

AŞILARIN NAZAL YOLDAN UYGULANIŞI NASAL DELIVERY OF VACCINES

Feray SAATÇI

Asuman BOZKIR

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology
06100 Tandoğan, Ankara-TURKEY

ÖZET

Bu derlemede aşılarda mukoza yollardan uygulanışı, nazal bağışıklık sistemi, nazal aşılamadan sonra bağışıklık yanıtının oluşması ve mukoza adjuvanlar değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Nazal aşı, NALT, mukoza adjuvan, biyoadeziv mikropartiküler sistem.

ABSTRACT

In this review; mucosal administration of vaccines, nasal immune system, the immune response following nasal vaccination and mucosal adjuvants were evaluated.

Key Words: Nasal vaccine, NALT, mucosal adjuvants, bioadhesive microparticulate system.

GİRİŞ

Tıp biliminin en önemli başarılarından bir tanesi olan aşılamaya sayesinde pek çok enfeksiyöz hastalıkla mücadele edilebilmekte ancak bağışıklamanın sistematik bir şekilde yürütülemediği ülkelerde bu hastalıklar hala ciddi bir sorun teşkil etmektedir. Enfeksiyonların pek çoğu mukoza yüzeylere etkir veya mukoza yüzeylerden yayılmaya başlar. Bundan dolayı; bu enfeksiyöz ajanlara karşı aktif bir bağışıklama sağlamak başarılı bir mukoza bağışıklık yanıtının oluşturulmasına bağlıdır.

Pek çok antijenik molekül epitel bariyerlerden zayıf transport özelliği gösterirler ve bu yüzden büyük çoğunluğu parenteral olarak uygulanır. Sistemik bağışıklama; enfeksiyöz hastalıkların yok edilmesinde gösterdiği gözardı edilemez başarısına rağmen günden güne büyüyen bir takım sorunları da beraberinde getirmektedir. Parenteral yola alternatif bir yol olan mukoza bağışıklama; taşıdığı pek çok avantajla klinik olarak geniş bir araştırma konusu olmuştur.

Aşıların Mukozal Yollardan Uygulanışı

Mukozal bağışıklamanın orjini binlerce yıl öncesine dayanır ve ilk kez Çinli tıp bilginleri tarafından uygulanmıştır. Çinli bilim adamları frengiyle oluşan yaraların kurutulmuş kabuklarını inhale toz haline getirerek küçük çocukları bu hastalığa karşı bağışıklamışlardır. Bu kadar eskiye dayanmasına rağmen mukozal aşılama günümüzde geniş bir ürün grubuyla temsil edilememektedir. Günümüzde kullanımda olan hemen hemen tüm aşılar parenteral yoldan uygulanmaktadır. İstisna olarak ancak birkaç uygulama örnek verilebilir (1):

- Canlı attenüe polio ve salmonella aşıları (oral yoldan)
- İnfluenza aşısı (nazal yoldan)

Mukozal bağışıklamanın, sistemik bağışıklamanın yerini almasıyla gelişmekte olan ülkelerde enfekte olmuş iğnelerin bir seferden fazla kullanımıyla ortaya çıkan hastalık yayılma riski önlenebilecektir.

Mukozal bağışıklamanın en önemli avantajı; lokal ve sistemik bağışıklığı birlikte uyarabilmesidir. Aynı zamanda mukozal bağışıklama, pek çok patojenin organizmaya giriş yaptığı mukozal bölgelerde lokal uzun dönem immünolojik hafızanın uyarılmasında en etkili yaklaşımdır. Son yıllarda yapılan pek çok araştırma ile "ortak mukozal bağışıklık sistemi" nin varlığı ortaya konulmuştur. Bunun anlamı; vücudun herhangi bir mukozal yüzeyinden yapılan aşı uygulamasının bu bölgeye çok uzak mukozal bölgelerde dahi bağışık yanıtı uyarabilmesidir (2,3). Solunum, intestinal ve jenital yolda enfeksiyöz hastalıklara yol açan hemen hemen tüm viral, bakteriyel ve parazitik ajanlar mukozal zarlar tarafından uygun hale getirilen geniş yüzeyler vasıtasıyla organizmaya giriş yaparlar (4).

Lokal bağışıklama için uygun olan mukozal yollar; oral, nazal, vajinal ve rektal yolu kapsamaktadır.

Nazal Bağışıklamanın Önemi

Nazal yol mukozal bağışıklık sisteminin çok önemli bir uygulama yoludur çünkü inhalasyonla organizmaya alınan antijenler için ilk temas noktasıdır ve böylelikle nazal bağışıklama ile patojenler organizmaya ilk girdikleri noktada nötralizasyona uğrarlar. Bunun sonucu olarak intranazal bağışıklama hem periferel hem de mukozal bağışıklama için çok etkin bir yoldur. Nazal uygulama yolunu üstün kılan nitelikler şunlardır (2,5-8):

- Kolaylıkla uygulanabilir.
- Nazal mukoza damar ağı açısından zengindir.
- Nazal mukoza çok sayıda mikrovilusa bağlı olarak geniş bir absorpsiyon alanına sahiptir.
- Hem mukozal hem sistemik immün cevabı uyarabilir.
- Nazal mukozanın diğer mukozal yapılara oranla geçirgenliği daha fazladır.
- İnsan topluluklarının bağışıklanmasında kullanılabilir kolay bir yöntemdir.
- İğne ve şırınga kullanımı olmadığı için enfeksiyon yayılma riski yoktur.
- Uygulanan aşılarda ilk geçiş etkisine uğrama sorunu yoktur.
- Mukozal bağışıklık sistemik bağışıklıktan daha önce oluştuğu için çok erken yaşlarda bağışıklama için iyi bir yaklaşımdır.
- Nazal aşılarda üretimi sistemik aşılarda olduğu kadar zor şartları gerektirmez bu açıdan üretimleri daha ucuzdur.
- Ortak mukozal bağışıklık sistemi sayesinde uzak mukozal bölgelerde dahi immün yanıt oluşturulabilir.

