farklı ve benzersiz özellikler gösterebilir. Bu durum nano yapıdaki sistemleri bazı uygulamalar için cazip hale getirir [215]. Nanopartiküller proteinler, polisakkaritler ve sentetik polimerler gibi bazı malzemelerden hazırlanabilir. Polimerik nanopartikülün hazırlanmasında taşıyıcı malzemenin seçimi şu parametrelere bağlıdır;

- Hedef nanopartiküllerin boyutu,
- Hedef molekülün suda çözünürlük ve stabilite gibi özellikleri,
- Nanopartikülün yüzey yükü ve geçirgenliği, nanopartikülün biyodegradasyona uğrayıp uğramayacağı, taşıyıcı malzemenin biyouyumluluğu ve toksisite derecesi [216].

Moleküler ağırlık, PLGA'nın içeriği, PLGA/ilaç oranı ve çözücü seçimi ile nanopartikülün özellikleri kontrol edilebilir [217]. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında 2 temel yaklaşım bulunur. Bunlar;

- Birincisi önceden hazırlanmış polimerlerin dispersiyonu ile nanopartiküllerin hazırlanması,
- İkincisi ise monomerlerin polimerizasyonu ile nanopartiküllerin hazırlanması yöntemidir [200], [218].

Polimer dispersiyonu ile nanopartiküllerin hazırlanmasında, çözücü buharlaşması, nanoçöktürme, emülsifikasyon/çözücü difüzyonu, tuzsuzlaştırma (salting out), diyaliz ve süper kritik akışkan teknolojisi gibi yöntemler kullanılır. Monomerlerin polimerizasyonundan nanopartikül hazırlama yöntemi olarak, emülsiyon, mini

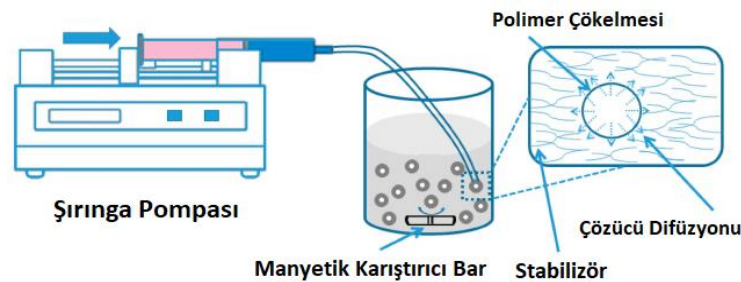
emülsiyon, mikro emülsiyon, arayüzey polimerizasyonu, kontrollü radikal polimerizasyonu gibi yöntemler kullanılır [219], [220].

Bu çalışmada kullanılan ve önceden hazırlanmış polimer dispersiyonu yaklaşımına dayanan tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi detaylı bir şekilde anlatılacak olup, aynı yaklaşıma dayanan diğer nanopartikül hazırlama yöntemlerinden de kısaca bahsedildi.

2.3.2.1 Nanopresipitasyon Yöntemi

Nanopresipitasyon yöntemi basit ve tek adımlı bir yöntemdir. Bu yöntemde, polimer ve hedef molekül aseton ya da metanol gibi bir organik çözücü içinde çözündürülür. Oluşan çözelti daha sonra yüzey aktif madde içeren sulu faz içine şırınga pompası yardımıyla damla damla ilave edilir. Organik çözücünün sulu fazla karışıyor olabilmesi önemlidir [221], [222]. Nanopresipitasyon yöntemi 100 nm gibi dar bir boyut aralığında partikül hazırlamak için kullanılabilmesi ve kayma gerilimi olmaması nedeniyle avantajlı bir yöntemdir [217]. Bu yöntem çoğunlukla hidrofobik ve bazen de hidrofilik moleküllerin enkapsüle edilmesinde kullanılabilir. Nanopresipitasyon yöntemi ilk defa ilaç dağıtımında kullanılmak üzere nanoparçacıkların hazırlanması için Fessi ve arkadaşları tarafından kullanıldığı bilinmektedir [223].

Nanopresipitasyon yöntemi ile nanopartiküllerin hazırlanması şekil 2.11’de verildi.



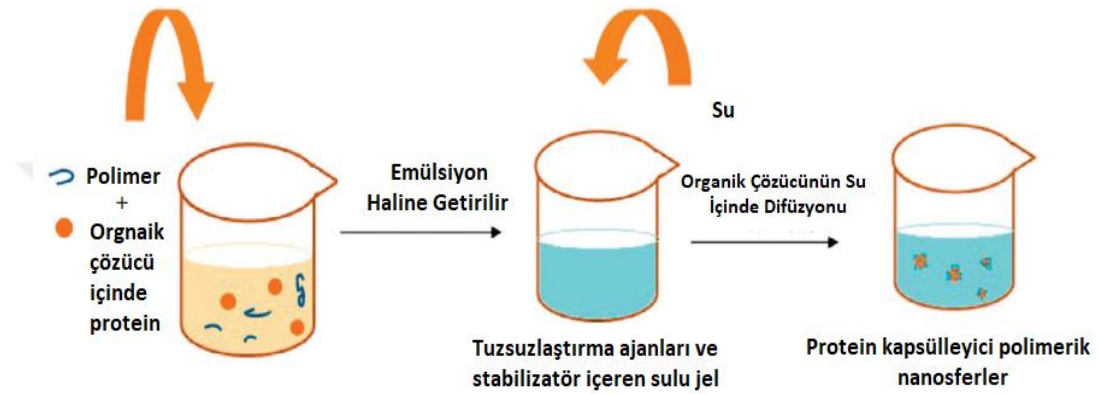
Şekil 2.11 Nanopresipitasyon yöntemi kullanılarak polimerik nanopartiküllerin hazırlanması [221]

2.3.2.2 Tuzsuzlaştırma Yöntemi (Salting Out)

Tuzsuzlaştırma yönteminde, polimer ve hedef molekül sulu fazla karışabilen aseton ve tetrahidrofuran gibi organik bir çözücü içinde çözündürülür. Daha sonra

elde edilen bu organik faz sulu fazda emülsifiye edilir. Kullanılacak olan sulu fazın organik çözücünde çözünmeyen yüksek konsantrasyonda tuzlar içermesi gerekir [224]. "Tuzsuzlaştırma" teriminin daha doğru anlaşılabilmesi için, açıklanan bu yöntem; PLGA+hedef molekül karışımının, viskoz polivinilalkol (PVA)/tuz çözeltisi içinde emülsifiye edilirken organik fazdan kontrollü şekilde çökeltilmesine dayanır [225].

Nanopartiküllerin tuzsuzlaştırma yöntemi ile hazırlanması Şekil 2.12'de gösterildi.



Şekil 2.12 Nanopartiküllerin Tuzsuzlaştırma Yöntemi ile hazırlanması [226]

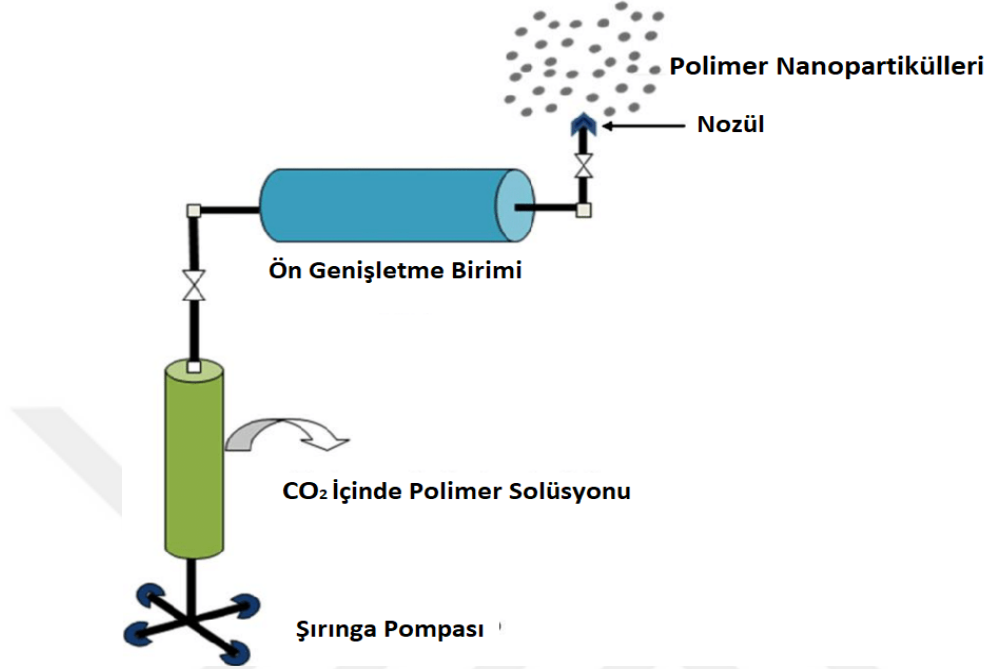
2.3.2.3 Süperkritik Akışkan Teknolojisi

Süperkritik akışkan teknoloji, nanopartikül oluşturma çalışmalarında önemli bir yere sahiptir. Süperkritik bir akışkan, akışkanın kritik sıcaklığının üzerindeki bir sıcaklıkta basınçtan bağımsız olarak tek bir faz halinde bulunmasıdır. Bu sistemde tek faz halindeki süper kritik akışkan, çözücü olarak tanımlanır [227]. Herhangi bir maddenin süperkritik formda olabilmesi için sıcaklığı ve basıncı kritik sıcaklığının ve kritik basıncının üstüne çıkarılmalıdır. Süperkritik akışkan teknoloji ekonomik, çevre dostu ve toksik etki göstermemesi gibi dikkat çeken bazı özellikleri nedeniyle son yıllarda ilgi gören bir teknolojidir [228].

Bu teknolojinin ana prensibi, hedef molekül ve taşıyıcı sistem olarak kullanılacak malzemenin kritik sıcaklık ve basınç koşullarındaki süperkritik çözücü içinde çözülmesi ve dağılımı (disperse edilmesi) ve daha düşük basınç koşullarında nozül aracılığıyla toplama veya genleşme odasına püskürtülmesidir. Püskürtülen malzemelerin hızlıca genleşmesi ve yoğunluğun değişmesi sonucu hedef molekül ve taşıyıcı sistem olarak kullanılan malzemenin oluşturduğu yapı hızlı bir

çekirdekleşme gösterir ve kısa sürede istenen boyutlarda nanopartikül elde edilmesi mümkün hale gelir [229].

Süperkritik akışkan teknolojisinin şematik gösterimi Şekil 2.13'te verildi.



Şekil 2. 13 Süperkritik akışkan teknolojisi şematik gösterimi [230]

2.3.2.4 Diyaliz Yöntemi

Diyaliz yöntemi dar-sıkı dağılıma sahip nanopartiküllerin hazırlanmasına izin veren basit ve etkili bir teknik olarak araştırmacılar tarafından kullanılır. Taşıyıcı olarak kullanılacak polimer ve kapsüle edilecek hedef molekül aynı organik çözücü içinde çözündürülür ve bu solüsyon belirli bir moleküler ağırlık sınırına sahip diyaliz tüpüne yerleştirilir [231]. Diyaliz tüpünün içinde organik faz bulunur ve bu diyaliz tüpü sulu faz ortamına yerleştirilir. Daha sonra tüpün içindeki çözücü sulu faza doğru yayılırken sulu faz da diyaliz tüpüne doğru yayılır ve hedef molekül+polimer karışımının tüp ortamındaki çözünürlüğü giderek azalır ve agregasyon nedeniyle nanopartiküller oluşmaya başlar. Bu sistemde organik fazdaki çözücünün ve sulu fazın yavaş şekilde geçişini izin veren yarı geçirgen membran kullanılır [232].

2.3.2.5 Emülsifikasyon / Solvent Difüzyonu

Emülsifikasyon / Solvent Difüzyonu yönteminde, polimer ve kapsüllenecek hedef molekül suyla kısmen karışabilen bir çözücü (benzil alkol veya asetat gibi bir çözücü) içinde çözündürülür ve bu solüsyon organik fazı oluşturur. Daha sonra bu organik faz, yüzey aktif madde içeren sulu bir çözelti ile karıştırılarak su içinde yağ (oil in water, o/w) emülsiyonu oluşturulur [200], [233]. Oluşan bu emülsiyon daha sonra yeterli miktarda su ile seyreltilir. Bunun sonucunda dağılmış damlacıklardan dış faza solvent difüzyonu gerçekleşir ve böylece kolloidal partiküllerin oluşumu sağlanmış olur. Oluşan bu nanopartiküllerin boyutu genel olarak 250-600 nm arasındadır [233].

Bu yöntem yüksek kapsülleme verimliliği (genellikle %70 ten daha fazla) sağlaması, homejenizasyona gerek olmaması, tekrarlanabilirliği, ölçek büyütmenin kolay olması ve nanopartiküllerde dar boyut dağılımı elde edilebilmesi gibi çeşitli avantajlar sunar. Ancak, süspansiyondan uzaklaştırılması gereken yüksek hacimde su bulunması, emüsifikasyon sırasında kapsüle edilen hedef molekülün hidrofilik özelliğe sahip olması durumunda sulu faza sızma ihtimalinin olması ve böylece kapsülleme veriminin düşmesi gibi bazı dezavantajlar da barındırır [219].

2.3.2.6 Çözücü Buharlaştırma Yöntemi (Solvent Evaporation)

Çözücü buharlaştırma yöntemi, polimer dispersiyonu yoluyla nanopartiküllerin hazırlanması için geliştirilen ilk yöntemdir. Bu yöntem taşıyıcı sistemi olarak kullanılacak polimerin ve kapsüle edilecek hedef molekülün uygun organik bir çözücü ile organik fazının hazırlanması, bu organik fazın sulu bir fazda emülsiyon haline getirilmesi ve kullanılan çözücünün buharlaştırılmasına dayanır [234], [235]. Basit bir yöntem olduğu için araştırmalarda yaygın bir şekilde kullanılır. Yöntem esas olarak lipofilik yapıdaki moleküllerin verimli bir şekilde kapsüllemesine izin verir [236]. Bunun yanında farklı özellikteki moleküllerin de enkapsülasyonuna izin veren modifiye yöntemler mevcuttur.

Su içinde yağ tekli emülsiyon (oil in water) çözücü buharlaştırma tekniği daha çok hidrofobik moleküllerin kapsüllemesinde kullanılır. İlave su fazının eklenmesi yani yağ içinde su emülsiyonu ve bu emülsiyonun tekrar su içinde emülfisiye

edilmesiyle (water in oil in water) oluşan ikili emülsiyon tekniği hidrofilik moleküllerin de kapsüllenmesine izin verir [237].

Çözücü buharlaştırma yöntemi, gelişmiş teknoloji kullanımını gerektirmemesi, ısı duyarlılığına sahip ilaçlar için oldukça uygun olması, kolay ölçek büyütme imkân vermesi ve oldukça küçük çapta nanopartiküller oluşturmayı mümkün kılması gibi önemli avantajlara sahiptir. Bunun yanında bu yöntem, kullanılan bazı organik solventlerin toksik olabilmesi, çözücünün hızlı bir şekilde buharlaştırılmadığında partiküllerin agregasyona uğraması gibi bazı dezavantajlar da içerebilir [238].

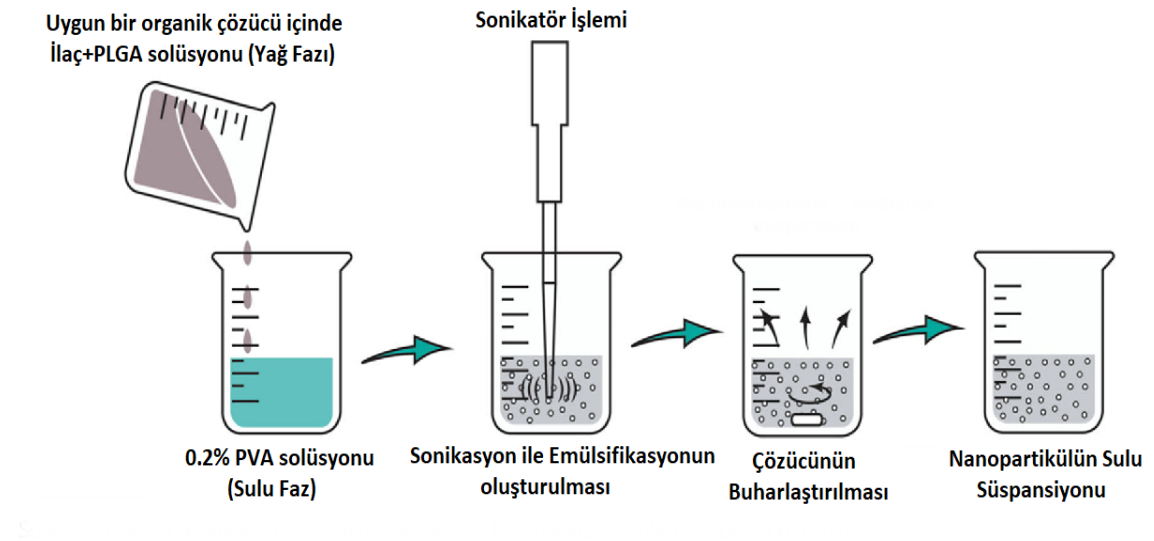
Bu çalışmada çözücü buharlaştırma tekniğinin su içinde yağ tekli emülsiyonu (o/w) kullanıldı.

Tekli Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Tekniği: Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniği hidrofobik molekülleri kapsüllemenin en basit ve en etkili yöntemlerinden biridir [225], [239]. Bu yöntem genel olarak şu basamaklardan oluşur;

- Kapsüllenecek hedef molekülün taşıyıcı matrisi oluşturacak olan uygun bir polimerle organik bir çözücü içinde çözündürülmesi,
- Oluşan bu organik fazın ikinci bir faz sistemiyle (genellikle PVA'nın sulu çözeltisi) bir sonikatör veya homojenizatör altında uygun karıştırma ve sıcaklık koşulları altında emülsiyonlaştırılması. Bu emülsiyon, polar olmayan bir organik çözücü içinde polimer ve lipofilik molekülün çözündürülmesi ile elde edilen yağ fazı veya organik faz olarak da isimlendirilebilen ve yüzey aktif madde içeren sulu bir fazdan oluşur,
- Uygun bir karıştırma parametresinde çözücünün buharlaştırılarak nanopartiküllerin oluşturulması,
- Oluşan nanopartiküllerin filtreleme veya santrifüj yoluyla ortamdan elde edilmesi ve uygun koşullar altında uygun bir yöntem kullanılarak (örneğin liyofilizasyon) kurutulmasıdır [227], [240]–[242]. Bu aşamalardan ilk ikisi daha çok nanopartikülün boyut dağılımını etkilerken, son iki adım ise nanopartikülün morfolojisini belirler [240].

Tekli ve ikili emülsiyon teknikleri, polimerin miktarı, çözücünün tipi, kapsüllenecek hedef molekül ilavesi, yüzey aktif maddenin seçimi ve sonikasyon veya homjenizasyon parametreleri ayarlanarak kolayca ölçeklendirilebilir. Her iki yöntemde de yüksek kayma geriliminin oluşabilmesi önemli bir dezavantajdır [227]. Ancak bu durum uygun parametrelerin seçimine dikkat ederek minimuma indirilebilir. Organik fazın hazırlanmasında kullanılan organik çözücü için, diklorometan, kloroform, heksafluoro-izopropanol gibi düşük kayma gerilimine sahip çözücüler veya etil asetat, izopropanol, metil etil alkol, aseton ve benzil alkol gibi halojenli olmayan çözücüler seçilebilir. Sulu fazda ise yüzey aktif madde olarak, PVA, polietilen glikol, polietilen glikol sorbitan monolaurat (Tween) ve sodyum dodesil sülfat gibi maddeler kullanılabilir [243].

Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniği kullanılarak nanopartiküllerin hazırlanması Şekil 2.14'te gösterildi.



Şekil 2.14 Tekli emülsiyon (o/w) çözücü buharlaştırma tekniği kullanılarak nanopartiküllerin hazırlanması [244]

2.3.3 Nanopartikül Karakterizasyonunda Kullanılan Bazı Yöntemler

Nanopartiküllerin boyutunu, partikül dağılımını, şeklini ve yüzey yüklerini araştırmak üzere farklı karakterizasyon yöntemleri mevcuttur [245]. Bazı belli başlı karakterizasyon yöntemlerinden bahsedilecek olup, bu çalışmada kullanılan karakterizasyon yöntemleri daha detaylı bir şekilde anlatıldı.

Tablo 2.9'da nanopartikül karakterizasyon yöntemleri verildi.

Tablo 2.9 Nanopartikül karakterizasyon metodları [246]

Nanopartikül Özellikleri	Karakterizasyon Metodları
Morfoloji(Şekil/Boyut)	Dinamik ışık saçılımı, Elektron mikroskobu (tarama / iletim), Atomik kuvvet mikroskopisi
Topografi (Yüzey)	X-Ray Difraksiyonu, BET
Kimyasal	UV görüntülenebilir spektroskopisi, Elektron dağılımlı X-ışını spektroskopisi, Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi
Elektriksel	Elektrokinetik (zeta / döngüsel voltametri çalışmaları)
Optiksel	Mikroskopi, Çift foton korelasyon spektroskopisi, Raman spektroskopisi, Yüzey plazmon rezonansı
Biyolojik	İn vitro hücre canlılığı, İn vivo, Mikrobiyal koloni canlılığı

2.3.3.1 Tez Çalışması Sırasında Kullanılan Karakterizasyon Metodları

Taramalı Elektron Mikroskopi: Nanomalzemeler ve nanoyapıların karakterizasyonu için kullanılan en popüler ve yaygın tekniklerden biri Taramalı Elektron Mikroskobudur (SEM). SEM, birkaç nanometre çözünürlüğe kadar numuneleri karakterize etmek için verimli bir şekilde kullanılabilir [247]. SEM'in temel bileşenleri, bir elektron tabancası, lens sistemi, görüntü toplayıcı, katot ışın tüpü ve diğer bazı elektronik cihazlardır [248]. SEM'de elektron ışını numune ile etkileşime girdiğinde birden fazla olay meydana gelir. Elektron ışını numuneye belli bir derinliğe kadar penetre olur ve bu farklı penetrasyon alanlarından farklı sinyaller elde edilir [249].

SEM ikincil elektronları oluşturmak için numunenin yüzeyini tarayan 2-3 nm lik bir elektron odağı kullanır. Daha sonra oluşan bu ikincil elektronlar sensör tarafından algılanarak 3 boyutluymuş gibi bir izlenim veren yüzey görüntüleri elde edilir [248]. Yüzey topografyasına ek olarak SEM, nanopartiküllerin kimyası,

kristal oryantasyonu ve iç gerilme dağılımı hakkında da yararlı bilgiler verebilir [247].

Bu tez çalışmasında morfolojik açıdan nanopartiküllerin oluştuğunu göstermek için SEM kullanıldı.

Ultraviyole-görünür spektroskopi (UV-Vis) Spektroskopi: Spektrofotetreler laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan ekipmanlardır. Ultraviyole spektrofotetreler genel olarak ışık kaynağı, örneğin yerleştirildiği hazne, ışığı farklı dalga boylarına ayırmak için bir dağıtıcı (örneğin monokromatör) ve uygun bir dedektörden oluşur [250]. Cihaz genellikle iki ışık kaynağı içerir. Bunlar: UV bölgesinde ışık yayan bir döteryum lambası ve görünür bölgede ışık yayan bir tungsten-halojen lambasıdır. Işık bir monokromatörden geçtikten sonra numunenin bulunduğu küvete odaklandırılır ve numuneden ne kadar ışık geçtiği bir dedektör tarafından tespit edilir [251]. Dedektör, ilk gelen ve iletilen ışın arasındaki yoğunluk farkını kaydeder. Işının farklı dalga boylarında gönderilmesiyle farklı yoğunluk farkları ölçülür. Bilgisayar yardımıyla hangi dalga boyunda ilk gelen ve iletilen ışın arasındaki farkın en yüksek olduğu, yani numunenin gönderilen ışını en fazla emdiği dalga boyu belirlenir. Ölçülen bu değer numune içerisindeki ilgili molekülün absorbens değeridir. Örneğin bu molekül bir peptid olabilir. Belirlenen absorbens değeri Beer-Lamberts yasasında kullanılarak çözelti içindeki ilgili molekülün konsantrasyonu belirlenebilir [252], [253].

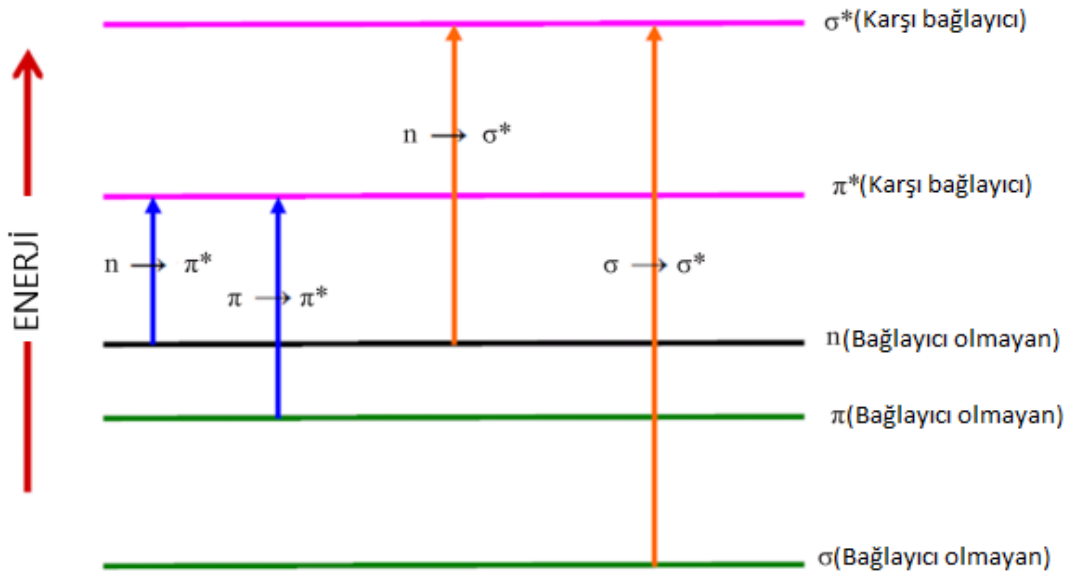
Elektronik spektroskopi olarak ta bilinen UV-Vis'te, ultraviyole bölge 200 – 400 nm dalga boyları arasındayken görünür ışık bölgesi 400 – 800 nm dalga boyları arasındadır [254]. UV bölgesi kolaylık olması açısından 3 bölgeye ayrılabilir;

- Yakın UV bölgesi (görünür bölgeye en yakın UV bölgesi; $\lambda \sim 250 - 400$ nm),
- Uzak UV bölgesi (görünür bölgeye uzak UV bölgesi; $\lambda \sim 190 - 250$ nm),
- Vakum UV bölgesi ($\lambda < 190$ nm).

UV bölgesinin bu şekilde ayrımı kesin bir ayrım değildir ve değişiklik gösterebilir. UV ışığının absorpsiyonu, moleküllerdeki elektronik geçişlerin düşük enerji durumundan yüksek enerji durumuna doğru olmasıyla ilişkilidir [255]. Ultraviyole ve görünür ışık bölgesi, dış (değerlik) elektronları daha yüksek enerji

seviyelerine çıkarmak için yeterli enerjiye sahiptir. Değerlik elektronları, pi (π) bağlayıcı orbitaller, sigma (σ) bağlayıcı orbitaller ve bağlayıcı olmayan (n) orbitaller olmak üzere 3 tür elektron orbitalinde bulunur. σ bağ orbitalleri π orbitallerinden daha düşük bir enerji seviyesindedir. Karşı bağlayıcı orbitaller (σ^* ve π^*) ise en yüksek enerji seviyesine sahiptirler [254]. Elektron geçiş yeteneğine sahip bazı moleküllerde elektronlar aldıkları enerji ile daha yüksek enerji seviyelerine çıkarlar ve böylece gelen ışığın bir kısmı absorplanmış olur.

Moleküler orbitallerin enerji seviyelerinin şematik bir gösterimi Şekil 2.15'te verildi.



Şekil 2.15 Moleküler orbitallerin enerji seviyelerinin şematik bir gösterimi; dikey oklar elektronik geçişleri temsil eder [254]

UV radyasyon ilgili numune ile etkileşime girdiğinde, saçılma, yansıma, iletim, soğrulma ve fotokimyasal reaksiyonların oluşması meydana gelebilir. Numunelerin UV-Vis spektrumlarını belirlemek için ölçüm yapılacağı zaman absorbans ölçümü yapılır [256].

Kalınlığı y cm olan bir tüp içerisinde bulunan z konsantrasyona sahip çözeltiden monokromatik ışık iletildiğinde, absorbe edilen ışık miktarı, ilk gelen ışık demeti/radyasyon (I_0) ile numuneden iletilen ışık demeti/radyasyon (I) arasındaki farkın sonucudur. Absorbe edilen ışık miktarı absorbans (A) olarak ifade edilir. Bir numuneden iletilen ışık çoğu zaman bir kesir ifadesi veya yüzdelik

olarak verilir [256]. Lambert-Beer eşitliği olarak ifade edilen denklem şu şekildedir;

$$T = \frac{I}{I_0} \text{ veya } \%T = \frac{I}{I_0} \times 100 \quad (2.1)$$

T; transmitans yani iletilen ışık miktarıdır.

