

## Mide Kanserine Yönelik AGS Hücrelerinden Geliştirilen Aşı Formülasyonunun İmmünoestimulan Etkilerinin Değerlendirilmesi

Murat IHLAMUR<sup>1\*</sup>, Yağmur HAMURCI<sup>2</sup>, Kübra KELLECI<sup>3</sup>

### Öz

Kanser, normal hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucunda oluşan bir hastalıktır. Kanser çeşitleri arasında akciğer, meme, kolorektum ve prostat kanserlerinden sonra dünya çapında teşhis edilen en yaygın beşinci malignite olan mide kanseri, %20'lik beş yıllık sağ kalım oranı ile en ölümcül kanser çeşitlerinden biridir. Tedavisinde cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve hedefe yönelik ilaç terapisi gibi yöntemler sıklıkla kullanılsa da hiçbiri etkili sonuçlar vermemektedir. Bu nedenle tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. İmmünoterapi, akciğer, mide ve meme kanseri gibi kanserler için yenilikçi bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Hastalığa yakalanmadan önce bireylerde bağışıklık oluşturmak, hastalığın başlamasını engellemekle birlikte tedaviden maksimum yanıtın alınmasını da sağlayacaktır. Aşılamanın kansere karşı bağışıklık sistemini harekete geçirdiğine dair literatürde yer alan çalışmalar, kanser aşılarında umut verici sonuçlar ortaya koymaktadır. Bu çalışmada, mide kanserine yönelik geliştirilen farklı aşı formülasyonlarının immünoestimulan etkileri, *in vitro* J774 murin makrofaj, THP-1 insan makrofaj ve L929 fibroblast hücrelerinde araştırılmış ve sitotoksiteleri tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, geliştirilen aşı formülasyonlarının hiçbir konsantrasyonda toksik etki yaratmadığı, artan protein konsantrasyonu ile birlikte immünoestimulan etkinliğin arttığı ve en yüksek değer 40 µg/ml konsantrasyonda elde edildiği tespit edilmiştir. Her üç hücre hattında maksimum protein konsantrasyonunda hücre canlılık oranlarının %80 'den fazla olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların mide kanserine yönelik aşı formülasyonlarının geliştirilmesine yardımcı olacağını, kanser immünoterapisi çalışan araştırmacılar için veri sağlayacağını söyleyebiliriz.

**Anahtar Kelimeler:** Mide kanseri, Aşı, Otoklavlama yöntemi, Hidroksiapatit, Kalsiyum Fosfat

## Evaluation of The Immunostimulant Effects of The Vaccine Formulation Developed from AGS Cells for Gastric Cancer

### Abstract

Cancer is a disease that results from the uncontrolled proliferation of normal cells. Gastric cancer, which is the fifth most common malignancy diagnosed worldwide after lung, breast, colorectal and prostate cancers among cancer types, is one of the deadliest cancer types with a five-year survival rate of 20%. Although methods such as surgery, chemotherapy, radiotherapy, immunotherapy and targeted drug therapy are frequently used in its treatment, none of them gives effective results. Therefore, there is a need to develop treatment approaches. Immunotherapy is recognized as an innovative approach for cancers such as lung, stomach and breast cancer. Creating immunity in individuals before getting the disease will prevent the onset of the disease, as well as ensure maximum response from the treatment. Studies in the literature showing that vaccination activates the immune system against cancer reveal promising results in cancer vaccines. In this study, the immunostimulatory effects of different vaccine formulations developed for gastric cancer were investigated *in vitro* in J774 murine macrophage, THP-1 human macrophage and L929 fibroblast cells and their cytotoxicity was determined. According to the results of the study, it was determined that the vaccine formulations developed did not cause toxic effects at any concentration, the immunostimulatory activity increased with increasing protein concentration, and the highest value was obtained at 40 µg/ml concentration. It was determined that cell viability rates were more than 80% at maximum protein concentration in all three cell lines. We can say that the obtained results will help the development of vaccine formulations for gastric cancer and provide data for researchers working on cancer immunotherapy.

**Keywords:** Gastric cancer, Vaccine, Autoclaving method, Hydroxyapatite, Calcium Phosphate

<sup>1</sup>Biruni Üniversitesi, Elektronik ve Otomasyon Bölümü, Meslek Yüksekokulu, İstanbul, Türkiye, [ihlamurmurat@gmail.com](mailto:ihlamurmurat@gmail.com)

<sup>2</sup>Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyoteknoloji Bölümü, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, [yagmurhamurcul@gmail.com](mailto:yagmurhamurcul@gmail.com)

<sup>3</sup>Beykoz Üniversitesi, Tıbbi Hizmetler ve Teknikleri Bölümü, Meslek Yüksekokulu, İstanbul, Türkiye, [kubrakelleci@beykoz.edu.tr](mailto:kubrakelleci@beykoz.edu.tr)

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0002-0458-5638>

<sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0002-2363-3965>

<sup>3</sup><https://orcid.org/0000-0002-9409-2254>

## 1. Giriş

Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüme gösterdiği, vücudun hemen hemen her organında veya dokusunda başlayabilme yeteneği olan ve/veya diğer organlara yayılma özelliği gösteren önemli halk sağlığı problemlerinden biridir (Hausman, 2019).

Mide kanseri, kanser çeşitleri arasında akciğer, meme, kolorektum ve prostat kanserlerinden sonra dünya çapında teşhis edilen en yaygın görülen beşinci malignite olduğu bilinmektedir. 2020 Uluslararası Kanser Ajansı verilerine göre 1 milyon yeni mide kanseri vakası ve 768.793 mide kanserine dayalı ölüm tespit edilmiştir. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de mide kanseri görülme sıklığı artmaktadır. Mide kanseri vakalarındaki artışa rağmen erken tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi mide kanserine bağlı ölümleri ciddi oranda azaltmaktadır (Sung ve ark., 2021).

