



T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
FARMASOTİK KİMYA ANABİLİM DALI
İLAÇ TASARIMI VE GELİŞİMİ DOKTORA PROGRAMI

IN VITRO MEMELİ MAKROFAJLARI ÜZERİNDEKİ
KARBON KUANTUM NOKTALARININ
İMMÜNOMODÜLATÖR AKTİVİTELERİNİN
İNCELENMESİ

Ecz.Başak ERİBOL

DANIŞMAN
Prof.Dr.İsmail Tuncer DEĞİM

Eylül, 2022

Beyan

Bu tezin bana ait olduğunu, tüm aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, içinde yer alan bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, kullanmış olduğum bütün bilgilere kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin yürütülmesi ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı

İmza



Teşekkür

Tez çalışmamın oluşum sürecinde değerli bilgilerini benimle paylaşan, engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamın bilimsel temeller altında oluşmasını sağlayan ayrıca her sorun yaşadığımda yanına rahatça gidebildiğim, her zaman güler yüzünü ve samimiyetini bana yansıtan ve mesleki hayatımda da bana yol göstereceğine inandığım sayın hocam Prof. Dr. İsmail Tuncer DEĞİM'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yine çalışmamda yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunan ve akademik hayatı boyunca çok daha başarılı olacağına inandığım kıymetli Dr. Öğr. Üyesi Gamze ÇAMLİK 'a da sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışma süresince benden desteklerini esirgemeyen ve hayatımın her evresinde bana yol gösteren ve destekleyen değerli annem Av.Serpil KAVRAK, babam Süleyman KAVRAK ve ikizim Mustafa Kemal KAVRAK' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışma sürecim boyunca akademik bilgisinden faydalandığım ve hayatımın her döneminde benden yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli nişanlım Arş. Gör. Can ERİBOL' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ecz. Başak ERİBOL

İçindekiler	Sayfa No
İç Kapak.....	-
Onay sayfası	-
Beyan.....	iii
Teşekkür	iv
İçindekiler.....	v
Simge/sembol ve Kısaltmalar Listesi	viii
Tablo listesi.....	xii
Şekil ve Resim Listesi.....	xiii
Türkçe Özet ve anahtar kelimeler	xv
İngilizce Özet ve anahtar kelimeler	xvi
1.Giriş ve Amaç	1
2.Genel Bilgiler	4
2.1. Farmasotik Nanomateryallerin Kullanım Ve Uygulama Alanları.....	4
2.2. Nanopartiküllerin ve Nanomateryallerin Sınıflandırılması.....	6
2.2.1. Karbon temelli nano malzemeler.....	6
2.2.2. İnorganik temelli nano malzemeler.....	7
2.2.3. Organik temelli nano malzemeler.....	8
2.2.4. Kompozit temelli nano malzemeler.....	9
2.3. Kuantum Nokta Sistemleri.....	9
2.3.1. Genel Özellikleri.....	9
2.3.2. Kuantum Nokta Fizikokimyasal Yapısı	13
2.3.3. Avantajları.....	15
2.3.4. Uygulama Alanları.....	16
2.3.5. İnorganik Temelli Kuantum Nokta Örnekleri.....	17
2.3.6. Toksik Etkisi.....	18
2.3.7. Karbon Temelli Kuantum Nokta Örnekleri.....	19
2.3.7.1. Yapısı ve Özelliği.....	19
2.3.7.2. Avantajları.....	19
2.3.7.3. Dezavantajları.....	20
2.3.7.4. Üretim teknikleri.....	21
2.3.7.5. Kullanım Alanları.....	26

2.3.7.6. Vücuttaki Dağılımı.....	30
2.3.7.7. Görüntüleme Teknikleri ile Kullanım Alanları.....	31
2.3.7.8. Toksik Etkisi.....	34
2.4. Bağışıklık Sistemi.....	36
2.4.1. Doğal Bağışıklık Sistemi.....	37
2.4.2. Edinsel Bağışıklık Sistemi.....	38
2.4.3. Doğal ve Edinsel Bağışıklık Sisteminin Alt Dalları.....	40
2.4.3.1. Doğal Bağışıklık Sistemi Humoral- Hücresel Bağışıklık Sistemi.....	42
2.4.3.2. Edinsel Bağışıklık Sistemi Humoral- Hücresel Bağışıklık Sistemi.....	44
2.4.4. Bağışıklık Sistemi Organları.....	49
2.4.5. Sitokinler.....	50
2.4.6. KKN İmmün Sistem Üzerine Etkisi.....	56
2.5. Aşı.....	58
2.5.1. Genel Bilgiler.....	58
2.5.2. Günümüzde Kullanılan Aşılar.....	59
2.5.3. Günümüz aşılarının avantaj ve dezavantajları.....	63
2.5.4. Aşı Adjuvanları.....	64
2.5.5. Nanoteknolojik Aşılar.....	73
2.5.6. KKN Aşı Geliştirilmesinde Kullanımı İle İlgili Bilgiler.....	76
3. Gereç ve Yöntem	78
3.1. Gereç.....	78
3.2. Yöntem.....	78
3.2.1. Kullanılan KKN Örneklerinin Hazırlanması ve özelliklerinin incelenmesi.....	78
3.2.1.1. Hazırlanan Kuantum Noktaların Fiziksel Görünüşleri.....	82
3.2.1.2. Spektroflorometri Yöntemi Geçerlilik Testi (Validasyonu)....	82
3.2.1.3. Hazırlanan Kuantum Noktaların Floresan ve Kuantum Verimi.....	84
3.2.2. Hazırlanan Örnekler İle Yapılan İn-vitro Çalışmalar.....	85
3.2.2.1. Hücre Kültürü.....	85

3.2.2.2. Karbon Kuantum nokta örnekleri ve LPS ile makrofaj hücre uyarımı.....	85
3.2.2.3. MTT Testi ile hücre canlılığının ölçülmesi.....	86
3.2.2.4. ELISA Testi ile TNF α , IL12p40, GMCSF ve IL6 belirlenmesi.....	86
3.2.2.5. Hücre içi fosforile p38 boyama ve akım sitometri analizi....	87
4.Bulgular	88
4.1. Karbon kuantum nokta örneklerinin fiziksel özellikleri.....	88
4.1.1. TEM görüntü analizi.....	88
4.1.2. Spektroflorometri Yöntemi Geçerlilik Testi (Validasyonu) Sonuçları.....	89
4.1.3. Hazırlanan Kuantum Noktaların Fiziksel Görünüşleri Sonucu.....	90
4.1.4. Floresan ve Kuantum verimi Sonucu.....	90
4.2. Karbon Kuantum Nokta İle Yapılan İn-vitro Çalışmalara Ait Bulgular...	94
4.2.1.KKN Hücre canlılığı ve hücre çoğalması üzerindeki etkisine ait bulgular.....	94
4.2.2. KKN TNF α , IL12p40, GMCSF ve IL6 üzerindeki etkisine ait bulgular.....	99
4.2.3. KKN p38 yolağı üzerindeki etkisine ait bulgular.....	104
5. Tartışma Sonuç ve Öneriler	106
5.1. Tartışma	106
5.2. Sonuç ve Öneriler	110
6.Kaynakça	113
7.Özgeçmiş	129
8.İntihal Raporu	130

Simge/Sembol ve Kısaltmalar Listesi

ACC-2	Adenoid Kistik Karsinom
Ag ₂ S	Gümüş Sülfür
AgClO ₄	Gümüş perklorat
ALT	Alanin Amino Transferaz
AMP	Antimikrobiyal Peptidler
APC	Antijen Sunan Hücreler
ASH	Antijen Sunucu Hücre
AST	Aspartat Transaminaz
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Karbon
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD8	Cluster of Differentiation 8
C-Dot	Karbon Nokta
CdS	Kadmiyum Sülfür
CdSe	Kadmiyum Selenür
CdTe	Kadmiyum Tellürid
CFA	Tamamlanmış Freund'un adjuvanı
Cipro@C-dots	Siprofloksasin – Karbon nokta
CMI	Hücre-Aracılı İmmünite
CNT	Karbon Nano Tüpler
CuInS ₂	Bakır İndiyum Sülfür
DAMP	Tehlike / hasarla ilişkili Moleküler Kalıp
DC	Dendritik Hücreler
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EBV	Eppstein-Barr virus
EDA	Etilendiamin
ER	Endoplazmik Retikulum
FTIR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
GKN	Grafen Kuantum Nokta
GMCSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
Gr	Grafen

GrKN	Grafen Kuantum Nokta
H	Hidrojen
HBsAg	Hepatit B virüsünün yüzey antijeni
HBV	Hepatit B Virüs
HCoV-229E S	İnsan Koronavirüs
Hg	Cıva
HIV	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HPV	Hepatit B virüsü (HBV)
HSV	Herpes Simplex Virus
I.V.	Intravenöz
IgD	İmmünglobulin D
IgE	İmmünoglobülin E
IgM	İmmünglobulin M
IL-1	İnterleukin-1
IL-10	İnterlökin 10
IL-12	İnterlökin 12
IL12p40	İnterleukin-12 p40 altbirimi
IL-18	İnterlökin 18
IL-23	İnterlökin 23
IL-27	İnterlökin 27
IL-6	İnterlökin-6
InAs	İndiyum Arsenik
InP	İndiyum Fosfit
IR spektroskopisi	Infrared (Kızılötesi) spektroskopisi
ISCOM	Immunostimulatory Complex
KKN	Karbon Kuantum Nokta
KN	Kuantum Noktalar
LPS	Lipopolisakkarit
m RNA	mesajcı Ribo Nükleik Asit
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MCF-7	İnsan Meme Kanseri Hücre Dizisi
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi - Doku Uyumluluk Kompleksi
N	Azot

NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
Na-sitrat	Sodyum Sitrat
NK hücresi	Doğal Öldürücü Hücreler
NLR	Nod Benzeri Reseptörler
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
O	Oksijen
Oxa	Oksidize edilmiş oxaliplatin
PACA	Poli alkil siyanoakrilat
PAMP	Patojenle ilişkili Moleküler Kalıp
PbSe	Kurşun selenid
PEG	Polietilen Glikol
PEG1500N	PoliEtilen Glikol 1500
PEG3350	Polietilen Glikol 3350
Ph	Power of Hydrogen
PLA	Poli- laktik asit
PLGA	Poli- D, L-laktid-ko-glikolid
PNP	Polimerik Nanopartiküller
PPEI-EI	Poli (PropionilEtilenimin- ko –Etilenimin)
PRR	Kalıp Tanıma Reseptörleri
PS	Parçacık Boyutları Dağılımı
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute
S	Sülfür
S.C.	Subkutan
SAMH	Sitrik Asit Monohidrat
Si KN	Silikon Kuantum Nokta
STL	Sitotoksik T Hücreleri
SWCNT	Tek Duvarlı Karbon Nano Tüp
TBAP	TetraButilAmonyum Perklorat
TGA	TermoGravimetrik Analiz
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
Th1	T helper tip 1
Th2	T helper tip 2

TiO ₂	Titanyum Dioksit
TLR	Toll Benzeri Reseptör
TNF- α	Tümör nekroz faktörü alfa
UV	Ultraviyole
VLP	Virüs Benzeri Parçacık
WBC	White Blood Cell (Beyaz Kan Hücre)
WSSV	White Spot Syndrome Virus (Beyaz Benek Virüsü)
XPS	X-ray Fotoelektron Spektroskopisi
ZnO	Çinko Oksit
ZnS	Çinko Sülfid
ZnSe	Çinko Selenid
ZP	Zeta Potansiyelleri

Tablolar Listesi

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	KKN üretiminde kullanılan farklı sentetik yöntemlerin özellikleri	26
Tablo 2	Doğal ve Edinsel Bağışıklık Sistemlerinin temel özellikleri	41
Tablo 3	Belirli konsatrasyonda seyreltilen KKN örnekleri.....	83
Tablo 4	Karbon kuantum nokta örneklerin parçacık boyutları, dağılımları ve zeta potansiyelleri (ZP) sonuçları	90

Şekil ve Resim Listesi

Şekil No	Şeklin İsmi	Sayfa No
Şekil 1	Karbon bazlı nanomalzemelerin yapıları	7
Şekil 2	İnorganik nanopartikül çeşitleri	8
Şekil 3	Organik nanopartikül yapıları	9
Şekil 4	Kuantum noktaların büyüklüklerine	12
	bağlı olarak yasak bölgedeki değişim	
Şekil 5	Kuantum nokta yapısı	13
Şekil 6	Karbon noktaların boyut büyüklüğüne	14
	bağlı olarak yaptığı farklı renklerdeki ışımlar	
Şekil 7	Top-down ve Bottom-up yaklaşımlarla	21
	karbon noktalarının üretilmesi	
Şekil 8	Karbon kuantum noktalarının	22
	sentezi için kullanılan yöntemler	
Şekil 9	Bağışıklık Sistemi elemanları	39
Şekil 10	Patojen bir mikroorganizmaya karşı	40
	vücudun savunma hattı	
Şekil 11	Edinsel Bağışıklık yanıtın dönemleri	45
Şekil 12	Hümmoral immün yanıt evreleri	47
Şekil 13	Bağışıklık Sistemi Anatomisi ve	49
	organların görevleri	
Şekil 14	Bağışıklık sistemi hücrelerinin	50
	oluşum basamakları	
Şekil 15	Adjuvanların temsili etki mekanizması	65
Şekil 16	Spektroflorometrik yöntem çalışmasında KKN çözeltisinin uyarma ve yayma spekturumu	89
Şekil 17	Kinin Sülfat Yoğunluk / Dalgaboyu grafiği	92
Şekil 18	KKN Yoğunluk / Dalgaboyu grafiği	93
Şekil 19	MTT testi ile canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilmesi	95
Şekil 20	Hücre canlılığı / KKN grafiği	96
Şekil 21	Hücre çoğalması / KKN grafiği	98
Şekil 22	TNFa ELISA sonuçları	101

Şekil 23	IL6 ELISA sonuçları	102
Şekil 24	GM CSF ELISA sonuçları	103
Şekil 25	IL 12p40 ELISA sonuçları	104
Şekil 26	p38 MAPK analiz sonucu	105
Resim 1	Karbon kuantum nokta örnekleri	79
Resim 2	Karbon quantum nokta örnekleri	80
	ve kontrol gruplarının UV cihazı altında görüntüleri.	
Resim 3	Karbon Kuantum Nokta örneğinin saflaştırılması	81
Resim 4	Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan	83
	KKN örneklerinin UV altında yaydığı floresan ışık yoğunlukları	
Resim 5	Örnekler eklenmeden önce hücreler 37°C'de% 5 CO ² inkübatöründe gece boyunca bekletildi.	86
Resim 6	Karbon kuantum noktaların TEM görüntüsü	88
Resim 7	Kinin sülfat / H ₂ SO ₄ çözeltisi UV altında	94
	yaymış olduğu floresan ışık.	

Türkçe Özet

Kavrak, B. (2022). In Vitro Memeli Makrofajları Üzerindeki Karbon Kuantum Noktalarının İmmünomodülatör Aktivitelerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul.

Kuantum noktaları, biyouyumluluklarının yanı sıra floresan özellikleri nedeniyle de tıpta ve biyolojide kullanılmıştır. Tıbbi ve biyolojik uygulamalarda, ilaç dağıtımı ve fonksiyonel gruplara bağlı olarak bazen tedavi ajanları olarak yaygın kullanılmasının yanı sıra in vivo görüntüleme kapasitelerinden de faydalanılmaktadır. Floresan özellikleri sayesinde hücrelerin fonksiyonel heterojenliği, membran taşıma proteinlerinin difüzyon hareketleri ve hücre içi organel etiketleme gibi hücre taşıma mekanizmalarını incelemek için kullanılabilir. Kolayca değiştirilebilen doğaları, fonksiyonel grupların yapılarına eklenerek hücrelerin ve vücudun içindeki lokalizasyon özelliklerinin yanı sıra farklı işlevler kazanmalarını sağlamaktadır. Çalışmaların çoğunda olası immünomodülatör rolleri ihmal edilmiş ve çalışmamızda ilaç dağıtım aracı olarak veya inflamasyona karşı aktif bileşen olarak kullanılabilecek bir dizi yeni karbon kuantum noktası üretmeyi amaçladık. Bu yeni karbon kuantum noktaları, ELISA yöntemiyle enflamatuar sitokinlerin üretimi üzerindeki etkilerini incelemek için in vitro olarak aktive edilmiş memeli makrofajları üzerinde test edildi. Sonuçlarımız, fonksiyonel gruplara bağlı olarak, bu yeni karbon kuantum noktalarının farklı immünomodülatör aktivitelerinin olduğunu göstermektedir. Bunların bir seti, makrofajların tepkisini ve hücre canlılığını etkilemeyecek güvenli ilaç dağıtım ajanları olarak kullanılabileceği gibi başka bir setinin de anti-inflamatuar ilaç adayı olarak değerlendirilebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kuantum noktaları; Makrofajlar; İnflamasyon; Anti-inflamatuar ilaçlar; Bağışıklık sistemi; İmmünomodülatör etki

İngilizce Özet

Kavrak, B. (2022). Immunomodulatory Activities Of Novel Carbon Quantum Dots On In Vitro Activated Mammalian Macrophages. Doktora Tezi, Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul.

Quantum dots have been utilized in medicine and biology due to their biocompatibility as well as fluorescent properties. In medicinal and biological applications, they have been widely used for their in vivo imaging capacities as well as drug delivery and depending on the functional groups sometimes as treatment agents. They can be used to study the cell transport mechanisms such as functional heterogeneity of cells, diffusion movements of membrane transport proteins, and intracellular organelle labeling thanks to their fluorescent properties. Their easy to modify nature enables addition of the functional groups to their structures to make them gain different functions as well as localization properties within the cells and the body. In most of the studies their possible immunomodulatory roles are omitted and in our study we aimed to generate a series of novel carbon quantum dots that can be used as drug delivery vehicle or as active ingredient against inflammation. These novel carbon quantum dots were tested on the in vitro activated mammalian macrophages to examine their effects on the production of the inflammatory cytokines by ELISA method. Our results suggest that depending on the functional groups there were differential immunomodulatory activities of these novel carbon quantum dots. A set of these can be utilized as safe drug delivery agents that would not affect the response and the cell viability of the macrophages. Whereas another set can be utilized as anti-inflammatory drug candidates.

Keywords: Quantum dots; Macrophages; Inflammation; Anti-inflammatory drugs; Immune system; Immunomodulatory effect

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Aşı, enfeksiyon hastalıklarına karşı koruyucu yanıt oluşturmak amacıyla vücuda verilen maddelerdir. Aşılamamanın amacı, hastalıklara karşı bağışıklık sistemini desteklemek ve bu sayede vücudu söz konusu hastalıklara karşı korumaktır. Sonuçta vücut, enfeksiyon hastalıklarına karşı bağışıklık kazanır ve ilgili hastalık daha hafif geçirilir. Aktif bağışıklık için vücuda, hastalık etkeninin antijeni verilir ve bu sayede vücutta antikor üretimi uyarılır. Pasif bağışıklık için vücuda, doğrudan antikor verilir. Aktif bağışıklık için kullanılan aşılarda; canlı zayıflatılmış, inaktif ve inaktif toksin aşılardır. Son zamanlarda, mRNA aşılarda ve DNA aşılarda yeni aşı yöntemleri olarak gelişmiştir (Jorge and Dellagostin, 2017). Aşıların tekrar virölans özellik kazanma riski ve az etkili olması gibi geleneksel aşıların bazı dezavantajı bulunmaktadır. Bunun dışında mRNA aşılarda ve DNA aşılarda daha düşük immün yanıt oluşturmaktadır. Bazı teknikler ile üretilen aşılar da, alerjik reaksiyon yaratabilecek istenmeyen yabancı proteinler içerebilmektedir. Ayrıca aşılar antijen sunmak dışında, ilgili hastalık için ihtiyaç duyulmayan birçok bileşeni de sunmaktadır. Bu bileşenler aşı etkinliğini azaltabilir, immün sistemi uygunsuz ya da etkisiz cevaplarla yönlendirebilmektedir (Jorge and Dellagostin, 2017; Francis, 2018). Geleneksel aşılarında meydana gelen bu olumsuz etkilerden dolayı, bilim insanları etkili bağışıklık yanıt oluşturabilen ve yan etkisi az olan aşılar geliştirmeye çalışmaktadırlar.

Nanoteknoloji, 1-100 nanometre boyutundaki parçacıklar bilimidir. Nanofarmasötik terimi ise nano büyüklükte ilaç taşıyıcı sistemleri ve araçları içermektedir. Nanofarmasötik bilimi yardımı ile hazırlanan ilaçlar, küçük boyutlarından dolayı damarlardan kolayca geçebilir, nanoparçacıklar geniş yüzey alanına sahip olduğu için çözünürlükleri, absorpsiyonu ve bunlara bağlı olarak da ilacın biyoyararlanımı artmaktadır. Ayrıca nanotaşıyıcı sistemler hasta bölgeye hedeflendirilebilirler ve ilacın raf ömrünü uzatabilmektedirler.

Nanopartiküllerin aşılarda hazırlanmasında bazı avantajları olabilmektedir. Birincisi, pasif veya aktif aşılarda taşıması için yararlı bir araç olabilmektedirler. İkincisi, doğal antijenite özelliğinden dolayı, bağışıklık sistemini iyi bir şekilde uyarabilir ve uygun bir bağışıklık tepkisi oluşturabilmektedirler (Zhao, Seth, Wibowo, Zhao, Mitter, et al., 2014). Buradan yola çıkarak, nanoteknolojik yöntemler kullanılarak, daha iyi hedefleme yoluyla etkin immün yanıt oluşturabilen nanoaşılarda üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Nano aşılarda, geleneksel aşılarda aksine, nanopartiküllerden oluşan ve hastalığın veya enfeksiyonun ortaya çıktığı bölgeyi doğrudan hedefleyen yeni bir aşı sınıfı olarak tanımlanmaktadır. Nano aşılarda, enfeksiyonların ve hastalıkların yayılmasını önlemek için vücudun bağışıklık sistemine katkıda bulunmaktadır (Kim, Park, Shon, Kim, Shim, et al., 2014; Sekhon et al., 2011). Ayrıca, nanosistemler ile geliştirilen aşılarda, degradasyona karşı antijenlerin bütünlüğünü koruyabilmektedir. Geleneksel aşılarda, aşı salınım miktarını kontrol edememekte ve hedef dokuyu tanımlayamamaktadır, bunun sonucunda aşı gelişigüzel vücutta dağılmaktadır ve sonuç olarak hücreler konumlarından dolayı belli bir miktarda ilaç dozu alabilmektedir. Nanopartikül sisteme dayalı ilaç dağıtım sistemleri aracılığıyla bu sorun önemli ölçüde çözülmüştür (O'Hagan and Singh, 2003). Ayrıca, peptidler, proteinler veya nükleik asitler gibi çok sayıda terapötik ajanı stabilize edebilmektedirler. Ek olarak geleneksel aşılarda aksine, ilgili ajanı düşük dozda kullanılmasını sağlayıp daha etkili olmasını sağlayabilmektedir (Stammers, Hunt and Erden, 2013).

Çalışmamızda, nanotaşıyıcı ilaç sistemlerinden biri olan karbon bazlı ilaç taşıyıcı nanosistemler ile aşı geliştirilmesi planlanmaktadır, böylece kısa sürede immün yanıt oluşturabilen, daha az yan etkili ve hedef odaklı aşı elde edilmesi amaçlanmaktadır.

Karbon nanotaşıyıcı sistemlerden biri olan karbon kuantum noktaları genellikle 10 nm'den daha küçük ve yüzeylerinde karbonil, eter, amino, karboksilik asit ve hidroksil grubu gibi farklı fonksiyonel gruplar içeren küresel bir şekle sahiptir. Bu özellikleri onlara biyouyumluluk, iyi iletkenlik, suda çözünürlük ve çeşitli inorganik ve organik maddeler ile bağ oluşturabilmeyi sağlamaktadır. Ayrıca karbon kuantum noktaları, geniş yüzey alanına dolayısıyla daha yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahiptir (Singh, Arora, Dhiman and Pahwa, 2018; Lacerda, 2006).

Karbon nanotaşıyıcı ilaç sistemleri'nin, hidrofilik, düşük toksisite, kimyasal stabilite ve biyouyumluluk gibi biyolojik özellikleri sayesinde güçlü bir ilaç taşıyıcı sistem adaydır. Ayrıca elektronik özellikleri sayesinde elektrokimyasal ışıltamaya neden olur bu sayede hücre içerisinde gözlemlenebilmektedir. Nano boyutları sayesinde hücresel girişı mümkün olmaktadır ve vücudun farklı organlarına serbestçe dağılabilmektedir. Nazal, oral, parenteral ve pulmoner yollar dahil olmak üzere çeşitli yollarla uygulanabilmektedir. Ek olarak, nanopartiküllerin birden fazla hastalığa karşı koruma için birkaç antijenle kombinasyon oluşturabilmesi özelliğı sayesinde etkili ve güçlü bir nanoaşı oluşturulabilmektedir (Mishra, Patil, Thakur and Kesharwani, 2018; Bao, Mitragotri and Tong, 2013; des Rieux, Fievez, Garinot, Schneider and Préat, 2006).

Çalışmamızda, farklı formülasyonlarda karbon kuantum noktaların sentezi yapılacaktır. Daha sonra in vitro yöntem ile memeli makrofaj hücresi üzerinde kuantum noktalarının enflamatuar yanıt oluşturma potansiyeline bakılacaktır. Bunun için makrofajlar üzerine farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kuantum nokta türevleri ilave edilecek ve bunların varlığında salgılanan proinflamatuar sitokinler'den olan TNFa, IL6, GMCSF ve IL12p40 miktarları ölçülecektir. Etkili bir adjuvan adayının antijen veya mikrobiyal metaryali (mRNA, DNA, toksin) taşıyıcı özelliğı ve immün sistemi stimüle edebilecek özelliğı sahip olması gerekmektedir (Zhu, Wang and Nie, 2014). Karbon kuantum noktasının bu özelliklere sahip olup olmadığı incelenecektir. Karbon kuantum nokta'ların immün yanıt oluşumunda etkili olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Lategan, Fowler, Bayati, Fidalgo de Cortalezzi and Pool, 2018; Gao, Shen, Zhao, Dong, Jia et al., 2013).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Farmasotik Nanomateryallerin Kullanım Ve Uygulama Alanları

Nanoteknoloji, nanoölçek boyutlarda fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri değişebilen malzeme ve sistemlerle ilgilenmektedir. Nanoteknolojinin hedefi, nanoölçek boyutlarda potansiyel bir işlevi olabilecek yapıların üretimini ve bu yapılardan malzeme üretimini gerçekleştirebilmek, nano ebatlarda özelliği ve işlevi belli olan cihaz üretebilmek, üretilen bu malzemeleri günlük hayatta kullanılabilir duruma getirmektir. Nanoölçek boyutlara getirilen malzemelerin farklılıkları sadece küçük ebatlarda olması ile ilgili değil, ayrıca küçük boyutlarda farklı fiziksel özelliklerin meydana gelmesi ile de ilişkilidir. Malzemenin boyutunun küçülmesi ile kuantum özellikler (mikroskobik özellikler) daha belirgin hale gelmektedir. Bunun en önemli sonuçlarından birisi atomların geometrik düzeninin maddenin bazı fiziksel özelliklerini etkilemesidir. Karbondan yapılmış malzemeler bu konuda verilebilecek en iyi örneklerdir (Ersöz, Işıtan ve Balaban, 2018).

Nanoteknoloji'nin sağlık alanında birçok kullanım yeri vardır. Nanoteknoloji kullanılarak üretilen küçük ölçekteki cihazlar ile hücre içerisine rahatça ulaşıp gözlemlenebilmekte ve kullanılacak cihaza sağlıklı hücre ile hastalıklı hücreyi birbirinden ayırt edebilme yeteneği kazandırılabilir. Bu sayede kanser gibi bazı hastalıkların teşhisi ve hedef odaklı tedavi yöntemi mümkün olmaktadır. Proteinler, nükleik asitler, lipitler, karbohidratlar, ebatları ile belirli özellikleri olan nanoölçekteki materyallere örnektir. Gen çalışmaların da yaşanan zorlukların nanoölçekteki aygıtlarla giderilebileceği düşünülmektedir. Bu alandaki çalışmaların hastalık teşhis ve tedavisinde yeni yöntemlerin bulunmasında destek sağlayacağı düşünülmektedir (Ersöz ve ark., 2018).

Bir canlı hastalığa maruz kaldığı zaman, ilgili organ, doku ya da hücreler çoğunlukla kimyasal ilaçların kullanıldığı yöntemler ile tedavi edilmektedirler. Kimyasal ilaçlar ile tedavi sonucu sağlıklı hücrelerde kimyasal ilaca maruz kalmaktadır ve bu durumdan olumsuz etkilenebilmektedir. Ayrıca, ilaç molekülünün

etki göstereceği bölgeye ulaşp ulaşamaması ilaç üretiminin ana sorunlarından biridir (Tüylek, 2019; Tüylek, 2017). Bunun önüne geçebilmek için yeni nesil ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmeye çalışılmıştır. Hedef odaklı ilaç taşıyıcı nanosistemler ile üretilen ilaçlar günümüzdeki ilaçlara kıyasla daha pratik olarak hedefe iletilmesini sağlamaktadır (Tüylek, 2017). Farmasotik nanoteknoloji ise nanoteknoloji bilimi kullanılarak, ilaçlar vücut içerisinde moleküler boyutta izleme, hastalıkları tedavi etme ve ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve vücutta seçilen organ, hücre yada reseptöre hedeflemenin yapılabilmesini içermektedir. Nanotaşıyıcı sistemler üzerinde yapılan yüzey modifikasyonları sayesinde istenilen organ, doku veya hücreye ulaşabilmekte ve yapay zeka kullanılarak ilgili bölge içerisinde biyotaklit özellik gösterebilmektedir. Bu sayede, nanotaşıyıcılar hastalığın olduğu bölgeye hedeflendirilebilmekte, tedavi özgünlüğü arttırılmakta, hedef bölgedeki ilaç konsantrasyonunu arttırabilmekte ve sağlıklı organ, doku ve hücrelerin kimyasal ilaca maruz kalmasının önüne geçebilmektedir (Tüylek, 2019).

Klasik yöntemlerle üretilen ilaçların vücut içerisinde terapötik doza gelebilmesi için genellikle tekrarlanan dozda kullanılmaktadırlar. Vücut içerisindeki etken maddenin gerek miktarın altına düşmesi veya yeter düzeyin üstüne çıkması sonucu toksik etki gibi istenmeyen durumlar olabilir. Bu durumların önüne geçebilmek için düşük dozda etkin madde kullanımı sağlayan ve bu sayede oluşabilecek toksik etkilerden arındıran, etkin maddeyi direk hedef bölgeye ulaştıran yeni nesil ilaç taşıma sistemleri kullanılabilmektedir. Nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemler ile polimer yapılı sistem içerisine yerleştirilen etken maddelerin spesifik bölgeye ulaşması sağlanmaktadır. Böylece hedef bölgede ki ilaç konsantrasyonu etkin terapötik düzeyde uzun süre sabit tutulabilmekte ve vücut içindeki etkin maddenin eliminasyonu azaltılabilmektedir. Bu sayede ilaç daha etkili kullanılmakta dolayısıyla ilaçtan alınacak olan fayda artmaktadır (Zhang, Gu, Chan, Wang, et al, 2008).

Nanotaşıyıcılar vücut içerisine verileceği için biyolojik yönden güvenilir olması gerekmektedir. Canlı için uygun olan biyo uyumlu polimerlerden yapılan ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılması ile bu yapıların zamanla vücutta parçalanması ve parçalanan ürünlerin toksik etkisinin olmaması sağlanmaktadır.

Nanotaşıyıcı sistemler etkin madde ile iki farklı şekilde bağlanabilmektedir. Birincisi, etkin maddenin elektrostatik, hidrofobik veya hidrojen bağları ile nanotaşıyıcılar içerisine implante edilerek salınması ikincisi ise kovalent veya

elektrostatik etkileşim ile etkin maddenin ilaç taşıyıcı yüzeyine konjugasyonudur (Tüylek, 2019).

İlaç hedeflenmesindeki asıl amaç, farmakolojik ajanın vücutta istenilen ya da hasta olan kısma taşınması, absorpsiyonu ve dağılması olarak tanımlanır. İlacın seçici hedeflendirilmesi ile, farmakolojik ajanın yan etkileri azalmakta, istenen terapötik yanıt elde edilmekte ve yüksek dozlarda ilaç kullanımı esnasında meydana gelen toksik etkiler azaltılarak daha güvenli bir ilaç kullanımı sağlanır. Ayrıca Nano taşıyıcı sistemlerle ilaç hedeflendirilmesi ile, ilaçlar kan-beyin bariyeri, akciğerdeki bronşiyoller ve derideki sıkı bağlantılar gibi ulaşılması zor olan bazı anatomik ve biyolojik yapıları aşarak ilaçların hedef dokuya ulaştırılmasını sağlar ve reseptöre spesifik ve dayanıksız moleküllerin korunması ve diğer hedef dışı reseptörlerle etkileşmemesi sağlanmaktadır (Sayiner ve Comoglu, 2016).

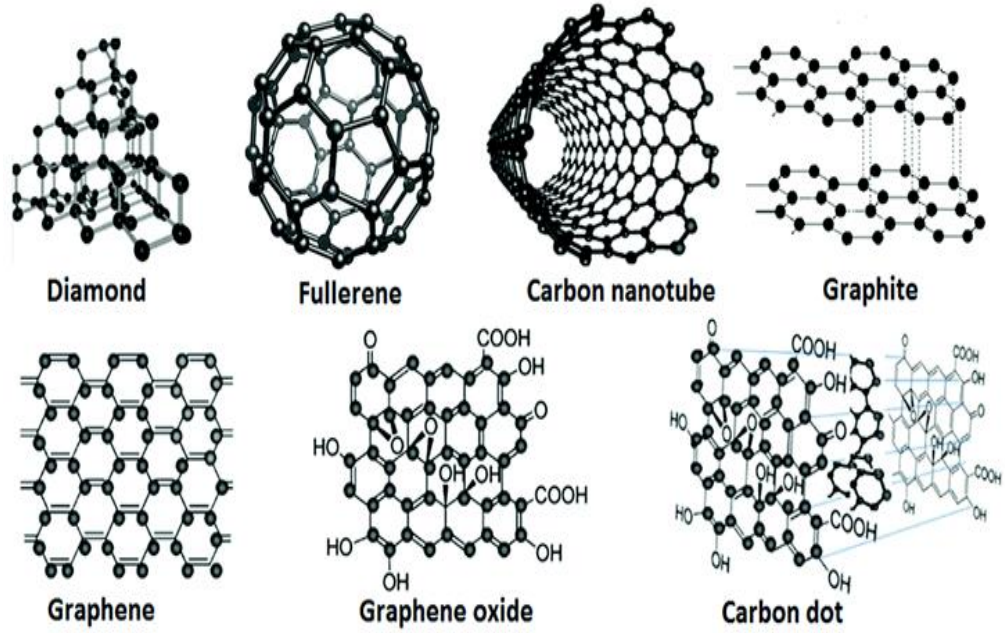
İlaç geliştirme alanının dışında, nanoteknolojinin genel olarak halk sağlığı yararlarına yol açabileceği düşünülmeli gerekmektedir. Buna örnek olarak, hava-toprak-sudaki patojenleri ve kirleticileri tespit etmek için yeni araçlar yaratmak, su kaynaklarının nanofiltrasyonu ve iyileştirilmesi gibi projeler de nanoteknoloji fayda gösterebilmektedir (Stammers et al., 2013).

2.2. Nanopartiküllerin Ve Nanomateryallerin Sınıflandırılması

Nanopartiküller materyal temelli olarak dört ana başlık altında sınıflandırılmaktadır.

2.2.1. Karbon Temelli Nano Malzemeler

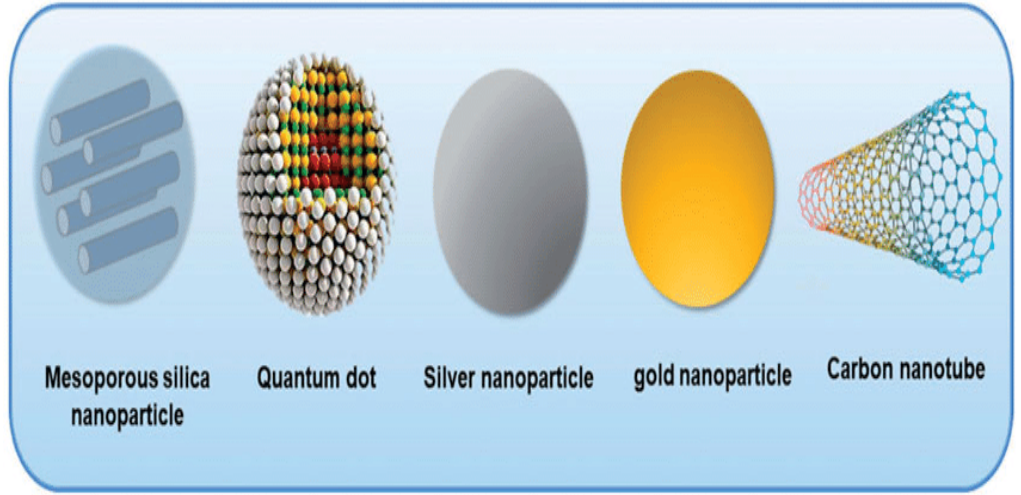
Bu grup nanopartiküller karbon içerir ve içi boş tüpler, elipsoidler veya küre gibi şekillerde bulunabilmektedir. 3-10 nm aralığında yapılardır. Fullerenler (C60), karbon nano tüpler (CNTs), karbon nano fiberler ve grafen (Gr) yapılar örnektir (Şekil 1). Karbon bazlı nanomalzemelerin, analitik, biyogörüntüleme, vücut içerisinde moleküler arası iletişim ve teranostik alanlarda uygulanmaktadır (Testa, Zammataro, Pappalardo and Sfrazzetto, 2019).



Şekil 1: Karbon bazlı nanomalzemelerin yapıları.(Yan, Gozin, Zhao, Cohen and Pang, 2016).

2.2.2. İnorganik Temelli Nano Malzemeler

Bu nano malzemeler, metal ve metal oksit nanopartikülleri ve nano yapılı malzemeleri içermektedir. Genellikle altın veya gümüş nanopartiküller gibi elementlerinden hazırlanan kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerden, TiO_2 (Titanyum Dioksit ve ZnO (Çinko Oksit) nanopartiküller gibi metal oksitler ve silikon ve seramikler gibi yarı iletken malzemelerden üretilmektedir (Şekil 2). Tanı ve/veya tedavi amaçlı kullanılabilir. Altın bazlı nanopartiküller, yüzey modifikasyonu ile küçük analitlerin ve biyomoleküllerin tespitinde geniş uygulamalar göstermektedir. Kuantum noktaları, yüksek floresan özelliği ve geniş emisyon aralığı nedeniyle biyogörüntülemeye büyük potansiyel göstermektedir (Wang, Li, Cheng and Yuan, 2016).



Şekil 2: İnorganik nanopartikül çeşitleri (Li, Cao, Liu, Liu, Li et al., 2019)

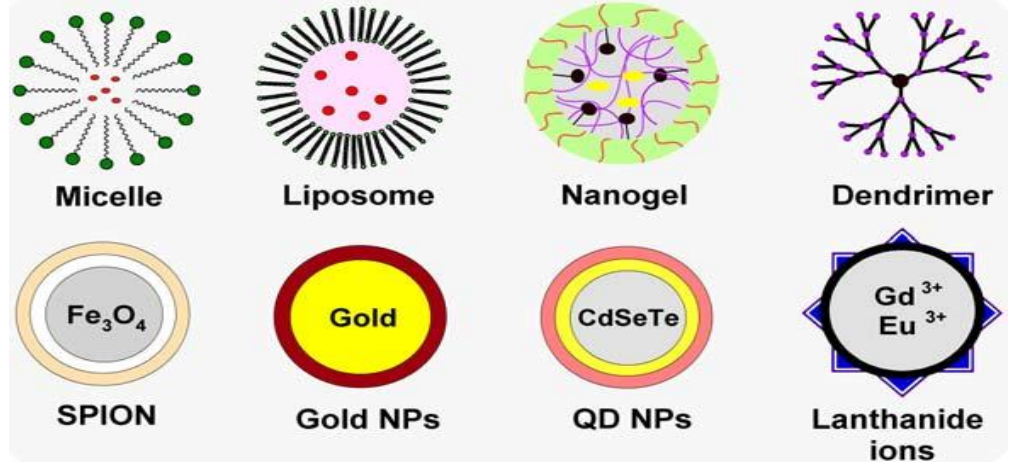
İnorganik nanopartiküller, boyuta bağlı optik, manyetik, elektronik ve katalitik özellikleri içeren benzersiz fiziksel özellikleri nedeniyle yeni ilaç taşıyıcı sistemi olarak ortaya çıkmaktadır.

Bu nanopartiküller yüksek stabiliteye, geniş yüzey alanına, çeşitli modifikasyonlara, çok işlevliliğe sahip fizikokimyasal özellikler ve spesifik biyolojik davranışlara sahiptir (Pandey and Dahiya, 2016).

2.2.3. Organik Temelli Nano Malzemeler

Genellikle organik materyallerden yapılan nano malzemelerdir. Şekil 3'te gösterildiği gibi dendrimerler, miseller, lipozomlar ve polimer nanopartiküller bu gruba örnek nanoparçacıklardır.

Bu yapılar da moleküllerin kendi kendine toplanması ve tasarımı için kovalent olmayan (zayıf) bağ kullanılmaktadır ve bu sayede istenen yapıların elde edilmesi sağlanmaktadır. Lipid bazlı organik nanopartiküller suda az çözünen ilaçların çözünürlüğünü artırma yetenekleri ve in vivo ortamda biçimi açısından birçok avantaja sahiptir (Rajabi and Mousa, 2016).



Şekil 3: Organik nanopartikül yapıları (Rajabi and Mousa, 2016).

2.2.4. Kompozit Temelli Nano Malzemeler

Nano ölçekli boyutta bir faza sahip olan nanopartikülleri diğer nanopartiküller yapılarla birleştirebilen çok fazlı nanopartiküller ve nanoyapılı malzemelerdir. Bileşenler arasındaki sinerjistik etkilerden dolayı bileşenlerinin özgün özelliklerine ek özelliklerle birleştirmektedir (Meroni and Ardizzzone, 2018).

2.3. Kuantum Nokta Sistemleri

2.3.1. Genel Özellikleri

Nano yapıdaki malzemeler genellikle 100 nm altında ki boyutlarda kuantum mekaniğinin özelliklerini göstermeye başlamaktadır. Kuantum nokta büyüklüğü 2-10 nm arasında olan yarı kristal nanopartiküllerdir. Küçük boyutlarından dolayı bu nanopartiküllerin üzerinde oynama yapılabilmektedir. Kuantum noktacıkların boyutları ve içerdiği atomlar onun özelliğini belirlemektedir. Kuantum noktalar yapısında birkaç atomdan, binlerce atoma kadar atom barındırabilen yapay bir atomdur. Kuantum noktaların boyutları üzerinde kolayca düzenlemeler yapılabilirdiği için bant boşluğu da değişmektedir bu da kuantum noktalarına yapay atom özelliği katmaktadır. Boyut kontrol edilebildiği için, kuantum noktalarının birden çok optik

ve elektriksel özellikleri bulunmaktadır (Gao, Yang, Petros, Marshall, Simons et al., 2005).

Kuantum noktalar ilk olarak Alexie Ekimov tarafından 1980’li yıllarda yapılan koloidal çözeltileri çalışmaları sırasında bulunmuştur. Kuantum nokta elde edebilmek için çoğunlukla periyodik cetvelin II-VI, III-V gruplarında bulunan iletken ve yarı iletken elementlerinden faydalanılmaktadır. En sık kullanılan kuantum noktalar: CdSe (Kadmiyum Selenür), InAs (İndiyum Arsenik), CdS (Kadmiyum Sülfür), CdTe (Kadmiyum Tellürid), ZnS (Çinko Sülfid), PbSe (Kurşun Selenid)’dir (Yong, Roy, Swihart and Prasad, 2009).