A ise şu şekilde tanımlanır: $-\log T$

$$A = x \cdot y \cdot z \quad (2.2)$$

Burada x absorptiviteyi, y optik yolun kalınlığını, z ise konsantrasyonu ifade eder. Eğer z, mol/l yani molar cinsinden veriliyorsa molar absorbtivite terimi kullanılır [257]. Böylece denklem şu şekli alır:

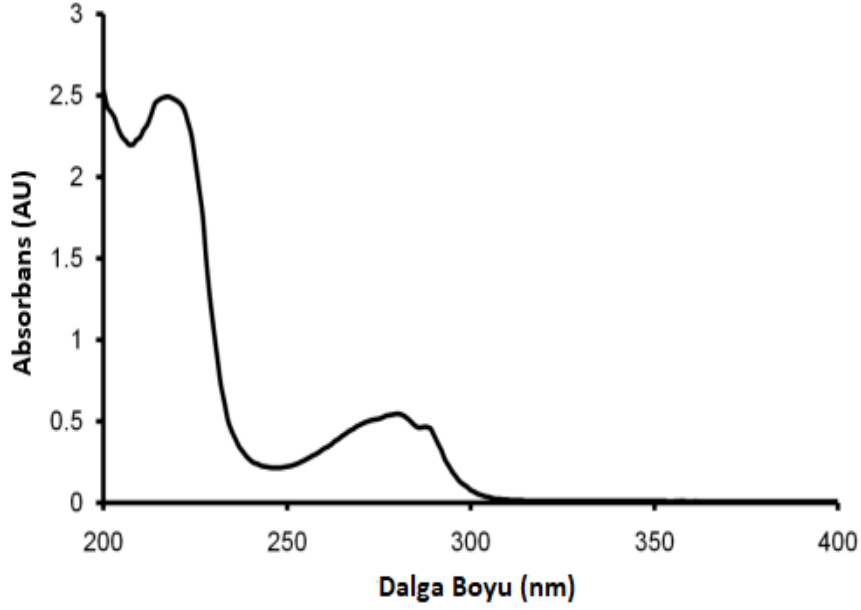
$$A = \varepsilon \cdot y \cdot z \quad (3.3)$$

Bu denklemde ε ($l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) molar absorbtivitedir.

Bu tez çalışmasında UV-Vis spektrofotometresi, (2.3)'ten yararlanılarak konsantrasyon tayini için kullanılmıştır.

Proteinler hem yakın hem de uzak UV bölgelerinde absorpsiyon yapabilir. Uzak UV bölgesi olarak adlandırılan 190-250 nm dalga boylarındaki ışığın proteinler tarafında absorbe edilebilmesi neredeyse tamamen peptid bağlarındaki $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerine bağlıdır. Protein yapısında bulunan tirozin, triptofan, fenilalin gibi aromatik amino asitler, yakın UV veya aromatik bölge olarak adlandırılan 240-300 nm dalga boylarındaki ışığı absorbe edebilirler. Ayrıca iki sistein kalıntısı arasında oluşan disülfid bağları da yaklaşık olarak 260 nm dalga boyundaki ışığı absorbe edebilir [251], [258].

Yakın ve uzak UV bölgelerinde bir peptidin absorpsiyon spektrumu Şekil 2.16'da gösterildi.



Şekil 2.16 Yakın ve uzak UV bölgelerinde bir peptidin absorpsiyon spektrumu [259]

Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri: Maddenin üç hali vardır. Bunlar, katı, sıvı ve gazdır. Maddenin bu hallerinden biri, diğer bir hali içinde gözle görülemeyecek kadar küçük partikül boyutlarında çözünmeden dağılmışsa, bu sistemlere kolloidal sistemler denir. Kolloidal süspansiyonlar, dağılan fazın (dispers faz) sürekli fazın (continous faz) içinde dağılmasıyla oluşur. Kolloidal süspansiyonlarda patikül boyutu 1 nm ile 1 μ m arasında değişir [260]. Çalışmamızda elde edilen nanopartiküllerin sıvı ortamda süspanse edilmesi de kollaidal süspansiyona örnektir. Kolloidal sistemlerde, yüzey yükü ve partikül boyutu bu sistemlerin doğasının anlaşılması için en önemli özelliklerden ikisidir [261]. Örneğin bu iki özellik nanopartikül sistemlerinin toksisite, hücrel alım gibi biyolojik etkilerinin anlaşılmasında oldukça önemlidir [262].

Deneylerimizde nanopartikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyelinin ölçümleri Zetasizer Nano ZS cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Bu cihaz nanopartikül boyut ve dağılımlarının belirlenmesinde Dinamik Işık Saçılımı tekniğini (DLS) kullanırken, zeta potansiyelinin ölçümü içinse yine DLS tekniğine dayanan Elektroforetik Işık Saçılımı tekniğini (ELS) kullanır.

DLS analizi, çözelti içindeki partiküllerin yayılma hareketlerine dayanır. Partiküller, içinde bulundukları çözümü moleküllerin rastgele hareket etmesi ve bu rastgele hareket eden moleküllerin partiküllere çarpması sonucu Brownian hareketi denen bir hareket oluştururlar. DLS tekniği ile Brownian hareketinin hızı ölçülür ve partikül boyutu ile ilişkilendirilir. DLS tekniğinde monokromatik bir lazer ışını numune haznesinde bulunan küvet içindeki süspansiyon çözeltisine gönderilir. Işık çözeltiye çarptığında kırılmalar meydana gelir ve saçılır. Işığın saçılması, öncelikle çözelti içinde asılı bir şekilde duran ve Brownian hareketi yapan partiküller tarafından meydana getirilir.

Küçük partiküller büyük partiküllere göre daha kolay yayılır ve daha fazla hareket eder. Partiküllerin yaptığı Brownian hareketinden dolayı saçılan ışıktaki yoğunluk dalgalanmaları meydana gelir ve bu dalgalanmalar zamanla değişir. Yoğunluk dalgalanması daha küçük parçacıklar için daha hızlıdır. Saçılan ışığın yoğunluk dalgalanmaları, difüzyon sabitini ve partikülün hidrodinamik yarıçapını elde etmek için analiz edilir. Partiküllerin bir çözeltideki hareketleri, boyutlarına, sıcaklığa ve çözücü viskozitesine bağlıdır [263], [264]. Partiküllerin hidrodinamik yarıçap (R_h) cinsinden boyutları, Einstein – Stoke denklemi kullanılarak ortaya konur. Bu denklem şu şekildedir;

$$R_h = \frac{k \cdot T}{(6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D)} \quad (2.4)$$

R_h ; Partiküllerin hidrodinamik yarıçapı

D ; Difüzyon katsayısı,

K ; Boltzman Sabiti,

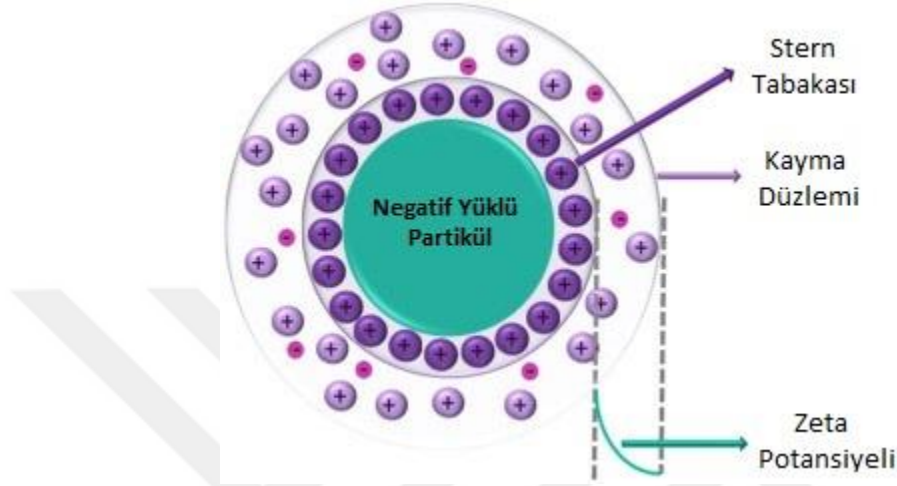
T ; Mutlak sıcaklık,

η ; Çözücü viskozitesi

Zeta potansiyeli, partikül ile partikülün içinde bulunduğu sıvı arasında oluşur. Belli bir yüke sahip partikül, süspansiyon içinde karşıt yükteki iyonları çeker ve bunun sonucunda partikül yüzeyinde katmanlaşma meydana gelir. Partikülü çevreleyen bu sıvı katmanı iki tabaka halinde bulunur; karşıt yüklü iyonların sıkı bir şekilde bağlı olduğu iç bölge (stern tabakası) ve partikülün dışına doğru

genişleyen ve daha zayıf bağlanmanın olduğu dış bölge (yayılma tabakası). Partikülün dışına doğru olan bu yayılma alanı içerisinde “kayma düzlemi” adı verilen bir sınır bulunur. Bu kayma yüzeyinin potansiyeli, zeta potansiyeli olarak isimlendirilir [261], [262], [264]

Bir partikülün zeta potansiyeli Şekil 2.17’de gösterildi



Şekil 2.17 Zeta potansiyelin şekilsel gösterimi [265]

Bazı elektrokimyasal yöntemler zeta potansiyelinin belirlenmesi için kullanılabilir. Bu yöntemler; akış ve çökelme potansiyeli, elektroforez ve elektroozmozdur. Bu yöntemlerden ikisi olan elektroforez ve akış potansiyeli oldukça önemlidir. Ölçümlerimizde kullandığımız Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı elektroforez yöntemini kullanır [266].

Cihazın numune bölümüne zeta potansiyeli için özel olarak tasarlanmış ölçüm küveti, içindeki çözelti ile yerleştirilir. Küvetteki koloidal süspansiyona elektrik alanı uygulanır. Elektrik alanın uygulanmasıyla beraber çözeltideki asılı yüklü partiküller karşı elektroda doğru hareket eder. Bu hareket elektroforez olarak bilinir. Elektrik alanın uygulanmasından dolayı partiküllere etki eden kuvvet elektroforetik kuvvet olarak isimlendirilir. Partiküllerin hızları partikülün ara yüzündeki yük miktarı ile ilişkidir. Partiküllerin, uygulanan elektrik alanı içinde yaptıkları hareket elektroforetik harekettir ve bu hareket partiküllerden ışığın saçılması ile ölçülür. Yöntem Lazer Doppler Hız ölçümü veya Elektroforetik Işık Saçılım tekniği olarak da isimlendirilir [261]–[263], [267]. Partiküllerden saçılan ışığın frekansı, Doppler kaymasından dolayı parçacık hızının bir fonksiyonudur.

Partiküllerden saçılan ışının frekans kaymasının hassas bir şekilde ölçümü için referans ışını denilen 2. bir ışık, partikülden saçılan ışıkla karışması için gönderilir. Böylece frekans kaymasındaki ölçülen büyüklük daha sonra parçacığın hızını belirlemek için kullanılır [268].

Partiküllerin gözlemlenen hızının uygulanan elektrik alanına bölünmesiyle elektroforetik hareketlilik elde edilir. Zeta potansiyeli elektroforetik hareket kullanılarak Henry denkleminde hesaplanır.

$$UE = \frac{(2.\varepsilon.\zeta.f(ka))}{3\eta} \quad (2.5)$$

UE; Elektroforetik hareketlilik,

ε ; Ortamın dielektrik sabiti,

η ; Ortamın viskozitesi,

$f(ka)$; Henry Fonksiyonu,

ζ ; Zeta Potansiyeli

Fourier transform kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi: Fourier transform kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, saf maddeleri, karışımları, safsızlıkları, ve çeşitli malzemelerin bileşimlerinin belirlenmesinde oldukça kullanışlı bir tekniktir [269], [270]. Bu yöntem sayesinde numunelerin, fonksiyonel gruplarının, bağ türlerinin ve moleküler yapılarının pratik bir şekilde analizi gerçekleştirilebilir [271], [272]. Bu teknik, bir molekülün kızılötesi radyasyon tarafından uyarılması ve bunun sonucunda molekülün belli bir dalga sayısı aralığındaki titreşiminin ölçülmesine dayanır. Bu yöntemin kullanımı basit olup, hızlı, ucuz, verimli, hassas, tekrarlanabilir olması, ölçüm için oldukça az numune gerektirmesi ve numunelerin nitel/nicel analizlerinde rutin bir şekilde kullanılabilmesi gibi önemli bazı avantajları bulunur. Ayrıca genel olarak spektroskopik teknikler, çok zaman almayan ve çevre için zararlı kimyasal ekstrelerin kullanımını gerektirmeyen avantajlı yöntemlerdir [271], [273], [274].

Bir FT-IR spektrofotometresi cihazı genellikle 5 bölümden oluşur. Bunlar, kızılötesi ışını sağlayan kaynak, hareketli ve sabit bir ayna, ışın ayırıcı, numune

hücresi ve detektördür. Kızılötesi ışın numuneden geçerek detektöre yönlendirilir. Dipol momente sahip olan moleküller kızılötesi radyasyonu emer ve böylece absorpsiyon oluşur. Moleküldeki her bir bağın absorbe ettiği kızılötesi radyasyon (IR) ölçülür. Cihaz, numune tarafından emilen IR radyasyon miktarını ve yoğunluğunu ölçerek bir absorpsiyon spektrumunu verir [275], [276]. Sonuçlar genellikle ekranda % transmittans karşılık wavenumber (cm^{-1}) şeklinde bir spektrum olarak gösterilir.

Kovalent bağ içeren birçok farklı madde, kızılötesi bölgesindeki elektromanyetik radyasyonu absorbe edebilir. Bir moleküldeki fonksiyonel grupları belirleyebilmek için o molekülün IR aktif olması gerekir. IR radyasyonu bir elektrik dipole sahip olan malzemelerin kovalent bağları ile etkileşime girdiğinde molekül enerjiyi emer ve bağ ileri geri salınım yapmaya başlar [275]. Bir molekülün IR aktif olması demek o molekülün bir dipol momente sahip olması ve numunenin IR radyasyonu ile etkileşime girdiğinde oluşan titreşimin seyri sırasında molekülün dipol momentinde bir değişiklik olması demektir [277]. Moleküllerde meydana gelen iki tür titreşim vardır. Bunlar, germe (stretching) ve bükme (bending) titreşimleridir [277].

Bir atom yalnız başına IR radyasyonu absorbe edemez çünkü kimyasal bir bağ içermez. Aynı şekilde simetrik moleküller de IR radyasyonu absorbe edemez çünkü dipol momentleri sıfırdır. Örneğin H_2 molekülü 2 adet H atomuna sahiptir ve bu iki atom arasındaki bağ, apolar kovalent bağdır ve molekül simetriktir. Bu yüzden H_2 molekülünün dipol momentleri sıfırdır ve IR aktif bir molekül değildir [275], [277].

IR bölgesi temel olarak üç ana bölgeden oluşur. Bunlar;

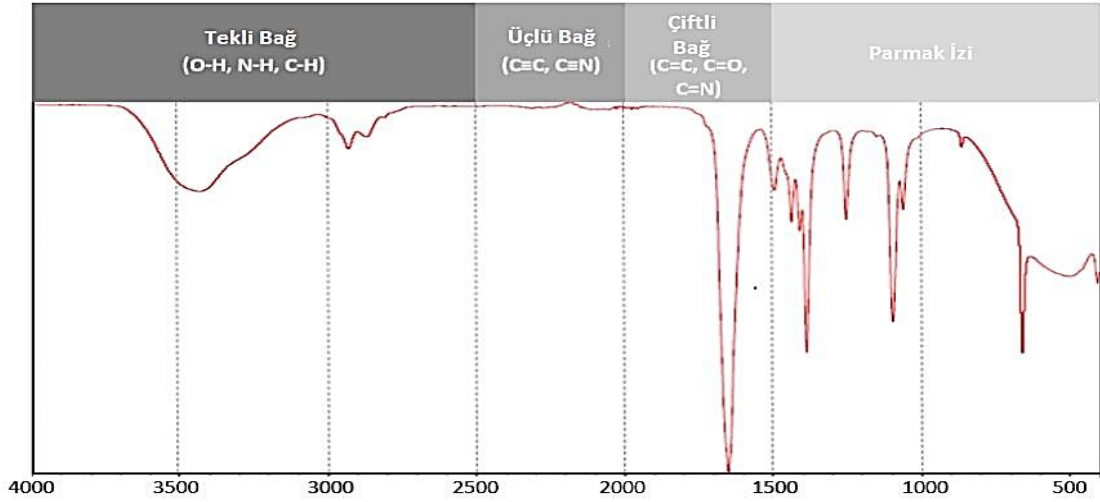
- Yakın IR ($14000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$),
- Orta IR ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$),
- Uzak IR ($400\text{--}40\text{ cm}^{-1}$)'dir.

Orta IR spektrumu numune analizlerinde en yaygın kullanılan bölgedir. Bunun yanında uzak ve yakın IR bölgeleri de numune analizlerinde bilgi sağlama açısından katkıda bulunabilirler. Orta IR spektrumu dört bölgeye ayrılır [278].

Bunlar;

- Tek bağ bölgesi (2500-4000cm⁻¹),
- Üçlü bağ bölgesi (2000-2500 cm⁻¹),
- Çift bağ bölgesi (1500-2000 cm⁻¹),
- Parmak izi bölgesi (600-1500 cm⁻¹)’dir.

Orta-IR spectrum bölgeleri Şekil 2.18’de gösterildi.



Şekil 2.18 Orta-IR spectrum bölgeleri [278]

FTIR spektroskopisi, Beer-Lambert Yasasına dayanır. Bir numunenin transmittans (geçirgenlik) spektrumu şu bağıntıdan hesaplanabilir;

$$\%T = 100 \times \left(\frac{I}{I_0} \right) \quad (2.6)$$

T= Transmittans,

I₀= Gelen ışığın yoğunluğu,

I= İletilen ışığın yoğunluğu’dur.

Spektrum grafiğinde y aksiste % transmittans olduğu gibi absorbans da yazılabilir.

Literatürde her ikisi de kullanılır.

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (2.7)$$

A= Absorbans,

I_0 = Gelen ışığın yoğunluğu,

I= İletilen ışığın yoğunluğu'dur.

Özet olarak bu analiz yönteminin arkasında yatan ana fikir, yapısal olarak farklı molekül yapılarına sahip numunelerin aynı kızılötesi spektrumu üretemeyeceğidir. Çünkü her bir molekülün titreşim spektrumlarındaki spektral bantları o molekülün kendisine özgüdür [271], [279]. Çalışmamızda kullandığımız antijenik peptid dizisi için de bu durum geçerlidir.

Serbest peptid molekülünün bir biyopolimer olan PLGA içine enkapsülasyon edilerek oluşturulan nanopartiküllerde, enkapsülasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirilip gerçekleştirilmediği FT-IR cihazı ile belirlendi. Hem peptid içermeyen hem de peptid ile enkapsülasyon yapılan PLGA nanopartiküllerinin FT-IR cihazında spektrumları elde edildi ve birbirleriyle karşılaştırıldı.

Peptid grupları ve proteinler hakkında bilgi veren aminoasit yan zincir gruplarına özgü birçok IR absorpsiyon bandı bulunur. Çalışmamızda PLGA nanopartiküllerine serbest peptid molekülünün enkapsülasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği Amid-I bantları üzerinden belirlendi. Amid-I bantları 1600–1700 cm^{-1} dalga boyu bölgesinde ortaya çıkar.

2.4 Adjuvan Sistemleri

Adjuvanların ilk olarak 1920'li yıllarda Pasteur'un laboratuvarında çalışan veteriner Gaston Ramon tarafından keşfedildiği düşünülür. Ramon'un yaptığı deneylerde aşılara belli bazı maddelerin özellikle alüminyum tuzlarının eklenmesi aşı etkinliğini artırır [280]. Adjuvan kelimesi Latince *adjuvare* den gelir ve “yardım etmek” anlamındadır. Adjuvanlar, antijen dışında aşılara eklenen ve antijenin immünojenitesini artırıp düzenleyebilen, yapısal olarak heterojen bileşikler grubu olarak tanımlanabilir [281]. Alüminyum tuzu (alüminyum potasyum sülfat veya alum olarak da bilinir) yaklaşık 70 yıl boyunca insan aşılarında adjuvan olarak kullanılır. Normal olarak bir aşıda bağışıklık tepkisinin harekete geçirilmesi antijen tarafından sağlanır, adjuvan ise bu tepkinin yükseltilmesini sağlar [282].

Biyoteknolojide yaşanan son gelişmeler sonucunda modern aşılar, hedef mikroorganizmanın geleneksel aşılarda olduğu gibi bir bütün olarak aşılama için kullanılmasından ziyade, daha güvenli, yüksek oranda saflaştırılmış ve rasyonel bir şekilde tasarlanmış antijenlere dayanır [282], [283]. Örneğin rekombinant proteinler veya sentetik peptidler geleneksel aşılar olan canlı zayıflatılmış ve inaktive edilmiş mikroorganizmalara göre daha güvenlidir, ancak bu aşı sistemleri daha az immünojeniktirler [284]. İyi tanımlanmış antijenlerin kullanıldığı modern aşılar birçok avantaj sağlamasına rağmen tek başlarına kullanıldıklarında canlı zayıflatılmış veya inaktif aşılar kadar bağışıklık sistemini güçlü bir şekilde uyaramazlar. Geleneksel aşılar olan canlı zayıflatılmış ve inaktif aşılarda, proteinlerin, oligonükleotidlerin, lipidlerin doğal formlarında heterojen olarak bir arada bulunması ayrıca adjuvan olarak ta etki göstermelerini sağlar [285].

2.4.1 İdeal bir adjuvanın sahip olması gereken özellikleri

Adjuvanlar genel olarak şu yollarla etki gösterir: İmmünomodülasyon, antijen sunumu, CD8+ sitotoksik T-lenfosit (CTL) yanıtlarının indüksiyonu, hedefleme ve antijen deposu olarak işlev görme [286]. İdeal bir adjuvanın sahip olması gereken bir takım özellikler bulunur. Uzun raf ömrüne sahip olması, biyouyumlu ve biyoparçalanabilirlik, düşük maliyetli üretim ve uygun bir bağışıklık tepkisini destekleyebiliyor olması ideal bir adjuvanın sahip olması gereken belli başlı özelliklerdir [287].

2.4.2 Adjuvanların aşı sistemlerinde sağladığı bazı yararlar

- Daha güçlü, hızlı, geniş çaplı ve uzun süreli bağışıklık kazandırması,
- Yaşlılar ve bağışıklık sistemi bir nedenden dolayı baskılanmış kişiler için enfeksiyonlara karşı bağışıklık sisteminin yeteri düzeyde uyarılabilmesi,
- Antijenin vücut içinde daha uzun süre kalmasını imkân vermesi ve aşılarda daha düşük miktarda antijen kullanımı sağlaması,
- Hastalığa karşı bağışıklık yanıtında daha fazla miktarda, daha yüksek afiniteye sahip ve daha geniş bir antikor cevabının oluşturulmasıdır [282], [283], [285], [287].

2.4.3 Adjuvanların potansiyel riskleri

Bir adjuvan lokal reaksiyonlar olarak; ağrı, lokal inflamasyon, şişme, enjeksiyon bölgesi nekrozu, granüloamlar, ülserler ve steril apse oluşumu gözlemlenebilir. Sistemik olarak ise; bulantı, ateş, adjuvan artrit, alerji, anafilaksi, organa özgü toksisite veya immunotoksisite (sitokin salımı) ve otoimmün hastalıklar gibi bir takım sorunlar ortaya çıkabilir [286], [287]. Adjuvanlar doğrudan bağışıklık sistemini uyarabildikleri için bazı istenmeyen bağışıklık süreçlerini tetikleyebilirler [285].

2.4.4 Adjuvanların sınıflandırılması

Adjuvanların sınıflandırılmasında farklı kriterler kullanılabilir. Adjuvanlar fizikokimyasal özelliklerine, kökenlerine veya etki mekanizmalarına göre sınıflandırılabilir. Etki mekanizmalarına göre sınıflandırdığımızda, partikül antijen dağıtım sistemleri ve immünostimülatörler olarak ikiye ayrılır. Bir de her iki sınıfa da dâhil olabilen mukozal adjuvanlar bulunur. Genel olarak adjuvant sistemleri, mineral tuzlar, lipid partiküller ve mikro/nanopartiküller olarak sınıflandırılabilir [288].

2.4.5 Taşıyıcı Sistemler

2.4.5.1 Mineral Tuzlar

Uzun yıllardır, alüminyum tuzları (özellikle alüminyum hidroksit ve alüminyum fosfat) insan aşılarında yaygın bir kullanıma sahiptir [289]. Alüminyum içeren adjuvanlarda, hedef mikroorganizmanın aşı olarak kullanılacak antijen kısmının alüminyum partiküllerine adsorbe olduğu kabul edilir. Enjeksiyon bölgesinde yoğun bir antijen varlığı bulunur ve bu antijenler uzun süreli bir etki gösterirler. Bu sayede antijen sunan hücreler daha uzun süreli antijen sunumu yapabilirler [288]. Alüminyum adjuvanlar, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağı ve van der Waals kuvvetleri gibi bazı etkileşimlerle antijenleri bağlayabilir [289]. Alüminyum bazlı adjuvanların, tetanoz, difteri, boğmaca, hepatit A virüsü ve çocuk felci dahil olmak üzere çeşitli insan aşılarında kullanımı mevcuttur [280].

Tam olarak çalışma mekanizmaları bilinmeyen alüminyum tuzlarının, enjeksiyon bölgesinde bir antijen deposu görevi gördüğü düşünülür. Komplement

aktivasyonu, eozinofil veya makrofaj aktivasyonu olası diğer mekanizmalar arasındadır. Bazı önemli avantajlarına rağmen alüminyum tuzları hücresel bağışıklığı harekete geçirmekte yetersiz kalır. Alüminyum tuzlarının, granülom oluşumu, alerjenite ve nörotoksisite gibi bazı yan etkileri bulunabilir. Bu yüzden demir, kasliyum ve zirkonyum tuzları alternatif olarak önerilir [287].

2.4.5.2 Lipid Partiküller

Lipid partikülü sınıfına giren emülsiyonların aşı adjuvanı olarak kullanımları oldukça eskiye dayanır [290]. Emülsiyonlar, dağılmış faz olarak adlandırılan bir sıvının, içinde karışmayacağı sürekli faz adı verilen ikinci bir sıvı ortamında disperse olması/dağılması olarak tanımlanabilir. Aşılarda, bu fazlar antijen içeren su ve yağdan oluşur. Emülsiyonların stabilitesi için yüzey aktif maddelerin kullanılması gerekir. Yüzey aktif madde hidrofilik bir polar grup ve hidrofobik olan apolar bir yağ zincirinden oluşur [284]. Emülsiyonlar yağ içinde su, su içinde yağ ve su-yag-su emülsiyonlar şeklinde hazırlanabilir [289]. Yağ içinde su (w/o) emülsiyonu iki temel yapıya ayrılır. Bunlar; complete Freund adjuvanı ve incomplete Freund adjuvanıdır [290].

Freund adjuvanı emülsiyon adjuvanlarının en önemlisidir. Freund adjuvanı, ısıyla inaktive edilmiş mikobakteriler içeren yağ içinde su (oil in water) emülsiyonudur. Genel olarak Freund adjuvanı deney hayvanlarında antijenlerin immünojenitesini değerlendirmek için ve bazı otoimmün hastalıkların indüklenmesinde kullanılır [288]. Bir başka emülsiyon adjuvan türü olarak ta MF59 ve AS03 adjuvanları insan aşılarında kullanılabılır. Hücre aracılığı bağışıklığı harekete geçiremeyen amülinyum tuzlarına göre bağışıklık sistemini daha dengeli bir şekilde uyarabilir [291].

Bir başka lipid partikülü olan lipozomlar, antijenlerin taşınmasını sağlayan, küresel şekilli partiküllerdir. Lipozomlar fosfolipid çift katmandan oluşan vezikül sistemlerdir. Lipozomların boyutları 100 nm den daha aşağı olabildiği gibi, birkaç mikrometre de olabilir [283]. Biyoparçalanabilir, biyoyumlu ve birçok yapı modifikasyonuna izin verebilecek şekilde ayarlanabilmeleri ve toksik olmamaları lipozomların sahip oldukları önemli bazı avantajlardır. Ancak bunun yanında lipozomlar, maliyetinin yüksek olması ve bütün lipozom formülasyonlarının güçlü

bir bağışıklık tepkisi oluşturmaması gibi de bazı önemli dezavantajlar barındırırlar [290].

2.4.5.3 Mikro/nanopartiküller

Son yıllarda polimerik yapıların nano ve mikro boyuttaki partiküllerinin adjuvan etkisi gösterebileceği kanıtlanmıştır [288]. Mikro ve nano boyutlardaki biyobozunur ve biyoyumlu polimerlerden oluşan adjuvan sistemleri bir antijen deposu gibi işlev görerek uzun süreli antijen salımı yapabilen taşıyıcı sistemlerdir [289]. Bu taşıyıcı sistemlerinde hedef antijenin polimerik partiküle enkapsüle edilmesi, lenf düğümlerine girişi teşvik eder ve uzun süreli lokal antijen konsantrasyonu sağlar. Ayrıca polimerik partiküller antijenlerin, antijen sunan hücrelerle etkileşimini de destekler [288].

İnsanda damar yolu kullanımı için USFDA onayına sahip, biyobozunur ve biyoyumlu olan PLGA, aşı geliştirme çalışmalarında adjuvan olarak kullanılabilecek önemli bir adaydır [288]. Uzun yıllardır farklı amaçlarla insan vücunda kullanılabilen PLGA, biyodegradasyona uğradığında oluşan monomerleri vücut için herhangi bir toksik veya zararlı bir etki oluşturmaz [49]. Ayrıca aşı geliştirme çalışmalarında PLGA'nın kullanılmasının en çekici taraflarından biri de, bu sistemlerin uzun süreli antijen sunumuna izin vermesi ve tekrar dozlarına gerek kalmayacak şekilde tek bir doz aşının yeterli olabilmesi için rasyonel olarak tasarlanabiliyor olmalarıdır [286].