Nazal yoldan uygulanan aşılarda "ortak mukozal bağışıklık sistemi" nin varlığı sayesinde daha uzak mukozal bölgelerde de bağışık yanıt oluşturabildiğine dair değişik çalışmalar vardır. Yapılan bir çalışmada Herpes simplex ait glikoprotein B'yi eksprese eden rekombinant bir adenovirüs vektörü intranazal olarak farelere uygulandığında mukozal bağışık yanıt indüklenmiş ve farelerin bu hastalığa karşı uzun dönem korunmaları mümkün olmuştur. Bu vektörün nazal yoldan uygulanmasıyla aynı zamanda jenital yolda da spesifik bir immün cevap gözlenmiştir. İnvajinal bağışıklamada ise aynı antijen için vajinal sekresyonlarda düşük seviyelerde IgA (İmmunglobulin A) ve Ig G (İmmunglobulin G) oluşumuna rastlanmıştır (9,10). Bu sonuçlar nazal yoldan verilen ve immünojenik antijenleri eksprese eden adenovirüs vektörlerin, HIV (Human Immunodeficiency Syndrome) ve HSV (Herpes Simplex Virüs) ile mücadele için mükemmel aday aşılardıklarını göstermektedir. Buna benzer pek çok antijenin nazal uygulanmasıyla vajinal sekresyonlarda yüksek seviyelerde spesifik Ig A ve Ig G oluşumu gözlenmiştir. Diğer mukozal yollarla karşılaştırıldığında nazal yol bir takım üstünlüklere sahiptir (1). Bunlar:

1) Nazal bağışıklama için kullanılan antijen dozu oral yola göre çok azdır. Nazal yolun düşük enzimatik aktiviteye sahip bir mukoza yapısından dolayı nazal yolla uygulanan antijenler oral yolda olduğu gibi düşük pH değerlerine ve enzimlerin parçalayıcı özelliklerine maruz kalmazlar. Düşük dozda antijen kullanımı özellikle rekombinant DNA teknolojisiyle üretilen ve çoğu kez üretimleri oldukça pahalı olan antijenlerin kullanımı sırasında büyük bir avantaj getirir.

2) Aşıların pulmoner yolla uygulanması çok daha zor bir işlemdir, daha ileri teknolojilere ihtiyaç vardır ve aşırı duyarlılık gibi, potansiyel toksisiteye bağlı önemli sorunlar da kullanımını sınırlar.

3) Nazal yolu jenital ve rektal yolla karşılaştırdığımızda ise; nazal yol lokal ve sistemik bağışık yanıtları daha çok indükleyebilen, kullanımı daha kolay ve kabul edilebilir bir uygulama yoludur. Bu nedenlerden dolayı günümüzde pek çok değişik tipte nazal aşı formülasyon ve uygulamaları üzerinde çalışmalar sürmektedir. Bunların bir kısmı Faz 1,2 aşamalarında, bir kısmında ise Faz 3 klinik aşamaya ulaşılmış bir kısmı ise pazarlanmaktadır (11-13). Örneğin lipozom şeklinde formüle edilmiş nazal bir influenza aşısı Avrupa'da yakın bir zamandan bu yana pazarlanmaktadır. Ayrıca Aviron tarafından geliştirilmiş olan canlı attenüe bir influenza aşısının da son aşamalarına gelinmiştir.

Nasal Bağışıklık Sistemi

Üst ve alt solunum yoluna ait bağışıklık sistemi;

1)Epitel dokuyu kaplayan bir kompartman ve hemen altında immunokompetent hücreleri içeren birleştirici doku,

2)Burna ve bronşlara ait lenfoid dokular. NALT(Burna bağlı lenfoid doku), BALT(Bronşlara bağlı lenfoid doku), LALT(Larinkse bağlı lenfoid doku),

3)Solunum sistemine drenaj yapan lenf düğümleri

olmak üzere 3 kısımda incelenebilir (2).

Solunum yolundaki epitel bariyerler ise 4 tip hücreden oluşmaktadır. Bunlar:

- Alveolar makrofajlar,
- Dendritik hücreler,
- M hücreleri,
- İntraepitel lenfositler

olarak sıralanabilir.

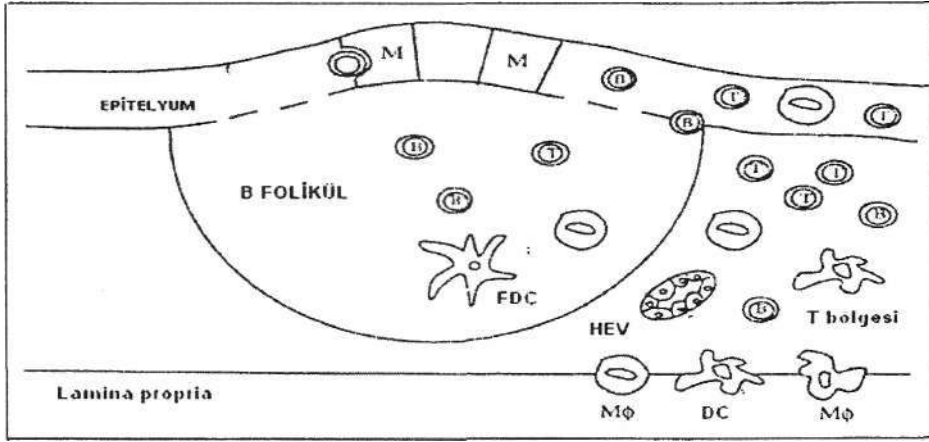
Mukozal bağışık yanıtların çoğunlukla MALT da oluşturulduğuna inanılmaktadır.

MALT (Mukozaya bağlı lenfoid doku) ve onun değişik formları olan GALT(Barsaklara bağlı lenfoid doku) ve BALT'ın tanımlanmasıyla birlikte "mukozal bağışıklama" ve onun uygulamaları olan "mukozal aşılar" geniş bir şekilde araştırılma olanağına kavuşmuştur. Genel terimlerle MALT B hücre folikülleri ve bunlara komşu T hücre alanlarını içeren lenfoid

agregatlardan oluşmuştur. Foliküllerin üzeri epitel dokuyla çevrilidir ve bu epitel antijenleri seçici olarak absorplama özelliğine sahiptir (Şekil 1). Temel membranın üzerinde, epitel dokunun içinde intraepitel B ve T lenfositleri bulunur. Bu yapılar arasındaki kompleks etkileşmeler mukozadaki homeostazisi düzenler ve etkin bir koruma sağlar. Mukozal bölgelerdeki savunma mekanizmasının prensibi doğal olarak üretilen sIgA (salgısal IgA) etkinliğine bağlıdır. Mukozal bağışıklamadan sIgA etkinliği sorumludur. Bunlar proteolize direnirler, antikör bağlı T hücre aracılı sitotoksiteye aracılık ederler, mikrobiyal bağlanma, kolonizasyon ve penetrasyonunu inhibe ederler, biyolojik olarak aktif antijenleri nötralize eder ve komplemanı aktive ederler (14,15).

