2000-44

TÜBİTAK

TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Temel Bilimler Araştırma Grubu
Basic Sciences Research Grant Committee

HEPATİT-B YÜZEY ANTİJENİ İÇEREN MANNAN KAPLI LİPOZOMLARIN ADJUVANT ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI İLE LENFOSİT ALTGRUPLARININ TAYİNİ

PROJE NO : TBAG-1584 (197T008)

Y.Doç.Dr. MAYDA GÜRSEL
HANDE CANPINAR

EYLÜL 1998
ANKARA

ÖNSÖZ

Hepatit B yüzey antijeni içeren mannan kaplı lipozomların adjuvant özelliklerinin araştırılması ile lenfosit altgruplarının tayini adlı bu projede farklı şekerlerle kaplanmış değişik lipozomal formülasyonların hücresel ve sıvısal bağışıklık üzerindeki etkileri incelenmiş, ayrıca T-lenfosit altgruplarının ışık mikroskopisi yoluyla yine lipozom içeren bir sistemle sayılmalarına yönelik bir sistem geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu projede yer alan çalışmaların tamamı TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: TBAG-1584) ve tüm deneyler ODTÜ Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Araştırma Ünitesi, Biomateryal Laboratuvarında yürütülmüştür.

Raporun ilk bölümünde konuya yönelik literatür bigisi, ikinci bölümünde Materyal ve Metodlar, üçüncü bölümde ise sonuçlar sunulmaktadır.

Projenin ilk aşamasındaki stabilite tayini deneylerinde aktif yer alan lisans öğrencilerimiz Şahru Yüksel ve Barış E. Dayanç'a göstermiş oldukları titiz çalışmadan dolayı teşekkür ederim. Projenin son aşamasını oluşturan lenfosit altgruplarının tayini deneylerinde kan örneklerinin toplanmasında ve incelenmesinde son derece yardımcı olan ODTÜ Sağlık Merkezi Mikrobiyoloji Uzmanı Sayın Nusret Taheri ve çalışma arkadaşlarına içten teşekkür ederim.

Son olarak da bu projenin gerçekleştirilmesindeki her aşamadaki değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Vasıf Hasırcı'ya içten teşekkür ederim.

Dr. Mayda Gürsel

Proje Yöneticisi

Eylul 1998, Ankara

İÇİNDEKİLER

Önsöz.....1

Tablolar Listesi.....4

Şekiller Listesi.....5

Öz.....6

Abstract.....7

Bölüm 1. Giriş.....8

1.1. Amaç.....8

1.2. Literatür Özeti ve Konunun Önemi.....8

Bölüm 2. Materyal ve Metodlar.....12

2.1. N-(p-aminofenil)stearilamid (APSA) sentezi.....12

2.2. Multilamellar lipozomların (MLV) hazırlanması.....13

2.3. Küçük tek katmanlı lipozomların (SUV) hazırlanması.....13

2.4. Dehidrasyon-rehidrasyon lipozomlarının (DRV) hazırlanması.....13

2.5. Polisakkaritlerin lipozom yüzeyine kovalent bağlanması.....14

2.6. Lipozom yüzeyine monoklonal antikorların kovalent olarak bağlanması.....14

2.7. Fenol-sülfirik asit şeker tayin yöntemi.....15

2.8. Biçinçoninik asit protein tayin yöntemi.....15

2.9. İmmünizasyon çalışmaları.....17

2.10. ELISA ile sıvısal yanıt ölçümü.....17

2.11. Sitokin ekstraksyon ve tayini.....18

2.12. Kanda lenfosit altgruplarının tayinine yönelik çalışmalar.....18

Bölüm 3. Sonuçlar.....20

3.1. Aşıda kullanılacak formülasyonların hazırlanma şartlarının optimizasyonu 20

3.2. Aşıda kullanılacak formülasyonların stabilitelerinin belirlenmesi.....23

3.3. Lipozom bazlı aşı formülasyonlarının hazırlanması.....25

3.4. Lipozomal Hepatit B yüzey antijeni ile aşılanmış hayvanlardaki antikor yanıtları.....28

3.5. Lipozomal Hepatit B yüzey antijeni ile aşılanmış hayvanlardaki sitokin yanıtları.....29

3.6. Değişik Lipozom popülasyonları kullanılarak lenfosit altgruplarının tayinine yönelik çalışmalar.....35

3.7.Sonuçlarla İlgili Tartışma ve Öneriler.....41

Kısım 4. Referanslar.....42

Bibliyografi.....45

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Lipozom tipi ve inkübasyon zamanının yüzeye bağlanan şeker verimi üzerindeki etkileri 22

Tablo 3.2. Farelere enjekte edilen formülasyonların özellikleri 26

Tablo 3.3. Lenfosit altgrup tayininde kullanılan lipozomların hazırlanma koşulları ve özellikleri 36

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. APSA sentezlenme şeması 12

Şekil 2.2. Proteinlerin lipozom üzerine kovalent bağlanma şeması 16

Şekil 2.3. Periferal kan örneğinin lenfosit izolasyon sıvısı üzerine uygulanıp sanatrifüjü sonrası elde edilen fraksiyonlar 19

Şekil 3.1. Kontrol (yüzeye şeker bağlanmamış) ve yüzey modifikasyonu yapılmış DRV tipi lipozomlardan CF salım profili. 24

Şekil 3.2. Serbest ya da lipozomal HbsAg ile enjekte edilmiş farelerdeki IgG_1 altgrup antikor yanıtları. 30

Şekil 3.3. Serbest ya da lipozomal HbsAg ile enjekte edilmiş farelerdeki IgG_{2a} altgrup antikor yanıtları. 31

Şekil 3.4. Serbest ya da lipozomal HbsAg ile enjekte edilmiş farelerdeki IgG_{2b} altgrup antikor yanıtları. 32

Şekil 3.5. İmmünize edilmiş ve kontrol (aşılanmamış) farelerin dalak homojenatlarındaki IL-4 seviyeleri. 33

Şekil 3.6. İmmünize edilmiş ve kontrol (aşılanmamış) farelerin dalak homojenatlarındaki IFN-γ seviyeleri. 34

Şekil 3.7. Anti-CD4 konjüge edilmiş peroksidaz içeren lipozomların lenfositlerle ve substratla inkübasyonu sonucu elde edilen görüntüler 38

Şekil 3.8. Anti-CD konjüge edilmiş alkalan fosfataz içeren lipozomların lenfositlerle ve substratla inkübasyonu sonucu elde edilen görüntüler 39

Şekil 3.9. Anti-CD3 konjüge edilmiş karboksifloresan içeren lipozomların lenfositlerle inkübasyonu sonucu elde edilen görüntüler 40

ÖZ

Sentetik peptid ve rekombinant aşıların kullanıma girmesiyle birlikte yeni imünolojik adjuvant sistemlerine duyulan ihtiyaç bu tür aşılara karşı özellikle hücresel bağışıklık yeterince sağlanamadığından artmıştır. Bu sebeple, bu projede daha önce yapılan çalışmalarda adjuvant özelliği kanıtlanmış lipozomal sistemin kullanımının yanısıra hücresel bağışıklığı arttırabilecek yeni bir ajanın (oksitlenmiş mannan) da bu sisteme kombine edilerek denenmesi amaçlanmıştır. Bu tür bir adjuvant formülasyonunun başarılı olması halinde değişik tip antijenlere karşı hücresel imüniteyi aynı anda arttırmak mümkün olacaktır. Ayrıca bu formülasyon kanser aşıları için de uygun bir adjuvant sistem olarak düşünülebilir. Elde edilen sonuçlar, oksitlenmiş mannan kaplı lipozomların sıvısal değil de hücresel bağışıklığı indüklediğini göstermiştir.

Projenin ikinci kısmında ise T hücrelerinin alt popülasyonlarının tayini amacıyla yeni bir metod geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu metod, yüzeylerinde lenfosit altgruplarına karşı geliştirilmiş monoklonal antikor bağlı içeride de renkli çözünmeyen ürün oluşturabilecek enzimlerin enkapsüle edildiği lipozomların kullanımıyla lenfositlerin çevresinde lipozom rozetlerinin oluşturulup bunların mikroskop altında sayımını esas almaktadır. Her bir monoklonal antikor tipi için lipozom içerisine farklı bir enzim (veya boya) enkapsüle edilmiştir. Bu yöntemle lenfosit altgruplarının görüntülenmesine yönelik çalışmalar da bu raporda yer almaktadır.

ABSTRACT

With the development of synthetic peptide and recombinant vaccines, the need for new immunological adjuvants also increased due to especially the lack of generation of cell-mediated immunity to such vaccines. For this reason, in this project use of liposomes as previously established immunological adjuvants together with a new agent (oxidized mannan) that can augment cell-mediated immunity is aimed. If this adjuvant system proves to be successful, it would be possible to increase the cell-mediated immunity to a variety of antigens simultaneously. The results show that oxidized mannan coupled liposomes are capable of stimulating only the cell-mediated immunity, but not humoral immunity.

In the second half of the project, development of a new method for the determination of T-lymphocyte subsets is aimed. The method is based on the enumeration of lymphocytes under the microscope that are rosetted with liposomes which contain surface linked monoclonal antibodies to lymphocyte surface antigens and encapsulating enzymes capable of producing insoluble, colored products. For each monoclonal antibody type, a different enzyme (or stain) is encapsulated within the liposomes. Results of these studies are also included in this report.

BÖLÜM 1: GİRİŞ

1.1. Amaç

Projenin ilk bölümünün amacı, hepatit B yüzey antijeni model olarak kullanılarak, bir antijene karşı olan Th1 ağırlıklı imün yanıtın lipozom ve mannan'ın bir arada adjuvant olarak kullanımıyla arttırılmasıdır. Bu formülasyonun başarılı olması halinde, özellikle hücresel bağışıklığın indüklenmesiyle, koruyucu olabilecek aşılar için farklı antijenler aynı anda lipozom içerisinde tutuklanabilecek ve çoklu aşı taşıyıcı sistem olarak, enjekte edilen antijenin tiplerinin tümüne birden imün yanıt artabilecektir.

Projenin ikinci kısmında ise lenfosit altgruplarının tayini için bir kit geliştirilmesi düşünülmektedir. Mutlak lenfosit altgruplarının sayımı için günümüzdeki en geçerli yol akım sitometrik yöntemdir. Ancak bu aletin çok pahalı olması ve konuya özel teknil eleman kullanımını gerektirmesi, bu metodun ancak tam teşeküllü belirli bazı merkezlerde uygulanabilmesiyle kısıtlı kalmaktadır. Bu sebeple, mikroskobik ve basit bir yöntemin lenfosit altgruplarının belirlenmesinde kullanılabilirliğinin test edilmesi bu projede yer almıştır.

1.2. Literatür Özeti ve Konunun Önemi:

Lipozomların imünolojik adjuvant olarak davrandıklarının ilk defa 1974'te gösterilmesinden (Allison ve Gregoriadis) sonra, pek çok çalışma bu taşıyıcıların değişik antijenler için hem sıvısal hem de hücresel bağışıklığı arttırdıklarını göstermiştir (Gregoriadis, 1990). Adjuvant özellikleri göz önüne alındığında diğerlerine tamamen üstün olabilecek belirli bir lipozom formülasyonu yoktur. Lipozomların adjuvant olarak davranabilmelerindeki tek şart antijenin lipozomla enkapsülasyon, pasif adsorpsiyon veya kovalent bağlanma yoluyla fiziksel bir ilişkiye girmesidir (Shahum ve Therien, 1988).Ancak lipozomların tek başlarına kullanımı

imün yanıtı serbest antijene göre arttırmakla birlikte, oluşan antikor altgruplarını değiştirememektedir.

Enfeksiyoz bir ajana karşı başarılı bir imün yanıt oluşabilmesi için hücresel veya sıvısal (bazen de her ikisi birden) gibi belirli bir tip imün effektör fonksiyonunun aktivasyonu gerekmektedir. Bağışıklık yanıtının bu iki kolu (hücresel ve sıvısal) birbirinden farklı iki tip yardımcı T-hücresi tarafından regüle edilmektedir. Th1 tipi hücresel bağışıklığa yardımcı olurken Th2 tipi ise sıvısal bağışıklığa yardımcı olmaktadır ve bu iki tip birbirlerinden salgıladıkları sitokin tipleri bakımından kolayca ayırılabilmektedir (Romagnani, 1997).Th1 tipi klon tipik olarak interlükin-2 (IL-2), interferon gama (IFN-γ) ve transforme eden büyüme faktörü beta (TGF-β) salgılar ve bu faktörler de hücresel bağışıklığın karakteristiği olan gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonlarının gelişmesine yardımcı olur (O'Garra ve Murphy, 1994). Th2 tipi klonlar ise sıvısal bağışıklığı indükleyen IL-4, IL-6, IL-10 ve IL-13 gibi sitokinler salgılamaktadırlar (Seder ve Paul, 1994). Genelde Th1 ve Th2 klonlarının salgıladıkları sitokinler birbirlerine karşı olarak çalışmaktadırlar. Farede immünoglobülin izotip değişiminde temel rol oynayan üç sitokin IL-4, IFN-γ ve TGF-β dır (Snapper ve Mond, 1993). IL-4'ün IgG_1 ve IgE üretimine, IFN-γ'nın IgG_{2a} oluşumuna, TGF-β'nın ise IgG_{2b} ve IgA tiplerinin sentezlenmesine yardımcı oldukları düşünülmektedir.