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Poly laktik-ko-glikolik asit (50:50, M_n 38,000-54,000), poly(vinil alkol), sodyum hidroksit, hidroklorik asit, diklorometan, dimetil sülfoksit (DMSO), Tripsin-EDTA (%0,25), sulfanilamide Sigma Aldrich'ten; sodyum fosfat dibazik heptahidrat, sodyum fosfat monobazik dihidrat, sodyum klor Honeywell Firması'ndan; etanol ve sodyum nitrit Tekkim'den; %93,4 saflıktaki *LSPRWYFY* peptid molekülü GenScript isimli bir firmadan temin edildi. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) besiyerleri, Fetal Bovine Serum (FBS), penisilin-streptomisin Capricorn'dan, fosforik asit ve N-(1-Naftil) etilendiamin dihidroklorür MERCK'ten, MTT tuzu Biomatik'ten temin edildi.

3.2 Kullanılan Cihazlar

Deneyisel çalışmalar için kullanılan cihazlar şunlardır:

- Nuve NF 800R Soğutmalı Santrifüj Cihazı
- Bandelin Sonorex Su Banyosu
- Heidolph Reax Top Vorteks
- Shimadzu UV-1700 Pharma Spec UV Visible Spektrofotometre
- Malvern Zetasizer Nano Zeta Potansiyel ve Partikül Boyut Ölçüm Cihazı
- Biohit Proline 100-1000 μ l Pipet
- Heto Drywinner Liyofilizatör
- Bandelin Elektronik UW 2070 Sonikatör
- Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı
- Mag Mix 15 Eco Çoklu Manyetik Karıştırıcı
- Hanni HI 2211 pH metre

- Thermo Scientific Nicolet İs10 FT-IR Cihazı
- FEI QUANTA 450 FEG ESEM SEM Model taramalı Elektron Mikroskopu
- Biotek Mikroplaka Okuyucu
- Leica Microsystems Faz Kontrast Mikroskopu
- Olympus İner Mikroskop
- Faster Laminar Akışlı Kabin
- Binder İnkübatör
- GFL Çalkamalı İnkübatör

3.3 Deneysel Yöntem

3.3.1 Çözeltilerin Hazırlanması

Yapılan Deneysel Çalışmalar için PBS tampon çözeltisi ve PVA çözeltisi hazırlandı.

3.3.1.1 PVA Çözeltisinin Hazırlanması

Deney çalışmalarımızda kütlece %3'lük PVA kullanıldı. Bunun için, 100 ml'lik balon joje manyetik bir karıştırıcının üzerine yerleştirildi ve içerisine önce 50 ml saf su konuldu. Balon joje içerisindeki bu 50 ml'lik saf su içerisine 3 gr toz PVA dikkatli bir şekilde eklendi. Manyetik karıştırıcıda 1 gece bekletilerek PVA'nın tamamen çözünmesi sağlandı. Daha sonra balon joje üzerine saf su eklenerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

3.3.1.2 PBS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

0,01 M'lık PBS tampon çözeltisi deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere hazırlandı. Tampon çözeltinin hazırlanması için, 0,78005 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MA=156,01 g/mol) tartıldı ve 1 L'lik balon joje içerisinde 400 ml saf suda çözüldü. Daha sonra 1,34035 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MA=268,07 g/mol) tartıldı ve aynı şekilde manyetik karıştırıcıda karışmakta olan balon joje içerisindeki 400 ml'lik saf suyun içinde çözüldü. Bu karışıma son olarak 0,2922 gr NaCl eklendi. Her ekleme işlemi sonucunda karışımların iyice çözünmesi sağlandı. Son karışımın pH'ı ölçüldü ve 0,5 M NaOH veya 0,5 M HCL ile pH 7,4'e ayarlandı. Ultra saf su

eklenerek çözeltinin son hacmi 0,5 L'ye tamamlandı. Hazırlanan PBS tampon çözeltisi 0,45 μ m'lik filtreden geçirilerek süzüldü.

3.3.2 NO Tayini İçin Griess Reaktifi ve Standart Çözeltilerin Hazırlanması

NO ölçümü yapılmadan önce Griess Reaktifinin ve reaksiyonda kullanılacak standart çözeltilerin hazırlanması gerekir.

Griess Reaktifinin hazırlanması için, 20 ml distile suya 2,5 ml fosforik asit eklendi. Bu çözeltiye sırasıyla 0,1 g N-(1-Naftil)etilendiamin ve 1 g sulfanilamite eklenerek karıştırıcıda çözünmesi sağlandı. Son olarak çözelti distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Standartların hazırlanması için ise, 10 ml distile su içinde 0,345 g sodyum nitrit 500 μ M derişimde olacak şekilde çözdürüldü. Bu çözelti stok çözeltiyi oluşturur. Daha sonra standart çözeltiler 0-100 μ M konsantrasyonda olacak şekilde ayarlandı.

3.3.3 *LSPRWYFY* Peptid Dizisinin Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için 0.25 mg/ml'lik stok peptid çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 0,2 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,0125 mg/ml'lik konsantrasyonlar hazırlandı ve konsantrasyonlar üzerinden UV-Vis spektrofotometrede ölçüm yapıldı

3.3.4 Tekli Emülsiyon (O/W Çözücü Buharlaştırma Tekniğiyle Boş PLGA Nanopartikül Sentezi

3.3.4.1 Birinci Deney Tasarımı

Boş nanopartikül (NP0) sentezi için tekli emülsiyon (o/w) çözücü buharlaştırma tekniği kullanıldı.

Bunun için, hassas terazi yardımıyla 10 mg olacak şekilde tartılan toz PLGA 1,5 ml'lik DCM içinde vorteks yardımıyla iyice çözdürüldü. Organik fazı oluşturan bu 1,5 ml DCM içerisinde bulunan 10 mg'lık PLGA çözeltisi, sentez işleminde kullanılmak için enjektöre çekildi. Sulu faz için daha önceden hazırlanan %3'lük PVA çözeltisinden 4 ml, 50 ml'lik falkonun içine aktarıldı. Uygun genişlikteki bir beherin içine buzlu su doldurularak ultrasonifikasyon cihazının altına yerleştirildi.

İçinde buzlu su bulunduran bir beherin dış ortam olarak kullanılmasının nedeni, homojenizasyon sırasında oluşacak ısıнын peptidlere ve enkapsülasyona zarar vermesini önlemek içindir. %3'lük 4 ml'lik PVA çözeltisi de ultrasonifikasyon cihazının altına, içinde buzlu su olan beherin içerisine yerleştirildi. Ultrasonikasyon cihazı 80 kuvvete ve 2 dk'ya ayarlandı. Cihaz çalıştırıldı ve daha önceden enjektör içerisine alınan ve organik fazı oluşturan PLGA çözeltisi 50 ml'lik falkon içerisindeki sulu fazı oluşturan PVA çözeltisine damla damla eklendi. Sonikatör altında homojenizasyon işlemi yapıldıktan sonra oluşan emülsiyon, daha önce 50 ml lik beher içinde hazırlanmış bulunan ve çoklu karıştırıcıda karıştırılmakta bulunan %0,1 lik 30 ml PVA çözeltisinin içine 1000 µl lik pipet yardımıyla aktarıldı. Emülsiyon 5 dakika karıştırıldıktan sonra çoklu karıştırıcıya alındı ve delikli alimünyum folyolarla sarılarak 1 gece çoklu karıştırıcıda bekletildi. Bu bekletme işlemi solventin buharlaştırılması için yapıldı. Ertesi gün emülsiyon, +4 °C 40 dk 9000 rpm'de santrifüj edildi. İlk santrifüj işleminden sonra oluşan pelletler 10 ml saf su kullanılarak 3 kez aynı şartlar altında yıkama için santrifüj edildi. Santrifüj işlemleri sonunda oluşan supernatant daha sonra enkapsülasyon veriminin hesaplanması için kullanıldı. Son olarak oluşan nanopartiküller -20 °C'de 1 gece bekletildi. Daha sonra örnek, liyolifizatörde 1 gece kurutmaya alındı ve ileriki analizlerde kullanılmak üzere tekrar -20 °C'ye kaldırıldı.

3.3.4.2 İkinci Deney Tasarımı

İkinci deney tasarımında NP0 sentezlemek için 100'er mg'lık PLGA örnekleri kullanıldı. 10 mg'lık NP0 sentezi için yapılan işlemler 100 mg'lık NP0 sentezi için de aynı şekilde tekrarlandı.

3.3.5 Tekli Emülsiyon (O/W) Çözücü Buharlaştırma Tekniğiyle Peptid Yüklü Nanopartikül Sentezi

3.3.5.1 Birinci Deney Tasarımı

Peptid yüklü nanopartikül sentezi için tekli emülsiyon (o/w) çözücü buharlaştırma tekniği kullanıldı.

Bunun için, ilk deney tasarımında 1 mg (NP1), 2mg (NP2), 3mg (NP3), 4mg (NP4) ve 5mg (NP5)'lık peptid örnekleri her biri için ayrı ayrı hazırlanan 500'er

μ l DCM + 500'er μ l etanol karışımı içinde su banyosu ve vorteks yardımıyla iyice çözdürüldü. Ayrıca 5 farklı miktardaki peptid örneği için 10'ar mg'lık PLGA örnekleri 500'er μ l DCM içerisinde su banyosu ve vorteks yardımıyla iyice çözdürüldü. Daha sonra bu peptid ve PLGA çözeltileri birbiri ile karıştırıldı. Oluşan bu karışımlar organik faz olarak adlandırılır. Organik fazı oluşturan çözeltiler enjektörler içerisine alındı. Her bir örnek için sulu fazı oluşturan %3'lük 4'er ml PVA çözeltileri 50 ml'lik falkonların içerisine aktarıldı. Uygun genişlikteki bir beherin içine buzlu su doldurularak beher ultrasonikasyon cihazının altına yerleştirildi. İçinde buzlu su bulunduran bir beherin dış ortam olarak kullanılmasının nedeni, homojenizasyon sırasında oluşacak ısıнын peptidlere ve enkapsülasyona zarar vermesini önlemektir. Organik faz ve sulu fazı homojenize etmek için içinde PVA çözeltisi bulunan 50 ml'lik falkon ultrasonifikasyon cihazının altında içinde buzlu su bulunan beherin içine yerleştirildi. Ultrasonikasyon cihazı 80 kuvvete ve 2 dakikalık süreye ayarlandı. Cihaz çalıştırıldı ve daha önceden enjektör içerisine alınan ve organik fazı oluşturan PLGA çözeltisi 50 ml'lik falkon içerisinde sulu fazı oluşturan PVA çözeltisine damla damla eklendi. Homojenizasyon işlemi her bir organik faz ve sulu faz örneği için ayrı ayrı tekrarlandı.

Sonikatör altında iyice karıştırma işlemi yapıldıktan sonra oluşan her emülsiyon, daha önce 5 adet 50 ml'lik beher içinde hazırlanmış bulunan ve çoklu karıştırıcıda karıştırılmakta bulunan %0,1 lik 30'ar ml'lik PVA çözeltilerinin içine 1000 μ l'lik pipet yardımıyla aktarıldı. Emülsiyonlar 5 dakika karıştırıldıktan sonra çoklu karıştırıcıya alındı ve delikli alimünyum folyolarla sarılarak 1 gece çoklu karıştırıcıda bekletildi. Bu bekletme işlem solventin buharlaştırılması için yapıldı. Ertesi gün emülsiyonlar +4 °C 40 dk 9000 rpm'de santrifüj edildi. İlk santrifüj işleminden sonra oluşan pelletler 10 ml saf su kullanılarak 3 kez aynı şartlar altında yıkama için santrifüj edildi. Santrifüj işlemleri sonunda oluşan supernatantlar daha sonra enkapsülasyon veriminin hesaplanması için kullanıldı.

Son olarak oluşan nanopartiküller -20 °C'de 1 gece bekletildi. Daha sonra örnekler liyolifizatörde 1 gece kurutmaya alındı ve ileriki analizlerde kullanılmak üzere tekrar -20 °C'ye kaldırıldı.

3.3.5.2 İkinci Deney Tasarımı

İlk deney tasarımından elde edilen sonuçlardan hareketle 2. Deney tasarımı için 20 mg (NP2) ve 40 mg (NP4)'lık peptid örnekleri seçildi. Her bir peptid örneği için 100'er mg'lık PLGA kullanıldı. Yukarıda anlatılan 1mg, 2mg, 3mg, 4mg, 5mg'lık peptid + 10'ar mg'lık PLGA üzerinden yapılan peptid yüklü nanopartikül sentezi için yapılan diğer tüm işlemler 20 mg, 40 mg'lık peptid + 100'er mg'lık PLGA örneklerinden sentezlenecek peptid yüklü nanopartiküller için de aynı şekilde tekrarlandı.

Birinci deney tasarımından elde edilen sonuçlar incelenerek ikinci deney tasarımı için 20 mg ve 40 mg'lık peptid ile 100 mg'lık peptid miktarları seçildi ve ileriki analizler bu parametreler üzerinden yürütüldü.

3.3.6 Boyut ve Zeta Potansiyeli Ölçümleri

Zetasizer cihazı kullanılarak, sentezlenen boş ve peptid yüklü nanopartikül örneklerinin boyut, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri gerçekleştirildi. Ölçümler ultrasonikasyon cihazı altında homejenizasyon sonucunda elde edilen emülsiyonlar üzerinden yapıldı. Her bir emülsiyon örneğinden 50 μ l örnek alındı ve üzerine 1450 μ l ultra saf su eklenerek 2 ml'lik ependorflar içinde karıştırıldı. Ölçüm için hazırlanan bu örneklerden 770 μ l alınarak zeta küvetine aktarıldı. Boyut ve PDI ölçümü zetasizer cihazında DLS yöntemi ile gerçekleştirildi. Zeta potansiyeli ise ELS yöntemi üzerinden hesaplandı. Bütün ölçümler 25 °C'de 3 tekrarlı olarak yapıldı ve ölçümlerin ortalamaları alındı.

3.3.7 Enkapsülasyon Veriminin (EE) Hesaplanması

Bütün nanopartikül örneklerinin sentezlenme aşamasından sonra santrifüjle elde edilen supernatant kısımları nanopartiküllere enkapsüle olmayan peptidlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanıldı. Supernatanttan alınan örneklerin UV-Vis spektrofotometresi kullanılarak 280 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen veriler üzerinden daha önceden hazırlanan kalibrasyon grafiği kullanılarak peptid miktarları tayin edildi. Bu miktarlar Eşitlik 3.1 kullanılarak her bir örnek için hesaplandı.

$$EE(\%) = \frac{(\text{İlk peptid miktarı (mg)} - \text{Enkapsüle olmayan peptid miktarı (mg)})}{\text{İlk peptid miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.3.8 Reaksiyon Veriminin (RV) Hesaplanması

Tekli emülsiyon (o/w) çözücü buharlaştırma tekniğiyle hazırlanan ve son olarak liyofilizatörden kurutularak elde edilen peptid yüklü nanopartiküllerin kuru ağırlıkları hassas terazi yardımı ile ölçüldü. Bu ölçüm sonucu ve ilk başta kullanılan toplam peptid + PLGA polimer miktarı Eşitlik 3.2 üzerinden reaksiyon verimini hesaplamak için kullanıldı.

$$RV(\%) = \frac{\text{Üretilen nanopartikül miktarı (mg)}}{\text{İlk peptid miktarı (mg)} + \text{İlk polimer miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.3.9 Yükleme Kapasitesinin (YK) Hesaplanması

Liyofilizatörde kurutulup -20 °C'de saklanan peptid yüklü nanopartiküllerin kuru ağırlıkları hassas terazi yardımı ile ölçüldü. Elde edilen ölçümler ile enkapsülasyon için kullanılan toplam peptid miktarı ve enkapsüle olmayan peptid miktarı kullanılarak Eşitlik (3.3) üzerinden hesaplama yapılarak yükleme kapasitesi hesaplandı.

$$YK = \frac{(\text{İlk peptid miktarı (mg)} - \text{Enkapsüle olmayan peptid miktarı (mg)})}{\text{Nanopartikül ağırlığı (mg)}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.3.10 FT-IR Ölçümleri

Peptid, boş nanopartikül ve peptid yüklü nanopartiküllerin moleküler karakterizasyonu için FT-IR spektrofotometresi kullanıldı. Daha önceden liyofilizatörde kurutulmuş olan ve -20 °C'de saklanan örneklerin FT-IR spektrumları orta IR (4000–400 cm⁻¹) frekans aralığında ölçüldü.

3.3.11 SEM Analizi

Peptid yüklü ve peptid yüklü olmayan nanopartiküllerin morfolojik analizleri için SEM cihazı kullanıldı. Daha önceden liyofilizatörde kurutulmuş olan örneklerden belirli miktarlarda alınarak cihazın numune ölçüm yerine yerleştirildi. Örneklerin üstü altın ile kaplandı ve örnekler farklı büyütme altında tarandı.

3.3.12 *In-vitro* Salım Çalışmaları

Salım çalışmaları kapsamında peptid yüklü nanoparitiküllerin kümülatif salım davranışları incelendi. İlk olarak, liyofilizatörden kurutulup +4 °C'de saklanan toz halindeki peptid yüklü nanopartiküllerin üzerine *in-vitro* ortamda canlı fizyolojik bir ortam sunan PBS (pH 7.4) çözeltisi eklendi ve salım ölçümleri için +4 °C'de beklemeye alındı. Salım ölçümleri belirli zaman aralıklarında analiz edildi. +4 °C'de bekleyen örnekler her belirlenen sürenin sonunda 9000 rpm'de +4 °C'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda elde edilen supernatant kısımların Uv-Vis spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Santrifüj sonucunda oluşan peptid yüklü nanopartikül pelletlerin üzerine ise taze PBS konuldu ve su banyosu/vortex yardımıyla süspanse edilip salım ölçümü için belirlenen süre kadar beklemek üzere tekrar +4 °C'ye kaldırıldı. Örneklerin elde edilen absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon grafiği yardımıyla supernatant kısımlardaki peptid miktarları bulundu. Elde edilen salım değerleri zamana bağlı kütle hesabı eşitliği kullanılarak kümülatif olarak hesaplandı. Bu işlemler her bir örnek için belirlenen her sürenin sonunda tekrarlandı.

$$P_t = C_t \times V + \sum C(t-1) \times V \quad (3.4)$$

P_t ; t zamanındaki peptid miktarı (mg),

C_t ; t zamanındaki peptid konsantrasyonu (mg/ml),

V ; Salım ortamı hacmi (ml)'dir.

$$M = \frac{P_t}{P_o} \times 100 \quad (3.5)$$

M ; Kümülatif salım yüzdesi (%),

P_t ; t zamanındaki peptid miktarı (mg),

P_o ; Başlangıçta nanopartiküllere yüklenen peptid miktarını (mg) göstermektedir.

3.3.13 Biyouyumluluk Testi

MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür), dört nitrojen atomu içeren pozitif yüklü bir mono-tetrazolyum tuzudur. MTT pozitif yüklü ve hidrofobik olması nedeniyle hücre zarından ve mitokondriyal iç zarından geçebilir ve canlı hücreler tarafından mavi-mor renkli ve suda çözünmeyen formazan adında bir moleküle indirgenir [292], [293]. MTT analizi ise MTT'nin canlı hücreler tarafından formazan kristallerine dönüştürülmesine dayanır. Mitokondriyal aktivite canlı hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır. MTT analizi hedef molekülün canlı hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerin ölçülmesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [294].

3.3.13.1 J774 Hücre Serisinin Kültürünün Yapılması

Sentezlenen Peptid ve Peptid yüklü nanopartiküllerin immunostimulan etkinliklerinin incelemesinin öncesinde sitotoksikite analizi yapıldı. J774 hücre hatları kriyobanktan çıkarılarak 37 °C'ye ayarlanan su banyosunda hızlıca çözöldükten sonra 5 ml %10 FBS'li RPMI besiyeri içeren santrifüj tüpü içine alınarak 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırıldıktan sonra kalan hücreler 25 cm²'lik flaskın içinde bulunan 5 ml %10 FBS içeren besiyerine ekimi yapıldı. Flask 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu. İnkübasyonun 48. saatinde flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldı. 96 saatlik inkübasyon sonucu konflent olması beklenen hücre hattı sitotoksik teste tabi tutuldu.

3.3.13.2 MTT Yöntemi ile Sitotoksikitenin Tayin Edilmesi

Serbest antijenik peptid molekülü ve peptid yüklü NP2'nin farklı konsantrasyonları, seçtiğimiz hücre hattında hücrelerin canlılığına olan etkisi MTT adı verilen yöntem ile test edildi. Her bir formülasyon için 1-1000 µg/ml konsantrasyon aralığı incelendi. MTT analizi için 96 kuyucuklu plakaya her bir kuyucuğa 1x10⁴ hücre/ml olacak şekilde ekim yapıp 24 saat inkübasyona bırakıldı. Serbest antijenik peptid molekülü ve NP2 için seçilen konsantrasyon aralıkları bu hücrelerin üzerine ekildi. Hücrelerin canlılıklarının belirlenmesi için 96 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 dk karanlık ortamda oda sıcaklığında tutulan mikrolakların her bir kuyucuğundaki optik yoğunluk değeri bu sürenin ardından 540 nm’de ELISA Reader’da okutuldu.

3.3.14 Peptid ve NP2’nin NO ve Sitokin Üretme Etkinliklerinin *In Vitro* Tayini

3.3.14.1 NO Tayini

NO, kardiyovasküler sistem, merkezi ve periferik sinir sistemi ve bağışıklık sisteminin fizyolojik ve patofizyolojik olaylarında çeşitli ve karmaşık işlevlere sahip olan bir moleküldür. NO çeşitli bulaşıcı hastalıkların patogeneğinde anahtar role sahip moleküllerden biridir [295], [296]. NO, sitokin üretimini uyarabilir ve makrofajların hücre içi patojenleri öldürmesine yol açabilir. Böylece NO, enfeksiyonlara karşı bağışıklık tepkisini arttırabilen bir moleküldür [297].

Bu nedenle aşı çalışamalarında makrofajların immunojenik moleküle maruz kaldıktan sonra NO üretiminin artması immun cevabın da arttığı anlamına gelir. NO seviyesinin ölçülmesiyle immunojenik molekülün yeterli immun cevabı oluşturup oluşturmadığı da belirlenebilir.

MTT yöntemi ile hücre için toksik olmayan konsantrasyonları belirlenen antijenik peptid moleküllerinin ve NP2’nin NO üretme kapasiteleri tayin edildi. NO analizi için J774 fare makrofaj hücre hattı kullanıldı. Bu hücre hattının *in vitro* koşullarda immünostimulan moleküllerle indüklendikten sonra NO ürettikleri yapılan pek çok çalışmada mevcuttur [298]–[301]. NO ölçümü Griess Reaksiyonu ile spektrofotometrik olarak yapıldı. Griess Reaksiyonu 2 adımda gerçekleşir. İlk adımda hazırlanan Griess reaktifinin içerisindeki nitrit iyonu sulfanilamit ile reaksiyona girerek diazonyum iyonuna dönüşür. Oluşan bu iyonlar da N-(1-Naftil)etilendiamin ile bağlanarak kromoforik azo türevlerine dönüşür. Son olarak 540 nm’de okuma yapılır. NO ölçümü yapılmadan önce Griess reaktifinin ve reaksiyonda kullanılacak standart çözeltilerin hazırlanması gerekir.

Griess reaktifi ve standartlar hazırlandıktan sonra NO tayin işlemine geçildi. Bunun için 96 kuyucuklu mikrolaklar J774 makrofaj hücre hatlarıyla kaplandı. Daha sonra tüm formülasyonların non-toksik konsantrasyonları ve bu konsantrasyonların alt ve üstündeki 3 farklı konsantrasyon 50 µl olacak şekilde

hazırlandı. Her bir konsantrasyondaki örnekten kuyucuklara 50 µl eklendi ve mikropipler 37 °C'de 96 saat inkübe edildi. Her bir kuyucuktaki süpernatantlar NO ve daha sonraki aşamada gerçekleştirilecek olan sitokin tayininde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

NO tayini için elde edilen süpernatantlardan ve hazırlanan standartlardan 50 µl, yeni plaktaki kuyucuklara aktarıldı ve yeni plaktaki her bir kuyucuk üzerine Griess reaktifinden 50 µl eklendi. 10 dk karanlıkta bekletilen mikropiplerin UV ölçümü 540 nm'de spektrofotometrik olarak yapıldı. Standartların elde edilen absorpsiyon değerlerinden standart kalibrasyon eğrisi çizildi ve her bir aşı formülasyonuna ait farklı konsantrasyonlar için NO üretim miktarı bu eğri yardımıyla hesaplandı.

3.3.14.2 Sitokin Tayini

Sitokin, immün/inflamatuar yanıtta katılan hücrelerin etkinliklerinde artış sağlanması için uyarılmış lenfositler, monositler ve makrofajlar ile diğer bazı somatik hücreler tarafından sentezlenen peptid veya glikoprotein yapısındaki moleküllerdir [302].

Bu çalışmada, antijenik serbest peptid molekülü ve peptid yüklü NP2'nin J774 hücre hattı üzerinde; interferon- γ (IFN- γ), interleukin-10 (IL-10) ve interleukin-12 (IL-12) sitokinlerinin miktarını artırıp artırmadığı araştırıldı. J774 hücre hattının belirli antijenlerle uyarıldıktan sonra yüksek seviyede Th1 aracılı sitokinleri ürettikleri yapılan çalışmalarla gösterilmektedir [303]–[305]. Bu nedenle bu hücre hattı kullanılarak elde edilecek sonuçların insanlar üzerinde yapılacak çalışmalarda sonuçları daha yüksek bir doğruluk oranıyla yansıtılabileceği düşünülür.

IFN- γ , IL-10, IL-12 sitokinleri bağışıklık aracılığı ile inflamasyonu düzenleyen sitokinlerdir. Bu grup sitokinler, antijenle uyarılmış CD4+ ve CD8+ T lenfositler tarafından uyarılırlar ve inflamatuvar lökositleri aktive ederler. IFN- γ , mononükleer fagositlerin güçlü bir aktivatörüdür ve antiviral etkiyi artırır. IL-10, aktive edilmiş makrofajlar ve Th2 hücreleri tarafından üretilir. Makrofajlar tarafından sitokinlerin üretimini inhibe eder ve makrofajların T hücresi aktivasyonundaki işlevlerini engeller [306]. IL-12 ise, aktive edilmiş makrofajlar ve dendritik hücreleri

tarafından üretilir. Bu sitokinler IFN- γ üretimini ve Th hücrelerin Th1 hücrelere farklılaşmasını uyarır [307].

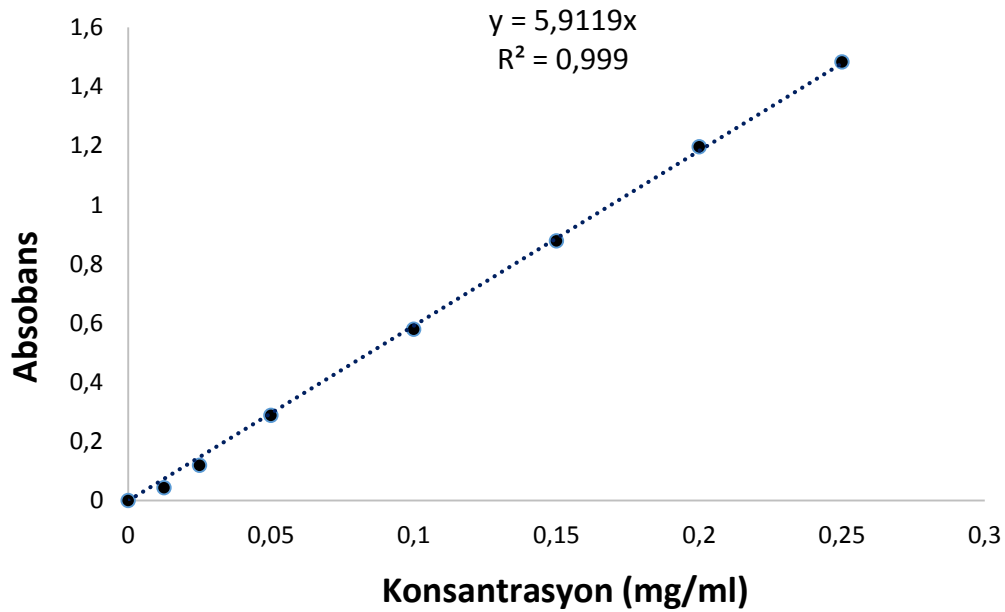
IFN- γ ve IL-12 sitokinleri Th1 hücreleri tarafından üretilirken, IL-10 Th2 hücreleri tarafından üretilir. Th1 hücreleri tarafından üretilen sitokinler makrofajları aktive eder ve sitotoksik lenfositlerin oluşumunda yer alırlar ve bu durum hücre-aracılı immune yanıt ile sonuçlanır [308].

Antijenik Peptid molekülü ve NP2 ile muamele edilen makrofajlardan salgılanan ve Th1/Th2 immun yanıtı indükleyen İnterlökin-10 ve İnterlökin-12 sitokinlerinin miktarı ELISA yöntemi ile tayin edildi.



4.1 Peptid Kalibrasyon Eğrisi

Peptidin 280 nm dalga boyunda Uv-Vis spektrofotometre kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.1’de gösterildi.



Şekil 4.1 Peptid kalibrasyon grafiği

Kalibrasyon grafiğinin çizilmesi sonucunda elde edilen denklemin eğim değeri 5,9119 olup denklemin regresyon katsayısı 0,999’dur.

Peptid yüklü nanopartikül sentezleri sonucunda hesaplanan enkapsülasyon veriminin, yükleme kapasitesinin ve *in-vitro* salım çalışmalarında ortama salınan peptid miktarının bulunmasında elde edilen bu kalibrasyon grafiği kullanıldı.