Uygun bir hayvan modelinin bulunamaması nedeniyle başlangıçta daha çok alt solunum yolu ve BALT üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Spitz ve arkadaşları (16) sıçanların nazal mukozalarının morfolojisi ve fonksiyonları üzerine çalışmalar yapmışlar ve burada yer alan lenfoit agregatların MALT'a ait lenfoit dokuya benzer özellikler gösterdiklerini bulmuşlardır. Burada da M hücrelerinin varlığı gözlenmiş, yapıların Peyer Plaklarına ve BALT'taki lenfoit yapılara benzerliği esas alınarak bu oluşumlara GALT'a ve BALT'a analog olmak üzere NALT ismini vermişlerdir.

NALT, M hücrelerini içeren limfoepitel dokuyla kaplı mukozal bir bölgedir ve nazal bağışık yanıtın oluşturulmasından sorumludur. Sıçanların NALT yapısı B ve T hücre alanları ile M hücrelerini içeren bir epitel tabakayla kaplı çok iyi organize olmuş yapılardır. İnsanlarda NALT'a eşdeğer dokular Waldeyer halkası olarak bilinir. Waldeyer halkası; nazofaringeal tonsil, bir çift palatin tonsil, bir çift tubal tonsil ve linguinal tonsilden oluşmaktadır (17). Tonsiller lenfoid hücre agregatlarından oluşmuşlardır ve yapı olarak barsaklardaki Peyer plaklarına benzerler. İnsan tonsillerinin eşsiz doğası onların çok çeşitli kompleks immünolojik fonksiyonları yerine getirmesine olanak vermektedir. Tonsiller lokal bağışıklıktan sorumlu organlardır, nazofaringeal ve palatin tonsiller immün gözetim ve koruma görevinden sorumludurlar (2). Tonsillerin mukozal immün savunma işleminde önemli rol oynamaları onların inhalasyonla alınan antijenlere karşı yakın temas kurabilecekleri bir bölgede yer almalarından kaynaklanmaktadır. Tüm hayvan türlerinde insan tonsillerine eşdeğer tonsil yapısı yoktur bu yüzden hayvanlardan elde edilen bulgulara ait karşılaştırmalar daha gerçekçi yapılmalıdır.

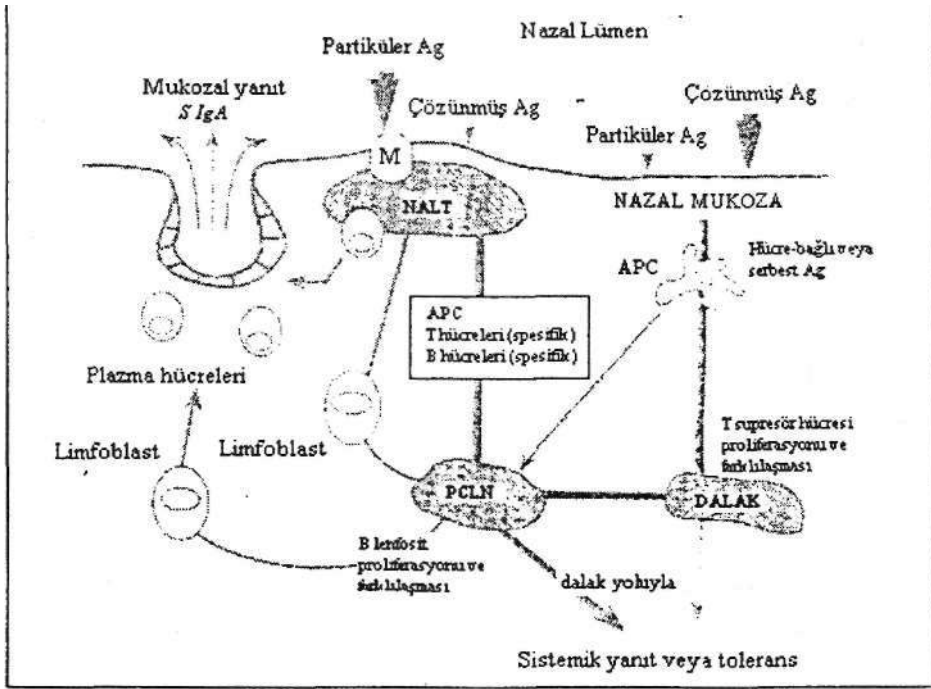


Şekil 1: NALT'ın yapısı. B-B hücresi; M-M hücresi; M ϕ -makrofajlar; DC-dendritik hücre; FDC-foliküler dendritik hücreler; HEV; yüksek endotelial venüller (3).

İntranazal Bağışıklama Sonrası Bağışık Yanıtın Oluşması

İntranazal bağışıklamadan sonra hem humoral hem de hüresel tipte bağışık yanıt oluşabilir. Antijen submukozadaki lenfoit hücelere geçer. Buralarda antijenin işlenmesi gerçekleşir. Antijenle nazal mukoza ve NALT arasındaki etkileşme pek çok faktöre bağlıdır ama esasen antijenin fiziksel doğası, dozu ve uygulama sıklığı rol oynar. Antijenin fiziksel özellikleri onun MALT ile etkileşim tarzını belirler. Partiküler haldeki antijenler M hüceleri tarafından alınırlar ve posterior lenf düğümlerine aşınırlar. Küçük molekül ağırlıklı çözüner haldeki antijenler nazal epitelden penetre olurlar.

Bu tip antijenler dendritik hücelere, makrofajlar ve lenfositler gibi antijen sunucu hücelere etkileşir, süperfasial servikal lenf düğümlerine oradan da posterior lenf düğümlerine drenajla taşınırlar (Şekil 2).



Şekil 2: Antijen uyarımının mekanizması ve NALT'ın antijenik uyarımından sonra bağışık yanıtın oluşması. Ag-Antijen; APC-Antijen sunucu hücreler; M-M hücreleri; PCLN-posterior servikal lenf düğümü; SCLN-superfasyal servikal lenf düğümü(3).