Daha önce de belirtildiği gibi lipozomların tek başlarına adjuvant olarak kullanımı imün yanıtı serbest antijene göre arttırmakla birlikte, Th2 ağırlıklı bir yanıtı (farede yüksek IgG_1 seviyesiyle gözlenen) Th1 ağırlıklı bir yöne (farede yüksek IgG_{2a} seviyesiyle gözlenen) çekememektedir. Th1 ağırlıklı bir yanıt, sitotoksik T-hücrelerinin (CTL) aktivasyonu ve dolayısıyla pek çok hücre içi büyüyen patojenin kontrol altına alınması için gereklidir (O'Garra ve Murphy, 1994). 1995 yılında yayınlanmış bir çalışmada (Apostopoulos ve arkadaşları), bir peptid antijene Th1 (yüksek CTL, düşük antikor) veya Th2 tip (düşük CTL,

yüksek antikor) yanıtlar, antijeni karbohidrat polimeri mannan'a konjüge ederek elde edilmiştir. Kısaca, Th1 tip yanıt, oksitlenmiş mannan kullanıldığında artmış, Th2 tip yanıt ise konjügatta indirgenmiş mannan kullanılarak elde edilmiştir. Oksitlenmiş mannan'ın makrofaj üzerindeki aldehit grupları ve yardımcı T-hücreler arasında Schiff-bazlar oluşturarak güçlü bir adjuvant olarak davranabileceği düşünülmektedir (Rhodes, 1996). Apostopoulos ve arkadaşlarının çalışmasında tek bir antijen mannan'a bağlanmıştır. Biz ise lipozomların yüzeyine mannan bağlayarak hem oksitlenmiş mannan'ın hem de lipozomun adjuvant özelliklerini birleştirerek lipozom içerisinde tutuklanabilecek bir veya birden çok antijen tipine karşı olan Th1 ağırlıklı imün yanıtı arttırmayı hedefledik. İmünizasyon çalışmalarında model antijen olarak ise Hepatit B yüzey Antijenini (HBsAg) kullandık.

Lenfositlerin, özellikle de CD4 markörü taşıyan T hücre yüzdeleri, HIV ile enfekte olmuş hastalarda hastalığın aşamalarının tayini, transplantasyon sonrası hasta takibi ve birincil ve ikincil imün yetersizlik diyagnozunda önemli bir laboratuvar ölçüm yöntemidir (Mercolino, 1995). Lenfosit altgrupları, florokom-konjüge edilmiş monoklonal antikorlarla işaretlenmiş hücrelerin akım sitometrisiyle ölçülmesiyle tayin edilebilmektedir (Johnson ve arkadaşları, 1995). Bu teknik en geçerli ve hassas yöntem olarak kabul edilmekle birlikte bazı teknik problemleri de vardır. Örneğin, mutlak lenfosit sayımlarında spesimen yaşı değişikliklere yol açmakta, alyuvarların yetersiz parçalanmaları, lenfosit gate'inin diğer hücrelerle kontaminasyonu, sonuçları etkileyebilmektedir. Akım sitometreye alternatif oluşturabilecek daha ucuz ve basit bazı yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır (Denny ve arkadaşları, 1995; Johnson ve arkadaşları, 1995).

T-lenfosit altgruplarının tayininde kullanılan bir başka yöntem de kan filmlerinin enzim içeren monoklonal antikorlarla incelenmesine dayanmaktadır (Gooi ve Chapel, 1990). Bu yöntem sadece bir ışık mikroskobu ile yapılabilmesine karşın boyanın hücreler etrafında birikimini

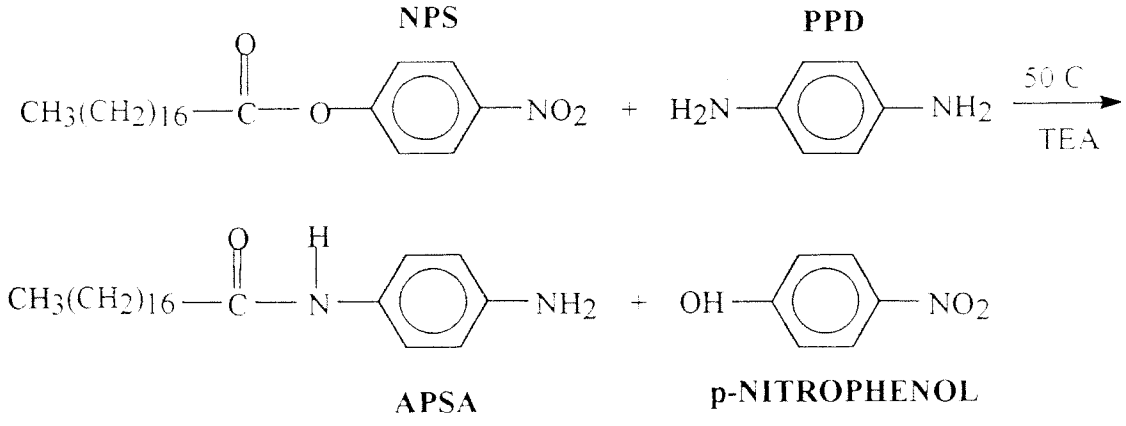
arttırmak için yüksek miktarlarda antikor kullanımı gerekliliği ve buna rağmen yetersiz boyanma yüzünden hassas olmamakta ve tercih edilmemektedir. Bu sebeple, biz, monoklonal antikorları lipozom yüzeyine konjüge ederek ve lipozomların içerisine renkli çözünmeyen ürün oluşturabilecek bir enzim enkapsüle ederek boya sinyalini neredeyse 1 milyon kat arttırmayı amaçladık.

BÖLÜM 2: MATERYAL VE METODLAR

Rekombinant Hepatit B yüzey antijeni (ayw alttipi) Rhein Biotech'ten (Almanya) alınmıştır. Mannan, dekstran (17,500 moleküler ağırlık), 3-[(cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulphonate (CHAPS) ve kolesterol Sigma Chem Co'dan (Amerika) alınmıştır. Peroksidaz konjüge edilmiş anti-fare IgG_1, IgG_{2a} ve IgG_{2b} Sera-Lab (ingiltere) ürünleridir. Fare IL-4 ve IFN-γ ELISA kitleri Amersham Life Sciences'tan alınmıştır.

2.1. N-(p-aminofenil)stearilamid (APSA) sentezi

APSA'in sentezi Snyder ve Vannier'in (1984) prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. İki g p-nitrofenil stearat (NPS) 30 mL dimetilsulfoksil (DMSO) içerisinde 50°C 'ta çözülmüş ve bu karışıma 0.8 g p-fenilendiamin (PPD) eklenmiştir. Bir damla trietilamin (TEA) ilavesinden sonra solüsyon 50°C 'ta 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra bu çözelti 200 mL'lik 2 mL 6 M NaOH ilavesiyle alkalinleştirilmiş buzlu distile suyla karıştırılmıştır. Oluşan sarı çökelek filtrasyonla toplanmış ve üç kere 100 mL absolüt etanol içerinde rekristalize edilerek saflaştırılmıştır. Elde edilen son ürün kurutulduktan sonra APSA'in varlığı spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (APSA ılık kloroformda çözüldüğünde maksimum dalga boyu 385 nm olarak ölçülmektedir). Prosedür Şekil 2.1'de özetlenmiştir.



Şekil 2.1. APSA sentezlenme şeması

2.2. Multilamellar lipozomların (MLV) hazırlanması

MLV'ler tipik olarak fosfatidil kolin (16 μmol), kolesterol (16 μmol) ve fosfatidiletanolamin veya APSA'den (3.2 μmol)oluşacak şekilde aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Kısaca kloroform içerisindeki lipid karışımı rotari evaporatör yardımıyla ince bir lipid filmine dönüştürülmüş, residüel organik solvent lipid filminin nitrojen gazına taabi tutulmasıyla uzaklaştırılmıştır. Lipid filminin rehidrasyonu 2 mL distile suyla gerçekleştirilmiş ve MLV oluşumu lipid filminin cam kürecikler aracılığıyla bozulmasıyla sağlanmıştır. Lipozom oluşumunun tamamlanması için oda sıcaklığında 1 saat beklenmiştir.

2.3. Küçük tek katmanlı lipozomların (SUV) hazırlanması

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan MLV'ler 19 mm'lik proba sahip sonikatörde 10 adet 1 dakika çalışma-30 saniye bekleme döngüsünden geçirilerek SUV'ler oluşturulmuştur. Hazırlanan SUV'ler 2,500 rpm'de 7 dakika santrifüj edilmiş ve böylelikle sonikasyon sırasında probdan dökülen titanyum partikülleri uzaklaştırılmıştır.

2.4. Dehidrasyon-rehidrasyon lipozomlarının (DRV) hazırlanması

DRV hazırlanması Kirby ve Gregoriadis'in (1984) metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Kısaca, yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan SUV'ler 1 mL fosfat tamponlu salin (PBS, 0.1 M, pH 7.4) içerisinde yer alan enkapsüle edilecek malzemeyle (antijen veya enzim gibi) karıştırılmış, -20°C'ta dondurulmuş ve bir gece boyunca tamamen kurumuş bir toz oluşana kadarfreeze-dry edilmiştir. Oluşan toz 0.1 mL distile su kullanılarak rehidre edilmiş ve bu oda sıcaklığında yarım saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 0.1 mL PBS ilave edilmiş ve yine aynı sıcaklıkta bir yarım saat daha beklenmiştir. 0.8 mL'lik PBS ilavesinden sonra enkapsüle edilmemiş malzeme lipozomal fraksiyondan ultrasantrifüj yoluyla (27,300xg, 20 dakika)

uzaklaştırılmıştır. Lipozom peleti iki kere PBS ile (6 mL) yıkanmıştır. Enkapsülasyon veya yüzeye bağlanma verimleri yıkama suyundan proteyinler için biçinçoninik asit protein tayin yöntemiyle, polisakkaritler için ise fenol-sülfirik asit yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

2.5. Polisakkaritlerin lipozom yüzeyine kovalent bağlanması

Oksitlenmiş polisakkaritlerin lipozom yüzeyine bağlanması, bu şekerlerin lipozomlarla inkübasyonu yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.Kısaca, mannan veya dekstran (20 mg) sitrat tamponlu salin (1 mL, 0.05 M, pH 5.5) içerisinde çözülmüş ve $NaIO_4$ (200 µL, 0.6 M) ilavesi ve 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyonuyla oksitlenmiştir. Reaksiyon 30 µL etilen glikol ilavesiyle durdurulmuş ve oksitlenmiş polisakkaritler reaksiyon karışımından minikolon santrifügasyon yöntemiyle (Fry ve arkadaşları, 1978) borat tamponlu salin (0.05 M, pH 9.0) ile ekulibre edilmiş Sephadex G-25 kolon materyali aracılığıyla uzaklaştırılmıştır. Oksitlenmiş bu polisakkaritler (kolon elüatından 0.5 mL) Kısım 2.3'te anlatıldığı gibi hazırlanmış olan 4 aynı tip SUV (PC:kolesterol:PE oranları 1:1:0.2) ile 2 gün boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. Bu sürenin sonunda mannan veya dekstran ile konjüge edilmiş olan 2 SUV preparasyonu "oksitlenmiş grup" olarak tutulmuş, diğer iki örnek ise "indirgenmiş kontrol"leri oluşturmak üzere 2.8 mg sodyum borohidrit ilavesiyle indirgenmiştir. Tüm lipozom preparatları 90,000xg 'de 1 saat santrifüjlenerek çöktürülmüş, PBS ile yıkanmış ve şeker bağlanma yüzdeleri yıkama suyundan fenol-sülfirik asit şeker tayini aracılığıyla hesaplanmıştır.