Mevcut tedavi yöntemleri arasında cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve hedefe yönelik ilaç terapi yaklaşımları (Urruticoechea ve ark., 2010) yer almakla birlikte hiçbiri etkili sonuç vermemektedir. Bu nedenle mevcut tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi, yenilikçi ve etkili terapi yöntemlerinin araştırılmasına ihtiyaç vardır. Alternatif bir tedavi yöntemi olarak kanser immünoterapisi, son yıllarda önemli ölçüde gelişmiştir. Diğer terapötik kavramların aksine, immünoterapi, öncelikle hastalığın metastatik yayılmasını önlemeyi ve etkilenen bireylerin yaşam kalitesini iyileştirmeyi amaçlamaktadır. Bununla birlikte hastalık başlamadan önce bağışıklık oluşturarak hastalığın başlamasını engellemekte veya daha hızlı bir şekilde tedavilerden yanıt alınmasını sağlamaktadır. İmmünoterapide uygulanan yaklaşımlar arasında yer alan aşılama bu nedenle önemlidir (Butterfield, 2015). Antijen kaynağı olarak proteinlerin yanı sıra hücrelerin de kullanımı söz konusudur. Hücrelerden antijen elde etmede genellikle otoklavlama, dondurma-çözdürme ve sonikasyon gibi yöntemler kullanılmaktadır (Jacquet ve ark., 2006). Etkili ve güvenilir bir aşı formülasyonu geliştirmede adjuvan seçiminin önemli olduğu bilinmektedir. Hazırlanan antijen etkinliklerinin adjuvanlar ile artırılabilirdiği ve bu sayede antijene karşı daha yüksek bir immün yanıt elde edildiği bilinmektedir (Shi ve ark., 2019).

Hazırlanan aşı formülasyonlarının klinik araştırma fazlarına geçmeden önce *in vitro* koşullar altında immünotimülan etkileri ve sitotoksosite analizlerinin araştırılması gerekmektedir. Bu amaçla genellikle makrofaj ve fibroblast hücre kültür sistemleri kullanılarak, hücrelerin nitrik oksit (NO) üretim miktarı incelenmektedir (Isobe ve Nakashima, 1993).

Bu çalışma kapsamında ilk kez, AGS insan mide kanseri hücre hattından otoklavlama yöntemi ile elde edilen antijenlerin tek başına ve farklı adjuvanlar (Hidroksiapatit (HA) ve Kalsiyum fosfat (CaP)) ile kombinasyonu ile elde edilen aşı formülasyonlarının J774 murin, THP-1 insan makrofaj ve L929 fare fibroblast hücre hatlarında *in vitro* koşullar altında immünotimülan aktivitesi ve sitotoksitesitesi incelenmiştir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Hücre Kültürü

Yapılan çalışmada laboratuvarımız kriyobankında bulunan L929 (fare fibroblast), J774 (fare makrofaj) ve THP-1 (insan makrofaj) hücre hatları kullanıldı. Hücre kültürü 75cm<sup>2</sup>'lik (Polistiren yüzey, NEST) flasklarda yapıldı. Stok medyumlar %1'lik penisilin-streptomisin ve L-glutamin eklenerek hazırlandı. Hücre çoğalması için L929 fibroblast kültürü %10 FBS içeren DMEM besiyerinde, J774 fare makrofaj kültürü ve THP-1 insan makrofaj kültürü %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyerinde gerçekleştirildi (Ihlamur ve ark., 2022). Çalışmada kullanılan hücrelerin pasaj sayıları 10. ile 15. arasındadır.

Hücre kültürü 37°C, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> inkübasyon şartlarında gerçekleştirildi. L929 hücre hattı enzimatik yol ile J774 ve THP-1 hücre hattı ise fiziksel yol ile toplanarak thoma lamında hücre sayımları gerçekleştirildi. 96 kuyulu plâtelere kuyu başına 1x10<sup>5</sup> hücre/mL olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi ve 24 saat boyunca inkübasyonu sağlandı (Ihlamur ve ark., 2022).

### 2.2. Antijen Hazırlama

AGS mide kanseri hücre hattının kültürü %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyerinde 37°C etüvde gerçekleştirildi. Stok medyumlar %1'lik penisilin- streptomisin ve L-glutamin eklenerek hazırlandı. Çoğaltılan AGS kültürü toplandı ve 1 ml PBS ile yıkanarak -20°C'ye daha sonra kullanılmak üzere kaldırıldı.

Otoklavlama yöntemi ile antijen hazırlamak için, 1 ml PBS içindeki AGS kültürü çözdürüldü ve pastör şisesine alındı. Şise otoklav cihazında 121°C, 1 atm basınç altında 20 dakika boyunca otoklavlandı. Otoklavdan çıkarılan hücreler homojenize edildi ve 10.000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernantant alınarak lizattaki protein miktarı, UV spektrometresinde Warburg-Christian yöntemi kullanılarak 280 ve 260 nm dalga boyunda ölçüldü (Kosari ve Ghaffari, 2018).

### 2.3. Nitrik Oksit Üretimi

Otoklavlama yöntemi ile elde edilen antijenler tek başına ve farklı adjuvanlar ile kombine edilerek farklı konsantrasyonlarda hazırlanan aşı formülasyonlarının fibroblast ve makrofaj hücre kültür sistemlerinde immünostimulan etkinliklerinin belirlenmesi için hücrelerin ürettikleri nitrik oksit (NO) miktarı Griess metoduyla belirlendi (Guevara ve ark., 1998). 24 saat %5 CO<sub>2</sub> içeren

37°C'deki etüvde makrofaj ve fibroblast hücre inkübasyonunun ardından altı farklı konsantrasyonda hazırlanan antijen (25 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) ve adjuvan (Hidoksiapatit (HA) ve Kalsiyum fosfat (CaP)) kombinasyonları (40 µg/ml ve 100 µg/ml) eklendi.

48 saat inkübasyonun ardından süpernatantlar toplanarak Griess reaktifi ile reaksiyona sokuldu. Griess reaktifi 100 ml distile suya 2,5 ml fosforik asit, 0,1 g N-(1- Naphthyl) Ethylenediamine ve 1 g Sulfanilamide eklenerek hazırlandı. NO ölçümü yapılacak kültür ortamından 50 µl alınarak yeni bir 96 kuyulu plate eklendi. Örneklerin üzerine 50 µl Griess reaktifi eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakıldı. 540 nm'de ELISA Readerda absorbans değerleri ölçüldü.