Çözünmüş haldeki antijenler servikal lenf düğümlerinde sistemik bir bağışık yanıtı veya toleransa sebep olurlar. Posterior lenf düğümleri ise salgısal bağışık yanıtın oluşmasında rol oynarlar. Çözünmüş haldeki antijenler bu tip bağışıklığı da uyarabilirler (11,17). Mukozal bağışık yanıt antijenin temas ettiği bölgede meydana gelen lokal bir fenomen olarak değerlendirilmekteydi. Son araştırmalarda ise "ortak mukozal bağışıklık sistemi" nin varlığı kanıtlanmış, bazı mekanizmaları açıklanmış ve bilinen bulaşıcı hastalıklar için mukozal yolun en üstün yol olduğu doğrulanmıştır. Ortak mukozal bağışıklık sistemi sayesinde uygulama yapılan mukozal bölge hariç diğer mukozal bölgelerde de bir bağışık yanıt oluşabilir. M hücreleri tarafından alınarak lenfoit agregatlara giren antijenler buradan T ve B lenfositleri ile antijen sunucu hücreleri (makrofajlar, dendritik hücreler ve B hücreleri) içeren lenfoit dokuya taşınırlar. Antijenik uyarıdan sonra B ve T hücreleri lenf düğümleri civarına göç ederler ve sonra farklılaşarak göğüs kanalı içinden dolaşıma geçerler. Neticede değişik mukozal yüzeylere ve ekzokrin bezlere yerleşirler.Örneğin BALT, tükürük bezleri,göğüs bezleri ve ürojenital mukozaya yerleşirler. Burada spesifik salgısal IgA üretimine başlarlar. Böylelikle bu mukozal bölgelerde bağışık yanıt sağlanmış olur (15).

Antijen Formülasyonları ve Nazal Bağışıklama İçin Kullanılan Taşıyıcı Sistemler

Bir aşının immün yanıt oluşturabilmesi pek çok etkene bağlıdır. Bunları şöyle sıralayabiliriz:

- Antijenin fiziksel doğası,
- Veriliş dozu ve veriliş yolu,
- Adjuvanların kullanımı,
- Konağın immünite durumu.

Bu grupta eczacılık yönünden aşı formülasyonunda önem taşıyan konuların başında adjuvanlar gelmektedir. Aşı antijenlerinin oluşturduğu bağışık yanıtı artırmak üzere aşılar eklenen maddelere adjuvan denir. Adjuvanlar immünomodülasyonu arttırarak, antijen sunucu hücrelerin işlevlerini geliştirerek, antijenlerin hedef bölgelere ulaşmalarını sağlayarak ve uzun süreli-yavaş salimli depo etki oluşturarak bağışık yanıtın artmasını sağlarlar (18). Nazal aşıların attenüe canlı hücrelerden hazırlandığı veya antijenin uygun bir immunostimülatör maddeyle ve/veya uygun bir taşıyıcı sistemin adjuvan niteliğinden yararlanılarak uygulandığında humoral ve hücreyel düzeyde bağışık yanıtı uyardığı kanıtlanmıştır (19). Peptit ve proteinlerin mukozal yollardan uygulanışında sınırlı bir başarı elde edilebilmiştir. Buna sebepler:

- Makromoleküllerin mukozal bariyerlerden sınırlı difüzyonları,
- Antijenlerin çok hızlı mukosliyer klerense uğramaları,
- Nazal sıvılardaki enzimatik aktivitenin varlığı,

Bu sebeplerden dolayı başarılı bir mukozal aşılama etkili mukozal adjuvanların kullanımıyla sağlanabilir (20).

Nazal Yolla Uygulanan Aşı Formülasyonlarında Kullanılan Adjuvanlar

Nazal yolla uygulanan aşı formülasyonlarında kullanılan aşı adjuvanlarını, taşıyıcı sistemler ve moleküler sistemler olarak 2 gruba ayırmak mümkündür:

Taşıyıcı sistemler:

Lipozomlar (21,22)

Mikroküreler, Nanoküreler (23-25)

Emülsiyonlar (26)

İscomlar (Bağışıklığı uyaran kompleks) (27)

Moleküler sistemler:

Sitokinler (28)

Bakteriler (29)

Bakteriyel toksinler (30,31)

Virüsler (32)

Membran partikülleri (33)

Plazmid DNA (34)

Lipitler, Gliseridler+Yağ asitleri (35)

Noniyonik blok polimer (20)

Nazal Aşı Uygulamalarında Adjuvan Olarak Kullanılan Taşıyıcı Sistemler

Lipozomlar biyoparçalanabilir ve immünolojik olarak inert olmaları nedeniyle mukozal aşılama için ideal sistemler olarak uygulanmışlardır. Lipozomlar antijeni yavaş salan depo sistemler olarak adjuvan etki gösterirler ve partiküler özellikleri antijen sunumunda rol oynamalarını sağlar (21,22).

Polimerik mikropartiküler sistemlerin mukozal bağışıklamada kullanılması ile aşılamanın etkinliği pek çok yönden arttırılmaktadır. Partiküler sistem; antijenleri enzimatik degradasyondan korur, daha iyi bir antijen alımı için mukozal dokuda sistemin yoğunlaşmasını sağlar, vücutta kalış süresini uzatır ve NALT gibi antijen alımının gerçekleştiği bölgelere hedeflenmeyi sağlar. Özellikle degradasyon özelliklerinin bilinmesiyle antijen salımı ayarlanarak istenilen düzeyde bağışık yanıtı ulaşmak mümkün olabilecektir. Günümüzde nazal partiküler taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında sıklıkla poli (laktid) (PLA) ve PLGA polimerleri tercih edilmektedir. Biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak geçimli olmaları ve uzun yıllardır kontrollü salım sistemleri şeklinde insanlarda kullanımlarının olması onları aşılama için birincil tercih yapmıştır (23,36,37).