4.2 Tekli Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Tekniğiyle Sentezlenen Boş ve Peptid Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.2.1 Birinci Deney Tasarımındaki Boş Nanopartiküllerin Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi

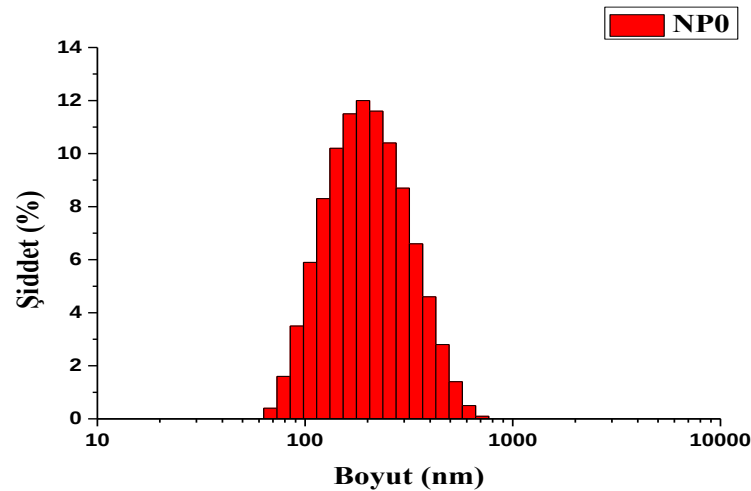
Ultrasonikasyon cihazı ile yapılan homojenizasyon sonucu sentezlenen boş nanopartiküllerin (NP0) boyut analizi yapıldı, partikül büyüklüğü/boyutu dağılımını ifade eden PDI ve yüzey yükünü gösteren zeta potansiyel değerleri belirlendi.

NP0'ın, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.1'de gösterildi.

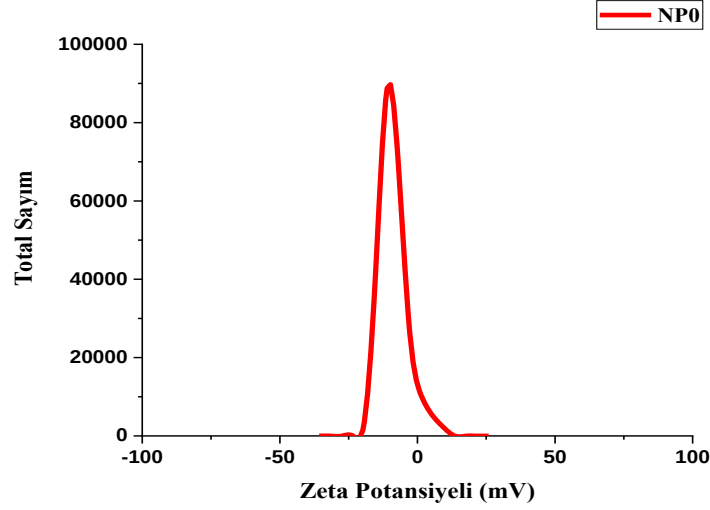
Tablo 4.1 Birinci deney tasarımındaki NP0'ın boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri

	Başlangıç Bileşenler		Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
	Peptid(mg)	PLGA(mg)			
NP0	0	10	182 ±2	0,215 ±0,01	-7,48 ±1,2

Birinci deney tasarımındaki NP0'ın boyut dağılım grafiği Şekil 4.1'de ve zeta potansiyel grafiği ise Şekil 4.2'de verildi.



Şekil 4.2 NP0'ın boyut dağılım grafiği



Şekil 4.3 NP0'ın zeta potansiyeli

4.2.2 Birinci Deney Tasarımındaki NP0'ın Reaksiyon Verimi Sonucu

Nanopartiküllerin sentezlenme işleminden sonra liyofilizatörde kurutulan boş nanopartikül örneği için bölüm 3.3.7'deki eşitlik 3.2 kullanılarak reaksiyon verimi hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4.2 de gösterildi.

Tablo 4.2 Birinci deney tasarımındaki NP0'ın reaksiyon verimi

	Başlangıç Bileşenler		Reaksiyon Verimi	
	Peptid(mg)	PLGA(mg)	Miktarı(mg)	Verimi(%)
NP0	0	10	3.2	32

4.2.3 Birinci Deney Tasarımındaki Peptid Yüklü Nanopartikül'lerin Boyut ve Zeta Potansiyeli Analizi

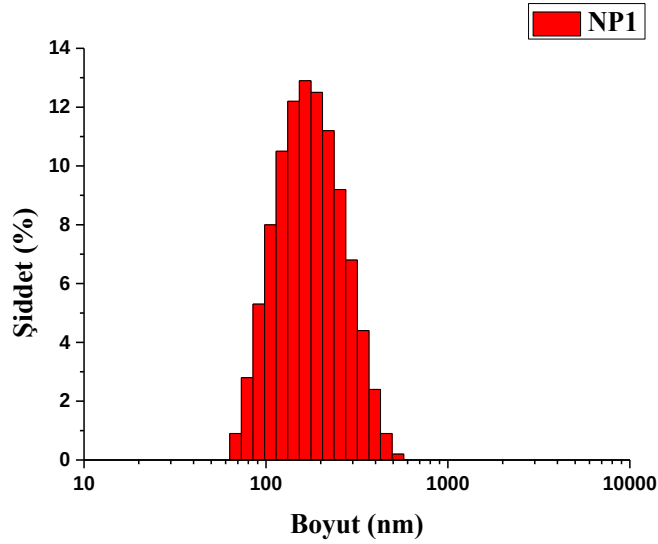
Ultrasonikasyon cihazı ile yapılan homojenizasyon işlemi sonucunda sentezlenen peptid yüklü beş nanopartikül örneğinin (NP1, NP2, NP3, NP4, NP5) boyut analizleri yapıldı, partikül büyüklüğü/boyutu dağılımını ifade eden PDI ve yüzey yükünü gösteren zeta potansiyel değerleri belirlendi.

Peptid yüklü nanopartiküllerin partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.3' te gösterildi.

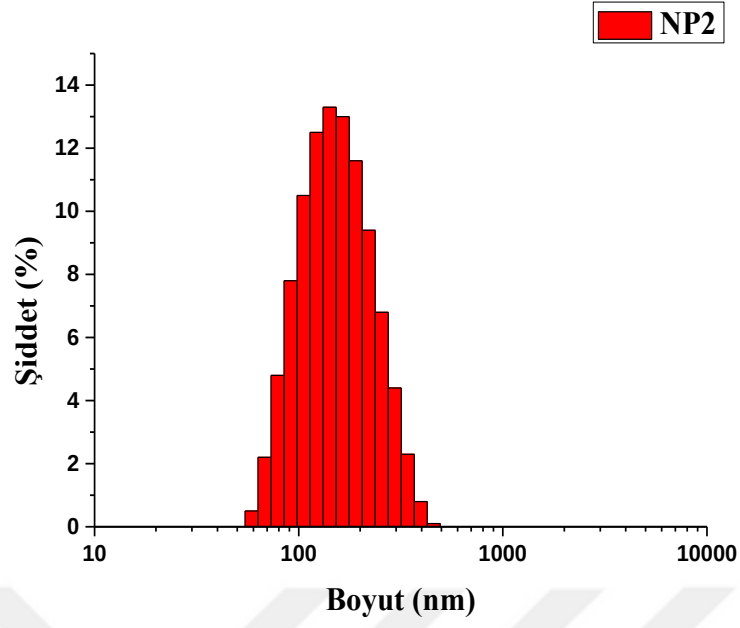
Tablo 4.3 Peptid yüklü PLGA nanopartiküllerin boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri

	Bileşenler		Boyut A-Ave (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
	Peptid (mg)	PLGA (mg)			
NP1	1	10	159,5 ±0,7	0,148	-8,25 ±0,7
NP2	2	10	138,9 ±0,4	0,161 ±0,02	-6,44 ±0,3
NP3	3	10	159,8 ±1,9	0,189	-6,29 ±0,6
NP4	4	10	199,6 ±0,6	0,337 ±0,02	-6,96 ±0,4
NP5	5	10	209,3 ±0,07	0,235 ±0,01	-6,95 ±0,2

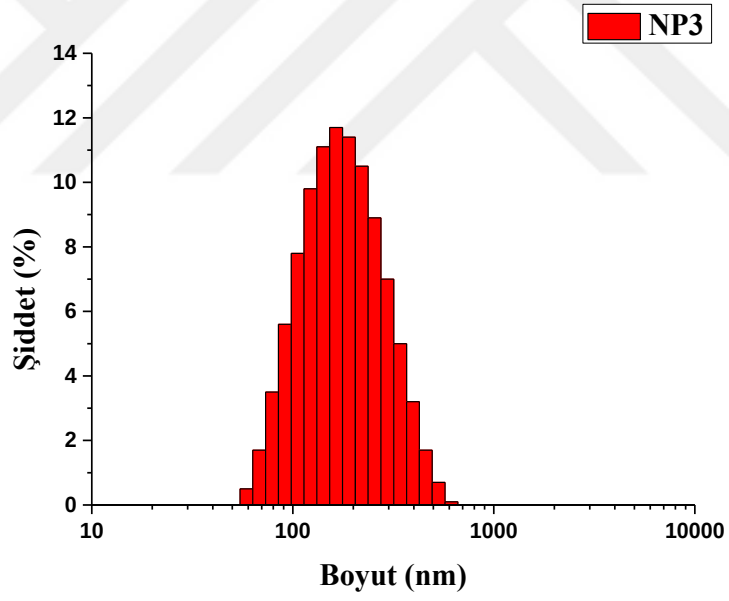
NP1, NP2, NP3, NP4 ve NP5'in boyut dağılım grafikleri Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verildi. NP1, NP2, NP3, NP4 ve NP5'in Zeta potansiyel grafikleri ise Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12'de verildi.



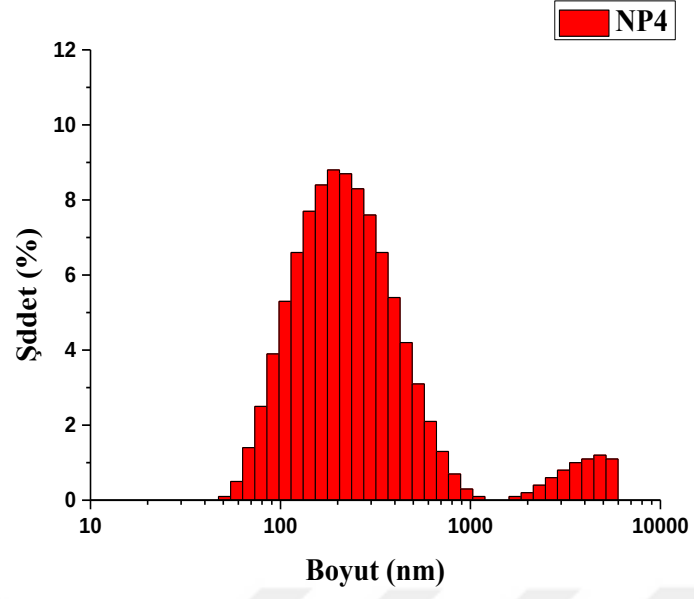
Şekil 4.4 NP1'in boyut dağılım grafiği



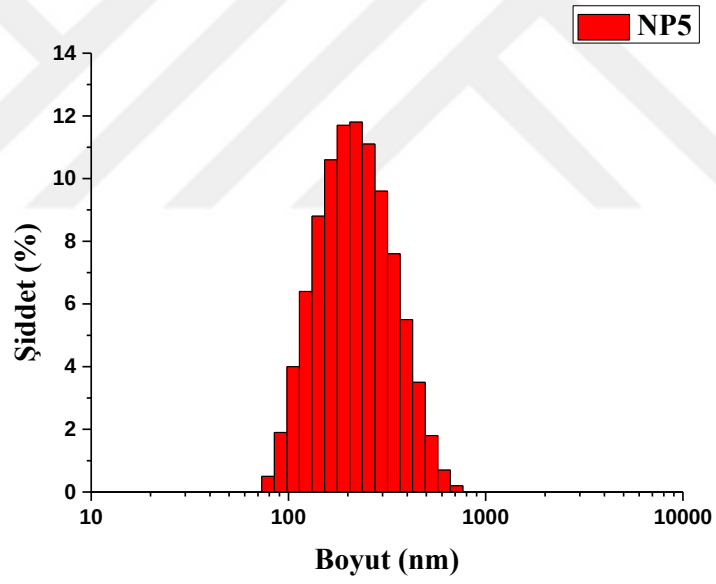
Şekil 4.5 NP2'nin boyut dağılım grafiği



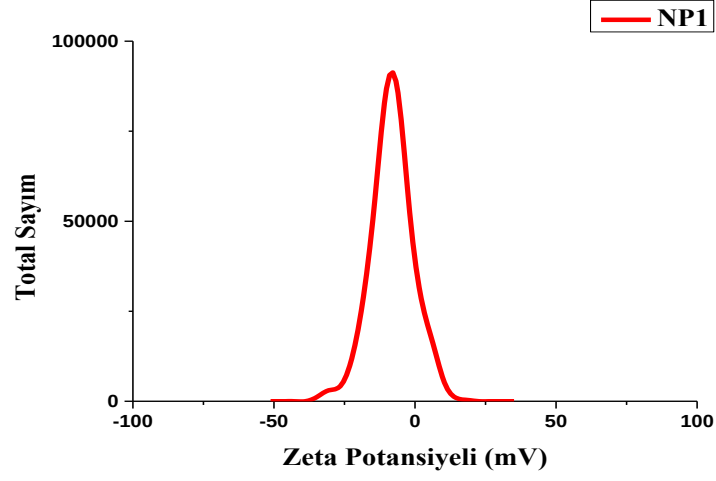
Şekil 4.6 NP3'ün boyut dağılım grafiği



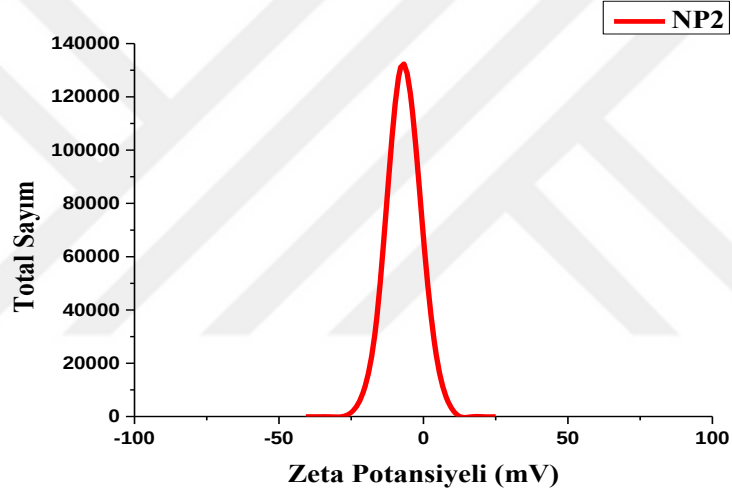
Şekil 4.7 NP4'ün boyut dağılım grafiği



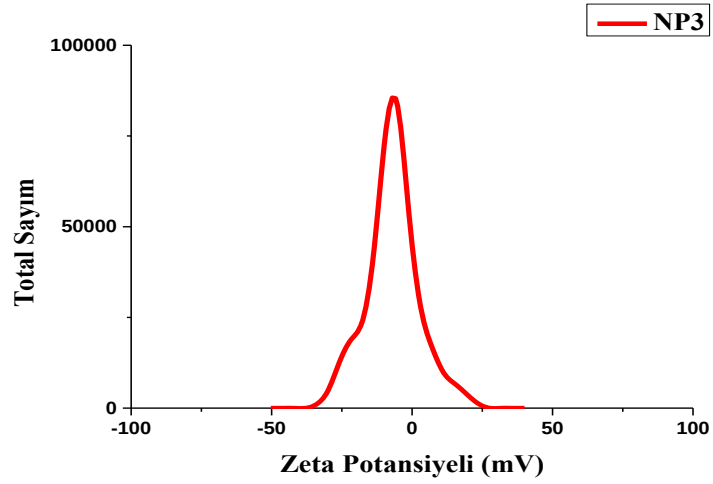
Şekil 4.8 NP5'in boyut dağılım grafiği



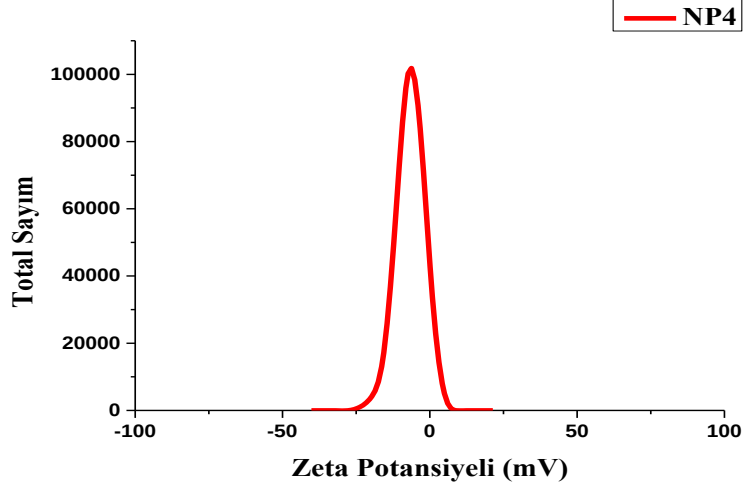
Şekil 4.9 NP1'in zeta potansiyel grafiği



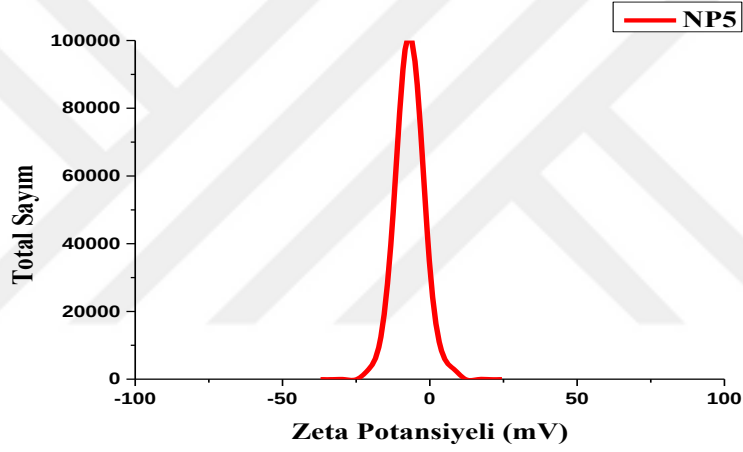
Şekil 4.10 NP2'nin zeta potansiyel grafiği



Şekil 4.11 NP3'ün zeta potansiyel grafiği



Şekil 4.12 NP4'ün zeta potansiyel grafiği



Şekil 4.13 NP5'in zeta potansiyel grafiği

4.2.4 Birinci Deney Tasarımındaki Peptid Yüklü Nanopartiküllerinin Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Verimi ve İlaç Yükleme Kapasitesi

Nanopartiküllerin sentezlenme işleminden sonra liyofilizatörde kurutulan örnekler için Bölüm 3.3.7'de ki 3.2 eşitliği kullanılarak reaksiyon verimleri, Bölüm 3.3.6'daki 3.1 eşitliği kullanılarak enkapsülasyon verimleri ve Bölüm 3.3'teki 3.3 eşitliği kullanılarak ilaç yükleme kapasiteleri hesaplandı. Hesaplama sonuçları Tablo 4.4'te gösterildi.

Tablo 4.4 Peptid yüklü nanopartiküllerin reaksiyon verimi, enkapsülasyon verimi ve ilaç yükleme kapasiteleri

	Başlangıç Bileşenler		Reaksiyon		Enkapsülasyon Verimi (%)	İlaç yükleme kapasitesi (%)
	Peptid (mg)	PLGA (mg)	Miktarı (mg)	Verimi (%)		
NP1	1	10	2,5	22,72	43,3	17,32
NP2	2	10	1,65	13,75	45,31	54,92
NP3	3	10	2,6	20	36,4	41,96
NP4	4	10	2,8	20	36,3	58,08
NP5	5	10	3	20	31,28	52,13

NP1'in reaksiyon verimi %22,72, enkapsülasyon verimi %43,3 ve ilaç yükleme kapasitesi %17,32, NP2'nin reaksiyon verimi %13,75, enkapsülasyon verimi %45,31 ve ilaç yükleme kapasitesi 54,92, NP3'ün reaksiyon verimi %20, enkapsülasyon verimi %36,4 ve ilaç yükleme kapasitesi 41,96, NP4'ün reaksiyon verimi %20, enkapsülasyon verimi %36,3 ve ilaç yükleme kapasitesi 58,08 ve son olarak NP5'in reaksiyon verimi %20, enkapsülasyon verimi %31,38 ve ilaç yükleme kapasitesi 52,13 olarak hesaplandı. NP2 ve NP4 örneklerinin en yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olduğu görüldü. İleriki çalışmalarda NP2 ve NP4'ün peptid/PLGA oranları baz alındı ve miktarlar 10 katına çıkarıldı. 2. sentez 20 mg peptid + 100 mg PLGA ve 40 mg peptid + 100 mg PLGA üzerinden yapıldı. Boş nanopartikül sentezi için sadece 100 mg PLGA kullanıldı.

4.2.5 İkinci Deney Tasarımındaki Boş Nanopartiküllerin Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi

Ultrasonifikasyon cihazı ile homojenizasyon sonucu sentezlenen boş nanopartiküllerin (NP0) boyut analizleri yapıldı, partikül büyüklüğü/boyutu

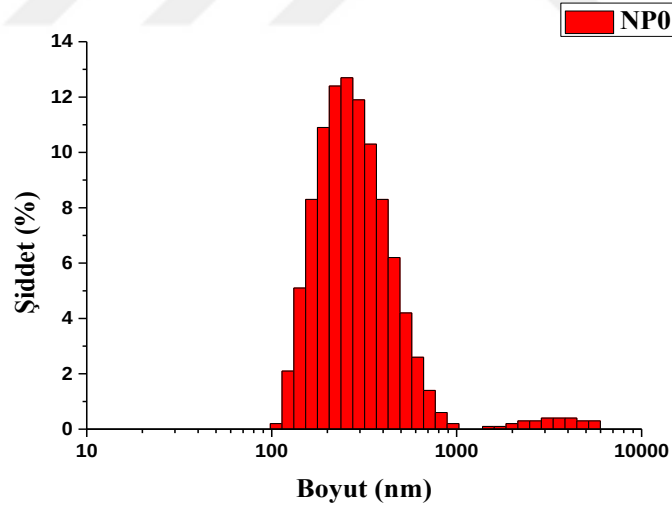
dağılımını ifade eden PDI ve yüzey yükünü gösteren zeta potansiyel değerleri belirlendi.

NP0'ın partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.5'te gösterildi.

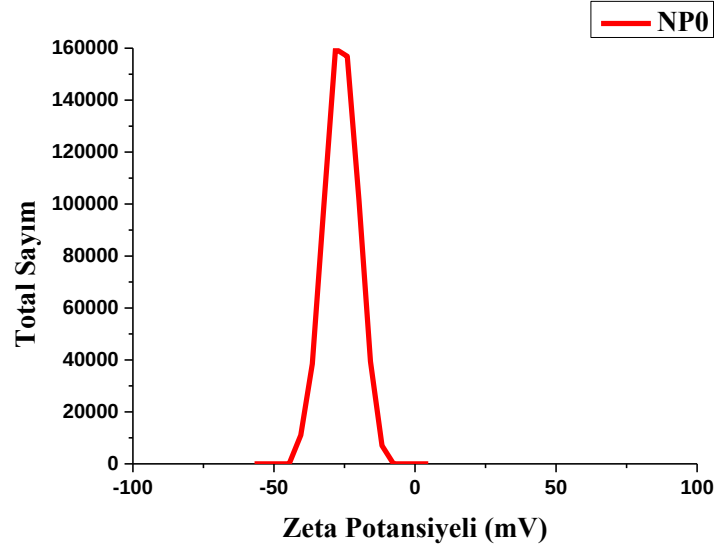
Tablo 4.5 NP0'ın boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri

	Başlangıç Bileşenler		Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
	Peptid (mg)	PLGA (mg)			
NP0	0	100	260,9 ±1	0,177	-26 ±0,2

NP0'ın boyut dağılım grafiği Şekil 4.14'te ve zeta potansiyel grafiği ise Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.14 NP0'ın boyut dağılım grafiği



Şekil 4.15 NP0'ın zeta potansiyel grafiği

4.2.6 İkinci Deney Tasarımındaki NP0'ın Reaksiyon Verimi

Nanopartiküllerin sentezlenme işleminden sonra liyofilizatörde kurutulan NP0 örneği için bölüm 3.3.7'deki eşitlik 3.2 kullanılarak reaksiyon verimi hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4.6'da gösterildi.

Tablo 4.6 NP0'ın reaksiyon verimi

	Başlangıç Bileşenler		Reaksiyon Verimi	
	Peptid(mg)	PLGA(mg)	Miktarı(mg)	Verimi(%)
NP0	0	100	68	68

4.2.7 İkinci Deney Tasarımındaki Peptid Yüklü Nanopartiküllerin Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi

Ultrasonifikasyon cihazı ile homojenizasyon sonucu sentezlenen peptid yüklü nanopartiküllerin (NP2 ve NP4) boyut analizleri yapıldı, partikül büyüklüğü/boyutu dağılımını ifade eden PDI ve yüzey yükünü gösteren zeta potansiyel değerleri belirlendi.

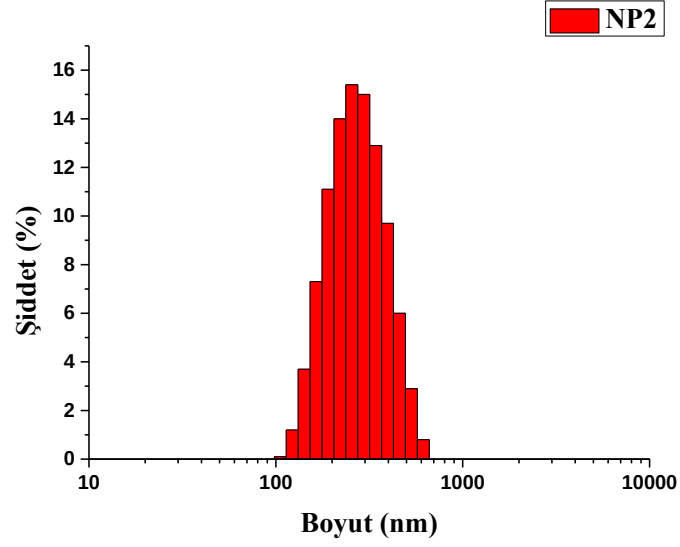
NP2 ve NP4'ün boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.7'de gösterildi.

Tablo 4.7 NP2 ve NP4'ün boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri

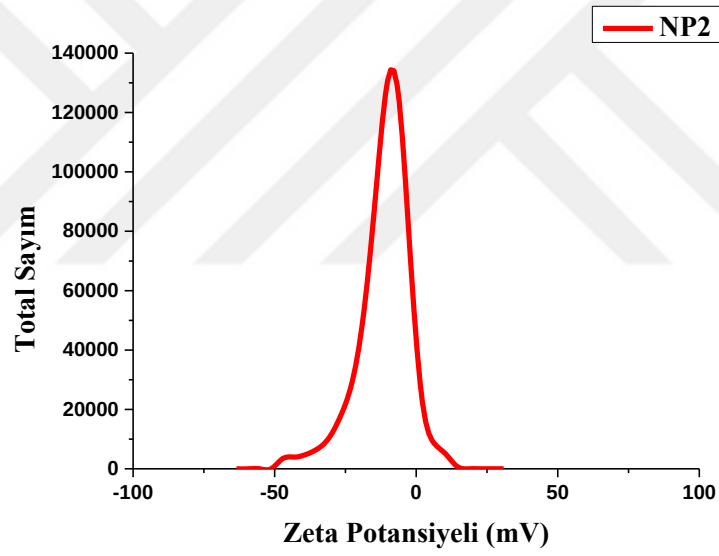
	Başlangıç Bileşenler		PVA		Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
	Peptid (mg)	PLGA (mg)	%	ml			
NP2	20	100	3	4	250,3 ±0,1	0,116	-11,1 ±0,5
NP4	40	100	3	4	223,3 ±4,3	0,088	-8,01 ±0,4

NP2'nin boyutu 250,3 nm, PDI 0,116 ve zeta potansiyeli -11,1 mV olarak bulundu. NP4'ün ise boyutu 223,3 nm, PDI 0,088 ve zeta potansiyeli de 8,01 Mv olarak bulundu. Her iki nanopartikül boyutu, nanopartiküller için literatürde verilen boyut aralığına uygundur [181]. NP2'nin PDI değerinin 0,116 ve NP4'ün PDI değerinin 0,088 olması nanopartiküllerin ortalama parçacık boyutu dağılımının yüksek olduğunu gösterir. Çünkü PDI değeri 1 ile 0 arasında değişir ve bu değer 0'a ne kadar yakınsa ortalama parçacık boyutu dağılımı da o kadar yüksektir. NP2 ve NP4'ün zeta potansiyelleri beklendiği gibi negatif çıkmıştır. Çünkü nanopartiküllerin yüzlerinde bulunan iyonize olmuş karboksil gruplarının varlığı ve PVA'da bulunan hidroksil grupları yüzünden nanopartiküllerin zeta potansiyellerinin negatif olması gerekir. Zeta potansiyelinin negatif veya pozitif olarak yüksek olması süspansiyonun oldukça az aglomere olması anlamına gelir. Zeta potansiyel değerleri -11,1 mV ve -8,01 mV ile nispeten ortalama bir değerdendirler. Nanopartiküllerin yüzeyinde PVA kalıntısının olması zeta potansiyeli değerini düşürür. Çünkü kalıntı PVA nanopartikül arayüzeyinde polimere bağlanabilir ve serbest karboksil gruplarının varlığını azaltabilir.

NP2'nin boyut dağılım grafiği Şekil 4.16'da ve zeta potansiyel grafiği ise Şekil 4.17'de verildi.