2.6. Lipozom yüzeyine monoklonal antikorların kovalent olarak bağlanması

Kullanılan metod Garcon ve arkadaşlarından (1986) uyarlanmıştır. 16 µmol PC, 16µmol kolesterol ve 0.75 µmol APSA'den oluşan SUV'ler, sırasıyla buzlu $NaNO_2$ (0.16 mL, 1M) ve

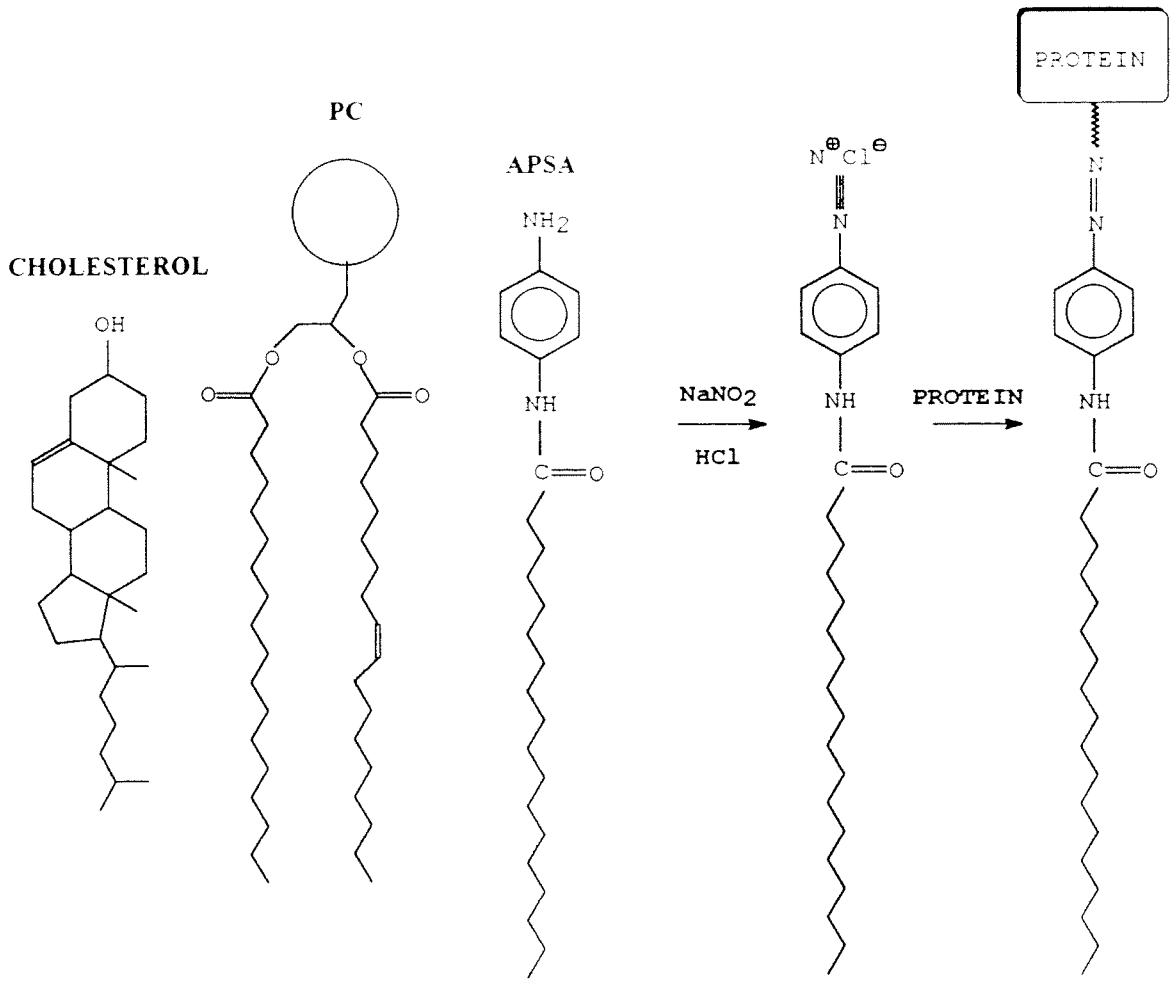
HCl/NaCl (0.16 mL, 1 M) ilavesiyle aktive edilmiş ve karışım buz üzerinde 5 dakika bekletilmiştir. SUV'ler reaksiyon karışımından hızla minikolon santrifügasyon yöntemiyle arındırılmıştır. Aktive olmuş bu lipozomlar 1 ml'lik monoklonal antikorla karıştırılmıştır (0.1 mg/mL, 0.05 M pH 10'luk borat tamponu içerisinde). Karışım buz banyosuna yerleştirilmiş ve gece boyunca bekletilmiştir. Yüzeye bağlanmış protein serbest antikordan ultrasantrifügasyonla ayrıştırılmıştır (90,000xg, 1 saat). Bağlanma yüzdeleri yine yıkama suyundan protein tayiniyle belirlenmiştir. Proteinlerin lipozomun yüzeyine bağlanma mekanizması Şekil 2.2'de gösterilmektedir.

2.7. Fenol-sülfirik asit şeker tayin yöntemi

Şeker tayini Weissig ve arkadaşlarının (1989) belirttiği gibi yapılmıştır. 25-125 μg/mL aralığında su içerisinde hazırlanmış mannoz standartlarından 200'er μL (veya analiz solüsyonlarında aynı miktarlar) pyrex tüpler içerisine konulmuş ve üzerlerine 400 μL % 2'lik fenol (su içerisinde) eklenmiştir. Bu karışıma 1 mL konsantre sülfirik asit solüsyonun yüzeyine hızla temas edecek şekilde ilave edilmişve tüpler oda sıcaklığında yarım saat bekletilmişlerdir. Renk oluşumu 485 nm'de kuantite edilmiş ve örneklerdeki şeker miktarı çizilen kalibrasyon eğrisinden hesaplanmıştır.

2.8. Biçinçoninik asit protein tayin yöntemi

Protein tayini Smith ve arkadaşlarının (1985) tarif ettikleri mikro-metoda göre yapılmıştır.% 8 $Na_2CO_3.2H_2O$, % 1.6 NaOH ve % 1.6 Na-K tartarat içeren solüsyonun pH'sı 11.25 'e toz $NaHCO_3$ ilavesiyle ayarlanmıştır (Solüsyon A). Solüsyon B deney günü hazırlanmıştır (su içerisinde% 4'lük biçinçoninik asit (sodyum tuzu)). % 4'lük bakır sülfat çözeltisi solüsyon C olarak adlandırılmıştır. Çalışma solüsyonu öncelikle 4 hacim solüsyon C'nin 100 hacim



Şekil 2.2. Proteinlerin lipozom üzerine kovalent bağlanma şeması

solüsyon B ile ve bunun da aşit hacimdeki solüsyon A ile karıştırılmasıyla oluşturulmuştur. Protein standartları (2-12 µg/mL) ve örnekler aynı hacimde çalışma solüsyonuyla karıştırılmış ve 60°C'da 1 saat inkübe edilmiştir. Renk oluşumu 562 nm'de tayin edilmiştir.

2.9. İmmünizasyon çalışmaları

Tüm immünizasyon çalışmalarında 20-25 g ağırlığında erkek fareler (4'erli gruplar halinde) kullanılmıştır (Refik Saydam Hıfzı Sıhha Enstütüsü). Aşılama sol arka bacak ön kası içerisine 25 gauge'lık iğne insülin iğnesiyle 0.1 mL'lik hacimlerde 0 ve 29. günlerde gerçekleştirilmiştir. Kan örnekleri kuyruk damarından 28. (birincil yanıt) ve 38. (ikincil yanıt) günlerde toplanmıştır. Plasma eldesinden sonra örnekler kullanılana kadar -20°C'ta saklanmıştır.

2.10. ELISA ile sıvısal yanıt ölçümü

96 kuyucuklu düz tabanlı ELISA plakaları 0.05 M pH 9.6'lık karbonat tamponu içerisindeki antijenle (2 µg/mL HBsAg; 60 µL/kuyucuk) kaplanmış, oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiş ve 3 kere PBS-Tween 20 (Yıkama tamponu) (% 0.05 v/v) tamponuyla yıkanıp kurutulmuştur. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek üzere tüm kuyucuklara bovi serum albumin (BSA) eklenmiş (yıkama tamponunda % 1; 60µL/kuyucuk) ve daha sonra uygun şekilde seyreltilmiş her plasma plakalardaki 8 dizili kuyucuk dizisinin birinci kuyucuğuna eklenmiş ve iki kat seri dilüsyon dizisiyle seyreltilmiştir. Plakalar oda sıcaklığında 2-3 saat bekletilmiş, yukarıdaki gibi 3 kere yıkanıp kurutulmuştur. Peroksidaz konjüge anti-fare immünoglobülini (3 altsınıftan biri) kuyucuklara eklenmiş (% 1 BSA ve % 5 fetal kalf serum içeren yıkama suyu içerisinde;50 µL/kuyucuk) ve plakalr 2-3 saat oda sıcaklığında inkübasyon sonrası 3 kere yıkanıp kurutulmuştur. Kuyucuklara substrat (40 µL hidrojen

peroksit içeren sitrat-fosfat tamponu içerisinde 40 mg o-fenilendiamin; 200 µL/kuyucuk) ilavesi ve yarım saatlik inkübasyon sonrası reaksiyon 25 µL 1.5 M H_2SO_4 ilavesiyle durdurulmuş ve renk oluşumu bir mikroplak okuyucu aracılığıyla 492 nm'de gerçekleştirilmiştir.

2.11. Sitokin ekstraksyon ve tayini

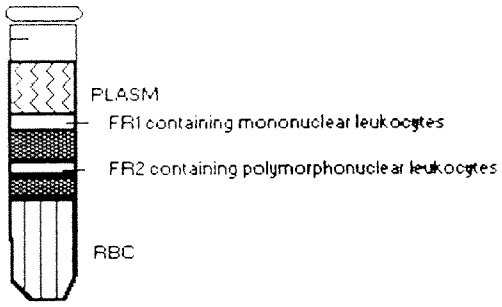
Fare dalak homojenatlarındaki endogenez IL-4 ve IFN-γ seviyeleri bu sitokinler için geliştirilmiş olan iki ayrı ELISA kit'i aracılığıyla üretici firmanın önerdiği şekilde tayin edilmiştir. Dalak homojenatları Nakane ve arkadaşlarının (1992) metoduna göre de Souza ve Playfair'in modifikasyonları da dahil edilerek hazırlanmıştır. Kısaca, kontrol ve aşılanmış farelerden alınan dalaklar tartılmış ve buzlu, % 1 CHAPS içeren PBS içerisinde homojenize edilmiştir (% 10 (w/v homojenatlar). Homojenatlar 1 saat buz üzerinde bekletilmiş, 2000xg de 20 dakika santrifüjlenmiş ve supernatantlar ELISA ile IL-4 ve interferon gama içerikleri açısından incelenmiştir.

2.12. Kanda lenfosit altgruplarının tayinine yönelik çalışmalar

0.1'er mL'lik anticoagulanlı kan örnekleri üç ayrı tüp içerisine yerleştirilmiş ve her birine 50 µL yüzeyinde anti-CD4, anti-CD8 veya anti-CD3 bulunan lipozom preparatı eklenmiştir. Karışım 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10 µL'lik bir örnek mikroskop Lam'ına aktarılmış ve normal hematolojik analiz için kullanılmak üzere yayma yapılmıştır. Yaymalar kuruduktan sonra kullanılan lipozom içerisinde yer alan enzime uygun bir substrat solüsyonuyla kaplanmış, 2-3 dakika bekletme ve yıkama sonrası mikroskop altında incelenmiştir.

Mutlak değer tayini için ise anticoagulanlı kan örneği Monopoly Resolving Medium adlı lenfosit izolasyon sıvısı üzerine dikkatlice uygulanmış ve 300xg'de 30 dakika oda

sıcaklığında santrifüj sonucunda periferal kan mononükleer hücreleri elde edilmiştir. Santrifüj sonucu elde edilen fraksiyonlar ve toplanan kısım (FR1 olarak gösterilmiş) Şekil 2.3'te gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Periferal kan örneğinin lenfosit izolasyon sıvısı üzerine uygulanıp snatrifüjü sonrası elde edilen fraksiyonlar

Şekil 2.3'te FR1 olarak gösterilen kısım aspire edilmiş ve toplanan hücreler iki kere PBS ile 250xg'de 10 dakika santrifüj suretiyle yıkanmıştır. Hücre sayısı Tripan mavisi boya alım testi sonrası 1 x 10^6/mL 'ye ayarlanmıştır (PBS içerisinde). 0.1 mL hücre kan yaymasında olduğu gibi 0.05 mL uygun lipozom preparatıyla karıştırılıp 10 dakika inkübe edilmiş, 0.1 mL substrat ilavesi sonrası lenfositler PBS ile 3 kere yıkanıp 0.1 mL'de süspanse edilerek mikroskop altında incelenmişlerdir.

BÖLÜM 3: SONUÇLAR

Projenin ilk bölümünde hayvan deneylerinde aşı olarak kullanılacak formülasyonların hazırlama şartlarının optimizasyonu ve formülasyonların karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar yürütülmüş ve daha sonra da imünizasyon çalışmalarına başlanmıştır.

