

Mide kanserine karşı geliştirilen aşı formülasyonunun immünostimülan ve sitotoksik etkilerinin incelenmesi

Yağmur HAMURCI^{1,*}, Murat IHLAMUR^{2,3}, Emrah Şefik ABAMOR³

¹Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Bölümü, İstanbul

²Biruni Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Elektronik ve Otomasyon Bölümü, İstanbul,

³Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Bölümü, İstanbul,

Geliş Tarihi (Received Date): 24.09.2022

Kabul Tarihi (Accepted Date): 16.11.2023

Öz

Kanser, hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması sonucu oluşan ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünyada ölüm oranı en yüksek hastalıktır. Mide kanseri, dünyada en yaygın görülen kanser türlerinden biri olmakla birlikte GLOBOCAN 2020 yaklaşık 800000 ölüme neden olmuş ve yaklaşık 1,1 milyon yeni mide kanseri vakası tespit edilmiştir. Tedavisinde cerrahi, kemoterapi, ilaç tedavisi gibi yöntemler sıklıkla kullanılsa da etkili sonuçlar vermemektedir. Bu nedenle mide kanseri oluşmadan önce bağışıklık oluşturularak hastalığın başlamasını engellenmeli veya elde edilen bağışıklık sayesinde daha hızlı bir şekilde tedavilerden yanıt alınmasını sağlanmalıdır. Aşılamanın kansere karşı bağışıklık sistemini harekette geçirdiğine dair literatürde yer alan çalışmalar, kanser aşılarda umut verici sonuçlar ortaya koymaktadır. Bu çalışmada, mide kanserine yönelik geliştirilen aşı formülasyonlarının immünostimülan etkileri, J774 murin makrofaj, THP-1 insan makrofaj ve L929 fibroblast hücrelerinde araştırılmış ve sitotoksiteleri belirlenmiştir. AGS mide kanseri hücre hattından dondurma-çözdürme yöntemi ile elde edilen antijenler Freund's ve Incomplete Freund's adjuvanları ile kombine edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, geliştirilen aşı formülasyonlarının toksik etkilerinin düşük olduğu ve en yüksek immünostimülan etkinliğin 40 µg/ml konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan üç hücre hattında maksimum protein konsantrasyonunda hücre canlılıkları %75'den yüksek olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların mide kanserine yönelik aşı formülasyonlarının geliştirmesine yardımcı olacağı ve kanser immünoterapisi çalışan araştırmacılar için bu verilerin değerlendirilebileceği söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Mide kanseri, aşı, dondurma-çözdürme yöntemi, Freund's adjuvan.

*Yağmur HAMURCI, yagmurhamurcu1@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2363-3965>

Murat IHLAMUR, ihlamurmurat@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0458-5638>

Emrah Şefik ABAMOR, esabamor@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9174-4528>

Investigation of immunostimulant and cytotoxic effects of vaccine formulation developed against gastric cancer

Abstract

Cancer is the disease that results from the uncontrolled proliferation of cells and has the highest mortality rate in the world after cardiovascular diseases. Although gastric cancer is one of the most common cancer types in the world, GLOBOCAN 2020 caused approximately 800,000 deaths and approximately 1.1 million new gastric cancer cases were detected. Although methods such as surgery, chemotherapy and drug therapy are frequently used in the treatment, they do not give effective results. For this reason, before gastric cancer occurs, the onset of the disease should be prevented by creating immunity or a faster response from the treatments should be provided thanks to the immunity obtained. 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 vaccine formulations developed for gastric cancer were investigated in J774 murine macrophage, THP-1 human macrophage and L929 fibroblast cells and their cytotoxicity was determined. Antigens obtained by freeze-thaw method from AGS gastric cancer cell line were combined with Freund's and Incomplete Freund's adjuvants. According to the results of the study, it was determined that the toxic effects of the developed vaccine formulations were low and the highest immunostimulatory activity was at a concentration of 40 µg/ml. It was determined that cell viability was higher than 75% at the maximum protein concentration in the three cell lines used. It can be said that the results obtained will help the development of vaccine formulations for gastric cancer and that these data can be evaluated for researchers working on cancer immunotherapy.

Keywords: *Gastric cancer, vaccine, freeze-thaw method, Freund's adjuvant.*

1. Giriş

Kanser, hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması sonucu oluşan ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünyada ölüm oranı en yüksek hastalıktır. Kanserinin birçok türü olmakla birlikte en fazla ölüme neden olan türleri akciğer, meme, prostat, mide ve kolorektal kanserlerdir [1].

Mide kanseri, dünyada en yaygın görülen kanser türlerinden biri olmakla birlikte kansere bağlı ölümlerde dördüncü sırada yer almaktadır. GLOBOCAN 2020 tahminlerine göre mide kanseri, tüm kanser ölümlerinin %7,7'sini oluşturarak yaklaşık 800000 ölüme neden olmuştur. 2020'de tüm kanser vakalarının %5,6'sını oluşturarak yaklaşık 1,1 milyon yeni mide kanseri vakası teşhis edilmiştir [2]. Mide kanseri, çevresel faktörlere dayanmakla birlikte % 1-3 gibi bir oranda kalıtsal olarak ortaya çıkmaktadır. Mide kanseri oluşumunda en önemli faktörlerin başında ise *Helikobakter pilori* (*H. Piloni*) enfeksiyonu gelmektedir. Bunun dışında metabolik yollarda ortaya çıkan mutasyonlar, tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin ekspresyon seviyelerinde oluşan değişimler mide kanseri oluşumunda etkilidir [3].

Mide kanseri çok kapsamlı bir hastalıktır. Bu da kanser tanısının geç konulmasına ve tedaviye geç başlanmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, diğer kanser türlerinde olduğu

gibi mide kanserinde de erken tanı, tedavi için oldukça önemlidir. Ancak kanserin semptomsuz ilerlemesi teşhisi zorlaştırmaktadır. Erken evrede tanı oldukça zor iken ileri evrede ağrı, kitle ve kanama gibi semptomlar ortaya çıkmaktadır [4].

Günümüzde erken evre mide kanserine karşı tedavide cerrahi rezeksiyon uygulanmaktadır. İleri evre mide kanserlerinde ise kemoterapi kullanılmaktadır. Ancak hastaların kemoterapötik ilaçlara karşı gösterdiği direnç, tedavinin olumsuz seyretmesine neden olmaktadır [5]. Bu nedenle mide kanseri oluşmadan önce bağışıklık oluşturularak hastalığın başlamasını engellenmeli veya elde edilen bağışıklık sayesinde daha hızlı bir şekilde tedavilerden yanıt alınmasını sağlanmalıdır. Kanser aşılı ile ilgili yapılan çalışmalarda kanser hücresi antijenleri aşı kaynağı olarak birçok çalışmada kullanılmaktadır. Hücre kaynağından antijen elde edilmesinde genellikle dondurma-çözdürme ve sonikasyon gibi yöntemler kullanılmaktadır [6]. Hazırlanan antijenlerle adjuvan kombinasyonları aşı çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu sayede hazırlanan antijenlerin etkinlikleri adjuvanlar ile artırılmakta ve antijene karşı daha yüksek bir immün yanıt elde edilmesi sağlanmaktadır [7].

Bu çalışmada ilk kez, AGS insan mide kanseri hücre hattından dondurma-çözdürme yöntemi ile elde edilen antijenlerin tek başına ve farklı adjuvan (Freund's ve Incomplete Freund's) kombinasyonu ile oluşturulan aşı formülasyonlarının J774 murin, THP-1 insan makrofaj ve L929 fare fibroblast hücre hatlarında immünoestimulan aktivitesi ve sitotoksitesisi incelenmiştir.

2. Deneysel çalışmalar

2.1. Hücre kültürünün yapılması

Yapılan deneysel çalışmalarda farelerden elde edilen fibroblast hücre hattı (L929) ve fare makrofaj hücre hattı (J774) ve insanlardan elde edilen makrofaj hücre hattı (THP-1) kullanıldı. Hücrelerin kültürü 75cm²'lik (Polistiren yüzey, NEST) flasklarda yapıldı. Deneysel çalışmada stok medyumlar kullanıldı. Stoklar %1'lik penisilin- streptomisin ve %1'lik L-glutamin ile hazırlandı. Hücrelerin çoğalması için L929 fibroblast hücre hattının kültürü %10 FBS içeren DMEM besiyerinde, J774 fare makrofaj hücre hattının kültürü ve THP-1 insan makrofaj hücre hattının kültürü %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyerinde gerçekleştirildi. Deneysel çalışmada pasaj sayıları 10. ile 15. Arasında olan hücre hatları kullanıldı. Hücre hatlarının kültürü 37°C, %95 nem ve %5 CO₂ inkübasyon şartlarında yapıldı. L929 hücre hattı enzimatik yol ile J774 ve THP-1 hücre hattı ise fiziksel yol ile toplanarak 25°C, 1000 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj ve thoma lamında hücre sayımları gerçekleştirildi. Kuyu başına 1x10⁵ hücre/mL olacak 96 kuyulu plâtelere ekim yapıldı. 24 saat inkübasyonda tutuldu [8].

2.2. Antijenlerin hazırlanması

AGS kültürü kültürünün çoğalması %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyerinde gerçekleştirildi. Çoğaltılan AGS kültürü toplandı ve 1 ml PBS ile yıkanarak -20°C'ye kaldırıldı. Çözünür AGS antijenlerinin hazırlanması için dondurma-çözdürme metodu uygulandı. Dondurma-çözdürme metodunda, -20°C'den çıkarılan hücreler 37°C'de su banyosu içerisinde çözüldü. Çözünen hücreler sıvı azot kabına konularak 15 dk süreyle hücrelerin donması beklendi. Donan hücreler 15 dk süre ile 37°C'deki su banyosuna bekletilerek çözünmesi sağlandı. PBS içerisinde süspanse hale getirilen hücrelerde bu işlem 5 kere tekrar edildi ve sonra 10.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi ve süpernatant

alındı. Lizattaki protein miktarının tayini, UV spektrometresinde Warburg-Christian yöntemi kullanılarak 280 ve 260 nm dalga boyunda gerçekleştirildi [9,10].

2.3. Nitrik oksit analizinin yapılması

Dondurma-çözdürme yöntemi ile hazırlanan antijenlerin farklı konsantrasyonlarının tek başına ve adjuvanlar ile kombinasyonlarının makrofaj ve fibroblast hücre kültür sistemlerinde immünostimulan etkinliğinin tayin edilmesi için hücrelerin ürettikleri nitrik oksit (NO) miktarı Griess metoduyla belirlendi [11]. 24 saat %5 CO² içeren 37°C'deki etüvde makrofaj ve fibroblast hücrelerinin inkübasyonunun ardından çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan antijen (25 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) ve adjuvan (Freund's adjuvant ve Incomplete Freund's adjuvant) kombinasyonları (10 µg/ml ve 40 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 96 kuyulu plaklara eklendi. Örneklerin üzerine 50 µl Griess reaktifi eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk. inkübasyona bırakıldı. 540 nm'de ELISA Readerda absorbanlar ölçüldü [12].

2.4. MTT analizinin yapılması

Hücre canlılığı analizi inkübasyon şartları 37°C'de %95 nem ve %5 CO² ortam olacak şekilde inkübator ayarlanarak 48 saat inkübe edilen hücrelere MTT uygulandı. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazilyum bromid içeren MTT ile hücre canlılık oranları değerlendirildi. Well plate üzerindeki her bir kuyucuğa 10 µl MTT solüsyonu ilave edildi. Well 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) eklendi. Plateler 30 dk karanlık ortamda bekletildi. Daha sonra 570 nm dalga boyunda ölçüm alınarak canlılık analizi gerçekleştirildi [13,14]. Her deney grubu üç kez tekrarlanarak ortalaması alındı. Canlılık analizi verileri denklem 1 kullanılarak hesaplandı. Veri grafikleri oluşturuldu.

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = \left(\frac{\text{Örnek absorbanı}}{\text{Kontrol absorbanı}} \right) * 100 \quad (1)$$

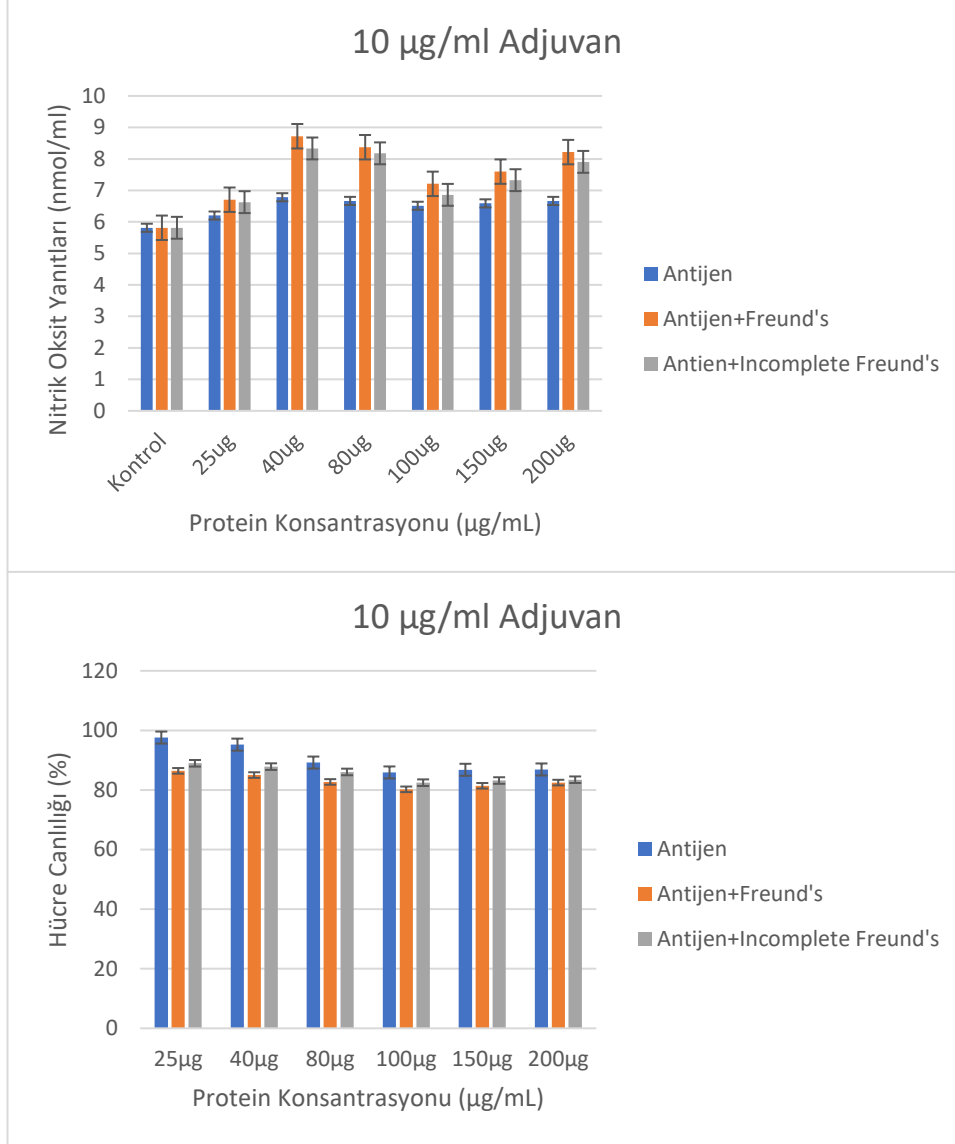
2.5. İstatistiksel analizinin yapılması

Çalışmada 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. Sonuçlar ve tartışma

Yapılan çalışmada AGS hücrelerinden dondurma-çözdürme metodu kullanılarak antijen hazırlanmıştır. Hazırlanan antijenlerin tek başına ve adjuvanlarla kombinasyonlarının aşı çalışmalarında kullanılabilirliğinin belirlenmesi için J774 ve THP-1 makrofaj ve L929 fibroblast hücre kültürü sisteminde immünostimulan etkinliğine ve sitotoksik etkilerine bakılmıştır.

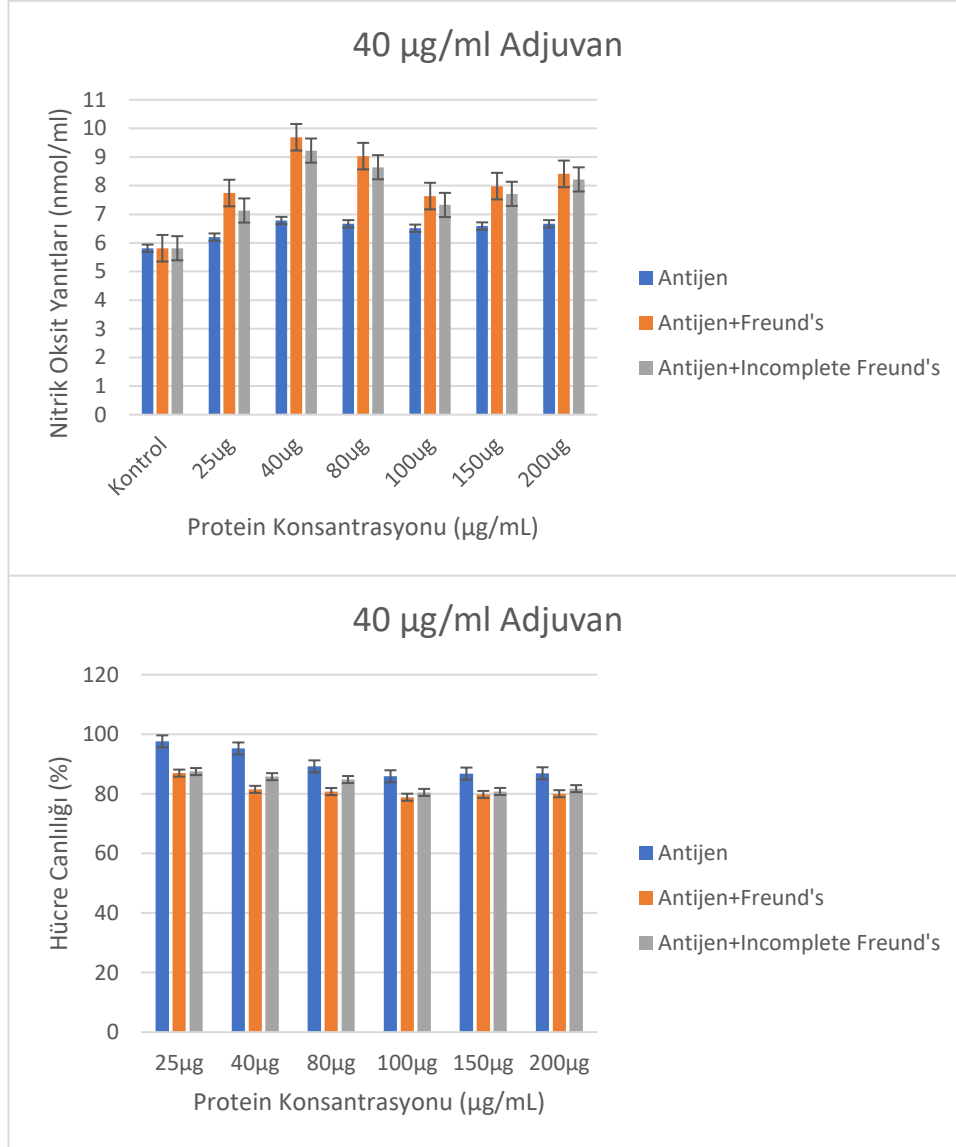
Şekillerde gösterilen hücrelerin canlılık yüzdeleri, pozitif kontrol grubunun değeri %100 olarak kabul edildiğinde, diğer gruplarda basit oran hesabı ile elde edilen % değeridir ve canlı hücre oranını belirtmektedir. MTT testi sonuçlarına göre hücre canlılığı 48. saatin sonundaki bütün gruplar arasında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



Şekil 1. Antijen ve adjuvan (10 µg/ml) kombinasyonlarının L929 fibroblast hattı üzerinde immünostimulan etkinliği ve sitotoksosite analizi.

AGS mide kanseri hücre hattından dondurma-çözdürme yöntemi ile hazırlanan antijenlerin ve adjuvan (10 µg/ml) kombinasyonlarının L929 fibroblast hücre kültürü sisteminde immünostimulan etkinliği ve sitotoksosite analizi Şekil 1'de 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 fibroblastlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünostimulan etkinlik 6,783 nmol/ml'dir. Sitotoksosite analizinde ise %95,23 canlılık tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada 10 µg/ml Freund's ve Incomplete Freund's adjuvanlarının antijenler ile kombinasyonlarının fibroblast hücre kültürü

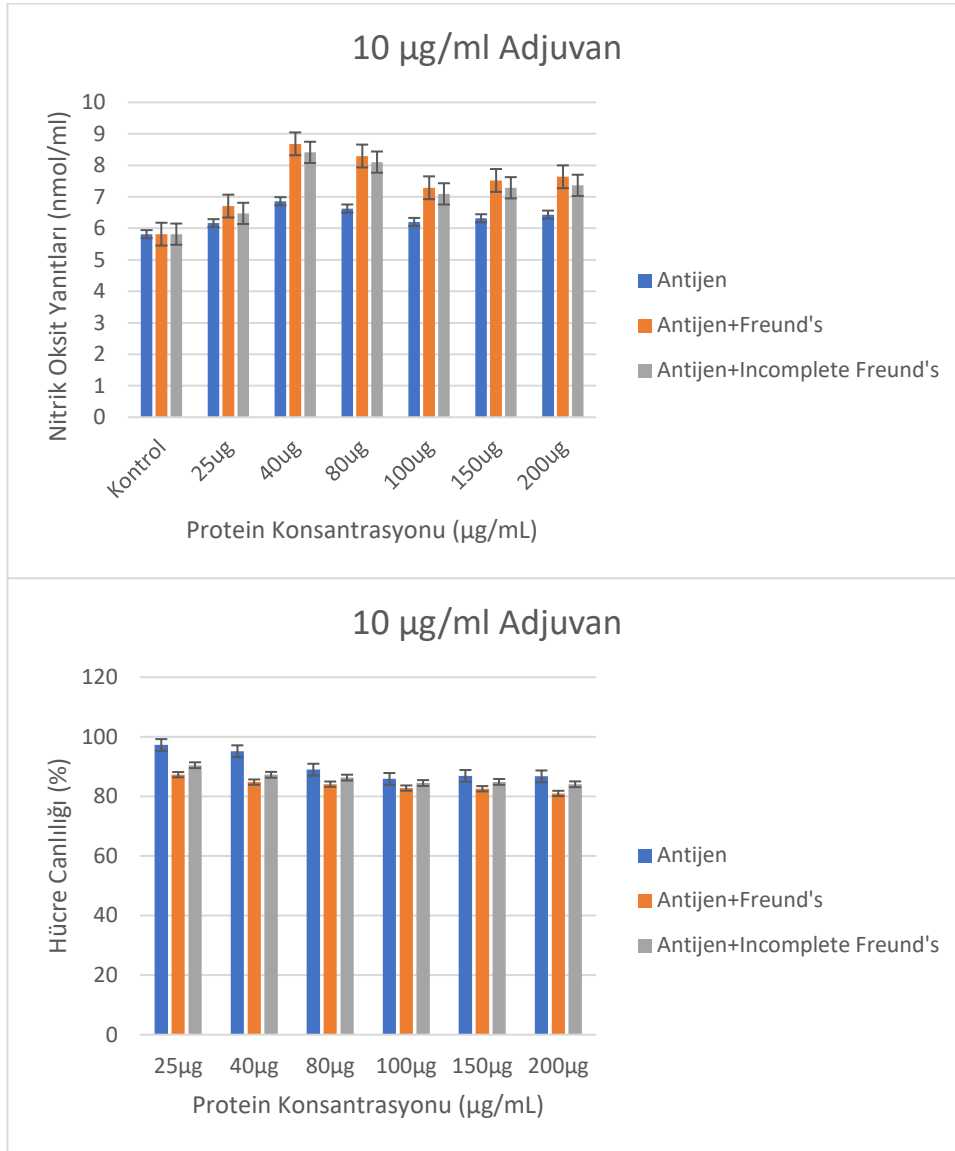
sisteminde immünoestimulan etkinliği de incelenmiştir. 40 µg/ml antijen-10 µg/ml Freund's adjuvan kombinasyonunun fibroblastlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünoestimulan etkinlik 8,721 nmol/ml'dir. Sitotoksisite analizinde ise %85,02 canlilik tespit edilmiştir. 40 µg/ml antijen-10 µg/ml Incomplete Freund's adjuvan kombinasyonunun fibroblastlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünoestimulan etkinlik 8,333 nmol/ml'dir. Sitotoksisite analizinde ise %87,85 canlilik tespit edilmiştir.



şekil 2. Antijen ve adjuvan (40 µg/ml) kombinasyonlarının L929 fibroblast hattı üzerinde immünoestimulan etkinliği ve sitotoksisite analizi.

AGS mide kanseri hücre hattından dondurma-zdrme yöntemi ile hazırlanan antijenlerin ve adjuvan (40 µg/ml) kombinasyonunun L929 fibroblast hücre kültürü sisteminde immünoestimulan etkinliği ve sitotoksisite analizi şekil 2'de gösterilmiştir. Yapılan çalışmada 40 µg/ml Freund's ve Incomplete Freund's adjuvanlarının antijenler ile kombinasyonlarının fibroblast hücre kültürü sisteminde immünoestimulan etkinliği incelenmiştir. 40 µg/ml antijen-40 µg/ml Freund's adjuvan kombinasyonunun fibroblastlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünoestimulan etkinlik 9,69 nmol/ml'dir. Sitotoksisite analizinde ise %81,49 canlilik tespit edilmiştir. 40 µg/ml

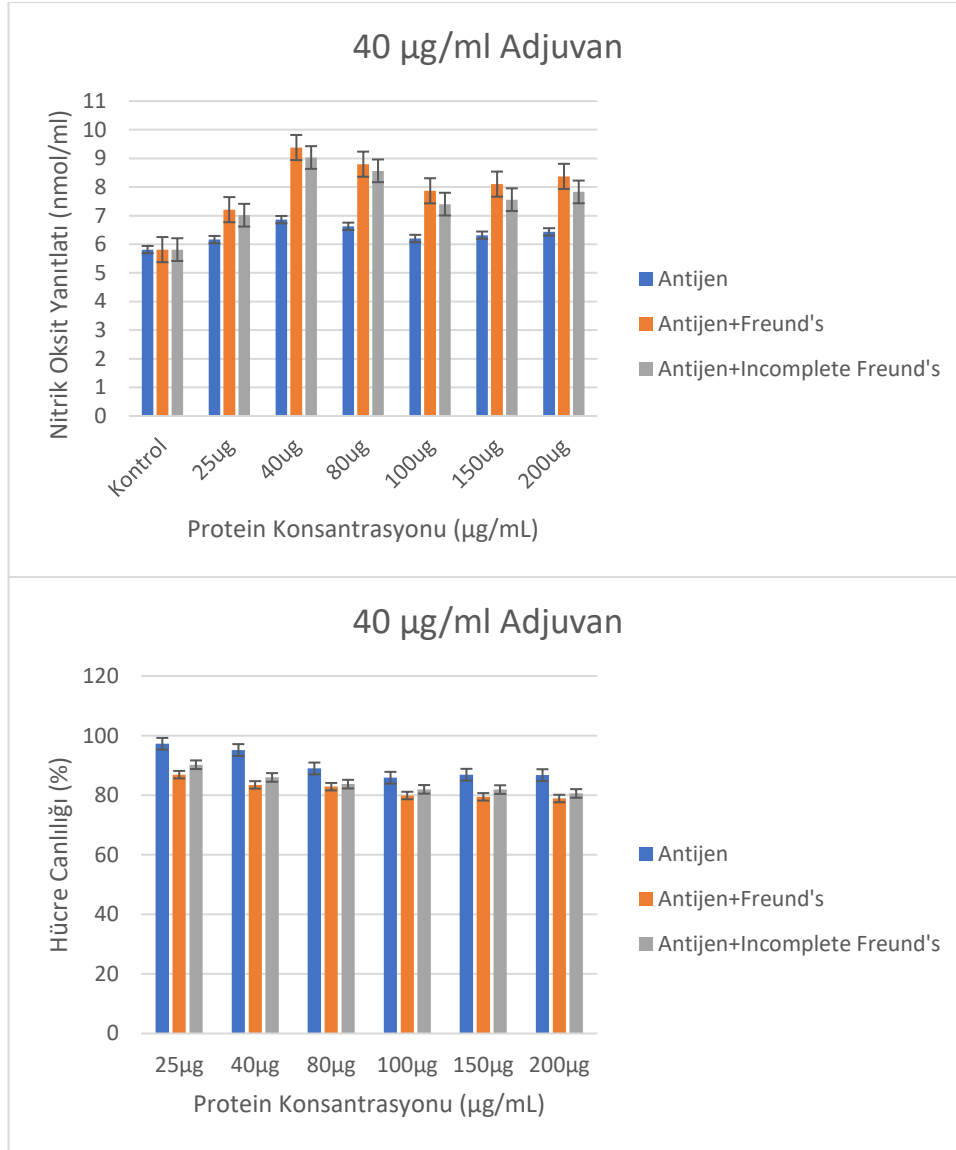
antijen-40 $\mu\text{g/ml}$ Incomplete Freund's adjuvan kombinasyonunun fibroblastlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünoestimulan etkinlik 9,225 nmol/ml'dir. Sitotoksisite analizinde ise %85,76 canlılık tespit edilmiştir.



Şekil 3. Antijen ve adjuvan (10 $\mu\text{g/ml}$) kombinasyonlarının J774 makrofaj hattı üzerinde immünoestimulan etkinliği ve sitotoksisite analizi.

AGS mide kanseri hücre hattından dondurma-çözdürme yöntemi ile hazırlanan antijenlerin ve adjuvan (10 $\mu\text{g/ml}$) kombinasyonunun J774 makrofaj hücre kültürü sisteminde immünoestimulan etkinliği ve sitotoksisite analizi Şekil 3'te gösterilmiştir. Yapılan çalışmada AGS hücre hattından elde edilen antijenlerin, en yüksek immünoestimulan etkinliği 40 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda göstermiştir. AGS hücre hattından elde edilen antijenlerin 40 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda makrofajlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünoestimulan etkinlik 6,86 nmol/ml'dir. Sitotoksisite analizinde ise %95,16 canlılık tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada 10 $\mu\text{g/ml}$ Freund's ve Incomplete Freund's adjuvanlarının antijenler ile kombinasyonlarının makrofaj hücre kültürü sisteminde immünoestimulan etkinliği de incelenmiştir. 40 $\mu\text{g/ml}$ antijen-10 $\mu\text{g/ml}$ Freund's adjuvan kombinasyonunun makrofajlarla muamelesinden elde edilen en yüksek

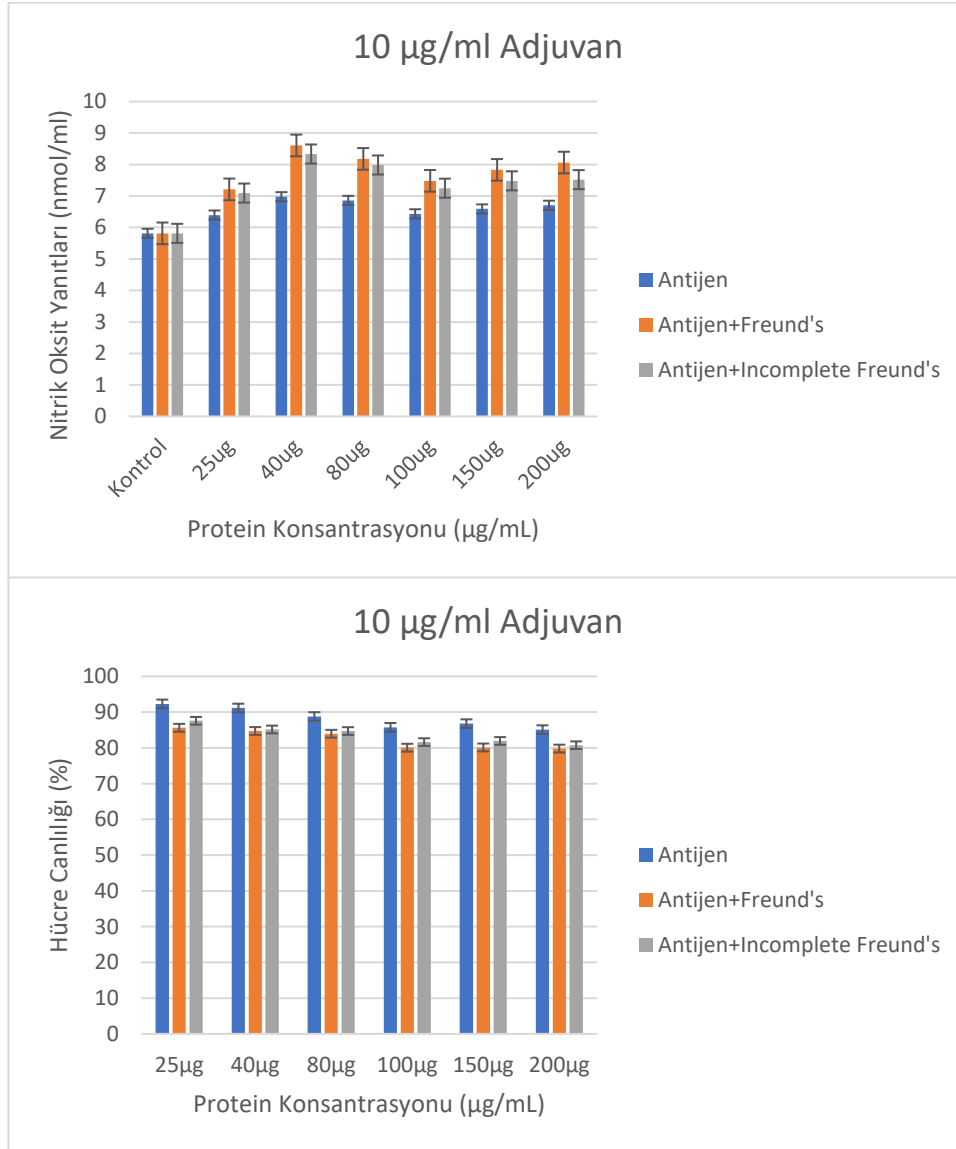
immünostimulan etkinlik 8,682 nmol/ml'dir. Sitotoksisite analizinde ise %84,8 canlılık tespit edilmiştir. 40 µg/ml antijen-10 µg/ml Incomplete Freund's adjuvan kombinasyonunun makrofajlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünostimulan etkinlik 8,411 nmol/ml'dir. Sitotoksisite analizinde ise %87,25 canlılık tespit edilmiştir.



Şekil 4. Antijen ve adjuvan (40 µg/ml) kombinasyonlarının J774 makrofaj hattı üzerinde immünostimulan etkinliği ve sitotoksisite analizi.

AGS mide kanseri hücre hattından dondurma-çözdürme yöntemi ile hazırlanan antijenlerin ve adjuvan (40 µg/ml) kombinasyonunun J774 makrofaj hücre kültürü sisteminde immünostimulan etkinliği ve sitotoksisite analizi Şekil 4'te gösterilmiştir. Yapılan çalışmada 40 µg/ml Freund's ve Incomplete Freund's adjuvanlarının antijenler ile kombinasyonlarının makrofaj hücre kültürü sisteminde immünostimulan etkinliği incelenmiştir. 40 µg/ml antijen-40 µg/ml Freund's adjuvan kombinasyonunun makrofajlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünostimulan etkinlik 9,38 nmol/ml'dir. Sitotoksisite analizinde ise %83,46 canlılık tespit edilmiştir. 40 µg/ml antijen-40 µg/ml Incomplete Freund's adjuvan kombinasyonunun makrofajlarla

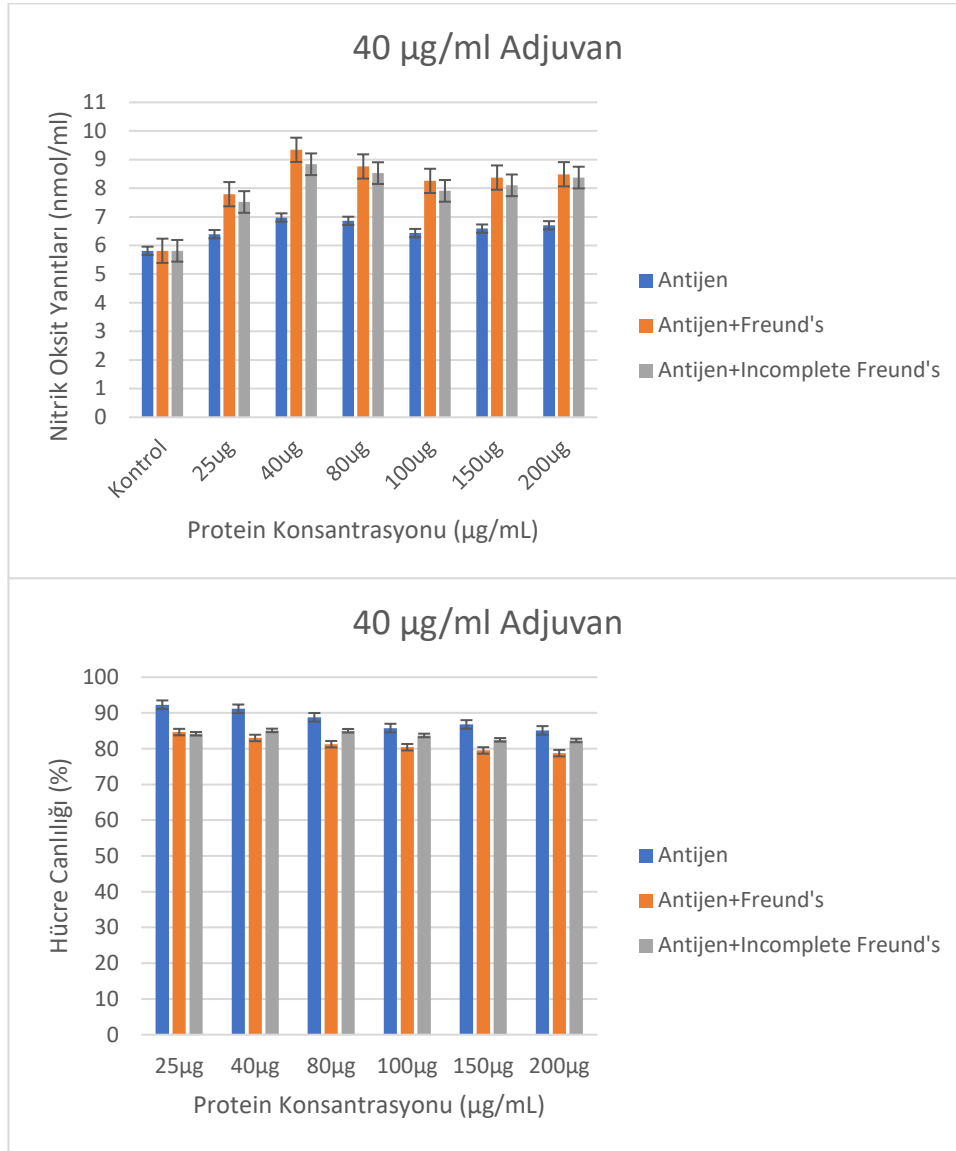
muamelesinden elde edilen en yüksek immünoestimulan etkinlik 9,031 nmol/ml'dir. Sitotoksisite analizinde ise %85,96 canlılık tespit edilmiştir.



Şekil 5. Antijen ve adjuvan (10 µg/ml) kombinasyonlarının THP-1 makrofaj hattı üzerinde immünoestimulan etkinliği ve sitotoksisite analizi.

AGS mide kanseri hücre hattından dondurma-çözdürme yöntemi ile hazırlanan antijenlerin ve adjuvan (10 µg/ml) kombinasyonunun THP-1 makrofaj hücre kültürü sisteminde immünoestimulan etkinliği ve sitotoksisite analizi Şekil 5'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 6,977 nmol/ml'dir. Sitotoksisite analizinde ise %91,16 canlılık tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada 10 µg/ml Freund's ve Incomplete Freund's adjuvanlarının antijenler ile kombinasyonlarının THP-1 makrofaj hücre kültürü sisteminde immünoestimulan etkinliği de incelenmiştir. 40 µg/ml antijen-10 µg/ml Freund's adjuvan kombinasyonunun makrofajlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünoestimulan etkinlik 8,605 nmol/ml'dir. Sitotoksisite analizinde ise %84,73 canlılık

tespit edilmiştir. 40 µg/ml antijen-10 µg/ml Incomplete Freund's adjuvan kombinasyonunun makrofajlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünoestimulan etkinlik 8,333 nmol/ml'dir. Sitotoksisite analizinde ise %85,16 canlılık tespit edilmiştir.



Şekil 6. Antijen ve adjuvan (40 µg/ml) kombinasyonlarının THP-1 makrofaj hattı üzerinde immünoestimulan etkinliği ve sitotoksisite analizi.

AGS mide kanseri hücre hattından dondurma-çözdürme yöntemi ile hazırlanan antijenlerin ve adjuvan (40 µg/ml) kombinasyonunun THP-1 makrofaj hücre kültürü sisteminde immünoestimulan etkinliği ve sitotoksisite analizi Şekil 6'de gösterilmiştir. Yapılan çalışmada 40 µg/ml Freund's ve Incomplete Freund's adjuvanlarının antijenlerle kombinasyonlarının THP-1 makrofaj hücre kültürü sisteminde immünoestimulan etkinliği incelenmiştir. 40 µg/ml antijen-40 µg/ml Freund's adjuvanı ile kombinasyonunun makrofajlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünoestimulan etkinlik 9,341 nmol/ml'dir. Sitotoksisite analizinde ise %83,01 canlılık tespit edilmiştir. 40 µg/ml antijen-40 µg/ml Incomplete Freund's adjuvan kombinasyonunun makrofajlarla muamelesinden elde edilen en yüksek immünoestimulan etkinlik 8,837 nmol/ml'dir. Sitotoksisite analizinde ise %85,12 canlılık tespit edilmiştir.

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucu oluşan bir hastalıktır. Kanser tek bir organa etki edebildiği gibi metastaz yaparak farklı organlara da yayılabilir. Farklı kanser türleri olmakla birlikte mide kanseri, dünyada en sık görülen kanserlerden biridir. Mide kanseri, mide duvarında veya özofagusdaki mutasyonlar sonucu ile oluşabilmektedir. Mide kanseri tedavisinde cerrahi tedavi, kemoterapi, radyoterapi, gen terapisi, immünoterapi ve hedeflendirilmiş terapiler gibi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Bu tedavi yöntemleri tek başına efektif bir sonuç vermediği için destekleyici tedaviler kullanılmaktadır [15].

Kanser tedavilerinde etkili ilaç formülasyonları olsa da hastalığın eradikasyonu aşılama yoluyla gerçekleştirilebilir. Aşılar, hastalık kontrolü için uzun vadeli çözümler sunmaktadır. Bu çalışmada AGS mide kanseri hücre hattından elde edilen çözünür mide kanseri antijenleri, güvenli ve ucuz olma avantajı sunduğundan dolayı aşı adayı olarak seçilmiştir. Ayrıca etkili bir aşı geliştirmek için mide kanserine karşı uzun süreli bağışıklık oluşturabilecek uygun bir adjuvan seçimi gerekmektedir. Uygun adjuvan, mide kanserine karşı güçlü bir bağışıklık tepkisi oluşturmasıyla immünojeniteyi de arttıracaktır. Bu nedenle, adjuvanlar, uzun süreli koruyucu bağışıklık tepkisi veren hem doğal hem de adaptif bağışıklık tepkilerini uyurabildiği ve yönlendirebildiği için antijen formülasyonlarının oluşturulmasında önemlidir.

Bu çalışmada Freund's adjuvanı çeşitleri, mide kanserinin dondurma-çözdürme yöntemi ile elde edilmiş antijenleri ile mide kanserine karşı aşı formülasyonlarını geliştirmek için formülize edilmiştir. Aşı formülasyonlarının J774 ve THP-1 makrofaj ve L929 fibroblast hücrelerinde immünotümölan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda nitrik oksit deneyleri ve canlılık analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda kontrol grubuna göre dondurma-çözdürme antijeninin tek başına immünotümölan etkinliğinin az da olsa yüksek olduğu belirlenmiştir. Antijen-adjuvan formülasyonlarının ise kontrol gruplarına göre immünotümölan etkinliğini 1,5 kat arttırdığı belirlenmiştir. Adjuvan grupları arasında ise Freund's adjuvanının Incomplete Freund's adjuvanına göre immünotümölan etkinliğinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında en iyi aşı adayı olma potansiyeli olan formülasyonun 40 µg/ml antijen-10 µg/ml Freund's adjuvanı kombinasyonu olduğu belirlenmiştir. Bu tür antijen-adjuvan kombinasyonları, koruyucu bağışıklığı indüklemeye yetenekleri ile etkili ve ucuz olduğundan ileriye dönük bir mide kanserine karşı aşı adayı olarak ortaya çıkabilir.

Kaynaklar

- [1] Kriehoff-Henning, E., Folkerts, J., Penzkofer, A. ve Weg-Remers, S., Cancer-an overview, **Med Monatsschr Pharm**, 40, 2, 48-54, (2017).
- [2] Siegel, R. L., Miller, K. D. ve Jemal, A., Cancer statistics, **CA Cancer J Clin**, 70, 1, 7-30, (2020).
- [3] Machlowska, J., Baj, J., Sitarz, M. ve Maciejewski, R., Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies, **Int J Mol Sci**, 21, 11, (2020).
- [4] Takahashi, T., Saikawa, Y. ve Kitagawa, Y., Gastric cancer: current status of diagnosis and treatment, **Cancers**, 5, 1, 48-63, (2013).

- [5] Huang, W. J., Ruan, S., Wen, F., Lu, X. N., Gu, S. P., Chen, X. X., Liu, M. ve Shu, P., Multidrug Resistance of Gastric Cancer: The Mechanisms and Chinese Medicine Reversal Agents, **Cancer Manag Res**, 12, 12385-12394, (2020).
- [6] Dombroski, J. A., Jyotsana, N., Crews, D. W., Zhang, Z. ve King, M. R., Fabrication and Characterization of Tumor Nano-Lysate as a Preventative Vaccine for Breast Cancer, **Langmuir**, 36, 23, 6531-6539, (2020).
- [7] Dubensky, T. W. ve Reed, S.G., Adjuvants for cancer vaccines, **Semin Immunol**, 22, 3, 155-61, (2010).
- [8] Ihlamur, M., Akgül, B. Ve Abamor, E. S., Farklı hücre hatlarında besiyeri ve FBS'in hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin incelenmesi, **Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi**, 17, 55-64, (2022).
- [9] Ihlamur, M., Başarı, H., Zengin, Y. ve Abamor, E. S., 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, (2022).
- [10] Ihlamur, M., Hamurci, Y. ve Kelleci, K. Mide Kanserine Yönelik AGS Hücrelerinden Geliştirilen Aşı Formülasyonunun İmmünostimulan Etkilerinin Değerlendirilmesi, **Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi**, 12, 2, 736-748, (2022).
- [11] Guevara, I., Iwanejko, J., Dembińska-Kieć, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P. ve Szczudlik, A., Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction, **Clin Chim Acta**, 274, 2, 177-188, (1998).
- [12] Zengin, Y., Ihlamur, M. ve Başarı, H. Immunostimulant/Cytotoxic Effect of Cardamom Extract with Adjuvant Combination on Breast Cancer Cell Line, **Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi**, 5, 2, 229-234, (2022).
- [13] Hamurci, Y., Ihlamur, M., ve Zengin, Y. Elettaria Cardamomum Ekstraktının Proleukin İlacı Kombinasyonu ile Mide Kanseri Hücre Hattı Üzerindeki İmmünostimulan/Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi, **Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 11, 2, 283-294, (2022).
- [14] Kumar, P., Nagarajan, A. ve Uchil, P.D., Analysis of Cell Viability by the MTT Assay, **Cold Spring Harb Protoc.**, 2018, 6, (2018).
- [15] Smyth, E. C., Nilsson, M., Grabsch, H. I., van Grieken, N. C. ve Lordick, F. Gastric cancer. **Lancet**, 396, 10251, 635-648, (2020).