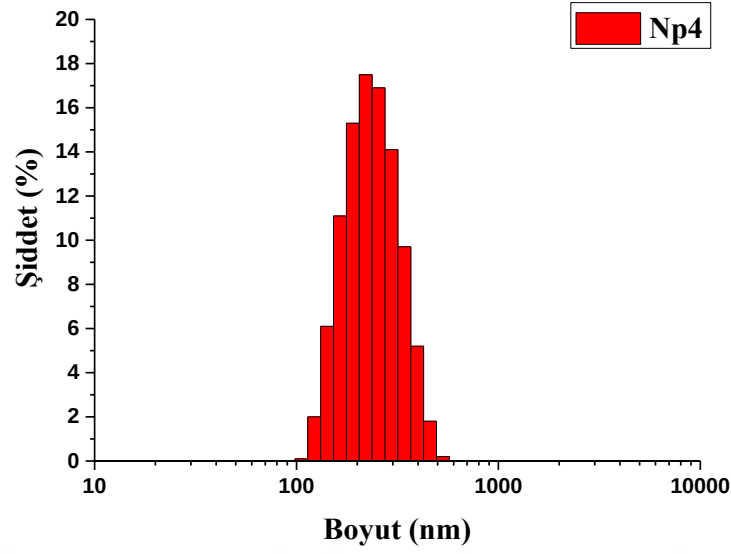


Şekil 4.16 NP2'nin boyut dağılımı grafiği

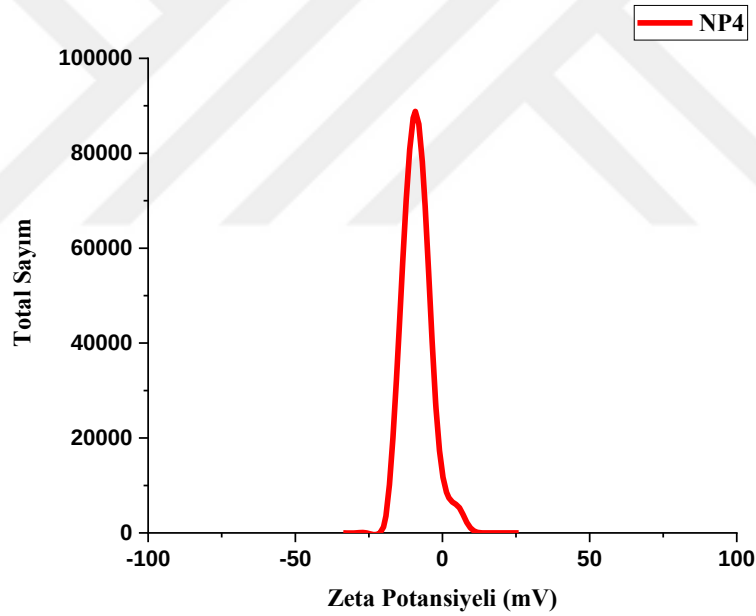


Şekil 4.17 NP2'nin zeta potansiyel grafiği

NP4'ün boyut dağılım grafiği Şekil 4.18'de ve zeta potansiyel grafiği ise Şekil 4.19'da verildi.



Şekil 4.18 NP4'ün boyut dağılımı grafiği



Şekil 4.19 NP4'ün zeta potansiyel grafiği

4.2.8 İkinci Deney Tasarımındaki NP2 ve NP4'ün Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Verimi ve İlaç Yükleme Kapasitesi

Nanopartiküllerin sentezlenme işleminden sonra liyofilizatörde kurutulan örnekler için Bölüm 3.3.7'de ki 3.2 eşitliği kullanılarak reaksiyon verimleri, Bölüm 3.3.6'daki 3.1 eşitliği kullanılarak enkapsülasyon verimleri ve Bölüm 3.3'teki 3.3

eşitliği kullanılarak ilaç yükleme kapasiteleri hesaplandı. Hesaplama sonuçları Tablo 4.8’de gösterildi.

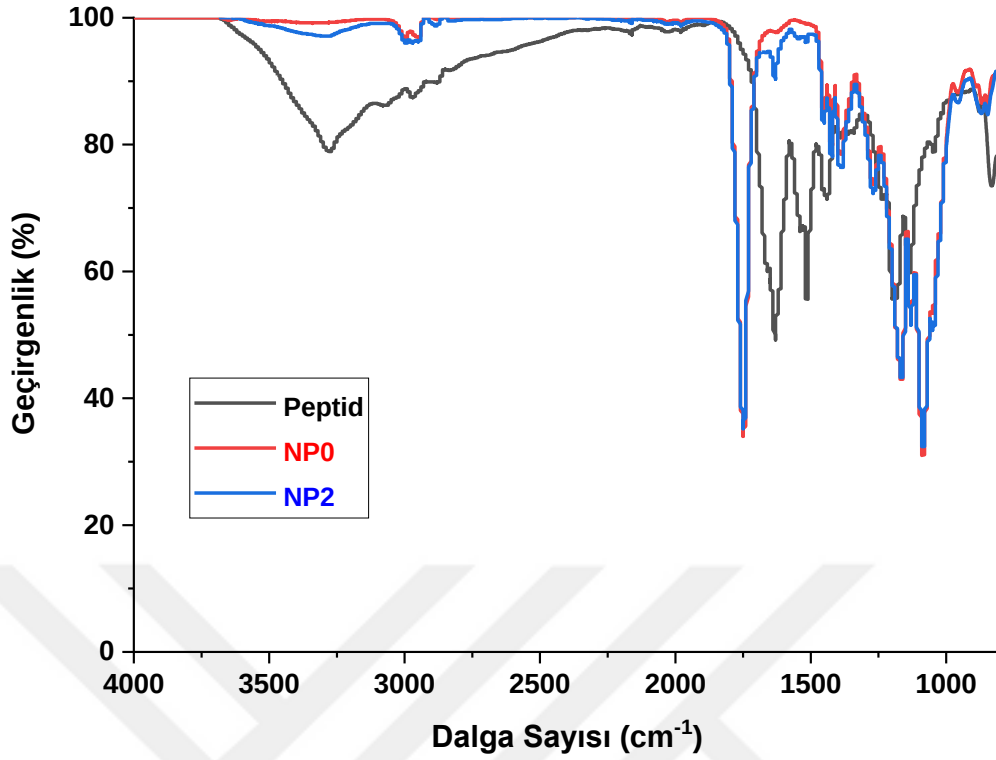
Tablo 4.8 NP2 VE NP4’ün reaksiyon verimi, enkapsülasyon verimi ve ilaç yükleme kapasiteleri

	Başlangıç Bileşenler		Reaksiyon Verimi		Enkapsülasyon Verimi	İlaç yükleme kapasitesi %
	Peptid (mg)	PLGA (mg)	Miktarı (mg)	Verimi (%)		
NP2	20	100	71,5	59,6	40	11,2
NP4	40	100	67	47,9	15	8,95

NP2’nin reaksiyon verimi %59,6, enkapsülasyon verimi %40 ve ilaç yükleme kapasitesi %11,2 olarak bulundu. NP4’ün reaksiyon verimi %47,9, enkapsülasyon verimi %15, ve son olarak ilaç yükleme kapasitesi %8,95 olarak bulundu. Elde edilen sonuçlara göre bütün nanopartiküllerde peptidlerimiz başarılı bir şekilde enkapsüle edildi. Ancak yüksek reaksiyon, enkapsülasyon verimi ve ilaç yükleme kapasitesine sahip olmasından dolayı 20 mg peptid + 100 mg PLGA ile hazırlanan NP2 ileriki çalışmalar ve analizler için en uygun aday olarak seçildi.

4.2.9 NP0, Peptid Ve Peptid Yüklü NP2’nin FT-IR Analizleri

FT-IR sayesinde nanopartiküllerdeki fonksiyonel grupların kimyasal analizleri başarılı bir şekilde yapılabilir. Peptidin nanopartiküle enkapsülasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediği FT-IR ile belirlendi. Eğer enkapsülasyon başarılı bir şekilde gerçekleştiyse peptid yüklü nanopartikülün FT-IR spektrumunun boş nanopartikülün FT-IR spektrumu ile aynı karakteristik özelliğe sahip olması gerekir ve peptide ait bant özelliklerin peptidin nanopartiküle enkapsüle olmasından sonra görülmemesi gerekir. Bu amaçla, peptid, NP0 ve NP2’nin spektrumları Şekil 4.20’de birlikte verildi.



Şekil 4.20 Peptid, boş PLGA nanopartikülü (NP0) ve peptid yüklü nanopartikül (NP2)'nin karşılaştırmalı FT-IR analizi

PLGA polimerinin sahip olduğu karaktersitik bantlar FT-IR spektrumunda izlenebilir. 2995 cm^{-1} bandı $-\text{CH}_2$ 'nin C-H gerilme titreşimini, 1748 cm^{-1} bandı esterdeki karbonil $-\text{C}=\text{O}$ güçlü gerilme titreşimini gösterir. Ayrıca 1451 cm^{-1} bandı polimer yapısında bulunan metil gruplarının ($-\text{CH}_3$) C-H eğilme titreşimlerini gösterir. Son olarak 1165 cm^{-1} ve 1085 cm^{-1} bantları da C-O gerilme titreşimini gösterir.

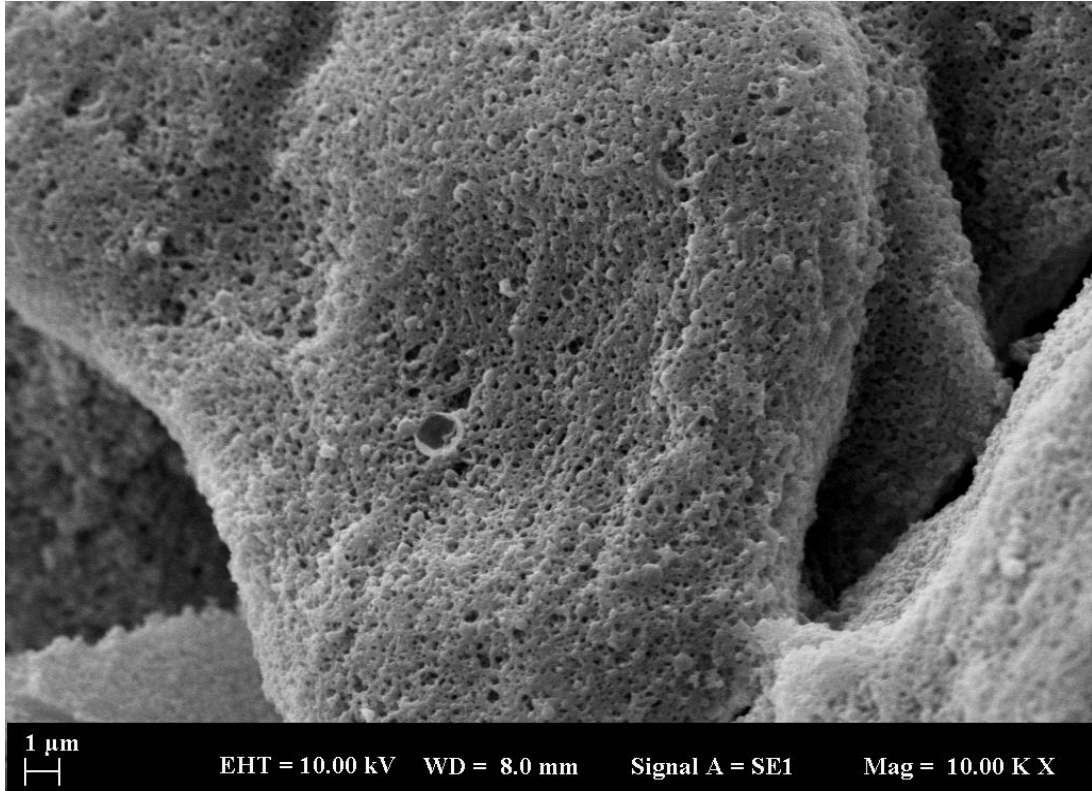
Serbest peptid molekülünün sahip olduğu karakteristik bantlar FT-IR spektrumunda görülebilir. 3274 cm^{-1} 'de görülen bant $-\text{OH}$ bandını gerilme titreşimini, 1439 cm^{-1} 'de görülen bant ise $-\text{OH}$ bandının bükülme titreşimlerini gösterir. 1632 cm^{-1} bandındaki bant, bir amino asidin karboksilik grubu ile başka bir amino asidin amin grubu arasında oluşan amid-I bağındaki $\text{C}=\text{O}$ gerilme titreşimini gösterir. Son olarak 833 cm^{-1} ve 799 cm^{-1} bantları $-\text{C}-\text{H}$ bükülmelerini gösterir.

Peptid yüklü NP2 nanopartiküllerin FT-IR spektru incelendiğinde serbest peptid molekülünün temel bandı olan 1632 cm^{-1} 'de görülen bandın önemli ölçüde indirgendiği görülebilir. Bu durum, serbest peptid molekülünün PLGA polimerine başarılı bir şekilde enkapsüle olduğunu gösterir. Ayrıca PLGA ve peptid yüklü NP2'nin FT-IR spektrumları birbiriyle yüksek oranda örtüştüğü görüldü.

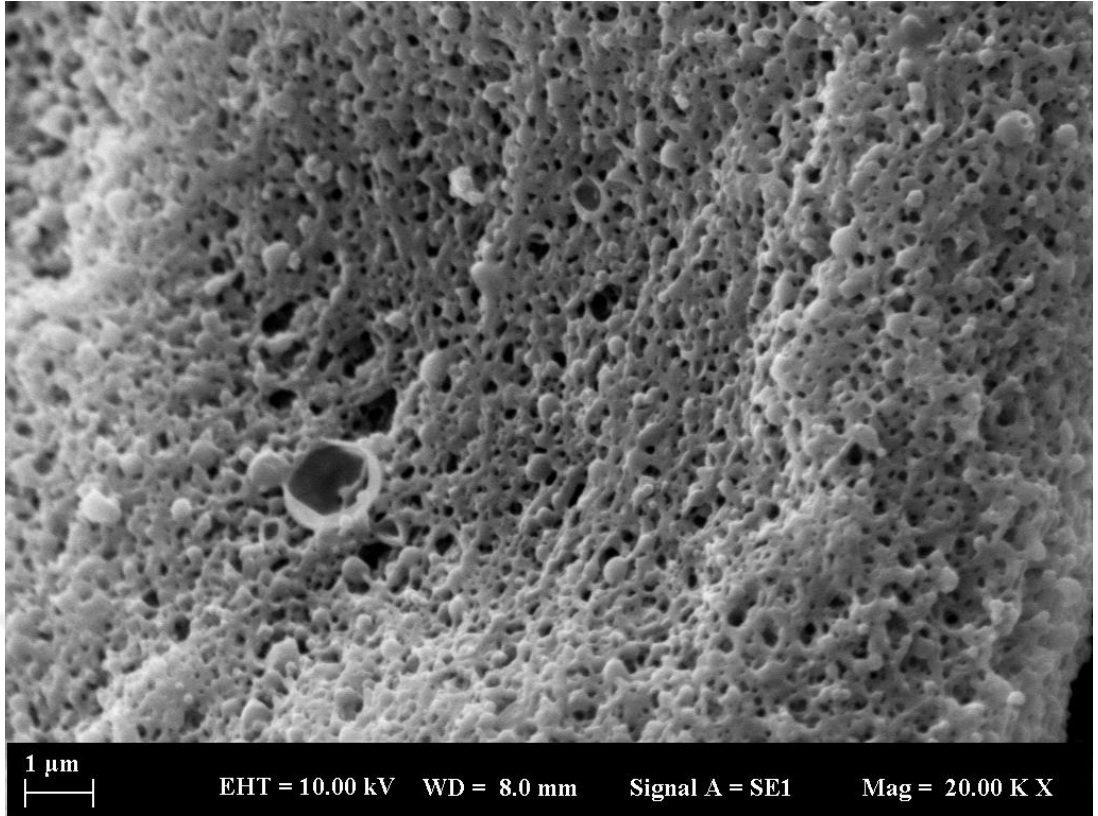
4.2.10 NP2'nin SEM Analizi

NP2 nanopartiküllerin morfolojik analizleri SEM cihazı ile farklı büyütme oranlarında gerçekleştirildi.

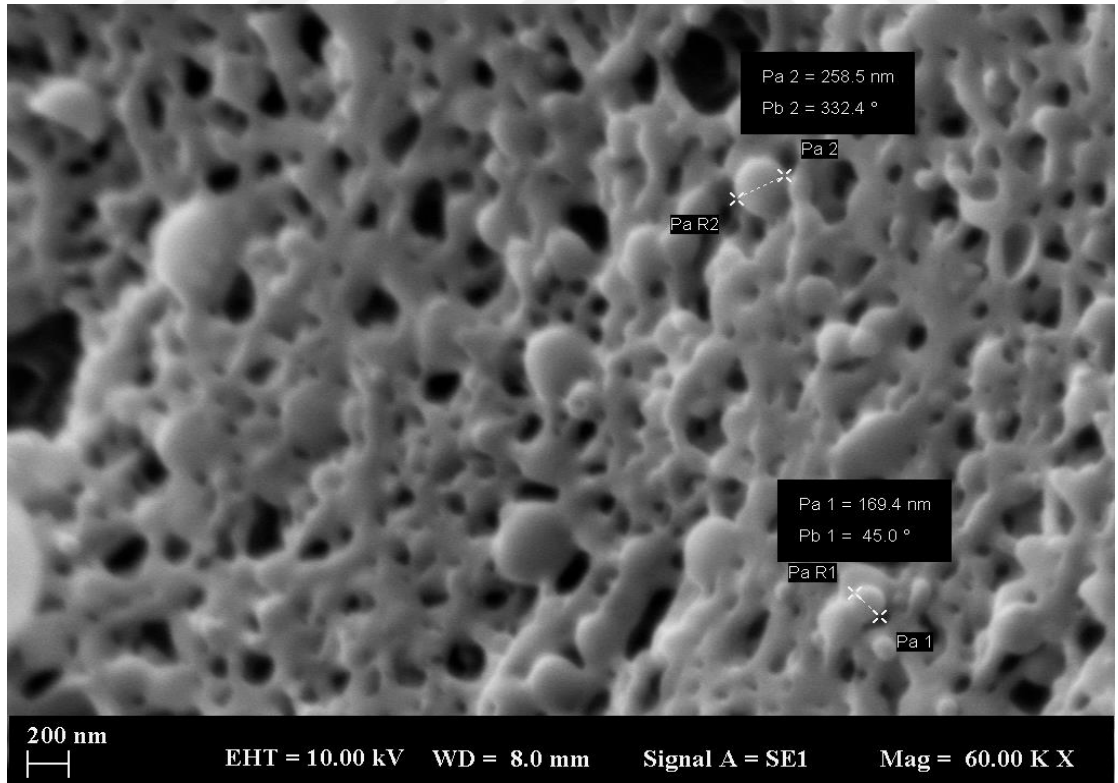
NP2 nanopartiküllerin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri Şekil 4.21, Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'te verildi.



Şekil 4.21 NP2 nanopartiküllerin 10.00 K X büyütmede alınan SEM görüntüsü



Şekil 4.22 NP2 nanopartiküllerin 20.00 K X büyütmede alınan SEM görüntüsü



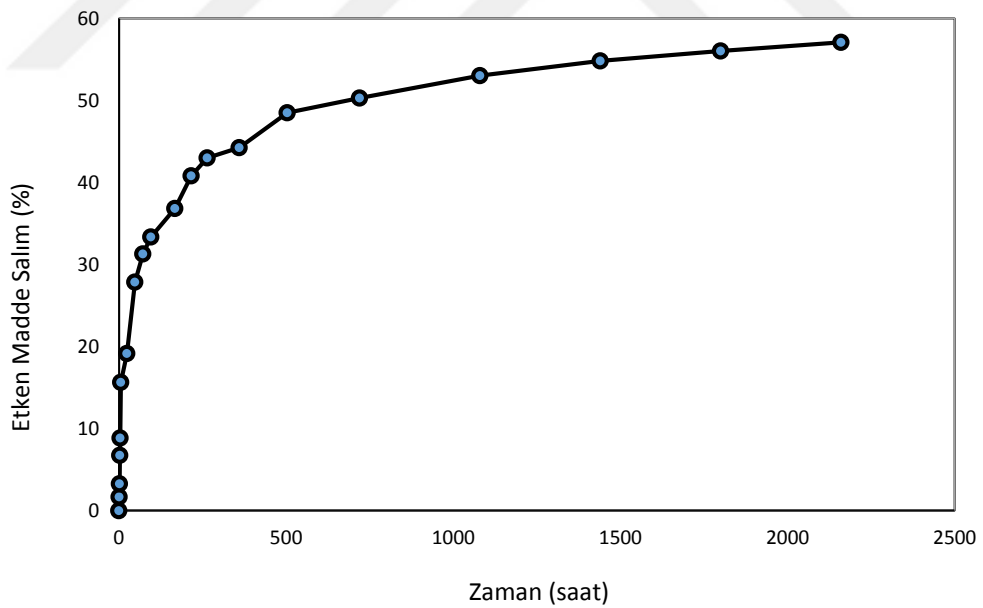
Şekil 4.23 NP2 nanopartiküllerin 60.00 K X büyütmede alınan SEM görüntüsü

4.2.11 NP2'nin İn-Vitro Salım Çalışmaları

Peptid yüklü NP2'nin kümülatif salım çalışmaları 90 gün boyunca yürütüldü ve salım profili incelendi. Belirlenmiş zaman aralıklarında 280 nm'deki UV ölçümleri kullanılarak ortama salınan peptid konsantrasyonları mg cinsinden hesaplandı ve peptidin zamana bağlı salım grafiği çizildi.

Yapılan kümülatif salım çalışmaları sonucunda peptid yüklü NP2'nin ilk 6 saat içerisinde etken maddenin %15,66'sını saldıgı görüldü. 3. günde salım yüzdesinin 2 katına, 15. Günde 3 katına çıktığı ve 90. Günde %57,095 salım yüzdesi ile salılımı tamamladığı görüldü. İlk saatlerde etken maddemiz peptidin, bu kadar hızlı salım yapması ani salım veya 'burst efect' ile açıklanabilir. Bunun nedeni ise etken maddenin bir kısmının nanopartiküllerin yüzeyine tutunmuş olması veya nanopartikül yüzeyine yakın yerlerde zayıf adsorbe olmasındandır.

Salım garfiği Şekil 4.24'te verildi.



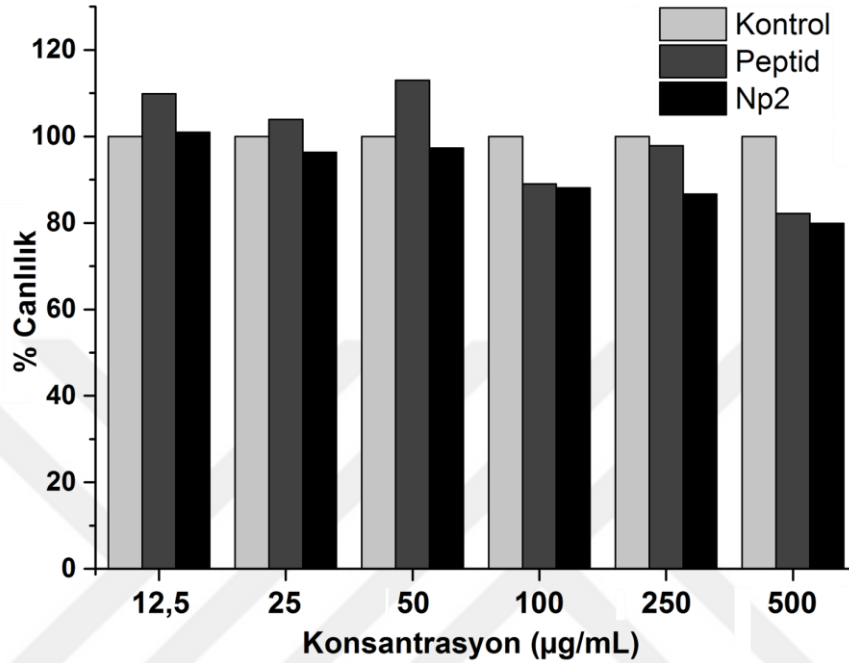
Şekil 4.24 NP2'nin salım grafiği

4.2.12 Peptid ve NP2'nin MTT İle Tayin Edilen Sitotoksisite Sonuçları

Antjenik serbest peptid molekülü ve peptid yüklü NP2 örneklerinin tutulduğu besiyeri ortamının J774 makrofaj hücre proliferasyonuna etkisi MTT testi ile

ölçüldü. Bu çalışmada serbest peptid molekülünün ve NP2'nin makrofajlar üzerinde sitotoksik bir etki gösterip göstermediği araştırıldı.

96. saatte serbest peptid molekülü ve NP2 örneklerinin MTT sonucu elde edilen verilerin grafiği Şekil 4.25'de verildi.



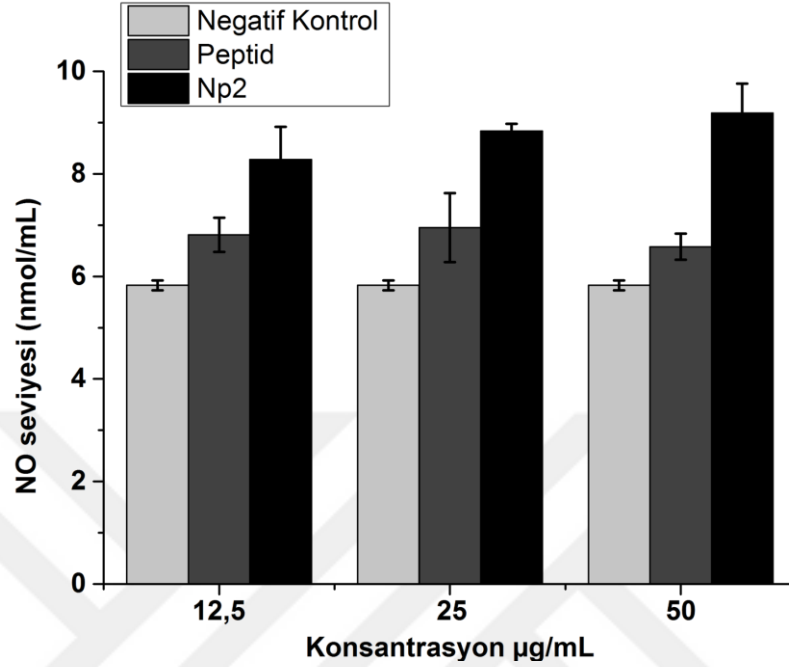
Şekil 4.25 96. Saatte peptid ve peptid yüklü NP2'nin J774 hücre proliferasyonuna etkisinin MTT testi ile ölçülmesi sonucu elde edilen verilerin grafiği

Elde edilen veriler antijenik serbest peptid molekülünün ve peptid yüklü NP2'nin J774 hücre hattı için toksik olmadığını gösterdi. Artan peptid ve NP2 konsantrasyonlarında J774 hücre canlılığında bir miktar azalma tespit edilmiş olsa da, peptidin ve peptid yüklü nanopartikülün sitotoksik bir etki gösterdiğinden bahsedilemez. Çalıştığımız en yüksek konsantrasyon olan 500 µg/ml'de bile J774 hücre canlılığı yaklaşık olarak %80 olarak ölçüldü.

4.2.13 Peptid ve NP2'nin NO Sonuçları

NO seviyesinin ölçülmesiyle immunojenik molekülün in vitro ortamda yeterli immünostimulan etkinlik oluşturup oluşturmadığı belirlenebilir. Antijenik serbest peptid molekülü ve peptid yüklü NP2'nin seçilen farklı konsantrasyonlarında J774 hücre hattı üzerinde oluşturduğu NO miktarı Griess reaksiyonu ile tayin edildi.

96. saat boyunca antijenik serbest peptid molekülüne ve NP2 formülasyonuna maruz bırakılan J774 makrofaj hücrelerinin ürettikleri NO miktarlarını gösteren grafik Şekil 4.26’da gösterildi.



Şekil 4.26 96. Saatte peptid ve peptid yüklü NP2’nin J774 hücre hattı üzerinde NO seviyesini gösteren grafik

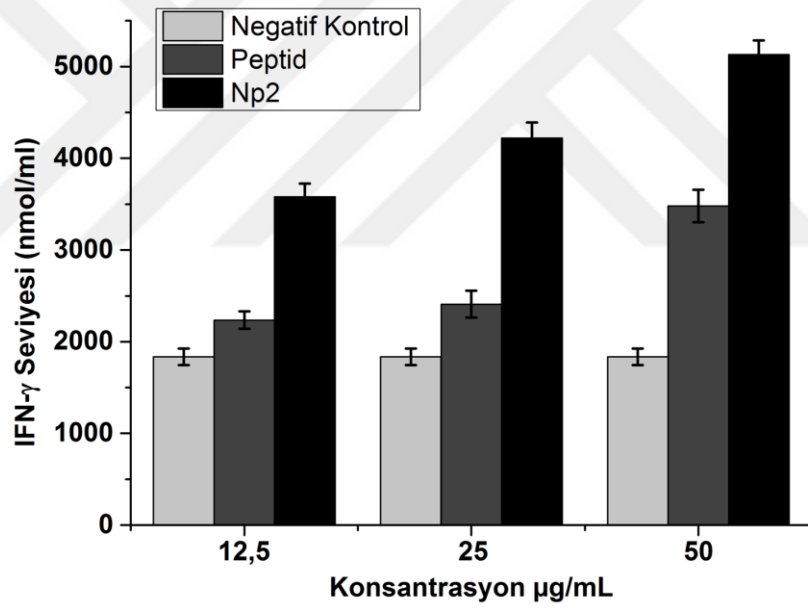
Şekilden de görülebileceği gibi hem serbest peptid hem de peptid yüklü nanopartiküller incelenen tüm konsantrasyonlarda kontrol grubu ile kıyaslandığında makrofajların daha fazla NO üretmelerini sağladı. Aynı zamanda makrofajların ürettikleri NO miktarları peptid ve nanopartikül konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak belirgin bir yükselme göstermektedir. Peptid ve peptid yüklü nanopartikülün NO üretimini tetikleme kabiliyetleri karşılaştırıldığında incelenen tüm konsantrasyonlarda peptid yüklü nanopartiküller ile muamele edilen makrofajların ürettikleri NO seviyesinin serbest peptide göre daha fazla olduğu görüldü. İncelenen en yüksek konsantrasyonda NP2 formülasyonuna maruz kalan makrofajların kontrol grubuna göre ürettikleri NO miktarını yaklaşık 1,5 kat arttırdıkları tespit edili.