Aşılamanın nazal olarak uygulanmalarında biyoadeziv polimer sistemlerle tasarlanmış mikropartiküler sistemlerin kullanımıyla aşı sisteminin nazal boşlukta kalış süresi arttırılmıştır. Uygulanan bir aşı formülasyonunun fiziksel özelliklerinin ve nazal dokularda yaptığı hücresel işlemlerin bilinmesinin yanısıra nazal fizyolojinin daha doğrusu mukosilyer klerensin incelenmesi son derece önemlidir. Mukosilyer klerens vücudun solunum ile alınan yabancı maddelere karşı korunması için geliştirilmiş non spesifik fizyolojik bir solunum yolu savunma mekanizmasıdır. Mukus sürekli bir film tabakası oluşturur. Silyalar bu jelimsi tabakayı sürekli

nazaofarenkse taşırlar. Mukus taşınma hızı 8 mm/dak olarak bulunmuştur. Mukus tabakası ve silyaların bu kombine hareketine mukosilyer klerens denir. İnsanda nazal yolla uygulanan basit bir toz veya sıvı bir formülasyon yaklaşık 15-20 dakikalık bir yarı ömürle nazal boşluktan temizlenir (38). Nazal boşluktaki bu klerens formülasyonun istenen bağışık yanıtı oluşturacak zamanı bulmasını engeller. Bu süre antijenlerin doku ve hücreler tarafından alınımının sağlanması için oldukça kısadır. Biyoadezif aşı sistemlerinin kullanımı mukosilyer klerensi yavaşlatacak böylece formülasyon nazal mukozadan uzun sürede geçiş yaparak antijeni nazal boşluktaki dokulara ve tonsiller gibi lenfoid yapılara sunma şansını daha fazla bulacaktır. 80'li yıllardan bu yana sistemik ve lokal ilaç verilmesini arttırmak amacıyla biyoadezif veya mukoadezif sistemler üzerinde çalışılmaktadır. Genel terimlerle biyoadezif sistem çok çeşitli doku yüzeylerine özellikle de mukozal epitele yapışmak üzere tasarlanmış sistemlerdir.

Biyo veya mukoadezyon elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler, Van der Waals güçleri veya hidrojen bağları gibi fiziksel ve kimyasal etkileşimleri içerir (39).

Bir biyoadezif sistemin getirdiği önemli avantajlar şöyle sıralanabilir:

- İlaç taşıyıcı sistemin etki göstereceği bölgede kalış süresinin artması,
- Seçili bir bölgeye lokal hedeflenmenin sağlanabilmesi,
- Mukozal epitelle etkileşimin artırılmasıdır.

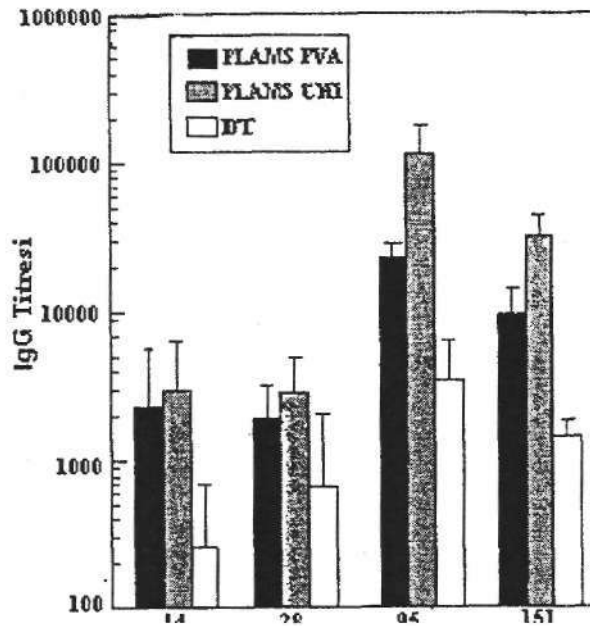
Protein yapısındaki etken maddelerin absorpsiyonlarını arttırmak üzere son yıllarda üzerinde en çok çalışma yapılan biyoadezif polimerler kitosanlar, metakrilik asitler, nişasta, jelatin, hyalüronik asit ve selüloz türevleri olarak sıralanabilir.

Biyoadezif polimer olarak aşı formülasyonlarında sıkça çalışılan bir polimer kitosandır. Kitosan biyolojik olarak geçimli ve parçalanabilir bir katyonik polisakkarittir. Pozitif yüklü oluşu hücre yüzeyi ve mukus gibi negatif yüklü materyallere çok güçlü bağlanabilme özelliğini getirir. Aynı zamanda kitosanın paraselüler absorpsiyonu arttırdığı hayvan deneyleri ve hücre kültürü çalışmalarıyla kanıtlanmıştır (40). Klerens süresini uzatma ve paraselüler transportu arttırma özelliğiyle kitosan nazal olarak uygulandığında bağışık yanıtı arttıran ve mukozal aşılama için son derece uygun polimerik bir materyaldir. Son yıllarda mukozal aşılama konusunda kitosan kullanılarak hazırlanmış mikropartiküler sistemler üzerinde durulmaktadır (25,41,42).

Yapılan bir çalışmada difteri toksoidi (DT) ile iki farklı mikroküre formülasyonu hazırlanmış ve adjuvan nitelikleri bakımından karşılaştırılmışlardır. İlk formülasyon PLA polimeri ve PVA stabilizeriyle hazırlanmış mikrokürelerdir (PLAMS PVA). İkinci

formülasyonda ise pozitif yüklü mikrokürelerin, klasik PLA mikrokürelerinden daha fazla bağışık yanıt oluşturacağı fikrinden dolayı, kitosanla hazırlanmış PLA mikroküreler kullanılmıştır (PLAMS CHI) (43). PLAMS PVA, PLAMS CHI ve sadece DT içeren çözelti deney hayvanlarına intranasal olarak uygulanmış, biyoadeziv polimer olan kitosanla hazırlanmış PLAMS CHI'nin bağışık yanıtı daha fazla arttırdığı bulunmuştur (Grafik 1). İntranazal bağışıklamadan sonra elde edilen antikor titrelerinden iki sonuca varmak mümkündür:

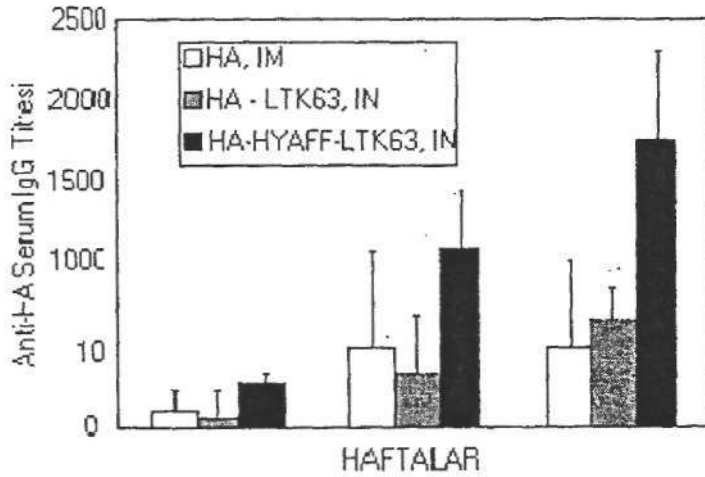
- Çözünür haldeki bir antijeni enkapsüle haldeki bir immünojene çevirmek adjuvan niteliğinin artışına sebep olmaktadır.
- Mukozal yüzeyle temasın kitosan gibi pozitif yüklü polimerik materyallerle artırılması ile antijen alımı artmakta böylelikle bağışık yanıt fazlasıyla indüklenebilmektedir.