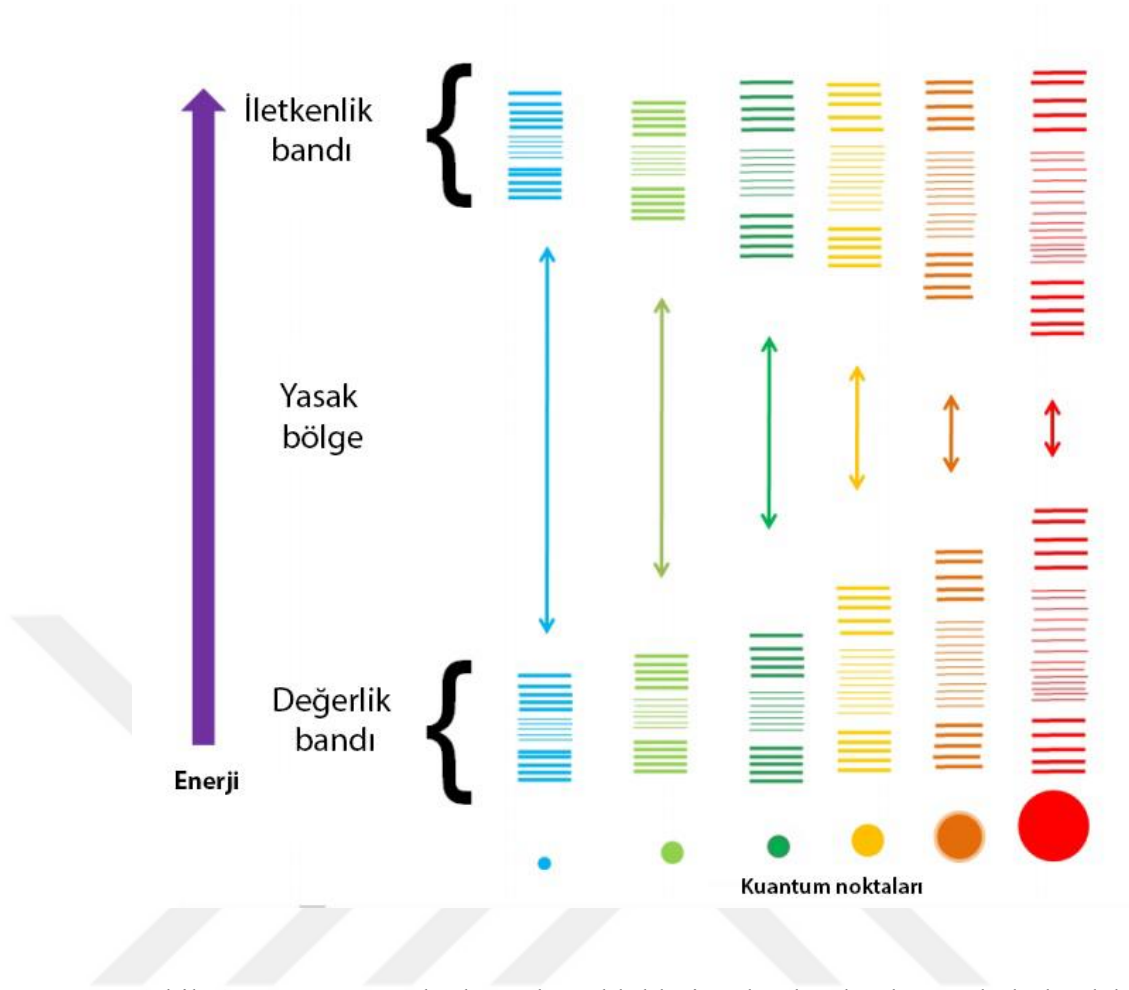
Bir maddenin iletken olabilmesi için elektronun bulunduğu değerlilik bandı ile iletken olabilmesi için geçmesi gereken iletkenlik bandı arasındaki uzaklığın çok az olması gerekmektedir. Yarı iletken bir madde de ise, elektronların çoğu değerlilik bandında geriye kalan az miktarda ki elektron ise iletken bandında bulunmaktadır. Bir elektronun değer bandından iletim bandına geçebilmesi için, yasak bandı geçebilecek kadar yüksek miktarda enerjiye sahip olması gerekmektedir. Isı, voltaj veya foton enerjisinden faydalanarak elektron uyarılarak iletim bandına ulaşması sağlanabilmektedir fakat iletim bandına ulaşan elektron o bölgede çok az durur ve değer bandındaki yerine geri dönmektedir (Durmuşoğlu, 2011).

Bulk malzemelerdeki yarı iletken kristalinin boyutu exciton bohr yarıçapından daha büyüktür ve bu exciton için yeterli bir boşluk alanı vermektedir. Kristalin boyutu küçüldükçe, atomda bulunan enerji seviyeleri sürekli şekilde davranmayı bırakıp ayrık bir şekilde davranmaya başlamaktadırlar. Bu ayrık enerji seviyelerinin bulunduğu duruma “kuantum sınırlaması” denilmektedir. Bu durumda artık kristalin boyutu exciton bohr yarıçapından daha küçüktür ve uyarılmış bir elektron uzağa gitmek isteyecek fakat sınırlandığı için hareket edemeyecektir. Bu duruma gelen maddelere, artık bulk malzemenin özelliklerini göstermeyi bırakıp, kauntum mekaniğine özgü özellikler göstermeye başlayacaktır ve değişen boyutlarından dolayı da bu malzemelere “Kuantum Nokta” denilmektedir (Yong et al., 2009).

Kuantum nokta UV ışığına maruz kalırsa, absorplanan (soğurulan) ışık sebebiyle kuantum noktasında bulunan elektron belli bir enerjiye maruz kalır ve düşük enerji seviyesinden daha yüksek enerjili bir seviyeye çıkmaktadır. Bu durum kararsız bir hal olmasından dolayı elektron daha kararlı olan temel haline dönmektedir. Bu uyarılma şekli ışık emisyonudur (fotoluminesans) ve enerji farkının o enerji farkına denk gelen dalga boyundaki ışığın yayılması olayı

olarak bilinmektedir. Ortaya çıkan ışığın rengi değer ve iletim bandı arasındaki enerji farkına bağlıdır. Kuantum sınırlaması etkisi ile boyutları değişen kuantum noktalarının yaptığı ısımanın rengi de değişmektedir. Ortaya çıkan enerji ısınım şeklinde gerçekleşmekte ve bant boşluğu ne kadar yüksekse, elektronun sahip olduğu enerji ve yaydığı enerji de o kadar fazla olmaktadır (Şekil 4). Sonuç olarak, elektron iletkenlik bandından, değerlilik bandına dönerken ışık saçar ve nesnelerin rengini bu sayede görmemizi sağlamaktadır. (Jamieson, Bakhshi, Petrova, Pocock, Imani et al., 2007; Reshma and Mohanan., 2019) .

Uyarılma sonucu salınan fotonun enerjisi ile dalga boyu arasında ters orantı vardır. Yüksek enerjili foton kısa dalga boyuna sahiptir diğer yandan enerji düştüğü zaman dalga boyu artış göstermektedir. Dalga boyunda meydana gelen değişiklik, elektromanyetik spektrumda olan görünür bölgedeki renk değişimine karşılık gelmektedir. Yüksek enerjili kısa dalga boyuna sahip olan foton mavi renkte gözükürken, düşük enerjili uzun dalga boylu foton ise kırmızı renkte görünmektedir (Şekil 6). Nanomalzemelerin eşsiz olası, büyüklüklerine bağlı olarak meydana gelen fiziksel, kimyasal veya mekanik özelliklerindeki değişim yapılabilmesidir. Kuantum noktalarının boyutları küçüldükçe yasak bölge aralığı artmaktadır (Şekil 4). Bu sebepten dolayı boyutları kontrol edilebilir bir değişken olup boyutunu değiştirerek dalga boyuna bağlı olarak renk ışımlarını da değiştirebilmektedir (Reshma and Mohanan., 2019).

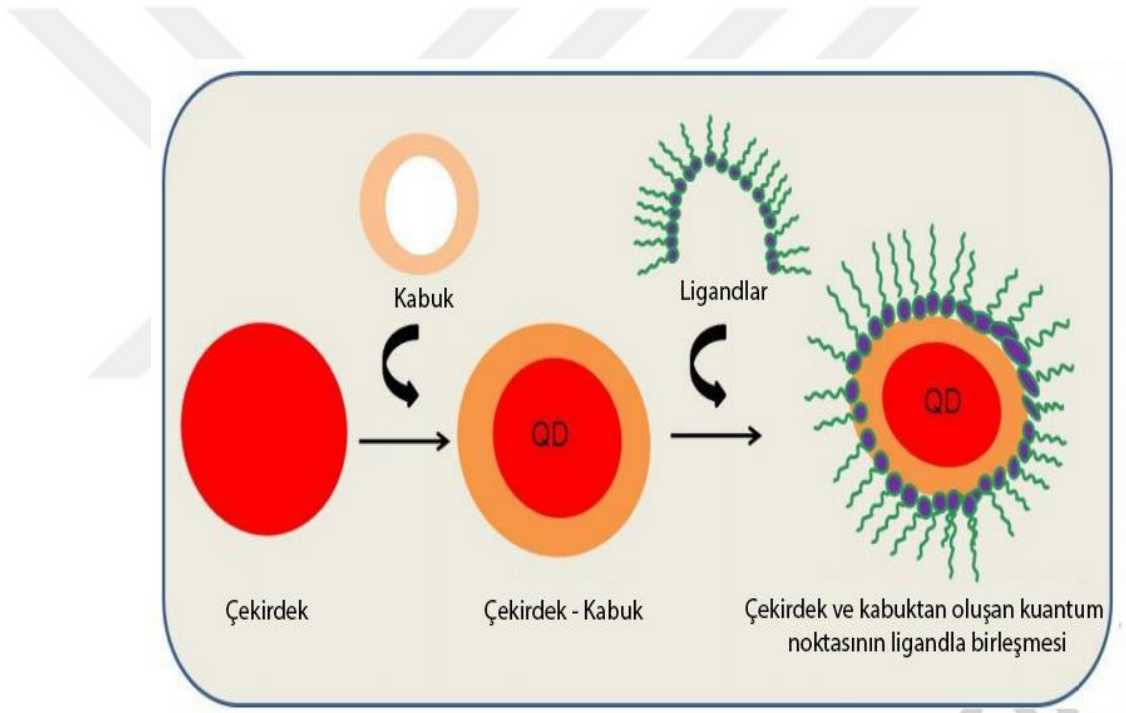


Şekil 4: Kuantum noktaların büyüklüklerine bağlı olarak yasak bölgedeki değişim (Reshma and Mohanan, 2019).

Sonuç olarak, kuantum noktalar exciton bohr yarıçapından daha küçük olduğu için ve enerji seviyelerinin şeklinin ilgili noktacığın boyutuyla alakalı olmasından dolayı ve kuantum noktaların boyutları üzerinde oynanabilmesinden dolayı maddenin sahip olduğu atomun enerji seviyeleri ile oynanabilecek bir malzeme vermektedir. Bu durum sıra dışı bir özelliktir. Kuantum noktalar, birden çok optik ve elektronik özellikler, ayarlanabilir boyutları ile ışık emisyonu, yüksek sinyal parlaklığı ve uzun süreli foto kararlılık gibi farklı özellikleri bulunmaktadır. En önemli özelliği boyutunu kontrol ederek rengini de kontrol edebilme özelliğinin olmasıdır ve en küçük kuantum noktalar mavi ışımaya yaparken en büyük noktalar ise kırmızı ışımaya yapmaktadır. Kuantum noktaları güneş panelleri, hastalık tanı ve tedavi de biyo-ajan olarak, LED aydınlatmalar, az enerji ile çalışan ampül ve televizyonlar gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

2.3.2. Kuantum nokta fizikokimyasal yapısı

Kuantum noktaları genellikle iki kısımdan oluşmaktadır ve bu yapılar inorganik çekirdek ve organik dış kabuktur. Kuantum noktanın içerisinde bulunan çekirdek kısmı, ilgili noktanın yarı iletken olmasını sağlamaktadır. Dış kabuk ise organik yapısından dolayı inorganik çekirdek kısmının okside olmasını engellemektedir (Şekil 5). Kuantum noktalar (KN) genel olarak periyodik cetvelin II ve VI elementlerinden ya da III ve V elementlerinden oluşmaktadır. KN kabuk yüzeyi biyoyumluluk açısından çok önemlidir ve genellikle suda çözünebilen ürünler kullanılmaktadır (Rizvi, Ghaderi, Keshtgar and Seifalian, 2010).



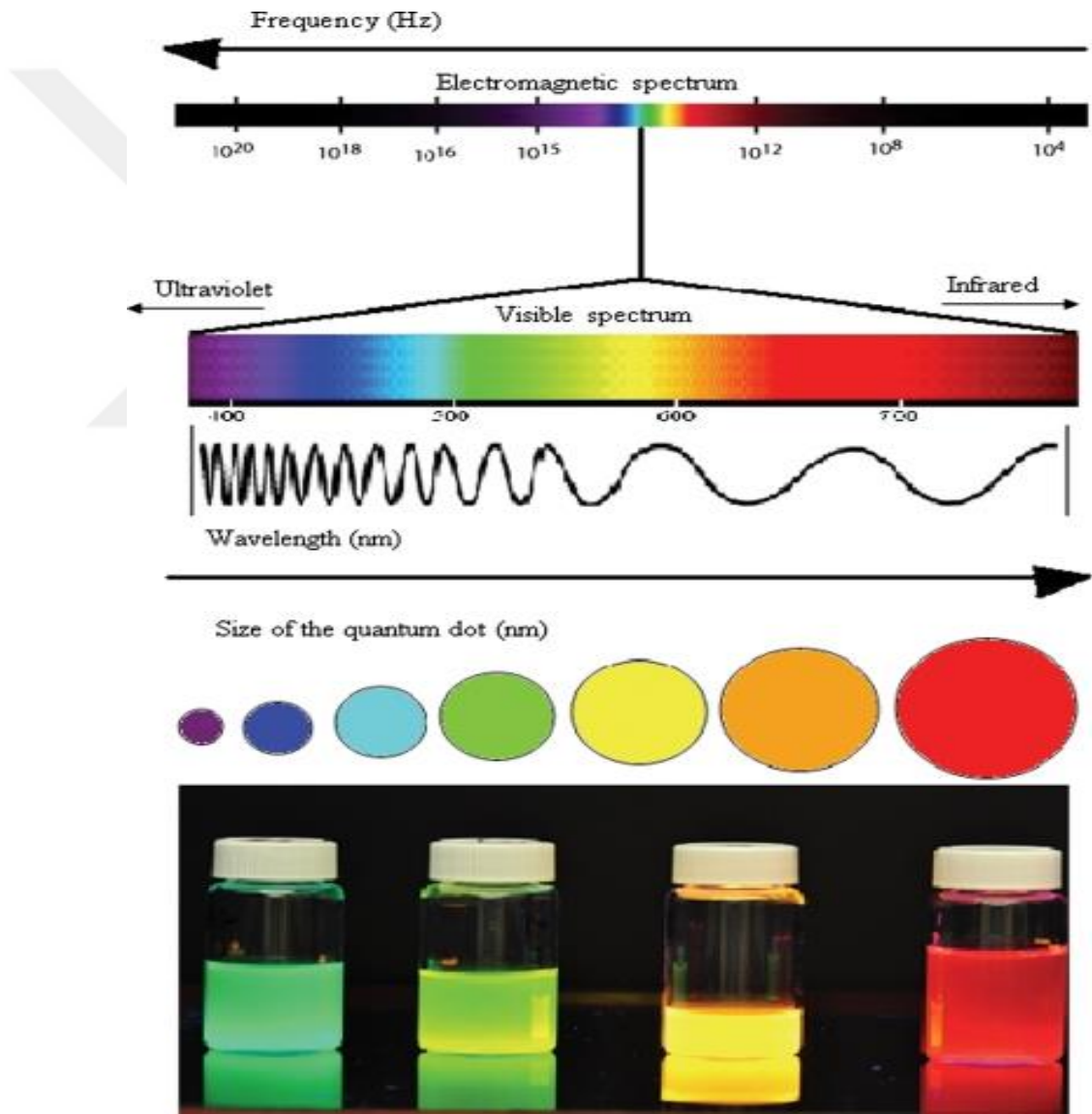
Şekil 5: Kuantum nokta yapısı (Reshma and Mohanan., 2019).

Kuantum Noktaların fiziksel büyüklükleri Bohr çapından küçüktür ve bu sebepten kuantum sınırlama olayı görülmektedir. 2.3.1. kısımda bahsedildiği gibi kuantum sınırlaması olayı değerlik bandı ile iletkenlik bandı arasında kalan bant boşluğu'nun daralması ile oluşmaktadır. Bu daralmanın asıl sebebi boyutu büyüyen KN sonucu daha fazla enerji bandının iç içe girmesidir. Bu daralma parçacığın belli

bir büyüklüğüne kadar devam eder ve sonrasında büyüklüğe bağlı olarak değişmemektedir.

Belli bir parçacık büyüklüğünden sonra enerji bantları tamamen iç içe girmesinden dolayı optik özellikte de değişme olmaz. Bu nedenle KN kuantum sınırlaması görülmektedir. Bu etki, KN optik ve elektronik özelliklerini belirlemektedir (Rizvi et al., 2010 ; Reshma and Mohanan., 2019).

Kuantum noktaları, morötesi ışınlarla aydınlatıldığı zaman, büyüklüklerine göre farklı renklerde ışımaya yapmaktadırlar. KN'ların optik özellikleri kristal boyutlarına bağlı olarak değişebilmektedir (Şekil 6).



Şekil 6: Karbon noktaların boyut büyüklüğüne bağlı olarak yaptığı farklı renklerdeki ışımalar (Reshma ve Mohanan., 2019).

2.3.3. Avantajları

Boyutları kolayca ayarlanabilirliği için geniş kullanım alanlarına sahiptir.

Kuantum noktaları bir dizi dalga boyundaki ışıkla uyarılabilmektedir, bu durum da KN'a belli bir dalga boyundaki ışıktaki birden çok renk gösterebilme imkanı sunmaktadır (Rizvi et al., 2010).

Kuantum nokta'ların, olabilecek dar emisyon spektrumlarına sahiptir. Parçacığın boyutu, bileşimi ve yüzey kaplamaları değiştirilerek kontrol edilebilir. Buradan, farklı renkler yayan birden fazla KN, tek bir ışık dalga boyu tarafından uyarılabilir, onları çoklanmış görüntüleme için ideal hale getirir (Rizvi et al., 2010).

Kuantum nokta'lar metabolik degradasyona karşı dirençli inorganik çekirdekleri nedeniyle son derece fotostabildir ve saatlerce tekrarlanan uyarma ve floresan döngülerden geçtikten sonra bile yüksek parlaklığı koruyabilir. Bu nedenle, uzun süreli olarak kullanılabilirler. Bu özelliğinden dolayı hücre izleme çalışmalarında kullanılabilir (Chan, Maxwell, Gao, Bailey, Han et al., 2002).

Kuantum nokta'ların floresan ömrü diğer meteryallere göre daha uzundur. Ortalama 30 – 100 ns arasındadır (Rizvi et al., 2010).

Kuantum nokta'lar daha yüksek kuantum verimine, daha büyük absorbans kesitine, in vivo çalışmalar da çok daha parlak floresan özellik taşıma (prob) kapasitesine sahiptir ve uzun süre devam eden sürekli izlenen deneylerde kullanılmaktadır. (Rizvi et al., 2010)

Günümüzde kullanılan geleneksel floresan boya ve proteinlerden farklı olarak kuantum noktaları, geniş lüminesans spektrumlarına (ışık aralığı) sahip olması ve fotostabil olması ile uzun süreli ve belirgin görüntüleme imkanı sağlamaktadır (Yao, Li, Li and Yang, 2018) .

Kuantum nokta'ların yüzey özellikleri parçacığın optik özelliklerini etkilemektedir. KN yapısının yüzeyinde atom boşluklarından kaynaklı oluşan yüzey tuzak bölgeleri bulunmaktadır. Bu durum bant aralığında yeni enerji seviyelerinin oluşmasını etkilemektedir. Parçacık yüzeyinde bulunan tuzak yapıların fazla olması, KN uygulamalarında verimin düşmesine ve yüklerin yeniden birleşmesi esnasında yanıp sönme (rekombinasyon) gibi olaylara sebep olmaktadır. KN yüzey özelliklerini iyileştirmek için KN bir yüzey aktif madde ile kaplama veya çekirdek/kabuk yapısında sentezleme gibi yöntemler kullanılarak foto aktivite iyileştirilebilmektedir

2.3.4. Uygulama Alanları

Kuantum nokta'ların floresan problemleri olarak hastalık tanı ve görüntüleme amacıyla kullanılması sağlık sektöründe yaygın olarak uygulanmaktadır. Fakat bazı KN bileşiminde olan CdSe, CdTe ve CdS gibi ağır metaller, fizyolojik koşullarda bozulma özelliğine sahip olup iyon salınımı yaparak toksik etkiye sebep olabilmektedirler. Bu etkiyi ortadan kaldırmak için, karbon veya silikon bazlı benzer foto-fiziksel parametrelere sahip biyo-uyumlu materyaller KN üretiminde kullanılmakta ve biyomedikal alanda uygulanmaktadır (Chen, Gao, Goh, Samsudin and Su et al., 2019).

2-6 nm boyut aralığında değişen metal ve yarı iletken nanopartiküller, yalnızca benzersiz boyut özellikleri nedeniyle değil, aynı zamanda biyolojik makromoleküllerle (nükleik asit ve proteinler gibi) boyutsal benzerlikleri nedeniyle de önemli ölçüde ilgi çekmektedir. Bu benzerlikler nanoteknoloji ve biyolojinin entegrasyonuna olanak tanıyarak tıbbi teşhis, hedefe yönelik terapötik üretimi, moleküler biyoloji ve hücre biyolojisinde önemli ilerlemelere yol açabilmektedir. Birkaç grup tarafından yapılan son araştırmalar, nanopartikülleri peptitler, proteinler ve DNA gibi biyomoleküllerle ilişkilendirmiştir. Bu nanoparçacık biyokonjugatları, homojen biyo tahliller geliştirmek için yeni malzemelerin bir araya getirilmesinde ve ultrasensitif algılama ve görüntüleme için çok renkli floresan etiketler olarak kullanılmaktadır (Chan et al., 2002).

Organik boyalar ve floresan proteinlerle karşılaştırıldığında, yarı iletken KN'lar birçok benzersiz avantaj sunar, görünürden kızılötesi dalga boylarına kadar boyut ve kompozit özelliğine göre ayarlanabilen emisyon özelliği, geniş bir spektral aralıkta büyük emilim katsayılarına ve çok yüksek parlaklık ve fotostabilite seviyelerine sahiptir. Geniş uyarılma profilleri ve dar / simetrik emisyon spektrumları sayesinde, yüksek kaliteli KKN'lar, birden fazla renk özelliklerine sahip olma ve binlerce gen, protein veya küçük molekül bileşiği belirlemek için yapılan K-nokta-makromolekül kombinasyonu sayesinde optik kodlama için de çok uygundur (Gao et al., 2005).

Kuantum Nokta'ları yapısında hem ilacı hem de görüntüleme sistemlerini bir arada bulundurabilmesinden dolayı, tanı ve tedavi edici ajanların tek bir platformda

toplanmasını sağlayan teranostik etkinin oluşmasını sağlamaktadır. Bu özellik sayesinde, KN yüzeyine anti-tümör ilaç ve tümör hedefli peptit bağlanarak kompozit bir yapı oluşturulabilir ve kanser tanı - tedavisinde kullanılabilir (Salva, Taratula, Garbuzenko and Minko, 2011).

Kuantum Noktalar'ların geniş uyarma profilleri ve dar/simetrik emisyon spektrumları sayesinde, yüksek kaliteli KN'lar, binlerce gen, protein veya küçük moleküllü bileşiği kodlamak için birden fazla renk ve yoğunluğun birleştirildiği kombinatorial optik kodlama için de çok uygundur ve biyosensör olarak kullanılmaktadır (Han, Gao, Su and Nie, 2001).

Kuantum Nokta'ların hedef hücrelerde veya dokularda bulunan antijenlere bağlanan antikolar, aptamerler, peptitler veya küçük moleküller ile yüzey modifikasyonu, in vitro ve in vivo uygulamalar için hassas ve spesifik hedefli görüntüleme ve tanı yöntemlerinin geliştirilmesiyle sonuçlanmıştır (Bagalkot, Zhang, Levy-Nissenbaum, Jon and Kantoff et al., 2007).

Kuantum nokta'lar ile üretilen LED aydınlatma sistemleri daha az maliyetli ve daha kaliteli hale getirilmiştir. LED çalışma mekanizması ise, anot ve katot tabakalar arasına biri elektron taşıma tabakası diğeri ise boşluklu taşıma tabakası olan taşıma tabakaları konulmuş ve bu tabakaların arasına yerleştirilmiş kuantum nokta-dan akım geçtiği zaman harcanan enerji ışık şeklinde ortama yayılmaktadır (Shirasaki, Supran, Bawendi and Vladimir, 2013).

Sonuç olarak kuantum noktalar, değişik parçacık boyutlarına bağlı olarak göstermiş olduğu farklı optik ve enerji niteliklerinden dolayı biyoteknoloji, biyo-ajanlar ve biyo-görüntüleme, LED aydınlatmalar, güneş panelleri, lazer sistemleri, daha canlı renklere sahip plazma ve televizyon ekranlarında, elektronik gibi birçok alanda uygulanmaktadır.

2.3.5. İnorganik Temelli Kuantum Nokta Örnekleri

İnorganik temelli kuantum noktalar, belli grup elementlerin birleşimi ile elde edilmektedir. Genellikle periyodik cetvelin III-V, II-VI veya IV-IV gruplarında bulunan metallerin bir araya gelmesi ile elde edilmektedir. Çoğu zaman yarı iletkenlerdir. Bu kuantum noktalara kükürt, azot veya fosfor bileşikler eklenerek belli bir fonksiyon kazandırılabilir bu sayede KN'ların boyutları ve seçiciliği

ayarlanabilmekte ve dalgaboyunda belli değişiklikler yapılarak istenilen amaca uygun, nitelikli bir nanoparçacık yapılabilmektedir (Shi, Liu and Su, 2014).

Parçacıkta bulunan çekirdeğin kararlılığını sağlamak, yığın oluşturmasını engellemek ve büyüklüklerini kontrol edebilmek için inorganik temelli kuantum noktalara hidrofilik veya hidrofobik özellik gösteren yüzey aktif ligantlar kaplanması gerekmektedir. Bu özellik için kullanılan yüzey aktif maddeler üç kısımdan oluşur. İlki çekirdek yüzeyine tutunan kısımdır, ikincisi iki fonksiyonel yapı arasında yer alan zincir yapıda olan yapıdır ve üçüncüsü ise zincirin ucuna bağlanan dış kısımda kalan yapıdır (Sperling and Parak, 2010).

2.3.6. Toksik Etkisi

Kuantum nokta olarak en yaygın kullanılan CdSe / ZnS, CdSe / ZnS ve CdTe / ZnS, yüksek fotostabilite veya uyarıma düzeyi süresi gibi geleneksel floresan boyalara kıyasla sahip oldukları üstünlükleri nedeniyle çeşitli biyolojik uygulamalarda kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu KN'ların çeşitli proteinlere, lipitlere ve genetik materyale zarar verdiği bilinen reaktif oksijen türleri (ROS) üretebildikleri için toksik oldukları bulunmuştur. Dahası, kadmiyum (Cd) bazlı nanomalzemeler hücre ölümüne yol açan kadmiyum iyonlarını serbest bırakabilmektedir (Navazi, Omid, Eskandani and Davaran, 2019).

Kadmiyum gibi ağır metaller içeren yarı iletken kuantum nokta'ların aksine karbon noktaları toksik bir element olarak kabul edilmemektedir. Nanopartiküller veya bunların agregalarını içeren karbon tozları günümüzde birçok ticari üründe ve sağlık bilminde kullanılmaktadır (Wang, Anilkumar, Cao, Liu and Luo, 2011). Ağır metal içeren kuantum nokta örneklerine alternatif olarak, karbon noktaları, silikon KN'lar (Si KN'lar) ve grafen KN'lar (Gr KN'lar), Ag₂S (Gümüş Sülfür), InP (İndiyum Fosfit), ZnSe / ZnS (Çinko Selenid / Çinko Sülfür) , CuInS₂ / ZnS (Bakır İndiyum Sülfür / Çinko Sülfür) kuantum noktalar gibi toksik ağır metal içermeyen kuantum noktalar üretilmiştir (Reshma ve Mohanan., 2019).

2.3.7. Karbon Temelli Kuantum Nokta Örnekleri

2.3.7.1. Yapısı ve Özelliği

Karbon kuantum noktaları (KKN) ilk defa Xu ve arkadaşları tarafından yanlışlıkla keşfedilmiştir. KKN preperatif elektroforez yoluyla tek duvarlı karbon nanotüplerin saflaştırılması işlemi sırasında floresan gözleminin ardından elde edilmiştir. İlk olarak ‘Karbon Nanopartikül ‘ adını almıştır fakat daha sonra inorganik kuantum noktaları ile benzer özellikleri çıkınca ‘Karbon Noktaları ‘ adını almıştır (Xu, Ray, Gu, Ploeh and Gearheart et al., 2004).

Karbon Kuantum Nokta (KKN) veya Karbon Noktaları (C-dot'lar), modifikasyon veya fonksiyonlaştırma yoluyla farklı yüzey pasivasyon işlemleriyle elde edilen 1-10 nanometrelik küçük yarı iletken nanokristallerdir.

Karbon Noktaları esas olarak bol ve toksik olmayan bir element olan karbondan oluşur ve yapısında karbon bulundurması diğer nanopartikül ailelerinden farklı olan ayırt edici yapısal ve elektronik özellikler sağlamaktadır (Singh et al., 2018). Birçok karbon nokta, UV uyarımı altında yoğun floresan özellik gösterir ve ağırlıkça en az %70 karbon içeriğine sahiptir. Kütle dengesi genellikle oksijen veya nitrojen bazlı yüzey fonksiyonel grupları içerir (Ai, Yang, Wang, Chang and Tang et al., 2021).

2.3.7.2. Avantajları

Karbon kuantum noktası üretimi için gereken karbon kaynağı sebzeler, meyveler, polimerler ve hatta atıklar dan karşılanabilmektedir. Karbon kaynağının ucuz olması ve bol miktarda olması, KKN üretimini kolaylaştırmaktadır (Huang, Chen, Wang, Zheng and Huang et al., 2017).

Amino grupları, oksijen ve polimer zincirleri gibi yüzeyde çeşitli fonksiyon grupları içeren karbon noktalarının kimyasal bileşimi, dikkat çekici özellikleri ile büyük ölçüde desteklenmektedir. Bu fonksiyonellerin fotoluminesans aktivitesi üzerinde önemli bir etkisi vardır ve ayrıca noktacık yüzeyin enerji boşluğunu ve enerji seviyesini arttırmaktadır (El-Shabasy, Farouk Elsadek, Mohamed Ahmed, Fawzy Farahat and Mosleh et al., 2021).

Karbon Noktalarının hidrofilik, düşük toksisite, kimyasal stabilite ve iyi biyoyumluluk gibi üstün biyolojik özellikleri, biyosensörler, ilaç dağıtımı ve biyogörüntüleme uygulamalarında iyi bir performans göstermesini sağlamaktadır (Mishra et al., 2018).

Karbon Nokta'lar, diğer kadmiyum bazlı KN'lar ve organik boyalarla karşılaştırıldığında yüksek sulu stabiliteye sahiptir (Singh et al., 2018).

Elektron bağışlayıcı ve alıcıları olarak karbon bazlı KN'ların olağanüstü elektronik özellikleri, elektrokimyasal ışıltama ve kemilüminesans'a neden olmaktadır, bu özellik KN'ları optronik, kataliz ve sensör kullanımında güçlendirmektedir (Pandey and Dahiya, 2016).

Karbon noktalarının kimyasal kararlılığı, diğer KN'larla (geleneksel veya metalik) karşılaştırıldığında çok yüksektir. (Singh et al., 2018)

Bununla birlikte, doku ve organlarda çok düşük konsantrasyonlarda birikmeleri nedeniyle kuantum noktalarının neden olduğu çekirdek toksisitesi, kuantum nokta uygulamalarını sınırlamaktadır.

Toksik olmayan ve biyoyumlu bir floresan nanopartikül arayışı, karbon (C), oksijen (O), hidrojen (H), sülfür (S) ve azot (N) 'dan oluşan KKN'ların keşfiyle sona ermiştir. Gelişmiş optik görüntüleme kalitesi ve ilaç verme verimliliğine ek olarak, karbon noktaları yalnızca hedef hücreleri etkiler, in vitro ve in vivo çalışmalar da az veya toksik olmayan etkiler göstermiştir. Karbon-noktaları toksik olmamasına rağmen, toksisiteleri PEG (PEGilasyon - polietilen glikol) ve amino asitler gibi biyoyumlu polimerler ile daha da azaltılabilmektedir (Mishra et al., 2018).

2.3.7.3. Dezavantajları

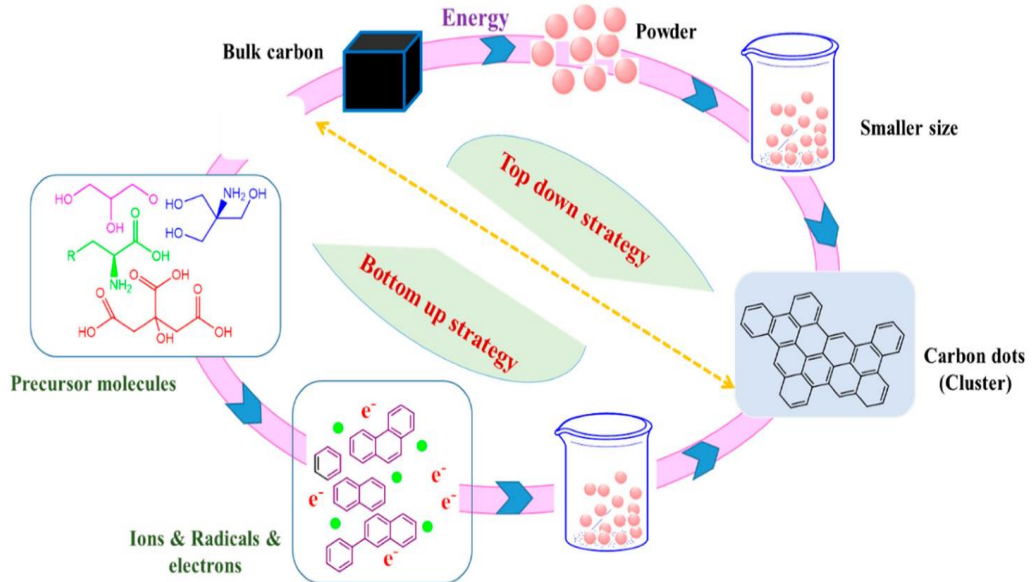
Organik materyal kullanılarak imal edilen KKN'lar sadece birkaç hafta stabil kalarak zayıf stabilite göstermektedirler. Bu nedenle, karbon noktalarının özelliklerini uzun vadede kontrol etmek zor olmaktadır.

Karbonizasyon ve piroliz gibi KKN üretmek için kullanılan imalat teknikleri, karmaşık moleküler yapılarla sonuçlanmakta ve nükleer manyetik rezonans (NMR) ve IR (Kızılötesi) spektroskopisi gibi karakterizasyon tekniklerini kullanarak yorumlamak zor olmaktadır (Mishra et al., 2018).

2.3.7.4. Üretim Teknikleri

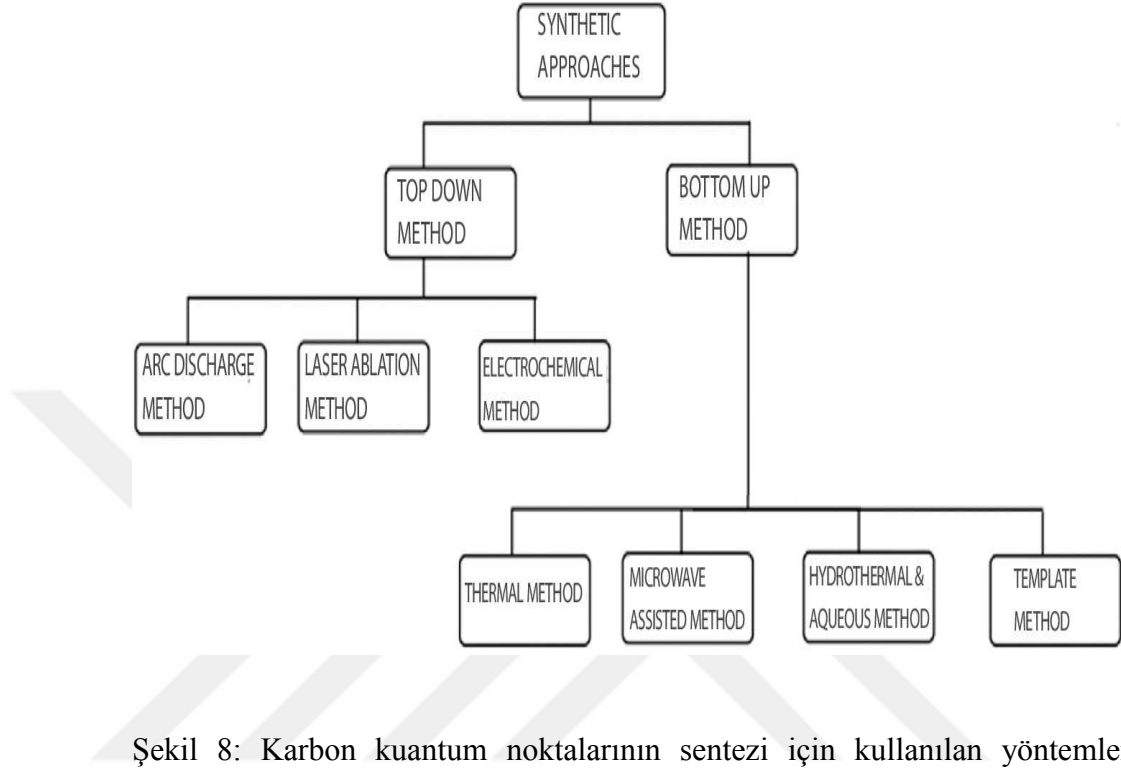
Tipik olarak, karbon noktalarının oluşumunda yaygın olarak Şekil 7 'de açıklandığı gibi “top-down” and “bottom-up” olmak üzere iki teknik kullanılmaktadır. “Top-Down” yönteminde, karbon noktaları, karbon malzemelerin grafen yapısını koruyan karbon fiber, grafen oksit veya fulleren malzemelerin lazer ablasyon/pasivasyon, kimyasal oksidasyon ve elektrokimyasal sentez gibi kimyasal ve fiziksel kesilme yaklaşımlarıyla üretilmektedir. Genel olarak grafen kuantum nokta'ları (GKN) ve KKN'ları hazırlamayı içerir. “Bottom-Up” yönteminde ise karbon noktaları, az miktarda karbon kaynağı gerektiren yanma, hidrotermal ve termal ve ultrasonik ışınlama yöntemleri ile karbon noktaları uygun moleküler öncülerden dönüştürülebilmektedir (El-Shabasy et al., 2021; Ai et al., 2021).

Bottom-up yöntemi Top-down yöntemine göre daha fazla tercih edilmektedir çünkü Top-down teknikte gerekli malzemelerin yüksek maliyeti, uzun süre ve zorlu koşullar gibi bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Ayrıca, Top-down yaklaşımlarla karbon noktalarının üretilmesi, genellikle yüzeyin işlevselleştirilmesi ve pasifleştirilmesi için ayrı bir adıma ihtiyaç duyulmaktadır, ancak ikinci yöntem olan bottom-up bunu gerektirmemektedir (El-Shabasy et al., 2021).



Şekil 7: Top-down ve Bottom-up yaklaşımlarla karbon noktalarının üretilmesi (El-Shabasy et al., 2021).

Şekil 8 ‘ de gösterildiği gibi KKN üretim tekniklerinin alt yöntemleri olan farklı sentez yaklaşımları gruplandırılmıştır. Ek olarak Tablo 1’ de KKN üretiminde kullanılan yöntemlerin özellikleri özet olarak açıklanmıştır.



Şekil 8: Karbon kuantum noktalarının sentezi için kullanılan yöntemler. (Singh et al., 2018)

Lazerle Aşıdırma Yöntemi (Laser Ablation Method)

Bu yöntemde, hedef karbonun lazer ışınlaması ile floresan karbon noktalarının sentezi gerçekleştirilmektedir.

2006 yılında Sun et al. gerçekleştirdiği, Q-switched Nd:YAG lazer ile buharlaştırılarak egzoz karışımı ve grafit tozu karışımından çıkan karbon kümeleri, taşıyıcı gaz olarak “900 °C ve 75 kPa”da su buharı taşıyan bir argon gazı akışında su soğutmalı bakır toplayıcı üzerinde birikmektedir. Biriken maddeler içerisinde karbon nano tüpler ve nanoparçacıklar bulunmaktadır. Elde edilen karbon nanopartiküllerinin yüzeyleri PEG1500N (polietilen glikol 1500) ve PPEI-EI (poli(propioniletilenimin- ko –etilenimin) gibi yüzey pasivasyon ajanları kullanılarak pasivize etmişlerdir ve bu nanopartiküllerin fotoluminesans özellik gösterdiğini görmüşlerdir.

Ark Boşaltma Yöntemi (Arc discharge method)

Bu yöntem Xu ve ark. tarafından 2004 yılında uygulanmıştır. Biri anot diğeri katot olarak hazırlanmış iki grafit çubuk arasında ark voltajı uygulanmıştır. Uygulanan akımla beraber anotta bulunan karbon buharlaşarak katotta birikmiştir. Daha sonrasında sodyum hidroksit (NaOH) ile oksidasyonu sonucu tek-duvarlı karbon nanotüpler (SWCNT) elde edilmiştir. Karbon nanopartikül yapılar ilk olarak ark boşaltma yöntemi ile üretilmiş olan tek duvarlı karbon nanotüplerin elektroforez ile saflaştırılması sırasında tesadüfen bulunmuştur. Ark Boşaltma Yöntemi gerçekleşmesi için bir ark reaktörü içerisinde genellikle helyum gazı ile “600mbar” dan yüksek bir basınç sağlanmalıdır.

Elektrokimyasal montaj (Electrochemical Method)

Kuantum nokta dizileri elektrokimyasal yöntemler ile kendiliğinden bir araya getirilebilmektedir. Bu teknik, karbon kaynağından bir dizi sıralı KKN üretilmesini içermektedir. Elektrolit-metal ara fazında iyonik bir reaksiyona neden olarak bir şablon oluşturulmakta; bu, kuantum noktaları da dahil olmak üzere nanoyapıların metal üzerine kendiliğinden birleşmesiyle sonuçlanmaktadır (stringfixer). Örnek olarak, 2007 yılında Zhou et al. üç elektrot kullanarak çok duvarlı karbon nanotüplerden karbon noktaları imal etmiştir. Bu üç elektrot sırası ile, çok duvarlı karbon nanotüplerden elde edilen bir çalışma elektrotu, bir karşı elektrot (platin tel) ve bir referans elektrot (Ag/AgClO₄) dur. Ayrıca destekleyici elektrolit çözeltisi olarak asetonitril içerisinde tetrabutilamonyum perklorat (TBAP; 0.1 M) kullanılmıştır. Reaksiyon sırasında elektrolit çözeltisi sarıdan koyu kahverengiye dönüşmüştür. Karbon noktalarından asetonitril izleri, buharlaştırılarak çıkarılmıştır. Bir başka çalışmada ise, 2014 yılında Yao ve arkadaşları elektrolizörün ortasına bir titanyum tüpün katodunu ve bir saf grafit halkasının bir anodunu yerleştirmiştir. Katot ve anodu ayırmak için yalıtılmış bir O-ring kullanılmıştır. Elektrolit ortamı için sterilize edilmiş su kullanılmıştır. Ultrasonik güç ve elektrolitik voltaj bir seferde uygulanmış ve saf 2-3 nm boyutunda mavi floresan karbon noktaları, herhangi bir saflaştırma olmaksızın hızla üretilmiştir.

Microwave Assisted Method

Mikrodalgalar, yaygın olarak 1 mm ile 1 m arasında değişen dalga boyları ile elektromanyetik dalgalar olarak kabul edilmektedir. Bilimsel araştırmalarda yardımcı bir teknik veya bir kimyasal sentez yöntemi olarak kullanılabilir. İnorganik

nanomalzeme üretimi için geliştirilen teknolojide, mikrodalga tabanlı yöntem önemli rol oynamaktadır. Geleneksel ısıtma yöntemlerinin aksine, mikrodalga işlemi yoğun, homojen ve verimli enerji sağlar ve böylece yüksek sıcaklığa ulaşabilir ve reaksiyonu son derece kısa bir süre içinde başlatabilmektedir. Bu yöntemde karbon kaynağı olarak genellikle çimen veya greyfurt kabuğu gibi yeşil hammaddeler kullanılmaktadır. Mikrodalga destekli strateji, Mikrodalga ışıması, KKN'ların oluşumu için tek tip ısı sağlayabilmesinden, uygun maliyetli ve KKN 'ları daha kısa sürede sentezleyebilmesinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır (Wang, Liu, Zhang and Lv, 2012; Pires, Santos, Sousa, De Paula and Cunha et al., 2015) .

Yapılan bir çalışmada, Mikrodalga destekli yöntem ile protein açısından zengin yumurta kabuğu zarlarından suda çözünür karbon noktalar elde edilmiştir (Wang et al., 2012). Başka bir çalışmada ham kaju sakızından mikrodalga destekli yöntem ile iki adımda (çözeltide kısmi depolimerizasyon ve katı halde karbonizasyon) karbon nokta üretimi gerçekleştirilmiştir.(Pires et al.,2015).

The Hydrothermal and Aqueous-Based Method

Hidrotermal sentezleme yönteminde, çeşitli teknikler kullanılarak bir sulu çözeltisi içerisindeki maddeler yüksek basınç altında kristalize edilmektedir. Kristal oluşumu, hammaddenin su içerisinde verildiği basınçlı ve çelikten yapılmış bir kap olan otoklav içinde gerçekleşmektedir. Cihaz içerisindeki örneğin konulacağı bölmenin karşılıklı iki ucu farklı sıcaklıklardadır. Bu sıcaklık farkı sayesinde sıcak tarafta hammadde çözülürken, soğuk tarafta kuantum nokta örneklerinin oluşması sağlanmaktadır. KKN 'ların üretilmesi için kullanılan hidrotermal strateji, düşük maliyetli ve toksik olmama gibi ve diğer yöntemlere kıyasla basit bir yaklaşım olmasından dolayı avantajlara sahiptir.

2010 yılında Pan ve arkadaşları hidrotermal yöntemi ilk kez kullanarak mavi floresan özellik gösteren KKN'ları elde etmişlerdir. Bir başka çalışmada, karbon açısından zengin olan şeker kamışı suyundan ortalama 3nm çapında floresan özellikte ve suda çözünen KKN üretimi yeşil sentez için bitki bazlı hidrotermal yöntem ile elde edilmiştir. Yeşil sentez yöntemi diğer adı ile biyolojik sentez; yüksek basınç, sıcaklık, enerji ve zehirli kimyasallar kullanılmadan nanoparçacıkların kolay ve çevre dostu olarak üretilmesi için kullanılan en pratik yöntemdir (Mehta, Jha and Kailasa, 2014).

Template Yöntem

Template yöntemi hazırlık koşulları yönünden hassas değildir, template malzeme aracılığıyla üretilen nanomalzemelerin parçacık boyutunu morfolojik özelliğini ve yapısını kontrol edilebildiğinden işlemesi ve uygulaması kolaylık sağlamaktadır. Template yöntemi kullanılarak nanomalzeme üretimi genellikle üç adımdan oluşmaktadır: İlk olarak, template hazırlanmaktadır. İkincisi, template işlevi altında hedef yapıyı sentezlemek için hidrotermal yöntem gibi bazı yaygın yöntemlerden biri kullanılmaktadır. Son olarak, üçüncü adımda ise template kaldırılarak nanomalzeme elde edilmektedir (Xie, Kocaefe, Chen and Kocaefe, 2016). Yang et al., template yöntemi kullanarak tek tip morfolojik fotoluminisans özellik gösteren KKN geliştirilmesini sağlayan bir yöntem bildirmiştir (Yang, Wu, Han, Hu and Liu, 2013).