Projenin ilk döneminde öngörülen çalışma evrelerinden elde edilen sonuçlar aşağıda verilmektedir:

3.1. Aşıda kullanılacak formülasyonların hazırlanma şartlarının optimizasyonu

Proje çalışma planının ilk üç ayını oluşturan formülasyon hazırlanma şartlarının optimizasyonu bölümünde daha önce öngörülmemiş olan bir ekleme yapılmıştır. Bu eklemeye duyulan gereksinimin nedeni kısaca aşağıda belirtilmiştir:

Hayvan deneylerinde kullanılacak aşı formülasyonunda yüzeyi oksitlenmiş mannan kaplı, içerisinde hepatit B antijeni içeren lipozomların adjuvant etkisine bakılması öngörülmüştü. Literatür bilgileri oksitlenmiş mannan'ın bağışıklık sistemini uyaran özellikleri olduğunu göstermekteydi. Bu adjuvant etkinin sadece oksitlenmiş mannan'a ait bir özellik mi olduğunu yoksa oksitleme sonucu oluşturulan aldehid gruplarının mi bu etkiye yol açtığını belirlemek için deneylerde mannan'ın yanı sıra başka bir tip polisakkarit olan dekstran da kullanılmıştır. Mannan mannoz polimeri, dekstran ise glikoz polimeridir. Mannan'ın makrofajlar üzerindeki mannoz reseptörüne bağlanabilme özelliği varken dekstran sadece glikozdan oluştuğu için bu reseptöre bağlanamamaktadır. Kısacası oksitlenmiş mannan'ın adjuvant etkisinin incelenmesinde etki mekanizmasına açıklık getirebilecek farklı bir şekerin kontrol olarak kullanılmasına gerek duyulmuştur.

Floresan bir boya olan FITC ile işaretlenmiş ve oksitlenmiş mannan ve dekstran, hazırlanmış olan lipozomların yüzeyine değişik ortam şartlarında bağlanmış ve bağlanma verimleri spektroflorimetrik yöntemle tayin edilmiştir.

Yapılan ön çalışmalarda inkübasyon zamanının ve kullanılan lipozom tipinin bağlanma verimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Tablo 3.1'de bu çalışmanın sonuçları verilmektedir.

Tablo 3.1 den de anlaşılacağı üzere inkübasyon süresinin uzaması bağlanma verimini çok fazla değiştirmemiştir. Büyük tip lipozomlar (DRV) küçük tip'e oranla daha yüksek verimde şeker bağlanmasını sağlamıştır. Ancak hayvan deneylerinde lipozom içerisine antijen tutturulacağı için ve şekerle kaplama sonrası enkapsülasyon işleminin freeze-drying yöntemi ile yapılmasında sadece SUV kullanılabileceği için diğer deneyler bu lipozom tipi kullanılarak yürütülmüştür.

Bağlanma veriminin arttırılabilmesi için lipozom kompozisyonundaki APSA fosfatidiletanolamin ile değiştirilmiştir. Bu değişiklik sonucunda Bağlanma verimi % 5.5'larda % 9.3'e çıkmıştır. Bu sebeple çalışmanın devamında APSA yerine lipozomlarda PE kullanılmasına karar verilmiştir. Bağlanma verimini daha fazla arttırmak için ek deneylere gerek duyulmamıştır. Bunun sebebi de % 8-9 civarı bağlanan oksitlenmiş şekerin üzerindeki aldehid miktarının gerekli ko-stimulan sinyali oluşturacak kadar yeterli olmasıdır.

Ortam pH'sının bağlanma verimi üzerindeki etkisi 2 farklı pH'da incelenmiştir. Mannan bağlanma verimi pH 7.4'lük fosfat tamponlu salin'de % 2.96 iken pH 9.0'lık karbonat tamponunda % 9.01 olarak bulunmuştur. Diğer çalışmalarda karbonat tamponu kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Lipozom tipi ve inkübasyon zamanının yüzeye bağlanan şeker verimi üzerindeki Etkileri

İnkübasyon zamanı (saat)	**Lipozom tipine göre elde edilen mannan bağlanma verimi (%)**			
	DRV			**SUV**
	1:1:0.05	1:1:0.1	1:1:0.2	1:1:0.2
24	6.88	5.80	7.35	5.83
48	6.85	7.66	8.39	5.43

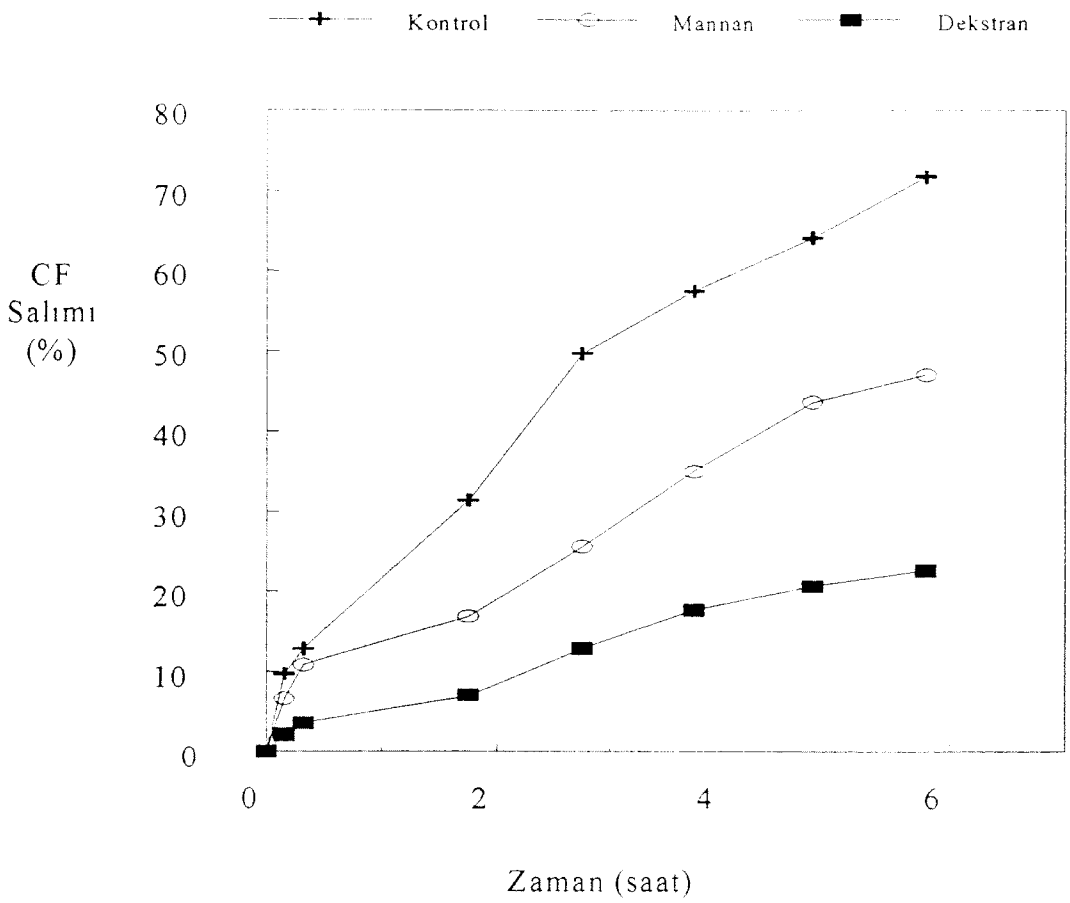
Bu çalışmada 16 µmol fosfatidilkolin (PC), 16 µmol kolesterol ve değişen molar oranlarda aminofeni stearilamid (APSA) kullanılmıştır. APSA laboratuarımızda kimyasal yöntemlerle sentezlenmiştir. Ayrıca çok katmanlı büyük lipozomlar (DRV) ve tek katmanlı küçük lipozomlar (SUV) kullanılarak yüzeye bağlanma verimi (mannan için) tayin edilmiştir.

1:1:0.2 (PC: kolesterol:PE) molar oranda hazırlanan SUV'ler 3 ayrı sefer pH 9.0'lık ortamda 24 saat boyunca mannan ve dekstran ile inkübe edilmiş ve bağlanma verimleri tayin edilmiştir. Buna göre mannan'ın bağlanma verimi % 8.17 ± 1.19 ve dekstran'ın bağlanma verimi ise % 4.78 ± 0.33 olarak bulunmuştur. Standart kayma değerlerinden de anlaşılacağı gibi bağlanma işlemi güvenilir ve tekrarlanabilir niteliktedir. Mannan'ın dekstran'a oranla daha yüksek bir verimle bağlandığı da gözlenmektedir.

3.2. Aşıda kullanılacak formülasyonların stabilitelerinin belirlenmesi:

Mannan ve dekstran kaplı lipozomların stabiliteleri şeker ile kaplanmış ve kaplanmamış (kontrol) boş SUV'lerin floresan bir boya olan karboksifloresan (CF) ile karıştırılıp freeze-dry edilmesi ve daha sonra kontrollu şartlarda rehidre edilerek oluşturulan DRV'lerde CF salımının spektroflorimetrik yöntemle takip edilmesi ile belirlenmiştir. Salım ortamı % 10'luk insan serumu içeren pH 7.4'lük fosfat tamponlu salin ve ortam sıcaklığı da 37°C olarak seçilmiştir. Şekil 3.1'de kontrol (yüzeye şeker bağlanmamış) ve yüzey modifikasyonu yapılmış DRV tipi lipozomlardan CF salım profili gösterilmektedir.

Sonuçlar, 6 saatin sonunda daha düşük bağlanma verimine sahip olan dekstran'ın lipozom stabilitesini mannan'a oranla çok daha fazla arttırdığını göstermektedir. Yüzey modifikasyonu yapılmamış kontrol DRV'ler 6 saatin sonunda içeriklerinin % 72'sini ortama salarken, mannan kaplanmış DRV'ler % 47, dekstran kaplılar ise % 22'sini diyaliz ortamına salmaktadırlar. Stabilitedeki bu artış plasmada bulunan düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) yüzeyi şeker kaplı lipozom yapısına ulaşamaması ve böylelikle lipozom yapısında bulunan fosfolipidlerin LDL'lerle değiş tokuşa giremeyişiyle açıklanabilir. Şeker ile kaplama lipozom yüzeyini hidrofilik hale getirdiği için LDL'ler bu lipozomları destabilize edememektedir.



Şekil 3.1. Kontrol (yüzeye şeker bağlanmamış) ve yüzey modifikasyonu yapılmış DRV tipi lipozomlardan CF salım profili.

3.3. Lipozom bazlı aşı formülasyonlarının hazırlanması:

Ön çalışmada elde edilen bilgiler doğrultusunda yüzeyi oksitlenmiş veya indirgenmiş mannan ya da dekstran ile kaplanan küçük lipozomlar (SUV) Hepatit B yüzey antijeni ile karıştırılmış ve dehidrasyon-rehidrasyon yöntemi ile antijen içeren lipozomlar elde edilmiştir. Hayvanlara enjekte edilen formülasyonlardaki şeker bağlanma yüzdesi ve antijen enkapsülasyon verimleri Tablo 3.2'de gösterilmektedir. Tablodan da anlaşılacağı üzere mannan ve dekstran bağlanma verimleri sırasıyla % 11.9 ve % 4.1 olarak bulunmuştur. Antijen enkapsülasyonu ise şeker bağlanmamış lipozomlarda % 47.82, oksitlenmiş mannan kaplı lipozomlarda % 57.14 ve indirgenmiş mannan kaplı grupta ise % 71.58 olarak bulunmuştur. Aynı değerler oksitlenmiş ve indirgenmiş dekstran kaplı lipozomlarda sırasıyla % 40.83 ve 53.41 olarak bulunmuştur.

Kısaca, fareler 4'erli gruplar halinde toplam 6 değişik formülasyon kullanılarak aşılanmıştır. Tablo 3.2'de bu formülasyonların hazırlama koşulları ve özellikleri verilmektedir.

Tablo 3.2'den de görülebileceği gibi hepatit B yüzey antijeni enkapsülasyonu oldukça yüksek düzeydedir. Mannan ile kaplamanın enkapsülasyonu olumlu yönde arttırdığı bulunmuştur. Özellikle indirgenmiş mannan % 50'lerde olan bu verimi % 70'ler düzeyine çıkartmıştır.

Projenin bundan sonraki bölümünde farelerden toplanacak olan kan örneklerinden antikor yanıtı ölçülecek ve böylelikle kullanılan formülasyonların sıvısal bağışıklık üzerindeki etkisi incelenmiştir. Hücresel bağışıklık ise toplanan dalak homojenatlarından yapılan sitokin tayiniyle belirlenmiştir.