Grafik 1 : İntranazal bağışıklamadan sonra Anti-DT spesifik IgG Titreleri (Toksoid 1. ve 49. günlerde 10 LF uygulanmıştır) (43).

Singh ve arkadaşları (39) nazal bir influenza aşısı formülasyonu üzerinde çalışmışlar, antijeni biyoadeziv taşıyıcı bir sistemle spesifik antijen alım bölgelerine hedeflemiştir. Çalışmada biyoadeziv sistemin etkinliği mukozal bir adjuvanın varlığında incelenmiştir. LTK63 E. Coli'den genetik olarak detoksifiye edilmiş bir enterotoksindir. Biyoadeziv polimer olarak hyalüronik asit seçilmiştir. Hyalüronik asidin karboksil gruplarının alkollerle esterleştirilmesiyle elde edilen biyodegradabl polimere HYAFF adı verilmiştir. Bu polimerlerle elde edilen

mikroküreler çok kuvvetli biyoadeziv özelliklere sahiptir. Deneysel hayvanlarına hemaglutinin (HA) IM olarak tek başına, nazal olarak HA+LTK63 ve HA+LTK63+HYAFF şeklinde uygulanmıştır. Biyoadeziv mikrokürelerin kullanımıyla birlikte serum ve nazal sıvılarda ölçülen antikor titrelerinde anlamlı bir artış olmuştur. En önemlisi nazal yolla elde edilen bağışık yanıt IM yolla elde edilenden çok daha yüksek bulunmuştur (Grafik 2). Bu da mukozal aşıların zaman içinde parenteral aşıların yerini alabileceğine dair umut verici bir göstergedir.



Grafik 2: İM olarak HA, İN olarak HA ve LTK63 ve İN olarak HA, LTK63 ve HYAFF ile bağışıklanan deneysel hayvanlarının nazal salgılarındaki Anti-HA Ig A titreleri (1).

Nazal Aşı Formülasyonlarında Adjuvan Olarak Kullanılan Moleküller

Mukozal bağışıklama için en potent adjuvanlar *Vibrio cholerae*'den elde edilen kolera toksini ve *Escherichia coli*'den elde edilen ısıya dayanıklı enterotoksin ve bunların altbırımleridir. Fakat bu maddeler insanlar için son derece toksiktirler ve kullanımları güvenlik açısından uygun bulunmamıştır. Aynı şekilde rekombinant attenüe virüsler veya bakterilerle de hayvan deneyleriyle çok uygun bağışık yanıtlar alınmış fakat bunlar da toksik özellikler göstermeleri nedeniyle insanlarda kullanılmadan önce güvenlik sorunlarının çözülmesi gerekmektedir. Bu sebeple bu maddelerin genetik olarak detoksifiye edilerek kullanımları sağlanmaya çalışılmaktadır (3,18,30,31).

Başka bir bakteriel kaynaklı ürün olan ve *Salmonella minnesota R595*'den elde edilen MPL (monofosforil Lipid A), hepatit yüzey antijeni, tetanoz toksoidi ve influenza antijenleri ile nazal olarak uygulanmış, nazal mukozada ve diğer uzak mukozal bölgelerde de lokal bağışıklığın arttığı gözlenmiştir (44,45)

Mukozal bağışıklamayla yeterli derecede immün yanıtın alınabilmesi için insanlarda kullanımı uygun olabilecek adjuvan sistemler üzerinde çok yoğun çalışmalar sürmektedir. Bakteriyel kaynaklı olmayan ve adjuvan nitelik gösterebilecek maddeler üzerinde çalışmalar sürmektedir.

Penetrasyon arttırıcılar genel olarak mukozal yüzeyleri modifiye ederek normalde absorpsiyonu zayıf olan moleküllerin geçişini arttıran maddelerdir. Diğer taraftan bu absorpsiyon artışından penetrasyon arttırıcıların epitel hücreler, mukus ve silyalar üzerindeki zararlı etkileri sorumludur. Pek çok penetrasyon arttırıcı yüzey aktif özelliğe sahiptir ve bu özellikleri onlardan beklenen etkilerinin yanısıra membran veya intraselüler organellere geri dönüşümsüz zararlar vermelerine neden olabilir. Mukozal bağışıklamanın amaçları dahilinde bu penetrasyon arttırıcıların mukozaya uygulanmaları çok sık olmaz ve de kronik bir nazal uygulama gerektiren durumlarla karşılaştırıldığında başarılı bir bağışıklığın sağlanabilmesi bu olumsuzlukların gözardı edilebilmesine neden olur. Alpar ve arkadaşları (43) dimetil P siklodekstrin, deoksikolik asit, poly-ornitin ve vitamin E derivesinin (D-alfa tokoferil polietilen glikol 1000 süksinat) nazal bağışıklamada adjuvan etkileri üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada tetanos toksoidi ve difteri toksoidi penetrasyon arttırıcıların toksik olmayan çeşitli dozlarıyla çözelti şeklinde formüle edilmiş ve nazal olarak deney hayvanlarına uygulanmıştır. Bu amaçla dimetil p siklodekstrin % 2.5-5 w/v, deoksikolik asit % 0.5-1 w/v, poly-ornitin % 0.5-1 w/v ve vitamin E % 0.5-20 oranlarında kullanılmışlardır. Bu penetrasyon arttırıcıların kullanımıyla bağışık yanıtın arttığı bulunmuştur.

Klinguer ve arkadaşları (46) ise lipofilik bir kuarterner amonyum tuzu olan dimetildioktadesilamonyum bromid (DDA) nın mukozal adjuvan olarak kullanılmasını incelemişlerdir. DDA insan deneyleriyle parenteral olarak non toksik özelliği kanıtlanmış bir yüzey aktif maddedir. Çalışmada model antijenik madde olarak tetanoz toksoidi, difteri toksoidi ve BBG2Na seçilmiştir. BBG2Na RSV (Respirotary Syncytial Virüs) nin G proteininin rekombinant bir fragmanıdır. Çalışmada adjuvan etkinliği olduğu düşünülen DDA, adjuvan niteliği son derece güçlü fakat insanlarda kullanımı olmayan kolera toksini (CTB) ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Sonuç olarak DDA ile elde edilen antikor titreleri CTB ile elde edilen antikor titrelerine son derece yakın bulunmuştur .