#### 2.4. MTT Analizi

Hücre canlılığı analizi için 37°C sıcaklık, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> inkübasyon şartlarında 48 saat inkübe edilen hücrelere MTT uygulandı. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazilyum bromid içeren MTT ile hücre canlılık oranları değerlendirildi. 96 kuyulu plate üzerindeki her bir kuyucuğa 10 µl MTT solüsyonu ilave edildi. 96 kuyulu platelerdeki hücreler karanlık ortamda, 37°C'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası MTT solüsyonu içeren sıvılar aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Her kuyuya 100 µl dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edildikten sonra well plateler 30 dk karanlık ortamda tutuldu. Formazan kristallerinin tamamen çözünmesi ile 570 nm dalga boyunda ölçüm alınarak hücre canlılık analizi gerçekleştirildi (Ihlamur ve ark., 2022). Her deney grubu üç kez tekrarlandı ve ortalaması alındı. Hücre canlılık analizi verileri denklem 1 kullanılarak elde edildi ve veri grafikleri oluşturuldu.

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = \left( \frac{\text{Örnek absorbansı}}{\text{Kontrol absorbansı}} \right) * 100$$

#### 2.5. İstatistiksel Analiz

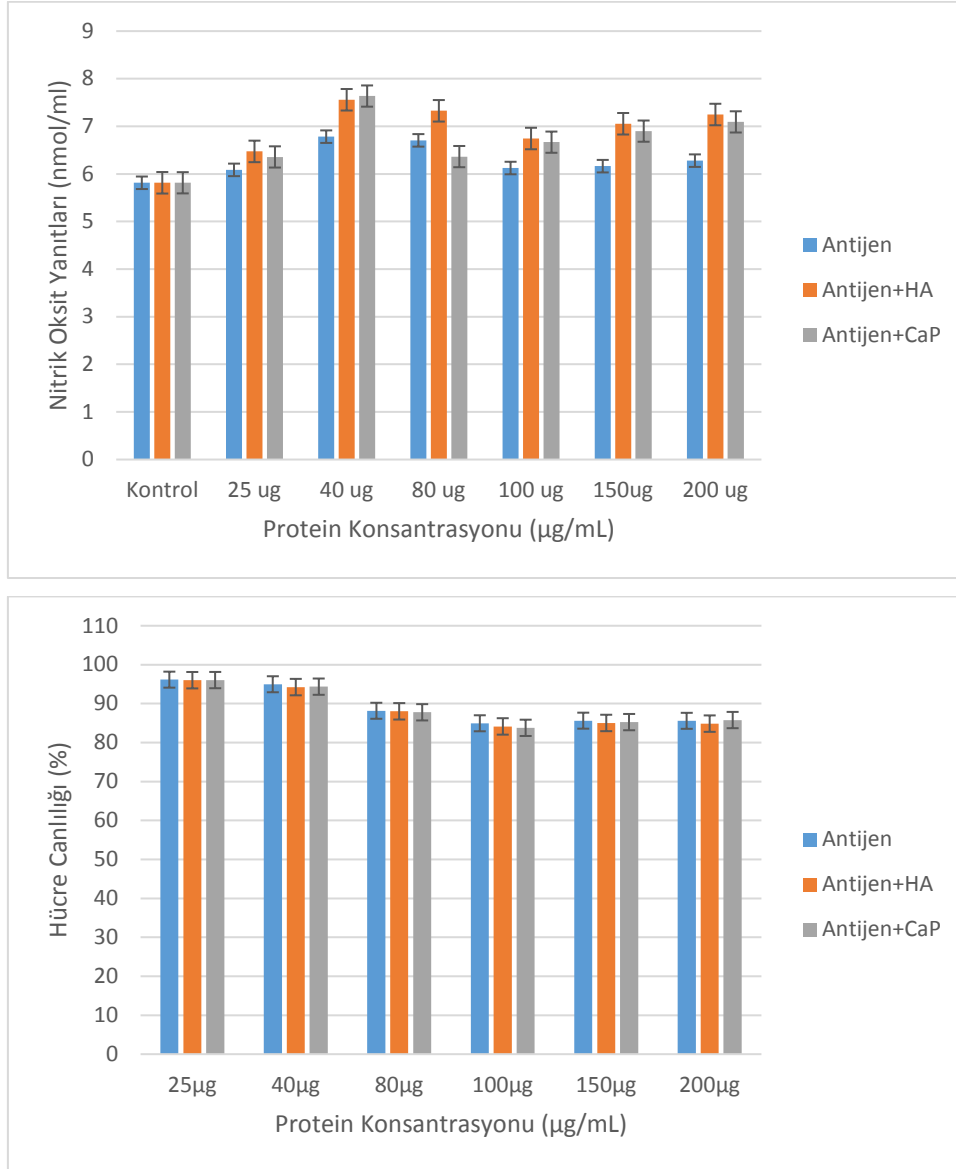
Çalışmadan elde edilen veriler IBM SPSS 25.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, ABD) paket programında analiz edilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi Tek Yönlü ANOVA testi ile yapılmıştır. Sonuçlar ortalama±standart sapma (Ortalama±SD) olarak verildi ve istatistiksel anlamlılık p<0,05 olarak kabul edildi.

### 3. Bulgular ve Tartışma

Yapılan çalışmada AGS hücrelerinden otoklavlama metodu kullanılarak antijen hazırlanmıştır. Hazırlanan antijenlerin tek başına ve adjuvanlarla kombinasyonlarının aşı adayları olarak

kullanılabilirliğinin belirlenmesi için J774 ve THP-1 makrofaj ve L929 fibroblast hücre kültüründe immünostimulan etkinliği ve sitotoksik etkileri incelenmiştir.