Tablo 3.2. Farelere enjekte edilen formülasyonların özellikleri

Preparat	SUV'lerle karıştırılan HbsAg miktarı (μg)	HBsAg enkapsülasyon verimi (%)	SUV'lerle karıştırılan mannan veya dekstran miktarı (μg)	Mannan veya dekstran bağlanma verimi (%)	Fare başına enjekte edilen antijen miktarı (μg)	Fare başına enjekte edilen şeker miktarı (μg)
S Ag	-	-	-	-	1	-
S Ag	-	-	-	-	3	-
E Ag	135	47.82	-	-	1	-
E Ag	135	47.82	-	-	3	-
Ox-Man	135	57.14	820	11.95	1	10.62
Ox-Man	135	57.14	820	11.95	3	31.86
Red-Man	135	71.58	820	11.95	1	8.48
Red-Man	135	71.58	820	11.95	3	25.45
Ox-Dx	135	40.83	270	4.10	1	4.89
Ox-Dx	135	40.83	270	4.10	3	14.69
Red-Dx	135	53.41	270	4.10	1	3.74
Red-Dx	135	53.41	270	4.10	3	11.23

PC:kolesterol:PE (1:1:0.2) den oluşturulmuş, oksitlenmiş veya indirgenmiş şekerle kaplanan veya yüzeyi modifiye edilmemiş boş SUV'ler hepatit B yüzey antijeni ile karıştırılmış, dondurarak kurutulmuş ve rehidrasyonla antijen enkapsüle eden DRV'ler elde edilmiştir. Şeker bağlanma verimi SUV'lerin ultrasantrifüjü sonrası bağlanmamış fraksiyondan (yani yıkama suyundan) fenol-sülfirik asit yöntemiyle hesaplanmıştır. Antijen enkapsülasyonu ise DRV'lerin yıkama suyundan bisinçoninik asit protein tayiniyle belirlenmiştir. Elde edilen tüm formülasyonlar fosfat tamponlu salin içerisinde fare başına 0.1 mL'lik hacimde 3 μg HBsAg'i düşecek şekilde seyreltilmiştir.

Tablo 3.2 ile ilgili açıklamalar:

Fareler 6 değişik tip formülasyon kullanılarak aşılanmıştır. Bunlar sırasıyla aşağıda verilmiştir:

1. Sebest antijen (S Ag): hepatit B yüzey antijeni fosfat tamponlu salin'de seyreltilerek 1 ve 3 μg fare başına düşecek şekilde iki farklı dozda enjekte edilmiştir
2. Enkapsüle antijen (E Ag): antijen yüzey modifikasyonu yapılmamış SUV'lerle karıştırılıp oluşturulan DRV'ler içerisine enkapsüle edilmiş, tutuklanmamış serbest antijenden ayrıştırılarak yine 2 doz halinde enjekte edilmiştir. Enkapsülasyon verimi bisinçoninik asit protein tayini yöntemi ile hesaplanmıştır.
3. Oksitlenmiş mannan kaplı enkapsüle antijen (Ox-Man): Oksitlenmiş mannan kaplı SUV'ler antijenle karıştırılmış ve oluştural DRV'ler 2 farklı dozda enjekte edilmiştir. Mannan kaplama verimi fenol-sülfirik asit şaker tayini yöntemine göre hesaplanmıştır.
4. İndirgenmiş mannan kaplı enkapsüle antijen (Red-Man): Bu formülasyon 3 No'da belirtilenin aynısıdır. Tek farkı şeker kaplama işleminden sonra yüzeydeki mannan sodyum borohidrit ile indirgenmiştir.
5. Oksitlenmiş dekstran kaplı enkapsüle antijen (Ox-Dx): Oksitlenmiş dekstran kaplı SUV'ler antijenle karıştırılmış ve oluştural DRV'ler 2 farklı dozda enjekte edilmiştir. Dekstran kaplama verimi fenol-sülfirik asit şaker tayini yöntemine göre hesaplanmıştır.
6. İndirgenmiş dekstran kaplı enkapsüle antijen (Red-Dx): Bu formülasyon 5 No'da belirtilenin aynısıdır. Tek farkı şeker kaplama işleminden sonra yüzeydeki dekstran sodyum borohidrit ile indirgenmiştir.

3.4. Lipozomal Hepatit B yüzey antijeni ile aşılanmış hayvanlardaki antikor yanıtları:

Lipozomal formülasyonlarla aşılanmış olan hayvanlardan elde edilen antikor yanıtları ELISA ile ölçülmüş ve sonuçlar serbest antijenle aşılanmış olan hayvan grubuyla da karşılaştırılmıştır. Bu amaçla fareler 4'erli gruplar halinde sıfır ve 29. günlerde kas içi uygulamayla hayvan başına 1 veya 3 μg serbest veya lipozomal antijenle immünize edilmişlerdir. 39. Gün kuyruk damarından alınan kan örneklerinden ELISA ile antikor yanıtları ölçülmüştür.

Elde edilen IgG_1, IgG_{2a} ve IgG_{2b} anti-HBsAg antikor yanıtları 3 μg antijen dozu için sırasıyla Şekil 3.2, 3.3 ve de 3.4'te gösterilmektedir. 1 μg antijenle yeterince yüksek düzeyde antikor elde edilemediği (dozun düşüklüğü sebebiyle) için bu çalışmanın sonucu grafik olarak bulunmamaktadır. 3 μgantijen kullanıldığında oksitlenmiş mannan ile kaplanmış lipozom grubu dışındaki tüm lipozomal formülasyonlar serbest antijene göre IgG_1 ikincil yanıtını istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde arttırmıştır ($P<0.05$-0.001). Oksitlenmiş mannan içeren formülasyon serbest antijenle aynı düzeyde yanıt vermiştir. İndirgenmiş mannan içeren formülasyon ise bu IgG altgrubu için en yüksek titreyi (4.25 ± 0.3) vermiş ve aynı zamanda da oksitlenmiş dekstran kaplı lipozomdan da daha üstün olarak bulunmuştur ($P<0.05$).

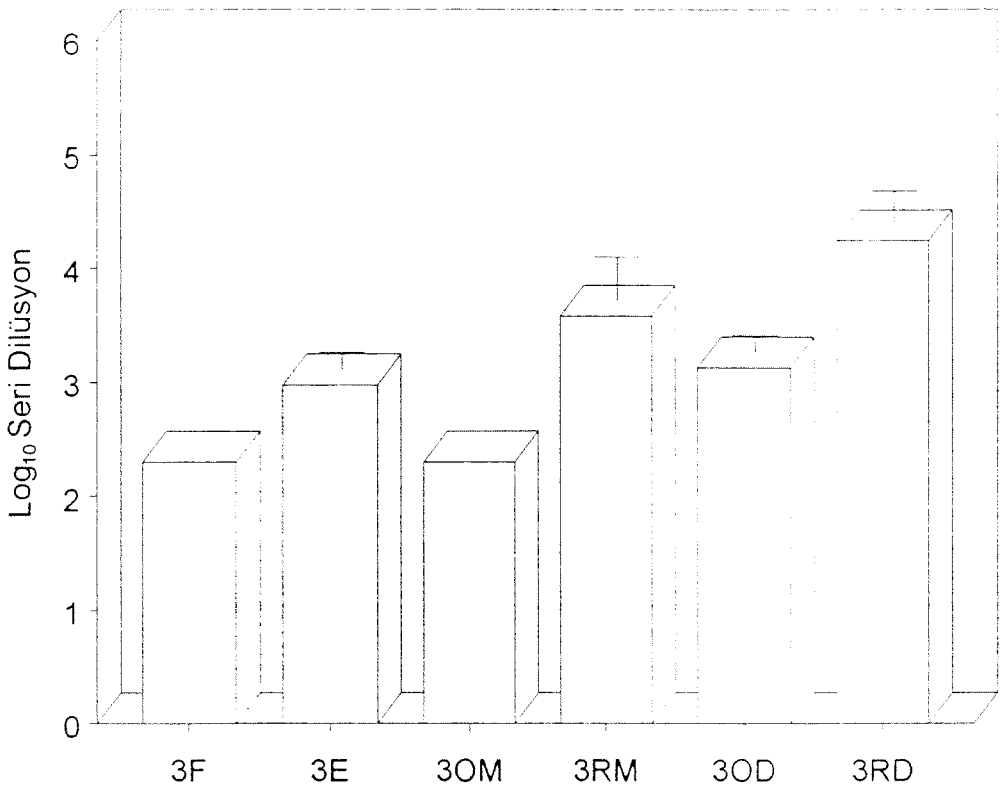
IgG_{2a} altgrup yanıtları incelendiğinde tüm DRV formülasyonları serbest antijene oranla başarılı olarak bulunmuştur ($P<0.05$-0.001). Bunun yanı sıra, oksitlenmiş dekstran kaplı lipozomlar diğer şeker kaplı formülasyonlarda da daha üstün titreler vermiştir ($P<0.05$).

IgG_{2b} altgrup yanıtlarında da yine tüm lipozomal formülasyonlar serbest antijene oranla antikor titrelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmışlardır ($P<0.05$-0.001).

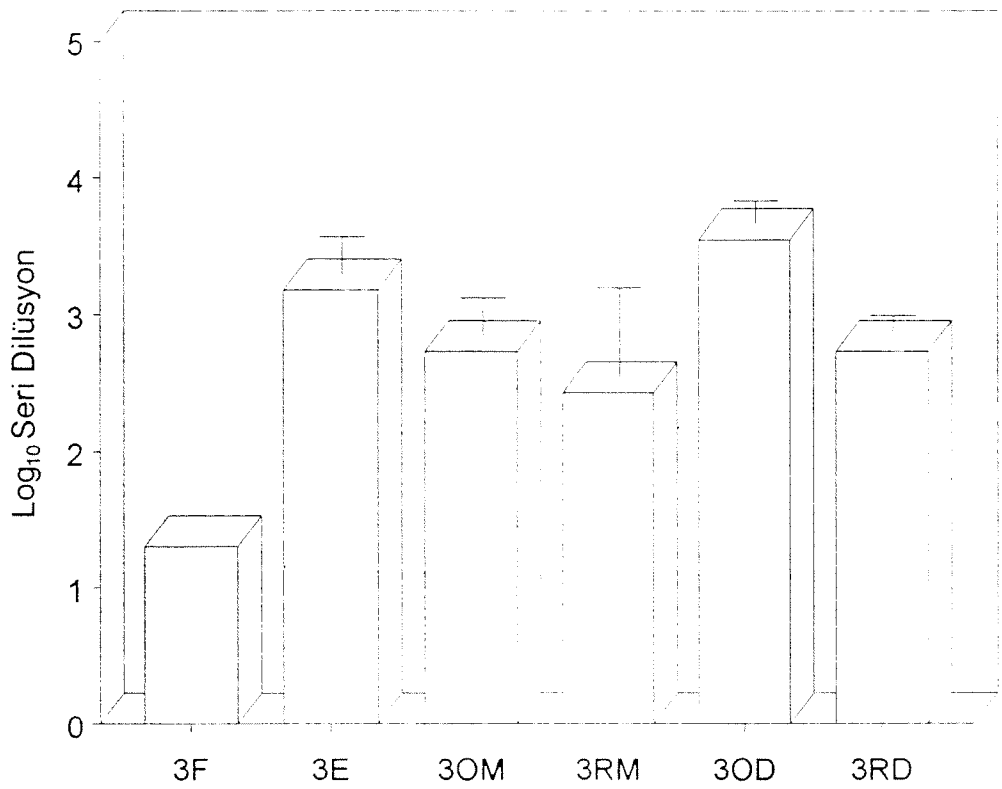
3.5. Lipozomal Hepatit B yüzey antijeni ile aşılanmış hayvanlardaki sitokin yanıtları

Aşılanmış veya kontrol farelerin dalak homojenatlarındaki IFN-γ ve IL-4 miktarları özel bir kit aracılığıyla sırasıyla Th1 ve Th2 hücresel yanıt işaretleyicisi olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar sırasıyla Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da gösterilmektedir. Buna göre, oksitlenmiş şeker kaplı veya kaplanmamış lipozomların IFN-γ üretimini arttırdığı gözlenmiştir. Bu sitokin tipinin salgılanmasını arttıran en başarılı formülasyonun oksitlenmiş mannan olduğu anlaşılmaktadır. Ancak, aynı formülasyonun IL-4 üretimini hiçbir şekilde arttıramadığı da bir başka önemli bulgudur.