SONUÇ

Geleneksel sistemik bağışıklama başta lokal bağışık yanıtları uyaramama ve hasta uyuncunun yetersizliği olmak üzere pek çok problemi taşımaktadır. Geleceğin aşı üretim stratejisi; ucuz, kolaylıkla dağıtılabılır ve uygulanabilir aşı sistemlerini oluşturabilmektir. Bu da hastanın kendisi tarafından uygulanabilen mukozal aşilar sayesinde gerçekteşebilir. Mukozal bir aşinin etkinliği; antijen taşıyıcı aşı sisteminin antijeni MALT gibi spesifik dokulara yeteri kadar sunabilmesine bağlıdır.

Bu da koruyucu bağışıklığın uyarılmasından sorumlu antijenlerin uygun taşıyıcı sistemlerle ve etkili adjuvanların varlığında formüle edilmesiyle gerçekteşebilir. Biyoadezif nitelikli ve güçlü adjuvan özelliği taşıyan aşı sistemlerinin hazırlanmasıyla nazal yoldan uygulanabilir ve parenteral yola eşdeğer olabilecek mukozal aşilara ulaşmak mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

1. **Vajdy, M. and O'Hagan, D.T.** "Microparticles for intranasal immunization" *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 51, 127-141 (2001).
2. **Davis, S.S.** "Nasal Vaccines" *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 51, 21-42 (2001).
3. **Almeida, A.J. and Alpar, H.O.** "Nasal Delivery of Vaccines" *J. Drug Target.*, 3, 455-467 (1996).
4. **Van der Lubben, I.M., Verhoef, J.C, Borchard, G. and Junginger, H.E.** "Chitosan for mucosal vaccination" *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 52, 139-144 (2001).
5. **Mestecky, J., Moldoveanu, Z., Michalek, S.M., Morrow, C.D., Compans, R.W., Schafer, D.P. and Russell, M.W.** "Current options for vaccine delivery systems by mucosal routes" *V. Control. Rel.*, 48, 243-257 (1997).
6. **Illum, L.** " Drug Delivery systems for nasal application" *STP Pharma*, 3, 594-598 (1987).
7. **Behl, C.R., Pimplaskar, H.K., Sileno, A.P., Xia, W.J., Gries, J.C. and Romeo, V.D.** "Optimization of systemic nasal drug delivery with pharmaceutical excipients" *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 5, 117-133 (1998).

8. **O'Hagan, D.T.** "Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines" *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 34, 305-320 (1998).
9. **Gallichan, W.S., Johnson, D.C., Graham, F.L. and Rosenthal, K.L.** " Mucosal immunity and protection after intranasal immunization with recombinant adenovirus expressing herpes simplex virus glycoprotein B" *J. Infect. Dis.*, **168**,622-629 (1993).
10. **Gallichan, W.S. and Rosenthal, K.L.** " Specific secretory immune responses in the female genital tract following intranasal immunization with recombinant adenovirus expressing glycoprotein B of herpes simplex virüs" *Vaccine*, 13,1589-1595 (1995).
11. **Ulum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A.N. and Davis, S.S.** "Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines" *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 51, 81-96 (2001).
12. **Weiner, H.L., Lemere, C.A., Maron, R., Spooner, E.T., Grenfell, T.J., Mori, C., Issazadeh, S., Hancock, W.W. and Selkoe, D.J.,** "Nasal administration of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease" *Awz. Neurol*, **48**,567-579 (2000).
13. **Glück, U., Gebbers, J. and Glück, R.** "Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without *Escherichia coli* heat-labile toxin in adult volunteers" *J. Virol.*, **73**, 2918-2926 (1999).
14. **Holmgren, J., Czerkinsky, C., Lycke, N. and Svennerholm, A.M.** "Mucosal immunity: Implications for vaccine development" *Immunobiology*, **184**, 157-179 (1992).
15. **McGhee, J.R., Mestecy, J., Dertzbaugh, M.T., Eldridge, J.H., Hirasawa, M. and Kiyono, H.** "The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development" *Vaccine*, 10, 75-88 (1992).
16. **Spit, B.J., Hendriksen, E.G.J., Bruijntjes, J.P. and Kuper, C.F.** "Nasal lymphoid tissue in the rat" *Cell and Tissue Res.*, 255, 193-198 (1989).
17. **Kuper, C.F., Koornstra, P.J., Hameleers, D.H.M., Biewenga, J., Spit, B.J., Duijvestin, A.M., Van Breda Vriesman, P.J.C. and Sminia, T.** "The role of nasopharyngeal lymphoid tissue" *Imm. Today*, 13, 219-224 (1992).
18. **Akgün, Y.,** "Aşı stabilitesi ve adjuvanlar" *Mikrobiyoloji-Enfeksiyon*, 1, 31-34 (2002).