4.2.14 Peptid ve NP2’nin IFN- γ , IL-10, IL-12 Sitokin Seviyesi Sonuçları

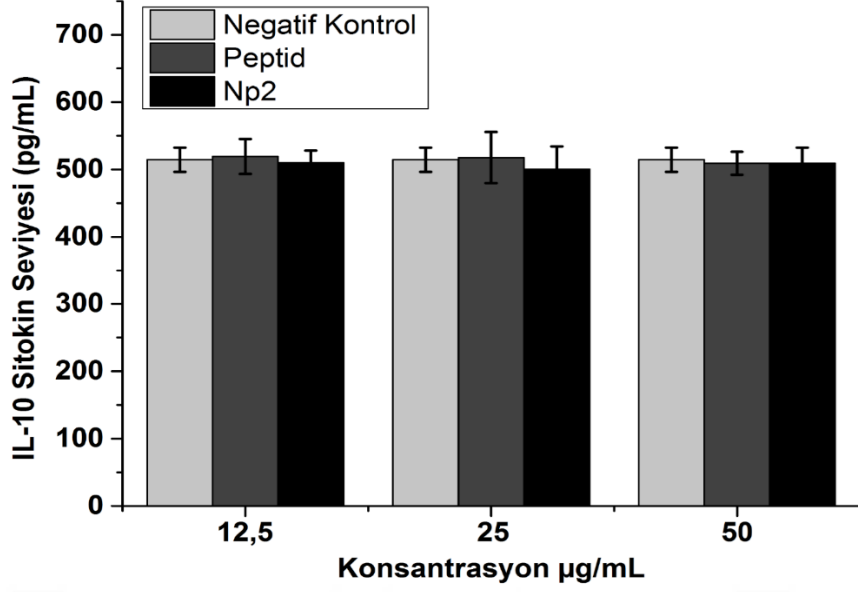
J774 hücre hattı belirli antijenlerle uyarıldıktan sonra Th1 veya Th2 aracılı sitokinleri üretebilir. Tez kapsamında üretilen peptidin gelecekte Covid-19’a karşı

geliştirilmesine yönelik çalışmalarda kullanılması beklendiğinden, aşı adaylarının Th1 immün yanıtını tetiklemesi büyük bir önem arz etmektedir. Bu nedenle bu tez çalışması kapsamında üretilen peptide ve peptid yüklü nanopartiküllere maruz kalan makrofajların Th1 ve/veya Th2 sitokinleri üretme kabiliyetleri incelendi. Deney çalışmaları öncesindeki beklentimiz üretin formülasyonlarla muamele edilen makrofajların çoğunlukla Th1 sitokinlerinin üretimini tetiklemesi yönündeydi. Bu doğrultuda makrofajlardan salınan Th1 aracılı immün yanıtın sitokinleri olan IFN- γ ve IL-12, Th2 aracılı immün yanıtın sitokini olan IL-10 seviyeleri ticari ELISA kitleri aracılığıyla ölçüldü.

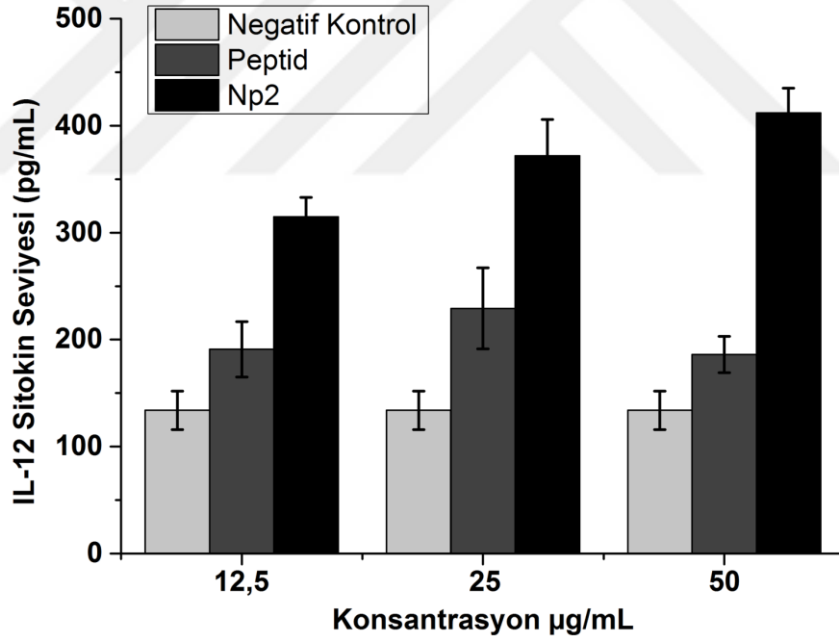
Nanoformülasyonlara 96 saat maruz kalan makrofajlardan salınan IFN- γ , IL-10, IL-12 sitokin seviyelerini gösteren grafikler Şekil 4.27, Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'da gösterildi.



Şekil 4.27 96. Saatte peptid ve peptid yüklü NP2'nin J774 hücre hattı üzerinde IFN- γ seviyesini gösteren grafik



Şekil 4.28 96. Saatte peptid ve peptid yüklü NP2'nin J774 hücre hattı üzerinde IL-10 seviyesini gösteren grafik



Şekil 4.29 96. Saatte peptid ve peptid yüklü NP2'nin J774 hücre hattı üzerinde IL-12 seviyesini gösteren grafik

Şekil 4.27'de görüldüğü üzere peptid ve peptid yüklü nanopartiküller ile muamele edilen gruplarda inkübasyon süresinin sonunda konsantrasyona bağlı olarak üretilen IFN- γ miktarında kayda değer bir artış meydana geldi. Hem peptid hem de peptid yüklü nanopartiküller uygulanan en yüksek konsantrasyonda

makrofajlar tarafından üretilen IFN- γ miktarını yaklaşık 2,5 kat arttırdı. Peptid ve peptid yüklü nanopartiküllerin etkinliği kıyaslandığında ise serbest peptidin IFN- γ üretimini tetikleme açısından bir miktar daha etkin olduğu görüldü. Ancak her iki formülasyonun da anlamlı bir şekilde IFN- γ sitokin üretimini desteklediği net bir şekilde görülmektedir. Benzer bir durum makrofajlardan salgılanan IL-12 seviyelerinin incelenmesinde de karşımıza çıkmaktadır. Konsantrasyon artışı ile doğru orantılı olacak şekilde serbest peptid ve peptid yüklü nanopartiküle maruz kalan makrofajlardan salınan IL-12 seviyelerinin önemli ölçüde artış gösterdiği görülmektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında incelenen en yüksek konsantrasyonda formülasyonlar ile muamele gören makrofajların ürettikleri IL-12 seviyelerinin yaklaşık 3,5 katlık bir artış gösterdiği tespit edildi. Diğer yandan formülasyonlar ile etkileşim sonrasında makrofajlardan salınan IL-10 seviyeleri incelendiğinde ise herhangi bir artışın olmadığı ve hatta test gruplarındaki sitokin seviyesinin kontrol grubunun altında kaldığı gözlemlendi. Bu durum peptid ve peptid yüklü nanopartiküllerin makrofajların IL-10 salgılaması üzerinde inhibi edici bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Antijenik serbest peptid ve NP2'nin artan konsantrasyonlarıyla beraber, IFN- γ , IL-12 sitokin miktarlarında artış gözlemlenirken, IL-10 sitokin miktarında artış gözlemlenmedi. Antiinflamatuvar aşı geliştirme çalışmalarında Th1 aracılı immün yanıtın oluşması öncelikli hedeftir. Th2 hücreleri tarafından üretilen sitokinler ise B hücrelerin aktive olmasına yardım eder ve Th1 immün yanıtını Th2 immün yanıtına doğru kaydırırlar. Bu yüzden bu çalışmada artan peptid ve NP2 konsantrasyonları ile beraber, IFN- γ ve IL-12 sitokin miktarlarının artması beklenirken, IL-10 sitokin miktarının artmaması beklenir.

Sitokin miktarlarını gösteren grafikler incelendiğinde artan peptid ve NP2 konsantrasyonlarıyla beraber IFN- γ ve IL-12 miktarları artarken, IL-10 miktarında artış gözlemlenmedi. Bu durum uygulanan formülasyonların immün yanıtı Th1 yönünde tetiklediğini açık bir biçimde ortaya oymaktadır. Bu nedenle uygulanan serbest peptid ve peptid yüklü nanopartiküler formülasyonların gelecekte Covid-19 hastalığına karşı aşı geliştirilmesine yönelik çalışmalarda kullanılma açısından büyük bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında SARS-CoV-2 virüsünün N proteinin *LSPRWYFY* dizisine sahip antijenik peptid molekülü PLGA nanopartiküllerine enkapsüle edilerek Kovid-19 enfeksiyonun tedavisinde kullanılabilecek bir aşı sisteminin fizikokimyasal ve morfolojik özellikleri ile beraber, ilaç salımı ve biyolojik aktivasyonun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. *LSPRWYFY* dizisine sahip antijenik peptid molekülü daha önce Kovid-19 enfeksiyonuna karşı aşı geliştirme çalışmalarında kullanımı mevcut değildir.

Birinci deney tasarımında tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniği ile sentezlenen NP0 için çıkan sonuçlar şu şekildedir;

Partikül boyutu 182 ± 2 nm, PDI değeri $0,215 \pm 0,01$ ve zeta potansiyeli $-7,48 \pm 1,2$ mV olarak bulundu. Reaksiyon verimi ise %32 olarak hesaplandı.

Birinci deney tasarımında tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniği ile sentezlenen NP1, NP2, NP3, NP4 ve NP5 için çıkan sonuçlar şu şekildedir;

Partikül boyutları sırasıyla, $59,5 \pm 0,7$, $138,9 \pm 0,4$, $159,8 \pm 1,9$, $199,6 \pm 0,6$, $209,3 \pm 0,07$ nm, PDI değerleri $0,148$, $0,161 \pm 0,02$, $0,189$, $0,337 \pm 0,02$, $0,235 \pm 0,01$ olarak bulundu. Zeta potansiyelleri ise sırasıyla $-8,25 \pm 0,7$, $-6,44 \pm 0,3$, $-6,29 \pm 0,6$, $-6,96 \pm 0,4$, $-6,95 \pm 0,2$ mV olarak ölçüldü.

Sırasıyla reaksiyon verimleri, $\%22,72$, $\%13,75$, $\%20$, $\%20$, $\%20$, ilaç yükleme kapasiteleri $\%17,32$, $\%54,92$, $\%41,96$, $\%58,08$, $\%52,13$ ve enkapsülasyon verimleri ise $\%43,3$, $\%45,31$, $\%36,4$, $\%36,3$, $\%31,28$ olarak hesaplandı.

Birinci deney tasarımındaki NP2 ve NP4 örneklerinin en yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olduğu görüldü. İleriki çalışmalarda NP2 ve NP4'ün peptid/PLGA oranları temel alındı ve miktarlar 10 katına çıkarıldı. 2. Deney tasarımında sentez 20 mg peptid + 100 mg PLGA (NP2) ve 40 mg peptid + 100 mg PLGA (NP4) üzerinden yapıldı. Boş nanopartikül (NP0) sentezi için sadece 100 mg PLGA kullanıldı.

İkinci deney tasarımımda tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniği ile sentezlenen NP0 için çıkan sonuçlar şu şekildedir;

Partikül boyutu $260,9 \pm 1$ nm, PDI değeri 0,177 ve zeta potansiyeli $-26 \pm 0,2$ mV olarak bulundu. Reaksiyon verimi ise %68 olarak hesaplandı.

İkinci deney tasarımımda tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniği ile sentezlenen NP2, NP4 için çıkan sonuçlar şu şekildedir;

Partikül boyutları sırasıyla $250,3 \pm 0,1$ ve $223,3 \pm 4,3$ nm, PDI değerleri 0,116 ve 0,088, zeta potansiyelleri ise $-11,1 \pm 0,5$ ve $-8,01 \pm 0,4$ mV olarak hesaplandı.

Reaksiyon verimleri %59,6 ve %47,9, enkapsülasyon verimleri %40 ve %15 ve son olarak ilaç yükleme kapasiteleri %11,2 ve %8,95 olarak hesaplandı.

NP2'nin ilaç yükleme kapasitesinin NP4'ün ilaç yükleme kapasitesinden daha yüksek olduğu hesaplandı. Ayrıca NP2'nin reaksiyon veriminin ve enkapsülasyon veriminin de NP4'e göre oldukça yüksek olduğu gözlemlendi. İleriki çalışmalar NP2 ile yürütüldü.

Moleküler karakterizasyon FT-IR spektrofotometre ile gerçekleştirildi. Beklenildiği gibi *LSPRWYFYY* dizisine sahip antijenik peptid yüklü PLGA'da peptid molekülüne ait karakteristik bantların görülmemesi ve PLGA karakteristiğinde spektrum elde edilmesi, Peptid molekülün PLGA nanopartikülüne enkapsüle olduğunu kanıtlar niteliktedir.

İkinci deney tasarımımda elde edilen NP2'ye morfolojik analizi SEM ile gerçekleştirildi. Belirli bir homojenitede nanopartiküllerin elde edildiği görüldü. Nanopartiküllerin boyutlarının 258,5-169,4 nm arasında değiştiği görüldü.

İkinci deney tasarımımda elde edilen NP2'nin salım çalışmasında ilk 6 saat içerisinde etken maddenin %15,66'sını saldıgı görüldü. 3. günde salım yüzdesinin 2 katına, 15. Günde 3 katına çıktığı ve 90. Günde %57,095 salım yüzdesi ile salılımı tamamladığı görüldü.

Serbest antijenik peptid molekü ve NP2'nin J774 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri MTT analizi ile test edildi. Bütün peptid ve NP2 konsantrasyonlarının non-toksik olduğu görüldü. Buna rağmen artan peptid ve NP2 konsantrasyonlarını 4. günde hücre profilerasyonuna negatif etkide bulunduğu ve hücre canlılığının

giderek azaldığı gözlemlendi. Ancak yine de en yüksek peptid ve NP2 konsantrasyonu olan 500 µg/ml'de hücre canlılığının her iki örnek içinde yaklaşık olarak %80 civarında olduğu görülmektedir.

Artan NO seviyesi immün yanıtta artışın olduğunun bir göstergesidir. Peptid ve NP2 örneklerinin artan konsantrasyonlarına karşın NO seviyesinin de arttığı gözlemlendi.

Artan peptid ve NP2 konsantrasyonlarıyla beraber IFN-γ ve IL-12 miktarları artarken, IL-10 miktarının artmadığı gözlemlendi.

Tüm bu sonuçlar kapsamında literatürde ilk defa SARS-CoV-2'nin N proteinin PLGA polimerine enkapsüle edilen *LSPRWYFY* peptid molekülünün SARS-CoV-2 tedavisi için aşı olarak kullanım potansiyeli araştırıldı. Bu peptid molekülünün SARS-CoV-2'ye karşı potansiyel olarak aşı üretiminde kullanılabilmesi için ileriki araştırmaların yapılması önerilir.

-
- [1] Q. Wang *et al.*, “Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2,” *Cell*, vol. 181, no. 4, pp. 894-904.e9, 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.03.045.
- [2] G. Pascarella *et al.*, “COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review,” *J. Intern. Med.*, vol. 288, no. 2, pp. 192–206, 2020, doi: 10.1111/joim.13091.
- [3] M. R. Denison, R. L. Graham, E. F. Donaldson, L. D. Eckerle, and R. S. Baric, “RNA Biology Coronaviruses An RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity,” vol. 8, no. 2, pp. 270–279, 2011, doi: 10.4161/rna.8.2.15013.
- [4] WHO, “COVID-19 weekly epidemiological update,” *World Heal. Organ.*, no. 58, pp. 1–23, 2022, [Online]. Available: <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-weekly-epidemiological-update>
- [5] Dayan S., “COVID-19 ve Aşı,” *Dicle Tıp Derg.*, vol. 48, pp. 98–113, 2021, doi: 10.5798/dicletip.
- [6] M. Li *et al.*, *COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects.*, vol. 7, no. 1. Springer US, 2022. doi: 10.1038/s41392-022-00996-y.
- [7] A. W. Purcell, J. McCluskey, and J. Rossjohn, “More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 6, no. 5, pp. 404–414, 2007, doi: 10.1038/nrd2224.
- [8] G. Zhu, C. Zhu, Y. Zhu, and F. Sun, “Minireview of progress in the structural study of SARS-CoV-2 proteins,” *Curr. Res. Microb. Sci.*, vol. 1, no. June, pp. 53–61, 2020, doi: 10.1016/j.crmicr.2020.06.003.
- [9] M. T. Khan *et al.*, “Structures of SARS-CoV-2 RNA-Binding Proteins and Therapeutic Targets,” *Intervirology*, vol. 64, no. 2, pp. 55–68, 2021, doi:

10.1159/000513686.

- [10] S. Kang *et al.*, *Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites*, vol. 10, no. 7. 2020. doi: 10.1016/j.apsb.2020.04.009.
- [11] I. M. Artika, A. K. Dewantari, and A. Wiyatno, “Molecular biology of coronaviruses: current knowledge,” *Heliyon*, vol. 6, no. 8, p. e04743, 2020, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04743.
- [12] A. Asghari, M. Naseri, H. Safari, E. Saboory, and N. Parsamanesh, “The Novel Insight of SARS-CoV-2 Molecular Biology and Pathogenesis and Therapeutic Options,” *DNA Cell Biol.*, vol. 39, no. 10, pp. 1741–1753, 2020, doi: 10.1089/dna.2020.5703.
- [13] F. S. Lugo, J. M. C. Padilla, A. M. V. Linares, Y. B. Cordero, and T. V. González, “General aspects about the structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (Sars-cov-2),” *Rev. Cuba. Investig. Biomed.*, vol. 39, no. 3, pp. 1–16, 2020.
- [14] M. S. Rahman *et al.*, “Evolutionary dynamics of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its consequences,” *J. Med. Virol.*, vol. 93, no. 4, pp. 2177–2195, 2021, doi: 10.1002/jmv.26626.
- [15] A. Kumar *et al.*, “Characterization of Nucleocapsid (N) Protein from Novel Coronavirus SARS-CoV-2,” *Preprints*, no. May, 2020, doi: 10.20944/preprints202005.0413.v1.
- [16] A. L. Silva, P. C. Soema, B. Slütter, F. Ossendorp, and W. Jiskoot, “PLGA particulate delivery systems for subunit vaccines: Linking particle properties to immunogenicity,” *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 12, no. 4, pp. 1056–1069, 2016, doi: 10.1080/21645515.2015.1117714.
- [17] W. Ma *et al.*, “PLGA nanoparticle-mediated delivery of tumor antigenic peptides elicits effective immune responses,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 1475–1487, 2012, doi: 10.2147/IJN.S29506.
- [18] S. Shi and A. J. Hickey, “PLGA microparticles in respirable sizes enhance an in vitro T cell response to recombinant mycobacterium tuberculosis antigen

- TB10.4-Ag85B,” *Pharm. Res.*, vol. 27, no. 2, pp. 350–360, 2010, doi: 10.1007/s11095-009-0028-7.
- [19] Y. A. Helmy, M. Fawzy, A. Elaswad, A. Sobieh, S. P. Kenney, and A. A. Shehata, “The COVID-19 pandemic: A comprehensive review of taxonomy, genetics, epidemiology, diagnosis, treatment, and control,” *J. Clin. Med.*, vol. 9, no. 4, 2020, doi: 10.3390/jcm9041225.
- [20] S. Anastasopoulou and A. Mouzaki, “The Biology Of Sars-CoV-2 And The Ensuing Covid-19,” *Achaiki Iatriki*, vol. 39, no. 1, pp. 29–35, 2020.
- [21] M. Hasöksüz, S. Kiliç, and F. Saraç, “Coronaviruses and sars-cov-2,” *Turkish J. Med. Sci.*, vol. 50, no. SI-1, pp. 549–556, 2020, doi: 10.3906/sag-2004-127.
- [22] K. A. Adedokun, A. O. Olarinmoye, A. O. Olarinmoye, J. O. Mustapha, and R. T. Kamorudeen, “A close look at the biology of SARS-CoV-2, and the potential influence of weather conditions and seasons on COVID-19 case spread,” *Infect. Dis. Poverty*, vol. 9, no. 1, pp. 1–5, 2020, doi: 10.1186/s40249-020-00688-1.
- [23] Y. Chen, Q. Liu, and D. Guo, “Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis,” *J. Med. Virol.*, vol. 92, no. 4, pp. 418–423, 2020, doi: 10.1002/jmv.25681.
- [24] S. Piepoli, B. Shamloo, A. Bircan, O. Adebali, and B. Erman, “Molecular biology of sars-cov-2,” *Turkish J. Immunol.*, vol. 8, no. 2, pp. 73–88, 2020, doi: 10.25002/TJI.2020.1293.
- [25] P. V'kovski, A. Kratzel, S. Steiner, H. Stalder, and V. Thiel, “Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 19, no. 3, pp. 155–170, 2021, doi: 10.1038/s41579-020-00468-6.
- [26] Z. M. Chen *et al.*, “Diagnosis and treatment recommendations for pediatric respiratory infection caused by the 2019 novel coronavirus,” *World J. Pediatr.*, vol. 16, no. 3, pp. 240–246, 2020, doi: 10.1007/s12519-020-00345-5.
- [27] S. Pamuk, A. Özkan, and B. Polat, “management of COVID-19,” vol. 30, no.

Supp 1, pp. 1–9, 2020.

- [28] A. G. Harrison, T. Lin, and P. Wang, “Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis,” *Trends Immunol.*, vol. 41, no. 12, pp. 1100–1115, 2020, doi: 10.1016/j.it.2020.10.004.
- [29] “Immunoassay to qualitatively detect antibodies (including IgG) against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2),” 2022. <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/electsys-anti-sars-cov-2.html>
- [30] S. A. Azer, “COVID-19: pathophysiology, diagnosis, complications and investigational therapeutics,” *New Microbes New Infect.*, vol. 37, no. M, p. 100738, 2020, doi: 10.1016/j.nmni.2020.100738.
- [31] H. E. G. Ghaleh, M. R. Karimi, P. Rezayat, M. Bolandian, M. M. Nodoushan, and M. Farzanehpour, “The possible role of novel coronavirus 2019 proteins in the development of drugs and vaccines,” *J. Appl. Biotechnol. Reports*, vol. 7, no. 2, pp. 63–73, 2020, doi: 10.30491/jabr.2020.230039.1220.
- [32] J. Lan *et al.*, “Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor,” *Nature*, vol. 581, no. 7807, pp. 215–220, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2180-5.
- [33] J. Shang *et al.*, “Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 117, no. 21, 2020, doi: 10.1073/pnas.2003138117.
- [34] A. C. Walls, Y. J. Park, M. A. Tortorici, A. Wall, A. T. McGuire, and D. Veasler, “Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein,” *Cell*, vol. 181, no. 2, pp. 281–292.e6, 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
- [35] X. Xia, “Domains and functions of spike protein in sars-cov-2 in the context of vaccine design,” *Viruses*, vol. 13, no. 1, pp. 1–16, 2021, doi: 10.3390/v13010109.
- [36] Y. Huang, C. Yang, X. feng Xu, W. Xu, and S. wen Liu, “Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19,” *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 41, no. 9, pp. 1141–

- 1149, 2020, doi: 10.1038/s41401-020-0485-4.
- [37] L. Dai and G. F. Gao, “Viral targets for vaccines against COVID-19.” doi: 10.1038/s41577-020-00480-0.
- [38] L. Wang and Y. Xiang, “Spike glycoprotein-mediated entry of sars coronaviruses,” *Viruses*, vol. 12, no. 11, 2020, doi: 10.3390/v12111289.
- [39] M. Gheblawi *et al.*, “Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2,” *Circ. Res.*, pp. 1456–1474, 2020, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317015.
- [40] M. Hussain *et al.*, “Structural Basis of SARS-CoV-2 Spike Protein Priming by TMPRSS2,” *bioRxiv*, p. 2020.04.21.052639, 2020, [Online]. Available: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.21.052639v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.21.052639v1.abstract>
- [41] M. T. Sarker *et al.*, “A Comprehensive Overview of the Newly Emerged COVID-19 Pandemic: Features, Origin, Genomics, Epidemiology, Treatment, and Prevention,” *Biologics*, vol. 1, no. 3, pp. 357–383, 2021, doi: 10.3390/biologics1030021.
- [42] C. Sun *et al.*, “SARS-CoV-2 and SARS-CoV Spike-RBD Structure and Receptor Binding Comparison and Potential Implications on Neutralizing Antibody and Vaccine Development,” *bioRxiv*, no. December 2019, p. 2020.02.16.951723, 2020, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1101/2020.02.16.951723>
- [43] A. Sternberg and C. Naujokat, “Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: Targets for vaccination,” *Life Sci.*, vol. 257, p. 118056, 2020, doi: 10.1016/j.lfs.2020.118056.
- [44] G. Lippi, C. J. Lavie, B. M. Henry, and F. Sanchis-Gomar, “Do genetic polymorphisms in angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) gene play a role in coronavirus disease 2019 (COVID-19)?,” *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 58, no. 9, pp. 1415–1422, Aug. 2020, doi: 10.1515/CCLM-2020-0727/ASSET/GRAPHIC/J_CCLM-2020-0727_FIG_002.JPG.

- [45] S. Hasan and M. M. Hossain, "Analysis of COVID-19 M Protein for Possible Clues Regarding Virion Stability, Longevity and Spreading," 2020.
- [46] P. Kumar, A. Kumar, N. Garg, and R. Giri, "An insight into SARS-CoV-2 membrane protein interaction with spike, envelope, and nucleocapsid proteins," *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2021, doi: 10.1080/07391102.2021.2016490.
- [47] S. Thomas, "342 SUGGESTED CITATION Thomas, S. The Structure of the Membrane Protein of SARS-CoV-2 Resembles the Sugar Trans-porter SemiSWEET," *Pathog. Immun.*, vol. 5, no. 1, pp. 342–363, 2020, doi: 10.20411/pai.v5i1.377.
- [48] F. Plaehn, NMJ; Gutjahr, "Graphical abstract Graphical abstract," *Leonardo*, no. August 2016, pp. 421–437, 1910, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.018>
- [49] S. Satarker and M. Nampoothiri, "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," *Arch. Med. Res.*, vol. 51, no. January, pp. 482–491, 2020.
- [50] S. N. Alharbi and A. F. Alrefaei, "Comparison of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) M protein with its counterparts of SARS-CoV and MERS-CoV species," *J. King Saud Univ. - Sci.*, vol. 33, no. 2, p. 101335, 2021, doi: 10.1016/j.jksus.2020.101335.
- [51] M. Sarkar and S. Saha, "Structural insight into the role of novel SARSCoV-2 E protein: A potential target for vaccine development and other therapeutic strategies," *PLoS One*, vol. 15, no. 8 August, pp. 1–25, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0237300.
- [52] F. K. Yoshimoto, "The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19," *Protein J.*, vol. 39, no. 3, pp. 198–216, 2020, doi: 10.1007/s10930-020-09901-4.
- [53] P. Troyano-Hernández, R. Reinosá, and Á. Holguín, "Evolution of sars-cov-2

- envelope, membrane, nucleocapsid, and spike structural proteins from the beginning of the pandemic to september 2020: A global and regional approach by epidemiological week,” *Viruses*, vol. 13, no. 2, 2021, doi: 10.3390/v13020243.
- [54] D. Schoeman and B. C. Fielding, “Coronavirus envelope protein: Current knowledge,” *Virology*, vol. 16, no. 1, pp. 1–22, 2019, doi: 10.1186/s12985-019-1182-0.
- [55] R. Arya *et al.*, “Structural insights into SARS-CoV-2 proteins,” *J. Mol. Biol.*, vol. 433, no. 2, p. 166725, 2021, doi: 10.1016/j.jmb.2020.11.024.
- [56] Y. Cao *et al.*, “Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors,” *Protein Sci.*, vol. 30, no. 6, pp. 1114–1130, 2021, doi: 10.1002/pro.4075.
- [57] Y. A. Malik, “Properties of coronavirus and SARS-CoV-2,” *Malays. J. Pathol.*, vol. 42, no. 1, pp. 3–11, 2020.
- [58] I. Astuti, “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 ,” no. January, 2020.
- [59] S.- Covid- and S. K. Pathak, “General Details of Structural Proteins of Coronaviruses with Special Reference General Details of Structural Proteins of Coronaviruses with Special Reference of SARS-COV-2 or COVID-19,” *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci.*, vol. 9, no. 6, pp. 2–7, 2020, [Online]. Available: <https://health.mil/News/Articles/2020/01/24/Coronavirus?type=Presentations>
- [60] C. Yin, “Genotyping coronavirus SARS-CoV-2: methods and implications,” *Genomics*, vol. 112, no. 5, pp. 3588–3596, 2020, doi: 10.1016/j.ygeno.2020.04.016.
- [61] T. Gao *et al.*, “Identification and functional analysis of the SARS-COV-2 nucleocapsid protein,” *BMC Microbiol.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–10, 2021, doi:

10.1186/s12866-021-02107-3.