Thermal Yöntem

Termal yöntem kararlı monodispers nanopartiküller sentezlemek için yenilikçi bir yöntemdir. Aynı zamanda monodispers metal nanoparçacıkları sentezlemenin en kolay ve en uygun yollarından biridir. Tipik olarak, termal yöntemleri, yüksek kaynama noktasına sahip olan oktadesen, oleik asit, kerosen, oktil eter, oleilamin, polietilen glikol gibi çözücüler ile 100-350 °C arasında sıcaklıklar ile çalışmaktadır. Bu koşullar altında, karbon bazlı ligandlar kolayca ayrışır ve metal oksit parçacıklarının homojen nükleasyonuna izin vermektedir (Palacios-Hernandez, Hirata-Flores, Contreras-Lopez, Mendoza-Sanchez and Valeriano-Arreola et al.,2012).

Tablo 1: KKN üretiminde kullanılan farklı sentetik yöntemlerin özellikleri (Singh et al., 2018)

S no	Synthetic methods	Size range	Quantum yield	Advantages	Disadvantages
1	Arc discharge method	---	-	Most attainable method	Harsh conditions, possess low QY and composite method
2	Laser ablation method	5 nm	QY ranges between 4%-10%	Effortlessness, effective technique, different sized nanoparticles can be prepared	Large amount of carbon matter is required, poor control over sizes, low QY
3	Electrochemical method	6-8 nm	QY ranges between 2.8%-8.9%	Stable method, extent of carbon dots can be managed by changing current density, water-soluble carbon dot can also be prepared	Complex method
4	Thermal route	2-6 nm	QY ranges between 0.1%-3%	Easy and straightforward method, have fluorescence property, appropriate method for particles (on milligram scale)	Low QY
5	Microwave-assisted method	4.51 nm	The PL QY and phosphorus containing QY ranges between 3.1%-6.3% and 21.65% respectively	Simple and convenient method, inexpensive and eco-friendly method	Poor control over sizes
6	Hydrothermal and aqueous-based method	-	-	Highly water-dispersible carbon dots can be prepared, inexpensive, non-toxic	Poor control over sizes
7	Template method	-	-	Carbon dots have biocompatibility and colloidal stability	Time-consuming and expensive method, have limited QY

QY: Quantum yield, PL: Photoluminescence

2.3.7.5. Kullanım Alanları

Karbon Noktaları, kolay hazırlanma, mükemmel suda çözünürlüğü, olağanüstü floresan özellikleri, düşük toksisitesi, ışıkla ağartmaya karşı ince dirençleri ve kolay yüzey işlevselleştirilmeleri nedeniyle ilaç dağıtımı, biyogörüntüleme ve biyosensörler gibi bir dizi uygulamada büyük ilgi görmektedir (Huang et al., 2017).

Karbon Noktaları, geleneksel ilaç taşıyıcılarının minimum gözlemlenebilirlik ve izlenebilirlik sorununun üstesinden gelmektedir. Floresan KKN'ları, modifiye

edilmiş fonksiyonel grupları, düşük sitotoksiteleri ve maksimum ilaç yükleme kapasiteleri nedeniyle ilaç taşıyıcı kısımlar olarak kullanılmaktadır (Mishra et al., 2018). KKN'ların yüzeyindeki çeşitli fonksiyonel gruplar, KKN'ların çeşitli antibiyotiklerle kolay konjugasyonunu sağlamıştır. Bugüne kadar, KKN'ların mikroorganizmaları öldürmek için modifiye edildiği geleneksel antibiyotiklerler sırası ile; siprofloksasin, ampisilin, penisilin vankomisin ve antiparaziter merhem dir. Arap sakızının mikrodalga yöntemiyle işlemi sonucu hazırlanan floresan özellikteki KKN'lar, geniş spektrumlu bir antibiyotik olan siprofloksasin hidroklorür salınımı için için bir taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Antibiyotik ile konjuge KKN'ların (Cipro@C-dots, siprofloksasin – KKN) fizyolojik koşullar altında kontrollü siprofloksasin salınımını sağlayarak, aşırı dozda antibiyotik kullanımının neden olduğu mikrobiyal direnç sorununa bir çözüm sunabilmektedir. Cipro@C-dots hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı gelişmiş antimikrobiyal aktivite sergilemiştir (Thakur, Pandey, Mewada, Patil and Khade et al, 2014).

Karbon kuantum noktaların kolayca sentezlenebilme ve iyi miktarlarda elde edilebilmesinden dolayı, bazı çalışmalar katalitik uygulamalarda kullanıldığını rapor etmiştir. Özellikle, benzersiz optik ve elektriksel özellikleri nedeniyle ve dış kabuk kısmında çok çeşitli fonksiyonel grupları kapsayabilme yeteneği sayesinde, KKN'lar üç ayrı katalitik uygulamalarda kullanılmıştır. Ana reaksiyon sınıfları: fotokataliz, asit-baz katalizi ve elektro kataliz dir (Testa et al, 2019). Nanokatalizör karbon nanopartiküller ile sabit kovalent bağ kuran katalizörün katı bir yüzey üzerine (heterojen kataliz) katalitik özellikleri arttığını gösteren çalışmalar vardır. Fotokatalizör, ışığın enerjisini absorbe ederek daha yüksek bir enerji düzeyine yol açmakta ve bu tür enerji spesifik reaksiyonda katalize edilen bir veya daha fazla substrata (reaktiflere) bırakmaktadır. KKN'ların ışığa duyarlılaştırıcı olarak kullanımı toksik olmama, stabilite ve sürdürülebilir özelliklerinden dolayı olduğu gözlenmiştir (Testa et al., 2019). KKN fotokataliz özelliğine örnek olarak, Reisner ve iş arkadaşları, nikel içeren bir katalizör ile KKN'ların fotokimyasal özelliklerini kullanarak, güneş ışığından yararlanarak ve sulu çözelti içerisinde hidrojen üretimi yapılmıştır.

Başka bir çalışmada, kırmızı fasulyeden hazırlanan karbon noktalarının birkaç kanser hücre hattının proliferasyonunu ve göçünü inhibe edip edemeyeceği ve geleneksel bir kemoterapi ilacı ile kombinasyon halinde uygulandığı zaman ilacın inhibitör etkisini teşvik edip edemeyeceği araştırılmıştır. Hücrel canlılık deneyinde, karbon noktalarının kanser hücresi canlılığını zamana ve doza bağlı bir şekilde

baskıladığı bulunmuştur. Karbon noktalarının en belirgin şekilde 5 mg/mL'lik bir konsantrasyon da hücre çoğalmasını engellediği gözlenmiştir. Yoğun olarak karaciğer kanseri hücrelerini, pankreas kanseri hücrelerini, intrahepatik kolanjiyokarsinom hücrelerini ve kolorektal adenokarsinom hücrelerinin çoğalmasını engellemiştir. Başka bir hücre canlılık deneyinde, karbon noktaları ve doksorubisin kombinasyonu kanser hücreleri üzerinde uygulandığı zaman, kombinasyonlu tedavi yöntemi karbon noktaları ve doksorubisin tek başına uygulandığı zamana göre kanser hücreleri üzerinde çok daha etkili inhibisyonla sonuçlanmıştır. Bu bulgular karbon noktalarının kanserlerin tedavisinde alternatif ve tamamlayıcı bir ilaç olabileceğini öne sürmektedir (Xia, Kawamura, Suehiro, Chen and Sato, 2019) .

KKN'lar, biyoyumlulukları, fotolüminesans ve toksik olmama nedeniyle ilaç ve gen taşıyıcıları olarak hareket etme konusunda güçlü bir yeteneğe sahiptir ayrıca çok küçük boyutlarda ve geniş yüzey alanına sahip olmaları, ilacın aktivitesi üzerinde çok az etki etmesi ile hızlı hücre alımı izin vermektedir. KKN 'ların bu özellikleri sayesinde, in vivo ve in vitro biyolojik sistemlerin görüntülenmesinde avantaj sağlamaktadır. KKN'lar teşhis yetenekleri ve terapötik özelliklere sahip olarak tanınması ile teranostik ajanlar için çekici adaylardır. Örnek olarak, amin grupları içeren karbon noktalarının yüzeyi bir antikanser ajanı ile konjuge edilerek çok işlevli bir teranostik ajan (KKN-Oxa) [oksidize edilmiş oxaliptatin, oxa (IV)-COOH geliştirilmiştir]. KKN-Oxa kombinasyonu ile Oxa'nın terapötik özellikleri ve karbon noktalarının optik özellikleri kullanılmıştır. Böylece, in vitro çalışmalar için biyoyumluluk, biyogörüntüleme özellikleri olan ve antikanser etkileri olan daha kuvvetli bir ajan meydana gelmiştir. İn vivo çalışma, ilacın dağılımı ve doz dağılımı floresan sinyali izlenerek takip edilmiştir. Bu sayede enjeksiyon süresine bağlı olarak ilaç dozunun belirlenmesine yardımcı olabilmektedir (Lim, Shen and Gao, 2015).

KKN'ların antimikrobiyal aktivitesi, mükemmel optik özellikleri, memeli hücrelerine düşük toksisitesi ve mikroorganizmalarla etkileşim yetenekleri nedeniyle son zamanlarda çok dikkat çekmiştir. KKN ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşim düzeyi, KKN'ların bileşimi, boyutu, şekli, ve yüzey kimyasının yanı sıra mikroorganizmaların yapısı ve yüzey kimyasına da bağlı olmaktadır (Lin, Bao and Wu, 2019). KKN'lar farklı virüslerle başarılı bir şekilde etkileşime girebilir ve enfeksiyonu geciktirebilmektedirler. Örneğin, amino grupları veya boronik asit ile bağlı olan KKN'larının herpes simpleks virüsü tip 1 hücrelerine girişi etkilenebilmektedir. Antiviral özellik gösteren 4-aminofenil boronik asit hidroklorür kullanılarak ve hidroter-

mal karbonizasyon yöntemi ile üretilen KKN'ları herpes simpleks virüsü tip 1'e karşı etkili olduğu gözlenmiştir. Etki mekanizması tam olarak anlaşılamamış karbon noktalarının virüs ve hücre reseptörleri arasındaki etkileşimler sırasında virüs enfeksiyonunun erken evresinde etki ettiği yorumlanmıştır (Barras, Pagneux, Sane, Wang and Boukherroub, 2016). Bazı çalışmalar KKN'ların, uzun zamandır dünyayı etkisi altına almış bir virüs çeşidi olan insan koronavirüs'e (HCoV-229E S) karşı da kullanılabileceğini belirtmiştir. Buna örnek bir çalışma da, 7 farklı KKN örneklerinin antiviral özelliği incelenmiştir. Mekanizması incelendiğinde, KKN'larının boronik asit fonksiyonlarının HCoV-229E S proteini ile psödolektin bazlı etkileşimi sonucu virüsü inhibe ettiği gözlenmiştir. Yan etki olarak bu ajanlar, kısa vadede hafıza kaybı, kafa karışıklığı, inhibisyon gibi birçok yan etki göstermiştir (Łoczechin, Séron, Barras, Giovanelli and Belouzard et al., 2019). KKN'lar *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* ve *Staphylococcus aureus* da dahil olmak üzere farklı bakteri türlerine karşı antimikrobiyal olarak kullanılmış ve bu mikropların görüntülenmesini sağlayarak bakteri türünün ve canlılığının belirlenmesini sağlayan çalışmalar bulunmaktadır. Pozitif yüzey yüküne sahip KKN'ların, negatif yüklü bakterilerle etkileşime girerek bakterileri yüzeyinin zarar görmesine ve sitoplazmik sızıntıya sebep olarak bakteri hücre ölümüne neden olmaktadır. Pozitif yüklü KKN'lar elde etmek, biyojenik poliaminler doğrudan öncül olarak kullanılmıştır (Lin et al., 2019) . Ayrıca, başlangıç materyali olarak doğrudan antibiyotikler kullanılarak hazırlanan KKN'ların, antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Örneğin, suda çözünebilen, toksik olmayan, yüksek oranda fotoluminesan özelliğine sahip hidrotermal yöntemle metronidazolden (zorunlu anaeroblara karşı geniş spektrumlu bir antibiyotiktir) hazırlanmış olan karbon noktalar, çok renkli görüntüleme kapasitesiyle beraber sadece anaeroblara karşı seçici antibakteriyel aktiviteye sahip özellik göstermiştir (Liu et al., 2010) .

KKN'larının biyomedikal uygulamalardaki yerinin anlaşılması, hücresel alım mekanizması ve hücre içi dağılım mekanizmasının anlaşılması için birçok araştırma yapılmaktadır. Bu araştırmalara örnek olarak, adenoid kistik karsinom (ACC-2) hücrelerinde hidrotermal yöntemle sentezlenen KKN'ların endositik yolu analiz edilmiş ve KN'ların floresan emisyon spektrumları, morfolojisi ve yapısal özellikleri değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, KKN'ları ACC-2 hücrelerinin hem sitoplazmasında hem de çekirdekte gözlemlenmiştir. KKN'larının hücresel alımı enerjiye bağlı olup bir endositoz çeşidi olan mikropinositoz yoluyla hücre içerisine alınmıştır. Fakat lizozom kombinasyonlu KKN'larının lizozomlarla taşınabileceğini

ortaya koymaktadır. Ayrıca, konfokal mikroskopi görüntülerinden, KKN'lerinin boyutu özelliklerini etkileyebilir ve hücre içi konumu belirleyebilmektedir.

Sonuç olarak, uygun yüzey kaplamasına sahip küçük nanoparçacıklar ilaç dağıtımı için büyük potansiyele sahip olabilir ve hücre çekirdeğine girebilecek nanopartiküller, klinik tedavi ihtiyacına göre kontrol edilmesi gereken gen terapisi gibi bazı uygulamalar için gerekli olabilmektedir (Wei, Jin, Kong, Zhang and Zhu, 2019).

2.3.7.6. Vücuttaki Dağılımı

KKN'ları düşük toksisiteye sahip olması ve yüksek floresans özellikleri kullanılarak biyoanaliz, biyogörüntüleme ve ilaç dağıtımı gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Vücut içerisine uygulanmasından dolayı, KKN'ların biyogüvenlik çalışmalarını dikkate alarak biyodağılım ve farmakokinetik özelliklerinin incelenmesi gerekmektedir.

KKN'ları genel olarak Subkutan (s.c.) ve intravenöz (i.v.) enjeksiyon yöntemleri ile uygulanmaktadır. Sistemik dolaşıma katıldıktan sonra hedef dokuyu belirleyerek ona bağlanmakta ve floresans özelliğini göstererek ışık yaymaktadırlar. Floresansın rengi KKN' sının boyutuna bağlıdır.

2009 yılında, Yang et al. Karbon-13 ve görüntüleme teknolojisini kullanarak karbon noktalarının biyolojik dağılım modelini araştıran ilk çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Farelerde yapılan bu çalışmada, Karbon noktalarının kan beyin bariyerini geçemediği, ancak tüm vücuda kolayca dağılabildiği bulunmuştur. Dalak, karaciğer ve böbrek gibi bazı organlarda orta düzeyde KKN birikim gözlenmiştir.

Başka bir çalışmada, KKN farmakokinetik analizi, iki bölmeli bir model kullanılarak yapılmıştır. KKN vücuttaki dağılımı ($t_{1/2}$), 0.1 saat ve klirens yarı ömrü 2.1 saat olarak gözlemlenmiştir. KKN genel olarak dalak, karaciğer ve böbrekte birikim göstermiş ve kan beyin bariyerini geçemeyerek beyinde tespit edilememiştir. KKN dağılım modeli Yang et al.'ninkine benzer olarak gözlenmiştir (Tao, Yang, Ma, Wan and Zhang et al., 2012).

Liu et al. farelerde yapmış olduğu çalışmada ise i.v. enjeksiyon ile uygulanan KKN'ların biyolojik dağılımı incelendiğinde, dalakta yüksek konsantrasyonlarda KKN fark edilmiştir (Liu, Yang, Chen and Wang, 2012).

Karbon kuantum noktalarının biyolojik dağılımı ile ilgili yapılan bir çalışmada ise, dalakta yüksek konsantrasyonlarda biriktiği gözlenmiştir (Xu, Jia, Yin, He and Zhang, 2014).

KKN 'ların uygulanma yolu ve yüzeyinin kaplandığı ajanlar, vücut içerisindeki dolaşımını ve hücre alımını etkileyen faktörlerdir. Parenteral yol ile uygulandıklarında KKN' lar vücuttan hızlı ve etkili bir şekilde atılmaktadır (Singh et al., 2018).

In vivo olarak PEG1500N tarafından pasifleştirilmiş floresan proba sahip KKN'ların dağılımları incelenmiştir. Subkutan enjeksiyonda, enjekte edilen KKN'ların difüzyonu floresansın izlenmesiyle gözlenmiş fakat floresan saçılım enjeksiyondan yaklaşık 24 saat sonra kaybolmuştur. İntradermal olarak enjekte edilen K-noktalarda, kol boyunca lenf damarlarından geçmiş ve enjeksiyondan 24 saat sonra toplanan lenf düğümlerinin görüntülenmesiyle aksiller lenf düğümlerinde biriktiği tespit edilmiştir. Çalışmada, intravenöz enjeksiyondan sonra ise karaciğerde ve dalakta az miktarda KKN'lar görülmüş ve büyük kısmı idrarla atılmıştır (Liu et al., 2012).

2.3.7.7. Görüntüleme Teknikleri ile Kullanım Alanları

Fosforesans ve flüoresans özellikler karbon noktalarda olması gereken fenomenlerdir ve bu özellikler in vivo ve in vitro biyoalgılama ve biyogörüntüleme de kullanımlarını artırmaktadır. Ayrıca ilaç dağıtımında, fotokatalitik reaksiyonlarda, fotodinamik ve fototermal terapilerde de kullanılabilir.

Hidrotermal yöntem ile şeker kamışı pekmezinden elde edilen KKN'ların flüoresans özelliğinin incelendiği bir çalışmada, X-ray fotoelektron spektroskopisi (XPS), Fourier dönüşümü Kızılötesi spektroskopisi (FTIR), NMR ve termogravimetrik analiz (TGA) yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiştir. KKN'ların floresan özelliği, değişen pH'lar, sodyum klorür (NaCl), amino asitler ve metal iyonları içeren çeşitli ortamlarda değerlendirilmiştir. Ayrıca çalışmada KKN'ların hücre görüntüleme ve Fe³⁺ ve gün batımı sarısı boya maddesini tespit edip edemeyeceği araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, KKN'ların, yaklaşık 1.9 nm çapında küresel bir şekil sergilemiş ve yaklaşık % 5.8'lik bir kuantum verimi ile mavi fotoluminesans yaymıştır. KKN'ları, Ph değeri 6 ila 12 aralığında daha fazla stabilize ve NaCl çözeltisine olağanüstü tolerans sergilemiştir.

Amino asitlerde ve birkaç metal iyonu çözeltisinde belirgin bir floresan yoğunluğu değişikliği meydana gelmemiştir. KKN'ları hem in vitro hem de in vivo olarak değerlendirilmiş ve MCF-7 hücreleri, kırmızı kan hücreleri, BSA ve ana organlarla mükemmel biyouyumluluk göstermiştir. Dahası, KKN'ları dalga boyuna bağlı bir karakteristik özellik göstererek MCF-7 hücrelerinde mavi, yeşil ve kırmızı floresan yaymıştır. Öte yandan KKN'ları, zayıf etkileşim nedeniyle Fe^{3+} ve gün batımı sarısını tespit etmek için ekstra hassas olamamıştır (Huang et al., 2017).

Sun et al., 2006 yılında KKN'larının fotoluminisans özelliğini incelediği çalışmada ise, suda çözünür polimerlerle kaplanarak fizyolojik ortamlarla uyumlu olan silikon nanopartiküller, hücrelerin lüminesans etiketlemesi için incelenmiştir. Burada kuantum büyüklüğündeki karbon analogları hakkında yeni bir bulgu rapor edilmiştir, basit yüzey pasivasyonu üzerindeki nano ölçekli karbon parçacıklarının, spektral özellikleri ve yüzey oksitlenmiş silikon nanokristallerinkiyle karşılaştırılabilir özellikleri ile hem çözelti hem de katı halde güçlü bir şekilde fotoluminesans özelliklere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Lazer ablasyon yöntemi ile üretilen KKN örnekleri Elektron mikroskopunda analiz edilmiş ve numuneden ve sulu süspansiyonundan herhangi bir fotoluminesans özellik saptanmamıştır. Daha sonra numune sulu bir nitrik asit içinde (2.6 M'ye kadar) 12 saate kadar muamele edilmiştir. Muamele edilen numune hala saptanabilir fotoluminesans özellik göstermemiştir. Bununla birlikte, asitle muamele edilmiş karbon parçacıklarına basit organik türler eklenerek üretilmiş yüzey pasivasyon ajanı uygulandığında parlak lüminesans emisyonlar gözlenmiştir. Organik ve polimerik pasivasyon ajanlarının (PEG1500N ve PPEI-EI) görünür veya UV'ye yakın kromofor içermediği ve bu nedenle görünür dalga boylarında açıkça yayıcı olmadığı belirtilmiştir. Gözlenen parlak ve renkli lüminesans emisyonları, yüzey pasifleştirilmiş karbon noktalarından kaynaklanmaktadır. Karbon noktalarının fotoluminesans spektrumları genellikle geniştir ve silikon muadillerinde olduğu gibi, sadece numunedeki farklı boyutlardaki parçacıkların etkilerini değil, aynı zamanda her bir pasifleştirilmiş karbon noktasındaki farklı emisyon bölgelerinin dağılımını da yansıtabilen uyarma dalga boylarına bağlı olmaktadır. Parçacık yüzey pasivasyonuna hakim olan parametreleri ve daha parlak fotoluminesanstaki karbon noktaları için ortaya çıkan özellikleri anlamak ve daha iyi kontrol etmek için daha fazla çaba gerekmektedir. Mekanik olarak, karbon noktalarından gelen fotoluminesans, yüzey pasivasyonunun bir sonucu olarak stabilizasyon üzerine yayıcı hale gelen yüzey enerjisi tuzaklarının

varlığına bağlanabilmektedir. Bununla birlikte, burada bildirilen fotolüminesan karbon noktaları için, parçacık yüzeyine yayıcı enerji tuzaklarının kuantum hapsedilmesi, yani parçacığın yüzey pasivasyonundaki parçacığın güçlü fotolüminesans göstermesi için bir parçacıkta büyük bir yüzey-hacim oranının gerekli olması gerekmektedir.

Karbon Kuantum Nokta'lar için iki sınıf floresan emisyon mekanizması önerilmiştir, ancak floresan emisyonlarının kökenleri tartışmalıdır ve floresan emisyonlarının mekanizmalarının daha net anlaşılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Birinci sınıf floresan emisyon mekanizması, konjuge p-alanlarının neden olduğu bant genişliği geçişleridir, ikinci sınıf ise KKN'lerdeki yüzey kusurlarıyla ilişkili daha karmaşık nedenleri içermektedir. KKN'larda bulunan karbonil ile ilişkili lokalize elektronik durumlar gibi diğer işlevselleştirilmiş yüzey kusurları, görünür ışık spektrumunun mavi ve yeşil bölgelerinde yoğunlaşan çok renkli emisyonlarına katkıda bulunmaktadır. Bu yüzey kusurları, farklı uyarma ve emisyon özelliklerine sahip çoklu yüzey kusurlarının varlığı nedeniyle çok renkli emisyonlar sergileyen, katı konakçılara ayrı ayrı dahil edilen aromatik moleküller gibi davranmaktadır. KKN'ların benzersiz özelliklerinden biri, ayarlanabilir floresans emisyonlarıdır. Genel olarak, KKN'lar herhangi bir yüzey pasivasyonu olmadan ayarlanabilir emisyonlara sahiptir, ancak radyasyon rekombinasyonunun azalmasına neden olan dengesiz yüzey kusurları nedeniyle genellikle çok düşük kuantum verimlerine sahip olmaktadır. Yüzey pasivasyonu üzerinde PEI-EI gibi organik veya polimerik malzemelerle KKN yüzeyine bağlanarak, yüzey kusurları dengelenmektedir ve hem çözelti benzeri süspansiyonda hemde katı formunda güçlü floresan emisyonlar tespit edilmiştir (Lim et al., 2015).

Düşük toksisiteleri, suda çözünürlükleri, yüksek fotostabiliteleri ve üstün kimyasal stabiliteleri nedeniyle kimyasal algılama için KKN'lar kullanılmıştır. KKN'ların sulu çözeltilerde ve canlı hücrelerde cıva (Hg_2^+) 'nın saptandığı bir çalışmada, hem KKN çözeltisinde hemde sol-jelde immobilize edilmiş KKN'ların floresan emisyonları Hg_2 algılanmasına duyarlılık göstermiştir (Gonçalves, Duarte and Esteves da Silva, 2010) .

Farklı özelliklere sahip karbon kuantum noktaları kullanılarak HuV7 hücre hatlarında hücre sel biyo görüntüleme deneyi yapılmış ve sonucunda, hidrotermal yöntemle sitrik asit ve etilendiamin kullanılarak üretilen karbon kuantum nokta sitop-

lazmada homojen olarak dağılmış ve yeşil floresan yaymıştır (Nekoueian, Amiri, Sillanpää, Marken and Boukherroub et al., 2019).

2.3.7.8. Toksik Etkisi

Karbon, vücut yapısını oluşturan birkaç temel elementten biridir. Karbon bazı malzemelerin her zaman kimyasal olarak inert olması beklenmektedir ve zorlu bir ortam olsa bile bir toksik parça salmaması gerekmektedir (Liu et al., 2012). Karbon genellikle toksik bir element olarak kabul edilmemiştir, kadmiyum ve yukarıda tartışılan diğer ağır metallerle hemen hemen aynı kategoride değildir. Bununla birlikte, KKN'lerde bulunan belirli malzeme konfigürasyonları ve yapıları nedeni ile ayrıca fullerenler ve karbon nanotüpler ile yapılan çalışmalar sonucunda açığa çıkan toksik etkiler sebebiyle KKN'ların in vitro ve in vivo biyouyumlulukları ile ilgili endişeler bulunmaktadır (Yang, Wang, Wang, Lu and Luo et al., 2009).

Farelerde KKN'lar kullanılarak yapılan in vivo toksisite çalışma sonucunda, farelere intravenöz yoluyla KKN enjekte edilmiş ve dört hafta sonra test edilmiştir. Testin sonucunda organlarının ve iç fonksiyonlarının pek etkilenmediği sonucuna varılmıştır (Lim et al., 2015). Düşük sitotoksikite seviyesi, KKN'ların in vivo çalışmalar için kullanılmasına izin vermektedir.

Karbon Kuantum Nokta'ların sitotoksikitesi in vitro çalışmalar da hücre canlılığını ve büyümesini etkileyen bir etkidir. KKN'larının sitotoksik özelliğini belirleyen bir dizi faktör vardır ve bu faktörler, kaplama malzemeleri, renk, kullanılan KKN dozu, yüzey kimyası, kaplanan malzemenin biyoaktivitesi dir (Hardman., 2006). Buna örnek olarak, yüzey pasifleştirilmiş KKN'ların sitotoksikitesin de incelendiği ve toksik etkisinin pasivasyon ajanlarınıninki ile karşılaştırıldığı çalışmada, PEG1500N tarafından pasifleştirilmiş KKN'ların MTT ve tripan mavisi testleri kullanılarak MCF-7 ve HT-29 hücrelerinin işlevleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, her iki hücre için de hücre çoğalması, canlılık ve ölüm oranlarının karbon noktalarından ve PEG1500N pasifleştirilmiş karbon noktalarından biraz etkilendiği gözlenmiştir. Ancak, PPEI-EI pasifleştirilmiş karbon noktalar, aynı konsantrasyonda PPEI-EI'den daha sitotoksik bulunmuştur. Öte yandan karbon noktaların 0.4 mg/mL dozuna kadar hem MCF-7 hem de insan kolorektal adenokarsinom HT-29 hücre modelleri üzerinde önemli toksik etkileri gözlenmemiştir (Liu, Anilkumar, Cao, Wang

and Yang et al., 2010). Benzer bir çalışmada farklı yöntemler ile üretilen KKN örneklerinin sitotoksitesi incelenmiş ve çalışmanın sonucunda, karbon noktalarındaki sitotoksiste sorunları hakkında bazı yeni bilgiler sunmaktadır. Nano ölçekli yapıları ve konfigürasyonları bakımından karbon noktalarının yapısal olarak sitotoksik olmadığı, gözlemlenen herhangi bir sitotoksitenin yalnızca veya esas olarak yüzey pasivasyon moleküllerine bağlı olduğu doğrulanmıştır. Bu moleküller için, sitotoksiteleri, parçacık yüzeyinde işlevselleştirilmeye kıyasla serbest olduğu zaman ile büyük ölçüde benzerdir. Bu nedenle, canlı hücrelerle kullanım için hedeflenen karbon noktaları için yüzey pasivasyon ajanlarının seçiminde sitotoksiste değerlendirmesi, serbest ajanların sitotoksiste profillerine bakılarak kolayca gerçekleştirilebilmektedir. Yukarıda sunulan sonuçlara göre, yüksek konsantrasyonlarda bile düşük sitotoksitete sahip yüzey pasivasyon molekülleri, canlı hücre görüntülemeye kullanıma uygun benzer veya düşük sitotoksitete sahip karbon noktaları için mevcuttur. Daha sitotoksik olan moleküller için bile, konsantrasyonları yeterince düşük tutulursa ve / veya inkübasyon süresi yeterince kısaysa, karşılık gelen karbon noktaları hala canlı hücrelerle kullanılabilir. Bu nedenle, karbon noktalarının canlı hücrelerin optik görüntülenmesi için umut verici floresan ajanlar olduğu sonucuna varmak makul görünmektedir (Wang et al., 2011).

Karbon Nokta'ların in vivo toksisitesinin değerlendirilmesi için CD-1 farelerinin kullanıldığı çalışmada ise, K-noktalarına maruz kalan farelerde iki önemli hepatik gösterge olan alanin amino transferaz (ALT) ve AST (Aspartat transaminaz) ve üç önemli böbrek göstergesi olan; ürik asit, kan üre nitrojen ve kreatinin değerleri incelenmiştir. Histopatolojik analizler sonucunda, farelerin karaciğer, dalak ve böbrekler fonksiyonlarının normal işlediği gözlenmiştir (Yang et al., 2009). Karbon noktalarının sitotoksitesinin yüzey pasivasyon moleküllerinin seçimine bağlı olduğunu göstermiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda daha belirgin sitotoksiste göstermiştir.

2.4. Başışıklık Sistemi

Başışıklık sistemi, yabancı ve zararlı olan her bir maddeyi (Mikroorganizma, protein ve polisakkarid v.b.) tanıyarak bu maddelerin yok edilmesi için organizmanın gerçekleştirmiş olduğu reaksiyonların genel adıdır.

Başışıklık sistemi, canlının herhangi bir enfeksiyondan veya hastalıklardan korunmasını sağlar bunu da vücuda giren maddelerin immün sistem hücreleri tarafından tek tek incelenmesi sonucu zararlı olan maddeler için oluşturulan bir savunma reaksiyonu sonucu gerçekleştirmektedir. Oluşan bu savunma mekanizması immün yanıt olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca başışıklık hücrelerinin bu savunma mekanizması sayesinde canlı da oluşabilecek metabolik hastalıkların ilerlemesinin önüne geçmektedir. İmmün yanıt süreci boyunca “hastalık” devam eder ve bu süre; vücutun direncine ve mikroorganizmanın yapısına göre değişmektedir.

İmmün yanıt oluşturan maddeler antijen yada immünojen olarak adlandırılabilir. İmmünojen, başışıklık sisteminin immün yanıt oluşturmasını tetikleyen ve sonunda vücutun başışıklık kazandırdığı herhangi bir maddeye verilen addır. Antijen ise, spesifik immüniten ürünleri ile bağlanabilme özelliğine sahip olan moleküllerdir. Antijenin yapısında bulunarak özgülüğünü belirleyen ve kendisine özgül olan antikorlar ile birleşmesini sağlayan kimyasal grup/gruplara epitop/epitoplar adı verilir. Bir antijen molekülünün birden fazla epitopu bulunmaktadır. Antijenlerin her zaman immün yanıt oluşturması beklenmez.

Başışıklık Sisteminin özellikleri genel olarak (Düzgün, 2014);

Spesifite: Spesifik antijen ile tanışmamış bir konakçada, her bir antijeni tanıyıp bir yanıt oluşturabilecek, antijen spesifik lenfosit klonları bulunmaktadır. Yabancı bir antijen vücuda girdiği zaman kendine özgül yüzey reseptörünü taşıyan lenfosit klonunu bulmakta ve aktive olmaktadır. Vücut aynı antijen ile tekrar karşılaştığında ise önceki karşılaşmada gerçekleşen immünizasyon sonucu, antijen spesifik lenfositlerin klonal olarak genişlemesi ile immün yanıt daha erken ve daha kuvvetli gelişmektedir.

Çeşitlilik: Memelilerde immün sistemin ortalama 109 farklı antijeni tanıma kapasitesi bulunduğu düşünülmektedir. Bu özellik “Lenfosit Repertuarı” olarak bilinir. Bir klondaki lenfositlerin antijeni tanıyan reseptörleri aynıdır. Her lenfosit klonunun antijen reseptöründe antijen bağlanma yerinin farklı olması repertuarın ne

kadar geniş olabileceğini göstermektedir. Bu da bir klonun birden fazla antijene bağlanabileceğini göstermektedir.

Hafıza: Bağışıklık sistemin bir antijenle tekrar karşılaşmasında daha kuvvetli ve hızlı immün yanıtın sağlanmasını immünolojik bellek veya immünolojik hafıza sağlamaktadır. Antijene her maruziyet o antijen için spesifik olan klonun veya klonların artmasına yol açmaktadır. Antijenik uyarı ile oluşan bellek hücreleri ise uzun ömürlüdür.

Otoregülasyon: Antijenik uyarıyı takiben normal immün yanıtın kendi kendini sınırlaması gerekmektedir. İmmün yanıtın asıl amacı canlı sistem için zararlı olanı yok etmektir. Amacına ulaştığında ise antijen kaynaklı uyarı yok olacağından immün yanıt tamamlanmaktadır.

Kendini (self'i) yabancı olandan ayırt etme: Bağışıklık sistemi kendinden olan antijenleri yabancı olanlardan ayırt etme özelliğini lenfositlerin gelişme sürecinde primer lenfoid organlarda kazanmaktadır. Kendine ait yapılara karşı immün yanıt vermemelidir ve buna self tolerans veya immün tolerans denir. Self toleransın bozulması ile otoimmün hastalıklar gelişebilmektedir.

İmmün yanıtın oluşmasına yardımcı olan savunma sistemi, birbirine bağlı olan iki ana gruptan oluşmaktadır. Bunlar, Doğal (innate) ve edinsel (adaptif) immünitedir.

2.4.1. Doğal Bağışıklık Sistemi

Doğal bağışıklık sistemi (doğal direnç); insan vücudunda enfeksiyona veya inflamasyona sebep olan mikropları vücuda ilk girdiği anda tanıyan ve bu mikropları yok etmek için mücadele veren doğumdan itibaren canlıda doğal olarak hazır bulunan immün sistemdir.

Doğal bağışıklık sistemi hücreleri ve organları başlıca, deri, solunum sistemi ve sindirim sistemi, doğal öldürücü hücreler (NK hücresi), fagositik hücreler, protein yapıdaki sıvısal ürünler (kompleman sistemi, sitokinler) den oluşmaktadır. Bu sistemler mikroorganizma ile karşılaştığı zaman hemen savunmaya geçmektedir. Ortaya çıkan immün yanıt ilgili mikrop'a karşı spesifik değildir ve hafızası yoktur. Doğal bağışıklık elemanları, canlının maruz kalacağı tehditlere karşı ilk adım olarak

savunma ve sonrasında meydana gelecek olan immün yanıtı yönlendirme görevine sahip olmaktadır (Velipaşaoğlu, 2020).

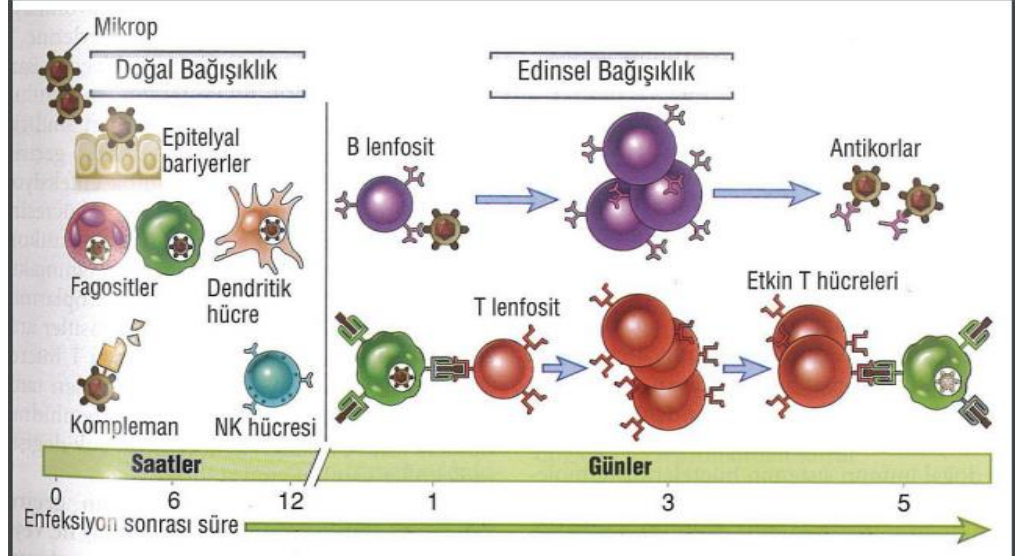
Doğal bağışıklığın mekanizması, konak hücrenin sahip olmadığı ve farklı mikroorganizmaların sahip olduğu ortak yapıları, az çeşitte reseptörlerle belirleyerek konak ve hedef hücreyi ayırt edip o esnada müdahale etmektir (Aksoy., 2013).

Doğal yanıtlar aynı zamanda edinsel yanıtın oluşmasını sağlar ve yanıtın yönlendirilmesine yardımcı olmaktadır. Bu köprü görevini gören iki temel öge vardır: MHC sınıf II (Majör histokompatibilite kompleksi) ile ilişkili olarak antijen sunumu yapabilen hücreler (özellikle dendritik hücreler (DC)) ve sitokin grubu moleküllerdir (Romo ve ark., 2016).

2.4.2. Edinsel Bağışıklık Sistemi

Edinsel bağışıklık sistemi (kazanılmış direnç); canlı için zararlı olan bir mikrop ile karşılaştıktan sonra günlerce süren bir hazırlık süreci sonucunda hareket etmektedir. İlgili mikrop'a karşı spesifiktir ve hafızaya sahiptir. Bu özellikleri sayesinde vücut aynı mikrop ile tekrar karşılaştığında immün sistem daha hızlı ve daha güçlü yanıt verme becerisi kazanmış olmaktadır. Edinsel bağışıklık sistemi hücreleri başlıca T ve B lenfositleri oluşturmaktadır (Velipaşaoğlu, 2020).

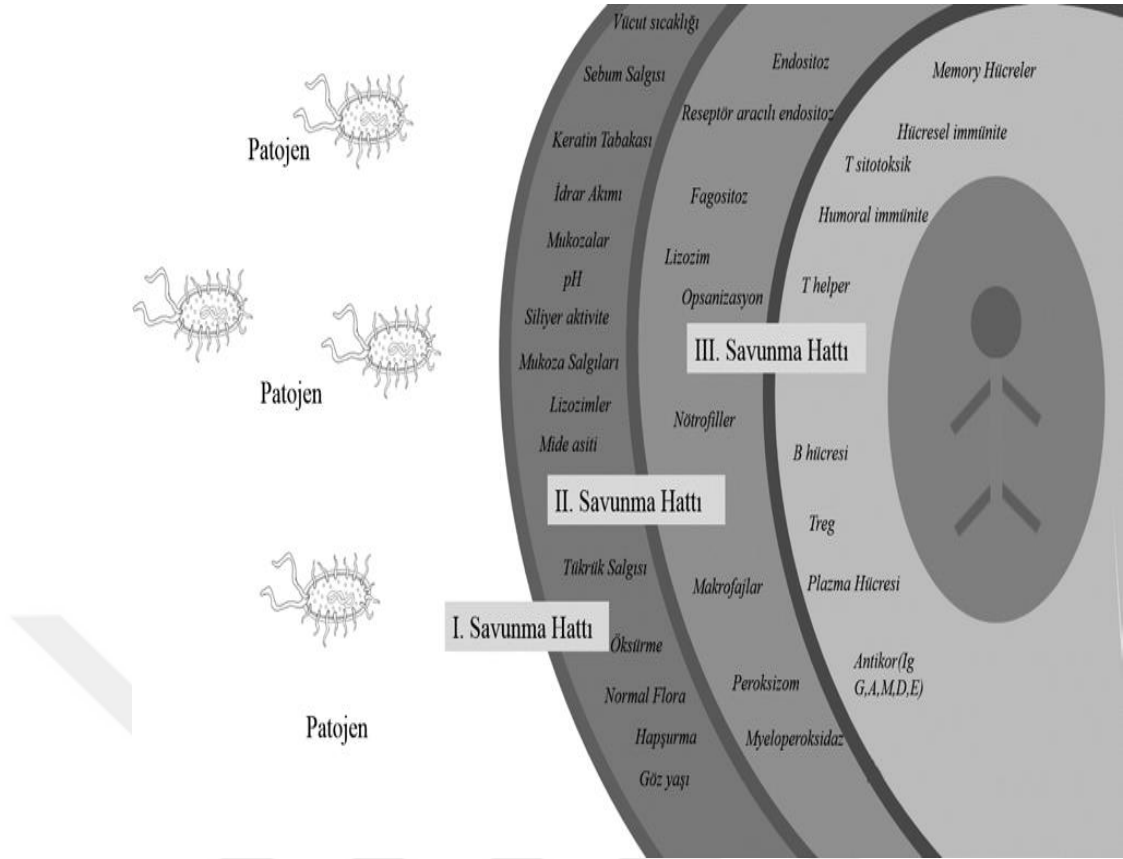
Edinsel bağışıklık aktif veya pasif olarak gelişebilmektedir. Aşı yapılması veya enfeksiyon geçirilmesi gibi yollarla oluşan immün yanıtı aktif bir bağışıklık cevabı iken, edinsel olarak bağışıklık kazanmış olan bir kişiden alınan serum ya da hücrelerin bağışıklığı olmayan birine hazır halde verilmesi ile de bir pasif immün yanıt sağlanmaktadır.



Şekil 9: Bağışıklık Sistemi elemanları (www.kocaelialerji.com.tr, Erişim tarihi: 26 Ocak 2022).

Doğal ve Edinsel Bağışıklık Sisteminin gerçekleştirmiş olduğu bir savunma sisteminde, enfeksiyonun şiddeti ve mortalite gücü zararlı mikroorganizmanın virülansı ile doğru orantılı iken bağışıklık sisteminin gücü ile ters orantılıdır. Bu faktörlerin birbirleri üzerinde olan güç farklılıklarının kıyaslanması sonucunda ise enfeksiyonun şiddeti belirlenmektedir. Patojen bir mikroorganizmanın vücuda girdikten sonra izlediği yol sırasıyla şöyledir (Şekil 10);

Patojen ilk olarak doğal bağışıklık sisteminin bariyerleri ile karşılaşmaktadır. Bu bariyerleri aştıktan sonra doku içerisine giren patojen, doku da bulunan mononükleer fagositik sistem üyesi olan doku makrofajları ve dendritik hücreler maruz kalmaktadır. İlerleyen zaman da kazanılmış bağışıklık yanıt ile karşılaşan patojen, bu sistemlerden kaçabilme yeteneğine (virülans faktörleri ile) sahip ise insan vücudunu istediği gibi enfekte etmeyi başarmaktadır (Çetin, Güven, Tunçbilek, Develi ve Aykutluğ, ve ark., 2015).



Şekil 10: Patojen bir mikroorganizmaya karşı vücudun savunma hattı (Çetin ve ark., 2015).

2.4.3. Doğal ve Edinsel Bağışıklık Sisteminin Alt Dalları

Doğal ve Edinsel Bağışıklık Sistemleri “hümorale” ve “hücrel” olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Bu alt gruplar doğal ve edinsel bağışıklığın özelliklerinin anlatıldığı Tablo 2 de açıklanmıştır. Hücrel bağışıklık etkeninin ana hedefi yabancı hücre ile beraber kendinden olan hücreyi de (konak) (enfekte hücrenin ya da tümör yok edilmesi gibi) ortadan kaldırmaktır. Hümorale bağışıklık etkeni ise antikor’dan yardım alarak zararlı olanı ortadan kaldırmaktır. Her iki mekanizma beraber çalışarak bağışıklık yanıtını oluşturur ve homeostaza dönüşü sağlamaktadır.

Bağışıklık sistemi ilk olarak kendinden olmayan sinyalleri – maddeleri tanımaktadır ve problem varsa bunu yok etmek için bağışıklık yanıtını oluşturmaktadır ve yeterli bir bağışıklık yanıtını aktif hale getiremez ise enfeksiyon gibi sonuçlar oluşmaktadır.

Öte yandan, eğer bağışıklık sistemi ve yanıtı gerçekte bir tehdit – problem olmadan devreye girer ya da aktive olursa alerjik reaksiyonlar ve otoimmün hastalık gibi farklı ve ciddi sorunlar ortaya çıkmaktadır.

Tablo 2: Doğal ve Edinsel Bağışıklık Sistemlerinin temel özellikleri (Aksoy., 2013).