19. **Ilium, L.**, "Nasal drug delivery-possibilities, problems and solutions" *J. Control. Rel.*, 1, In Press (2002).
20. **Westrinsk, M.A.J., Louise Smithson, S., Srivastava, N., Blonder, J., Coeshott, C. and Rosenthal, G.J.** "Projuvant™ (Pluronic F 127®/chitosan) enhances the immune response to intranasally administered tetanus toxoid" *Vaccine*, 20, 711-723 (2002).
21. **Childers, K.N., Tong, G., Mitchell, S., Kirk, K., Russel, M.W. and Michalek, S.M.** "A controlled clinical study of the effect of nasal immunization with a *Streptococcus mutans* antigen alone or incorporated into liposomes on induction of immune responses" *Infect. Immun.*, 67, 618- 623 (1999).
22. **Baca-Estrada, M.E., Foldvari, M., Snider, M., Harding, K., Kournikakis, B., Babiuk, L.A. and Griebel, P.** "Intranasal immunization with liposome-formulated *Yersinia pestis* vaccine enhances mucosal immune responses" *Vaccine*, 18, 2203-2211 (2000).
23. **Almedia, A.J., Alpar, H.O. and Brown, M.R.W.** "Immune response to nasal delivery of antigenically intact Tetanus Toxoid associated with poly(L-lactic acid) microspheres in rats, rabbits and guinea-pigs" *J.Pharm. Pharmacol.* ,45, 198-203 (1993).
24. **Eyles, J.E., Sharp, G.J.E., Williamson, E.D., Spiers, I.D. and Alpar, H.O.** "Intranasal administration of poly-lactic acid microsphere co-encapsulated *Yersinia pestis* subunits confers protection from pneumonic plague in the mouse" *Vaccine*, 16, 698-707 (1998).
25. **Vila, A., Sanchez, A., Tobio, M., Calvo, P. and Alonso, M.J.** "Design of biodegradable particles for protein delivery" *J. Control. Rel.*, 78, 15-24 (2002).
26. **Barchfield, G.L., Hessler, A.L., Chen, M., Pizza, M., Rappuoli, R. and Van Nest, G.A.** "The adjuvants MF59 and LTK-63 enhance the mucosal and systemic immunogenicity of subunit influenza vaccine administered intranasally in mice" *Vaccine*, 17, 695-704 (1999).
27. **Hsu, S.C., Schadeck, E.B., Delmas, A., Shaw, M. and Steward, M.W.** "Linkage of a fusion peptide to a CTL epitope from the nucleoprotein of measles virus enables incorporation into ISCOMS and induction of CTL responses following intranasal immunisation" *Vaccine*, 14, 1159- 1166 (1996).
28. **Boyaka, P.N., Marinaro, M., Jackson, R.J., Menon, S., Kiyona, H., Jirillo, E. and McGhee, J.R.** "IL-12 is an effective adjuvant for induction of mucosal immunity" *J. Immunol.* 162, 114-121 (1999).

29. **Berstad, A.K.H., Andersen, S.R., Dalseg, R., Dromtorp, S., Hoist, J., Namork, E., Wedege, E. and Haneberg, B.** "Inactivated meningococci and pertussis bacteria are immunogenic and act as mucosal adjuvants for a nasal inactivated influenza virus vaccine" *Vaccine*, **18**,1910-1919 (2000).
30. **Isaka, M., Yasuda, Y., Mizokami, M., Kozuka,S., Taniguchi, T., Matano, K., Maeyama, J., Mizuna, K., Morokuma, K., Ohkuma, K., Goto, N. and Tochikuba, K.** "Mucosal immunization against hepatitis B virus by intranasal co-administration of recombinant hepatitis B surface antigen and recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant" *Vaccine*, **19**, 1460-1466 (2001).
31. **Hagiwara,Y., Komasa, K., Chen, Z., Matsuo, K., Suzuki, Y., Aizawa, C, Kurata, T. and Tamura, S.** "Mutants of cholera toxin as an effective and safe adjuvant for nasal influenza vaccine" *Vaccine*, **17**, 2978-2926 (1999).
32. **Niedrig, M., Stolte, N., Fuchs, D., Hunsmann, G. and Stahl-Hennig, C.** "Intra-nasal infection of macaques with Yellow Fever (YF) vaccine strain 17D: A novel economical approach for YF vaccination in man" *Vaccine*, **17**,1206-1210 (1999).
33. **Dalseg, R., Wedege, E., Hoist, J., Haugen, I.L., Hoiby, E.A. and Haneberg, B.** " Outer membrane vesicles from group B meningococci are strongly immunogenic when given intranasally to mice" *Vaccine*, **17**, 2336-2345 (1999).
34. **Sagodira, S., Iochmann, S., Mevdec, M.N., Dimier-Poisson, I. and Bout, D.** "Nasal immunization of mice with *Cryptosporidium parvum* DNA induces systemic and intestinal immune responses" *Parasite. Immunol.*, **21**, 507-516 (1999).
35. **Schroder, U. and Svenson, S.B.** "Nasal and parenteral immunizations with diphteria toxoid using monoglyceride/fatty acid lipid suspensions as adjuvants" *Vaccine*, **17**, 2096-2103 (1999).
36. **Gutierrez, I., Hernandez, R.M., Igartua, M., Gascon, A.R. and Pedraz, J.L.** "Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA loaded nanospheres" *Vaccine*, **21**,67-77 (2002).
37. **Hilbert, A.K., Fritzsche, U. and Kissel, T.** "Biodegradable microspheres containing influenza A vaccine: immune response in mice" *Vaccine*, **17**, 1065-1073 (1999).

38. **Eroglu, H.** and **Kas, H.S.** "Nazal Yolla Ilac Uygulanmasi" *FABAD J. Pharm. ScL*, **25**, 43-51 (2000).
39. **Singh, M., Briones, M.** and **O'Hagan, D.T.** "A novel bioadhesive intranasal delivery system for inactivated influenza vaccines" *J. Control. Rel*, **70**, 267-276 (2001).
40. **Dodane, V., Khan, M.A.** and **Merwin, J.R.** "Effect of Chitosan on epithelial permeability and structure" *Int J. Pharm.*, **182**, 21-32 (1999).
41. Xu, Y. and Du, Y. "Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles" *Int. J. Pharm.*, **250**, 215-226 (2003).
42. **Alpar, H.O., Ward, K.R.** and **Williamson, E.D.** "New strategies in vaccine delivery" *S.T.P. Pharm. Sci.*, **10**, 269-278 (2000).
43. **Alpar, H.O., Eyles, J.E., Williamson, E.D.** and **Somavarapu, S.** "Intranasal vaccination against plague, tetanus, and diphtheria" *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **51**, 173-201 (2001).
44. **Baldrige, J.R., Yorgensen, Y., Ward, J.R.** and **Ulrich, J.T.** "Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration" *Vaccine*, **18**, 2416-2425 (2000).
45. **Childers, N.K., Miller, K.L., Tong, G., Llarena, J.C., Greenway, T., Ulrich, J.T.** and **Michaelak, M.** "Adjuvant activity of monophosphoryl lipid A for nasal and oral immunization with soluble or liposome-associated antigen" *Infect. Immun.*, **68**, 5509-5516 (2000).
46. **Klinguer, C, Beck, A. De-Lys, P., Bussat, M.C., Blaecke, A., Derouet, F., Bonnefoy, J.Y., Nguyen, T.N., Corvala, N. and Velin, D.** "Lipophilic quaternary ammonium salt acts as a mucosal adjuvant when co-administered by the nasal route with vaccine antigens" *Vaccine*, **19**, 4236-4244 (2001).

Received: 09.04.2003

Accepted: 10.07.2003