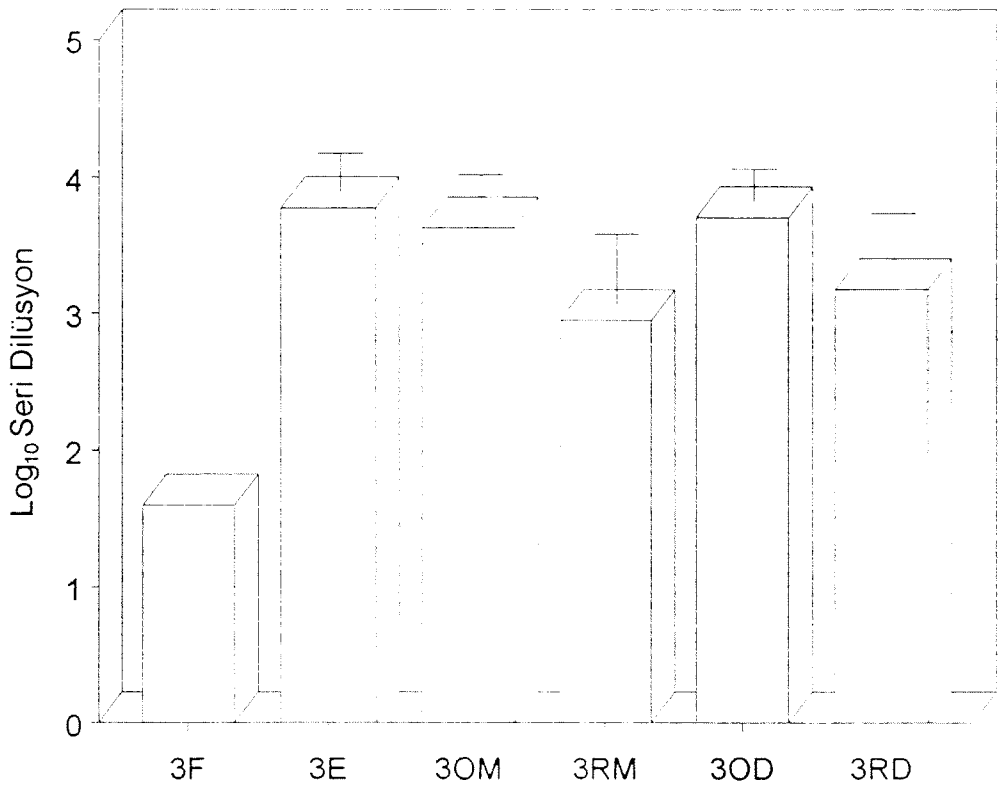
Tüm bu sonuçlar bir araya getirildiğinde, oksitlenmiş mannan kaplı lipozomların sadece Th1 tipi bir yanıta yol açtığı (IgG_1 altgrubunda etkisiz olması ve IL-4 üretimini indüklememesi) aşikardır. Diğer tüm lipozomal popülasyonlar ise hem Th1 hem de Th2 tip bir yanıta yol açmaktadırlar.



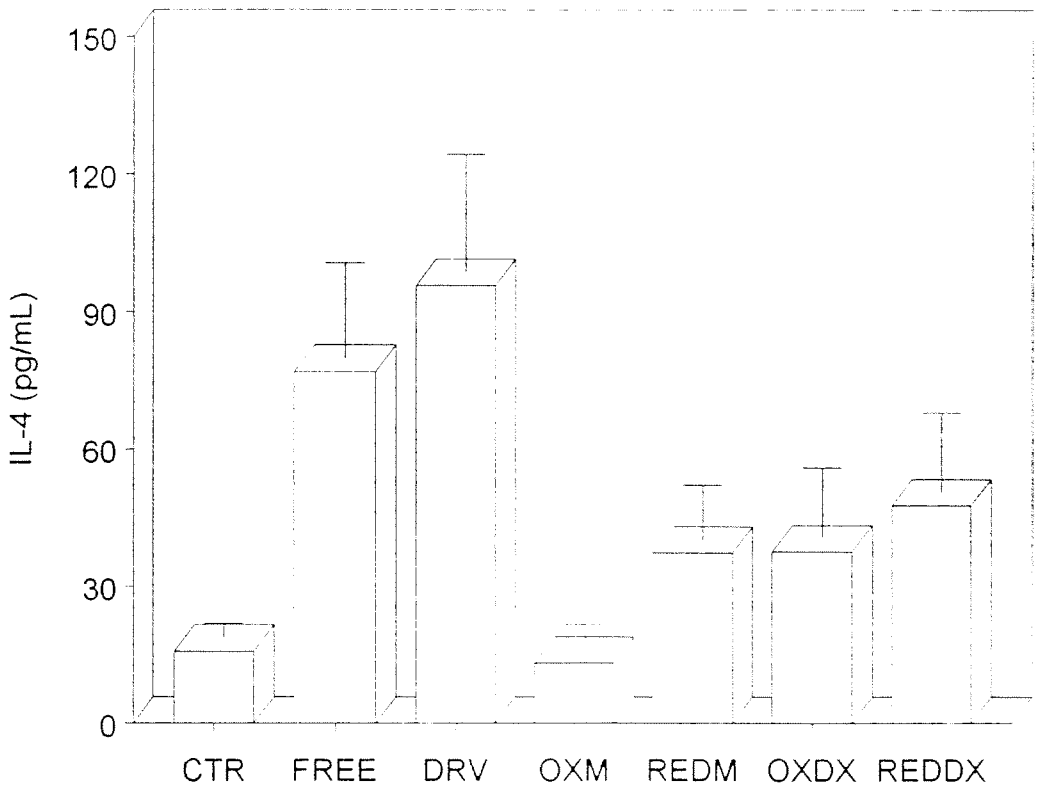
Şekil 3.2. Serbest ya da lipozomal HbsAg ile enjekte edilmiş farelerdeki IgG_1 altgrup antikor yanıtları. Fareler 4'erli gruplar halinde 3 μg antijen içeren formülasyonla 4 hafta arayla 2 kez kas içi uygulamayla aşılanmıştır. Kan alımı ikinci aşılamadan 10 gün sonra gerçekleştirilmiştir. Kan örneklerindeki anti-HBsAg antikor yanıtları ELISA ile ölçülmüştür.



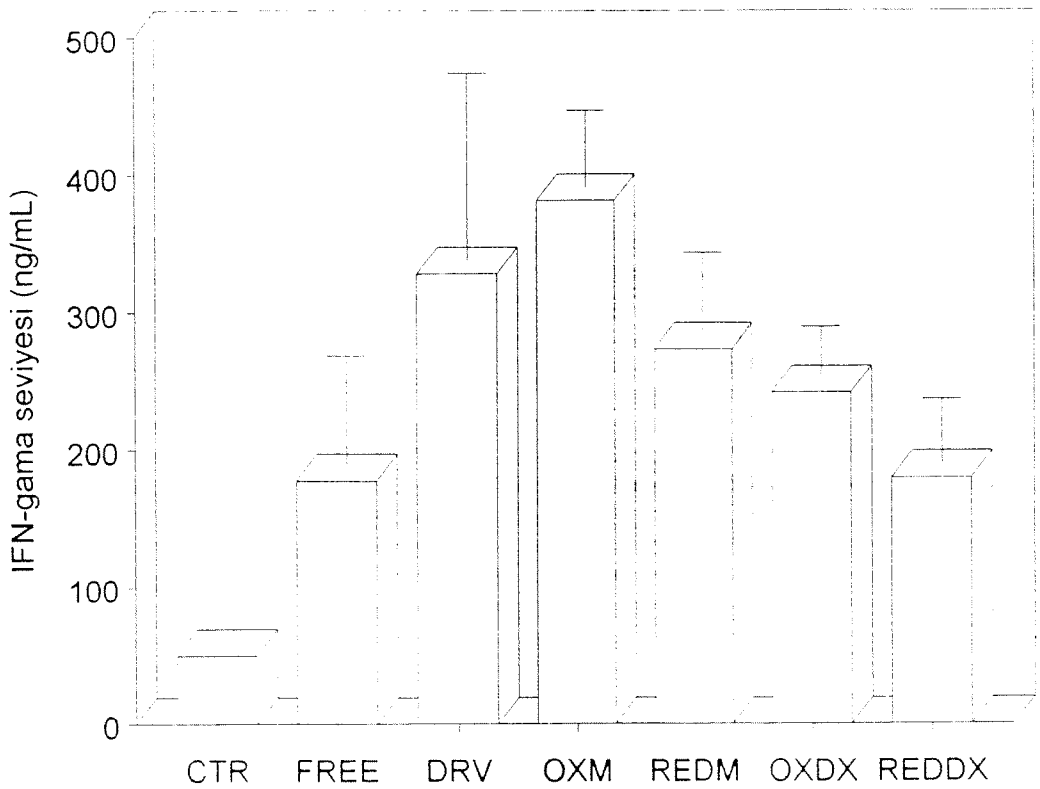
Şekil 3.3. Serbest ya da lipozomal HbsAg ile enjekte edilmiş farelerdeki IgG_{2a} altgrup antikor yanıtları. Fareler 4'erli gruplar halinde 3 μg antijen içeren formülasyonla 4 hafta arayla 2 kez kas içi uygulamayla aşılanmıştır. Kan alımı ikinci aşılamadan 10 gün sonra gerçekleştirilmiştir. Kan örneklerindeki anti-HBsAg antikor yanıtları ELISA ile ölçülmüştür



Şekil 3.4. Serbest ya da lipozomal HbsAg ile enjekte edilmiş farelerdeki IgG_{2b} altgrup antikor yanıtları. Fareler 4'erli gruplar halinde 3 μg antijen içeren formülasyonla 4 hafta arayla 2 kez kas içi uygulamayla aşılanmıştır. Kan alımı ikinci aşılamadan 10 gün sonra gerçekleştirilmiştir. Kan örneklerindeki anti-HBsAg antikor yanıtları ELISA ile ölçülmüştür.



Şekil 3.5. İmmünize edilmiş ve kontrol (aşılanmamış) farelerim dalak homojenatlarındaki IL-4 seviyeleri. Kontrol ve immünize farelerden elde edilen dalaklar tartılmış ve % 1 CHAPS içeren soğuk fosfat tamponlu salin içerisinde % 10 (w/v) homojenatlar oluşturacak şekilde homojenize edilmiştir. Santrifüjle elde edilen berrak çözeltideki IL-4 miktarı özel bir kit aracılığıyla üreticinin önerdiği metoda uygun olarak tayin edilmiştir.



Şekil 3.6. İmmünize edilmiş ve kontrol (aşılanmamış) farelerim dalak homojenatlarındaki IFN-γ seviyeleri. Kontrol ve immünize farelerden elde edilen dalaklar tartılmış ve % 1 CHAPS içeren soğuk fosfat tamponlu salin içerisinde % 10 (w/v) homojenatlar oluşturacak

şekilde homojenize edilmiştir. Santrifüjle elde edilen berrak çözeltideki IFN-γ miktarı özel bir kit aracılığıyla üreticinin önerdiği metoda uygun olarak tayin edilmiştir.

3.6. Değişik Lipozom popülasyonları kullanılarak lenfosit altgruplarının tayinine yönelik çalışmalar:

Lenfosit altgruplarının lipozomlarla tanımlanabilmesine yönelik çalışmalarda 3 farklı lipozom formülasyonu hazırlanmıştır. Bunlar:

a) Yüzeyinde anti-CD4 monoklonal antikor bağlı, içerisinde peroksidaz enkapsüle olmuş popülasyon. Bu lipozomların yardımcı T-lenfositleri işaretlemesi beklenmekteydi.
b) Yüzeyinde anti-CD8 monoklonal antikor bağlı, içerisinde alkalan fosfataz enkapsüle olmuş popülasyon. Bu lipozomların sitotoksik T-lenfositleri işaretlemesi beklenmekteydi.
c) Yüzeyinde anti-CD3 monoklonal antikor bağlı, içerisinde karboksifloresan enkapsüle olmuş popülasyon. Bu lipozomların her iki lenfosit popülasyonunu işaretlemesi beklenmekteydi.

Bu lipozomlar için bulunan antikor bağlanma ve enzim veya boya enkapsülasyon yüzdeleri Tablo 3.3'te gösterilmiştir. Tabloda yer alan bu değerler daha önce DRV lipozomlarının kullanıldığı deneylerde elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir (Gürsel ve Gregoriadis, 1997a ve 1997b).