- [62] A. Savastano, A. Ibáñez de Opakua, M. Rankovic, and M. Zweckstetter, “Nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 phase separates into RNA-rich polymerase-containing condensates,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-19843-1.
- [63] Y. Peng *et al.*, “ Structures of the SARS - CoV- 2 nucleocapsid and their perspectives for drug design ,” *EMBO J.*, vol. 39, no. 20, 2020, doi: 10.15252/embj.2020105938.
- [64] G. K. Azad, “Identification and molecular characterization of mutations in nucleocapsid phosphoprotein of SARS-CoV-2,” *PeerJ*, vol. 9, no. June 2020, 2021, doi: 10.7717/peerj.10666.
- [65] J. Wu, “Represses RIG-Mediated IFN- β Production,” pp. 1–15, 2021.
- [66] W. Zeng, G. Liu, H. Ma, D. Zhao, Y. Yang, and M. Liu, “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 ,” no. January, 2020.
- [67] Q. Ye, A. M. V. West, S. Silletti, and K. D. Corbett, “Architecture and self-assembly of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein,” *Protein Sci.*, vol. 29, no. 9, pp. 1890–1901, 2020, doi: 10.1002/pro.3909.
- [68] “Human coronavirus 2019-nCov Nucleocapsid,” 2020. <https://www.invivogen.com/sars2-nucleocapsid>
- [69] N. K. Dutta, K. Mazumdar, and J. T. Gordy, “The Nucleocapsid Protein of SARS–CoV-2: a Target for Vaccine Development,” *J. Virol.*, vol. 94, no. 13, pp. 1–2, 2020, doi: 10.1128/jvi.00647-20.
- [70] M. Waqas, A. Haider, M. Sufyan, S. Siraj, and S. A. Sehgal, “Determine the Potential Epitope Based Peptide Vaccine Against Novel SARS-CoV-2 Targeting Structural Proteins Using Immunoinformatics Approaches,” *Front. Mol. Biosci.*, vol. 7, no. October, pp. 1–11, 2020, doi: 10.3389/fmolb.2020.00227.

- [71] M. Waqas *et al.*, “Immunoinformatics and Molecular Docking Studies Predicted Potential Multiepitope-Based Peptide Vaccine and Novel Compounds against Novel SARS-CoV-2 through Virtual Screening,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2021, 2021, doi: 10.1155/2021/1596834.
- [72] P. P. Uttamrao, C. Sathyaseelan, L. P. P. Patro, and T. Rathinavelan, “Revelation of Potent Epitopes Present in Unannotated ORF Antigens of SARS-CoV-2 for Epitope-Based Polyvalent Vaccine Design Using Immunoinformatics Approach,” *Front. Immunol.*, vol. 12, no. August, pp. 1–13, 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.692937.
- [73] A. Rakib *et al.*, “Epitope-Based Immunoinformatics Approach on Nucleocapsid Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2,” *Molecules*, vol. 25, no. 21, 2020, doi: 10.3390/molecules25215088.
- [74] Y. D. Devi *et al.*, *Immunoinformatics mapping of potential epitopes in SARS-CoV-2 structural proteins*, vol. 16, no. 11 November. 2021. doi: 10.1371/journal.pone.0258645.
- [75] O. S. Abbadi, “Non-Structural Proteins of SARS-CoV-2 as potential sources for vaccine synthesis,” *Infect. J.*, pp. 1–7, 2020.
- [76] S. J. R. da Silva, C. T. Alves da Silva, R. P. G. Mendes, and L. Pena, “Role of nonstructural proteins in the pathogenesis of SARS-CoV-2,” *J. Med. Virol.*, vol. 92, no. 9, pp. 1427–1429, 2020, doi: 10.1002/jmv.25858.
- [77] D. R. Littler, B. S. Gully, R. N. Colson, and J. Rossjohn, “Crystal Structure of the SARS-CoV-2 Non-structural Protein 9, Nsp9,” *iScience*, vol. 23, no. 7, p. 101258, 2020, doi: 10.1016/j.isci.2020.101258.
- [78] C. Semper, N. Watanabe, and A. Savchenko, “Structural characterization of nonstructural protein 1 from SARS-CoV-2,” *iScience*, vol. 24, no. 1, p. 101903, 2021, doi: 10.1016/j.isci.2020.101903.
- [79] R. Gorkhali, P. Koirala, S. Rijal, A. Mainali, A. Baral, and H. K. Bhattarai, “Structure and Function of Major SARS-CoV-2 and SARS-CoV Proteins,” *Bioinform. Biol. Insights*, vol. 15, no. Figure 1, 2021, doi: 10.1177/11779322211025876.

- [80] M. Santerre, S. P. Arjona, C. N. Allen, N. Shcherbik, and B. E. Sawaya, "Why do SARS-CoV-2 NSPs rush to the ER?," *J. Neurol.*, vol. 268, no. 6, pp. 2013–2022, 2021, doi: 10.1007/s00415-020-10197-8.
- [81] Ç. Arabacı, G. Aydın Tutak, B. Eroğlu Kesim, B. Ertürk, K. Ak, and E. Ağaç, "The Characteristics of SARS-CoV-2 Virus and Microbiological Diagnosis," *Eur. Arch. Med. Res.*, vol. 36, no. 1, pp. 10–20, 2020, doi: 10.4274/eamr.galenos.2020.71501.
- [82] R. Raj, "Analysis of non-structural proteins, NSPs of SARS-CoV-2 as targets for computational drug designing," *Biochem. Biophys. Reports*, vol. 25, p. 100847, 2021, doi: 10.1016/j.bbrep.2020.100847.
- [83] A. Rogstam *et al.*, "Crystal structure of non-structural protein 10 from severe acute respiratory syndrome coronavirus-2," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 19, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/ijms21197375.
- [84] WHO, "COVID-19 weekly epidemiological update," *World Heal. Organ.*, no. 58, pp. 1–23, 2022, [Online]. Available: <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-weekly-epidemiological-update>
- [85] A. Ciurea, "Epidemiology and Clinical Characteristics of Melanoma," *Genet. Melanoma*, no. March, pp. 69–83, 2016, doi: 10.1007/978-1-4939-3554-3_3.
- [86] R. B. Khadka, R. Bhandari, R. Gyawali, and B. Neupane, "Epidemiology and Pathogenesis of Coronavirus Disease (COVID-19)," *Nov. Res. Microbiol. J.*, vol. 4, no. 2, pp. 675–687, 2020, doi: 10.21608/nrmj.2020.84016.
- [87] I. Salahshoori *et al.*, "Overview of COVID-19 Disease: Virology, Epidemiology, Prevention Diagnosis, Treatment, and Vaccines," *Biologics*, vol. 1, no. 1, pp. 2–40, 2021, doi: 10.3390/biologics1010002.
- [88] C. Bulut and Y. Kato, "Epidemiology of covid-19," *Turkish J. Med. Sci.*, vol. 50, no. SI-1, pp. 563–570, 2020, doi: 10.3906/sag-2004-172.
- [89] C. Binns, W. Y. Low, and L. M. Kyung, "The COVID-19 Pandemic: Public Health and Epidemiology," *Asia-Pacific J. Public Heal.*, vol. 32, no. 4, pp.

- 140–144, 2020, doi: 10.1177/1010539520929223.
- [90] E. Petersen and D. Gökengin, “Sars-cov-2 epidemiology and control, different scenarios for Turkey,” *Turkish J. Med. Sci.*, vol. 50, no. SI-1, pp. 509–514, 2020, doi: 10.3906/sag-2003-260.
- [91] H. S. Rahman *et al.*, “The transmission modes and sources of COVID-19: A systematic review,” *Int. J. Surg. Open*, vol. 26, pp. 125–136, 2020, doi: 10.1016/j.ijso.2020.08.017.
- [92] M. A. Shereen, S. Khan, A. Kazmi, N. Bashir, and R. Siddique, “COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses,” *J. Adv. Res.*, vol. 24, no. March, pp. 91–98, 2020, doi: 10.1016/j.jare.2020.03.005.
- [93] J. Vallamkondu, A. John, W. Yousuf, and S. Pathinti, “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 ,” no. January, 2020.
- [94] S. Falahi and A. Kenarkoochi, “Transmission routes for SARS-CoV-2 infection: review of evidence,” *New Microbes New Infect.*, vol. 38, p. 100778, 2020, doi: 10.1016/j.nmni.2020.100778.
- [95] M. Cevik, K. Kuppalli, J. Kindrachuk, and M. Peiris, “Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2,” *BMJ*, vol. 371, pp. 1–6, 2020, doi: 10.1136/bmj.m3862.
- [96] L. Zhou, S. K. Ayeh, V. Chidambaram, and P. C. Karakousis, “Modes of transmission of SARS-CoV-2 and evidence for preventive behavioral interventions,” *BMC Infect. Dis.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–9, 2021, doi: 10.1186/s12879-021-06222-4.
- [97] F. Şahiner and İ. Cebeci, “Major and Possible Transmission Routes of SARS-CoV-2 Infections,” *J. Mol. Virol. Immunol.*, vol. 1, no. 2, pp. 24–35, 2020, doi: 10.46683/jmvi.2020.10.
- [98] A. Llanes, C. M. Restrepo, Z. Caballero, S. Rajeev, M. A. Kennedy, and R.

- Lleonart, "Betacoronavirus genomes: How genomic information has been used to deal with past outbreaks and the covid-19 pandemic," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 12, pp. 1–28, 2020, doi: 10.3390/ijms21124546.
- [99] M. Umair *et al.*, "Whole-genome sequencing of SARS-CoV-2 reveals the detection of G614 variant in Pakistan," *PLoS One*, vol. 16, no. 3 March, pp. 1–11, 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0248371.
- [100] M. P. Jogalekar, A. Veerabathini, and P. Gangadaran, "Novel 2019 coronavirus: Genome structure, clinical trials, and outstanding questions," *Exp. Biol. Med.*, vol. 245, no. 11, pp. 964–969, 2020, doi: 10.1177/1535370220920540.
- [101] A. Abu, T. Naqvi, K. Fatima, T. Mohammad, U. Fatima, and I. K. Singh, "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 ,," no. January, 2020.
- [102] A. C. Brant, W. Tian, V. Majerciak, W. Yang, and Z. M. Zheng, "SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication," *Cell Biosci.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–17, 2021, doi: 10.1186/s13578-021-00643-z.
- [103] S. U. Kumar *et al.*, "A review of novel coronavirus disease (COVID-19): based on genomic structure, phylogeny, current shreds of evidence, candidate vaccines, and drug repurposing," *3 Biotech*, vol. 11, no. 4, pp. 1–22, 2021, doi: 10.1007/s13205-021-02749-0.
- [104] T. Therapeutics, B. M. Foundation, B. Sciences, L. Angeles, T. Therapeutics, and M. L. Group, *Transmission of SARS-CoV-2 through analysis of Viral Genomics and Structure*. 2021.
- [105] S. Alsobaie, "Understanding the molecular biology of SARS-CoV-2 and the COVID-19 pandemic: A review," *Infect. Drug Resist.*, vol. 14, pp. 2259–2268, 2021, doi: 10.2147/IDR.S306441.
- [106] A. M. Al-Qaaneh, T. Alshammari, R. Aldahhan, H. Aldossary, Z. A.

- Alkhalifah, and J. F. Borgio, "Genome composition and genetic characterization of SARS-CoV-2," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 28, no. 3, pp. 1978–1989, 2021, doi: 10.1016/j.sjbs.2020.12.053.
- [107] E. Ahmed, N. Sajjad, A. Ali, and F. M. Aldakeel, "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 ,," no. January, 2020.
- [108] S. Korea *et al.*, "Genomic and phylogenetic analyses of SARS-CoV-2 strains isolated in the city of Author Contributions", doi: 10.1101/2020.12.16.423178.
- [109] C. Li, Q. He, H. Qian, and J. Liu, "Overview of the pathogenesis of COVID- 19 (Review)," *Exp. Ther. Med.*, vol. 22, no. 3, pp. 1–10, 2021, doi: 10.3892/etm.2021.10444.
- [110] S. Mirmohammadi, A. Kianmehr, M. Arefi, and A. Mahrooz, "Biochemical parameters and pathogenesis of SARS-CoV-2 infection in vital organs: COVID-19 outbreak in Iran," *New Microbes New Infect.*, vol. 38, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1016/j.nmni.2020.100792.
- [111] E. Kordzadeh-kermani, "Pathogenesis , clinical manifestations and complications of COVID-19," vol. 15, pp. 1287–1305, 2020.
- [112] M. Kumar and S. Al Khodor, "Pathophysiology and treatment strategies for COVID-19," *J. Transl. Med.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1186/s12967-020-02520-8.
- [113] H. Amirfakhryan and F. safari, "Outbreak of SARS-CoV2: Pathogenesis of infection and cardiovascular involvement," *Hell. J. Cardiol.*, vol. 62, no. 1, pp. 13–23, 2021, doi: 10.1016/j.hjc.2020.05.007.
- [114] M. Demirci, Ö. Ünlü, A. Yiğın, and F. Y. Zeyrek, "Pathogenesis of SARS-CoV-2 and Immune Response in COVID-19," *Türk Mikrobiyoloji Cemiy. Derg.*, vol. 50, no. 4, pp. 183–191, 2020, doi: 10.5222/tmcd.2020.183.
- [115] J. Emrani *et al.*, "SARS-COV-2, infection, transmission, transcription,

- translation, proteins, and treatment: A review,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 193, no. PB, pp. 1249–1273, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.10.172.
- [116] H. Ö. DİNÇ and P. YÜKSEL MAYDA, “SARS CoV-2 Pathogenesis and Immune Response,” *Bezmialem Sci.*, vol. 8, no. 3, pp. 153–156, 2020, doi: 10.14235/bas.galenos.2020.4776.
- [117] M. Pizzato *et al.*, “SARS-CoV-2 and the Host Cell: A Tale of Interactions,” *Front. Virol.*, vol. 1, no. January, pp. 1–29, 2022, doi: 10.3389/fviro.2021.815388.
- [118] S. K. M. Haque, O. Ashwaq, A. Sarief, and A. K. Azad John Mohamed, “A comprehensive review about SARS-CoV-2,” *Future Virol.*, vol. 15, no. 9, pp. 625–648, 2020, doi: 10.2217/fvl-2020-0124.
- [119] A. Jalali and M. Khoramipour, “SARS-CoV-2: Review of Structure, Genome, Genetic Variants, and Vaccines,” vol. 8, no. 1, pp. 16–34, 2022, doi: 10.22080/jgr.2021.21980.1270.
- [120] S. M. Khade, S. M. Yabaji, and J. Srivastava, “An update on COVID-19: SARS-CoV-2 life cycle, immunopathology, and BCG vaccination,” *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 51, no. 7, pp. 650–658, 2021, doi: 10.1080/10826068.2020.1848869.
- [121] S. B. P. Brito, I. O. Braga, M. M. Moraes, C. C. Cunha, S. C. Leão, and I. Takenami, “Immunopathological mechanisms involved in SARS-CoV-2 infection,” *J. Bras. Patol. e Med. Lab.*, vol. 56, pp. 1–10, 2020, doi: 10.5935/1676-2444.20200056.
- [122] K. Yuki, M. Fujiogi, and S. Koutsogiannaki, “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 ,” no. January, 2020.
- [123] S. K. Chatterjee, S. Saha, and M. N. M. Munoz, “Molecular Pathogenesis, Immunopathogenesis and Novel Therapeutic Strategy Against COVID-19,” *Front. Mol. Biosci.*, vol. 7, no. August, pp. 1–11, 2020, doi:

10.3389/fmolb.2020.00196.

- [124] T. Karşılıgil and H. Akdoğan, “SARS-CoV-2, What We Know, What We Do Not Know,” *Türk Mikrobiyoloji Cemiy. Derg.*, vol. 51, no. 3, pp. 203–213, 2021, doi: 10.5222/tmcd.2021.09825.
- [125] C. Voto, P. Berkner, and C. Brenner, “Overview of the Pathogenesis and Treatment of SARS-CoV-2 for Clinicians: A Comprehensive Literature Review,” *Cureus*, vol. 12, no. 9, 2020, doi: 10.7759/cureus.10357.
- [126] S. Ahmad, “A Review of COVID-19 (Coronavirus Disease-2019) Diagnosis, Treatments and Prevention,” *Eurasian J. Med. Oncol.*, vol. 4, no. 2, pp. 116–125, 2020, doi: 10.14744/ejmo.2020.90853.
- [127] W. J. Wiersinga, A. Rhodes, A. C. Cheng, S. J. Peacock, and H. C. Prescott, “Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review,” *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, vol. 324, no. 8, pp. 782–793, 2020, doi: 10.1001/jama.2020.12839.
- [128] Ö. Özdemir, “Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Diagnosis and Management (narrative review),” *Erciyes Med. J.*, vol. 42, no. 3, pp. 242–247, 2020, doi: 10.14744/etd.2020.99836.
- [129] C. Long *et al.*, “Diagnosis of the Coronavirus disease (COVID-19): rRT-PCR or CT?,” *Eur. J. Radiol.*, vol. 126, no. February, p. 108961, 2020, doi: 10.1016/j.ejrad.2020.108961.
- [130] A. T. Society, “Diagnosis and Management of COVID-19 Disease,” 2020. <https://www.thoracic.org/patients/patient-resources/resources/covid-19-diagnosis-and-mgmt.pdf>
- [131] G. Russello, A. Russo, F. Sisto, M. M. Scaltrito, and C. Farina, “Laboratory diagnosis of,” vol. 97, pp. 307–316, 2012.
- [132] C. Y. P. Lee, R. T. P. Lin, L. Renia, and L. F. P. Ng, “Serological Approaches for COVID-19: Epidemiologic Perspective on Surveillance and Control,” *Front. Immunol.*, vol. 11, no. April, pp. 1–7, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.00879.

- [133] J. M. Abduljalil, "Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2: available approaches and limitations," *New Microbes New Infect.*, vol. 36, no. June, p. 100713, 2020, doi: 10.1016/j.nmni.2020.100713.
- [134] R. W. Peeling *et al.*, "Serology testing in the COVID-19 pandemic response," *Lancet Infect. Dis.*, vol. 20, no. 9, pp. e245–e249, 2020, doi: 10.1016/S1473-3099(20)30517-X.
- [135] P. D. Minor, "Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges," *Virology*, vol. 479–480, no. June, pp. 379–392, 2015, doi: 10.1016/j.virol.2015.03.032.
- [136] J. Sejvar, *Vaccines and viral / toxin-associated neurologic infections*, 1st ed., vol. 123. Elsevier B.V., 2014. doi: 10.1016/B978-0-444-53488-0.00038-9.
- [137] M. S. F. Fenner, P. Bachmann, E. Paul, F. Murphy, "Immunization against Viral Diseases," in *Veterinary Virology*, Orlando, Florida: Academic Press, 1987, p. 672. [Online]. Available: <https://books.google.com.tr/books?id=cak5AwAAQBAJ&dq=CHAPTER+14++Immunization+against++Viral+Diseases++Attenuated+Live-Virus+Vaccines+267++Inactivated+Vaccines+270++Isolated+Immuno+gens+271++Antiidiotype+Antibodies+273++Attenuated+Live-Virus+versus+Inactiv>
- [138] X. Dai, Y. Xiong, N. Li, and C. Jian, "Vaccine Types," *Vaccines - the History and Future*, Mar. 05, 2019. undefined/state.item.id (accessed Jun. 04, 2022).
- [139] B. R. Singh, "Salmonella Vaccines for Animals and Birds and Their Future Perspective," *Open Vaccine J.*, vol. 2, pp. 100–112, 2009.
- [140] D. Griffin, Dee; Ensley, Steve; Smith, "Understanding Vaccines," *University of Nebraska*. <https://extensionpublications.unl.edu/assets/pdf/g1445.pdf>
- [141] D. J. A. Crommelin, R. D. Sindelar, and B. Meibohm, "Pharmaceutical biotechnology: Fundamentals and applications," *Pharm. Biotechnol. Fundam. Appl.*, pp. 1–653, 2019, doi: 10.1007/978-3-030-00710-2.
- [142] F. R. Vogel and N. Sarver, "Nucleic Acid Vaccines," *Clin. Microbiol. Rev.*,

- vol. 8, no. 3, pp. 406–410, 1995.
- [143] J. J. Donnelly, B. Wahren, and M. A. Liu, “DNA Vaccines: Progress and Challenges,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 2, pp. 633–639, 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.2.633.
- [144] J. Lee, S. A. Kumar, Y. Y. Jhan, and C. J. Bishop, “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 ,” no. January, 2020.
- [145] K. H. Khan, “DNA vaccines: Roles against diseases,” *Germs*, vol. 3, no. 1, pp. 26–35, 2013, doi: 10.11599/germs.2013.1034.
- [146] A. Stachyra, A. Góra-Sochacka, and A. Sirko, “DNA vaccines against influenza,” *Acta Biochim. Pol.*, vol. 61, no. 3, pp. 515–522, 2014, doi: 10.18388/abp.2014_1873.
- [147] Y. Koide, T. Nagata, A. Yoshida, and M. Uchijima, “DNA vaccines,” *Japanese Journal of Pharmacology*, vol. 83, no. 3. pp. 167–174, 2000. doi: 10.1254/jjp.83.167.
- [148] S. S. A. A. Hasson, J. K. Z. Al-Busaidi, and T. A. Sallam, “The past, current and future trends in DNA vaccine immunisations,” *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 5, no. 5, pp. 344–353, 2015, doi: 10.1016/S2221-1691(15)30366-X.
- [149] L. Blackburn, “RNA vaccines: an introduction,” *PHG Foundation*, 2018. [https://www.phgfoundation.org/media/612/download/RNA vaccines - an introduction - Content now out of date.pdf?v=1&inline=1](https://www.phgfoundation.org/media/612/download/RNA+vaccines+-+an+introduction+-+Content+now+out+of+date.pdf?v=1&inline=1)
- [150] A. Hubaud, “RNA vaccines: a novel technology to prevent and treat disease,” *Harvard University*, 2015. <https://sitn.hms.harvard.edu/flash/2015/rna-vaccines-a-novel-technology-to-prevent-and-treat-disease/>
- [151] N. Pardi, M. J. Hogan, F. W. Porter, and D. Weissman, “mRNA vaccines-a new era in vaccinology,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 17, no. 4, pp. 261–279, 2018, doi: 10.1038/nrd.2017.243.

- [152] D. B. Weiner, “RNA-Based Vaccination: Sending a Strong Message,” *Mol. Ther.*, vol. 21, no. 3, pp. 506–508, 2013, doi: 10.1038/mt.2013.26.
- [153] M. A. McNamara, S. K. Nair, and E. K. Holl, “RNA-Based Vaccines in Cancer Immunotherapy,” *J. Immunol. Res.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/794528.
- [154] T. Kramps and J. Probst, “Messenger RNA-based vaccines: Progress, challenges, applications,” *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, vol. 4, no. 6, pp. 737–749, Nov. 2013, doi: 10.1002/WRNA.1189.
- [155] T. Velikova and T. Georgiev, “SARS-CoV-2 vaccines and autoimmune diseases amidst the COVID-19 crisis,” *Rheumatol. Int.*, vol. 41, no. 3, pp. 509–518, 2021, doi: 10.1007/s00296-021-04792-9.
- [156] G. Maruggi, C. Zhang, J. Li, J. B. Ulmer, and D. Yu, “mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases,” *Mol. Ther.*, vol. 27, no. 4, pp. 757–772, 2019, doi: 10.1016/j.ymthe.2019.01.020.
- [157] S. M. Vrba, N. M. Kirk, M. E. Brisse, Y. Liang, and H. Ly, “Development and applications of viral vectored vaccines to combat zoonotic and emerging public health threats,” *Vaccines*, vol. 8, no. 4, pp. 1–31, 2020, doi: 10.3390/vaccines8040680.
- [158] C. Gyles, “Coronavirus vaccines,” *Can. Vet. J.*, vol. 61, no. 8, pp. 813–815, 2020, doi: 10.1016/j.vacune.2020.05.005.
- [159] T. Ura, K. Okuda, and M. Shimada, “Developments in viral vector-based vaccines,” *Vaccines*, vol. 2, no. 3, pp. 624–641, 2014, doi: 10.3390/vaccines2030624.
- [160] S. Rauch, E. Jasny, K. E. Schmidt, and B. Petsch, “New vaccine technologies to combat outbreak situations,” *Front. Immunol.*, vol. 9, no. SEP, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01963.
- [161] W. Li, M. D. Joshi, S. Singhanian, K. H. Ramsey, and A. K. Murthy, “Peptide vaccine: Progress and challenges,” *Vaccines*, vol. 2, no. 3, pp. 515–536, 2014, doi: 10.3390/vaccines2030515.

- [162] R. H. Meloen, J. I. Casal, K. Dalsgaard, and J. P. M. Langeveld, "Synthetic Peptide Vaccines: Success at Last," *Vaccines*, vol. 13, no. 10, pp. 127–133, 1995, doi: 10.1007/978-1-4613-0357-2_13.
- [163] M. Skwarczynski and I. Toth, "Peptide-based synthetic vaccines," *Chem. Sci.*, vol. 7, no. 2, pp. 842–854, 2016, doi: 10.1039/c5sc03892h.
- [164] R. Arnon and R. J. Horwitz, "Synthetic peptides as vaccines," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 4, no. 4, pp. 449–453, 1992, doi: 10.1016/S0952-7915(06)80037-3.
- [165] A. Azuar, W. Jin, S. Mukaida, W. M. Hussein, I. Toth, and M. Skwarczynski, "Recent advances in the development of peptide vaccines and their delivery systems against group a streptococcus," *Vaccines*, vol. 7, no. 3, pp. 1–27, 2019, doi: 10.3390/vaccines7030058.
- [166] H. Yang and D. S. Kim, *Peptide immunotherapy in vaccine development: From epitope to adjuvant*, 1st ed., vol. 99. Elsevier Inc., 2015. doi: 10.1016/bs.apcsb.2015.03.001.
- [167] N. A. M. Ibrahim and Y. S. E. Mansour, "a Review on Anticancer Peptide-Based Vaccines: Advantages, Limitations, and Current Challenges," *Indian J. Drugs*, vol. 8, no. 1, pp. 1–7, 2020, doi: 10.5281/zenodo.3351737.
- [170] H. W. Fei Deng, Shiyu Dai, "Advances and challenges in enveloped virus-like particle (VLP)-based vaccines," *J. Immunol. Sci.*, vol. 2, no. 2, pp. 36–41, 2018, doi: 10.29245/2578-3009/2018/2.1118.
- [171] R. Noad and P. Roy, "Virus-like particles as immunogens," *Trends Microbiol.*, vol. 11, no. 9, pp. 438–444, 2003, doi: 10.1016/S0966-842X(03)00208-7.
- [172] D. Yan, Y. Q. Wei, H. C. Guo, and S. Q. Sun, "The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 99, no. 24, pp. 10415–10432, 2015, doi: 10.1007/s00253-015-7000-8.
- [173] M. Mohsen, "The New Era of Virus-Like Particles Based Vaccines," *Gene Technol.*, vol. 05, no. 01, pp. 4–5, 2016, doi: 10.4172/2329-6682.1000136.

- [174] A. Shrestha, J. R. Sadeyen, and M. Iqbal, “Enhancing protective efficacy of poultry vaccines through targeted delivery of antigens to antigen-presenting cells,” *Vaccines*, vol. 6, no. 4, 2018, doi: 10.3390/vaccines6040075.
- [175] J. Fuenmayor, F. Gòdia, and L. Cervera, “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 ,” no. January, 2020.
- [176] F. S. Youssef, H. A. El-Banna, H. Y. Elzorba, and A. M. Galal, “Application of some nanoparticles in the field of veterinary medicine,” *Int. J. Vet. Sci. Med.*, vol. 7, no. 1, pp. 78–93, 2019, doi: 10.1080/23144599.2019.1691379.
- [177] A. M. Ealias and M. P. Saravanakumar, “A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application,” *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 263, no. 3, 2017, doi: 10.1088/1757-899X/263/3/032019.
- [178] A. L. Tornesello, M. Tagliamonte, M. L. Tornesello, F. M. Buonaguro, and L. Buonaguro, “Nanoparticles to Improve the E ffi cacy of Peptide-Based Cancer Vaccines,” pp. 1–20, 2020.
- [179] A. Rivas-Aravena, A. M. Sandino, and E. Spencer, “Nanoparticles and microparticles of polymers and polysaccharides to administer fish vaccines,” *Biol. Res.*, vol. 46, no. 4, pp. 407–419, 2013, doi: 10.4067/S0716-97602013000400012.
- [180] A. Taki and P. Smooker, “Small wonders—the use of nanoparticles for delivering antigen,” *Vaccines*, vol. 3, no. 3, pp. 638–661, 2015, doi: 10.3390/vaccines3030638.
- [181] G. Roebben, H. Emons, G. Reiners, J. E. Decker, and A. G. Steele, *Nanotechnology Standards*. 2011. doi: 10.1007/978-1-4419-7853-0.
- [182] A. D’Souza and R. Shegokar, *Polymer: Lipid Hybrid Nanostructures in Cancer Drug Delivery: Successes and Limitations*. Elsevier Inc., 2016. doi:

10.1016/B978-0-323-47347-7.00016-1.