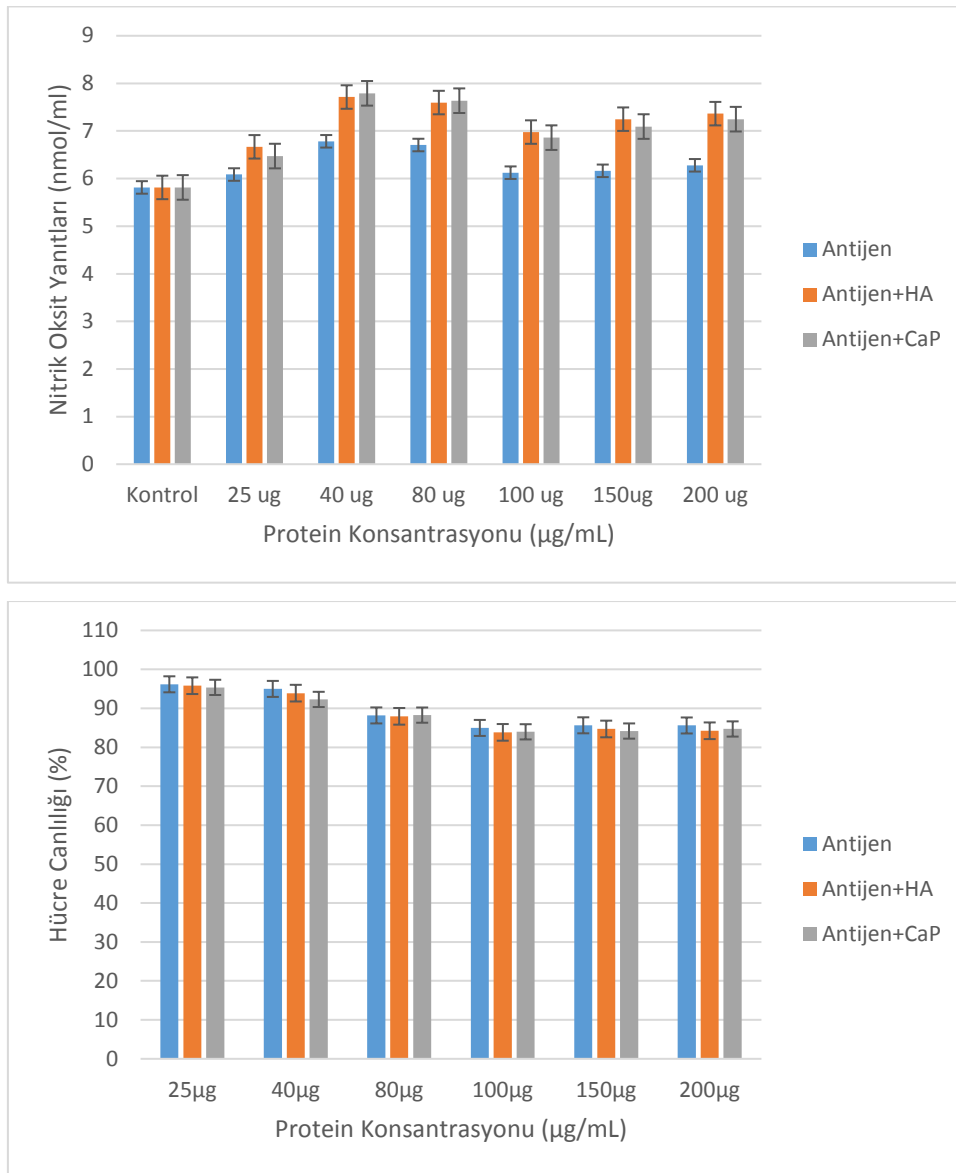
Şekillerde gösterilen hücrelerin canlılık yüzdeleri, pozitif kontrol grubunun değeri %100 olarak kabul edildiğinde, diğer gruplarda basit oran hesabı ile elde edilen % değeridir ve canlı hücre oranını belirtmektedir. MTT testi sonuçlarına göre hücre canlılığı 48. saatin sonundaki bütün gruplar arasında % hücre canlılığı üzerinden değerlendirmeler yapılmıştır.



Şekil 1. Antijen ve adjuvan (40 µg/ml) kombinasyonlarının L929 fibroblast hücreleri üzerindeki immünostimulan etkinliği ve sitotoksisite analizi

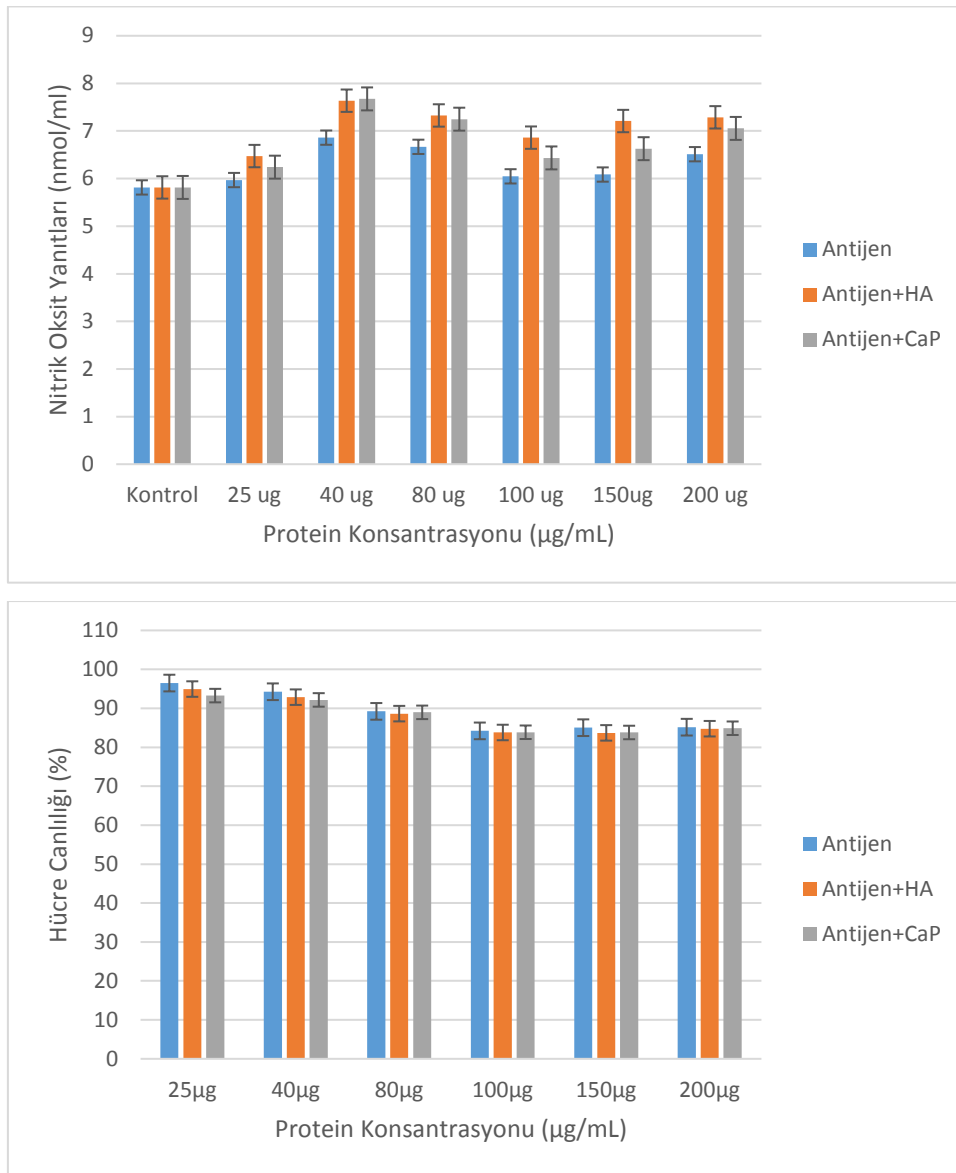
AGS mide kanseri hücre hattından otoklavlama yöntemi ile hazırlanan antijenlerin ve adjuvan kombinasyonlarının (HA ve CaP) L929 fibroblast hücre kültüründe immünostimulan etkinliği ve sitotoksisite analizi Şekil 1’de gösterilmiştir. Yapılan çalışmada AGS hücre hattından elde edilen antijenlerin, en yüksek immünostimulan etkinliği 40 µg/ml konsantrasyonda belirlenmiştir. AGS

antijenlerinin 40 µg/ml konsantrasyonda fibroblastlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünoestimulan etkinlik 6,783 nmol/ml'dir. Sitotoksosite analizinde ise %94,98 canlılık tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada 40 ug/ml HA ve CaP adjuvan kombinasyonlarının fibroblast hücre kültürü sisteminde immünoestimulan etkinliği de incelenmiştir. 40 µg/ml antijen-40 ug/ml HA adjuvanı kombinasyonunun fibroblastlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünoestimulan etkinlik ise 7,558 nmol/ml'dir. Sitotoksosite analizinde ise %94,25 canlılık tespit edilmiştir. 40 µg/ml antijen-40 ug/ml CaP adjuvan kombinasyonunun fibroblastlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünoestimulan etkinlik ise 7,636 nmol/ml'dir. Sitotoksosite analizinde ise %94,36 canlılık tespit edilmiştir.



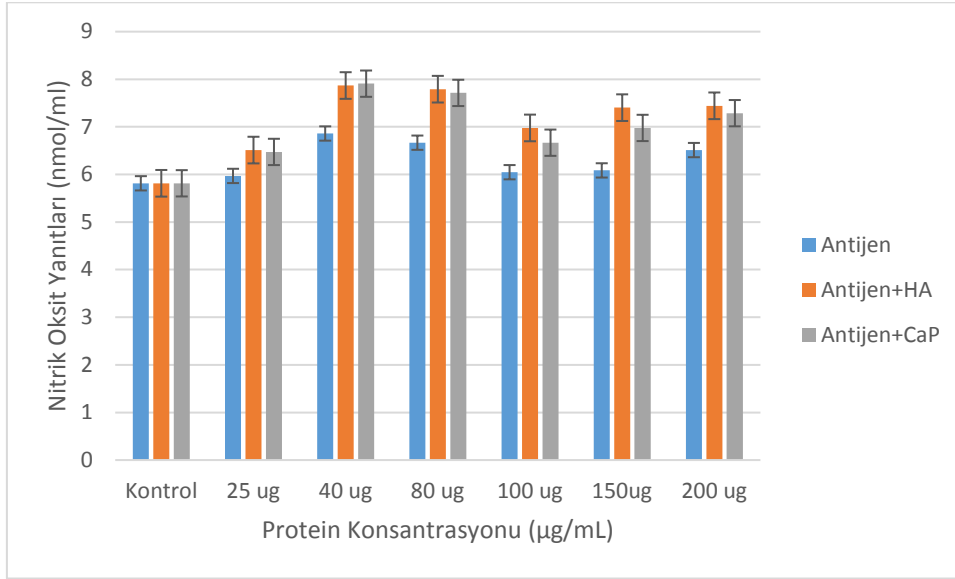
Şekil 2. Antijen ve adjuvan (100 ug/ml) kombinasyonlarının L929 fibroblast hücreleri üzerindeki immünoestimulan etkinliği ve sitotoksosite analizi

AGS mide kanseri hücre hattından otoklavlama yöntemi ile hazırlanan antijenlerin ve adjuvan kombinasyonlarının L929 fibroblast hücre kültürü sisteminde immünostimulan etkinliği ve sitotoksosite analizi Şekil 2’te gösterilmiştir. Yapılan çalışmada 100 ug/ml HA ve CaP adjuvanlarının antijen ile kombinasyonlarının fibroblast hücre kültüründeki immünostimulan etkinliği incelenmiştir. 40 µg/ml antijen-100 ug/ml HA adjuvan kombinasyonunun fibroblastlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünostimulan etkinlik 7,713 nmol/ml’dir. Sitotoksosite analizinde ise %93,89 canlılık tespit edilmiştir. 40 µg/ml antijen-100 ug/ml CaP adjuvan kombinasyonunun fibroblastlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünostimulan etkinlik 7,791 nmol/ml’dir. Sitotoksosite analizinde ise %92,28 canlılık tespit edilmiştir.

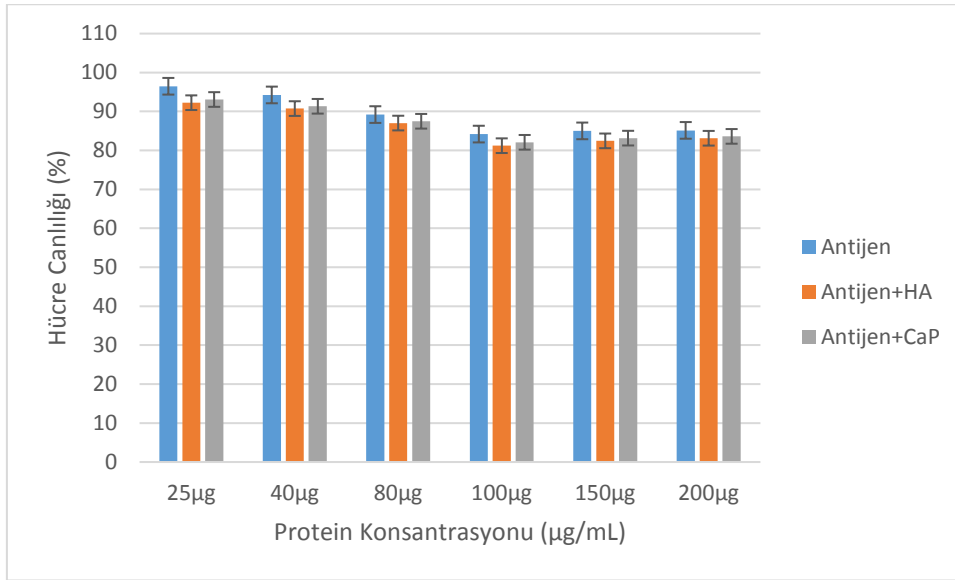


Şekil 3. Antijen ve adjuvan (40 µg/ml) kombinasyonlarının J774 makrofaj hücreleri üzerindeki immünostimulan etkinliği ve sitotoksosite analizi

AGS mide kanseri hücre hattından otoklavlama yöntemi ile hazırlanan antijenlerin ve adjuvan kombinasyonlarının J774 makrofaj hücre kültüründeki immünoestimulan etkinliği ve sitotoksosite analizi Şekil 3'te gösterilmiştir. Yapılan çalışmada AGS hücre hattından elde edilen antijenlerin en yüksek immünoestimulan etkinliği 40 µg/ml konsantrasyonda göstermiştir. AGS hücre hattından elde edilen antijenlerin 40 µg/ml konsantrasyonda makrofajlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünoestimulan etkinlik 6,86 nmol/ml'dir. Sitotoksosite analizinde ise %94,25 canlılık tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada 40 ug/ml HA ve CaP adjuvanlarının antijen ile kombinasyonlarının makrofaj hücre kültürü sisteminde immünoestimulan etkinliği de incelenmiştir. 40 µg/ml antijen-40 ug/ml HA adjuvan kombinasyonunun makrofajlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünoestimulan etkinlik 7,636 nmol/ml'dir. Sitotoksosite analizinde ise %92,86 canlılık tespit edilmiştir. 40 µg/ml antijen-40 ug/ml CaP adjuvan kombinasyonunun makrofajlarla muamelesinden elde edilen en yüksek etkinlik 7,674 nmol/ml'dir. Sitotoksosite analizinde ise %92,15 canlılık tespit edilmiştir.

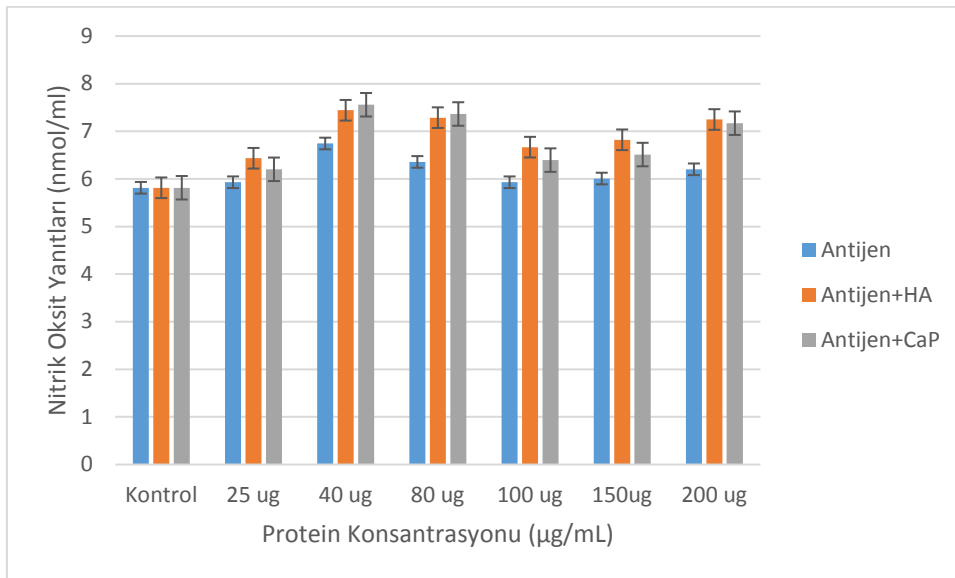


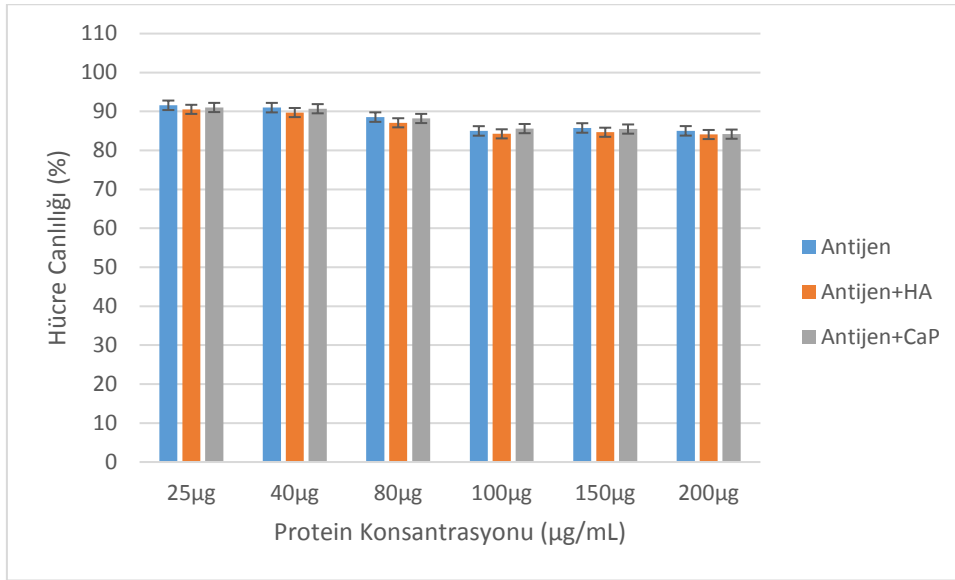




Şekil 4. Antijen ve adjuvan (100 ug/ml) kombinasyonlarının J774 makrofaj hücreleri üzerindeki immünostimulan etkinliği ve sitotoksosite analizi

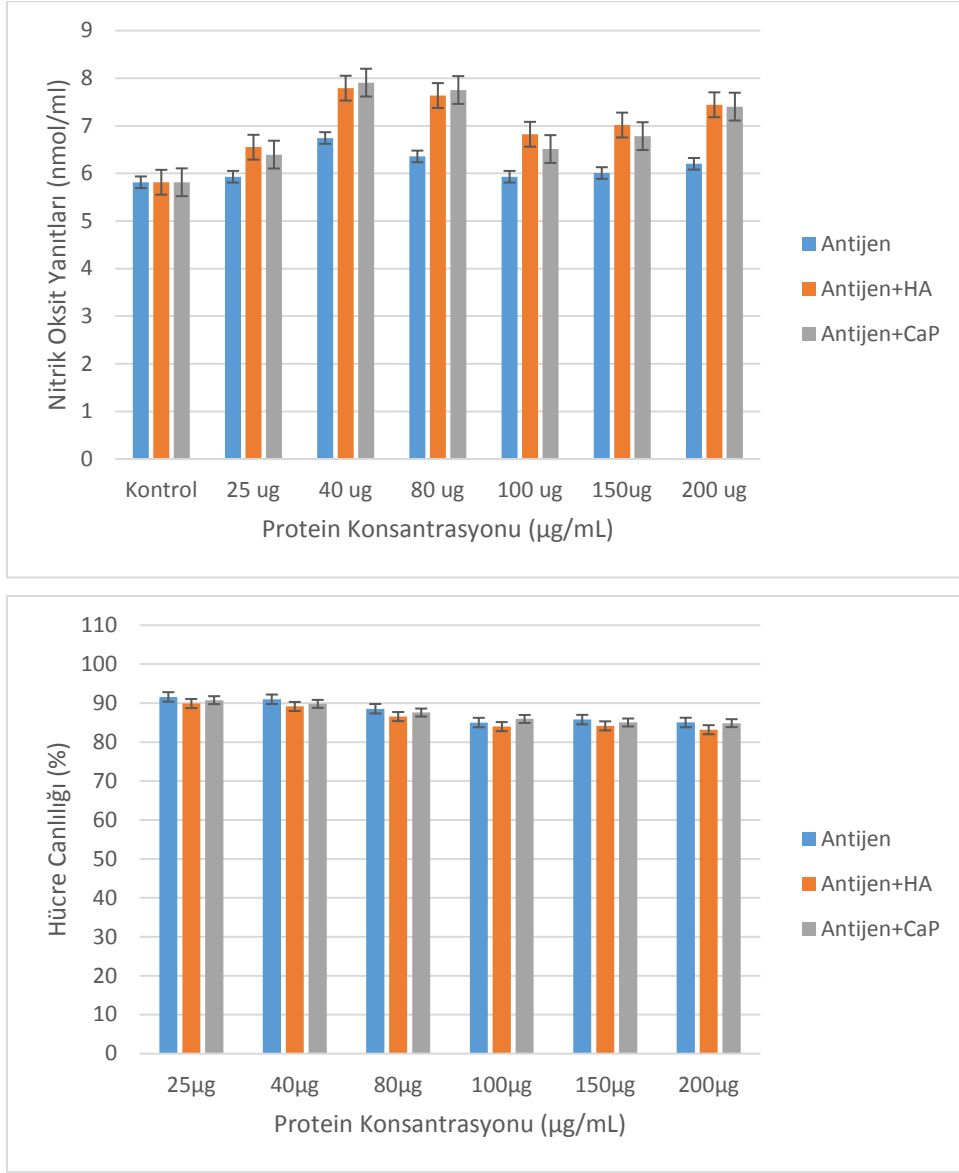
AGS mide kanseri hücre hattından otoklavlama yöntemi ile hazırlanan antijenlerin ve adjuvan kombinasyonlarının J774 makrofaj hücre kültürü sisteminde immünostimulan etkinliği ve sitotoksosite analizi Şekil 4'te gösterilmiştir. Yapılan çalışmada 100 ug/ml HA ve Cap adjuvanlarının antijenler ile kombinasyonlarının makrofaj hücre kültürü sisteminde immünostimulan etkinliği incelenmiştir. 40 µg/ml antijen-100 ug/ml HA adjuvan kombinasyonunun makrofajlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünostimulan etkinlik 7,868 nmol/ml'dir. Sitotoksosite analizinde ise %90,75 canlılık tespit edilmiştir. 40 µg/ml antijen-100 ug/ml CaP adjuvan kombinasyonunun makrofajlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünostimulan etkinlik 6,907 nmol/ml'dir. Sitotoksosite analizinde ise %91,34 canlılık tespit edilmiştir.





**Şekil 5.** Antijen ve adjuvan (40 µg/ml) kombinasyonlarının THP-1 makrofaj hücreleri üzerindeki immünostimulan etkinliği ve sitotoksosite analizi

AGS mide kanseri hücre hattından otoklavlama yöntemi ile hazırlanan antijenlerin ve adjuvan kombinasyonunun THP-1 makrofaj hücre kültürü sisteminde immünostimulan etkinliği ve sitotoksosite analizi Şekil 5'te gösterilmiştir. Yapılan çalışmada AGS hücre hattından elde edilen antijenlerin, en yüksek immünostimulan etkinliği 40 µg/ml konsantrasyonda göstermiştir. AGS hücre hattından elde edilen antijenlerin 40 µg/ml konsantrasyonda makrofajlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünostimulan etkinlik 6,744 nmol/ml'dir. Sitotoksosite analizinde ise %90,99 canlılık tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada 40 ug/ml HA ve CaP adjuvanlarının antijenler ile kombinasyonlarının THP-1 makrofaj hücre kültürü sisteminde immünostimulan etkinliği de incelenmiştir. 40 µg/ml antijen-40 ug/ml HA adjuvan kombinasyonunun makrofajlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünostimulan etkinlik 7,442 nmol/ml'dir. Sitotoksosite analizinde ise %89,73 canlılık tespit edilmiştir. 40 µg/ml antijen-40 ug/ml CaP adjuvan kombinasyonunun makrofajlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünostimulan etkinlik 7,558 nmol/ml'dir. Sitotoksosite analizinde ise %90,71 canlılık tespit edilmiştir.



**Şekil 6.** Antijen ve adjuvan (100 ug/ml) kombinasyonlarının THP-1 makrofaj hücreleri üzerindeki immünostimulan etkinliği ve sitotoksosite analizi

AGS mide kanseri hücre hattından otoklavlama yöntemi ile hazırlanan antijenlerin ve adjuvan kombinasyonunun THP-1 makrofaj hücre kültürü sisteminde immünostimulan etkinliği ve sitotoksosite analizi Şekil 6'da gösterilmiştir. Yapılan çalışmada 100 ug/ml HA ve CaP adjuvanlarının antijenler ile kombinasyonlarının THP-1 makrofaj hücre kültürü sisteminde immünostimulan etkinliği incelenmiştir. 40 µg/ml antijen-100 ug/ml HA adjuvan kombinasyonunun makrofajlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünostimulan etkinlik 7,791 nmol/ml'dir. Sitotoksosite analizinde ise %89,14 canlılık tespit edilmiştir. 40 µg/ml antijen-100 ug/ml CaP adjuvan kombinasyonunun makrofajlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünostimulan etkinlik 7,907 nmol/ml'dir. Sitotoksosite analizinde ise %89,81 canlılık tespit edilmiştir.

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucu oluşmaktadır. Farklı kanser türleri olmakla birlikte mide kanseri, dünyada en sık görülen kanser türlerinden biridir. Cerrahi tedavi, kemoterapi,

radyoterapi, immünoterapi ve hedeflendirilmiş terapiler gibi tedavi yöntemleri mide kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Fakat bu tedavi yöntemleri etkili sonuçlar vermemekte ve yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bununla birlikte hastalık başlamadan önce bağışıklık oluşturmak hastalığın başlamasını engellemekte ya da daha hızlı bir şekilde tedavilerden yanıt alınmasını sağlamaktadır.

Aşı, hastalıklar için uzun süreli bir çözüm olmaktadır. Aşı çalışması için mide kanserine karşı uzun süreli bağışıklık oluşturabilecek uygun adjuvan gerekmektedir. Kullanılacak uygun adjuvan, mide kanserine karşı güçlü bağışıklık tepkisinin oluşturulmasını sağlamaktadır. Bu çalışmada AGS mide kanseri hücre hattı kullanılarak otoklavlama yöntemiyle hazırlanan antijenlerin tek başına ve HA-CaP adjuvanları kombinasyonu kullanılarak aşı aday geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Literatürde dondurma-çözdürme ve otoklavlama gibi yöntemler kullanılarak aşı formülasyonları hazırlanmıştır. Bu antijen hazırlama yöntemleri sadece kanser aşuları için değil aynı zamanda leishmania gibi farklı organizmalara yönelik aşı çalışmalarında da kullanılmaktadır. Saf antijen kullanılan çalışmalarda nitrik oksit üretimi kontrol gruplarına göre daha düşük olmaktadır. Fakat saf antijenler, adjuvan kombinasyonları ile birlikte kullanıldığında nitrik oksit üretim verimliliği artmaktadır.

#### 4. Sonuçlar ve Öneriler

Yapılan bu çalışmada mide kanserine karşı aşı formülasyonlarını geliştirmek için mide kanseri hücrelerinden otoklavlama yöntemi ile elde edilmiş antijenler, HA ve CaP adjuvan ile kombine edilmiştir. Formülasyonların, J774 ve THP-1 makrofaj ve L929 fibroblast hücrelerinde immünotümölan aktiviteleri incelenmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalarda nitrik oksit ve canlılık analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kontrol grubuna göre otoklavlama antijeninin tek başına immünotümölan etkinliğinin az da olsa daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Antijen-adjuvan formülasyonlarının ise kontrol gruplarına göre immünotümölan etkinliğini yüksek oranda arttırdığı belirlenmiştir. Adjuvan grupları arasında ise Kalsiyum fosfat adjuvanının hidroksiapatit adjuvanına göre immünotümölan etkinliğinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada bu iki adjuvan aday arasında en iyi aşı aday olma potansiyeli olan formülasyonun 40 µg/ml antijen-40 µg/ml CaP adjuvanı kombinasyonu olduğu belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında, mide kanserine karşı HA ve CaP ile kombine halde otoklavlanmış mide kanseri antijenlerinin aşı aday olabileceği belirlenmiştir. Bu tür antijen-adjuvan kombinasyonları, koruyucu bağışıklık yetenekleri ile etkili ve ucuz olduğu için mide kanserine karşı aşı aday olarak görülmektedir. Ayrıca bu formülasyonlar ile yapılan in vivo çalışmalardan elde edilecek antikorların da mide kanseri tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

### Yazarların Katkısı

Tüm yazarlar çalışmaya eşit katkıda bulunmuştur.

### Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

### Araştırma ve Yayın Etiği Beyanı

Yapılan çalışmada araştırma ve yayın etiğine uyulmuştur.

### Kaynaklar

- Butterfield, L. H. (2015). Cancer vaccines. *BMJ*, 350, 988.
- Guevara, I., Iwanejko, J., Dembińska-Kieć, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P., and Szczudlik, A. (1998). Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta*, 274(2), 177-188.
- Hausman, D. M. (2019). What Is Cancer? *Perspect Biol Med*, 62(4), 778-784.
- Ihlamur, M., Akgül, B., Abamor, E. S. (2022). Farklı hücre hatlarında besiyeri ve FBS'in hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin incelenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 17, 55-64.
- Ihlamur, M., Başarı, H., Zengin, Y., Abamor, E. S. (2022). Evaluation of immunostimulant/cytotoxic activity of human breast cancer prepared by different antigen preparation methods with adjuvants combination. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 17, 96-110.
- Isobe, K., and Nakashima, I. (1993). Nitric oxide production from a macrophage cell line: interaction with autologous and allogeneic lymphocytes. *J Cell Biochem*, 53(3), 198-205.
- Jacquet, D., Boelaert, M., Seaman, J., Rijal, S., Sundar, S., Menten, J., and Magnus, E. (2006). Comparative evaluation of freeze-dried and liquid antigens in the direct agglutination test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health*, 11(12), 1777-1784.
- Kosari, F., and Ghaffari, F. (2018). The Comparison Between Microwave and Autoclave as Antigen Retrieval Methods for Immunohistochemical Detection of CD15 and CD30 in Hodgkin's Lymphoma. *Iran J Pathol*, 13(4), 390-396.
- Shi, S., Zhu, H., Xia, X., Liang, Z., Ma, X., and Sun, B. (2019). Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine*, 37(24), 3167-3178.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209-249.
- Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Viñals, F., and Capellá, G. (2010). Recent advances in cancer therapy: an overview. *Curr Pharm Des*, 16(1), 3-10.