Ancak lenfosit yüzde tayini için hazırlanan kan örneklerinin incelenmesi (yayma tipi), lipozomlu örneklerin bu sistemde çalışmadığını göstermiştir. Bunun sebebinin lipozom-kücre karışımının mekanik bir işlemle yayılması, fiksasyonu (metanol içerisinde) ve kurutulması işlemlerinin lipozomların yapısını bozduğuna yönelik bulgular olduğu düşünülmektedir. Lipozomların standart hücre fiksasyon solüsyonlarında ve kontrolsüz kurutmalarda stabil kalamayacakları, membran özelliklerini kaybedecekleri aşikardır. Bu sebeple yüzde tayini

yerine absolüt sayı elde edilmesi yoluna gidilmiştir. Bu yöntemde kandan ayrıştırılan lenfositler PBS tamponu içerisinde lipozomlarla inkübe edilmiş ve lipozom tipine göre uygun bir substrat eklenmesiyle eldeki karışım kurutulmadan mikroskop altında incelenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen mikroskop altındaki görüntüler anti-CD4 konjüge lipozomlar için

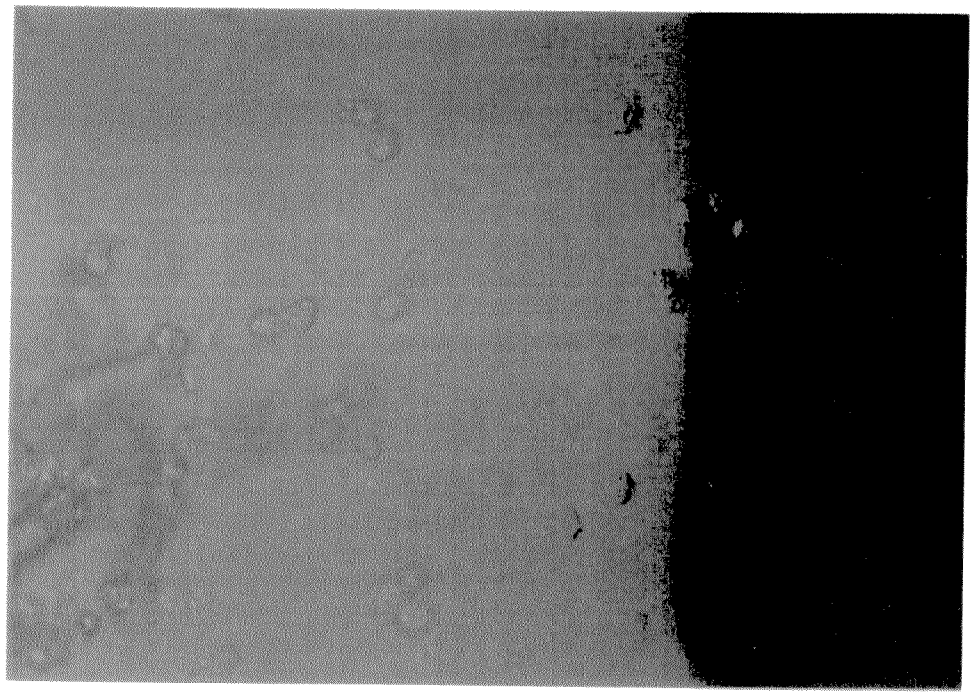
Tablo 3.3. Lenfosit altgrup tayininde kullanılan lipozomların hazırlanma koşulları ve özellikleri

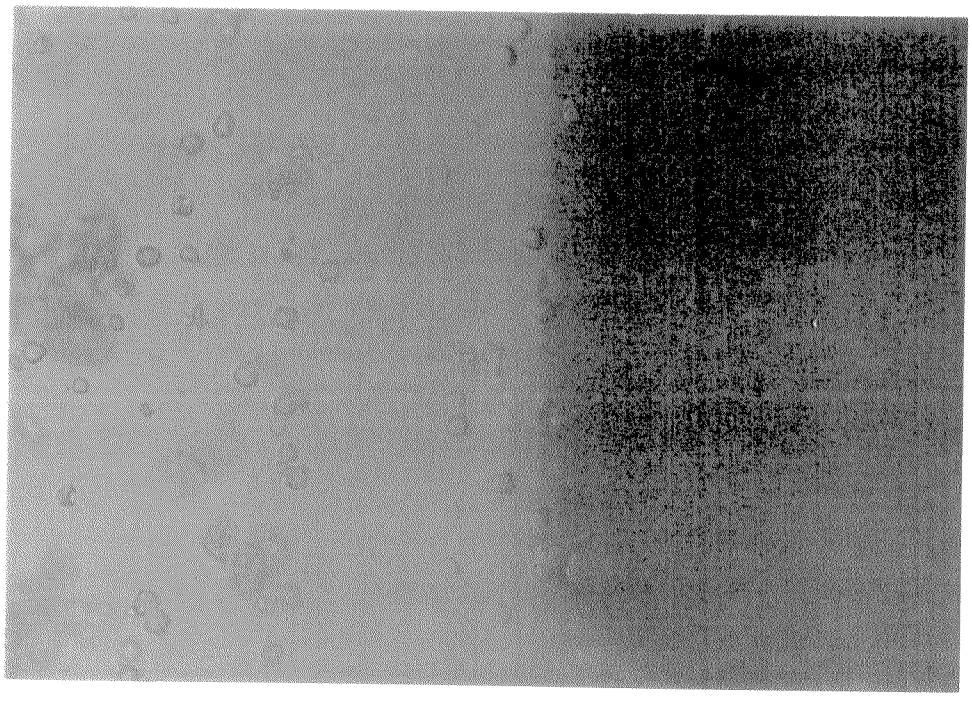
Formülasyon	SUV ile karıştırılan antikor miktarı (μg)	Yüzeye bağlanan antikor yüzdesi	SUV ile karıştırılan enzim veya boya miktarı (mg)	Enzim veya boya enkapsülasyon yüzdesi
Anti-CD4 ve peroksidaz	100	17.3	0.1	32.5
Anti-CD8 ve alkalan fosfataz	100	14.1	0.1	22.8
Anti-CD3 ve karboksifloresan	100	12.7	2.5	30.3

PC:kolesterol:APSA (1:1:0.2) den oluşturulmuş, yüzeye anti-CD4, anti-CD8 veya anti-CD3 konjüge edilmiş boş SUV'ler enzim veya floresan boya ile karıştırılmış, dondurarak kurutulmuş ve rehidrasyonla enzim veya boya enkapsüle eden DRV'ler elde edilmiştir.

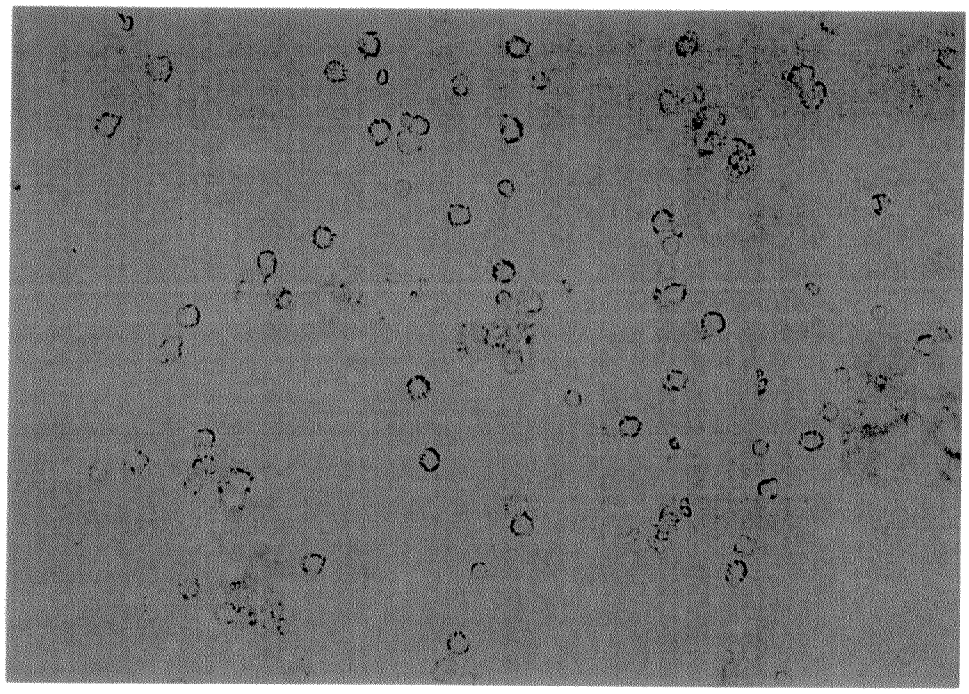
Şekil 3.7'de, anti-CD8 bağlı lipozomlar için Şekil 3.8'de ve anti-CD3 konjüge lipozomlar için ise Şekil 3.9'da (ultraviyole ışık altında) gösterilmiştir. Şekil 3.7'deki görüntüler incelendiğinde lenfositler etrafında minik kabarcıklar şeklinde rozetlenmiş lipozomları görmek mümkündür. Ancak peroksidaz'ın substratı çözünmez ürüne dönüştürdükten sonra gözlenmesi beklenenkahverengi boya birikimini takip etmek mümkün olmamıştır. Faz-

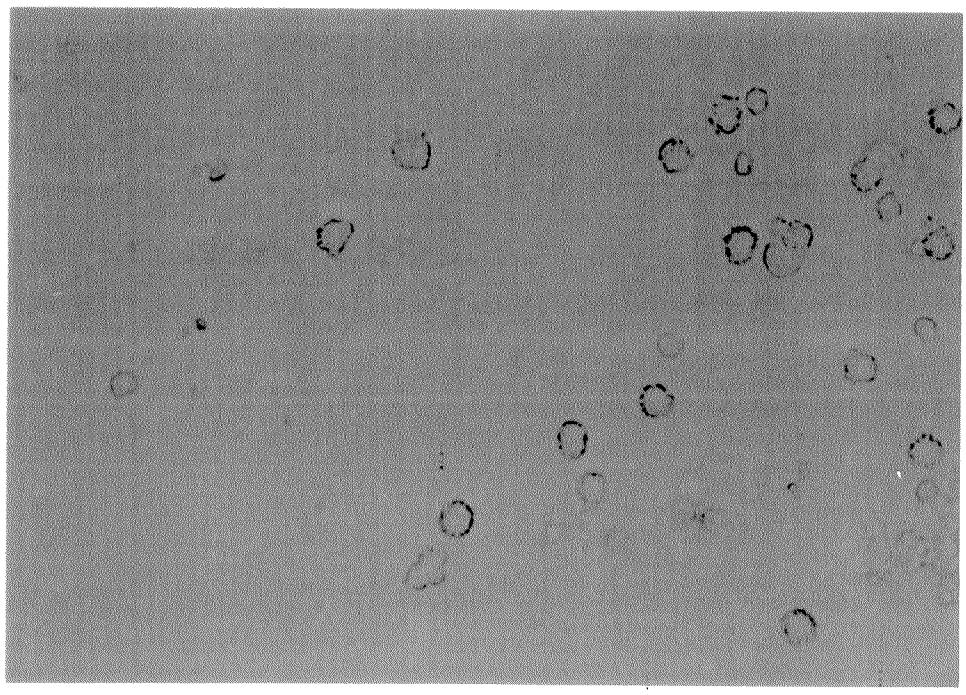
konstrat-floresan mikroskobu ile fotoğraflanan aynı örnekler standart ışık mikroskobu ile incelendiğinde oluşan kahverengi rengi gözlemek mümkün olmuş ama rengin yoğun olmaması sebebiyle çok hafif bir boyanmaya sahip hücreleri boyasızlardan ayırıp saymak mümkün olamamıştır. Normal ışık mikroskobu için fotoğraf ataçmanı olmadığı için bu bulgular belgelenememiştir. Şekil 3.8'de ise alkalan fosfataz içeren anti-CD8 kaplı lipozomlar kullanılarak çekilmiş fotoğraflar yer almaktadır. Burada lenfositlerin çevresinde oluşan mor-mavi renkli ürünü görmek mümkündür. Ancak yine ürünün sinyali sağlıklı bir sayım yapılması için yeterli değildir. Şekil 3.9'da da da anti-CD3 konjüge edilmiş karboksifloresan içeren lipozomlar kullanılarak elde edilen görüntüler gösterilmektedir. Buradaki görüntüler UV ışık kullanılarak alınmıştır ve yine diğerleri gibi sağlıklı bir sayım yapmak için yeterli görülmemiştir. Bu sistemin enzim veya boya içeriklerinin arttırılması, lipozom tipinin daha büyük bir tiple değiştirilmesi ve bağlanan antikor miktarının arttırılması ile çalışır hale getirilmesi mümkün olabilir ancak bunu destekleyecek ya da çürütecek deneylerin yapılması için yeterli malzeme elimizde kalmamıştır (her bir antikor zaten 0.1 mg olarak alınmış ve tamamı bu dneylerde kullanılmıştır). Yapılacak değişikliklerle birlikte sistem çalışır hale getirilse bile yine de akım sitometreden elde edilecek sonuçlar kadar hassas ve güvenilir sonuçların elde edileceği oldukça şüphelidir.