- [183] P. Pandey and M. Dahiya, "A Brief Review on Inorganic Nanoparticles," *J. Crit. Rev.*, vol. 3, no. 3, pp. 18–26, 2016.
- [184] E. Öykü *et al.*, "Metalik nanopartiküllerin hedeflendirilmesi Targeting of metallic nanoparticles," *Derleme / Rev. Ege Tıp Derg. / Ege J. Med.*, vol. 59, no. 1, pp. 71–81, 2020.
- [185] R. Ladj *et al.*, "Individual inorganic nanoparticles: Preparation, functionalization and in vitro biomedical diagnostic applications," *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, no. 10, pp. 1381–1396, 2013, doi: 10.1039/c2tb00301e.
- [186] J. Cancino-Bernardi, I. M. M. Paino, J. P. Souza, V. S. Marangoni, P. F. M. Nogueira, and V. Zucolotto, *Current Challenges in the Commercialization of Nanocolloids: Toxicology and Environmental Issues*. Elsevier Inc., 2016. doi: 10.1016/B978-0-12-801578-0.00013-8.
- [187] K. Nasirzadeh, S. Nazarian, and S. M. G. Hayat, "Inorganic nanomaterials: A brief overview of the applications and developments in sensing and drug delivery," *J. Appl. Biotechnol. Reports*, vol. 3, no. 2, pp. 395–402, 2016.
- [188] M. Sharma, P. Easha, G. Tapasvi, and R. Reetika, *Nanomaterials in biomedical diagnosis*. INC, 2020. doi: 10.1016/b978-0-12-817923-9.00002-x.
- [189] N. Slepíčková Kasálková, P. Slepíčka, and V. Švorčík, "Carbon nanostructures, nanolayers, and their composites," *Nanomaterials*, vol. 11, no. 9, 2021, doi: 10.3390/nano11092368.
- [190] C. C. Berry, *Applications of inorganic nanoparticles for biotechnology*, 1st ed., vol. 4, no. 1. Elsevier LTD., 2012. doi: 10.1016/B978-0-12-415769-9.00006-6.
- [191] S. P. Gubin, Y. A. Koksharov, G. B. Khomutov, and G. Y. Yurkov, "Magnetic nanoparticles: Preparation, structure and properties," *Usp. Khim.*, vol. 74, no. 6, pp. 539–574, 2005, doi: 10.1070/rc2005v074n06abeh000897.
- [192] A. S. Balderrama-González, H. A. Piñón-Castillo, C. A. Ramírez-Valdespino,

- L. L. Landeros-Martínez, E. Orrantia-Borunda, and H. E. Esparza-Ponce, "Antimicrobial resistance and inorganic nanoparticles," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 23, 2021, doi: 10.3390/ijms222312890.
- [193] R. K. Shatrohan Lal, "Synthesis of Organic Nanoparticles and their Applications in Drug Delivery and Food Nanotechnology: A Review," *J. Nanomater. Mol. Nanotechnol.*, vol. 03, no. 04, 2014, doi: 10.4172/2324-8777.1000150.
- [194] H. Feracci, B. S. Gutierrez, W. Hempel, and I. S. Gil, *Organic nanoparticles*, 1st ed., vol. 4, no. 1. Elsevier LTD., 2012. doi: 10.1016/B978-0-12-415769-9.00008-X.
- [195] P. Falagan-Lotsch, E. M. Grzincic, and C. J. Murphy, "New advances in nanotechnology-based diagnosis and therapeutics for breast cancer: An assessment of active-targeting inorganic nanoplatfoms," *Bioconjug. Chem.*, vol. 28, no. 1, pp. 135–152, 2017, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00591.
- [196] B. García-Pinel *et al.*, "Lipid-based nanoparticles: Application and recent advances in cancer treatment," *Nanomaterials*, vol. 9, no. 4, pp. 1–23, 2019, doi: 10.3390/nano9040638.
- [197] J. Uday Raj, R. Srikanth, G. Kyathi, and G. Balakrishna, "Effect of Unipolar Acu-Stim on Muscle Re-Education Following Tendon Transfer - A Case Study," *Int. J. Physiother.*, vol. 2, no. 1, p. 347, 2015, doi: 10.15621/ijphy/2015/v2i1/60039.
- [198] I. Gessner and I. Neundorf, "Nanoparticles modified with cell-penetrating peptides: Conjugation mechanisms, physicochemical properties, and application in cancer diagnosis and therapy," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 7, pp. 1–21, 2020, doi: 10.3390/ijms21072536.
- [199] L. Salvia-Trujillo, M. Artiga-Artigas, A. Molet-Rodríguez, A. Turmo-Ibarz, and O. Martín-Belloso, "Emulsion-Based Nanostructures for the Delivery of Active Ingredients in Foods," *Front. Sustain. Food Syst.*, vol. 2, no. November, pp. 1–7, 2018, doi: 10.3389/fsufs.2018.00079.
- [200] A. Zielinska *et al.*, "Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization,

- Toxicology and Ecotoxicology,” *Molecules*, vol. 25, no. 16, Aug. 2020, doi: 10.3390/MOLECULES25163731.
- [201] S. Guo *et al.*, “Applications of polymer-based nanoparticles in vaccine field,” *Nanotechnol. Rev.*, vol. 8, no. 1, pp. 143–155, 2019, doi: 10.1515/ntrev-2019-0014.
- [202] S. A. DERMAN, “Canine Parvovirus’e Ait Antijenik Özellikli Sentetik Peptidlerin Sentezi Ve Biyokonjugatlarının Geliştirilmesi,” Yıldız Teknik Üniversitesi, 2012.
- [203] A. des Rieux, V. Fievez, M. Garinot, Y. J. Schneider, and V. Préat, “Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach,” *J. Control. Release*, vol. 116, no. 1, pp. 1–27, 2006, doi: 10.1016/j.jconrel.2006.08.013.
- [204] H. K. Makadia and S. J. Siegel, “Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier,” *Polymers (Basel)*, vol. 3, no. 3, pp. 1377–1397, 2011, doi: 10.3390/polym3031377.
- [205] S. S. Huang, I. H. Li, P. Da Hong, and M. K. Yeh, “Development of Yersinia pestis F1 antigen-loaded microspheres vaccine against plague,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, no. 1, pp. 813–822, 2014, doi: 10.2147/IJN.S56260.
- [206] M. Allahyari and E. Mohit, “Peptide/protein vaccine delivery system based on PLGA particles,” *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 12, no. 3, pp. 806–828, 2016, doi: 10.1080/21645515.2015.1102804.
- [207] A. L. Silva *et al.*, “Optimization of encapsulation of a synthetic long peptide in PLGA nanoparticles: Low-burst release is crucial for efficient CD8+ T cell activation,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 83, no. 3, pp. 338–345, 2013, doi: 10.1016/j.ejpb.2012.11.006.
- [208] Y.-R. Lee, Y.-H. Lee, S.-A. Im, K. Kim, and C.-K. Lee, “Formulation and Characterization of Antigen-loaded PLGA Nanoparticles for Efficient Cross-priming of the Antigen,” *Immune Netw.*, vol. 11, no. 3, p. 163, 2011, doi: 10.4110/in.2011.11.3.163.
- [209] N. Biotechnologies, “PLGA nanoparticles,” *Nanovex Biotechnologies*, 2017.

<https://www.nanovexbiotech.com/858-2/>

- [210] J. E. Rosas *et al.*, “Biodegradable PLGA microspheres as a delivery system for malaria synthetic peptide SPf66,” *Vaccine*, vol. 19, no. 31, pp. 4445–4451, 2001, doi: 10.1016/S0264-410X(01)00192-X.
- [211] S. Mohammadi-Samani and B. Taghipour, “PLGA micro and nanoparticles in delivery of peptides and proteins; Problems and approaches,” *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 20, no. 4, pp. 385–393, 2015, doi: 10.3109/10837450.2014.882940.
- [212] L. Feng *et al.*, “Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-dose hepatitis B vaccine using PLGA microspheres,” *J. Control. Release*, vol. 112, no. 1, pp. 35–42, 2006, doi: 10.1016/j.jconrel.2006.01.012.
- [213] S. C. Chuang, J. C. Ko, C. P. Chen, J. T. Du, and C. Da Yang, “Encapsulation of chimeric protein rSAG1/2 into poly(lactide-co-glycolide) microparticles induces long-term protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice,” *Exp. Parasitol.*, vol. 134, no. 4, pp. 430–437, 2013, doi: 10.1016/j.exppara.2013.04.002.
- [214] P. A. Sales *et al.*, “Use of biodegradable PLGA microspheres as a slow release delivery system for the *Boophilus microplus* synthetic vaccine SBm7462,” *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 107, no. 3–4, pp. 281–290, 2005, doi: 10.1016/j.vetimm.2005.05.004.
- [215] T. Cele, “Preparation of Nanoparticles,” *Eng. Nanomater. - Heal. Saf.*, pp. 1–14, 2020, doi: 10.5772/intechopen.90771.
- [216] R. Konwar and A. B. Ahmed, “Nanoparticle: an Overview of Preparation, Characterization and Application,” *Int. Res. J. Pharm.*, vol. 4, no. 4, pp. 47–57, 2016, doi: 10.7897/2230-8407.04408.
- [217] D. Essa, P. P. D. Kondiah, Y. E. Choonara, and V. Pillay, “The Design of Poly(lactide-co-glycolide) Nanocarriers for Medical Applications,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, no. February, pp. 1–20, 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.00048.
- [218] R. K. Saini, L. P. Bagri, A. K. Bajpai, and A. Mishra, *Responsive polymer*

- nanoparticles for drug delivery applications*. Elsevier Ltd., 2018. doi: 10.1016/B978-0-08-101997-9.00015-1.
- [219] B. V. N. Nagavarma, H. K. S. Yadav, A. Ayaz, L. S. Vasudha, and H. G. Shivakumar, "Different Techniques for," vol. 5, 2012.
- [220] J. P. Rao and K. E. Geckeler, "Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, no. 7, pp. 887–913, 2011, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001.
- [221] Y. Wang, P. Li, T. T. D. Tran, J. Zhang, and L. Kong, "Manufacturing techniques and surface engineering of polymer based nanoparticles for targeted drug delivery to cancer," *Nanomaterials*, vol. 6, no. 2, 2016, doi: 10.3390/nano6020026.
- [222] M. Isabirye, D. V. . Raju, M. Kitutu, V. Yemeline, J. Deckers, and J. Poesen Additional, "We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %," *Intech*, p. 13, 2012, [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1039/C7RA00172J%0Ahttps://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.12.014>
- [223] K. S. Yadav and K. K. Sawant, "Modified nanoprecipitation method for preparation of cytarabine-loaded PLGA nanoparticles," *AAPS PharmSciTech*, vol. 11, no. 3, pp. 1456–1465, 2010, doi: 10.1208/s12249-010-9519-4.
- [224] H. E. Gültekin and Z. Değim, "Biodegradable polymeric nanoparticles are effective systems for controlled drug delivery," *Fabad J. Pharm. Sci.*, vol. 38, no. 2, pp. 107–118, 2013.
- [225] C. Wischke and S. P. Schwendeman, "Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles," *Int. J. Pharm.*, vol. 364, no. 2, pp. 298–327, 2008, doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.04.042.
- [226] S. Dubey, N. Mody, R. Sharma, U. Agrawal, and S. P. Vyas, *Nanobiomaterials: Novel nanoplatforms for protein and peptide delivery*.

- Elsevier Inc., 2016. doi: 10.1016/B978-0-323-42866-8.00004-6.
- [227] Y. P. Sun, M. J. Meziani, P. Pathak, and L. Qu, "Polymeric nanoparticles from rapid expansion of supercritical fluid solution," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 11, no. 5, pp. 1366–1373, 2005, doi: 10.1002/chem.200400422.
- [228] P. Chakravarty, A. Famili, K. Nagapudi, and M. A. Al-Sayah, *Using supercritical fluid technology as a green alternative during the preparation of drug delivery systems*, vol. 11, no. 12. 2019. doi: 10.3390/pharmaceutics11120629.
- [229] N. B. Jadav and A. Paradkar, *Solid dispersions: Technologies used and future outlook. technologies used and future outlook*. Elsevier Inc., 2020. doi: 10.1016/B978-0-12-817778-5.00005-1.
- [230] A. Katmis, S. Fide, S. Karaismailoglu, and S. Derman, "Synthesis and characterization methods of polymeric nanoparticles," *Charact. Appl. Nanomater.*, vol. 2, no. 2, p. 60, 2019, doi: 10.24294/can.v2i2.791.
- [231] E. Chiellini, C. Errico, C. Bartoli, and F. Chiellini, "Poly(hydroxyalkanoates)-based polymeric nanoparticles for drug delivery," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2009, no. May 2014, 2009, doi: 10.1155/2009/571702.
- [232] M. Mahalingam and K. Krishnamoorthy, "Selection of a suitable method for the preparation of polymeric nanoparticles: Multi-criteria decision making approach," *Adv. Pharm. Bull.*, vol. 5, no. 1, pp. 57–67, 2015, doi: 10.5681/apb.2015.008.
- [233] H. Y. Kwon, J. Y. Lee, S. W. Choi, Y. Jang, and J. H. Kim, "Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 182, no. 1–3, pp. 123–130, 2001, doi: 10.1016/S0927-7757(00)00825-6.
- [234] C. I. C. Crucho and M. T. Barros, "Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 80, pp. 771–784, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.06.004.
- [235] D. V. P. and P. S. D. P. J. Naik, "Pelagia Research Library," *Der Chem. Sin.*, vol. 4, no. 4, pp. 68–72, 2013.

- [236] S. Desgouilles *et al.*, “The Design of Nanoparticles Obtained by Solvent Evaporation: A Comprehensive Study,” *Langmuir*, vol. 19, no. 22, pp. 9504–9510, 2003, doi: 10.1021/la034999q.
- [237] T. Urbaniak and W. Musiał, “Influence of solvent evaporation technique parameters on diameter of submicron lamivudine-poly- ϵ -caprolactone conjugate particles,” *Nanomaterials*, vol. 9, no. 9, 2019, doi: 10.3390/nano9091240.
- [238] S. G. Patel, M. D. Patel, A. J. Patel, M. B. Chougule, and H. Choudhury, *Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery*. Elsevier Inc., 2018. doi: 10.1016/B978-0-12-812218-1.00008-7.
- [239] J. Mosafer and M. Teymouri, “Comparative study of superparamagnetic iron oxide/doxorubicin co-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanospheres prepared by different emulsion solvent evaporation methods,” *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 46, no. 6, pp. 1146–1155, 2018, doi: 10.1080/21691401.2017.1362415.
- [240] J. Vysloužil *et al.*, “Influence of different formulations and process parameters during the preparation of drug-loaded PLGA microspheres evaluated by multivariate data analysis,” *Acta Pharm.*, vol. 64, no. 4, pp. 403–417, 2014, doi: 10.2478/acph-2014-0032.
- [241] R. A. Jain, “The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices,” *Biomaterials*, vol. 21, no. 23, pp. 2475–2490, 2000, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00115-0.
- [242] M. G. Nava-Arzaluz, E. Pinon-Segundo, A. Ganem-Rondero, and D. Lechuga-Ballesteros, “Single Emulsion-Solvent Evaporation Technique and Modifications for the Preparation of Pharmaceutical Polymeric Nanoparticles,” *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.*, vol. 6, no. 3, pp. 209–223, 2012, doi: 10.2174/187221112802652633.
- [243] E. Lagreca, V. Onesto, C. Di Natale, S. La Manna, P. A. Netti, and R. Vecchione, “Recent advances in the formulation of PLGA microparticles for

- controlled drug delivery,” *Prog. Biomater.*, vol. 9, no. 4, pp. 153–174, 2020, doi: 10.1007/s40204-020-00139-y.
- [244] S. K. Paswan and T. R. Saini, “Purification of Drug Loaded PLGA Nanoparticles Prepared by Emulsification Solvent Evaporation Using Stirred Cell Ultrafiltration Technique,” *Pharm. Res.*, vol. 34, no. 12, pp. 2779–2786, 2017, doi: 10.1007/s11095-017-2257-5.
- [245] M. M. Modena, B. Rühle, T. P. Burg, and S. Wuttke, “Nanoparticle Characterization: What to Measure?,” *Adv. Mater.*, vol. 31, no. 32, pp. 1–26, 2019, doi: 10.1002/adma.201901556.
- [246] A. Kumar and C. K. Dixit, “Methods for characterization of nanoparticles,” *Adv. Nanomedicine Deliv. Ther. Nucleic Acids*, pp. 44–58, 2017, doi: 10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1.
- [247] B. S. Murty, P. Shankar, B. Raj, B. B. Rath, and J. Murday, “Textbook of Nanoscience and Nanotechnology,” *Textb. Nanosci. Nanotechnol.*, pp. 149–175, 2013, doi: 10.1007/978-3-642-28030-6.
- [248] S. Mahmood, U. K. Mandal, B. Chatterjee, and M. Taher, “Advanced characterizations of nanoparticles for drug delivery: Investigating their properties through the techniques used in their evaluations,” *Nanotechnol. Rev.*, vol. 6, no. 4, pp. 355–372, 2017, doi: 10.1515/ntrev-2016-0050.
- [249] “Components in a SEM,” *Nanoscience Instruments*.
<https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-electron-microscopy/components/>
- [250] C. A. De Caro, “UV / VIS Spectrophotometry,” *Mettler-Toledo Int.*, no. September 2015, pp. 4–14, 2015, [Online]. Available: http://lcwu.edu.pk/ocd/cfiles/Chemistry/MSc/Chem-C-410/Fundamentals_UV_VIS.pdf
- [251] F. Schmid, “Biological Macromolecules: UV- visible Spectrophotometry,” *eLS*, pp. 1–4, 2001, doi: 10.1038/Npg.els.0003142.
- [252] M. Joshi, A. Bhattacharyya, and S. W. Ali, “Characterization techniques for nanotechnology applications in textiles,” *Indian J. Fibre Text. Res.*, vol. 33,

- no. 3, pp. 304–317, 2008.
- [253] P. Heera and S. Shanmugam, “Nanoparticle Characterization and Application : An Overview,” *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 4, no. 8, pp. 379–386, 2015.
- [254] S. Soundararajan and K. Palanivelu, “Studies on Mechanical and Electrical Properties of Poly Carbonate-EPDM Blends,” *IOSR J. Polym. Text. Eng.*, vol. 1, no. 2, pp. 08–10, 2014, doi: 10.9790/019x-0120810.
- [255] “Determination of protein concentration by ultraviolet spectroscopy,” *Joint initiative of IITs and IISc*, 2022. <https://archive.Nptel.ac.in/content/storage2/courses/102103047/PDF/mod2.pdf>
- [256] “The Basics of UV-Vis Spectrophotometry,” *AGILENT*, 2021. <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/primer-uv-vis-basics-5980-1397en-agilent.pdf>
- [257] S. ACAR, “PEPTİD PROTEİN KOVALENT KONJUGASYONU,” Yıldız Teknik Üniversitesi, 2006.
- [258] J. M. Antosiewicz and D. Shugar, “UV–Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 2: selected applications,” *Biophys. Rev.*, vol. 8, no. 2, pp. 163–177, 2016, doi: 10.1007/s12551-016-0197-7.
- [259] M. A. Saraiva, “Interpretation of α -synuclein UV absorption spectra in the peptide bond and the aromatic regions,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 212, no. September, p. 112022, 2020, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.112022.
- [260] N. ÇELEBİ, “Kolloidler,” 2011. <https://www.scribd.com/doc/49214741/16>
- [261] “Zeta potential - An introduction in 30 minutes,” *MALVERN*, 2015. <https://www.research.colostate.edu/wp-content/uploads/2018/11/ZetaPotential-Introduction-in-30min-Malvern.pdf>

- [262] S. Bhattacharjee, "DLS and zeta potential - What they are and what they are not?," *J. Control. Release*, vol. 235, pp. 337–351, 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- [263] S. Karmakar, "Particle Size Distribution and Zeta Potential Based on Dynamic Light Scattering: Techniques to Characterize Stability and Surface Charge Distribution of Charged Colloids," *Recent Trends Mater. Phys. Chem.*, no. January, pp. 117–159, 2019.
- [264] M. Ateş, "Nanoparçacıkların ölçme ve inceleme teknikleri," *Turkish J. Sci. Rev.*, vol. 11, no. 1, pp. 63–69, 2018.
- [265] M. Gumustas, C. T. Sengel-Turk, A. Gumustas, S. A. Ozkan, and B. Uslu, *Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems*. Elsevier Inc., 2017. doi: 10.1016/B978-0-323-52725-5.00005-8.
- [266] N. Mahmood Aljamali, "Zetasizer Technique in Biochemistry," *Biochem. Anal. Biochem.*, vol. 04, no. 02, pp. 1–5, 2015, doi: 10.4172/2161-1009.1000168.
- [267] "Zeta potential and size measurement of nanoparticles by laser scattering video microscopy," *Particle Metrix*. <https://analytik.co.uk/wp-content/uploads/2016/12/whitepaper-zeta-potential-and-size-measurement-of-nanoparticles-by-laser-scattering-video-microscopy.pdf>
- [268] "Zeta Potential: Layout, Calculating, Analysis," *HORIBA*, 2022. <https://www.horiba.com/esp/scientific/technologies/zeta-potential/zeta-potential/>
- [269] A. Lapresta-Fernández *et al.*, "A general perspective of the characterization and quantification of nanoparticles: Imaging, spectroscopic, and separation techniques," *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.*, vol. 39, no. 6, pp. 423–458, 2014, doi: 10.1080/10408436.2014.899890.
- [270] D. Kowalczyk and M. Pitucha, "Application of FTIR method for the assessment of immobilization of active substances in the matrix of biomedical materials," *Materials (Basel)*, vol. 12, no. 18, 2019, doi:

10.3390/ma12182972.

- [271] Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. U. Rehman, “Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 43, no. 2, pp. 134–179, 2008, doi: 10.1080/05704920701829043.
- [272] S. Mourdikoudis, R. M. Pallares, and N. T. K. Thanh, “Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties,” *Nanoscale*, vol. 10, no. 27, pp. 12871–12934, 2018, doi: 10.1039/c8nr02278j.
- [273] D. I. Santos, M. J. N. Correia, M. M. Mateus, J. A. Saraiva, A. A. Vicente, and M. Moldão, “Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy as a possible rapid tool to evaluate abiotic stress effects on pineapple by-products,” *Appl. Sci.*, vol. 9, no. 19, 2019, doi: 10.3390/app9194141.
- [274] A. Durazzo *et al.*, “Qualitative analysis of traditional Italian dishes: FTIR approach,” *Sustain.*, vol. 10, no. 11, 2018, doi: 10.3390/su10114112.
- [275] S. K. Sharma, D. S. Verma, L. U. Khan, S. Kumar, and S. B. Khan, “Handbook of Materials Characterization,” *Handb. Mater. Charact.*, no. July 2020, pp. 1–613, 2018, doi: 10.1007/978-3-319-92955-2.
- [276] F. Rolle and M. Segal, “Use of FTIR spectroscopy for the measurement of CO₂ carbon stable isotope ratios,” vol. 05002, p. 05002, 2019, doi: 10.1051/metrology/201905002.
- [277] C. Berthomieu and R. Hienerwadel, “Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy,” *Photosynth. Res.*, vol. 101, no. 2–3, pp. 157–170, 2009, doi: 10.1007/s11120-009-9439-x.
- [278] A. B. D. Nandiyanto, R. Oktiani, and R. Ragadhita, “How to read and interpret ftir spectroscopy of organic material,” *Indones. J. Sci. Technol.*, vol. 4, no. 1, pp. 97–118, 2019, doi: 10.17509/ijost.v4i1.15806.
- [279] S. Chang, “Title of Research: Analysis of Polymer Standards by Fourier Transform Infrared Spectroscopy-Attenuated Total Reflectance and Pyrolysis Gas Chromatography/Mass Spectroscopy and the Creation of Searchable Libraries,” pp. 404–315, 2012.

- [280] E. F. Nicholls, L. Madera, and R. E. W. Hancock, “Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1213, no. 1, pp. 46–61, 2010, doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05787.x.
- [281] C. M. S. Ribeiro and V. E. J. C. Schijns, “Chapter 1 Immunology of Vaccine Adjuvants,” no. August, 2016, doi: 10.1007/978-1-60761-585-9.
- [282] N. Garçon, G. Leroux-Roels, and W. F. Cheng, “Vaccine adjuvants,” *Perspect. Vaccinol.*, vol. 1, no. 1, pp. 89–113, 2011, doi: 10.1016/j.pervac.2011.05.004.
- [283] S. G. Reed, M. T. Orr, and C. B. Fox, “Key roles of adjuvants in modern vaccines,” *Nat. Med.*, vol. 19, no. 12, pp. 1597–1608, 2013, doi: 10.1038/nm.3409.
- [284] J. Aucouturier, L. Dupuis, and V. Ganne, “Adjuvants designed for veterinary and human vaccines,” *Vaccine*, vol. 19, no. 17–19, pp. 2666–2672, 2001, doi: 10.1016/S0264-410X(00)00498-9.
- [285] A. Di Pasquale, S. Preiss, F. T. Da Silva, and N. Garçon, “Vaccine adjuvants: From 1920 to 2015 and beyond,” *Vaccines*, vol. 3, no. 2, pp. 320–343, 2015, doi: 10.3390/vaccines3020320.
- [286] R. Edelman, *Vaccine Adjuvants Preparation Methods and Research Protocols*. New Jersey: Humana Press Inc., 2000.
- [287] J. C. Aguilar and E. G. Rodríguez, “Vaccine adjuvants revisited,” *Vaccine*, vol. 25, no. 19, pp. 3752–3762, 2007, doi: 10.1016/j.vaccine.2007.01.111.
- [288] J. D. S. Apostólico, V. A. S. Lunardelli, F. C. Coirada, S. B. Boscardin, and D. S. Rosa, “Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing,” *J. Immunol. Res.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/1459394.
- [289] H. F. Stills, “Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund’s complete and other adjuvants,” *ILAR J.*, vol. 46, no. 3, pp. 280–293, 2005, doi: 10.1093/ilar.46.3.280.
- [290] Z. Wu and K. Liu, “Overview of vaccine adjuvants,” *Med. Drug Discov.*, vol. 11, no. May, p. 100103, 2021, doi: 10.1016/j.medidd.2021.100103.

- [291] Z. Liang *et al.*, “Adjuvants for Coronavirus Vaccines,” *Front. Immunol.*, vol. 11, no. November, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.589833.
- [292] M. Ghasemi, T. Turnbull, S. Sebastian, and I. Kempson, “The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 23, 2021, doi: 10.3390/ijms222312827.
- [293] A. Martín-Moreno *et al.*, “Nanoparticle-delivered HIV peptides to dendritic cells a promising approach to generate a therapeutic vaccine,” *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 7, pp. 1–17, 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12070656.
- [294] J. Van Meerloo, G. J. L. Kaspers, and J. Cloos, “Cell sensitivity assays: The MTT assay,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 731, pp. 237–245, 2011, doi: 10.1007/978-1-61779-80-5_20.
- [295] D. Yao, A. G. Vlessidis, and N. P. Evmiridis, “Determination of nitric oxide in biological samples,” *Microchim. Acta*, vol. 147, no. 1–2, pp. 1–20, 2004, doi: 10.1007/s00604-004-0212-8.
- [296] T. Akaike and H. Maeda, “Nitric oxide and virus infection,” *Immunology*, vol. 101, no. 3, pp. 300–308, 2000, doi: 10.1046/j.1365-2567.2000.00142.x.
- [297] S. Derman, Z. A. Mustafaeva, E. S. Abamor, M. Bagirova, and A. Allahverdiyev, “Preparation, characterization and immunological evaluation: Canine parvovirus synthetic peptide loaded plga nanoparticles,” *J. Biomed. Sci.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–12, 2015, doi: 10.1186/s12929-015-0195-2.
- [298] G. R. de Abreu Cabral, Z. T. Wang, L. D. Sibley, and R. A. DaMatta, “Inhibition of nitric oxide production in activated macrophages caused by *Toxoplasma gondii* infection occurs by distinct mechanisms in different mouse macrophage cell lines,” *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. AUG, pp. 1–11, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.01936.
- [299] M. Fujihara, N. Ito, J. L. Pace, Y. Watanabe, S. W. Russell, and T. Suzuki,

- “Role of endogenous interferon- β in lipopolysaccharide-triggered activation of the inducible nitric-oxide synthase gene in a mouse macrophage cell line, J774,” *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 17, pp. 12773–12778, 1994, doi: 10.1016/s0021-9258(18)99942-4.
- [300] J. S. Milano, F. Arcoleo, M. Dieli, D. Rita, and E. Cillari, “Prostaglandin E , Regulates Inducible Nitric Oxide Synthase In The Murine,” vol. 6980, no. 94, pp. 105–115, 1995.
- [301] S. F. A. Albaayit, A. S. K. Al-Khafaji, and H. S. Alnaimy, “In vitro macrophage nitric oxide and interleukin-1 beta suppression by moringa peregrina seed,” *Turkish J. Pharm. Sci.*, vol. 16, no. 3, pp. 362–365, 2019, doi: 10.4274/tjps.galenos.2018.52244.
- [302] M. Akdoğan and M. Yöntem, “SİTOKİNLER,” *Online Türk Sağlık Bilim. Derg.*, pp. 36–45, 2018, doi: 10.26453/otjhs.350321.
- [303] M. Caroff, D. Karibian, J. M. Cavaillon, and N. Haeffner-Cavaillon, “Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides,” *Microbes Infect.*, vol. 4, no. 9, pp. 915–926, 2002, doi: 10.1016/S1286-4579(02)01612-X.
- [304] S. Kany, J. T. Vollrath, and B. Relja, “Cytokines in inflammatory disease 炎症性疾患におけるサイトカイン,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 23, pp. 1–31, 2019.
- [305] L. Crosby *et al.*, “Murine J774 macrophages recognize LPS/IFN-g, non-CpG DNA or two-CpG DNA-containing sequences as immunologically distinct,” *Nitric Oxide - Biol. Chem.*, vol. 22, no. 3, pp. 242–257, 2010, doi: 10.1016/j.niox.2010.01.005.
- [306] İ. Güner, D. Özmen, and B. Oya, “Sitokinlerin işlevleri ve sınıflandırılması,” *T Klin J Med Sci 1997*, vol. 17, pp. 65–74, 1997.
- [307] G. MAYER, “SİTOKİNLER VE İMMÜNOREGÜLASYON,” 2016. <https://www.microbiologybook.org/Turkish-immunol/immunolchapter13turk.htm>
- [308] G. MAYER, “Spesifik immün yanıtta hücre – hücre etkileşimleri,” 2016,

[Online]. Available: <https://www.microbiologybook.org/Turkish-immunol/immunolchapter12turk.htm#:~:text=Th1 hücreleri tarafından üretilen sitokinler,eder%2C bu antikor üretimiyle sonuçlanır.>



Konferans Bildirisi

- [1] M. Ramazan, D. Serap, “Aşı uygulaması amaçlı antijenik peptid yüklü nanopartiküllerin üretimi ve biyolojik değerlendirilmesi,” EurasianBioChem., 2022.