Tablo 1. Doğal ve kazanılmış bağışık yanıt arasındaki temel farklılıklar		
	Doğal bağışıklık	Kazanılmış bağışıklık
Hücresel elemanlar	Hematopoetik hücreler: makrofaj, dendritik hücre, mast hücre, nötrofil, eozinofil, NK hücre Non-hematopoetik hücreler: epitel hücreleri (deri, havayolu, barsak)	Hematopoetik hücreler: T ve B lenfositler
Humoral elemanlar	Kompleman proteinleri, LPS bağlayıcı protein, C-reaktif protein ve diğer akut faz reaktanları, antimikrobiyal peptidler, mannoz bağlayıcı lektin	B hücrelerin sentezlediği antikorlar
Özgüllük	Mikroorganizmalar tarafından paylaşılan ortak yapılar (moleküler biçimler) - Lipopolisakkaritler - Mannoz - dsRNA - CpG nükleotidleri	Mikrobiyal yapıların yapısal detayı (Antijenler), Nonmikrobiyal antijenleri de tanıyabilir
Reseptörler	Kalıtılabilir germline kodlama Sınırlı farklılık Biçim tanıma reseptörleri - N-formil metionil reseptör - Mannoz reseptörü - Integrinler (Mac-1) - Çöpçü reseptörleri	Gen kısımlarının rastgele somatik rekombinasyonu ile oluşan farklı genler tarafından kodlama Sınırsız farklılık
Reseptörlerin dağılımı	Non-klonal	Klonal
Reseptörlerin tipi	Aktive edici: TLR, NLR, kompleman Durdurucu: KIR	B ve T hücre reseptörleri
Yanıt	Ani (dakikalar) Kısa süreli Özgün değil Tekrar karşılaşmada benzer Hafızası yok	Gecikmiş (saatler – günler) Daha uzun süreli Özgün Tekrar karşılaşmada çok daha etkili Hafızası var
Öz olan ve olmayanın ayrımı	Evet Reseptörlerin ligandları konak hücrede bulunmaz	Evet Kendine reaksiyon veren lenfositlerin seçimi, Hatalı olursa otoimmünite gelişir.

2.4.3.1. Doğal Bağışıklık Sistemi Humoral- Hücresel Bağışıklık Sistemi

Doğal bağışıklık sisteminde önemli rol oynayan kompleman sistemi, dolaşımda ve hücre membranlarında yerleşmiş en az 20 glikoproteinden oluşmaktadır ve mikroplara ve/veya antikor aracılı doku hasarına karşı vücudu koruyan önemli bir sistemdir. Bu sistemdeki proteinlerin pek çoğu birer proteolitik enzimlerdir ve sistemin harekete geçmesi bu enzimlerin birbiri ardından aktive olmasını sağlamaktadır. Proteinlerin birbiri ardından parçalanması sonucu kompleman sistemi aktive olur ve çeşitli şekillerde mikropları elimine eden efektör moleküllerin oluşmasını sağlamak-

tadır. Bu sisteminin aktivasyonu konak hücreleri tarafından sıkı bir denetim altında tutulmaktadır. Başlıca karaciğerden üretilmektedirler. Bu enzimatik reaksiyon üç farklı yolak tarafından başlatılabilmektedir: Klasik yolak (antijen–antikor kompleksleri), alternatif yolak (mikrobiyal hücre duvarı kaynaklı polisakkaritlerle uyarılıma) ve yeni tanımlanmış lektin yolağı (mikrobiyal karbonhidratlarla mannoz –bağlayan proteinlerin etkileşimi sonucu aktikleşme) dir . Antikor ile başlatılması gereken klasik yolağının aksine alternatif ve lektin bağımlı yolaklar mikrobiyal yüzeyler ile temas sonucu aktive olmaktadır (Abbas ve Lichtman., 2007) . Kompleman proteinlere örnek olarak, antimikrobiyal peptidler (AMP) ana hatları ile 10-50 aminoasit içerikli, pozitif yüklü ve amfifatik (hem hidrofilik hem de hidrofobik yüzeylere sahip) özelliklere sahip bitkiler ve omurgasız pek çok canlı mikroorganizmaların kendilerini korumak amaçlı ürettikleri bir yapıdır. Bu proteinlerin antimikrobiyal etki mekanizması, mikrobun yüzeyine bağlanarak zarlarında gözenekler açması sonucu mikrobiyal öldürme yapabilme kabiliyetlerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Epidermisi de kapsayan insan epitel dokuları buna benzer antimikrobiyal peptidleri üretmektedir (Goldsmith, Katz, Gilchrest, Paller, Leffell et al., 2012).

Makrofaj hücresi, Kemik iliğinde üretildikten sonra kan dolaşımına geçen, dokuya geçtiğinde makrofaj adını alan bir monosit hücresidir. Zararlı patojenler tüm bariyerleri geçip doku içerisine veya dolaşıma ulaştığı zaman bunları ortadan kaldıracabilecek çeşitli savunma hücreleri rol oynamaktadır. Mikroorganizmalar, bunların komponentleri ve artıkları fagositer hücreler tarafından alınır ve lizozomal enzimler yardımı ile temel yapıtaşlarına parçalanır veya antijenik peptit sunum yolakları tetiklenmektedir. Makrofajlar “mononükleer-fagositik sistem”i oluştururlar. Makrofajlar potent bir fagositöz kapasitesi ve yüksek lizozomal enzim kapasitesine sahiptir. Makrofajlar vücuda giren mikrobun etrafında toplanarak ve yapancı olduğunu algıladıktan sonra yutup salgıladıkları enzimler ile parçalayıp yok etmektedir. Her organismamızda bulunan benzer yapıdaki doku makrofajları da aynı görevi yapmaktadır (Rosales and Uribe-Querol., 2017).

Nötrofiller, lökosit grupları içerisinde kanda en çok bulunan hücrelerdir. Fagositöz özellikleri sayesinde, fagozite ettikleri mikropları sahip oldukları lizozim, laktoferrin, hidrolaz, miyeloperoksidaz gibi enzimleri kullanarak parçalama veya öldürme işlemini gerçekleştirmektedirler (Düzgün, 2014).

Doğal Öldürücü (NK) hücreler büyük granüler lenfositlerdir ve dolaşım - periferik lenfoid organlardaki lenfositlerin %10'unu oluşturmaktadırlar. NK hücrelerinin kendilerine özel yüzey antijenleri vardır fakat B ve T hücreleri gibi antijen reseptörleri yoktur. NK hücrelerinin asıl görevi, vücudu kolağan ederek zararlı mikroorganizmalar tarafından enfekte edilmiş herhangi bir hücre olup olmadığını incelemek ve varsa da ortadan kaldırmaktır (Abbas ve Lichtman., 2007).

Eozinofillerin asıl ve en önemli görevi vücudu parazitik enfeksiyondan korumaktır. Parazit kaynaklı enfeksiyonlarda paraziti bulunduran antijene özgül IgE antikorları üretilmektedir. Eozinofiller IgE (Immünoglobülin E) antikorlarına bağlanır ve aktive olmaktadır. Eozinofiller makrofajlara kıyasla zayıf fagositik özellik göstermektedirler. Eozinofiller aktive olduğu zaman kendinden kaynaklı nörotoksin ürünler ve çeşitli sitokinler salgılayarak parazitleri öldürebilmektedir. Eozinofiller ayrıca alerjik reaksiyonların patogeneğinde de önemli rol oynamaktadır (Schwarz, 2012).

Dış dünya ile aramızda bir kalkan görevi gören deri ise önemli bir savunma organımızdır. Çeşitli mikrobiyal, kimyasal ve fiziksel faktörlere karşı hem fiziksel hem de immünolojik koruma sağlamaktadır. Epidermis mikrobiyal organizmaların, kimyasal maddelerin ve toksinlerin vücut içerisine girişini engeller; güneş ışığı ve iyonizan radyasyonu absorbe ve bloke eder ve ayrıca su kaybını engellemektedir. Fiziksel savunma bariyeri stratum korneum da bulunmaktadır. Stratum korneum bariyeri, kolesterol, serbest yağ asitleri ve seramid gibi maddeler içermektedir. Kimyasal ve biyokimyasal bariyerler doğal bağışık yanıtta oldukça önemlidir. Bu bariyerler antimikrobiyal maddeler, antioksidanlar, inflamatuvar mediatörler, UV absorbe eden moleküller ve ksenobiotik metabolize edici enzimleri içermektedir (Goldsmith et al., 2012).

Dendritik hücreler (DC) bağışıklık cevabının oluşmasında ve düzenlenmesinde önemli bir rolü olan beyin, testis ve göz dışındaki tüm dokularda yerleşmiş olan deri, burun mukozası, solunum ve gastrointestinal sistem gibi vücudun dışa açılan bölgelerinde antijen sunan hücrelerdir. DC ana yapısı, bir ağaç dalı gibi hücre yüzeyinden dışarı doğru çok miktarda membran uzantılarından oluşmaktadır. Bununla beraber antijenin işlenmesi için bol miktarda hücre içi yapıları (endozom, lizozom ve Birbeck granülleri gibi) da bulunmaktadır. Ana görevi vücuda giren mikrobu yakalayıp küçük parçalar haline getirdikten sonra T-yardımcı hücrelere sunarak, yok edilme

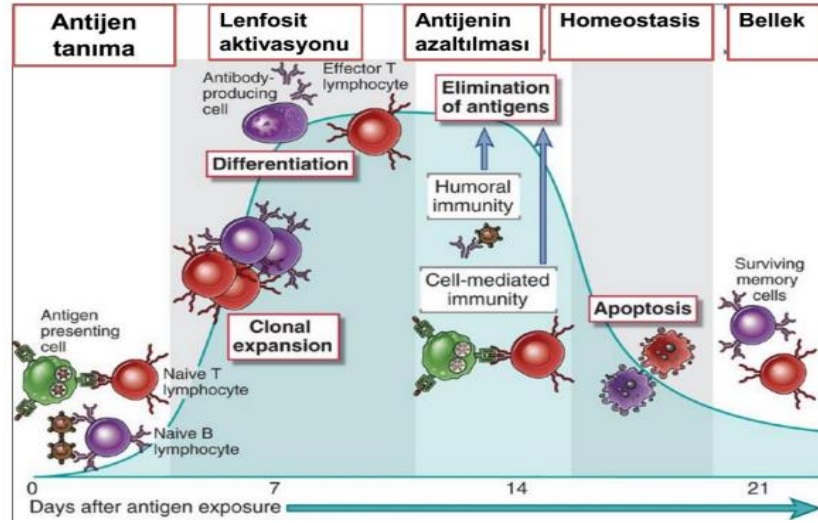
yollarını T hücrelerinin bulmasını sağlamaktır. Ek olarak immün toleransın oluşumu – devamı ve B lenfositleri uyararak üzerinden hümorale immünitenin oluşturulması görevleride mevcuttur (Yeşilyurt ve Fidan, 2011).

2.4.3.2. Edinsel Bağışıklık Sistemi Humoral- Hücresel Bağışıklık Sistemi

Edinsel immün yanıt doğal immüne yanıtla göre oluşmaktadır. Edinsel bağışıklık yanıt yabancı maddeyi ortadan kaldırdıktan sonra basal duruma, homeostaza dönüş yapmaktadır. Edinsel immün yanıtta rol alan en önemli efektör hücreleri T ve B-lenfositlerdir. T-lenfositler “hücresel” bağışıklık yanıtta rol alırken B-lenfositler ve bunların ürünleri “hümorale” bağışıklık yanıtta rol almaktadırlar (Mirsky, Miller, Linderman and Kirschner, 2011). Edinsel bağışıklık belirli hastalık (kızamık, suçiçeği v.b.) oluşumuna sebep olan patojenlere karşı antikor üretimini ve T hücrelerinin üretimini yaparak spesifik bir bağışıklık oluşturmaktadır. Bu tür immünite’nin oluşması uzun bir zaman süreceği için vücudun maruz kaldığı ilk saldırıyı engellemede etkin rol oynayamaz fakat daha sonradan olabilecek ataklar için önemli bir sistemdir.

Hücresel bağışıklığın hedef aldığı yapılar, bağışıklığın uyarılmasına sebep olan antijeni içeren, eksprese eden hücreler ve ilgili antijenin kaynağını fagosite etmiş hücreler vardır. Hümorale bağışıklık ise, Latince “humor, humori” (sıvı, sıvılarla ilgili anlamına gelmektedir; salgı, salgısal değil) kavramına dayanır ve mekanizması ise “vücut sıvıları” (antikorları içeren vücut sıvıları) ile aktarılabilen bir immüniteyi ifade etmek için kullanılmıştır. Temelde B-lenfositlerin ürettiği antikorların bir fonksiyonu olarak oluşur ve antikorlar efektör fonksiyonlarını hücre dışı antijen ve bu antijenin kaynağına karşı kullanmaktadırlar (Mirsky et al., 2011).

EDİNSEL İMMÜN YANITIN DÖNEMLERİ



Şekil 11: Edinsel Bağışıklık yanıtın dönemleri (Abbas ve Lichtman., 2007)

Edinsel immün yanıt, lenfositlerin antijen reseptörü ile antijeni tanınması ile başlamaktadır. T hücrelerinin birçoğu antijen sunucu hücre (ASH) lerde MHC moleküllerine bağlanan ve bu moleküllerce gösterilen peptit antijenlerini tanımaktadır. Antijenleri yakalayıp T lenfositinin tanınması için ona sunan özelleşmiş hücreler ASH'lerdir. Naif T lenfositlerinin antijenlere karşı klonal çoğalması, etkin ve bellek hücrelerine farklılaşmasının sağlanması için antijenlerin dendritik hücrelerce, en etkili ve özelleşmiş ya da “profesyonel” ASH'lerce, sunulması gerekmektedir (Abbas ve Lichtman., 2007).

T lenfositlerinin farklı mikropların oluşturduğu çeşitli enfeksiyonlara karşı savunmada birçok görevleri bulunmaktadır. T lenfositlerinin esas rolü hücre içi mikropların oluşturmuş olduğu enfeksiyonlara karşı korumayı sağlayan hücre-aracılı immünite (CMI)'dedir. T lenfositleri hücre içinde bulunan ve çoğalan zararlı mikroorganizmaların atılmasında ve diğer savunma hücreleri tarafından elimine edilmiş bazı hücre dışı mikropların sebep olduğu enfeksiyonların yok edilmesinde gerekli olmaktadır. Hücresel bağışıklık yanıt naif T lenfositlerinin etkin hücrelere farklılaşması ve çoğalması için gerekli olan aktivasyonu ile başlamaktadır. Etkin hale gelmiş T hücreleri ise çoğunlukla makrofajlar ve diğer lökositler ile birlikte çalışarak hücre ilişkili mikropları yok etmektedirler. Farklı çeşitlerdeki hücre içi mikropları yok etmek için üretilmiş iki çeşit hücresel bağışıklık reaksiyonu bulunmaktadır. CD4+ T hücreler lökositlerin aktivasyonu ve fagositoz ile hücre içinde öldürülmesini

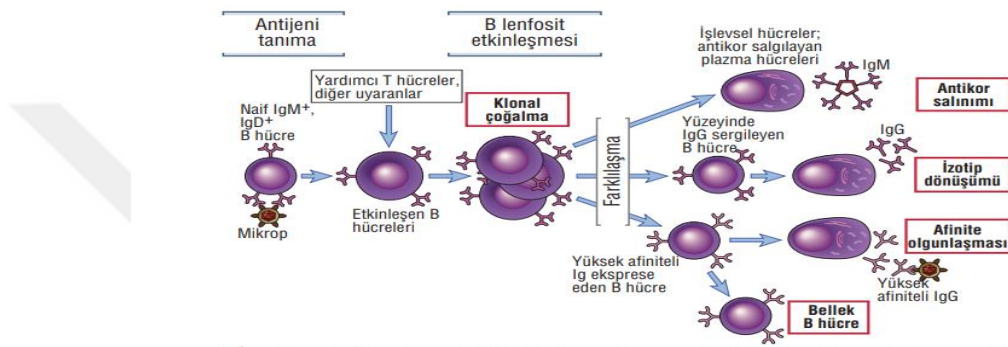
sağlayan sitokinleri salgılamaktadır. CD8+ sitotoksik T hücreleri (STL'ler) ise sitoplazmada veya çekirdekte mikrobiyal protein içeren her türlü hücreyi öldürerek enfeksiyonu ortadan kaldırmaktadırlar (Abbas ve Lichtman., 2007).

T lenfositleri ile oluşturulan immün reaksiyonlar birden fazla adımdan oluşmaktadır. İlk olarak hücre içeresinde bulunan zararlı mikroorganizmaları elimine etmekle görevli olan T hücreleri, mikrobiyal antijenlerle uyarılan farklılaşmamış T hücrelerinden lenf düğümleri ve dalakta üretilmektedir.

Farklılaşan T lenfositleri enfeksiyonun olduğu bölgeye göç eder. Mikroorganizmaları yutarak hücre içindeki veziküllere alan bu bölgedeki fagositler, mikrobiyal proteinlere ait hücre yüzeyinde bulunan, sınıf II MHC moleküllerine bağlı peptit parçalarını CD4+ alt grubunun etkin T hücrelerine tanıtmak üzere sunmaktadır. Enfekte hücrelerin sitoplazmalarında yaşayan mikropların peptid antijenleri ise sınıf I MHC molekülleri tarafından CD8+ T hücrelerine sunulmaktadır. Etkin T hücreleri tarafından antijenlerin tanınması, bu hücreleri asıl görevleri olan enfeksiyöz patojenlerin uzaklaştırılması yönünde aktive etmektedir. Böylece, hücrel immünitede, T hücreleri protein antijenlerini iki evrede tanımaktadır. Farklılaşmamış T hücreleri antijenleri lenfoid dokularda tanıyıp çoğalma ve etkin hücrelere farklılaşma şeklinde yanıt verirken, etkin T hücreleri aynı antijenleri vücudun herhangi bir yerinde tanır ve bu mikroorganizmaları yok ederek görevini sürdürmektedir (Abbas ve Lichtman., 2007) .

Hümmoral immünite edinsel immün yanıtın bir dalı olup, antikor kullanılarak hücre dışı mikroorganizmaların ve mikrobiyal toksinlerin etkisiz bırakılmasını ve yok edilmesini sağlamaktadır. Hümmoral immünite özellikle yapısında bol miktarda polisakkarid ve lipid içeren kapsüllü mikroorganizmalara karşı savunmada başlıca görev almaktadır. B lenfositlerinin bu mikroorganizmalara karşı etkili olmasının temel sebebi ise, B hücrelerin hücre dışında ve hücre yüzeyinde bulunan polisakkarid, lipid ve proteinler de dahil olmak üzere çok çeşitli tipte moleküllere karşı reaksiyon verip spesifik antikorlar üretebilmesi iken, T hücrelerinin ise sadece hücre içine alınmış ya da hücre içinde üretilen protein yapısındaki antijenleri belirleyip yanıt oluşturmaktadır. Antikorlar, B lenfositler ve B lenfosit alt türevleri tarafından üretilmektedir. Naif B lenfositler antijenleri belirleyebilir, ancak antikor salgılayamazlar, bu hücrelerin etkinleşmesi onların antikor üreten plazma hücrelerine farklılaşmasını sağlamaktadır (Abbas ve Lichtman., 2007).

Naif B hücreleri hücre zarına bağlı bulunan ve antijen reseptörü görevi yapan iki tür antikor; IgM (İmmünglobulin M) ve IgD'yi (İmmünglobulin D) yüzeylerinde bulundurmaktadır. Bahsi geçen bu B lenfositler daha sonra antijenler ve diğer sinyal yolları ile etkinleşmektedir. B lenfositlerin etkinleşmesi, Şekil 12 de gösterildiği gibi klonal çoğalma adı da verilen antijene özgül hücrelerin çoğalması ve hüморal immüitenin antikor salgılayan; yani etkin hücreleri olan plazma hücrelerine farklılaşması ile sonuçlanmaktadır (Abbas ve Lichtman., 2007).



Şekil 12: Hüморal immün yanıt evreleri

B hücrelerinin farklılaşmaları sırasında, bazı B hücreleri değişik mikroorganizma türleri ile savaşabilmek için özelleşmiş ve değişik etkin görevleri olan, farklı ağır zincir izotipinde antikor üretmeye başlayabilir. Bu işleme ağır zincir sınıf (izotip) dönüşümü (class switching) denmektedir. Böylece hüморal immüite hızla çoğalan mikroorganizmalara karşı ayak uydurabilmektedir. Protein yapısındaki antijenlerle tekrarlayan karşılaşmalar yüksek antijen afiniteli antikorların üretimine sebep olmaktadır. Bu işleme çekim gücünün (afinite) olgunlaşması denmektedir. Böylece, mikroorganizma ve onların toksinlerini etkisiz hale getiren bağlama kapasiteleri yüksek antikorların üretimi gerçekleşmektedir (Abbas ve Lichtman., 2007).

Hüморal immüite konağın salmış olduğu antikorlar ile oluşturduğu bir savunma şekli olup hücre dışı mikroplara ve toksinlerine karşı korunmada önemlidir. Antikorlar mikropların konak hücrelerine bağlanmasını ve enfekte etmesini engelleyerek enfeksiyonları önlemektedir. Ayrıca antikorlar mikrobiyal toksinlere de bağlanabilir ve konak hücrelerini hasar görmekten koruyabilmektedir. Antikorlar

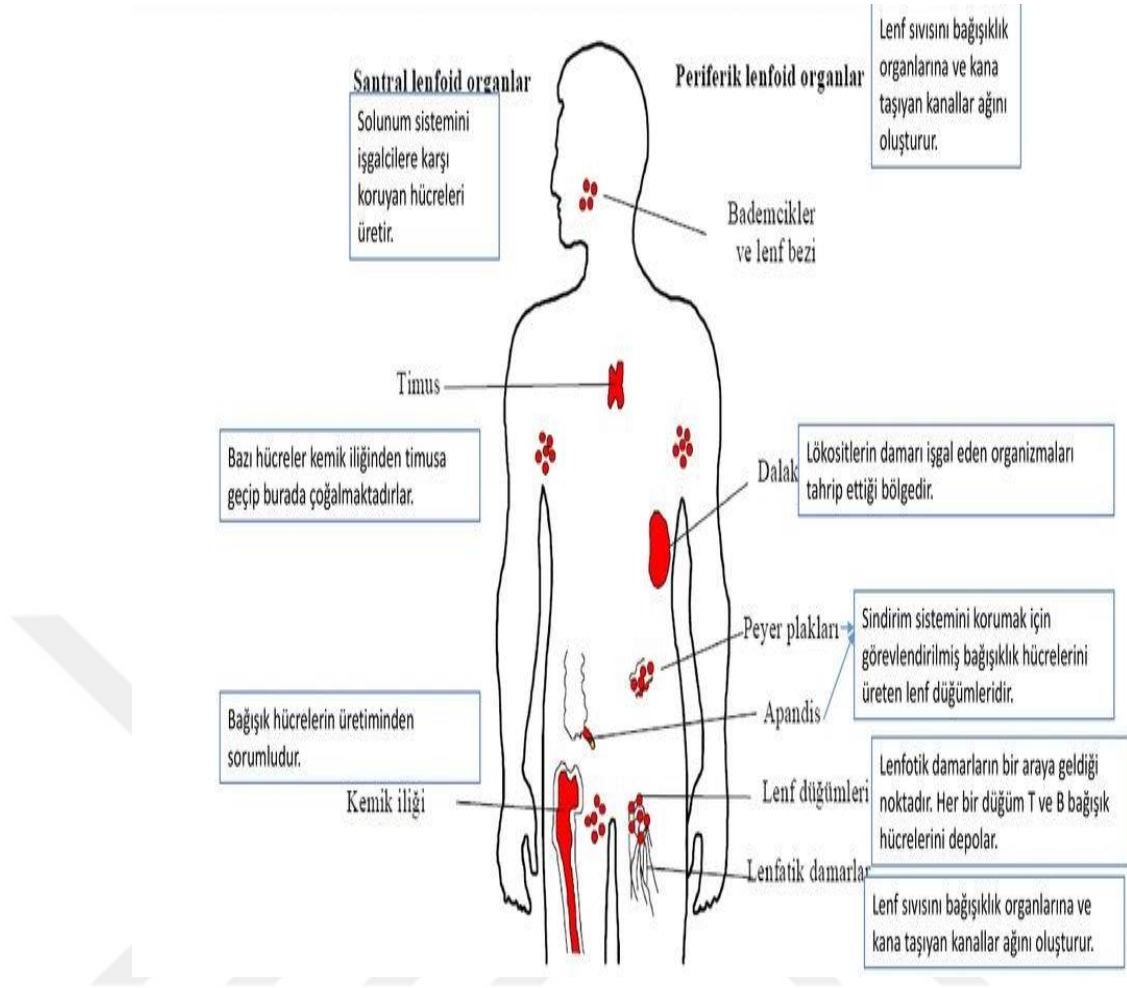
mikropların, toksinlerin ve enfekte hücrelerin vücuttan uzaklaştırılmasında rol oynamaktadırlar (Abbas ve Lichtman., 2007).

B lenfositlerin çoğu antikor-salgılayan plazma hücrelerine farklılaşır ve bu hücrelerin bazıları lenfoid organlarda ve enflamasyonlu dokuda kalırken diğerleri kemik iliğine gitmekte ve oraya yerleşmektedir. Plazma hücreleri farklı ağır zincir izotiplerinde (sınıflarda) antikorları üretir ve salgılamaktadır. Bu salgılanan antikorlar, epitel yoluyla girmeye çalışan mikroplarla mücadele eden mukozal salgılara geçmektedir. Böylece, antikorlar işlevlerini tüm vücutta gerçekleştirebilir (Abbas ve Lichtman., 2007).

Vücutta antikor yapımı enfeksiyon veya aşılama sonrası bir hafta içerisinde başlamaktadır. Kemik iliğine göçen plazma hücreleri aylarca veya yıllarca antikorları üretmeye devam etmektedir. Mikrop tekrar konağı enfekte etmeyi denerse, sürekli salınan antikorlar derhal koruyuculuğu sağlamaktadır. Antijen ile uyarılan B lenfositlerin bazıları antikor salgılamayan fakat o antijen tekrar ortaya çıktığında yanıt vermeye hazır olan bellek hücrelerine farklılaşmaktadır. Bu bellek hücreleri mikrop ile karşılaştığında hızla enfeksiyona karşı daha etkin savunma oluşturmak için büyük miktarda antikor yapımını sağlayan antikor-üreten hücrelere dönüşmektedir. Aşılamamanın amacı uzun ömürlü antikor salgılayan plazma hücreleri ve bellek hücrelerinin gelişimini uyarmaktır (Abbas ve Lichtman., 2007).

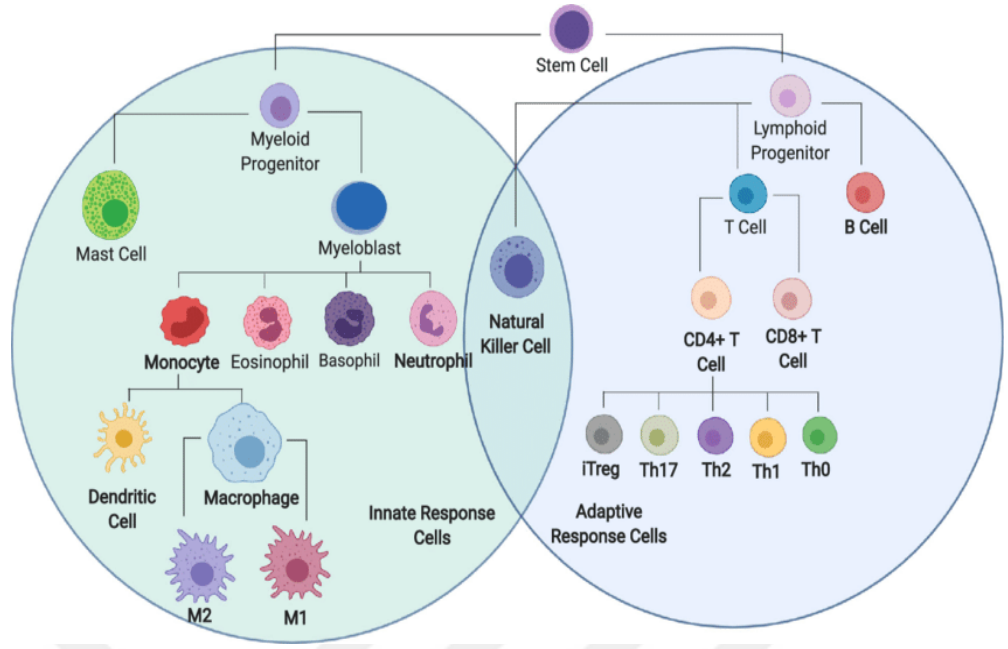
2.4.4. Bağışıklık Sistemi Organları

Bağışıklık Sistemi Organları ve dokuları başlıca iki gruptan oluşmaktadır bunlar; 1- Santral lenfoid organlar: kemik iliği ve timüs ve 2- Periferik lenfoid organlar: dalak, lenf bezi, mukozal lenfoid doku (mucosa associated lymphoid tissue, MALT) (Şekil 13). Santral lenfoid organlarda lenfositler tüm özelliklerini kazanarak olgunlaşmaktadır. Periferik lenfoid organlar da ise edinsel bağışıklık yanıtın başlamaktadır. Bağışıklık hücreleri santral organlarda olgunlaşarak periferik organlarda görevlerini yapmaktadırlar (immün sistemin tanımı, Gupta and Tyagi, 2020).



Şekil 13: Bağışıklık Sistemi Anatomisi ve organların görevleri (Gupta and Tyagi, 2020).

Şekil 14 te gösterildiği gibi bağışıklık sisteminin tüm hücreleri tek bir kök hücreden oluşmaktadır. Kemik iliğinde pluripotent hemotopoetik kök hücreden daha özelleşmiş iki farklı öncül hücre oluşmaktadır. Bunlar myeloid progenitör hücre ve lenfoid progenitör hücre'lerdir. Myeloid progenitor hücreden eritrosit, trombosit, granülosit, monositler ve mast hücreleri gelişmektedir. Lenfoid progenitor hücreden lenfositler (T ve B) gelişmektedir (immün sistemin tanımı).



Şekil 14: Bağışıklık sistemi hücrelerinin oluşum basamakları (Torang, Gupta, and Klinke, 2019).

2.4.5. Sitokinler

Sitokinler, vücudumuzda bulunan protein yapısındaki maddelerdir. Sitokinler vücutta gerçekleşen hücrelerarası haberleşmede ve çeşitli biyolojik fonksiyonları düzenlemede önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, immün yanıt ve inflamasyonda kilit rolleri vardır. Sitokinlerin kemokinler, interferonlar, interlökinler, lenfokinler, tümör nekroz faktörü gibi birçok alt grubu bulunmaktadır. Sitokin adı, hücre ve hormon anlamına gelen terimlerden oluşmaktadır. Sitokinler bir immün sistem hormonları olarak açıklanmış fakat bazı özellikleri ile endokrin hormonlardan farklılık göstermişlerdir. Endokrin sistemden farklı olarak sitokinler çeşitli hücrelerden salgılanmakta ve salgılandıkları ortamda etki göstermektedirler (immün sistemin tanımı).

Farklı gruplara özgü sitokinler bir hücrede aynı sinyal yollarını uyarabilmekte ve bir sitokin farklı hücrelerde birbirinden bağımsız sinyal yollarını tetikleyebilmektedir. Hangi sürecin uyarılacağı sitokinin uyardığı hücre içi sinyal yolağına, bu da bağlandığı reseptörlere, reseptörle ilişkili olan alt gruplara ve faktörlerine bağlı olarak değişmektedir. Sitokinler bağışıklık sistemi hücrelerinin

gelişmesi, farklılaşması ve aktivasyonunda, antijen sunumu, adezyon moleküllerinin ekspresyonu, akut faz yanıtları gibi immün yanıtın ve inflamasyonun her safhasında, hücre ölümünde, hematopoez ve yara iyileşmesi gibi birçok biyolojik olaylarda hücreler arasındaki ilişkileri düzenleyen yüksek düzeyde spesifik soluble proteinlerdir (Suzuki, 1999).

Sitokinler makrofajlar, B lenfositleri, T lenfositleri ve mast hücreleri gibi bağışıklık hücrelerinden ve endotel hücreleri, fibroblastlar ve çeşitli stromal hücreleri gibi birden çok hücreler tarafından üretilmektedir. Ayrıca bir sitokin birden fazla hücre türü tarafından üretilmektedir (Akdoğan ve Yöntem, 2018).

Bağışıklık sisteminin uygun şekilde çalışması için sitokinlerin sentezi ve salınımı düzenlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle, doğuştan gelen bağışıklık hücreleri tarafından salınan sitokinlerin kaskadları başlangıçta enflamatuvar veya alerjik tepkileri monte eder ve daha sonra tepkilerin zamanında azalmasını sağlamaktadır. Proinflamatuvar sitokinler ayrıca adaptif immün yanıtları monte etmek için T lenfositleri ve diğer hücreleri işe almaya ve aktif hale getirmeye hizmet etmektedir (Iwasaki and Medzhitov, 2010).

Th1 (T helper tip 1) yanıtı sitokinler üretir (IFN- γ , TNF- β , vb.) ve bunlar enflamasyonu destekler ve esas olarak belirli T hücrelerini ve makrofajları aktive etmekte, oysa Th2 (T helper tip 2) yanıtı ile salınan sitokinleri (IL-4, IL-5, vb.) esas olarak B hücrelerini ve antikorlara bağlı olarak bağışıklık tepkilerini aktive etmektedir (Charlton and Lafferty, 1995).

Sitokinler fonksiyonları ve kaynağına göre belli alt gruplara ayrılmaktadır;

İnflamatuvar sitokinler,

Makrofajlar enflamatuvar uyaranlara maruz kaldıklarında, tümör nekroz faktörü (TNF), IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-12 gibi sitokinler üretmektedir. Monositler ve makrofajlar bu sitokinlerin ana kaynakları olmasına rağmen, aktive lenfositler, endotel hücreleri ve fibroblastlar tarafından da üretilmektedirler. Bütün bu moleküller, uyum içinde çalışarak artmış vasküler geçirgenliği indükleyebilir ve inflamatuvar hücrelerin güçlenmesini sağlamaktadır. Lokal etkilerin yanı sıra, bu araçlar ayrıca ateş ve akut enflamatuvar yanıt proteinlerinin üretimi gibi sistemik etkiler de üretmektedirler (Arango Duque and Descoteaux, 2014).

IL-1 (Interleukin-1)

IL-1 üç ayrı formu bilinmektedir: IL-1 α , IL-1 β ve IL-1Ra dır. IL-1 α hem de IL-1 β güçlü bir proinflamatuvar etki göstermektedir. TNF 'e benzer şekilde, IL-1 β

enfeksiyonlara, lezyonlara ve strese karşı immün yanıtın erken aşamalarında üretilen ve salınan endojen bir pirojendir. Monositler ve makrofajlar IL-1 β ana kaynakları olmasına rağmen, NK hücreleri, B hücreleri, dendritik hücreler, fibroblastlar ve epitel hücreleri tarafından da salınmaktadır (Arango Duque and Descoteaux, 2014). Enflamasyon sırasında, IL-1 β karaciğerden akut faz proteinlerinin üretimini uyarmakta ve ateşi ve prostaglandin sekresyonunu indüklemek için merkezi sinir sistemine etki etmektedir. Mast hücrelerinde, IL-1 β histamin salınımını indüklemekte ve bu da vazodilatasyona ve lokalize inflamasyona neden olmaktadır. Aynı zamanda granülositler için bir kemoatraktandır, CD4 T hücrelerinin genişlemesini ve farklılaşmasını arttırmaktadır (Ben-Sasson, Hu-Li, Quiel, Cauchetaux, Ratner, et al., 2009). IL-1 β ekspresyonu, merkezi sinir sistemindeki mikroglia ve astrositlerde travma sonrası ve periferik sinirin ezilmesi ile oluşan yaralanmada artmaktadır (Yan, Banos, Herregodts, Hooghe and Hooghe-Peters, 1992). IL-1 β intraperitoneal, intraserebroventriküler veya intraplantar enjeksiyonu takiben hiperaljezi üretebilmektedir (Watkins, Wiertelak, Goehler, Smith, Martin, et al., 1994).

Uyarılmış makrofajlarda, IL-1 α de novo sentezlenir ve apoptotik hücrelerden aktif olarak salgılanabilmekte veya pasif olarak salınabilmektedir. Ayrıca etkilerini intrakrin bir şekilde uygulayabilir ve bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görebilmektedir (Yazdi, Guarda, Riteau, Drexler, Tardivel et al., 2010).

IL-1 β , inflamazomla aktive edilmiş kaspaz-1 ile bölünmesi gereken bir öncü olarak sentezlenmektedir.

Aktivasyondan sonra, otofaji bu sitokinin salınmasında önemli bir rol oynamaktadır. Otofaji, ökaryotlarda, sitoplazma, anormal veya hasar görmüş organellerin çift membranlı veziküllerde tutulduğu ve sonuçta ortaya çıkan makromoleküllerin parçalanması ve nihai olarak geri dönüşümü için lizozoma salındığı yüksek oranda korunmuş bir işlemdir. Bu süreç, değişen çevresel koşullara uyum sağlamada, açlıkta, gelişim sırasında hücre sel yeniden şekillenmede ve yaşlanmada çok önemli bir rol oynamaktadır. Otofajinin, IL-1 β ve IL-18 gibi proteinlerin salgılanmasına aracılık ettiği de kabul edilmiştir (Ravikumar, Futter, Jahreiss, Korolchuk, Lichtenberg, et al., 2009).

Çeşitli IL1 salgılama modları, makrofajların enflamatuar uyarılara hızla yanıt vermek için bir araç olarak evrimleştiği enfes makineleri vurgulamaktadır.

TNF-a (Tümör nekroz faktörü alfa)

Kaşektin olarak da bilinen TNF- α , bazı ağrı modellerinde iyi bilinen ve kilit bir rol oynayan başka bir enflamatuvar sitokindir. TNF iki hücre yüzeyi reseptörü aracılığıyla (TNFR1 ve TNFR2) birkaç farklı sinyal yolu üzerinde etki etmektedir. TNF apoptotik yolları, enflamasyonun NF κ B aktivasyonunu düzenler ve stresle aktive olan protein kinazları (SAPK'LER) aktive etmektedir. TNF- α reseptörler hem nöronlarda hem de glia'da bulunmaktadır (Boka, Anglade, Wallach, Javoy-Agid, Agid, et al.,1994). TNF-a'nın intraplantar enjeksiyonu ayrıca mekanik ve termal hiperaljezi üretmektedir (Cunha, Poole, Lorenzetti and Ferreira, 1992). TNF-a bağışıklık yanıtının akut fazını uyarmaktadır. Bu güçlü pirojenik sitokin, bir patojene yanıt olarak salınan ilk sitokinlerden biridir ve etkilerini birçok organda uygulayabilmektedir. TNF, lenfosit, nötrofil ve monosit infiltrasyonu için elverişli olan vazodilatasyona ve vasküler geçirgenlik kaybına neden olmaktadır. Kemokin salınımını düzenleyerek bu hücrelerin iltihap bölgesine alınmasına yardımcı olmaktadır (Beutler, 1999) .

IL-6 (İnterlökin-6)

IL-6, hem proinflamatuvar hem de bağışıklıktan hücre onarım-metanolizmasına kadar birçok süreci etkileyen anti-inflamatuvar özellik göstermektedir. IL-6 ayrıca monositlerin iltihap bölgesine alınmasına yol açmaktadır, Th17 hücrelerinin bakımını teşvik etmektedir ve hücre apoptozu gelişimini inhibe etmektedir (Scheller, Chalaris, Schmidt-Arras and Rose-John, 2011). Ayrıca, B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşmasını teşvik etmekte, sitotoksik T hücrelerini aktive etmekte ve kemik homeostazını düzenlemektedir. Diğer proinflamatuvar sitokinlerde olduğu gibi, IL-6 Crohn hastalığı ve romatoid artritte rol oynamaktadır (Nishimoto and Kishimoto, 2004). IL-6 hücreleri B lenfosit çoğalması ve farklılaşması, Ig üretimi, ateş ve akut faz protein oluşumunda önemli bir hücredir (Akdoğan ve Yöntem, 2018).

IL-6, ER'da (Endoplazmik Retikulum) sentezlenen çözünür bir sitokindir ve TNF'den farklı olarak, membrana bağlı bir öncü olarak işlenemektedir. Makrofajların LPS ile uyarılması üzerine, IL-6, 4 saatlik stimülasyondan sonra Golgi'de birikmeye başlamaktadır (Manderson, Kay, Hammond, Brown and Stow, 2007).

IL-6'nın sinir hasarına nöronal reaksiyonda merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir. Anti-IL-6R antikorlarının in vivo uygulanmasıyla IL-6'nın

baskılanması rejeneratif etkilerin azalmasına neden olmuştur. IL-6 ayrıca mikrogial ve astrositik aktivasyonun yanı sıra nöronal nöropeptit ekspresyonunun düzenlenmesinde de rol oynamaktadır (Hirota, Kiyama, Kishimoto and Taga, 1996). IL-6'nın periferik sinir hasarı sonrası nöropatik ağrı davranışının gelişimi üzerinde etkisi olmaktadır (Zhang and An, 2007).

IL-12 (İnterlökin 12)

IL-12 esas olarak monositler, makrofajlar ve diğer antijen sunan hücreler; bulaşıcı hastalıklar ve kanserle savaşmak için gereklidir. IL-12, sentezlerinden sonra bir araya gelen p35 ve p40 alt birimlerinden oluşan heterodimerik bir sitokindir (Dorman and Holland, 2000). IL-12, Th1 hücrelerinin uyarılması yoluyla hücre aracılı bağışıklığı arttırmaktadır. TNF ve diğer proinflamatuvar sitokinlerle sinerjize olarak NK ve CD8 T hücrelerinin sitotoksitesinde rol oynayan IFN- γ hücrelerinin üretimini uyarmaktadır (Wang, Frank and Ritz, 2000)

IL-18 (İnterlökin 18)

IL-18, IL-1 ailesinin bir üyesidir ve aynı zamanda IFN- γ üretiminde bir indükleyicidir. T hücrelerini ve NK hücrelerini aktive etmek için IL-12 ile sinerjize olmaktadır. IL-18'in IL-1 β ile benzer şekilde sinyal vermesine rağmen, IL-18 bir pirojen değildir ve hatta IL-1 β kaynaklı ateşi zayıflatabilmektedir (Gatti, Beck, Fantuzzi, Bartfai, and Dinarello, 2002). Ateş indüksiyonunun olmaması, IL-18'in IL-1 β tarafından kullanılan NF-kB yolu yerine MAPK p38 yolu üzerinden sinyal vermesi ile açıklanabilmektedir (Lee, Kim, Lewis, Azam, Reznikov et al., 2004)

IL-23 (İnterlökin 23)

IL-23 bir IFN- γ indükleyicisi ve T hücresi aktivatörüdür ve sedef hastalığından şizofreniye kadar çeşitli hastalıklarda oluşmaktadır. Her ikisi de iltihaplanmaya neden olduğu için IL-12'ye benzerlik göstermektedir. Dahası, hem IL-12 hem de IL-23, IL-12p40 alt birimini paylaşır ve bu nedenle benzer sinyal yollarına sahiptir (Croxford, Kulig and Becher, 2014).

IL-27 (İnterlökin 27)

IL-27, IL-12 ailesinin bir üyesidir ve p28 ve Epstein-Barr virüsü kaynaklı gen 3 alt birimlerinden oluşmaktadır. TNF'ye benzer şekilde, LPS ve IFN- γ ile uyarılan monositlerde ve makrofajlarda üretilmektedir (Yoshida, Hamano, Senaldi, Covey, Faggioni, et al., 2001).

IFN- γ indüksiyonu yoluyla naif T hücrelerinin Th1 hücrelerine farklılaşmasını desteklemenin yanı sıra, IL-27 ayrıca Th17 hücrelerinin farklılaşmasını da inhibe etmektedir (Stumhofer, Laurence, Wilson, Huang, Tato et al., 2006).

Bu sitokin enflamatuar ve anti-enflamatuar özellikler olarak seçici özelliklere sahiptir fakat enflamatuar yanıtın hızlı olduğu kavramını desteklemektedir, ancak aynı zamanda konakçıya zarar vermemek için dikkatlice üretilmektedir.

Antiinflamatuar sitokinler,

IL-10 (İnterlökün 10)

IL-10 B hücreleri ve T hücreleri tarafından üretilmektedir. Başlıca faaliyetleri makrofaj aktivasyonunun baskılanması ve TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 ve GM-CSF üretiminin baskılanmasıdır (Fiorentino, Zlotnik, Mosmann, Howard, and O'Garra, 1991). IL-10, aktive edilmiş makrofajlarda MHC-II ekspresyonunu bastırmaktadır ve bu nedenle antijen sunumunun güçlü bir inhibitörüdür.

TGF- β (Transforming growth factor beta)

IL-10 ile birlikte, TGF- β , birçok hedef hücreye etki eden ve TNF, IL-1 β , IL-2 ve IL-12'nin enflamatuar etkilerini azaltan bir başka güçlü antiinflamatuar sitokindir. TGF- β , hem Th1 hem de Th2'nin güçlü bir baskılayıcısıdır. TGF- β ayrıca hematopoezde rol oynamaktadır ve embriyogenez, doku rejenerasyonu ve hücre çoğalması ve farklılaşmasında çok önemli bir role sahip olmaktadır (Travis and Sheppard, 2014).

Kemokinler

Kemokinler, kemotaksi olarak da bilinen hücresel göçü yönlendirme sürecine yardımcı olan heparin bağlayıcı sitokinlerin özel bir ailesidir. Lökosit migrasyonunu düzenler ve anjiyogenez, lökosit degranülasyonu gibi süreçlerin oluşmasını sağlamaktadır. Kemokinler vücut içerisinde meydana gelen birçok biyolojik süreçte rol almaktadır; lökosit-endotelial hücre ilişkilerinde, T ve B hücre matürasyonunda, immün denetim, tolerans ve immünitenin oluşumunda, T-B hücre iletişimde ve primer immün cevabın oluşmasında görev almaktadır. Ayrıca, dendritik hücre fonksiyonlarında, T hücre farklılaşması ve fonksiyonlarının sağlanmasında, efektör T hücre cevabı ve inflamatuvar hastalıklarda, mukozal immünitede de yer almaktadır (Çağlar ve Kansu, 2004). Kemokinler tarafından çekilen hücreler kemokinin kaynağına doğru göç etmektedir. Bağışıklık gözetimi sırasında, kemokinler bağışıklık sisteminin hücrelerini ihtiyaç duydukları yere yönlendirmede çok önemli bir rol oynamaktadır. İnflamatuvar yanıt olarak, hem doğuştan ve kazanılmış

bağışıklık hücreleri tarafından geniş bir hücre yelpazesi tarafından serbest bırakılmaktadır. Kemokin salınımı genellikle TNF, IL-6 ve IL-1 β gibi proinflatuar sitokinler tarafından indüklenmektedir (Comerford and McColl, 2011).

Kemokinler ve kemokin reseptörleri birçok önemli biyolojik süreçte görev almaktadırlar. Kemokinler, lökositlerin inflamasyon ve homeostasisin sağlanması aşamalarında hücresel hareketleri düzenlemektedirler. Kemokinlerin, homeostatik sirkülasyondaki lökositlerin dokulara yönelimlerinde de görev aldıkları kabul edilmektedir. Inflamasyon boyunca kemokinlerin sekresyonunda dramatik bir şekilde artış gözlenmektedir. Inflamasyonda birçok dokuda (deri, beyin, eklem, meninges, akciğer, kan damarları, böbrek ve gastrointestinal sistem) kemokinlerin varlığı tespit edilmiştir. Tüm hücrelerde olmasa dahi birçoğunda hücreler uygun stimülasyon sonucunda kemokin moleküllerini sentezleyerek ortama salmaktadırlar. Kemokin üretimi için en önemli uyarı erken proinflatuar sitokinlerdir (interlökin1 ve tümör nekrozis faktör-a, viral infeksiyon, lipopolisakkarit gibi bakteriyel ürünler). Inflamasyonda kandan kemokinler, lökositlerin dokuya geçişine ve inflamasyonun bulunduğu yerde birikimine ve aktivasyonuna yol açmaktadır. Kemokinlerin sentezini arttıran en önemli uyarıcılar IL-1, LPS, TNF-a, IFN-y ve IL-4'dir (Çağlar ve Kansu, 2004).

2.4.6. KKN İmmün Sistem Üzerine Etkisi

Karbon noktalarının normal BALB / c farelerinin bağışıklık fonksiyonu üzerindeki etkilerini açıklığa kavuşturmak için yapılmış olan bir çalışmada, Bu B hücresi mitojenine (LPS) ve T hücresi mitojenine (ConA) maruz kaldıktan sonra karbon noktalarının dalaktaki lenfoproliferasyon üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, dalak lenfositleri proliferasyonunda karbon nokta gruplarına maruz kaldıktan 1 gün sonra çok az artış olduğu gözlenmiştir.

Bununla birlikte, örneğe maruz kalan gruplarda hem B hem de T lenfosit proliferasyonu uygulamadan sonraki dokuzuncu günde doza bağlı olarak önemli ölçüde artmıştır. Bu çalışmada, karbon noktaları BALB /c farelerinin Th1 ve Tc tepkilerini indükleyerek bağışıklık fonksiyonunu ayarlayabilmektedir. Ancak, bu etkiler bağışıklık organlarının morfolojik değişimini indüklemek için yeterli değildir.

Karbon noktalarının bağışıklık sistemini modüle ettiği mekanizma belirsizliğini korumaktadır (Gao et al., 2013).

Başka bir çalışmada ise, KKN'ların murin makrofaj hücresi RAW 264.7 ve insan beyaz kan hücresi kültürleri (WBC) üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Hücre canlılığı, enflamatuvar biyobelirteçler, edinsel bağışıklık sisteminin sitokinleri gibi bir dizi parametre değerlendirilmiştir. Karbon noktaların 5 ila 50 g / mL arasında değişen çok düşük konsantrasyonlarda hücre proliferasyonu uyardığını ve daha sonra konsantrasyonda bir artışla canlılıkta bir düşüş olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada, hücre canlılığında 31.25 g / mL'de bir artış ve 62.5 ve 250 g / mL'de canlılıkta bir azalma olduğu için bu eğilim izlenmiştir. Bu, hücre döngüsünün G2 / M fazında kontrolsüz proliferasyona yol açan yüksek düzeyde reaktif oksijen türlerine bağlı olmuştur. Bazal koşullar altında, RAW 264.7 hücre inflamatuvar markörü olan IL-6 KKN'ların 62.5 g / mL konsantrasyonunda kısmen inhibe edilmiştir. RAW 264.7 hücre inflamatuvar belirteçleriyle çelişen MIP kemokinleri, KKN'nın 250 g / mL konsantrasyonlarda maruziyeti ile önemli ölçüde yukarı regüle edilmiştir. WBC'lerde de benzer bir eğilim görülmüş ve değerlendirilen en yüksek konsantrasyonun (500 g / mL) uyarılmamış kültürlerde IL-6 ve MIP-1'i indüklemiştir. Hümorale immün yanıt sitokin IL-10, hem uyarılmamış hem de PHA ile uyarılmış kültürlerde 500 g / mL KKN'da yukarı regüle edilirken, hücre aracılı immün yanıt sitokin IFN her iki koşulda da etkilenmeden kalmıştır. Bu çalışma, sitotoksikite düzeylerinin düşük olmasına rağmen, KKN'ların yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik olduğunu açıkça göstermektedir. KKN'lar nispeten bazal koşullar altında yüksek konsantrasyonlarda proteome analizi ile desteklenen iltihaplanmaya neden olmaktadır. Proteome analizi, KKN'ya maruz kaldığında değerlendirilecek potansiyel biyobelirteçleri ortaya çıkarmıştır. Bunlara MIP-1, MIP-2, TNF-, IL-8 ve SDF-1 dahildir. Humoral immün yanıt da yüksek KKN seviyelerinde modüle edilmiştir. Bağışıklık tepkilerinin bu şekilde uyarılması aşırı duyarlılığa ve otoimmüniteye neden olabilmektedir.

Mevcut çalışma bu nanopartiküller olarak KKN'ların bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri hakkında önemli bir fikir vermektedir (Lategan et al., 2018).

Karides üzerinde karbon kuantum nokta'nın immün sistem üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, sonuçlar poliamin KKN'ların hemolenflerin pıhtılaşma mekanizması, antioksidan savunma mekanizması, antimikrobiyal peptid sistem ve antimikrobiyal immün yanıtlar gibi birçok doğuştan gelen bağışıklığı

uyardığını göstermiştir. Bu çalışmada, poliamin KKN'ların WSSV (beyaz benek virüsü) zarfına bağlandığı ve doza bağlı bir etki ile virüs enfeksiyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir. Poliamin KKN'lar bu sonuç da gösteriyor ki, karidesin çeşitli bağışıklık genlerini upregüle etmiş ve WSSV enfeksiyonu kaynaklı ölüm oranını azaltmıştır. Çalışma, poliamin KKN'lar virüse karşı etkili olabileceğini tespit eden ilk çalışmadır. Bu sonuçlar, poliamin KKN'ların karideste immüностimülatör etkisi olduğunu göstermiş ve aslında, su ürünleri yetiştiriciliğinde poliamin KKN'lar kullanarak etkili antiviral stratejiler veya terapötik yöntemler geliştirmek için de bir yön sağlamıştır. Bu deneyde, poliamin KKN'lar virüs enfeksiyonunu inhibe etmiştir ve ayrıca karidesin doğuştan gelen bağışıklığını geliştirmiştir. Bu nedenle, poliamin KKN'lar diğer patojenleri inhibe etme yeteneğine sahip olabilmektedir ancak bunun için daha fazla deney gerekmektedir. Bununla birlikte, bu çalışma, poliamin KKN'ların karides yetiştiriciliğinde WSSV'ye karşı yem katkı maddesi olarak kullanım için büyük potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. (Huang, Lin, Huang, Huang, Lin, et al., 2020).

2.5. Aşı

2.5.1. Genel Bilgiler

Aşılamanın amacı hedeflenen patojene karşı hastalığa yakalanma riski ve potansiyel komplikasyonları olmaksızın koruyucu bağışıklık tepkisi yaratmaktır. Aşılar, doğal enfeksiyonlar gibi doğuştan gelen bağışıklık tepkisine neden olur bu da bir antijene özgü adaptif immün yanıt oluşturmaktadır. Her patojen (veya aşı), spesifik antikorlar üretmek için B lenfositlerini uyararak yüksek oranda spesifik T lenfosit alt kümelerini ve humoral bağışıklığı aktive ederek hücre aracılı bağışıklığı indükleyen antijenleri eksprese etmektedir (veya içermektedir). Patojenin ortadan kaldırılmasından sonra, adaptif bağışıklık sistemi genellikle immünolojik hafıza kurmaktadır. Bu immünolojik hafıza temeli uzun süreli bağışıklık koruması sağlamaktadır ve aşılamanın amacı antikorların kalıcılığı ile ve aynı patojene daha sonra maruz kaldığında hızla yeniden etkinleştirilebilen bellek hücrelerinin jenerasyonu ile karakterize edilmektedir.

Enfeksiyonun biyolojisine ve hastalığın önlenmesine bağlı olarak, farklı humoral (yani antikorlar) veya hücre aracılı (yani T hücreleri) adaptif bağışıklık mekanizmaları etkili olabilmesi için aşı gerekmektedir.

Aşıların güvenlik profili ve beklenen faydaları aşılanan bireyler ve genel nüfus için önemli olmaktadır ve bundan dolayı aşıların etki mekanizmasını anlama ve buradan yola çıkarak etkinliklerini tahmin etmek son derece önemli olmaktadır. Sürü veya toplum koruması olarak adlandırılan bu dolaylı koruma, nüfusun büyük bir kısmının (hastalığa bağlı olarak% 75-95) veya hastalığın bulaşmasında kilit rol oynayan özel bir grubun aşılmasını gerektirmektedir. Sürü koruması -kızamık gibi programlar - genellikle aşılamanın başarısı için gerektirmektedir. Benzer şekilde, aşılama hamile kadınlar, maternal antikorların anneden plasenta boyunca fetusa aktarılması yoluyla yaşamın ilk aylarında bebekleri dolaylı olarak koruyabilmektedir. Bu kavram tetanoz, grip ve boğmaca için başarıyla kurulmuştur (Vetter, Denizer, Friedland, Krishnan, and Shapiro, 2018; Furman and Davis, 2015).

2.5.2. Günümüzde Kullanılan Aşılar

Aşılar bireysel koruma sağlamaktadır ayrıca aşılar aşılanmamış popülasyonlar da bireyleri kişiden kişiye bulaşma oranını düşürerek ve bireyler için riski sınırlandırarak koruyabilmektedir .Belirli bir aşının seçilmesi, koruma seviyesi, beklenen etki şekli, konunun özellikleri veya hastalığın ortadan kaldırılması stratejisi gibi çeşitli faktörlere bağlı olabilmektedir (Vetter et al., 2018; Aşılar ve Aşı Adjuvanları).

Günümüzde kullanılan aşılar aşağıda kısaca belirtilmiştir;

Canlı zayıflatılmış aşılar, zayıflatılmış, değiştirilmiş veya daha az virülen özellik gösteren patojenler içermektedir. Aşılar içerisinde bulunan gücü zayıflatılmış bu patojenler normal aktivitelerine kıyasla gerçek hastalığa neden olamazlar veya çok hafif bir şekilde sadece hastalığı taklit etmektedir (Vetter et al., 2018).

Canlı zayıflatılmış organizma hala hedef hücreleri enfekte edebildiğinden, bu aşılar hem hücresel hem de humoral bağışıklığı çoğaltabilmekte ve indükleyebilmekte ve genellikle etkili olması için bir adjuvana ihtiyaç duyulmamaktadır. Canlı zayıflatılmış aşılar genellikle bakterilerden ziyade virüslerden üretilmektedir çünkü virüsler daha az gen içermekte ve gücü zayıflatabilmekte ve daha güvenilir bir

şekilde kontrol edilebilmektedir (Jorge and Dellagostin, 2017). Canlı zayıflatılmış aşılar elde etmek için en yaygın yöntem, virüsü bir dizi in vitro hücre kültüründen (örneğin civciv embriyo hücrelerinde) geçirmektir. Her “geçişte”, seçilen virüsler hücre kültürlerinde enfekte etme ve çoğalma yeteneği iyi olanlardır ancak orijinal insan konakçıları enfekte etme ve çoğaltma yeteneklerini kaybetmektedir. Zayıflama, düşük sıcaklık ile geçişlerde de elde edilebilmektedir (örneğin 25 °C) . Bu yaklaşım soğuk bir ortamda iyi çoğalabilen virüsleri seçmekte, ancak vücut sıcaklığında daha az çoğalmaktadır, bu nedenle insan konağında patojenitelerini azaltmaktadır (Vetter et al., 2018).

Canlı zayıflatılmış aşılar az miktarda bir enfeksiyon çeşidine neden olmaktadır. Zayıflatılmış patojen orijinal patojenle aynı antijenleri sunmakta, sağlıklı bireyler de bu enfeksiyondan kaynaklanan bir bağışıklık tepkileri geliştirmektedir. Sonuç olarak, bu aşılar antikor tepkileri indüklemekte ve genellikle sadece bir veya iki dozdan sonra uzun vadeli bağışıklık sağlamaktadır (Vetter et al., 2018). Kızamık, kabakulak, kızamıkçık, çocuk felci (Sabin aşısı), sarı humma aşıları ve bazı adenovirüslere karşı hazırlanan aşılar canlı virüs aşılara örneklerdir (Aşılar ve Aşı Adjuvanları)

İnaktive aşılar, bir veya daha fazla bakteri türünün veya serotipin bakterilerinden veya en sık bir yağ veya alüminyum hidroksit adjuvanında formüle edilmiş olan öldürülmüş viral suşlardan oluşmaktadır. İnaktive aşılar normal koşullarda stabildir ve canlı aşılarla göre üretilmesi daha ucuzdur. Öldürülmüş aşıların üretimi için aşı virüsünün inaktivasyona, proteinlerin denatürasyonuna veya nükleik asitlere zarar veren fiziksel veya kimyasal işlemlerle sağlanmaktadır. İnaktive antijen daha da saflaştırılabilmekte ve bir adjuvan ile karıştırılabilmektedir. İnaktive aşılar gelişmiş güvenlik profilleri sunmaktadır, ancak patojen replikasyonunun tahrip olması nedeniyle etkili ve uzun süreli koruma sağlayamamaktadırlar (Jorge and Dellagostin, 2017). Poliovirüs (Saik aşısı), kuduz ve influenza aşıları bu grubun örnekleridir (Aşı ve Aşı Adjuvanları). İnaktivasyon işlemi patojenin çoğalma ve hastalığa neden olma yeteneğini yok etmekte ancak immünojenikliği korunmaktadır, böylece bağışıklık sistemi hedeflenen patojeni hala tanımaktadır. Vücuda enjekte edildikleri zaman virüsün yalnız yüzey antijenlerine karşı antikorlar oluşmakta ve karma aşılar içerisine kolayca katılabilmektedirler (Vetter et al., 2018 ; Aşı ve Aşı Adjuvanları).

Alt birim aşılar, patojenin bütün parçası yerine patojenin antijen gibi davranan bir parçasını içermektedir. Bu parçalar proteinler, polisakkaritler veya bir virüsün virüs benzeri parçacıklarını oluşturabilecek kısımları (VLP) olabilmektedir.

Alt birim aşılar genellikle canlı veya inaktive edilmiş tüm organizma aşılardan daha az advers reaksiyon neden olmakta, ancak daha az immünojenik olabilmektedir çünkü daha az antijen içermektedir ve doğuştan gelen bağışıklık yanıtını tetikleyici bileşenleri ortadan kaldıran saflaştırma işlemi uygulanmıştır (Vetter et al., 2018). Altbirim aşılarla uyarılan bağışık yanıtı etkileyen ana faktör vardır:

1. İmmünojenin doğası ve dozu
2. Formülasyonda kullanılan adjuvan veya taşıyıcılar
3. Bağışıklama programı
4. Uygulama yolu
5. İmmünize edilen bireyin immün durumu (yaş, genetik yapı ve immün sistemde önceden var olan eksiklikler) (Aşı ve Aşı Adjuvanları)

Altbirim aşılarının taşıdıkları patojenin parçalarına göre çeşitleri vardır. Bunlar;

Protein içeren aşılar, antijenik proteinler ve aselüler boğmaca aşısı gibi hazırlanmış olan patojen bütünü saflaştırılmasıyla elde edilebilir yada rekombinant genetik mühendisliği ile üretilebilmektedir. İkinci durumda, antijenik proteini kodlayan bir gen, hücre kültürlerinde büyük miktarlarda antijen üretimi yapabilen bir sistem içerisine konmaktadır (Vetter et al., 2018). Rekombinant protein aşıların sakıncası; organizma tarafından ekzojen antijen olarak değerlendirilmeleri ve bu nedenle de hücresel yanıt yeterli derecede uyaramamaları, yalnız humoral bağışıklığı uyarabilmeleridir. Rekombinant bir immünojeni içeren ve ticari ürün olarak bulunan ilk aşı Hepatit B aşısıdır (Rekombivax HB, Merck). Bu aşı Hepatit B virüsünün yüzey antijeni (HBsAg)'nden oluşmakta ve koruma mekanizması nötralize edici antikorların üretilmesine dayanmaktadır (Aşı ve Aşı Adjuvanları).

Toksoid Aşısı, bakteriyel toksinlerin neden olduğu hastalıkları kontrol etmek için mevcut en iyi koruyucu önlemlerdendir. Şu anda ticari olarak üretilen aşılar, geleneksel adjuvanlarla birlikte inaktive edilmiş doğal toksinlerden (toksoidler) oluşmakta ve bu da verimli olmasına rağmen bazı üretim sınırlamalarına neden olmaktadır. Örneğin, in vitro üretilen toksin miktarı tahmin edilemeyebilir ve

toksinlerin bazıları yüksek düzeyde biyogüvenlik gerektirebilen güçlü biyolojik toksinlerdir. Rekombinant aşılarda kullanımı bu sınırlamaların üstesinden gelebilmekte, çünkü bunlar büyük miktarlarda verimli bir şekilde üretilirler ve genellikle düşük reaktogenite ve toksik etki göstermektedirler (Jorge and Dellagostin, 2017). Bu gruptaki aşılarda ekzotoksinlerin ve endotoksinlerin formaldehit ile belirli ısıda bir süre tutularak uzaklaştırılması sonucu toksik etkileri giderilmiş preparatlardır. Toksoidler grubundaki ilk alt birim aşılarda difteri ve tetanoz aşılardır. Bu hastalıkların etkenleri, virülans faktörleri güçlü olan endotoksinlerdir. Bu proteinlerin toksisitesi yok edilerek nötralize edici antikorların üretimini uyaran toksoidler elde edilmektedir (Aşı ve Aşı Adjuvanları)

Polisakkarit aşılarda, bakterilerin yüzey kapsülünü oluşturan uzun karbonhidrat molekülleri zincirlerinden oluşan bir alt birim aşı türüdür. Bazı patojenik bakterilerin virülansı başlıca hidrofilik polisakkarit kapsüllerinin antifagositik özelliklerine bağlı olmaktadır. Kapsüller polisakkaritler tuz çözeltileri kullanılarak bakterilerden ekstraksiyon yoluyla veya bakterinin yetiştirildiği kültür ortamından elde edilebilmektedirler. Bakterilere karşı koruyucu bağışıklığı uyaran immünojenik yapılardır. Polisakkarit aşılarda sakıncası; T (yardımcı T hücresi) hücrelerini aktive edememeleridir. Bu nedenle araştırmacılar, bağışık yanıtta T H'lerin de yer alması için polisakkarit antijeni bazı protein taşıyıcılar veya toksoid proteinleri ile konjuge etmektedirler (Aşı ve Aşı Adjuvanları). Bu aşı grubuna örnek olarak günümüzde de hala kullanılmakta olan tüm patojenlerden saflaştırılmış kapsüller polisakkaritlere dayanan 23 değerlikli pnömokokal polisakkarit aşısıdır (Pneumovax 23, MSD; Pneumo 23, Sanofi Pasteur). Polisakkarit konjuge aşılarda ise, saflaştırılmış polisakkaritlerin immünojenikliğini güçlendirmek için protein ile konjuge ederek üretilen aşılardır. Konjugasyon, T hücresini aktive edemeyen polisakkaritlerin T hücresine bağımlı yanıt oluşturarak yüksek afiniteye sahip antikorlar ve bağışıklık hafızasına neden olmaktadır (Vetter et al., 2018).

Rekombinant ürünü aşılarında mikroorganizmaların antijenik komponentleri çıkarılması, sonra alıcı bir hücreye (bakteri, maya) transferi, gen ürünü antijenik proteinin ekspresyonunun sağlanması, hücrelerde biriken proteinlerin elde edilmesi, bunların deneme hayvanlarına verilerek bağışıklık kazandırılması amaçlanmaktadır. Hepatit B ve Grip aşılarda bunlara örnek verilebilir. DNA Aşıları, bu aşılar hastalık-ajan proteinini kodlayan geni içeren sentetik DNA'dan oluşmaktadır. E. coli 'de çoğaltılmış sentetik DNA içeren plazmid DNA'lar aşı olarak kullanılmaktadır. Sonra

bu plazmid DNA'lar enjeksiyon için izole edilmekte ve saflaştırılmaktadır. Elde edilen çıplak DNA genellikle kas içi ve deri içine enjekte edilmektedir.

Antijen (DNA) viral enfeksiyona benzer bir şekilde doğrudan ifade edilebilmekte ve konakta immün tepkiyi başlatmaktadır. DNA aşılarının uygun taşıyıcı sistemler içerisinde verilmeleri amacıyla taşıyıcı sistemler olarak gen tabancası canlı vektörler viral olmayan sentetik mikropartiküler sistemler ve adjuvan taşıyıcılar üzerinde çalışılmaktadır. (Aytar ve Başbülbul, 2019).

2.5.3. Günümüz Aşılarının Avantaj Ve Dezavantajları

Canlı zayıflatılmış aşılar çok etkili olabilir çünkü hem hücresel hem de humoral immün yanıtları indüklemektedir. Bununla birlikte, bu nitelikteki aşılarla ilişkili önemli bir endişe, mikroorganizmanın virülan bir phenotype için potansiyel geri dönüş riski oluşturmalarıdır. Öldürülen / etkisiz hale getirilen aşılar tipik olarak daha güvenli olmaktadır; bununla birlikte, zayıflatılmış aşılarından daha az etkili olabilmektedirler. Toksoidlere (inaktive edilmiş toksinler) dayalı ticari aşılarda, kültür ortamında kompleks bileşiklere ihtiyaç duymaları nedeniyle bazı dezavantajları olmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisini kullanarak çok sayıda hastalığa karşı daha etkili aşılar geliştirme çalışmaları tüm dünyada devam etmektedir. Rekombinant aşılar, yapı bazlı tasarım, epi-toplara odaklanma veya genomik bazlı tarama yoluyla rasyonel olarak tasarlanmış rekombinant yüksek oranda saflaştırılmış antijenlere dayanarak geliştirilmektedir. Bununla birlikte, rekombinant antijenlerin doğal immünojenikliği, daha geleneksel aşılarla kıyasla genellikle düşük olmakta ve rekombinant aşılarda başarılı olmasını sağlamak için güçlü ve güvenli aşı adjuvanlarına ihtiyaç olmaktadır. Rekombinant antijenlerde sıklıkla görülen düşük immünojeniklik, eksojen immün aktive edici bileşenlerin eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Rekombinant antijenler farklı adjuvanlarda sunulabilmekte ve immünomodülatör etkiler spesifik antijenlerle birlikte kullanılan spesifik adjuvana bağlı olmaktadır (Jorge and Dellagostin, 2017).

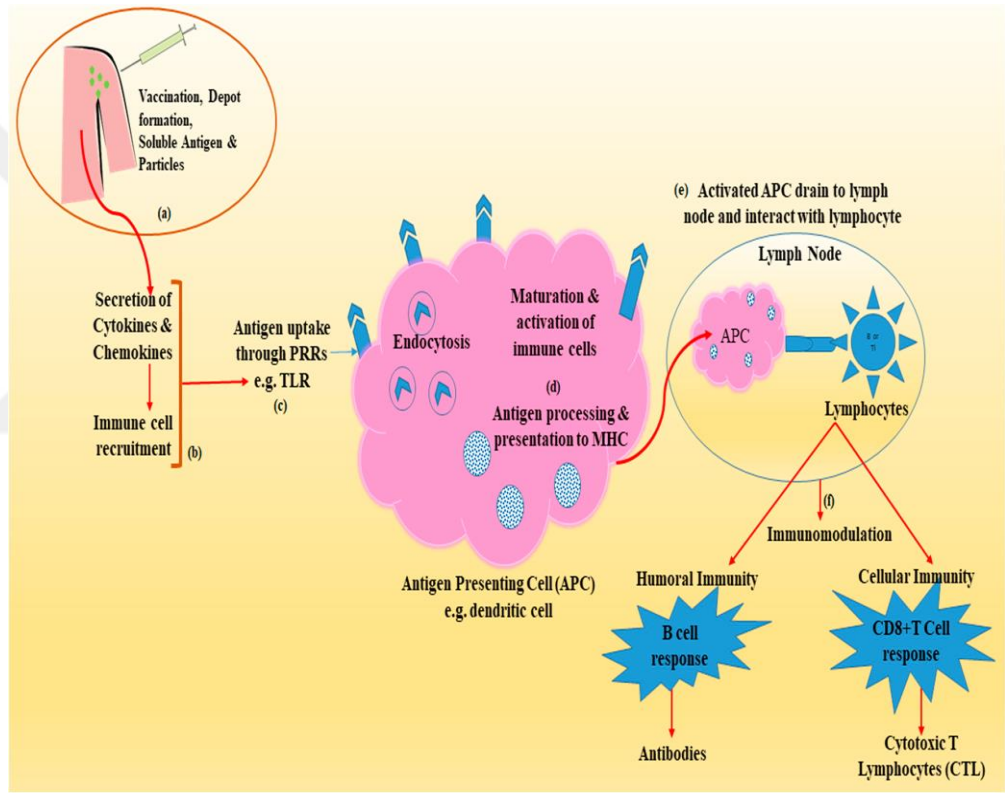
2.5.4. Aşı Adjuvanları

Tüm patojen aşilar güçlü bir immün cevap oluşturabilirken, yeni jenerasyon aşilar, iyi tanımlanmakta, iyi karakterize edilmekte ve daha güvenli olmakta fakat zayıf immünojenik ve adjuvan olmadığı takdirde zayıf koruma sağlamakta veya hiç koruma sağlayamamaktadır. Özellikle rekombinant protein aşilar için adjuvanlar büyük önem taşımaktadır. Sorunun çözümündeki temel problem adjuvanlarda ve/veya taşıyıcılarda yatmaktadır. Adjuvanlar, bağışıklık sistemi hücrelerinin (B ve T hücreleri) çoğalmasını ve farklılaşmasını hızlandırarak antijenlere karşı güçlü bir bağışıklık oluşturabilen ajanlardır.

Aşilar, konakçının bağışıklık sisteminin mikropları tanıması, yok etmesi ve hatırlaması ve gelecekte aynı mikrobiyal enfeksiyona karşı savaşması için uyarmaktadır. Canlı zayıflatılmış bir aşı gerçek bir patojeni tanıttığından konakçı için sadece bir veya iki dozla ömür boyu bağışıklığa yol açan bağışıklık tepkisinin tam bir simülasyonunu temsil etmektedir. Bununla birlikte, bu tür aşilar bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar da oluşabilecek riskler nedeniyle uygulanmamaktadır. Ayrıca, rekombinant DNA aşiları, alt ünite aşiları ve konjugat aşiları, güvenlikleri (canlı zayıflatılmış aşiların aksine virülan bir forma geri dönemedikleri için) ve rekombinant yöntemlerden büyük miktarlarda antijen üretme avantajı nedeniyle daha cazip hale gelmektedir (yani, seri üretim için ölçeklendirilmesi kolaydır). Bununla birlikte, bu aşilar hazırlanırken tüm organizmanın yalnızca belirli bir bölümünün kullanılması sebebiyle zayıf bir bağışıklık tepkisi üretmekte ve minimum yan etkileri olan bir konakçıya etkili koruma sağlamak için yeterli immünojenik yanıt sağlayamamaktadır. Bu bağlamda, antijeni uygun bir şekilde iletmek ve sağlam bir bağışıklık tepkisini tetiklemek için adjuvanlar ve dağıtım sistemleri genellikle gerekli olmaktadır. Adjuvanlar, aşı antijenleri ile birlikte kullanıldığında, tek başına aşı tarafından indüklenene kıyasla aşıya daha güçlü ve daha etkili bir yanıt veren maddelerdir. Aşılarla adjuvan ilavesi ile, antijenlerin immünojenikliğini arttırabilmekte; koruyucu bağışıklık için gerekli antijen miktarını veya bağışıklama sayısını azaltabilmekte; yenidoğanlarda, yaşlılarda veya bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerde aşiların etkinliğini arttırmaktadır.

Fonksiyon ve uygulamaya bağlı olarak, adjuvanlar üç ana kategoriye ayrılmaktadır; immünomodülatör moleküller, immünostimülatör olmayan dağıtım sistemleri ve ikisinin kombinasyonlarıdır.

Yaygın deneysel kullanımda veya klinik çalışmalarda bir dizi immünomodülatör molekül uygulanmaktadır. Özellikle, doğuştan gelen immün sinyal reseptörlerinin ligandları bunlar, TLR'ler (Toll benzeri reseptör) ve NLR'ler (Nod benzeri reseptörler) dahil olmak üzere başlıca immünomodülatör adjuvan tipleridir. Diğer adjuvan sınıfları için dağıtım sistemi esas olarak bağışıklık hücrelerine antijen sunumunu arttırmak için çalışmaktadır. Aşılar için en gelişmiş iki dağıtım sistemi lipozomlar ve virozomlardır (Petkar, Patil, Chavhan, Kaneko, Sawant et al., 2021; Zhu et al., 2014). Şekil 15' de aşı adjuvanlarının mekanizması anlatılmaktadır.



Şekil 15: Adjuvanların temsili etki mekanizması (Petkar et al., 2021).

Aşı adjuvanlarının mekanizması sırası ile; (a) Aşılamadan sonra, depo oluşumu (bazı durumlarda), parçacıklar ve çözünür antijenin serbest bırakılması; (b) Enjeksiyon bölgesinde çeşitli bağışıklık hücrelerinin işe alınmasında rol oynayan sitokinlerin ve kemokinlerin salgılanması, böylece immünokompetan ortamın oluşması; (c) Yüzeyde ve hücre içi olarak eksprese edilen kalıp tanıma reseptörleri (PRR'LER) örnek olarak Toll benzeri reseptör (TLR) gibi çeşitli örüntü tanıma reseptörleri yo-

luyla antijen alımı. Bu PRR'LER antijenler ve adjuvanlar tarafından tanınır ve aktive edilir; (d) Antijen sunan hücreler (APC' ler) tarafından antijen alımı, immün hücrelerin olgunlaşmasına ve aktivasyonuna ve MHC ekspresyonunu yukarı regüle ederek majör histo-uyumluluk kompleksine (MHC) sunum için daha fazla işleme yol açar; (e) Etkinleştirilen apc'ler daha sonra lenf nodu drenaja geçer lenfosit ile etkileşime girmek için; (f) bu, humoral ve hücrel bağışıklığı tetikleyerek immünomodülasyona yol açmaktadır (Şekil 15).

Günümüz aşılarda kullanılan birçok adjuvan çeşidi vardır. Bunlar,
Alüminyum tuzları (ALUM)

Alüminyum tuzları, en yaygın kullanılan inorganik immün adjuvanlardan biridir ve insan aşılarda en yaygın kullanılan adjuvanlardandır. Alüminyum tuz adjuvanları esas olarak şap, alüminyum hidroksit ve alüminyum sülfat olarak sınıflandırılmaktadır. Ticari aşılarda alüminyum tuzu adjuvanlarının ana bileşenleri alüminyum hidroksit ve alüminyum fosfat olmasına rağmen, adjuvan olarak kullanılan ilk alüminyum tuzu şap olmuştur. Şap adjuvanları, bağışıklık tepkilerini tetiklemek için iki ana mekanizma kullanmaktadır. İlk mekanizma, dendritik hücreler ve diğer bağışıklık hücreleri tarafından antikor üretimini destekleyen bir bağışıklık sinyali olan interlökin-1 β (IL-1 β) salgılanmasının indüklenmesidir. İkinci mekanizmanın, immün uyarıcı olarak görev yapan ölmekte olan hücrelerden salınan DNA ile enjeksiyon bölgesinde immün hücrelerin öldürülmesi olduğu düşünülmektedir. Geleneksel alüminyum tuzlarına ek olarak, alüminyum nanopartiküllerin formülasyonları da immün adjuvanlar olarak kullanılmaktadır (Wu and Liu, 2021). Her ne kadar geleneksel olarak öncelikle antijen için uzun süreli bir depo oluşturarak ve antijen sunan hücreler tarafından alımını teşvik ederek işlev gördüğü düşünülse de, doğuştan gelen immün stimülasyonun da şapın adjuvan aktivitesi birincil rol oynamaktadır. Genel olarak, alüminyum tuzları, insanlarda değerlendirildiğinde T hücresi tepkilerinin zayıf indüklemektedir (Coffman, Sher and Seder, 2010).

Viral vektör,

Virüsten evrimleşmiş bir araçtır ve bağışıklık tepkilerini başlatmak için istenen bir antijeni kodlayan genetik materyali alıcının konakçı hücrelerine iletmek için bir viral vektör kullanan bir aşıdır. Vektör, bir etkeni vücuda ya da hücre içine sokabilmek için kullanılan aracı-taşıyıcıyı tanımlamaktadır. Viral vektör aşılı,

vektör olarak kullanılan virüs veya antijenin kaynağı ile enfeksiyona neden olmamaktadır. Sağladığı genetik materyal, bir kişinin genomuna entegre olmamaktadır. Viral vektörler, genomun stabilitesi, üretim kolaylığı, maliyet etkinliği, canlı / zayıflatılmış aşılarla göre hücre özgüllüğü, verimli ekspresyonla çoklu immünojeniklik sağlama yeteneği ve güçlü bağışıklık tepkisi gibi bazı ortak avantajlar sunmaktadır. Viral vektörler, hassas bileşiklerin kapsüllenmesi ve korunması gibi benzersiz özelliklerinden dolayı aşıların geliştirilmesinde hayati bir rol oynamaktadır. Yüzey kısmında yapılan modifikasyonla, doğuştan gelen biyoyumlulukları ve doğal olarak immünojenik özellikleri ile aktif olarak hedeflenen ilaç dağıtım sistemleri olarak gelişmelerine yol açmaktadır. Klinik / prelinik çalışmalarda retrovirüs, lentivirüs, adenovirüs, adeno-ilişkili virüs, herpesvirüs, çiçek virüsü, veziküler stomatit virüsü, alfavirüs, kızamık virüsü, poliovirüs, sitomegalovirüs, sendai virüsü ve HBV gibi sağlam bir bağışıklık tepkisi ve gelişmiş hücresel bağışıklığı indüklemeye yetenekleri nedeniyle çeşitli viral vektör tipleri kullanılmıştır. Bununla birlikte, klinik kullanımlarını sınırlayan toksisiteleri, viral antijenlere karşı bağışıklık tepkileri veya potansiyel viral rekombinasyonu, büyük veya karmaşık yapıları gibi bazı riskleri barındırmaktadır. Farklı uygulama yolları için influenza, tetanoz, sıtma, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve COVID-19'a karşı birçok aşı için mükemmel bir dağıtım platformu sağlamaktadır (Petkar et al., 2021).

Virüs Benzeri Parçacıklar (VLP'ler) ve Virozomlar,

VLP'ler, viral proteinin kendi kendine montaj mekanizması (self assembly) tarafından in vitro protein ekspresyonu sırasında kendiliğinden hazırlanan doğal viryonlara benzeyen içi boş, multiprotein, çoğalmayan ve bulaşıcı olmayan yapılardır. Virus-benzeri partiküller inert, boş viral kapsid ya da kapsid proteinleridir. DNA yada RNA içermezler ama viral yapı korunmaktadır. Bu sayede viral enfeksiyon taklit edilebilmektedir.

Vlp'ler, viral bileşenlerin bulaşıcı olmayan bir alt kümesinin varlığı nedeniyle bir tür alt birim aşı olarak kabul edilmektedir. Genetik materyali olmadığı için herhangi bir enfeksiyona sebep olmamaktadır. Bununla birlikte, antijenik proteinlerin doğal yapısı iyi korunmakta, bu da protein aşılarla kıyasla immünojenikliklerini arttırmaktadır. Bir diğer VLP'lere benzer alt birim aşı (dağıtım sistemi), virozomlar dır. Genel ilke genetik materyal içermeyen virüs partiküllerinin (viral zarf), antijenleri hedef dokulara taşımak için kullanılmasıdır. Zarflı viruslerin dış membranını virüsün

genetik materyalinden birtakım yöntemlerle ayırarak lipozom benzeri bir yapı oluşturulmaktadır. Oluşan yapı viral genom içermemekte dolayısıyla enfeksiyon riski yaratmamaktadır. Virozomlar sadece elde edildikleri virüslere karşı immünite oluşturmak için kullanılmamakta, aynı zamanda pek çok diğer aşı antijeni, ilaç, nükleik asit için taşıyıcı sistemler olarakta kullanılmaktadır. VLP'ler ve virozomlar yapısal ve morfolojik olarak enfeksiyöz virüslere benzemekte, enfektif viral partiküllerin hücreye bağlanma ve nüfuz etme kabiliyetini korumakta ve hem humoral hem de hücrel bağışıklığı uyarmaktadır. Ayrıca öldürülen / zayıflatılmış viral aşılarla ve çözünür antijenlere kıyasla güvenli ve kararlı olmaktadır. VLP'lerin ve virozomların bu özellikleri, pazarlanan birçok üründe kullanılmıştır; örneğin, Hepatit B virüsü (HBV), insan papilloma virüsü vb. (Petkar et al., 2021; Zhao et al., 2014) .

Emülsiyonlar,

Alüminyumdan sonra insan ve hayvanlarda en sık kullanılan adjuvanlardır. Bu grup yağ içinde su (water in oil, W/O; parafin içinde sıvı antijen) veya su içinde yağ (oil in water, O/W) emülsiyonları içermektedir. Enjeksiyon yerinde depo oluşturma ve buradan antijenin yavaş salınımı yolu ile plazma hücrelerinde antikor üretimini stimüle ederek etki ettikleri düşünülmektedir. MF59, skualen (% 4.3 v / v) (doğal olarak oluşan bir madde) ve iki yüzey aktif madde, polisorbata 80 (% 0.5 v / v, Tween 80) ve sorbitan trioleattan (% 0.5 v / v, Span 85) oluşan suda yağ (o / w) emülsiyonudur. ~ 160 nm büyüklüğünde damlacıkların oluşumuna yol açan sitrat tamponunda emülsifiye edilmiştir. İnsan vücudunda doğal olarak bulunması ve biyoparçalanabilir olması nedeniyle adjuvanların çoğunun yapısında bulunmaktadır. MF59-adjuvan mevsimsel grip aşısı (Fluad ®), 1997 yılında lisanslanan ilk MF59 aşısıdır. Yapılan araştırmalarda MF59, influenza aşısı için hem antikor hem de T hücre yanıtlarını indüklemekte şaptan (alum) daha üstün bir adjuvan olmasına rağmen, bazı hastalarda enjeksiyon bölgesinde ağrı ve reaktogenite gibi yan etkiler gözlenmiştir. MF59, bebeklerde ve küçük çocuklarda bağışıklık yanıtını etkili bir şekilde artırabilmektedir. Bir diğer adjuvan olan Montanid, doğal metabolize edilebilir bir yağ çözeltisinde mannid monooleat ailesinden yüksek oranda rafine edilmiş emülgatörler geliştirdi. Bu adjuvanların güçlü bir bağışıklık tepkisine neden olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, şiddetli lokal reaksiyonlar kullanımlarını sınırlandırmıştır (Del Giudice, Rappuoli and Didierlaurent, 2018; Petkar et al., 2021).

Freund'un Adjuvanı, Tamamlanmış Freund'un adjuvanı (CFA), sulu antijen çözeltilerinin emülsiyon haline getirildiği, ısıyla öldürülen *Mycobacterium tuberculosis* veya *M. butyricum* içeren bir parafin yağı ve yüzey aktif madde karışımıdır. Ancak yüksek reaktogenitesi nedeniyle (granulom, apse, artrit, amiloidosis, allerjik reaksiyonlar gibi) insanlarda kullanımından vazgeçilmiştir (Coffman et al.,2010).

Lipid Nanotaşıyıcı adjuvanlar

İmmünostimulant kompleks olan ISCOM (İmmünostimulatory Complex) adjuvanları, protein antijeni, saponin adjuvanı (Güney Amerika *Quillaia saponaria* Molina ağacının kabuğundan elde edilen Quil A), kolesterol ve fosfolipidleri içeren partikül komplekslerinden oluşmaktadır. Kolesterol, adjuvanın stabilitesine katkıda bulunması muhtemel olan ve aynı zamanda güvenliği için önemli olan saponinlerin hemolitik aktivitesini azaltan 40 nm büyüklüğünde benzersiz bir kafes benzeri partikül yapısı oluşturmak için saponin ile güçlü bir şekilde etkileşime girmektedir. Lipozomlardan daha sert ve stabil yapılara sahiptirler. Yapılan çalışmalarda HIV, influenza virüs, EBV (Eppstein-Barr virus, Human Herpes virus-4), HSV (Herpes simplex virus, Genital uçuk veya siğil) gibi aşı çalışmalarında başarılı sonuçlar alınmıştır. ISCOM hem hücresel hem humoral cevap oluşturmaktadır. Antijen alımını arttırmakta ve lenf düğümlerini boşaltırken DC'ler tarafından tutulmayı uzatmakta, DC'lerin aktivasyonunu indüklemekte ve güçlü antikor ve T hücresi tepkilerine yol açmaktadır (Coffman et al.,2010; Zhao et al., 2014).

Liposome, İki tabakalı lipidlerin oluşturduğu bir dış kabuk ve hidrofilik iç kompartmanı olan küresel yapılardır. Enfeksiyon ve otoimmün hastalık tedavisinde, kanser, deri hastalıklarında ve ayrıca astım ve artitte denenmektedir. Aşı adjuvanı olarak ise, antijen (peptid, mRNA veya DNA olsun) ya lipozomun yüzeyine adsorbe edilebilmekte, lipozom çekirdeğine veya çift katlı lipid katmanına yüklenebilmektedir. Yapısal özelliği sayesinde enkapsüle ettiği antijeni hızlı ekstrasellüler yıkımdan korumaktadır. Bu sayede gerekli antijen dozu azalmakta ve aşı etkinliği artmaktadır. Dış yapısına yerleştirilen doku spesifik antikorlar ve ligandlar sayesinde doku hedefi sağlanabilmektedir. Böylece aşı yan etki sıklığı azalmaktadır. Bu özellik ciddi yan etkileri olan kanser aşılı için önemlidir. Lipozomlar, DNA ve protein ile birlikte “codelivery” sistemi olarak kullanılabilir. DNA sayesinde MHC tip1, protein sayesinde MHC tip2 sunum olmakta ve hem CD8(+) hem de CD4(+) hücreleri aktive olmaktadır. Bununla birlikte bu sistemin üretimi, stabilitesi ve kalitesi şu an için

aşılması gereken en önemli problemler olarak gösterilmektedir (Zhao et al., 2014; O'Hagan and Singh, 2003).

Polimerik Nanoyapılar

Biyolojik olarak parçalanabilen polimerik nanopartiküller (PNP'ler), aşı antijenlerinin hedef bölgeye ulaşana kadar korunması / stabilizasyonu ile ilgili ilginç özellikler göstermektedir. PNP'lerin hazırlanabileceği çok sayıda polimerler bulunmaktadır, (poli- (D, L-laktid-ko-glikolid) (PLGA), poli- laktik asit (PLA), Poli alkil siyanoakrilat (PACA) , polianhidritler ve kitosan vb. Özellikle, kitosan bazlı nanopartiküller biyoyumlulukları, biyolojik bozunabilirlikleri, toksik olmayan yapıları ve istenen şekil ve boyutlarda kolayca değiştirilebilmeleri nedeniyle geniş çapta çalışılmaktadır. Bu nanopartiküller, HPV aşıları da dahil olmak üzere çeşitli aşılarda hazırlanmasında kullanılmaktadır. Alternatif yolla iyi bilinen bir kompleman aktivatörü olan inulin de güçlü bir adjuvandır. AdvaxTM gibi inulinden türetilen nanopartikül adjuvanları, influenza ve hepatit B dahil olmak üzere çeşitli virüslere karşı aşılarda immün yanıtın arttığını göstermiştir. PLGA adjuvanı hepatit B virüsü (HBV), Bacillus anthracis ve ovalbümin ve tetanoz toksoidi gibi model antijenler olarak monofosforil lipid A ile Plasmodium vivax dahil olmak üzere çeşitli patojenlerden türetilen antijeni taşımak için kullanılmıştır. PLA, PLGA, PEG gibi polimerler ve polisakkaritler gibi doğal polimerler de bir tür nano boyutlu hidrofilik üç boyutlu polimer ağı olan hidrojel nanoparçacıklarını sentezlemek için kullanılmaktadır. Nanojeller, esnek ağ boyutu, çok değerlikli konjugasyon için geniş yüzey alanı, yüksek su içeriği ve antijenler için yüksek yükleme kapasitesi gibi olumlu özelliklere sahiptir. Karbon nanopartiküller, ilaç ve aşı dağıtımı için yaygın olarak çalışılan bir başka bileşimdir. İyi biyoyumlulukları ile bilinirler ve çeşitli nanotüplere ve mezopor kürelere sentezlenebilmektedir (Zhao et al., 2014; O'Hagan and Singh, 2003). Bu polimerlerin biyolojik olarak parçalanabilme özelliği antijen taşıyıcı sistem araştırmalarında umut verici araçlar olmaktadır; ancak, araştırmacılar bu taşıyıcı sistemler de ele alınması gereken istikrar ve doz optimizasyon sorunları gibi problemler için çalışmalar yapmaktadır.

Tiplerine bağlı olarak, antijenler nanopartikül'lerin yüzeyinde kapsüllenebilmekte veya adsorbe edilebilmektedir. Antijenin kapsüllenmesi, zararlı gastrointestinal ortamdan korunmasını sağlamakta, sistemik dolaşımdaki ilaç bozulmasına (fagositozdan kaçınarak ve ilacı sitoplazmada serbest bırakarak) ve uzun bir süre boyunca sürekli salınmaya karşı korumakta, antijenin nanopartikül'lere

adsorpsiyonu sırasında nanopartikül'lerin formülasyon işlemi sırasında zararlı organik çözücüler veya asidik Ph 'a maruz kalmayı önlemektedir. Çeşitli klinik öncesi çalışmalar, poli nanopartikül'lerin uygulanmasında antijene özgü bağışıklığın önemli ölçüde indüklendiğini göstermiştir. Polianhidrit bazlı nanopartiküller ve kitosan nanopartiküller, APC'leri aktive ederek adjuvan benzeri özellikler sergilemekte ve hem humoral hem de hücre aracılı immün yanıtları kendi başlarına indüklemektedir (Petkar et al., 2021; Kim et al., 2014).

Aşı dağıtımında dendrimerler, siklodekstrinler gibi yeni malzeme sınıfları da araştırılmıştır. Dendrimerler boyutlarından ve yüzey yüklerinden dolayı biyouyumlu özelliktedir. Optimal özellikleri, onları aşılarda verimliliğini artırabilecek etkili immün sistemi uyarıcı adjuvan yapmaktadır (Petkar et al., 2021)

Biyolojik olarak parçalanamayan nanopartiküller, aşı dağıtım sistemleri ve yardımcı maddeler olarak altın, karbon, silika, kuantum noktaları ve polistiren gibi biyolojik olarak parçalanamayan çeşitli malzemeler kullanılmaktadır. Uzun bir süre dokuda kalmakta ve böylece antijeni gelişmiş immünojenikliğe sahip dokulara sunabilmektedir. Genel olarak, belirli hücreleri hedeflemek için nanomalzemelerin yüzey işlevselleştirilme mekanizması ile çalışmaktadır. Biyolojik olarak parçalanamayan malzemeler, farklı fonksiyonel gruplar ve antijenlerle konjugasyonu kolaylaştırır da, daha yüksek hücresel ve humoral tepkiye neden olmaktadır, ancak genellikle daha fazla güvenlik doğrulaması gerektiren dokularda toksisiteye ve agregasyona yol açmaktadır. Karbon nanopartiküller, ilaç ve aşı dağıtımı için yaygın olarak çalışılan bir başka bileşimdir. İyi biyouyumlulukları ile bilinirler ve çeşitli nanotüplere ve mezopor kürelere sentezlenebilmektedirler. Protein ve peptid antijenlerinin çoklu kopyaları, teslimat için karbon nanotüp'lere konjuge edilebilmiş ve IgG yanıt seviyesini arttırmıştır. Mezoporöz karbon nanopartiküller oral aşı adjuvanı olarak kullanılmak üzere incelenmiştir. Kalsiyum fosfat nanopartikülleri, belirli koşullar altında kalsiyum klorür, dibazik sodyum fosfat ve sodyum sitratın karıştırılmasıyla oluşturulabilmektedir. Toksik değildirler ve 50-100 nm boyutlarında oluşabilmektedir. Bu nanopartiküller DNA aşılarda ve mukozal bağışıklık için yararlı adjuvanlardır ve mükemmel biyouyumluluk göstermektedirler. Birkaç klinik öncesi çalışma, işlevselleştirilmiş kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin (100-400 nm), dendritik hücrelerin aktivasyonu ile hem doğrudan hem de adaptif bağışıklığı indükleyebildiğini göstermiştir. Karbon nanopartikül'ler, birçok aşı için bir adjuvan olarak alüminyuma alternatif olarak araştırılmaktadır. Kolloidal stabil

nanopartiküller, dekstran, pullulan ve mannoz gibi çeşitli karbonhidratlar suda çözünürlüğü nedeniyle sulu bir çözeltide kendi kendine bağlanamamaktadır. Onları amfifilik yapmak için hidrofobik malzemeler (örneğin, kolesterol) ile konjuge edilebilmektedirler. Bu moleküllerin kendi kendine montajı (proteinli ve proteinsiz) kolloidal olarak stabil oluşumuna yol açan 30-40 nm büyüklüğünde nanopartiküllerdir (Petkar et al., 2021)

Proteozomlar

Proteazom, *Neisseria meningitidis*'in ana dış membran proteinlerinden (OMP'ler) oluşan hidrofobik, proteinli nanopartiküllerden (~ 150 nm) oluşmaktadır. OMP'ler 1981'den beri pazarlanan bir meningokok aşısında (Menomune ® , Sanofi Pasteur) başarıyla kullanılmaktadır. Hidrofobik OMP, proteazom ile antijen arasındaki uygun komplekslerin oluşumuna yol açan kovalent olmayan etkileşime bağlı olarak polar veya amfifilik antijenlerin verilmesi için iyi bir sistemdir. Çeşitli insan klinik çalışmaları, proteozomları, esas olarak intranazal uygulamadan sonra, insan kullanımı için güvenli ve iyi tolere edilen materyaller olarak nitelendirmiştir (Petkar et al., 2021).

Kalıp tanıma reseptör hedefli adjuvanlar, Kalıp tanıma reseptörleri veya PRRler, mikrobiyal patojenler ilgili molekülleri tanımak için bağışıklık sistemi hücrelerince üretilen proteinlerdir.

Hücre yüzeyinde ve endozomal membranlarda lokalize olan TLR ligandları, patojenle ilişkili moleküler kalıpları (PAMP'ler) ve tehlike / hasarla ilişkili moleküler kalıpları (DAMP'ler) tanıyabilen tek transmembran PRR'lerdir. Doğuştan gelen bağışıklık sistemini indüklemek için güçlü bir immünomodülatör olarak, birçok çalışma TLR ligandlarının hem kanser aşısı adjuvanları hem de immünoterapötik ajanlar olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Son zamanlarda geliştirilen aşı adjuvanlarının çoğu aşı verimliliğini arttırmak için retinoik asit indüklenebilir gen I (RIG- I) benzeri reseptörler (RLR'ler) yer verilmektedir. RLR'ler, hem doğuştan hem de edinilmiş immün yanıtları düzenleyen mekanizmalar aracılığıyla tip I ve III interferonların ve enflamatuar sitokinlerin üretimini aktive ederek virüslere karşı immün yanıtta önemli roller oynamaktadır (Wu and Liu, 2021; Coffman et al.,2010).

2.5.5. Nanoteknolojik Aşılar

Antijenlerin ve adjuvanların immün sisteme taşınması ve koruyucu bir bağışıklık tepkisini teşvik etmek amacıyla çok sayıda aşı nanotaşıyıcıları tasarlanmış ve araştırılmıştır (Kim et al., 2014).

Yeni nesil aşı adjuvanlarına yönelik beklentiler, zayıf antijenlerin bağışıklama etkinliğinin artması, istenen tiplerde gelişmiş T hücresi tepkileri ve güvenlikten ödün vermeden çok yönlü genişleyen bağışıklık tepkilerinin üretilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Malzeme bilimi ve nanoteknolojideki artan ilerlemelerle, istenen aktivite ve güvenlik ile yeni adjuvanların rasyonel tasarımı ve üretimi mümkün hale gelmektedir. Nanomalzemeler tarafından sağlanan antijenler bozulmaya karşı korunabilir ve sürdürülebilir bir şekilde salınabilir ve antijen sunan hücreler (APC'LER) tarafından alımları daha verimli olmaktadır. Ayrıca, bir dizi çalışma, hücrel ve humoral immün yanıtlarda nanomalzemelerin doğal düzenleyici aktivitesini göstermektedir. Bu nedenle, nanomalzemelerin hem taşıyıcı hem de immünomodülatör etkilerinin adjuvan uygulamalara entegrasyonu, aşılamanın immün sonuçlarına büyük ölçüde fayda sağlayacaktır. İdeal bir adjuvan geliştirmek için, bir adjuvanın hem immünomodülatör aktivitesi hem de dağıtım fonksiyonu göz önünde bulundurulmalıdır. Yeni nesil adjuvanlar her ikisi için de optimize edilmelidir çok işlevli malzemeleri sayesinde faaliyetler ve nanomalzemeler, dağıtım ve immünostimülatör fonksiyonları birleştirmek için umut verici bir platformu temsil edebilmektedir. Nanopartiküllerin immün hücre alımı üzerindeki etkileri esas olarak fagositleri teşvik etme yetenekleri ile proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve adezyon molekülleri üretmeye dayanmaktadır. Bu moleküllerin salgılanması ve ekspresyonu, makrofajlar, DC'ler, T hücreleri, nötrofiller, bazofiller ve eozinofiller dahil olmak üzere bağışıklık hücrelerinin üretilmesine neden olmaktadır (Zhu et al., 2014).

Çoğu aday aşı “minimalist” bileşimleri temsil eder ve bu da tipik olarak daha düşük immünojeniklik sergiler. Modern aşılar çağına doğru ilerledikçe immünojenikliği artıran adjuvanlara ve yeni dağıtım sistemlerine giderek daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Nanopartiküller ve antijenleri içeren aşı formülasyonları nanoparçacık etkisi ile dağıtım sistemine veya bağışıklık güçlendirici yaklaşımlara dayalı olanlara sınıflandırılabilir. Bir dağıtım sistemi olarak, nanopartiküller

bağışıklık sisteminin hücrelerine antijen verebilir, yani antijen ve nanopartikül bağışıklık hücresi tarafından birlikte yutulmakta veya geçici bir dağıtım sistemi olarak işlev görür, yani antijeni korur ve sonra hedef yerde serbest bırakılmaktadır (Zhao et al., 2014).

Halk sağlığı ve koruyucu hekimlik çerçevesinde nanomedikal araştırmaların büyük küresel bulaşıcı hastalıklara karşı aşılar geliştirebileceğine dair çok az şüphe vardır. Örnek olarak bu yöntemle geliştirilmiş olan yeni yardımcı maddeler verilebilir. Bir adjuvan, herhangi bir spesifik antijenik etkiye sahip olmadan bir aşıda birlikte verildiği antijenlere karşı bağışıklık tepkisini arttıran bir ajandır. Mevcut aşılarda nispeten az sayıda adjuvan kullanılmaktadır ve hem yeni dağıtım sistemlerine hem de bağışıklık güçlendiricilere olan ihtiyaç yüksek kalmaktadır (Stammers et al., 2013).

Nanotaşıyıcılar antijen sunan hücrelere antijenlerin veya adjuvanların sürekli salınımını yaparak ve / veya hücreler hedeflemeyi kolaylaştırabilmektedir. Makrofajlar ve dendritik hücreler gibi fagositik hücreler 10 mm'den küçük parçacıklar tarafından kolayca alınmaktadır. Bu özellik hücrelerin antijen alımını geliştirmek için kullanılır ve böylece antijenin tanıma ve sunum etkinliğini arttırmaktadır. Yüzeyde modifiye edilmiş nanokariyerler antijenlerin hedeflenen bölgeye teslimata yardımcı olabilmektedir (Kim et al., 2014).

Hem profilaktik hem de terapötik yaklaşımlarda, nanopartiküller, hem antijen fonksiyonunu arttırmak için bir ilaç dağıtım sistemi olarak ve / veya bağışıklığı aktive etmek veya arttırmak için bir immünostimülant adjuvanı olarak kullanılmaktadır. Terapötik nano aşı çoğunlukla kanser tedavisi için uygulanmakta ve Alzheimer, hipertansiyon ve nikotin bağımlılığı gibi diğer hastalıkları veya koşulları tedavi etmek için giderek daha fazla araştırılmaktadır (Zhao et al., 2014).

Nanoteknolojik aşılar günümüz aşılarındaki belli kısıtlamaları azaltmaktadır. Buna örnek olarak hepatit B aşısı verilebilir. Günümüzde kullanılan Hepatit B aşısı rekombinant teknoloji ile üretilmiştir ve mevcut olan aşılar gelişmekte olan birçok ülkedeki koşullara ideal olarak uygun değildir. Depolama için 2 ila 8 ° C arasında soğutma gerektirir ve maksimum bağışıklığın uzun bir süre boyunca üç dozun uygulanmasını gerektirir - ilk iki doz bir ay arayla ve üçüncüsü ikinci dozdan altı ay sonra uygulanır. Her dozun uygulanması için şırınga ve iğnelere olan gereksinim, potansiyel tehlikeleri beraberinde getirir, yılda 21 milyon yeni hepatit B

enfeksiyonunun sağlık ortamlarında güvenli olmayan enjeksiyonlardan kaynaklandığı tahmin edilmektedir .

Öte yandan bir nano-emülsiyon, mevcut hepatit B aşları için halihazırda kullanılan ve iğnelerin kullanımını engelleyen antijenler için yeni bir dağıtım yöntemidir. Michigan Üniversitesi Nanoteknoloji Tıp ve Biyolojik Bilimler Enstitüsü, intranazal olarak uygulanan süper ince bir yağ, su ve yüzey aktif madde emülsiyonuna dayanan, iğnesiz bir aşılama yöntemi geliştirmiştir (Stammers et al., 2013).

Aşılar, monoterapiler olarak veya daha sıklıkla immünoterapi, kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi gibi diğter terapötik modalitelerle kombinasyon halinde kanser immünoterapisi için muazzam bir potansiyele sahiptir. Kanser immünoterapisi için nanoaşılar lenf düğümleri (LNs) gibi ikincil lenfoid organlar için etkili bir taşıyıcı ve doku bariyerleri penetrasyon, antijen ve adjuvanın berbaer bulunduğu özel olarak tasarlanmış bir taşıyıcı, hücre içerisine ayarlanabilir aş salınımı, etkin hücre içi aş sunumu, antijen sunan hücrelere antijen çapraz sunumu gibi özgül karaktere yönlüdür. Bu nedenle, aşların terapötik etkinliğini artırmak için ikincil lenfoid organlara alt ünite aşısını verimli bir şekilde sağlayabilen nanoteknolojiler de dahil olmak üzere yeni teknolojiler umut vericidir. Örneğin, nanovasinler kan dolaşımına hızla yayılımının aksini önleyebilir ve lenfatikler tarafından lns'ye verimli bir şekilde boşaltılabilir, bu da nanovasinin ln'de yaşayan lenfositlerle etkileşime girmesi için uzun bir zaman penceresi sağlamaktadır. Nanoaşılar ayrıca, minimum bağışıklık tolerans ile geniş bir antikanser T hücresi tepkisini indüklemek için kanser antijeni ve adjuvan veya çoklu epitop antijenleri de verebilmektedir. Nanoaş bazlı kanser tedavisini gerçekleştirmek için, endojen fagositik hücrelerin (örneğin, dendritik hücreler, makrofajlar, monositler, nötrofiller) alımını sağlamak, doğuştan gelen ve adaptif immün hücreleri uyarmak için vücuda eksojen nanoaşılar uygulanabilmektedir (Zhu, Zhang, Ni, Niu and Chen, 2017)

Aşı tasarımına nanoteknolojik bir yaklaşımın en büyük yararlarından biri, dağıtım aracının moleküler tasarımına daha kolay dikkat edilmesi, nanotaşıyıcıların moleküler tanıma yoluyla belirli mikroorganizmalara veya hücrelere hedeflenmesi ve aynı zamanda en uygun şekilde zamanlanmış bir salımın sağlanmasıdır. Nanoaşılar, hastalık durumuna uygun dengeli bir dağıtım için tasarlanabilmektedir ve taşıyıcının boyutunu, şeklini ve yüzeyinin tasarlanması istenilen dağılımı elde etmek için

mümkün olmalıdır. Nanoteknoloji örneğin, adjuvanı bağışıklık sistemine daha doğrudan tanınabilir hale getirerek daha iyi alternatifler sağlayabilmektedir;.

İnsan papilloma virüsünde (örneğin) bulunan alüminyum gibi geleneksel adjuvanlar (HPV) aşıları, gerçekte nasıl çalıştıklarına dair teorik bir anlayış olmadan kullanılırken, nano ölçekte daha iyi kontrol edilerek eksikliğin ne olduğu belirlenip çözülebilmektedir. Bu, belki de daha az umut verici adjuvanların sayısını azaltmak (deneysel olarak yüzlerce var) ve çok daha küçük bir adjuvan dozu kullanmak anlamına gelmektedir. (Stammers et al., 2013).

2.5.6. KKN Aşı Geliştirilmesinde Kullanımı İle İlgili Bilgiler

Fotoluminesansları nedeniyle, KKN'lar, viral enfeksiyonlarda alt hücrelerin göstermiş olduğu morfolojik değişikliklerin izlenmesi için kullanılabilir. Bu da KKN'ların floresan görevi ile canlı sistemlerde virüs görüntülemesi için uygun aday olmaktadır. Bu sadece teşhiste değil, aynı zamanda enfeksiyon sırasında virüslerin davranışlarını incelemek için kullanılabilir. Viral hastalıkların tedavisi göz önüne alındığında, mükemmel biyouyumluluk ile KKN'lar gelecek vaat eden antiviral özellikler sergileyebilmektedir. Seçilen karbon öncüsüne bağlı olarak kolay ve nispeten ucuz sentezlenmesine karşın potansiyel geniş spektrumlu aktivite ile yepyeni antiviral ajanlar geliştirmek için harika bir fırsat sunmaktadır. Antiviral aktiviteye sahip olan çeşitli öncüllerin karbonizasyonuna dayanan KKN sentezlerine aşağıdan yukarıya yaklaşımlar çok umut verici görünmektedir. KKN'ların glisirizik asit, kurkumin ve karrageenan gibi doğal öncüllerden ucuz yeşil sentezlerle hazırlanması ile bu kadar basit hazırlanmış karbon noktalarının umut verici antiviral özellikler göstermektedir. Karbon noktaların antiviral aktivitesini geliştirmenin veya indüklemenin bir diğer yolu, antiviral etkilere sahip moleküllerle sentetik olarak hazırlanması olarak gösterilmiştir. KN'larının antiviral etkisinin mekanizmasının daha derin bir şekilde anlaşılmasının yanı sıra yapı–aktivite (boyut, şekil, yüzey yükü vb. şartları) ilişkisini açıklığa kavuşturmak için hala güçlü çalışmalar gerekmektedir. (Belza, Opletalova and Polakova, 2021)

Başka bir çalışma da, hidrotermal yöntem ile sentezlenen KKN'ların gp85 proteinine karşı Ab yanıtını arttırmak için bir adjuvan kompleksler olarak potansiyeli araştırılmış. Çalışmada KKN'lar ve Ab arasındaki ilişkiye odaklanılmış ve model

olarak gp85 proteini seçilmiş. KKN'lara bağılı hazırlanan aşının tavuklarda ALV-J'ye karşı etkileri belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, KKN'ların ilk kez tavuklarda ALV-J'ye karşı mükemmel bir adjuvan görevi görebildiği gözlemlenmiştir. Gp85-KKN aşısı, tavukları yüksek IgG seviyeleri üretmeye ve kalıcı koruma sağlamaya teşvik edebilmiştir. Bir aşının bileşeninde bağışıklık hafızasını indükleme yeteneği önemli bir faktördür. Çalışmada, bağışıklamadan sonra ortaya çıkan koruyucu immün yanıtın uzun ömürlülüğünün belirlenmesi amaçlanmıştır. IgG seviyeleri ölçülmüş ve Gp85-KKN'ların 2 kez immünizasyondan sonra 49 D'de en yüksek Ab seviyelerine ulaştığını göstermiştir. Bu bulgu, KKN'ların antijene özgü Th2 alerjik immün yanıtları da dahil olmak üzere antijene özgü Ab yanıtlarının üretimini indükleyebileceğini ortaya koymuştur (Cheng, Xu, Zhou, Liu, Geng et al., 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Sigma Aldrich'ten sitrik asit, sodyum sitrat, polietilen glikol 3350 ve metil selüloz (4000 cp) ve sıçan insülini satın alındı. L-sistein Biobasic'ten alındı. bir model peptid olarak kullanılır (insülin. KKN'ların sentezi için bir mikrodalga cihazı (Anton Paar) kullanıldı. Selofan membranı (Şeffaf Viyolonsel Ruloları, kalınlık 25,4 mikrometre, Paper Mart, 2164 N. Batavia Street Orange, CA 92865) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. *Kullanılan KKN Örneklerinin Hazırlanması ve Özelliklerinin İncelenmesi*

Çalışmada 4 farklı karbon kuantum nokta örneği kullanılmıştır (Resim 1). Bunlar;

1. Kuantum nokta örneği (Q1) (ph: 3)
SAMH (1 gr) + L-sistein (0.025 gr) + Distile Su (5 ml) + PEG3350 (0.1 gr)
2. Kuantum nokta örneği (Q2) (ph:7)
Na-sitrat (1 gr) + L-sistein (0.025 gr) + Distile Su (5 ml) + PEG3350 (0.1 gr)
3. Kuantum nokta örneği (Q3) (ph:4)
SAMH (1 gr) + EDA (10 Damla) + Distile Su (5 ml) + PEG3350 (0.1 gr)
4. Kuantum nokta örneği (Q4) (ph:13)
Na-sitrat (1 gr) + EDA (10 Damla) + Distile Su (5 ml) + PEG3350 (0.1 gr)



Resim 1: Karbon kuantum nokta örnekleri

Kimyasallar tartıldıktan sonra G30 reaksiyon vialine kimyasallar sıra ile aktarılacak ve magnetic karıştırıcıya koyularak iyice çözünmesi sağlanacaktır. 3 ve 4 nolu örneklerde , kimyasalların karışımı esnasında EDA ilave edilerek berrak ve şeffaf bir çözelti oluşturması sağlanmıştır (Jia et al., 2016). Ayrıca üretilen KKN örneklerinin vücut içerisinde stabilitesini korumak için her bir örneğe PEG3350 eklenmiştir (Darraudi., 2018). Ayrıca, herbir örneğin kontrol grubu hazırlanmıştır. Kontrol grubu olarak, herbir formülasyon tekrar hazırlandı fakat monowave cihazına konulmayarak kuantum nokta üretimi yapılmadı. Böylece kuantum nokta bulunan ve bulunmayan arasındaki farka bakılarak kuantum nokta'nın immün yanıtı stimule yada aktive etme yeteneğine bakılmıştır.

Örnekler tam olarak çözündükten sonra monowave cihazında reaksiyona koyulması için G30 viali cihaza koyulmuştur. Mikrodalga reaktörü (Monowave 300, Anton Paar) kurulmuştur. Karbon kuantum noktalarının üretimi için ısıtma prosedürü aşağıdaki gibidir:

- 1- İlk ısıtma: 0-140 ° C: 5 dakika
- 2- Tutma (Reaksiyon gerçekleşmesi için): 140 ° C: 20 dakika
- 3- Soğutma: 140 ° C-60 ° C, zaman sınırlaması kullanılmadı
- 4- Tüm adımlar için karıştırma hızı: 500 rpm.

Reaksiyonun sonunda karbon kuantum noktaları elde edildi ve UV altında luminesanslığına bakılmıştır. UV ışığı altında (365nm) çok parlak mavi floresan özellik gösterdiler, ancak sodyum sitrat kullanıldığında UV ışığı altında (365nm) açık yeşil floresan emisyonu gözlemlendi (Resim 2). Sadece çözeltinin başlangıç malzemesini veya pH'sını değiştirerek farklı renk emisyonları elde etmek mümkündür.

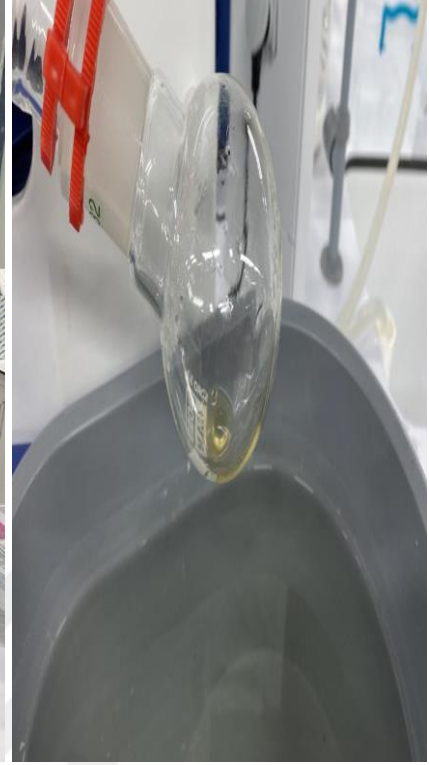


Resim 2: Karbon kuantum nokta örnekleri ve kontrol gruplarının UV cihazı altında görüntüleri.

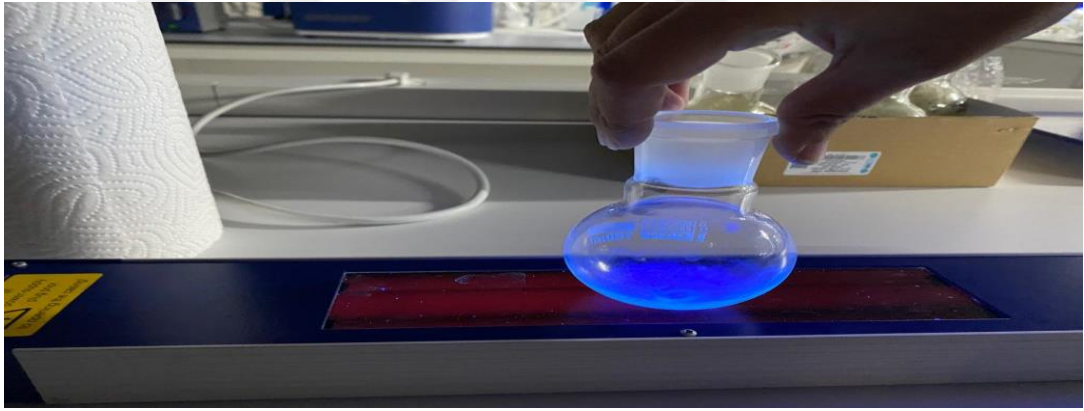
Elde edilen KKN örneklerini kuantum verimini doğru olarak saptayabilmek için saflaştırmak üzere her bir numuneye NaOH çözeltisi eklendikten sonra bir süre çözeltinin çökmesi beklenmiştir. Çökme işlemi gerçekleştikten sonra çöken maddenin üstünde kalan NaOH uzaklaştırmak için etanol eklenmiştir. Çöken çözelti alındı ve uçurma işlemi yapıldı. Uçurma işlemi ile çözelti içerisindeki etanol ve su uzaklaştırılarak saf KKN elde edilmiştir (Resim 3).



a)



b)



c)

Resim 3: Karbon Kuantum Nokta örneğinin saflaştırılması a) İçerisinde SAMH hammaddesi ile üretilmiş olan karbon kuantum nokta bulunan çözeltinin uçurulma işlemi. b)Uçurulma işlemi sonucu elde edilen saf KKN örneği. c) SAMH üretilmiş olan ve saflaştırılmış KKN örneğinin UV altında yaymış olduğu mavi floresan ışık.

3.2.1.1. Hazırlanan Kuantum Noktaların Fiziksel Görünüşleri

Hazırlanan karbon kuantum noktaları, saf su ile seyreltildikten sonra TEM (Transmission Electron Microscope-Carl Zeiss EM900) altında tanımlanmıştır. Ayrıca, Karbon kuantum noktaları, parçacık boyutları (PS), dağılımları ve zeta potansiyelleri (ZP) dikkate alınarak da karakterize edilmiştir (Lite sizer 500, Anton Paar).

3.2.1.2. Spektrofotometri Yöntemi Geçerlilik Testi (Validasyonu)

Validasyon, ürünlerin değerlendirilme aşamasında, kalitatif veya kantitatif analizlerde seçilen yöntemlerin bu analiz işlemlerinde uygulanabilir olduğunu göstermek için yapılan testlerin tümünü kapsamaktadır. Seçilen analitik yöntemin geçerliliğini göstermek için kullanılan parametreler: Doğruluk, Kesinlik, Saklanan Örneklerin Kararlılığı (Stabilite) , Doğrusallık, Seçicilik ve Duyarlılık tır.

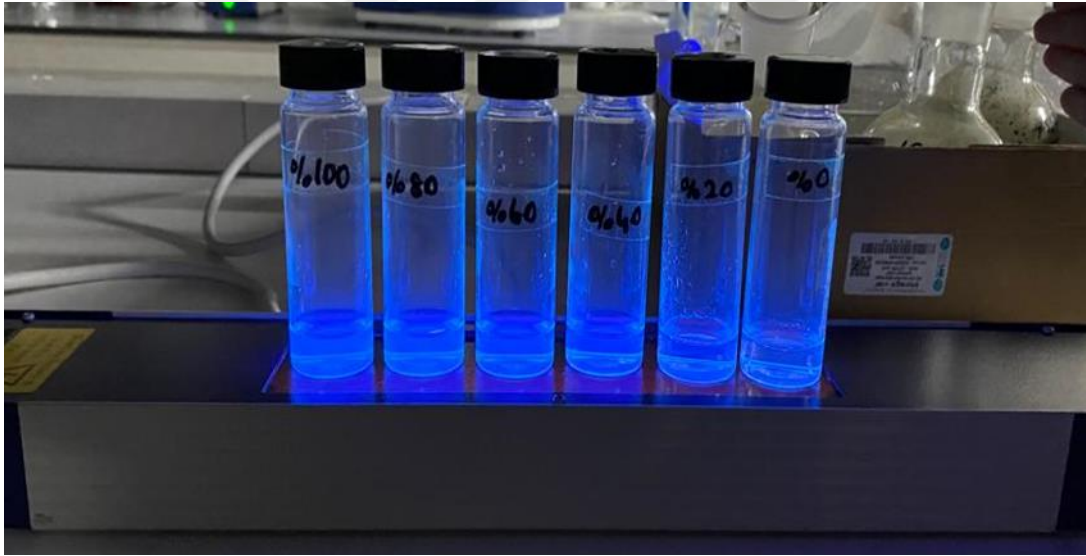
Değerlendirilen validasyon parametreleri için; maddelerin çeşitli konsantrasyonlarda çözündürülmesi ile örnekler hazırlanmış ve analizler 6 parametre üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Doğrusallık: En düşük derişimden en yüksek derişime doğru bir seri çözelti hazırlanarak yöntemin doğrusal olduğu aralığın belirlenme işlemine doğrusallık denir. Bu aralık belirlendikten sonra çözeltinin derişimine karşı elde edilen cevaplar grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilmektedir. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemi ve korelasyon katsayısı elde edilmektedir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir ölçüsüdür.

SAMH üretilmiş olan KKN için örnek hazırlama işleminde, saflaştırılmış KKN numunesine 15 ml distile su ilave edilmiştir. Hazırlanan çözelti belli konsantrasyonlarda su ile seyreltilerek stok çözeltiler hazırlanmıştır (Tablo 3). İçerisinde bulunan KKN yoğunluğuna göre hazırlanan her bir örnek farklı yoğunlukta floresans ışık yaymıştır (Resim 4).

Tablo 3: Belirli konsantrasyonda seyreltilen KKN örnekleri

	KONSANTRASYON	STOK (KKN)	Dsu
S100	100	5 ml	-
S80	80	4 ml	1 ml
S60	60	3 ml	2 ml
S40	40	2 ml	3 ml
S20	20	1 ml	4 ml
S0	0	-	5 ml



Resim 4: Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan SAMH üretilmiş KKN örneklerinin UV altında yaydığı floresan ışık yoğunlukları.

Spektrofluorometrik Yöntem Şartları: Spektrofluorometrik ölçümlerde 200-800 nm uyarma (excitation) ve yayma (emission) dalga boyu aralığında Cary Eclipse Floresans Spektrofluorometresi kullanılmıştır. Çalışma, 1.0 cm kuvarz küvetler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yayma (emission) spektrumları madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı yayma (emission) değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilmiştir.

Kesinlik: Aynı derişimde hazırlanan numunenin ardı ardına yapılan ölçümlerinin birbirine yakınlığı yöntemin kesinliğini göstermektedir. Yöntemin farklı günlerde gösterdiği kesinlik de yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermektedir. Bu; farklı günlerde aynı derişimde hazırlanan numunelerin ölçümlerinin birbirine yakınlığı ile değerlendirilmektedir. Kesinlik; standart sapma ve bağıl sapma değerleri ile değerlendirilmektedir.

Doğruluk; Ölçüm sonucu saptanan madde miktarı ile numune içerisindeki gerçek etkin madde miktarının yakınlığıdır. Yöntemin doğruluğunu kanıtlamak için bilinen konsantrasyonda örneklerin analizi yapılarak değerlendirilmektedir ve yöntemin doğruluğu geri elde etme yüzdesine bağlı olmaktadır. Elde edilen değer % 95 olasılıkla daha önceden kabul edilen aralıkta olmalıdır.

Seçicilik: Kullanılan analiz yönteminin yalnızca analiz edilmesi istenilen maddeyi saptayabilmesi gerekliliği özgünlük ve seçicilik olarak ifade edilmektedir. Formülasyona giren etkin madde dışındaki diğer maddelerin aynı dalga boyunda aynı yerde pik verip vermediğinin kontrolü yapılmaktadır.

Duyarlılık: Analitik yöntemin en düşük derişimdeki analitleri saptayabilmesinin bir ölçüsüdür.

Stabilite: Saklanan örneklerin analiz süresince bozunmadan sabit kaldığından emin olmak için yapılan testlere kararlılık (stabilite) denilmektedir. Hazırlanan karbon kuantum noktalarının partikül büyüklükleri, zeta potansiyelleri ve peptit içerikleri üzerindeki değişim stabilite göstergesi olarak belli bir süre boyunca (3 saat) gözlenmiştir.

3.2.1.3. Hazırlanan Kuantum Noktaların Floresan ve Kuantum verimi

Karbon kuantum noktalarının floresan özellikleri UV ışığı altında belirlenmiştir. Kuantum verimini belirlemek için doğrusal yöntem kullanılmıştır. 0.1-0.01 aralığında optik yoğunluklara sahip bir dizi çözelti hazırlanmıştır (Tablo 3) ve floresan yoğunluğa karşı optik yoğunluk grafiği elde edilmiştir. Çözeltiler hazırlandıktan sonra UV cihazında floresan özelliklerine bakılmıştır ve KKN yoğunluğuna bağlı olarak floresan ışık yoğunluğunun değiştiği gözlenmiştir (Resim 4). Elde edilen grafikten çizginin eğimi hesaplanmıştır. Kuantum verimi Formül 1. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$Q = Q_R \left(\frac{Grad}{Grad_R} \right) \left(\frac{n^2}{n_R^2} \right)$$

(1.)

Burada Q ve QR kuantum verimleridir ve n çözeltinin kırılma indisidir (test için (su) n = 1.3325 ve referans için (0.1M H₂SO₄ içinde kinin sülfat) n: 1.3333)

3.2.2. Hazırlanan Örnekler İle Yapılan İn-vitro Çalışmalar

3.2.2.1. Hücre Kültürü

Bu çalışma için RAW 264.7 hücreleri (ATCC) kullanılmıştır ve bu hücreler % 10 fetal sıgır serumu ve % 1 antibiyotikli (100 µg / cm³ penisilin ve 100 µg / cm³ streptomisin) Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) ortamından oluşan tam ortamda büyütülmüştür (Ayaz, Demir ve Bölgen, 2021; Yüzer, Ayaz ve Ince, 2019)

3.2.2.2. Karbon Kuantum Nokta Örnekleri Ve LPS İle Makrofaj Hücre Uyarımı

RAW 264.7 hücreleri, 1 cm³'te 10⁶ hücre/kuyucuk konsantrasyonunda inkübe edilmiştir. Testler için 24 oyuklu plakalar kullanılmıştır. Hücreler, örnekler eklenmeden önce 37°C'de %5 CO₂ inkübatöründe gece boyunca bekletilmiştir (Resim 5). Her bir kimyasaldan 1, 5 ve 10 µg/mL alınarak 1 µg/mL LPS ile birlikte ilgili kuyucuklara konulmuş ve 24 saat süreyle uyarılmıştır. Kontrol grup olarak 10 µg /mL Salisilik asit kullanılmıştır. Her kuyucuğun süpernatantları eppendorf tüplerinde toplanmış ve test edilene kadar -80 ° C'de tutulmuştur. Her set üç paralel test olarak yapılmıştır ve istatistiksel olarak incelenmiştir.



Resim 5: Örnekler eklenmeden önce hücreler 37°C'de % 5 CO₂ inkübatöründe gece boyunca bekletildi.

3.2.2.3. MTT Testi İle Hücre Canlılığının Ölçülmesi

Hücre sayımı ve proliferasyonu 24 saat sonra süpernatantlar çıkarılarak ve hücreler mikroskop altında tripan mavisi içinde sayılarak yapılmıştır. MTT testi ile hücrelerin aktiviteleri belirlenmiştir. Hücre proliferasyonunu belirlemek için MTT tahlili yapılmıştır. Deney prosedürü için ROCHE TOXO 1 kiti kullanılmıştır. Her deney seti, sonuçları çıkarmak ve istatistiksel testleri GraphPad Prism Sürüm 5 ile uygulamak için biyolojik olarak bağımsız üç deneyde kullanılmıştır (Ayaz, Demir ve Bölgen, 2021; Yüzer, Ayaz ve Ince, 2019).

3.2.2.4. ELISA Testi ile TNF α , IL12p40, GMCSF ve IL6 Belirlenmesi

BD Biosciences, CA, USA TNF α , IL12p40, GMCSF ve IL6 kitleri, ELISA testlerini yapmak için şirketin verdiği standart protokolüne göre çalışılmıştır (Ayaz, Demir ve Bölgen, 2021; Yüzer, Ayaz ve Ince, 2019).

3.2.2.5. Hücre İçi Fosforile P38 Boyama Ve Akım Sitometri Analizi

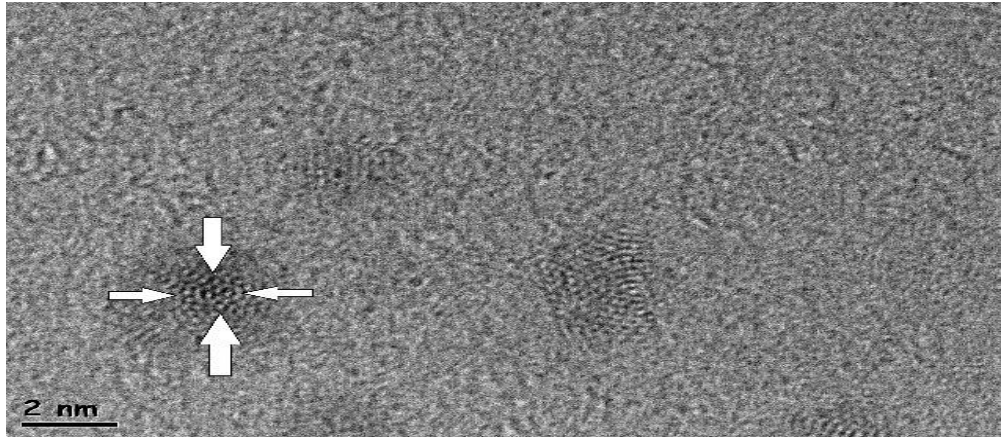
Makrofajlar, 24 oyuklu plakalara 1 ml'de 10^6 hücre / kuyucuk konsantrasyonunda inkübe edilmiştir. Örnekler uygulanmadan önce hücreler gece boyunca 37°C 'de % 5 CO_2 inkübatöründe dinlendirilmiştir. Her bir örnekten 10 ug/mL alınarak 1 ug/ ml LPS ile birlikte ilgili kuyucuklara konulmuştur. İmmünomodülatör aktivitelerini incelemek için 24 saat 37°C 'de % 5 inkübatör de LPS ile birlikte numuneler işlenmiştir. 24 saat sonra her kuyucuğun süpernatantları, ELISA analizi için -80°C 'de saklanmıştır. Kontrol grubu olarak 10ug/mL salisilik asit kullanılmıştır. Hücreler BD protokolünü göre BD Fix Buffer I (557870) ile düzeltilmiştir. Daha sonra hücreler, BD kitinin talimatlarını izleyerek BDPERM Buffer III (558050) kullanılarak geçirgenlik kazandırılmıştır. Daha sonra hücreler BD tarafından verilen protokolü izleyerek BD PE Mouse Anti-P38 MAPK (pT180/pY182) ile boyanmıştır. Daha sonra hücreler BD FACS Aria III akım sitometrisi ile analiz edilmiştir (Ayaz, Demir ve Bölgen, 2021; Yüzer, Ayaz ve Ince, 2019).

4. BULGULAR

4.1. Karbon Kuantum Nokta Örneklerinin Fiziksel Özellikleri

4.1.1. TEM görüntü analizi

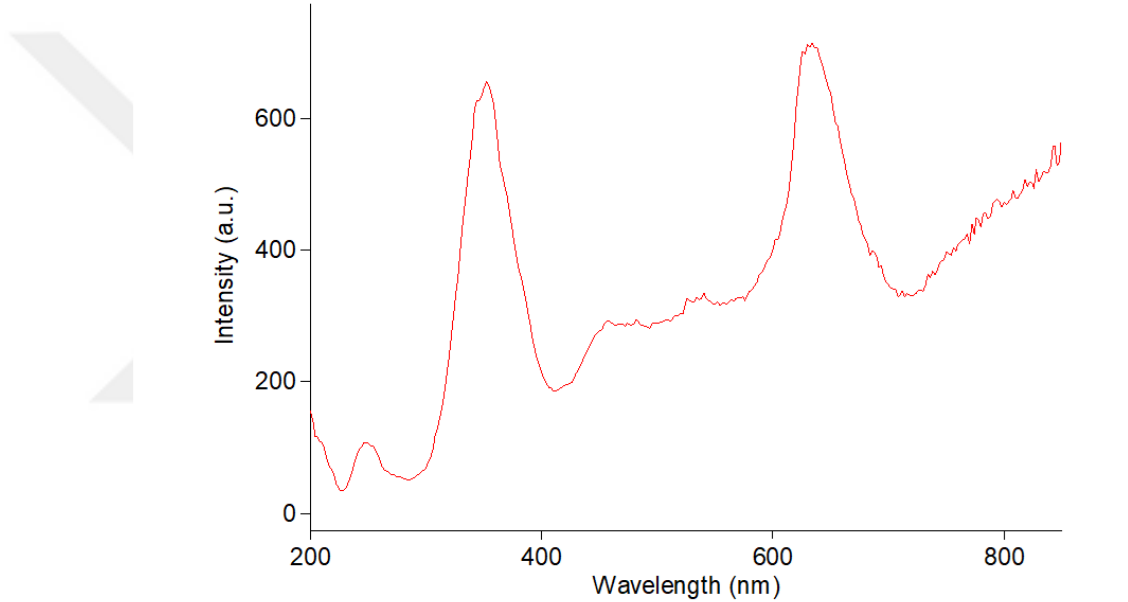
TEM, görüntüleme ve kırınım tekniklerini birlikte kullanarak milyonlarca kez büyütmeyle nanometre büyüklüğündeki küçük ve ince malzemelerin kristalografik ve morfolojik bilgilerine ulaşmayı, ayrıca kimyasal bileşim ve elektriksel özellikler hakkında bilgi edinmeyi sağlayan bir tekniktir. Temeli, çok ince bir numuneden geçen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesi prensibine dayanmaktadır. Yüksek ayırma gücüne sahiptir ve kırınım ve görüntü bilgilerinin aynı anda alınmasını sağlamaktadır. Hazırladığımız formülasyonun TEM görüntüleri aşağıda gösterilmiştir (Resim 6). Böylece nano ölçekte hazırladığımız karbon kuantum noktalarının morfolojik yapıları, bileşimleri ve parçacık boyutları hakkında tamamlayıcı bilgiler elde edilebilir. Ayrıca elde edilen görüntüler boş nano taşıyıcılar, işlevselleştirilmiş nano taşıyıcılar ve aktif madde yüklü fonksiyonel nano taşıyıcılar olarak karşılaştırılabilir, böylece taşıyıcı sistem hakkında fikir edinebiliriz.



Resim 6: Karbon kuantum noktaların TEM görüntüsü

4.1.2. Spektrofotometri Yöntemi Geçerlilik Testi (Validasyonu) Sonuçları

Tablo 3 te açıklandığı üzere belirli derişimlerde hazırlanan (S0, S20, S40, S60, S80, S100) SAMH türevli KKN örnekleri kullanılmıştır. Karbon Kuantum Nokta'ların uyarma (excitation) ve yayma (emission) dalga boylarını belirlemek amacıyla 200-800 nm dalga boyu aralığında uyarma ve yayma spektrum taraması yapılmıştır ve KKN'nın uyarma dalga boyu 360 nm ve yayma dalga boyu 443 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 16).



Şekil 16: Spektroflorometrik yöntem çalışmasında KKN çözeltisinin uyarma ve yayma spekturumu.

Validasyon çalışmasında kullanılan parametrelerin sonuçları aşağıda açıklanmıştır:

Stabilite: Stabilite çalışmasında ise KKN'ların partikül büyüklükleri, zeta potansiyelleri ve peptit içerikleri üzerindeki değişimlerin 3 saat gözlenmesi sonucunda yapılarında herhangi bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir.

4.1.3. Hazırlanan Kuantum Noktaların Fiziksel Görünüşleri Sonucu

Karbon kuantum noktaların, parçacık boyutları (PS), dağılımları ve zeta potansiyelleri (ZP) sonuçları Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4: Karbon kuantum nokta örneklerin parçacık boyutları, dağılımları ve zeta potansiyelleri (ZP) sonuçları.

Formulation	pH	Zeta potential (mV)	Particle size
Sitrik acid-L-cystein	2-3	5.3-7.4	1,9 nm
Sitrik acid-L-cystein	7	-7.1	2.0 nm
Na-citrate-L-cystein	7-7.5	-8.0	9 nm

4.1.3. Floresan ve Kuantum verimi Sonucu

Referans madde olarak kinin sülfat kullanılarak KKN örneğinin kuantum verimi aşağıdaki adımlara göre hesaplanmıştır. Takip edilen adımlar hem kinin sülfat çözeltisine hem de KKN numunesine uygulanmıştır.

1- Seçilen numunenin çözücüsü için UV Görünür alan absorbans spektrumu elde edildi. Varsa, kullanılacak uyarma dalga boyundaki absorban- sa dikkat edildi (uyarma, kinin sülfat-sülfürik asit çözeltisi için 350 nm dir.) (Şekil 16 -)

2- Çözeltiyi 10 mm'lik bir floresan küvete yerleştirerek aynı çö- zücünün floresan spektrumu (Floresan yoğunluğu-dalga boyu grafiği) kayde- dildi (burada Kinin sülfat-0.1M sülfürik asit çözeltisi için yaklaşık değerin

maksimum 350 nm'de olması gerekir). Floresan yoğunluğu-dalga boyu grafiğinin alanı veya floresan spektrumu hesaplandı.

3- Artan konsantrasyonların beş solüsyonları için 1. ve 2. Adımlar tekrarlandı (Hazırlanan numunelerin absorpsiyonu yaklaşık 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 ve 0.10 aralığında olmalıdır, bu değerler deneme - yanılma yöntemiyle bulundu, tam olarak bu aralıkta değilse, gerçek değeri yazılır). Boş çözelti ile elde edilen alanı, çözeltiler için elde edilen alan değerlerinden çıkarıldı.

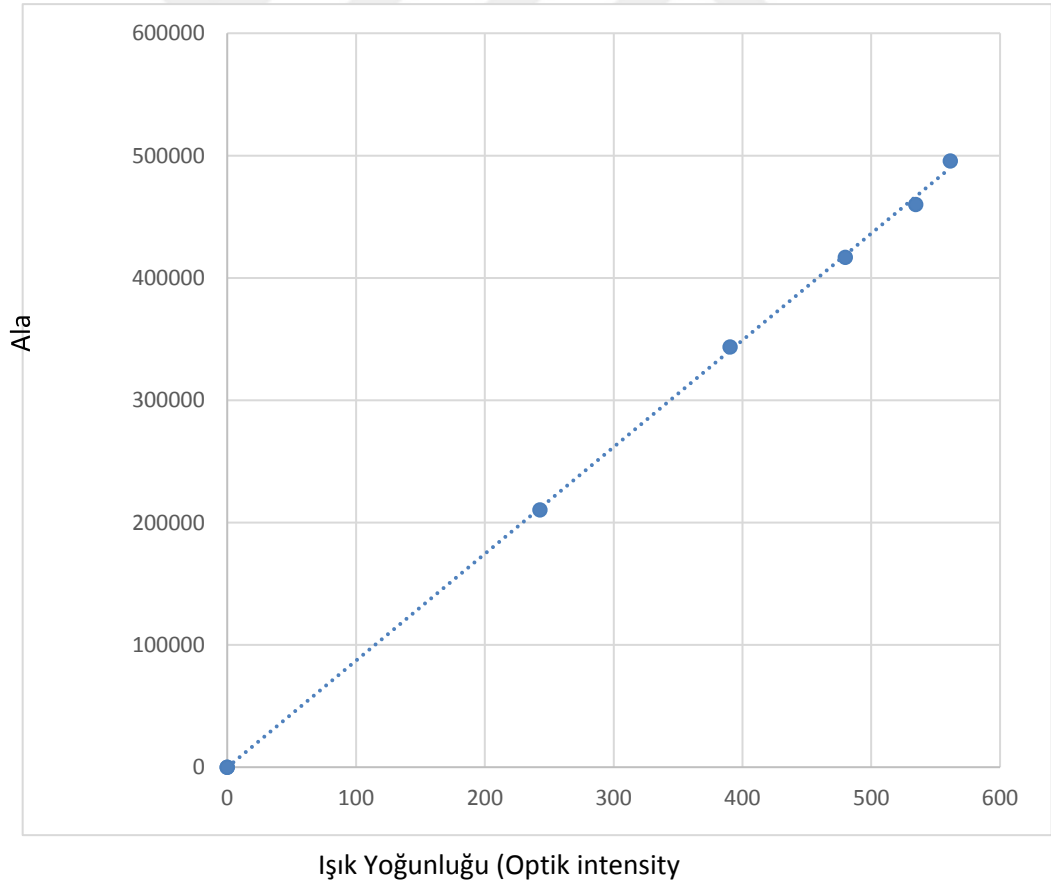
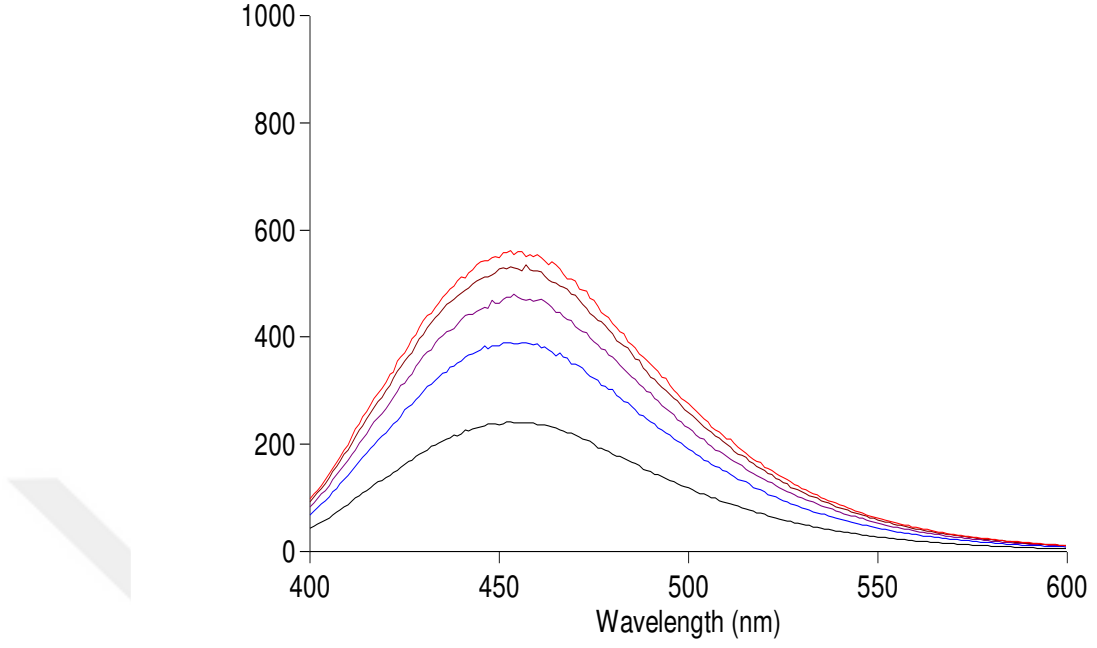
4- 3. Adımda elde edilen absorpsiyon 2. Adımda elde edilen alanlara göre grafiğe döküldü ve doğrusal regresyon ile orijinden geçen çizginin (0,0) eğimini (m) bulundu (Şekil 17, Şekil 18).

Kuantum verimi : $\{m(\text{test})/m(\text{kinin sülfat})\} * A$

A : $(\text{refraktif indeks-su} / \text{refraktif indeks-0.1M sülfürik asit}) = 0,99939985$

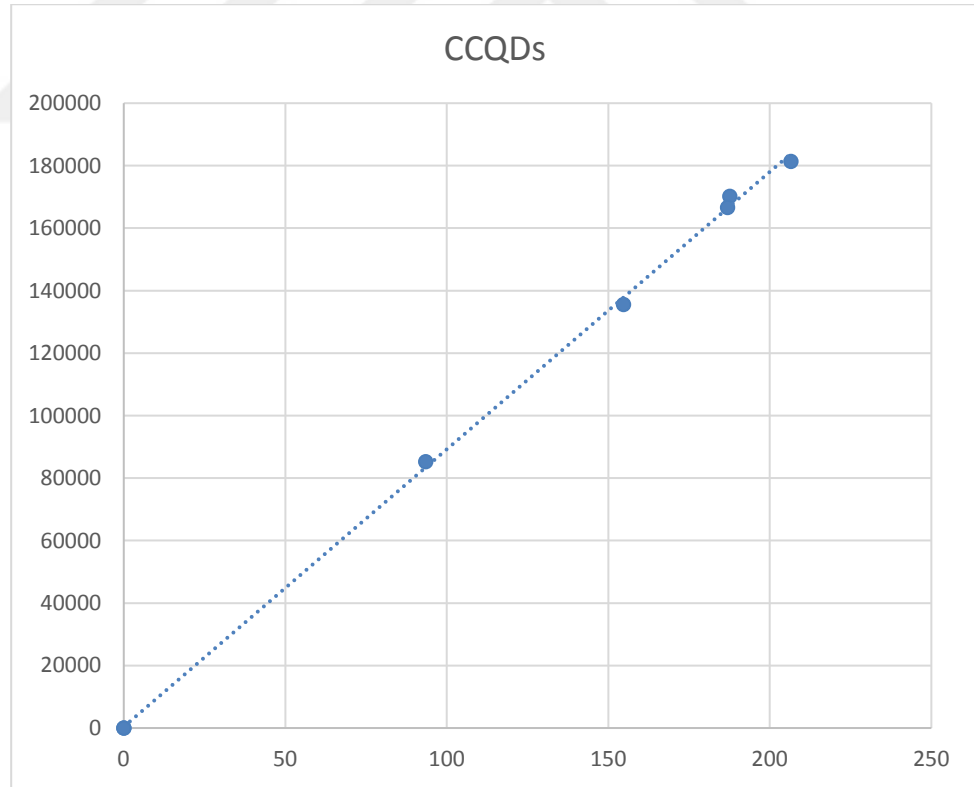
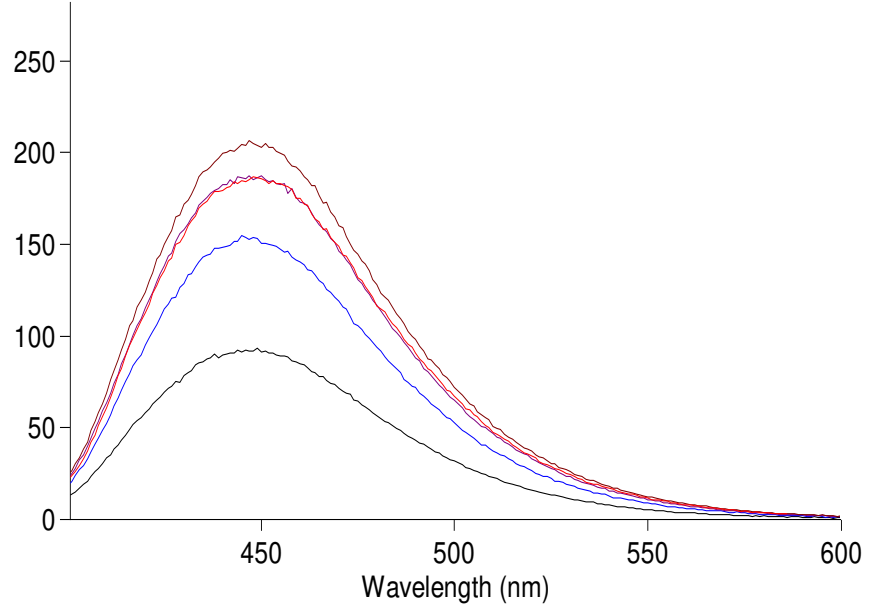
[refraktif indeks-su=1.3325; refraktif indeks-0.1M sülfürik asit =1.3333]

Kinin Sulfat



Şekil 17: Kinin Sulfat Yoğunluk / Dalgaboyu grafiği

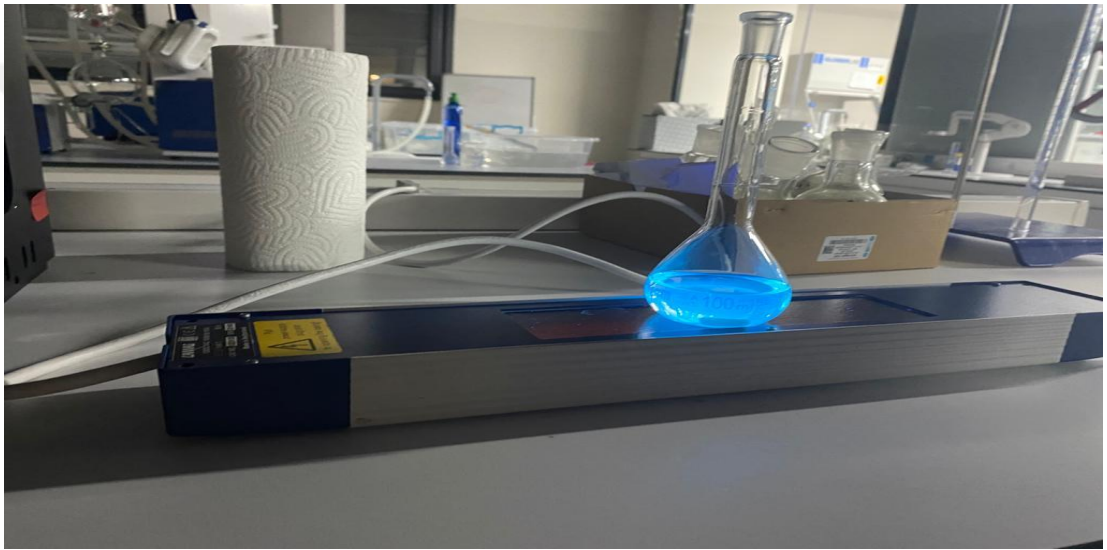
Karbon Kuantum Nokta



Şekil 18: Karbon Kuantum Nokta Yoğunluk / Dalgaboyu grafiği

$$\begin{aligned}\text{Kuantum verimi} &= [\text{EğimTest} / \text{EğimRef}] * (\text{ntest} / \text{nref}) \\ &= [865.06/880.84] * (1,3325/1,3333) \\ &= 98,1 \%\end{aligned}$$

Kinin sülfat / H₂SO₄ çözeltisi kendiliğinden KKN oluşturmasından ve güçlü bir floresan özellik göstermesinden dolayı (Resim 7) çalışmada referans madde olarak 50 ug/ml Kinin sülfat / H₂SO₄ çözeltisi kullanılmıştır.



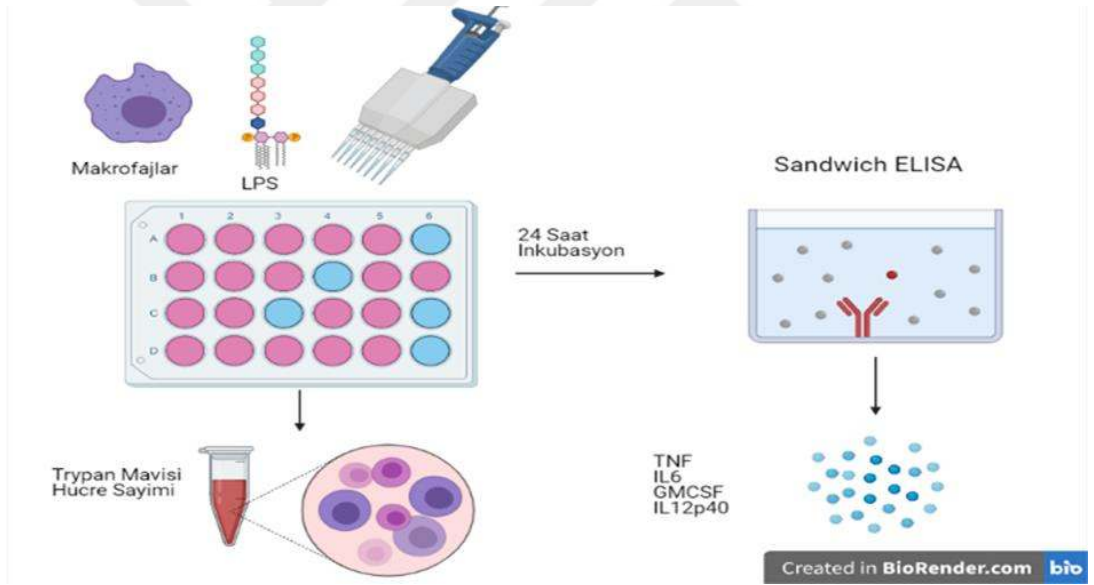
Resim 7: Kinin sülfat / H₂SO₄ çözeltisi UV altında yaymış olduğu floresan ışık.

4.2. Karbon Kuantum Nokta İle Yapılan In-vitro Çalışmalara Ait Bulgular

4.2.1.KKN Hücre canlılığı ve hücre çoğalması üzerindeki etkisine ait bulgular

Örneklerin hücre canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile makrofaj hücreleri 1X10⁶ hücre/mL konsantrasyonunda ve toplamda bir milyon olacak şekilde 24 kuyucuklu plakalara ekilmişlerdir. Gece boyunca kuyucuklarda inkübe edilen

hücreler ertesi gün besi yerleri yenilendikten sonra 1, 5 ve 10 ug/mL konsantrasyonlarındaki kimyasallar ve 1ug/mL LPS veya LPS içermeyen sadece kimyasallar ile muamele edilmişlerdir. Negatif kontrol grubundaki hücreler hiçbir kimyasala maruz bırakılmazken pozitif kontrol grubundaki hücreler bağışıklık sistemi hücrelerinden makrofajları uyarma gücü ile bilinen 1ug/mL LPS ile aktive edilmişlerdir (Scull, Hays and Fischer, 2010). Ayrıca anti-inflammatuvar özelliği bilinen salisilik asit de en yüksek konsantrasyon değeri olan 10ug/mL konsantrasyonunda 1ug/mL LPS ile birlikte kontrol grubu olarak kullanılmıştır (Randjelovic, Veljković, Stojiljković, Sokolovic and Ilić, Ivan, 2015; Zhang, Sun, Liu, Zhang and Lan, 2012). 24 saatlik inkübasyon periyodunun sonunda besi yerleri ELISA için toplanırken hücreler PBS ile yıkanıp Trypan mavisi ile sayılmışlardır. Böylece canlı ve ölü hücreler ayırt edilebilmektedir (Şekil 19) ve kontrol grubuna göre hücre çoğalması belirlenebilmektedir.

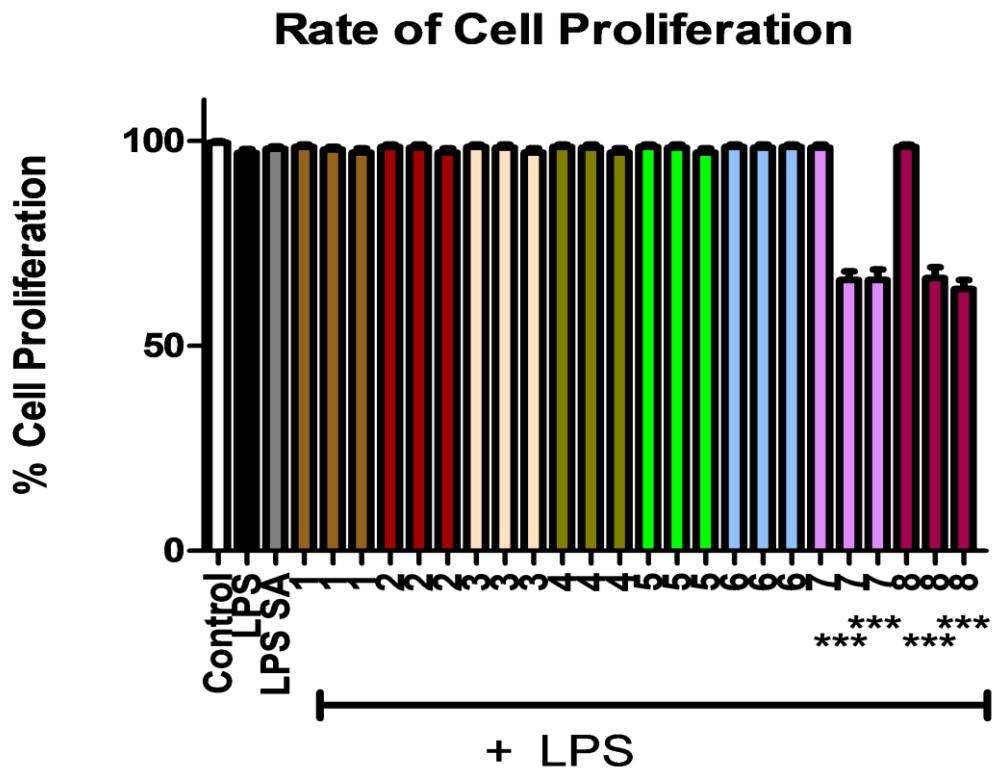
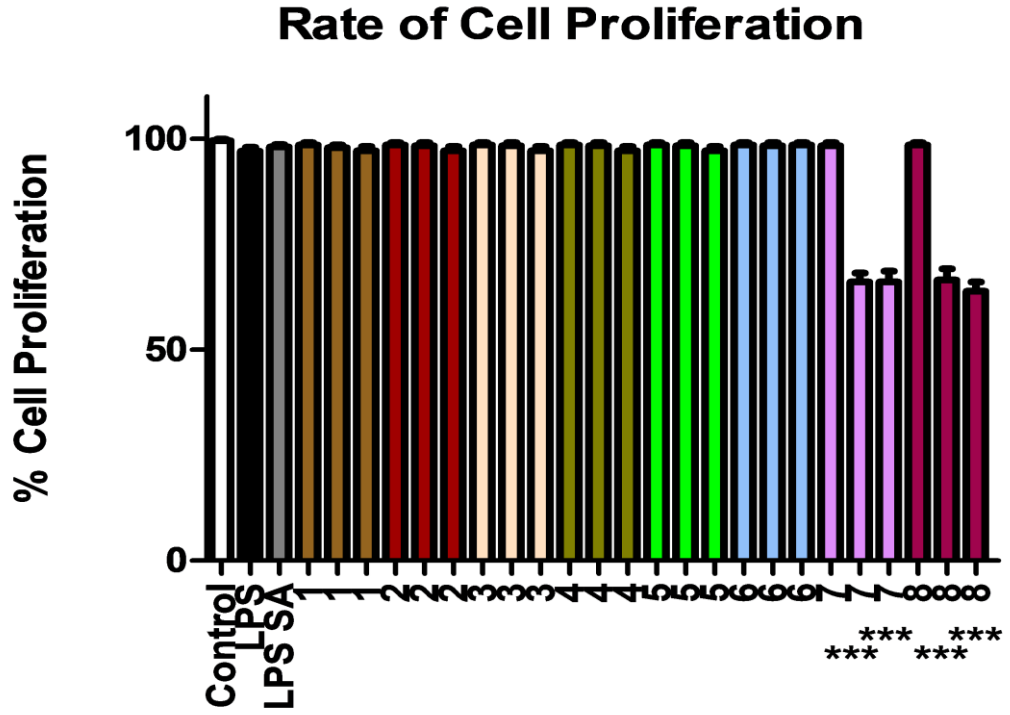


Şekil 19: MTT testi ile canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilmesi

Kontrol gruplarına kıyasla, LPS'lerin yokluğunda ve varlığında kuyucuklara kuantum karbon nokta örnekleri eklendiğinde hücre canlılığında bir değişiklik olmamıştır (Şekil 18). Bu sonuçlar, bu yeni kuantum karbon noktalarının kullanılan konsantrasyonlarda sitotoksik olmadığını desteklemektedir.

Hücreler, hücre canlılığını belirlemek için Tripan Mavisi boyama ile sayıldı. Her deney seti, sonuçları çıkarmak ve student t testini Graphpad Prism Sürüm 5 ile uygulamak için biyolojik olarak bağımsız üç deneyde kullanıldı.

Hücre proliferasyon oranları, herhangi bir kimyasal madde ile muamele edilmemiş kontrol gruplarına kıyasla MTT tahlili ile belirlendiğinde, sadece 7 ve 8 numaralı numuneler, 5 ve 10 ug / mL konsantrasyonlarında makrofaj hücre proliferasyonunda önemli bir azalmaya yol açmaktadır. Örneklerin geri kalanı, makrofajların 24 saatlik süre boyunca çoğalma kabiliyetini değiştirmedir. Bu durum hem LPS yokluğunda hem de varlığında geçerlidir. Bu sonuçlar, 7 ve 8 numaralı numuneler dışında, bileşiklerin geri kalanının hücre çoğalmasını etkilemediğini göstermektedir. Örnekler 7 ve 8 sitotoksik olmasa da, bir şekilde hücre proliferasyonunu belirli bir dereceye kadar bloke edebildiler (Şekil 20 ve Şekil 21).



Şekil 21: Hücre çoğalması / KKN grafiği. Hücreleri aktive etmek için 96 kuyu plakası kullanıldı ve 100ul konsantrasyonda 10^5 hücre / kuyuda inkübe edildi. Gece boyunca 37°C 'lik % 5 CO_2 inkübatöründe dinlendirildikten sonra; Her numuneden

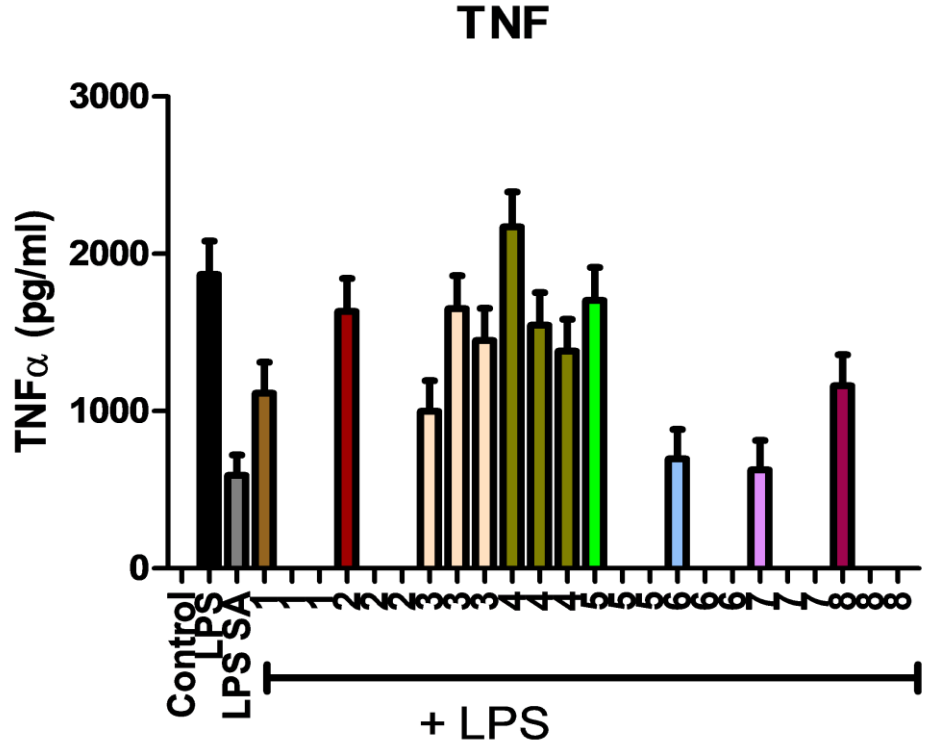
1, 5 ve 10 ug / ml konsantrasyolarda çözeltiler alınarak, her bir kuyuya 1ug / ml LPS ile ve LPS olmadan 24 saatlik uyarılma için hazırlanmıştır.. Kontrol gruplarında kimyasal yoktu ve negatif kontrol grubuna 10 ug/ mL Salisilik asit ilave edildi. Hücre proliferasyonunu belirlemek için MTT tahlili yapıldı. Deney prosedürü için ROCHE TOXO 1 kiti kullanıldı. Her deney seti, sonuçları çıkarmak ve student t testini Graphpad Prism Sürüm 5 ile uygulamak için biyolojik olarak bağımsız üç deneyde kullanıldı.

4.2.2. KKN TNF α , IL12p40, GMCSF ve IL6 üzerindeki etkisine ait bulgular

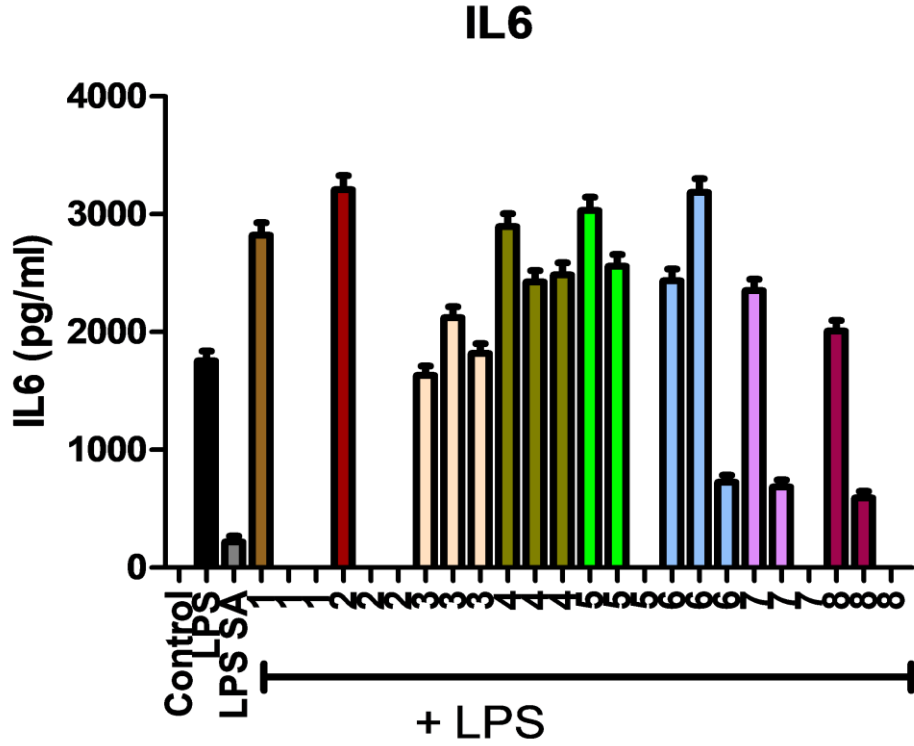
Toplanan besi yerleri için ELISA metodu kullanılmıştır. Öncelikle data gösterilmese de yapılan çalışmalarda LPS olmadığı zaman kimyasalların bağışıklık sistemi hücrelerini TNF, IL6, GMCSF ve IL12p40 sitokinlerinin üretimi için tetiklemediği bulgusuna erişilmiştir. Bu sonuçlar, numunelerin aşı formülasyonlarında adjuvan adayı olarak kullanılabilecek immünostimülatör bir role sahip olmadığını göstermektedir. Negatif kontrol gruplarında sitokin üretimi olmaz iken sadece LPS varlığında bu dört sitokin de üretildiği gözlemlenmiştir. Bu durum kuantum noktaların tek başına immün yanıtta etkisi olmadığını göstermektedir (Singh et al., 2019).

Bu örneklerin immünomodülatör aktivitelerini test etmek için 1, 5 ve 10 ug / mL konsantrasyonlarında kimyasallar LPS ile aktive edilmiş makrofajlarla inkübe edildi. Kontrol gruplarında kimyasal kullanılmazken, negatif kontrol gruplarında 1 ug/mL LPs ile birlikte kuyucuklara 10 ug/mL Salisilik asit (SA) ilave edilmiştir. Pozitif kontrol grupları sadece 1ug / mL LPS ile inkübe edilmiştir. Sadece LPS uygulaması, ELISA yöntemiyle belirlenen makrofajlar tarafından önemli miktarda TNF, IL6, GMCSF ve IL12p40 sitokin üretimine neden olmaktadır (Şekil 20,21,22,23). LPS ile aktive olmuş makrofajlar da örnekler TNF ve IL6 üretimi üzerinde farklı etkiler göstermiştir (Şekil 22 ve 23). Numune 3 ve 4, pozitif kontrol gruplarına kıyasla LPS ile aktive edilmiş makrofajlar tarafından TNF veya IL6 üretiminde bir değişikliğe yol açmadıkları için immünolojik olarak inettir (Şekil 22 ve Şekil 23). Bu sonuçlar, immün sistem hücrelerini ve ilaç verme sırasındaki enflamatuvar aktivitelerini bozmayacak immünolojik olarak inert ilaç verme ajanları olarak olası kullanımlarını göstermektedir. Örnek 1, 2, 5, 6, 7 ve 8, pozitif kontrol

gruplarına kıyasla aktive edilmiş makrofajlar tarafından enflamatuvar TNF ve IL6 sitokinlerinin üretiminde önemli bir azalmaya yol açtığı için anti-enflamatuvar aktivitelere sahiptir (Şekil 22 ve Şekil 23). Salisilik asitinkine benzer aktivitelere göstermiştir (Şekil 22 ve Şekil 23). Bu sonuçlar, uyarılmış memeli makrofajları üzerinde anti-enflamatuvar ajanlar olarak immünomodülatör aktivitelere sahip olduklarını göstermektedir. Dahası salisilik asitin TNF ve IL6 sitokinlerinin üretimini düşürdüğü belirlenirken GMCSF ve IL12p40 üretimi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür. LPS ile muamele edilen örneklerde kimyasalların etkileri test edildiği zaman 1, 2, 5, 6, 7 ve 8 nolu örneklerin özellikle 5ug/mL ve 10ug/mL konsantrasyonlarının TNF üretimini istatistiksel olarak anlamlı ve güçlü bir şekilde tamamen ortadan kaldırdığı belirlenmiştir. Fakat bu kimyasallar arasında 6 ve 7 numaralı örnekler 1ug/mL konsantrasyonunda bile neredeyse 10ug/mL salisilik asit kadar etkili olmuşlardır. Bu sebeple daha güçlü anti-enflammatuvar potansiyele sahiptirler. Öte yandan 1,2,5 ve 8 nolu örnekler 1 ug/ml konsantrasyonunda LPS kadar olmasa da pro-enflammatuvar etki göstermişlerdir. Ayrıca, 1 ve 2 nolu örnekler IL6 bağlamında daha güçlü anti-enflammatuvar özellik göstermiştir. Çünkü 5 ug/mL'lik konsantrasyonları bile IL6 üretimini tamamen elimine etmiştir. Öte yandan 1,2,5,6,7 ve 8 nolu örnekler 1 ug/ml konsantrasyonunda IL6 üretimi LPS kadar etkili olmuştur. Ayrıca 5 ve 6 nolu örneklerin 5 ug/ml konsantrasyonunda LPS den daha iyi pro- enflammatuvar etki göstermişlerdir.



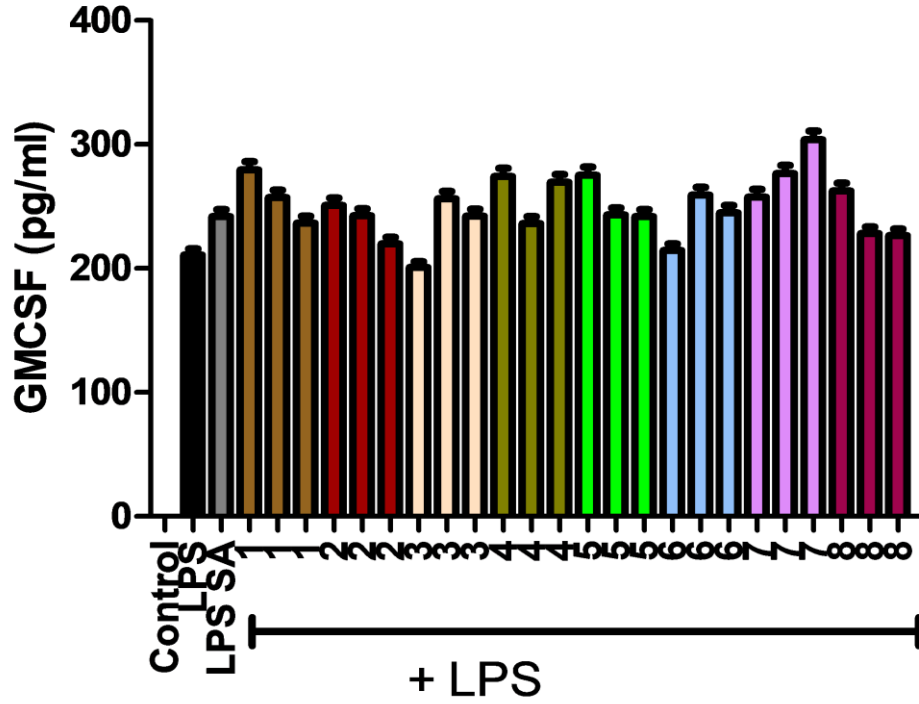
Şekil 22: TNFα ELISA sonuçları hücreleri aktive etmek için 24 kuyu plakası kullanıldı ve 1 cm³ konsantrasyonda 10⁶ hücre / kuyuda inkübe edildi. Gece boyunca 37 ° C'lik % 5 CO² inkübatöründe dinlendirildikten sonra; Her numunenin 1, 5 ve 10 ug / ml'si, 24 saatlik stimülasyon için karşılık gelen her bir kuyuya 1ug / ml LPS ile veya onsuz yerleştirildi. Kontrol gruplarında kimyasal yoktu ve negatif kontrol grubuna 10 ug/ mL Salisilik asit ilave edildi. ELISA testi için süpernatantlar kullanıldı. Her deney seti, sonuçları çıkarmak ve istatistiksel testleri uygulamak için biyolojik olarak bağımsız üç deneyde kullanıldı.



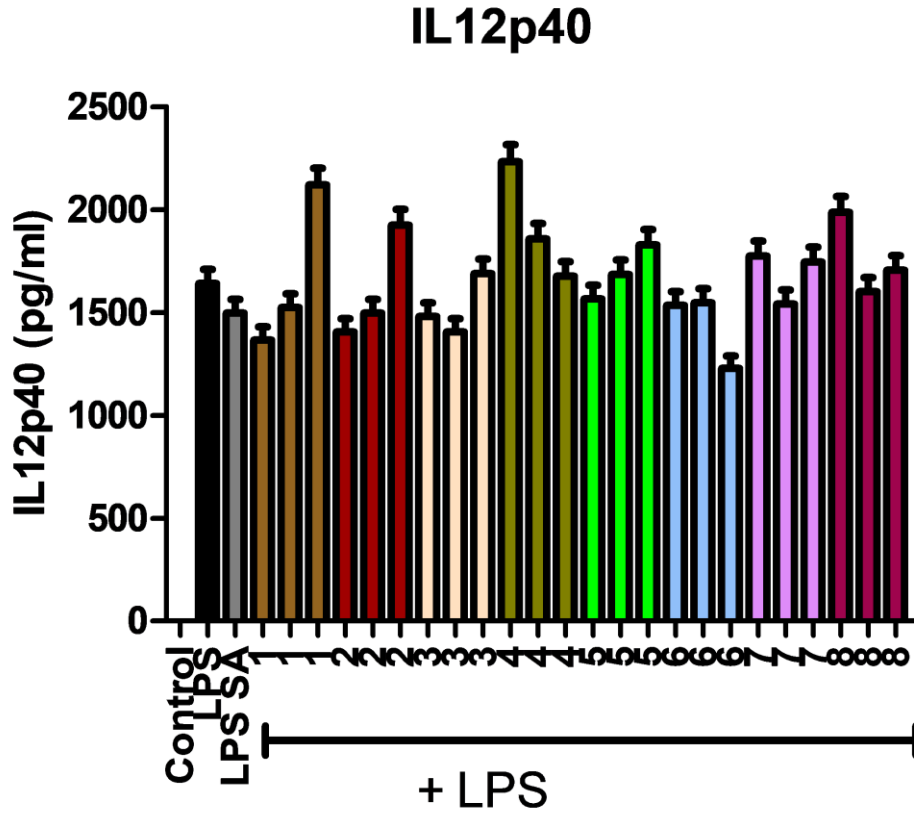
Şekil 23: IL6 ELISA sonuçları. hücreleri aktive etmek için 24 kuyu plakası kullanıldı ve 1 cm³ konsantrasyonda 106 hücre / kuyuda inkübe edildi. Gece boyunca 37 ° C'lik% 5 CO₂ inkübatöründe dinlendirildikten sonra; Her numunenin 1, 5 ve 10 ug / ml'si, 24 saatlik stimülasyon için karşılık gelen her bir kuyuya 1ug / ml LPS ile veya onsuz yerleştirildi. Kontrol gruplarında kimyasal yoktu ve negatif kontrol grubuna 10 ug/ mL Salisilik asit ilave edildi. ELISA testi için süpernatantlar kullanıldı. Her deney seti, sonuçları çıkarmak ve istatistiksel testleri uygulamak için biyolojik olarak bağımsız üç deneyde kullanıldı.

Karbon kuantum noktaları, aktive edilmiş makrofajlar üzerinde GMCSF ve IL12p40 sitokinlerinin üretimini etkilememiştir (Şekil 24 ve Şekil 25) .Bu da kimyasalların anti-enflammatuvar özelliklerinin TNF ve IL6 ile sınırlı olduğunu sitokin üretimini genel olarak baskılamadığını göstermektedir.

GMCSF



Şekil 24: GM CSF ELISA sonuçları. hücreleri aktive etmek için 24 kuyu plakası kullanıldı ve 1 cm³ konsantrasyonda 106 hücre / kuyuda inkübe edildi. Gece boyunca 37 ° C'lik% 5 CO₂ inkübatöründe dinlendirildikten sonra; Her numunenin 1, 5 ve 10 ug / ml'si, 24 saatlik stimülasyon için karşılık gelen her bir kuyuya 1ug / ml LPS ile veya onsuz yerleştirildi. Kontrol gruplarında kimyasal yoktu ve negatif kontrol grubuna 10 ug/ mL Salisilik asit ilave edildi. ELISA testi için süpernatantlar kullanıldı. Her deney seti, sonuçları çıkarmak ve istatistiksel testleri uygulamak için biyolojik olarak bağımsız üç deneyde kullanıldı.

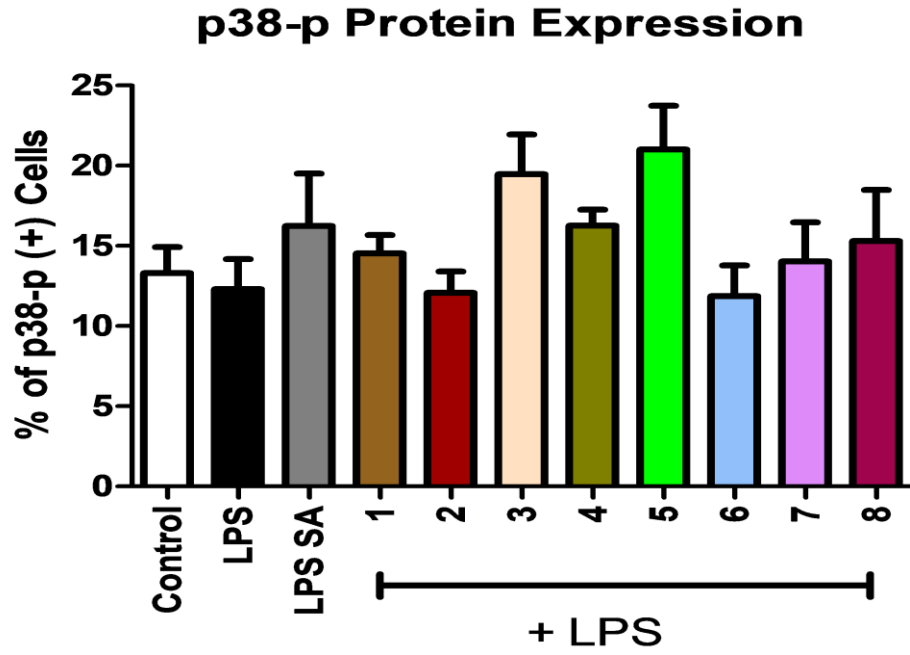


Şekil 25: IL 12p40 ELISA sonuçları. hücreleri aktive etmek için 24 kuyu plakası kullanıldı ve 1 cm³ konsantrasyonda 106 hücre / kuyuda inkübe edildi. Gece boyunca 37 ° C'lik% 5 CO₂ inkübatöründe dinlendirildikten sonra; Her numunenin 1, 5 ve 10 ug / ml'si, 24 saatlik stimülasyon için karşılık gelen her bir kuyuya 1ug / ml LPS ile veya onsuz yerleştirildi. Kontrol gruplarında kimyasal yoktu ve negatif kontrol grubuna 10 ug/ mL Salisilik asit ilave edildi. ELISA testi için süpernatantlar kullanıldı. Her deney seti, sonuçları çıkarmak ve istatistiksel testleri uygulamak için biyolojik olarak bağımsız üç deneyde kullanıldı.

4.2.3. KKN p38 yolağı üzerindeki etkisine ait bulgular

Kimyasallar en yüksek konsantrasyonlarında hücre içi fosforile p38 için boyanıp flow sitometri analizi ile kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. P38 MAP kinaz yolağı enflammatuvar tepkilerin oluşmasında önemli roller üstlenmektedir. Biz de kimyasalların etki mekanizmasında rol oynayıp oynamadığını test etmeyi

amaçladık. Numuneler olası hücre içi etki mekanizmaları açısından test edildiğinde, LPS ile birlikte 10 ug / mL numune ile muamele edilen makrofajlarda fosforile edilmiş p38 düzeylerinde pozitif kontrol gruplarına göre fark yoktur (Şekil 26). p38 MAPK, makrofajların enflamatuar tepkileri için önemli bir rol oynar, ancak fakat salisilik asit gibi bu kimyasallar da etkilerini p38 MAPK yolağından bağımsız yaratmaktadırlar.



Şekil 26: p38 MAPK analiz sonucu. Hücreleri aktive etmek için 24 kuyu plakası kullanıldı ve 1 cm³ konsantrasyonda 10⁶ hücre / kuyuda inkübe edildi. Gece boyunca 37 ° C'lik% 5 CO₂ inkübatöründe dinlendirildikten sonra; Her numunenin 1, 5 ve 10 ug / ml'si, 24 saatlik stimülasyon için karşılık gelen her bir kuyuya 1ug / ml LPS ile veya onsuz yerleştirildi. Kontrol gruplarında kimyasal yoktu ve negatif kontrol grubuna 10ug/ mL Salisilik asit ilave edildi. BD Fix Buffer I (557870) kullanılarak hücre fiksasyonu sağlandı ve prosedürlere uygun BD protokolü uygulandı. Hücre permeabilizasyonu BD PERM Tamponu III (558050) ile gerçekleştirildi. Hücre içi boyama için BD PE Fare Anti-p38 MAPK (pT180/pY182) kullanıldı ve boyama işlemi için BD protokolü takip edildi. Daha sonra numuneler, fosforile edilmiş p38'in hücre içi seviyelerini belirlemek için akış sitometrisi BD FACS ARIA III ile çalıştırıldı. Her deney seti, sonuçları çıkarmak ve istatistiksel

testleri Graphpad Prism Sürüm 5 ile uygulamak için üç biyolojik olarak bağımsız deneyde kullanıldı.

5. TARTIŞMA-SONUÇ-ÖNERİ

5.1. Tartışma

Biyouyumlu ve floresan doğası nedeniyle kuantum karbon noktaları tıpta ve biyolojide kullanılmaktadır. Bunlar sadece numunelerin hem in vivo hem de in vitro olarak görüntülenmesini sağlamakla kalmaz, aynı zamanda biyouyumlu, toksik olmayan ve inert özellikleriyle ilaç taşıyıcı sistemler olarak da büyük ilgi görmektedirler. İşlevlerini değiştirmek ve biyolojik özellikler eklemek için yapılarına fonksiyonel gruplar eklenebilmektedir. Modifiye edilmeleri nispeten kolaydır ve bu modifikasyonlar sadece işlevlerini değil, aynı zamanda görüntüleme veya ilaç taşıma işlevleri amaçları için hücre içi lokalizasyonlarını da değiştirir. Bilinen kadarıyla, bu alandaki çalışmaların çoğu olası immünomodülatör rollerine odaklanmamaktadır ve bu, taşıdıkları veya teslim ettikleri ilaç ajanlarının aktivitesinin etkileyebileceği durumlarda sorunlara neden olabilir. Karbon kuantum noktaların immünomodülatör aktiviteleri tespit edilirse, klinik çalışmalarda daha verimli kullanılabilirler. Bu nedenle çalışmalar yapılmıştır.

Bu çalışmada hazırlanan numunelerin fizikokimyasal özelliklerine bakıldığında, optimum pH'da (örnek 3 ve 4 pH: 7) numuneler immünolojik olarak inerttir ve ilaç dağıtım aracı olarak kullanılabilme imkanı sunmaktadırlar. pH: 7'de, karbon kuantum noktaları uygun bir stabil yapıya sahiptir ve örnek 5 ve 6, anti-enflamatuar özelliklere sahiptir (Yang, Li, Zhong and Lu, 2018; Shangguan, Huang, He, Wang, Ye et al., 2017).

Ayrıca, yüksek asidik (pH:1 ve 2) veya yüksek bazik (pH:7 ve 8) koşullarda üretildikleri durumlarda, çoğunlukla anti-enflamatuar özellikler göstermişlerdir.

Karbon kuantum noktalarının yüzey özellikleri ve boyutlarının üretim yöntemlerinden etkilendiği bilinmektedir (Nair, Haponiuk, Thomas, Gopi, 2020). Aynı zamanda kullanılan öncüler, yani karbon kaynağı olarak kullanılan maddeler reaksiyon sıcaklık ve sıcaklık uygulama süresi de önem teşkil etmektedir. Bonilla ve ark.larının yapmış olduğu bir çalışmada herhangi bir katalizör kullanılmadan gliserol

ve süksinik asitten yola çıkılarak farklı sürelerde kuantum verimleri ve floresan özellikleri farklı kuantum noktalarını üretmişlerdir.

Formülasyonlarda kullanılmak üzere karbon kuantum noktalarının hazırlanabilmesi için aşağıdan yukarıya (Bottom up) yöntemlerden olan mikrodalga sentez yöntemi kullanılmıştır. Mikrodalga sentez yöntemi sahip olduğu yüksek verim, iyi tekrarlanabilirlik, kontrollü boyut ve sıcaklık, düşük maliyet, hız, çevre dostu, kısa reaksiyon süresi gibi birçok avantajdan dolayı tercih edilmiştir. İlk başta kuantum noktalarını üretebilmek için pek çok karbon kaynağı olabileceği düşünülen kimyasal maddelere farklı sıcaklık ve sürelerde denemeler yapılmıştır. Örneğin sakkaroz kullanılarak 180°C reaksiyon sıcaklığında 10 dakika ve 20 dakika olmak üzere iki farklı reaksiyon sonunda floresan özellik göstermeyen siyah bir kalıntı olduğu görülmüştür. Aslında burada da karbon kuantum noktası vardır ancak temizlemek gerekmektedir. Fazla oluşan kalıntı kuantum noktalarını örtmektedir.

Bu nedenle gerçekleştirilen ön çalışmalarda ilk olarak lüminisans veren karışım ve oranlar belirlenmeye çalışılmıştır. Örneğin albumin ile gerçekleştirilen ön deneylerde iyi sonuçlar alınamamasına rağmen aslında albuminin içindeki l-sistein ve benzeri yapılardan floresan etkinin olduğu anlaşılmıştır. Bu sebeple sonraki çalışmalarda l-sistein kullanılarak çeşitli formülasyonlar gerçekleştirilmiştir.

Yapılan ön denemelerin sonunda değişen konsantrasyonlarda sitrik asit monohidrat ve sodyum sitratın karbon kaynağı olarak kullanıldığı l-sistein içeren çözeltiler mikrodalga sentez cihazında 140°C’de 20 dakika reaksiyon sonucunda elde edilmişlerdir. Elde edilen bu formülasyonlar 365 nm UV lambası altında incelendiğinde sitrik asit içeren kuantum noktalarının mavi floresan, sodyum sitrat içeren karbon kuantum noktaları ise yeşil floresan özellik göstermişler ve bu karbon kuantum noktalarının oluşumunu kanıtlayan ilk adımdır. Aynı zamanda sitrik asit içerenlerde konsantrasyon arttıkça UV altında floresan yoğunluğunun artmasına rağmen sodyum sitrat içeren konsantrasyonlarda böyle bir netliğin olduğu görülmemiştir. Hatta yeşil floresan yoğunluğun zamanla azaldığı fark edilmiştir.

Hazırlanmış olan kuantum noktalarının pH değerleri uygulanabilmesi hem de çökmeden biraraya gelebilmesi gerekmektedir. Bu amaçla hazırlanan kuantum noktalarının pH değerleri ölçülmüş sitrik asitli olanlar asidik özellikteyken (pH:2-3) sodyum sitrat içerenler alkali özellik göstermektedir. Bunlar dokuya uygun hale getirilmesi için pH’nin uygun aralığa çekilebilmesi için çöktürme işlemi uygulanmıştır ve pH değerleri uygun aralığa çekilmiştir.

Sonuç olarak temizleme ve ayırma gerektirmeyen, yani büyük partikül ve yanmış kalıntı oluşturmeyen doğrudan işleme alınabilecek kuantum noktaları elde edilmiştir.

Hazırlanan formüasyonların spektrofotometrede ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Kinin sülfat ile kuantum verimi hesaplanmaktadır (Joseph R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd edition, 2006). Sonuçta kinin sülfata oranla elde edilen verim ise % 98,1 olarak hesaplanmıştır. Kuantum veriminin yüksek olması düşük konsantrasyonlarda bile güçlü floresan gösterebileceğini yani in vivo bir uygulama için gereken miktarı azaltarak vücuttan daha iyi metabolize olabilmesi (temizlenebilmesini) sağlamıştır (Jessica, Fong, Sing, 2018).

Kontrol gruplarına kıyasla, LPS'lerin yokluğunda ve varlığında kuyucuklara kuantum karbon nokta örnekleri eklendiğinde hücre canlılığında bir değişiklik olmamıştır (Şekil 20). Bu sonuçlar, bu yeni kuantum karbon noktalarının kullanılan konsantrasyonlarda sitotoksik olmadığını desteklemektedir.

Hücre proliferasyon oranları, herhangi bir kimyasal madde ile muamele edilmemiş kontrol gruplarına kıyasla MTT tahlili ile belirlendiğinde, sadece 7 ve 8 numaralı numuneler, 5 ve 10 ug / mL konsantrasyonlarında makrofaj hücre proliferasyonunda önemli bir azalmaya yol açmaktadır. Örneklerin geri kalanı, makrofajların 24 saatlik süre boyunca çoğalma kabiliyetini değiştirmedir. Bu durum hem LPS yokluğunda hem de varlığında geçerlidir. Bu sonuçlar, 7 ve 8 numaralı numuneler dışında, bileşiklerin geri kalanının hücre çoğalmasını etkilemediğini göstermektedir. Örnekler 7 ve 8 sitotoksik olmasa da, bir şekilde hücre proliferasyonunu belirli bir dereceye kadar bloke edebildi.

Yapılan çalışmada testler için ELISA metodu kullanılmıştır. Karbon kuantum noktaları hayvanlara uygulandığında özellikle TNF, IL6, GM-CSF ve IL12p40 sitokinlerinin üretiminin arttığı bulunmuştur. Bunlar sitokin grubunda olduklarından için çeşitli immune cevaplarda hatta otoimmün hastalıklarda rol alırlar. Öncelikle veriler gösterilmese de yapılan çalışmalarda LPS olmadığı zaman kimyasalların bağışıklık sistemi hücrelerini tetiklemediği bulgusuna erişilmiştir. Bu sonuçlar, hazırlanan formülasyonların aşı formülasyonlarında adjuvan adayı olarak kullanılabilecek immünostimülatör bir role sahip olmadığını göstermektedir.

Negatif kontrol gruplarında sitokin üretimi olmaz iken sadece LPS varlığında bu dört sitokin de üretildiği gözlemlenmiştir. Bu durum kuantum noktaların tek

başına immün yanıtta etkisi olmadığını ancak uygun bir LPS ile birlikte kullanıldığında sitokin üretimini sağladığını göstermektedir. Bu da uygun bir karbon kuantum noktası formülasyonu ile optimum etkinin sağlanabileceğini göstermektedir.

Pozitif kontrol grupları sadece 1ug / mL LPS ile inkübe edilmiştir. Sadece LPS uygulaması, ELISA yöntemiyle belirlenen makrofajlar tarafından önemli miktarda TNF, IL6, GMCSF ve IL12p40 sitokin üretimine neden olmaktadır. LPS ile aktive olmuş makrofajlar da örnekler TNF ve IL6 üretimi üzerinde farklı etkiler göstermiştir. Bu da sistemin doğru çalıştığını göstermektedir.

Numune 3 ve 4, pozitif kontrol gruplarına kıyasla LPS ile aktive edilmiş makrofajlar tarafından TNF veya IL6 üretiminde bir değişikliğe yol açmadıkları için immünolojik olarak inerttir. Bu sonuçlar, immün sistem hücrelerini ve ilaç verme sırasındaki enflamatuvar aktivitelerini bozmayacak immünolojik olarak inert ilaç verme ajanları olarak olası kullanımlarını göstermektedir. Örnek 1, 2, 5, 6, 7 ve 8, pozitif kontrol gruplarına kıyasla aktive edilmiş makrofajlar tarafından enflamatuvar TNF ve IL6 sitokinlerinin üretiminde önemli bir azalmaya yol açtığı için hazırlanan karbon kuantum noktalarının anti-enflamatuvar aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Bu etki salisilik asitinkine benzer aktiviteler göstermiştir. Bu sonuçlar, uyarılmış memeli makrofajları üzerinde anti-enflamatuvar ajanlar olarak immünomodülatör aktivitelere sahip olduklarını göstermektedir. LPS ile muamele edilen örneklerde kimyasalların etkileri test edildiği zaman 1, 2, 5, 6, 7 ve 8 nolu örneklerin özellikle 5ug/mL ve 10ug/mL konsantrasyonlarının TNF üretimini istatistiksel olarak anlamlı ve güçlü bir şekilde tamamen ortadan kaldırdığı belirlenmiştir. Fakat bu kimyasallar arasında 6 ve 7 numaralı örnekler 1ug/mL konsantrasyonunda bile neredeyse 10ug/mL salisilik asit kadar etkili olmuşlardır. Bu sebeple daha güçlü anti-enflamatuvar potansiyele sahiptirler. Öte yandan 1,2,5 ve 8 nolu örnekler 1 ug/ml konsantrasyonunda LPS kadar olmasa da pro-enflamatuvar etki göstermişlerdir. Ayrıca, 1 ve 2 nolu örnekler IL6 bağlamında daha güçlü anti-enflamatuvar özellik göstermiştir. Çünkü 5 ug/mL'lik konsantrasyonları bile IL6 üretimini tamamen elimine etmiştir. Öte yandan 1,2,5,6,7 ve 8 nolu örnekler 1 ug/ml konsantrasyonunda IL6 üretimi LPS kadar etkili olmuştur. Ayrıca 5 ve 6 nolu örneklerin 5 ug/ml konsantrasyonunda LPS den daha iyi pro-enflamatuvar etki göstermişlerdir. Kimyasallar en yüksek konsantrasyonlarında hücre içi fosforile p38 için boyanıp flow sitometri analizi ile kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. P38 MAP kinaz yolağı enflamatuvar tepkilerin oluşmasında önemli roller üstlenmektedir. Biz de

kimyasalların etki mekanizmasında rol oynayıp oynamadığını test etmeyi amaçladık. Numuneler olası hücre içi etki mekanizmaları açısından test edildiğinde, LPS ile birlikte 10 ug / mL numune ile muamele edilen makrofajlarda fosforile edilmiş p38 düzeylerinde pozitif kontrol gruplarına göre fark bulunmamıştır. Bu da hazırlanan karbon kuantum noktalarının P38 MAP kinaz yolağı ile enflammatuvar etki göstermediğini göstermiştir.

Yapılan tüm analizler sonucunda hazırlanan karbon kuantum noktalarının immünolojik etkilerin kompleks ve doz ile değişen özellikte olduğu bulunmuştur. Formülasyon ve tasarım ile bunların istenen yönde optimize edilmesinin gerekli olduğu ortaya çıkmıştır. Çalışılan formülasyonların aşılarda immüniteye etki göstermeyen ancak antienflammatuvar olarak katılabileceği de görülmüştür.

5.2. Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda, ilaç dağıtım aracı olarak veya inflamasyona karşı aktif bileşen olarak kullanılabilecek bir dizi yeni karbon kuantum noktası üretmeyi amaçladık. Bu yeni karbon kuantum noktaları, sitotoksisitelerini, anti-proliferatif aktivitelerini ve enflammatuvar sitokinlerin üretimi üzerindeki olası etkilerini ELISA yöntemiyle incelemek için in vitro olarak aktive edilmiş memeli makrofajları üzerinde test edildi.

Kuantum karbon nokta örneklerimizin varlığında hücre proliferasyon hızlarındaki farklılıkları belirlemek için MTT testi kullanıldı (Higuchi, Oka, Kawakami ve Hashida, 2008; O'Hara, Seddon, O'Connor, McClean, Singh et al., 2017). 4 Farklı kuantum nokta örneğinde hücre proliferasyonu üzerindeki etkiler incelendiğinde, 7. ve 8. Örneklerin herhangi bir hücre ölümüne neden olmadan yüksek konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu bloke ettiği gözlenmiştir. Karbon noktalarının kanser hücreleri üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmada da benzer bir sonuç bulunmuştur (Xia, Kawamura, Suehiro, Chen ve Sato, 2019). Bu numuneler Tripan mavisi boyama analizinden sonra hücre canlılığını değiştirmedi ve 7 ve 8 numaralı numuneler dışında anti-proliferatif aktiviteleri yoktu (Şekil 20 ve 21). Bu nedenle, toksik olmayan olarak kabul edilebilirler.

LPS, bağışıklık sistemi hücrelerinden makrofajları uyarmak için birçok klinik deneyde kullanılmıştır (Scull, Hays and Fischer, 2010). Bu çalışmada makrofajları

uyarmak için kontrol grupları 1µg / mL LP ile aktive edildi. Bazı çalışmalarda makrofaj hücreleri üzerinde salisilik asidin antiinflamatuvar özellikleri kullanılmıştır (Randjelovic et al., 2015; Zhang et al., 2012). Bu deneyde salisilik asit, kontrol grubu olarak 1µg / mL LP ile 10ug / mL olan en yüksek konsantrasyon değerinde anti-enflamatuar etki kullanılmıştır. Kuantum noktalarının memeli makrofaj hücrelerinde herhangi bir enflamatuar yanıtı ortaya çıkarıp çıkaramayacağını araştırmak için TNFα, IL6, GMCSF ve IL12p40 proinflamatuvar sitokinleri ve P38 MAP kinaz yolunu kullandık. Karbon kuantum noktalarının makrofajlarla etkileşimini ve bunların altında yatan etki mekanizmasını deşifre etmek için (Lategan et al., 2018; Qin, Zhou, Pan, He and Zhang, 2015; Belprain, Kang, Dunphy, Priebe and Chiu et al., 2021) her numunenin sonuçları analiz edildiğinde, numuneler 3 ve 4 dışındaki tüm numuneler, LPS varlığında yüksek konsantrasyonlarında sitokin üretimini baskılayabildi. 1 ve 2 nolu örnekler 5 ve 10 ug/ml konsantrasyonlarda diğer örneklerle kıyasla TNF-a ve IL-6 üretimini daha fazla azaltarak daha etkili anti-inflamatuar etki göstermişlerdir. Sonuçlarımız, enflamatuar ve otoimmün bozuklukları tedavi etmek için kullanılabilecek bazı karbon kuantum noktaları anti-enflamatuar aktiviteleri öneren önceki bulgu ile örtüşmektedir (Belparain et al., 2021; Wang, Zhang, Kong, Cheng, Zhang et al., 2020). Numuneler genellikle TNF-α ve IL-6 üretiminde GMCSF ve IL12p40 üretimine kıyasla etkiliydi.

Bu, kuantum noktalarının her sitokin grubunda anti-enflamatuar özelliklerini göstermediğini göstermektedir (Belparain et al., 2021; Lategan et al., 2018).

Bu kuantum karbon noktaları kümesi, fosforile edilmiş p38 MAPK seviyelerini değiştirmede, bu da etki mekanizmalarının, enflamatuar yanıtlarda çok önemli bir rol oynayan bu yoldan bağımsız olduğunu öne sürmektedir.

Sonuç olarak, kuantum nokta üretiminde meydana gelen pH değişiminin immünomodülatör potansiyellerini etkilediği görülmektedir. Yukarıda bahsedilen önceki çalışmalar, kuantum karbon noktaları farklı pH değerlerinde üretildiğinde farklı aktiviteler uyguladıklarını desteklemektedir. Bu, kuantum noktalarının farklı pH'lara sahip farklı ortamlarda üretildiğinde, farklı immünomodülatör aktiviteler sergilediklerini gösteren ilk çalışmadır.

Sonuçlarımız, fonksiyonel gruplara bağlı olarak, bu yeni karbon kuantum noktalarının farklı immünomodülatör aktivitelerinin olduğunu göstermektedir. Bunların bir seti, makrofajların tepkisini ve hücre canlılığını etkilemeyecek güvenli ilaç dağıtım ajanları olarak kullanılabilir. Güvenli bir ilaç dağıtım ajanı olması, aşı

adjuvanı olarak antijenin hedef dokuya güvenli bir şekilde ulaştırılmasını ve etkili bir immün yanıt oluşumu sağlayabilmesine yardımcı olabilir. Oysa başka bir set anti-inflamatuar ilaç adayları olarak kullanılabilir. Bu numuneler için hücre içi etki mekanizması test edildiğinde, p38 MAPK yolundan bağımsız hareket ettiler. Gelecekteki çalışmalar, anti-enflamatuar ilaçlar için dağıtım ajanı veya kendileri tarafından aktif ilaç ajanı olarak enflamatuar bozuklukların hayvan modellerinde etki mekanizmalarının yanı sıra in vivo aktivitelerine odaklanacaktır.



6. KAYNAKÇA

O'Hagan, D.T., Singh, M. (2003), Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems. *Expert Review of Vaccines*,2(2), 269–283.

Tüylek, Z. (2019), İlaç Taşıyıcı Nanosistemler. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*,28(2), 184-192.

Tüylek, Z. (2017), İlaç Taşıyıcı Sistemler Ve Nanoteknolojik Etkileşim. *Bozok Tıp Dergisi*,7(3), 89-98 .

Sayiner, Ö., Comoglu, T. (2016), Nanotaşıyıcı sistemlerde hedeflendirme. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 40, 62-79.

Ersöz, M., Işıtan, A., Balaban, M. (2018), Nanoteknoloji 1: nanoteknolojinin temelleri. Denizli: BilalOfset.

Zhang, L., Gu, F.X., Chan, J.M., Wang, A.Z., Langer, R.S., Farokhzad, O.C. (2008), Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical pharmacology and therapeutics*,83(5), 761–769.

Testa, C., Zammataro, A., Pappalardo, A., Sfrazzetto, G.T. (2019), Catalysis with carbon nanoparticles. *RSC Adv.*,9, 27659–27664.

Yan, Q.L., Gozin, M., Zhao, F.Q., Cohen, A., Pang, S.P. (2016), Highly energetic compositions based on functionalized carbon nanomaterials. *Nanoscale*,8(9), 4799–4851.

Wang, F., Li, C., Cheng, J., Yuan, Z. (2016), Recent Advances on Inorganic Nanoparticle-Based Cancer Therapeutic Agents. *International journal of environmental research and public health*,13(12), 1182.

Pandey, P., Dahiya, M. (2016), A Brief review on inorganic nanoparticles. *J Crit Rev*,3(3), 18-26.

Li, W., Cao, Z., Liu, R., Liu, L., Li, H., Li, X.,...,Liu, Y. (2019), AuNPs as an important inorganic nanoparticle applied in drug carrier systems. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*,47(1), 4222–4233.

Rajabi, M., Mousa, S.A. (2016), Lipid Nanoparticles and their Application in Nanomedicine. *Current pharmaceutical biotechnology*,17(8), 662–672.

Meroni, D., Ardizzone, S. (2018), Preparation and Application of Hybrid Nanomaterials. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*,8(11), 891.

Gao, X., Yang, L., Petros, J.A., Marshall, F.F., Simons, J.W., Nie, S. (2005), In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots. *Current opinion in biotechnology*,16(1), 63–72.

Durmuşoğlu, E.G. (2011), Kuantum Nokta. *Metalurji*,160, 31-34.

Yong, K.T., Roy, I., Swihart, M.T., Prasad, P.N. (2009), Multifunctional Nanoparticles as Biocompatible Targeted Probes for Human Cancer Diagnosis and Therapy. *Journal of materials chemistry*,19, 4655–4672.

Düzgün, N. (2014), İmmün Sistemin Tanıtımı. (Erişim adresi: 25.05.2022), https://personel.omu.edu.tr/docs/ders_dokumanlari/1329_1307_305.pdf

Jamieson, T., Bakhshi, R., Petrova, D., Pocock, R., Imani, M., Seifalian, A. M. (2007), Biological applications of quantum dots. *Biomaterials*,28(31), 4717–4732.

Reshma, V.G., Mohanan, P.V. (2019), Quantum dots: Applications and safety consequences. *Journal of Luminescence*,205, 287-298.

Rizvi, S.B., Ghaderi, S., Keshtgar, M., Seifalian, A.M. (2010), Semiconductor quantum dots as fluorescent probes for in vitro and in vivo bio-molecular and cellular imaging. *Nano reviews*,1, 10.3402/nano.v1i0.5161.

Chan, W.C., Maxwell, D.J., Gao, X., Bailey, R.E., Han, M., Nie, S. (2002), Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current opinion in biotechnology*,13(1), 40–46.

Yao, J., Li, P., Li, L., Yang, M., (2018), Biochemistry and biomedicine of quantum dots: from biodetection to bioimaging, drug discovery, diagnosis, and therapy. *Acta Biomaterialia*,74, 36–55.

Chen, Z., Gao, S., Goh, B.L., Samsudin, I.B., Su, X., Lwe, K.W.,...,Zhu, C. (2019), Recent advances in non-toxic quantum dots and their biomedical applications. *Progress in Natural Science: Materials International*,29(6), 628-640.

Salva, R., Taratula, O., Garbuzenko, O., Minko, T. (2011), Tumor targeted quantum dot-mucin 1 aptamer-doxorubicin conjugate for imaging and treatment of cancer. *Journal of Controlled Release*,153, 16-22.

Han, MY., Gao, XH., Su, JZ., Nie, SM. (2001), Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat Biotechnol*,19, 631-635.

Bagalkot, V., Zhang, L., Levy-Nissenbaum, E., Jon, S., Kantoff, P.W., Langer, R., Farokhzad, O.C. (2007), Quantum dot-aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer. *Nano letters*,7(10), 3065–3070.

Shirasaki, Y., Supran, G.J., Bawendi, M.G., Vladimir, B.V. (2013), Emergence of colloidal quantum-dot light-emitting Technologies. *Nature Photonics*,7, 13–23.

Shi, F., Liu, S., Su, X. (2014), Dopamine functionalized–CdTe quantum dots as fluorescence probes for l-histidine detection in biological fluids, *Talanta*,125, 221-226.

Sperling, R.A., Parak, W.J. (2010), Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc. A*, 368 , 1333–1383. (makaleyi indirmedi)

Xu, X., Ray, R., Gu, Y., Ploehn, H.J., Gearheart, L., Raker, K., Scrivens, W.A. (2004), Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. *Journal of the American Chemical Society*, 126(40) , 12736–12737.

Singh, I., Arora, R., Dhiman, H., Pahwa, R. (2018), Carbon Quantum Dots: Synthesis, Characterization and Biomedical Applications. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*, 15(2), 219–230.

Bao, G., Mitragotri, S., Tong, S. (2013), Multifunctional nanoparticles for drug delivery and molecular imaging. *Annual review of biomedical engineering*, 15, 253–282.

des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.J., Pr  at, V. (2006), Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*, 116(1), 1–27.

El-Shabasy, RM., Farouk Elsadek, M., Mohamed Ahmed, B., Fawzy Farahat, M., Mosleh, KN., Taher , MM. (2021), Recent Developments in Carbon Quantum Dots: Properties, Fabrication Techniques, and Bio-Applications. *Processes*, 9(2) , 388.

Ai, L., Yang, Y., Wang, B., Chang, J., Tang, Z., Yang, B., Lu, S. (2021), Insights into photoluminescence mechanisms of carbon dots: advances and perspectives. *Science Bulletin*, 66(8), 839-856.

Huang, G., Chen, X., Wang, C., Zheng, H., Huang, Z., Chen, D., Xie, H. (2017), Photoluminescent carbon dots derived from sugarcane molasses: synthesis, properties, and applications. *RSC Adv*, 7, 47840–47847.

Mishra, V., Patil, A., Thakur, S., Kesharwani, P. (2018), Carbon dots: emerging theranostic nanoarchitectures. *Drug discovery today*, 23(6), 1219–1232.

Sun, Y.P., Zhou, B., Lin, Y., Wang, W., Fernando, K. A., Pathak, P.,..., Xie, S.Y. (2006). Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *Journal of the American Chemical Society*,128(24), 7756–7757.

Zhou, J.H., He, J.P., Ji, Y.J., Dang, W.J., Liu, X.L., Zhao, G.W.,..., Hu, H.P. (2007) CTAB assisted microwave synthesis of ordered mesoporous carbon supported Pt nanoparticles for hydrogen electro-oxidation. *Electrochim. Acta* 52, 4691–4695.

Yao, S., Hu, Y., Li, G. (2014), A one-step sonoelectrochemical preparation method of pure blue fluorescent carbon nanoparticles under a high intensity electric field. *Carbon*,66, 77-83.

Wang, Q., Liu, X., Zhang, L.C., Lv, Y. (2012), Microwave-assisted synthesis of carbon nanodots through an eggshell membrane and their fluorescent application. *Analyst*,137, 5392–5397.

Pires, N.R., Santos, C.M.W., Sousa, R.R., De Paula, R.C.M., Cunha, P.L.R., Feitosa, J.P.A. (2015), Novel and Fast Microwave-Assisted Synthesis of Carbon Quantum Dots from Raw Cashew Gum. *J. Brazil. Chem. Soc.*,26, 1274–1282.

Pan, D., Zhang, J., Li, Z., Wu, M. (2010), Hydrothermal route for cutting graphene sheets into blue-luminescent graphene quantum dots. *Adv. Mater.*,22, 734–738.

Mehta, V.N., Jha, S., Kailasa, S.K. (2014), One-pot green synthesis of carbon dots by using *Saccharum officinarum* juice for fluorescent imaging of bacteria (*Escherichia coli*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells. *Mater. Sci. Eng. C*,38, 20–27.

Xie, Y., Kocaefer, D., Chen, C., Kocaefer, Y. (2016), Review of Research on Template Methods in Preparation of Nanomaterials. *Journal of Nanomaterials.*, 1-10.

Yang, Y., Wu, D., Han, S., Hu, P., Liu, R. (2013), Bottom-up fabrication of photoluminescent carbon dots with uniform morphology via a soft-hard template approach. *Chemical communications (Cambridge, England)*,49(43), 4920–4922.

Yang, S.T., Wang, X., Wang, H., Lu, F., Luo, P.G., Cao, L.,..., Sun, Y.P. (2009), Carbon dots as nontoxic and high performance fluorescence imaging agents. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces.*,113, 18110-18114.

Tao, H., Yang, K., Ma, Z., Wan, J., Zhang, Y., Kang, Z., Liu, Z. (2012), In vivo NIR fluorescence imaging, biodistribution, and toxicology of photoluminescent carbon dots produced from carbon nanotubes and graphite. *Small.*,8, 281-290.

Liu, J.H., Yang, S.T., Chen, X.X., Wang, H. (2012), Fluorescent carbon dots and nanodiamonds for biological imaging: preparation, application, pharmacokinetics and toxicity. *Current drug metabolism*,13(8), 1046–1056.

Xu, Y., Jia, X.H., Yin, X.B., He, X.W., Zhang, Y.K. (2014), Carbon quantum dot stabilized gadolinium nanoprobe prepared via a one-pot hydrothermal approach for magnetic resonance and fluorescence dual modality bioimaging. *Anal Chem*,86(12), 122-12129.

Palacios-Hernandez, P., Hirata-Flores, G., Contreras-Lopez, O., Mendoza-Sanchez, M., Valeriano-Arreola, I., Gonzalez-Vergara, E., Mendez-Rojas, M. (2012), Synthesis of Cu and Co metal oxide nanoparticles from thermal decomposition of tartrate complexes. *Inorganica Chimica Acta.*,392, 277–282.

Xia, J., Kawamura, Y., Suehiro, T., Chen, Y., Sato, K. (2019), Carbon dots have antitumor action as monotherapy or combination therapy. *Drug discoveries & therapeutics*,13(2), 114–117.

Lim, S.Y., Shen, W., Gao, Z. (2015), Carbon Quantum Dots and their applications. *Chem Soc Rev.*,44, 362-381.

Barras, A., Pagneux, Q., Sane, F., Wang, Q., Boukherroub, R., Hober, D., Szunerits, S. (2016), High Efficiency of Functional Carbon Nanodots as Entry Inhibitors of Herpes Simplex Virus Type 1. *ACS applied materials & interfaces*,8(14), 9004–9013.

Łoczechin, A., Séron, K., Barras, A., Giovanelli, E., Belouzard, S., Chen, Y. T., Metzler-Nolte, N., Boukherroub, R., Dubuisson, J., Szunerits, S. (2019), Functional Carbon Quantum Dots as Medical Countermeasures to Human Coronavirus. *ACS applied materials & interfaces*,11(46), 42964–42974.

Lin, F., Bao, Y.-W., Wu, F.G. (2019), Carbon dots for sensing and killing microorganisms. *C—J. Carbon Res.*,5, 33.

Thakur, M., Pandey, S., Mewada, A., Patil, V., Khade, M., Goshi, E., Sharon, M. (2014), Antibiotic conjugated fluorescent carbon dots as a theranostic agent for controlled drug release, bioimaging, and enhanced antimicrobial activity. *Journal of drug delivery*, 2014, 282193.

Liu, J.H., Anilkumar, P., Cao, L., Wang, X., Yang, S.T., Luo, P.G.J.,.....,Sun, Y.P. (2010), Cytotoxicity evaluations of fluorescent carbon nanoparticles. *Nano Life*, 1(1&2), 153-161.

Wang, Y., Anilkumar, P., Cao, L., Liu, J.H., Luo, P.G., Tackett, K.N., 2nd, Sahu, S., Wang, P., Wang, X., Sun, Y.P. (2011), Carbon dots of different composition and surface functionalization: cytotoxicity issues relevant to fluorescence cell imaging. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*,236(11), 1231–1238.

Wei, Y., Jin, X., Kong, T., Zhang, W., Zhu, B. (2019), The endocytic pathways of carbon dots in human adenoid cystic carcinoma cells. *Cell proliferation*,52(3), e12586.

Gonçalves, H.M., Duarte, A.J., Esteves da Silva, J.C. (2010), Optical fiber sensor for Hg(II) based on carbon dots. *Biosensors & bioelectronics*, 26(4), 1302–1306.

Navazi, Z., Omid, Y., Eskandani, M., Davaran, S. (2019), Cadmium-free quantum dot-based theranostics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*,118, 386-400.

Nekoueian, K., Amiri, M., Sillanpää, M., Marken, F., Boukherroub, R., Szunerits, S. (2019), Carbon-based quantum particles: An electroanalytical and biomedical perspective. *Chemical Society Reviews*,48, 4281-4316.

Velipaşaoğlu, S. (2020), Aşı immünitesi ve yanıtını etkileyen faktörler. *Osmangazi Journal Of Medicine*, 1-5.

Kocaeli Alerji, “Bağışıklık (İmmün) Sistemi Nedir?“, (Erişim 26.01.2022), <http://kocaelialerji.com/tr/bagisiklik-sistemi-hastaliklari/bagisiklik-sistemi-nedir/>

Çetin, R., Güven, G., Tunçbilek, V., Develi, S., Aykutluğ, Ö., Korkmaz, A. (2015), Mikroorganizmalar ve insan vücudu ile olan etkileşimleri. *TAF preventive medicine bulletin*,14, 10.5455/pmb.1-1422383762.

Aksoy, B. (2013), Derinin doğal bağışıklık sistemi. *Türkderm*, 47(1), 2-11.

Camcıoğlu, Y., Deniz, G. (Çev.) (2007), Temel İmmünoloji – İmmün sistemin işlev ve bozuklukları. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., 1. Baskı., İstanbul; İstanbul Medikal Yayıncılık, s: 21-39.

Goldsmith, LA., Katz, SI., Gilchrest, BA., Paller, AS., Leffell, DJ., Wolff, K. (2012). Fitzpatrick’ Dermatology in General Medicine. 8th edition. USA: McGraw-Hill Companies Inc,105-499.

Rosales, C., Uribe-Querol, E. (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed research international*,2017, 9042851.

Schwarz, T. (2012), Immünology. In: Dermatology. Bologna JL, Jorizzo JL, Schaffer JV, (eds.), 3rd edition, Philadelphia: Elsevier Saunders, s: 81-98.

Yeşilyurt, E., Fidan, I. (2011). Dendritik Hücreler ve Enfeksiyonlardaki Rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*,41(3), 91-102.

Mirsky, HP., Miller, MJ., Linderman, JJ., Kirschner, DE. (2011), Systems biology approaches for understanding cellular mechanisms of immunity in lymph nodes during infection. *J Theor Biol*,287, 160-70.

Gupta, P.D., Tyagi, S. (2020), Development Of Immune System From New Born To Adult: A New Insight. *Journal of Cell and Tissue Research*,20(1), 6853-6860.

Torang, A., Gupta, P., Klink, D.J., 2nd (2019), An elastic-net logistic regression approach to generate classifiers and gene signatures for types of immune cells and T helper cell subsets. *BMC bioinformatics*, 20(1), 433.

Suzuki, Y. (1999), Genes, cells and cytokines in resistance against development of toxoplasmic encephalitis. *Immunobiology*,201, 255–271.

Akdoğan, M., Yöntem, M. (2018), Sitokinler. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*,3(1), 36-45.

Iwasaki, A., Medzhitov, R. (2010), Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*,327(5963), 291-295.

Yan, H.Q., Banos, M.A., Herregodts, P., Hooghe, R., Hooghe-Peters, E.L. (1992), Expression of interleukin (IL)-1 beta, IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and after injury. *European journal of immunology*,22(11), 2963–2971.

Arango Duque, G., Descoteaux, A. (2014), Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in immunology*,5, 491.

Watkins, L.R., Wiertelak, E.P., Goehler, L.E., Smith, K.P., Martin, D., Maier, S.F. (1994), Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain research*, 654(1), 15–26.

Hirota, H., Kiyama, H., Kishimoto, T., Taga, T. (1996), Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *The Journal of experimental medicine*,183(6), 2627–2634.

Zhang, J.M., An, J. (2007), Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics*,45(2), 27–37.

Boka, G., Anglade, P., Wallach, D., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Hirsch, E.C. (1994), İmmünocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neuroscience letters*,172(1-2), 151–154.

Beutler, BA. (1999), The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol*, (Suppl), 57, 16–21.

Cunha, F.Q., Poole, S., Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H. (1992), The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *British journal of pharmacology*, 107(3), 660–664.

Ben-Sasson, S.Z., Hu-Li, J., Quiel, J., Cauchetaux, S., Ratner, M., Shapira, I., Dinarello, C.A., Paul, W.E. (2009), IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,106(17), 7119–7124.

Yazdi, A.S., Guarda, G., Riteau, N., Drexler, S.K., Tardivel, A., Couillin, I., Tschopp, J. (2010). Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,107(45), 19449–19454.

Ravikumar, B., Futter, M., Jahreiss, L., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S.,..., Rubinsztein, D.C. (2009), Mammalian macroautophagy at a glance. *Journal of cell science*,122(Pt11),1707–1711.

Nishimoto, N., Kishimoto, T. (2004), Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. *Current opinion in pharmacology*,4(4), 386–391.

Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S. (2011), The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et biophysica acta*,1813(5), 878–888.

Manderson, A.P., Kay, J.G., Hammond, L.A., Brown, D.L., Stow, J.L. (2007). Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNF alpha. *The Journal of cell biology*,178(1), 57–69.

Dorman, S.E., Holland, S.M. (2000), Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine & growth factor reviews*,11(4), 321–333.

Wang, K.S., Frank, D.A., Ritz, J. (2000), Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood*,95(10), 3183–3190.

Gatti, S., Beck, J., Fantuzzi, G., Bartfai, T., Dinarello, C.A. (2002), Effect of interleukin-18 on mouse core body temperature. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*,282(3), R702–R709.

Lee, J.K., Kim, S.H., Lewis, E.C., Azam, T., Reznikov, L.L., Dinarello, C.A. (2004), Differences in signaling pathways by IL-1beta and IL-18. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,101(23), 8815–8820.

Croxford, A.L., Kulig, P., Becher, B. (2014), IL-12-and IL-23 in health and disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 25(4), 415–421.

Yoshida, H., Hamano, S., Senaldi, G., Covey, T., Faggioni, R., Mu, S.,..., Mak, T.W. (2001), WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to L. major infection. *Immunity*,15(4), 569–578.

Stumhofer, J.S., Laurence, A., Wilson, E.H., Huang, E., Tato, C.M., Johnson, L.M., ..., Hunter, C.A. (2006), Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nature immunology*, 7(9), 937–945.

Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., O'Garra, A. (1991), IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 147(11), 3815–3822.

Travis, M.A., Sheppard, D. (2014), TGF- β activation and function in immunity. *Annual review of immunology*, 32, 51–82.

Comerford, I., McColl, S.R. (2011), Mini-review series: focus on chemokines. *Immunology and cell biology*, 89(2), 183–184.

Çağlar, M., Kansu, E. (2004), Kemokinler, Kemokin Reseptörleri Ve İnflamasyon. *ANKEM Derg*, 18(Ek 2), 164-168.

Gao, Z., Shen, G., Zhao, X., Dong, N., Jia, P., Wu, J., ..., Wang, Y. (2013), Carbon dots: a safe nanoscale substance for the immunologic system of mice. *Nanoscale research letters*, 8(1), 276.

Charlton, B., Lafferty, K.J. (1995), The Th1/Th2 balance in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 7, 793–798.

Lategan, K., Fowler, J., Bayati, M., Fidalgo de Cortalezzi, M., Pool, E. (2018), The Effects of Carbon Dots on Immune System Biomarkers, Using the Murine Macrophage Cell Line RAW 264.7 and Human Whole Blood Cell Cultures. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 8(6), 388.

Huang, H.T., Lin, H.J., Huang, H.J., Huang, C.C., Lin, J.H., Chen, L.L. (2020), Synthesis and evaluation of polyamine carbon quantum dots (CQDs) in *Litopenaeus vannamei* as a therapeutic agent against WSSV. *Scientific reports*, 10(1), 7343.

Vetter, V., Denizer, G., Friedland, L.R., Krishnan, J., Shapiro, M. (2018), Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Annals of medicine*,50(2), 110–120.

Aytar, M., Başbülbul, G. (2019), Rekombinant Aşılar. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*,17(1), 1-10.

Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C.X., Mitter, N., Yu, C., Middelberg, A. P. (2014), Nanoparticle vaccines. *Vaccine*,32(3), 327–337.

Kim, M., Park, J., Shon, Y., Kim, G., Shim, G., Oh, Y. (2014), Nanotechnology and vaccine development. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*,9(5), 227-235.

Jorge, S., Dellagostin, O.A. (2017), The development of veterinary vaccines: A review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnol. Res. Innov.*,1, 6–13

Zhu, M., Wang, R., Nie, G. (2014), Applications of nanomaterials as vaccine adjuvants. *Human vaccines & immunotherapeutics*,10(9), 2761–2774.

Furman, D., Davis, M.M. (2015), New approaches to understanding the immune response to vaccination and infection. *Vaccine*,33(40), 5271–5281.

Stammers, T.G., Hunt, G.R., Erden, Y.J. (2013), The promise and challenges of nanovaccines and the question of global equity. *Nanotechnology Perceptions*,9, 16-27.

Petkar, K.C., Patil, S.M., Chavhan, S.S., Kaneko, K., Sawant, K.K., Kunda, N.K., Saleem, I.Y. (2021), An Overview of Nanocarrier-Based Adjuvants for Vaccine Delivery. *Pharmaceutics*,13(4), 455.

Belza, J., Opletalová, A., Poláková, K. (2021), Carbon dots for virus detection and therapy. *Mikrochimica acta*,188(12), 430.

Cheng, J., Xu, Y., Zhou, D., Liu, K., Geng, N., Lu, J.,..., Liu, J. (2019), Novel carbon quantum dots can serve as an excellent adjuvant for the gp85 protein vaccine against avian leukosis virus subgroup J in chickens. *Poultry science*,98(11), 5315–5320.

Zhu, G., Zhang, F., Ni, Q., Niu, G., Chen, X. (2017), Efficient Nanovaccine Delivery in Cancer Immunotherapy. *ACS Nano*,11(3), 2387–2392.

Del Giudice, G., Rappuoli, R., Didierlaurent, A.M. (2018), Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Seminars in immunology*,39, 14–21.

Coffman, R.L., Sher, A., Seder, R. A. (2010), Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*,33(4), 492–503.

Wu, Z., Liu, K. (2021), Overview of vaccine adjuvants. *Medicine in Drug Discovery*,11, 100103.

Ayaz, F., Demir, D., Bölgen, N. (2021), Injectable chitosan cryogel microspheres with biocompatible properties on mammalian macrophages in vitro. *J Mater Sci*,56, 17268–17277.

Yüzer, A., Ayaz, F., Ince, M. (2019), Immunomodulatory activities of zinc(II)phthalocyanine on the mammalian macrophages through p38 pathway: Potential ex vivo immunomodulatory PDT reagents. *Bioorg Chem.*,92, 103249.

Yang, Mei & Li, Baoyan & Zhong, Kailiang & Lu, Yun. (2018). Photoluminescence properties of N-doped carbon dots prepared in different solvents and applications in pH sensing. *Journal of Materials Science*. 53.

Shangguan J, Huang J, He D, He X, Wang K, Ye R, Yang X, Qing T, Tang J. Highly Fe³⁺-Selective Fluorescent Nanoprobe Based on Ultrabright N/P Codoped Carbon Dots and Its Application in Biological Samples. *Anal Chem.* 2017 Jul 18;89(14):7477-7484.

Higuchi, Y., Oka, M., Kawakami, S., & Hashida, M. (2008). Mannosylated semiconductor quantum dots for the labeling of macrophages. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 125(2), 131–136.

O'Hara, T., Seddon, B., O'Connor, A., McClean, S., Singh, B., Iwuoha, E., Fuku, X., & Dempsey, E. (2017). Quantum Dot Nanotoxicity Investigations Using Human Lung Cells and TOXOR Electrochemical Enzyme Assay Methodology. *ACS sensors*, 2(1), 165–171.

Xia J, Kawamura Y, Suehiro T, Chen Y, Sato K. Carbon dots have antitumor action as monotherapy or combination therapy. *Drug Discov Ther.* 2019;13(2):114-117.

Scully CM, Hays WD, Fischer TH (2010) Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets. *J Inflamm (Lond)* 7:53.

Qin, Y., Zhou, Z. W., Pan, S. T., He, Z. X., Zhang, X., Qiu, J. X., Duan, W., Yang, T., & Zhou, S. F. (2015). Graphene quantum dots induce apoptosis, autophagy, and inflammatory response via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B mediated signaling pathways in activated THP-1 macrophages. *Toxicology*, 327, 62–76.

Belperain, S., Kang, Z. Y., Dunphy, A., Priebe, B., Chiu, N., & Jia, Z. (2021). Anti-Inflammatory Effect and Cellular Uptake Mechanism of Carbon Nanodots in Human Microvascular Endothelial Cells. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 11(5), 1247.

Randjelovic, Pavle & Veljković, Slavimir & Stojiljković, Nenad & Sokolovic, Dusan & Ilić, Ivan & Laketić, Darko & Randjelović, Dušica & Randjelović, Nebojša. (2015). The Beneficial Biological Properties of Salicylic Acid. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*. 32. 259-265. 10.1515/afmnai-2015-0026.

Zhang, T., Sun, L., Liu, R., Zhang, D., Lan, X., Huang, C., Xin, W., Wang, C., Zhang, D., & Du, G. (2012). A novel naturally occurring salicylic acid analogue acts as an anti-inflammatory agent by inhibiting nuclear factor-kappaB activity in RAW264.7 macrophages. *Molecular pharmaceutics*, 9(3), 671–677.

Wang X, Zhang Y, Kong H, Cheng J, Zhang M, Sun Z, Wang S, Liu J, Qu H, Zhao Y. Novel mulberry silkworm cocoon-derived carbon dots and their anti-inflammatory properties. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2020 Dec;48(1):68-76.

Nair, A., Haponiuk, J. T., Thomas, S., Gopi, S. (2020). Natural carbon-based quantum dots and their applications in drug delivery: A review ,*Biomedicine & Pharmacotherapy*, 132,110834.

Jessica, F. Y., Fong, Y. H. and Sing, M. (2018). Carbon dots as a new class of light emitters for biomedical diagnostics and therapeutic applications. *Fullerens, Graphenes and Nanotubes*, 227–295.

8. İNTİHAL RAPORU

IN VITRO MEMELİ MAKROFAJLARI ÜZERİNDEKİ KARBON KUANTUM NOKTALARININ İMMÜNOMODÜLATÖR AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%15	EN	%10	%12	%4
BENZERLİK ENDEKSİ		İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.mdpi.com	%3
	İnternet Kaynağı	
2	espace.inrs.ca	%2
	İnternet Kaynağı	
3	www.tandfonline.com	%1
	İnternet Kaynağı	
4	www.ncbi.nlm.nih.gov	%1
	İnternet Kaynağı	
5	www.biori.periodikos.com.br	%1
	İnternet Kaynağı	
6	Zhenchuan Wu, Keqin Liu. "Overview of vaccine adjuvants", Medicine in Drug Discovery, 2021	%1
	Yayın	
7	espace.library.uq.edu.au	%1
	İnternet Kaynağı	