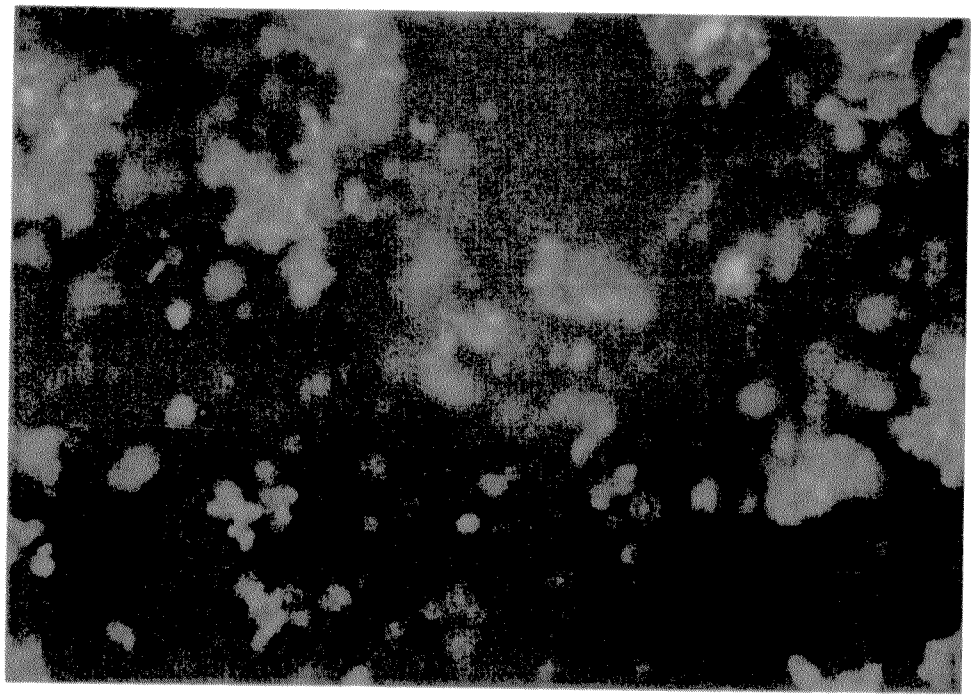


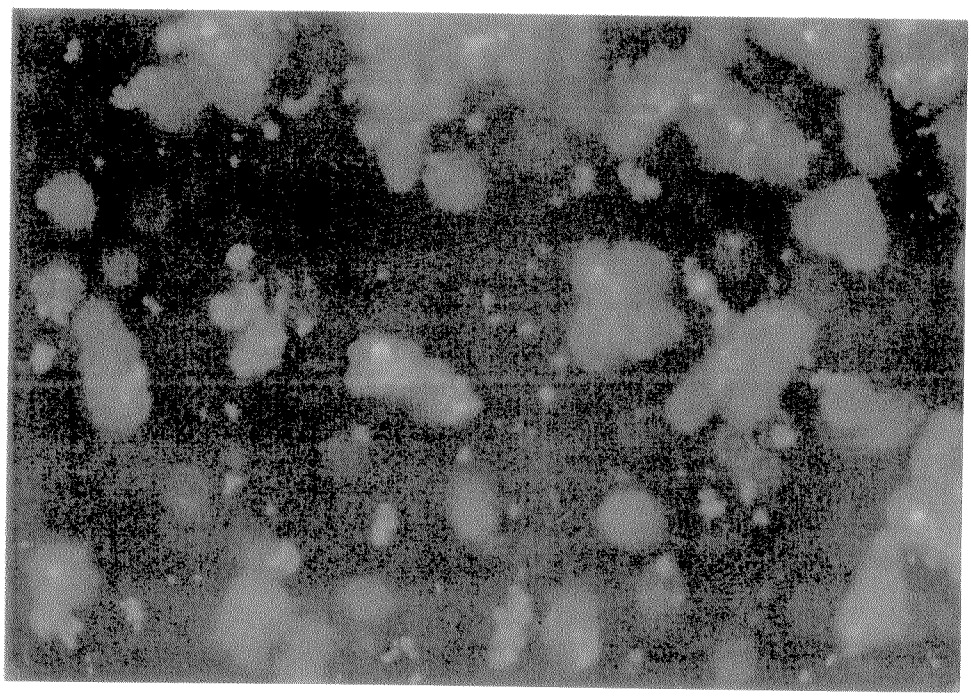
Şekil 3.7. Anti-CD4 konjüge edilmiş peroksidaz içeren lipozomların lenfositlerle ve substratla inkübasyonu sonucu elde edilen görüntüler (40 X, normal ışık)





Şekil 3.8. Anti-CD konjüge edilmiş alkalan fosfataz içeren lipozomların lenfositlerle ve substratla inkübasyonu sonucu elde edilen görüntüler (40 ve 60 X, normal ışık)





Şekil 3.9. Anti-CD3 konjüge edilmiş karboksifloresan içeren lipozomların lenfositlerle inkübasyonu sonucu elde edilen görüntüler (60 X, UV ışık altında)

3.7. Sonuçlarla İlgili Tartışma ve Öneriler

Projenin ilk bölümünü oluşturan aşılama çalışmaları oksitlenmiş polisakkarit kaplı DRV'lerin Th1 ağırlıklı bir yanıt, indirgenmiş formülasyonların ise Th2 ağırlıklı bir yanıt verdiklerine işaret etmektedir. Oksitlenmiş mannan kaplı lipozomların IFN-γ seviyesini arttırırken IL-4 miktarının bu tip lipozomlarla aşılanmış farelerde çok düşük olması bu polisakkaridin oksitlenmiş halde sadece Th1 ağırlıklı bir immün yanıtı indüklediğini göstermektedir. Bu sonuçlar projede öngörülmüş olan amaca uygundur.

Projenin son kısmını oluşturan lenfosit altgruplarının lipozomlar aracılığıyla tayini deneyleri başarılı olamamıştır. Bu, sistemin tamamen çalışmaması anlamına gelmemektedir. Hazırlanan formülasyonlar lenfositlerin etrafını çevrelemiş ancak sağlıklı bir sayım yapacak kadar hassas bir sistem geliştirilememiştir. Bu sayım sisteminin mikroküre gibi daha kolay görüntülenebilen, daha büyük ve stabil taşıyıcılarla denenmesi büyük bir olasılıkla daha olumlu sonuçlar verecektir.

KISIM 4: REFERANSLAR

Allison, A.C. and Gregoriadis, G., Liposomes as immunological adjuvants, *Nature*, 252:252, (1974)

Apostolopoulos, V., Pietersz. G.A., Loveland, B.E., Sandrin M.S. and McKenzie I.F.C., Oxidative reductive conjugation of mannan to antigen selects for T1 or T2 immune responses, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:10128 (1995).

De Souza, J. B. and J. H. L. Playfair. A novel adjuvant for use with a blood-stage malaria vaccine. *Vaccine 13:1316* (1995.).

Denny, T.N., Jensen, B.D., Gavin, E.I., Louzao, A.G., Vella, F.A., Oleske, J.M. and Wong, W., Determination of CD4 and CD8 lymphocyte subsets by a new alternative fluorescence immunoassay. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 2: 330-336, (1995).

Fry, D.W., White, C. and Goldman, D.I., Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution, *Anal. Biochem.*, 90:809 (1978).

Garcon, N., Senior, J. And Gregoriadis, G. Coupling of ligands to liposomes before entrapment of agents sensitive to coupling procedures. *Biochem. Soc. Trans.* 14:1038-1039, (1986).

Gregoriadis, G. Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immunol. Today*, 11, 89-97, (1990).

Gürsel, M. and Gregoriadis G., Interleukin-15 acts as an immunological co-adjuvant for liposomal antigen in vivo, *Immunol. Letts.*, 55:161 (1997a).

Gürsel, M. and Gregoriadis G., The immunological coadjuvant action of liposomal interleukin-2: the role of localization of the cytokine and antigen in the vesicles. *J. Drug Targeting*, 5:93-98, (1997b)

Johnson, D., Hirschkorn, D., Busch, M.P., Evaluation of four alternative methodologies for determination of absolute CD4+ lymphocyte counts. *J. AIDA and Hum. Retrovirol.*, 10:522-530, (1995).

Kirby, C. and Gregoriadis, G., Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes, *Biotechnology*, 2:980 (1984).

Mercolino, T.J., Connelly, M.C., Meyer, E.J., Knight, M.D., Parker, J.W., Stelzer, G.T. and DeChirico, G. Immunological Differentiation of absolute lymphocyte count with an integrated flow cytometric system. *Cytometry*, 22:48-59, (1995).

Nakane, A., A. Numata and T. Minagawa. Endogenous tumour necrosis factor, interleukin-6 and gamma interferon levels during *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Infect. Immun. 60:523 (*1992).

O'Garra, A. and Murphy, K., Role of cytokines in determining T-lymphocyte function, *Curr. Opinion Immunol.*, 6:458 (1994).

Rhodes, J., Covalent chemical events in immune induction: fundamental and therapeutic aspects, *Immunol Today*, 17:436 (1996).

Romagnani, S., The Th1/Th2 paradigm, *Immunol. Today*, 18:263 (1997).

Seder, R.A. and Paul, W.E., Acquisition of lymphokine-producing phenotype by $CD4^+$ T cells, *Annu. Rev. Immunol.*, 12:635 (1994).

Shahum, E. and Therien, H-M., Immunopotentiation of the humoral response by liposomes: encapsulation versus covalent linkage, *Immunology*, 65:315, (1988).

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C., Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.*, 150:76 (1985).

Snapper, C.M. and Mond, J.J., Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching, *Immunol. Today*, 14:15 (1993).

Snyder, S.L. and Vannier, W.E., Immunological response to protein immobilized on the surface of liposomes via covalent azo-bonding. *Biochim. Biophys. Acta*, 772, 288-294, (1984).

Weissig, V., Lasch, J. and Gregoriadis, G., Covalent coupling of sugars to liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1003:54 (1989).

BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU

1. Proje No: TBAG-1584 2. Rapor Tarihi: Eylül 1998

3. Projenin Başlangıc ve Bitiş Tarihleri: Mart 1997-Eylül 1998

4. Projenin Adı: Hepatit B yüzey antijeni içeren mannan kaplı lipozomların adjuvant özelliklerinin araştırılması ile lenfosit altgruplarının tayini

5. Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırıcılar: Y. Doç. Dr. MaydaGürsel, Uz. Biyolog Hande Canpınar

6. Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ, Biyolojik Bilimler Bölümü, Biyomateryal Araştırma Laboratuvarı, ODTÜ, 06531, Ankara

7. Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK, 125, Kavaklıdere, Ankara

8. Öz (Abstract): Sentetik peptid ve rekombinant aşıların kullanıma girmesiyle birlikte yeni imünolojik adjuvant sistemlerine duyulan ihtiyaç bu tür aşılara karşı özellikle hücresel bağışıklık yeterince sağlanamadığından artmıştır. Bu sebeple, bu projede daha önce yapılan çalışmalarda adjuvant özelliği kanıtlanmış lipozomal sistemin kullanımının yanısıra hücresel bağışıklığı arttırabilecek yeni bir ajanın (oksitlenmiş mannan) da bu sisteme kombine edilerek denenmesi amaçlanmıştır. Bu tür bir adjuvant formülasyonunun başarılı olması halinde değişik tip antijenlere karşı hücresel imüniteyi aynı anda arttırmak mümkün olacaktır. Ayrıca bu formülasyon kanser aşıları için de uygun bir adjuvant sistem olarak düşünülebilir. Elde edilen sonuçlar, oksitlenmiş mannan kaplı lipozomların sıvısal değil de hücresel bağışıklığı indüklediğini göstermiştir.

Projenin ikinci kısmında ise T hücrelerinin alt popülasyonlarının tayini amacıyla yeni bir metod geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu metod, yüzeylerinde lenfosit altgruplarına karşı geliştirilmiş monoklonal antikor bağlı içeride de renkli çözünmeyen ürün oluşturabilecek enzimlerin enkapsüle edildiği lipozomların kullanımıyla lenfositlerin çevresinde lipozom rozetlerinin oluşturulup bunların mikroskop altında sayımını esas almaktadır. Her bir monoklonal antikor tipi için lipozom içerisine farklı bir enzim (veya boya) enkapsüle edilmiştir. Bu yöntemle lenfosit altgruplarının görüntülenmesine yönelik çalışmalar da bu raporda yer almaktadır.

Anahtar Kelimeler: immunoadjuvant, mannan, lipozom, lenfosit altgrupları

9. Proje ile İlgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler: 4. Uluslararası Biomed sempozyumunda şu makale sunulmuştur: Mannan and Dextran Linked Liposomes as potential vaccine carriers M. Gürsel, Ş. Aral, B.E. Dayanç and V. Hasırcı, Ekim ,1997.

10. Bilim Dalı:
Doçentlik B.Dalı Kodu: ISIC Kodu:
Uzmanlık Alanı Kodu:

11. Dağıtım(*): ☐ Sınırlı ☐ Sınırsız

12. Raporun Gizlilik Durumu: ☐ Gizli ☐ Gizli Değil

(*) *projenizin Sonuç Raporunun ulaştırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz*