



T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

**SAPONİNLERİN PEPTİD BAZLI MEME KANSERİ AŞI
FORMÜLASYONUNDA KULLANIM POTANSİYELİNİN *IN*
VITRO OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Gülşah AKAĞAÇ

Biyomühendislik

İzmir
2020

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**SAPONİNLERİN PEPTİD BAZLI MEME KANSERİ AŞI
FORMÜLASYONUNDA KULLANIM POTANSİYELİNİN *IN*
VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Gülşah AKAĞAÇ

Danışman : Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir
2020

Gülşah AKAĞAÇ tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Saponinlerin Peptid Bazlı Meme Kanseri Aşı Formülasyonunda Kullanım Potansiyelinin *In Vitro* Olarak Araştırılması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 24.06.2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

: Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY

.....

Raportör Üye

: Doç. Dr. Nazlı SARIKAHYA

.....

Üye

: Doç. Dr. Lokman VARIŞLI

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Saponinlerin Peptid Bazlı Meme Kanseri Aşı Formülasyonunda Kullanım Potansiyelinin *In Vitro* Olarak Araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

24 / 06 / 2020

İmzası

Gıbah Akdoğan


ÖZET
SAPONİNLERİN PEPTİD BAZLI MEME KANSERİ AŞI
FORMÜLASYONUNDA KULLANIM POTANSİYELİNİN *IN VİTRO*
OLARAK ARAŞTIRILMASI

AKAĞAÇ, Gülşah

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY

24/06/2020, 89 sayfa

Meme kanseri, tüm dünyada kadınlarda görülen en yaygın kanser türüdür. Meme kanserinin; klinik, morfolojik ve moleküler çok farklı ögeleri içeren komplike bir hastalık olması da geleneksel tedavi yöntemlerinin bu hastalık için yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Kanser aşılarını da içeren immünoterapi de bu yeni tedavi yaklaşımlarının başında gelmektedir. Son yıllarda immünoterapinin kanser hastalarında tedavi edici potansiyelinin anlaşılmasıyla kanser aşlarına verilen önem artmıştır.

Aşı adjuvanları aşılarda; immünomodülatör kapasitenin artırılması, aşının daha uygun maliyetli hale getirilmesi (gerekli dozun azalmasıyla), doğal bağışıklık sinyallerinin etkinliğinin artırılması, yüksek spesifik antikor üretimi, güçlü sitotoksik T hücre üretiminin stimüle edilmesi, uzun süreli adaptif bağışıklık yanıtı ve antijeni daha güçlü hale getirmek gibi işlevleri olan önemli bir bileşenlerdir. Aşı çalışmalarındaki artışa paralel olarak adjuvanlarla ilgili yapılan araştırmalar günden güne artış göstermektedir. Bu tez çalışmasında da aşı adjuvan sistemlerinde onay alan QS-21 saponine alternatif olabilecek Aristatoside B, Scoposide A, Scoposide B, Elmalienoside A, Balansoide B saponinlerinin peptid bazlı meme kanseri aşı formülasyonunda adjuvan olarak kullanım potansiyelleri *in vitro* olarak araştırılmıştır. Bu çalışmayla sonraki aşamaların önünü açarak hem bilim dünyasına hem de ilerleyen aşamalarla ülke ekonomisine yararlı olmak hedeflenmiştir.

Bu amaçla ülkemiz endemik *Cephalaria spp.* bitkilerinden izole edilen Aristatoside B, Scoposide A, Scoposide B, Elmalienoside A, Balansoide B saponinleri HER2/neu peptid antijeniyle formüle edilerek PMA+iyonomisin ile indüklenen insan tam kan kültürüne uygulanarak 24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyonu takiben ELISA kitleri kullanılarak IL-4, IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IFN γ sitokin analizleri gerçekleştirilmiş ve formülasyonların immün yanıt oluşumuna etkileri belirlenmiştir.

Yapılan ELISA testi sonuçlarına göre; HER2/neu antijeniyle bir araya getirilen formülasyonlarda Scoposide B ($p<0.01$), Elmalienoside A ($p<0.01$) ve Balansoide B ($p<0.05$) saponinlerinin literatürde tümör büyümesini kolaylaştırıcı etkileri olduğu görülen IL-4 konsantrasyonunda anlamlı bir azalma meydana getirdikleri gözlemlenmiştir. Hem pro-tümörjenik hem de anti-tümörjenik etkileri olduğu görülen IL-1 β konsantrasyonu üzerinde Scoposide B ($p<0.05$) ve Balansoide B ($p<0.01$) saponinleri HER2/neu antijeniyle birlikte olan formüllerde anlamlı bir artış, Elmalienoside A ($p<0.05$) saponini ise HER2/neu antijeni ile birlikte formüle edildiğinde anlamlı bir azalma meydana getirmiştir. Pro-tümörjenik bir etkisi olduğu ve tümör terapötik direncini modüle eden IL-6 konsantrasyonu üzerinde HER2/neu antijeniyle birlikte formüle edilmiş saponin adjuvanlarının HER2'nun tek başına olduğu gruba göre anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür (Scoposide A ($p<0,0005$), Scoposide B ($p<0,0001$), Elmalienoside A ($p<0,0001$), Balansoide ($p<0,0001$), Aristatoside B ($p<0,0001$)). Meme kanseri hücre hatlarının büyümesini, göçünü ve yayılmasını teşvik ettiği, radyoterapiye karşı dirence katkıda bulunduğu bilinen TNF- α 'nın konsantrasyonunu QS-21 dışında hazırlanan tüm formülasyonların anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüştür. Meme kanserinde önemli terapötik etkiye sahip olan IFN- γ konsantrasyonu Her/neu antijeniyle saponinlerin bir araya getirilmesiyle oluşturulan tüm formülasyonlarda anlamlı bir şekilde artmıştır (Scoposide A ($p<0.005$), Scoposide B ($p<0.0001$), Elmalienoside A ($p<0.0001$), Balansoide B ($p<0.0001$), Aristatoside B ($p<0.0001$), QS21 ($p<0.0001$)).

Sonuç olarak bu çalışma ile ülkemizde endemik olarak yetiştirilen *Cephalaria spp.* türlerinden elde edilen; Aristatoside B, Scoposide A, Scoposide B, Elmalienoside A, Balansoide B, saponinleri peptid aşılarında aşı adjuvanı adayı olabileceği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Aşı, HER2/neu, Saponin, Adjuvan, *Cephalaria spp.*

ABSTRACT***IN VITRO* INVESTIGATION OF THE POTENTIAL USE OF
SAPONINS AS AN ADJUVANT IN PEPTIDE BASED BREAST
CANCER VACCINE FORMULATION**

AKAĞAÇ, Gülşah

MSc in Bioeng.

Supervisor: Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY

24/06/2020, 89 pages

Breast cancer is the most common cancer among women. Breast cancer is a complex disease that includes many different clinical, morphological and molecular elements. Therefore, traditional treatment methods are insufficient for this disease and new treatment approaches are needed. Immunotherapy, which also includes cancer vaccines, is one of these new treatment approaches. In recent years, the importance given to cancer vaccines has increased with the understanding of the therapeutic potential of immunotherapy in cancer cases.

Active immune therapy with vaccines is an attractive treatment modality for number of reasons including; improving immunomodulatory capacity, making the vaccine more cost-effective (with decreasing the required dose), increasing the effectiveness of natural immune signals, high specific antibody production, production of cytotoxic T cells, long-term adaptive immune response. With the increase in vaccination studies, research on adjuvants is increasing day by day. However, the vast majority of adjuvants in the studies have not been successful in obtaining approval for human use due to restrictions such as lack of efficacy, unacceptable local or systemic toxicity, production difficulties, low stability and preventive costs.

In this thesis, in order to overcome this deficiency in the field of vaccine adjuvants, saponins (Aristatoside B, Scoposide A, Scoposide B, Elmalienoside A, Balansoide B) have been investigated as potential adjuvants in peptide-based breast cancer vaccine formulation. Saponins are formulated with the HER2 / neu peptide antigen when investigating the potential for use of saponins as adjuvants. Cytokine

analyses (IL-4, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN γ), were performed using commercial ELISA kits and immogenicity potentials of formulations were determined.

According to the ELISA test results; in formulations combined with the HER2 / neu antigen, it was observed that Scoposide B ($p<0.01$), Elmalienoside A ($p<0.01$) and Balansoide B ($p<0.05$) saponins produced a significant reduction in IL-4 concentration, which appears to have tumor-promoting effects. In cases where Scoposide B ($p<0.05$) and Balansoide B ($p<0.01$) saponins were formulated with HER2 antigen, it was observed that saponins caused a significant increase in IL-1 β (according to the literature, it has both pro-tumorigenic and anti-tumorigenic effects) concentration. When Elmalienoside A ($p<0.05$) was formulated together with the HER2/neu antigen, it resulted in a significant reduction in the concentration of IL-1 β . IL-6 shows a pro-tumorigenic effect by increasing the survival of cancer cells and modulates therapeutic resistance. All saponins have been shown to cause a significant increase in IL-6 concentration and saponin adjuvants formulated with HER2 / neu antigen showed a significant decrease in IL-6 concentration. The investigated saponins made more difference in the IL-6 concentration than QS21. Aristatoside B, Elmalienoside A and QS-21 saponins significantly increased the concentration of TNF- α , which promotes growth, migration and invasion in various breast cancer cell lines and contributes to radio-resistance. It was observed that there was no significant difference in the formulation prepared using the HER2 / neu antigen with QS-21 saponin compared to the group where HER2 was alone. Other formulations investigated were found to significantly reduce TNF- α cytokine concentration. It was observed that all formulations created by combining her / neu antigen and saponins produced a significant increase in IFN- γ concentration which is thought to provide significant therapeutic benefit in breast cancer.

Consequently, it can be said that Aristatoside B, Scoposide A, Scoposide B, Elmalienoside A, Balansoide B, saponins have the potential to use adjuvants in peptide-based HER2-positive breast cancer vaccine formulations. In addition, given the immune responses produced by the adjuvants, it is possible for these adjuvants to be evaluated as vaccine adjuvant candidates for different breast cancer subtypes or different types of cancer.

Keywords: Vaccine, HER2 / neu, Saponin, Adjuvant, *Cephalaria spp.*

ÖNSÖZ

Kanser tedavisinde imünnoterapiye ve bunun bir parçası olan kanser aşılara olan ilginin günden güne artmasına paralel olarak yeni aşı adjuvanlarına olan ihtiyaç da günden güne artmaktadır. Bu çalışmayla birlikte bu alanda ihtiyaç olan yeni adjuvant adaylarının belirlenmesi ve sonraki aşamaların önününü açarak hem bilim dünyasına hem de ülke ekonomisine yararlı olmak amaçlanmıştır.

Bu amaca bağlı olarak, tez çalışması kapsamında *Cephalaria spp.* Türlerinden izole edilen Aristatoside B, Scoposide A, Scoposide B, Elmalienoside A, Balansoide B saponinlerinin meme kanseri aşılarında adjuvan olarak kullanım potansiyeli yapılan *in vitro* çalışmalarla araştırılmıştır. HER2/neu peptid antijeniyle bir araya getirilerek adjuvan-antijen formülasyonları hazırlanmış, PMA ve iyonominin ile indüklenen insan tam kan kültürü kullanılarak yapılan ELISA sonuçlarına bağlı olarak aday adjuvanların immünojenite potansiyelleri belirlenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

İZMİR
AKAĞAÇ

24/06/2020

Gülşah

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLOLAR DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.2. Meme Kanseri	4
2.3. Meme Kanserinin Alt Tipleri	5
2.3.1. Luminal A Meme Kanseri	6
2.3.2. Luminal B Meme Kanseri	6
2.3.3. Bazal Benzeri Meme Kanseri	7
2.3.4. Claudin-low Meme Kanseri	7
2.3.5. HER2 Pozitif Meme Kanseri	8
2.4. Meme Kanserinde İmmun Sistem ve İmmunoterapi	9
2.5. Meme Kanseri ve Sitokinler	13
2.5.1. IL-1 β	15
2.5.2. IL-4	16
2.5.3. IL-6	16
2.5.4. IFN- γ	17
2.5.5. TNF- α	18
2.6. Kanser Aşıları	19
2.6.1. Peptit Bazlı Aşılar	20
2.6.2. Tam Hücre Lizat Aşıları	21
2.6.3. Viral veya DNA Bazlı Aşılar	22
2.6.4. Dendritik Hücre Aşıları	23
2.6.5. Koruyucu Aşılar	25

2.7. HER2 Pozitif Meme Kanseri Kullarılan Aşılar.....	25
2.8. Aşı Adjuvanları.....	26
2.9. Adjuvanların Etki Mekanizmaları	27
2.10. Kanser Aşılarında Adjuvanların Kullarınımı	29
2.10.1. MPL İçeren Adjuvanlar	30
2.10.2. Poly-ICLC.....	30
2.10.3. CpG Oligodenkleotid Adjuvanı	31
2.10.4. Büyüme Faktörü ve Sitokinler.....	32
2.10.5. Saponinler ve QS-21 Adjuvanı	33
2.10.6. Adjuvan Sistemleri	37
2.11. Aşı Adjuvanlarının İmmun Sistem zerindeki Etkileri	38
2.12.1. <i>İn vitro</i> etkinlik testleri	42
3. MATERYAL VE METOT	49
3.1. Materyal.....	49
3.1.1. Analizlerde Kullarılan Malzemeler.....	49
3.1.2. Çalışmada Kullarılan Tam Kan.....	49
3.1.3. Cihazlar.....	49
3.2. Metot.....	50
3.2.1. İnsan Tam Kanının Kültüre Alınması ve Madde Eklenmesi	50
3.2.2. ELISA ile Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi	53
3.2.3. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz.....	57
4. BULGULAR	58
4.2. IL-1β Sitokin Analizi.....	61
4.3. IL-6 Sitokin Analizi.....	63
4.4. TNFα Sitokin Analizi	65
4.5. IFN-γ Sitokin Analizi	67
5. TARTIşMA.....	71
7. ÖNERİLER	81
8. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	82
TEşEKKüR	95
ÖZGEçMİş.....	96

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2. 1.Kanserin başlıca özellikleri (Korgaonkar and Yadav, 2019)	4
Şekil 2. 2.Dünya'da kadınlar arasındaki en yaygın kanser türleri dağılımı (American Cancer Society).	5
Şekil 2. 3. Meme kanseri alt tiplerinin şematik gösterimi (Heng et al., 2015).	6
Şekil 2. 4. HER2 neu ptotein yapısı (Moasser, 2007).....	9
Şekil 2. 5.Meme kanserinde uyarıcı ve inhibe edici immün hücre popülasyonlarının anti-tümör immün yanıtının düzenlenmesine etkisi (Basu et al., 2019)	11
Şekil 2. 6.Meme kanserinde yapılan immünoterapi çalışmalarının kategorisine göre kanser aşamasına bağlı dağılımı (Esteva et al., 2019).....	12
Şekil 2. 7.Meme kanserinde yapılan tüm immünoterapi çalışmalarının bağışıklık hedefleri (Esteva et al., 2019).....	12
Şekil 2. 8.IL-1 β sinyalizasyonunun kanserdeki fonksiyonları (Baker et al., 2019).....	15
Şekil 2. 9.IL-6'nın tümör gelişimindeki rolü (Masjedi et al., 2018)	17
Şekil 2. 10.IFN- γ 'nin klasik anti-tümör etkileri (Kursunel and Esendagli, 2016)	18
Şekil 2. 11.Kanser aşısının tarihsel gelişimi (Song et al., 2018).....	19
Şekil 2. 12.HER2 pozitif meme kanserinde farklı aşı formülasyonlarına genel bakış (Milani et al., 2013).....	26
Şekil 2. 13. Aşı adjuvanlarının gelişimindeki önemli olayların zaman çizelgesi (Shi et al., 2019).....	27
Şekil 2. 14.QS-21'in temel moleküler bileşenleri (Ragupathi et al., 2011)	34
Şekil 2. 15. Saponinlerin etki mekanizmaları (Bonam et al., 2017)	35
Şekil 2. 16. Tez çalışmasında kullanılacak olan saponinlerin moleküler yapıları (Ozer et al., 2018; Sarikahya Boke et al., 2018).....	36
Şekil 2. 17. Bazı adjuvanların etki mekanizmaları (Rambe et al., 2015)	39
Şekil 2. 18. Adjuvanlara yönelik güvenlik değerlendirmeleri (Garçon et al., 2011)	42
Şekil 2. 19. Farklı türlerdeki kan hücrelerinin gelişimi ve olgunlaşması (Glenn and Armstrong)	44
Şekil 2. 20. LPS etki mekanizması (Solov'eva et al., 2013)	45
Şekil 2. 21. PMA / iyonominin kombinasyonunun mekanizması (Abimannan et al., 2016).....	46
Şekil 2. 22. M1 ve M2 makrofajlara yönelik aktivatör ve markerlar (Jayasingam et al., 2020).....	47
Şekil 3. 1. Kanın santrifüj sonrası görünümü	50
Şekil 3. 2. 24 gözlü pleyte ekim yapılması.....	51
Şekil 3. 3. İmmünojenite potansiyelinin belirlenmesi için 24 gözlü pleyt şablonu	52
Şekil 3. 4.24 gözlü pleytlere antijen-adjuvan eklenmesi	52
Şekil 3. 5.ELISA testi için ependorflara ayrılan örnekler	53
Şekil 3. 6.ELISA testlerinin yapılışı ve meydana gelen renk değişimleri	57
Şekil 3. 7.ELISA testlerinin okutulduğu spektrofotometre	57
Şekil 4. 1.Saponinlerin PMA+iyonominin ile indüklenen kan kültüründe IL4 seviyesine etkisi	58
Şekil 4. 2. Saponin-HER2/neu peptit formülasyonlarının P MA+iyonominin ile indüklenen kan kültüründe IL4 seviyesine etkisi (*p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001).....	59

Şekil 4. 3. HER2/neu peptidinin PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IL4 seviyesine etkisi	60
Şekil 4. 4. Saponinlerin PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IL1 β seviyesine etkisi (*p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001)	61
Şekil 4. 5. Saponin-HER2/neu peptit formülasyonlarının P MA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IL1 β seviyesine etkisi (*p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001)	62
Şekil 4. 6. HER2/neu peptidinin PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IL1 β seviyesine etkisi	63
Şekil 4. 7. Saponinlerin PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IL-6 seviyesine etkisi (*p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001)	63
Şekil 4. 8. Saponin-HER2/neu peptit formülasyonlarının PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IL-6 seviyesine etkisi (*p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001).....	64
Şekil 4. 9. HER2/neu peptidinin formülasyonlarının PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IL-6 seviyesine etkisi.....	65
Şekil 4. 10. Saponinlerin PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe TNF α seviyesine etkisi (*p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001).....	65
Şekil 4. 11. Saponin-HER2/neu peptit formülasyonlarının PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IL-6 seviyesine etkisi (*p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001) 66	
Şekil 4. 12. Saponin - HER2/neu formülasyonlarının PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IL-6 seviyesine etkisi	67
Şekil 4. 13. Saponinlerin PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe TNF α seviyesine etkisi (*p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001).....	67
Şekil 4. 14. Saponin-HER2/neu peptit formülasyonlarının PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IFN- γ seviyesine etkisi (*p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001)	68
Şekil 4. 15. Saponin - HER2/neu formülasyonlarının PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IFN- γ seviyesine etkisi	69

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2. 1.Kanser tedavisinde immünoterapinin avantajları ve dezavantajları (Tan et al., 2020).....	10
Tablo 2. 2.Meme kanserinde yer alan interlökinlerin ana işlevleri ve kaynakları (Fasoulakis et al., 2018).....	14
Tablo 2. 3.Peptit bazlı meme kanseri aşılarının hedefi antijenleri (Solinas et al., 2020) ..	21
Tablo 2. 4.Viral veya DNA bazlı meme kanseri aşılarının hedef antijenleri (Solinas et al., 2020).....	23
Tablo 2. 5.Dendritik hücre bazlı meme kanseri aşılarının hedef antijenleri (Solinas et al., 2020).....	24
Tablo 2. 6.Adjuvanlar ve etki mekanizmaları (Leroux-roels, 2010)	29
Tablo 2. 7. CpG ODN'nin kanser aşılarında adjuvan olarak kullanımı (Shirota and Klinman, 2017).....	32
Tablo 2. 8.GSK kanser aşılarında kullanılan adjuvan sistemleri (Garçon & Pasquale, 2016).....	37
Tablo 2. 9.Faz çalışmalarındaki bazı kanser aşıları ve kullanılan adjuvanlar	38
Tablo 2. 10 Bazı önemli adjuvanlar ve bağışıklık yanıtları (Coffman et al., 2010)	40
Tablo 2. 11. Sıklıkla kullanılan makrofaj/monosit hücre hatları (ATCC, 2020).....	47
Tablo 4. 1. Saponinlerin tek başına oldukları grupların DMSO'ya göre sitokin seviyelerinde meydana getirdikleri değişimler (ns : anlamlı bir değişim yok, + : pozitif yönde değişim, - : negatif yönde değişim)	69
Tablo 4. 2. Her2/neu peptidi ile yapılan formülasyonların HER/neu'nun tek başına olduğu gruba kıyasla Sitokin seviyelerinde meydana getirdiği değişimler (ns : anlamlı bir değişim yok, + : pozitif yönde değişim, - : negatif yönde değişim).....	70
Tablo 4. 3. Saponin+Her2/Saponin oransal bilgileri (ns : anlamlı bir değişim yok, + : pozitif yönde değişim, - : negatif yönde değişim)	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİ

Simgeler

ml	Mililitre
nm	Nanometre
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat

Kısaltmalar

HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
FBS	Fetal Sığır Serum
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
AIDS	Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu
ER	Östrojen Reseptörü
PGR	Progesteron Reseptörü
DC	Dendritik Hücre
PDL 1	Programlı Ölüm Ligandı 1
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
IL	İnterlökin
TNF	Tümör Nekroz Faktör
IFN	İnterferon
TGF	Dönüştürücü Büyüme Faktörü

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİ(devam)

NK	Doğal Öldürücü Hücreler
MDSC	Miyeloid Türevi Baskılayıcı Hücre
TAA	Tümöre Bağlı Antijenler
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
APC	Antijen Sunan Hücre
TCR	T Hücre Reseptörü
EMT	Epitelyal Mezenkimal Transizyon
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
CTA	Kanser / Testis Antijenleri
TSA	Tümöre Özgü Antijen
MPL	Monophosphoryl Lipid
CTL	Sitotoksik T Lenfositleri
TLR	Toll Benzeri Reseptör
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent dene

1. GİRİŞ

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen, tüm kanser türleri içinde ise en yaygın görülen ikinci kanser türüdür. Dünyada her yıl 1,5 milyondan fazla kadın (tüm kadınların% 25'i) meme kanserine yakalanmaktadır (Bray et al., 2018). Hastalık heterojenliği, hastalar arasında tedavi yanıtı varyasyonu, terapötik direnç ve bazı meme kanserlerinde çeşitli mutasyonel manzara, hedeflenen tedavinin olmaması, meme kanserine karşı geliştirilmiş terapötik strateji ihtiyacına işaret etmektedir. Tümörlerde immüno-gözetim ve immüno-düzenleme kavramı ile belirlendiği üzere, konakçı bağışıklık sisteminin kansere karşı korunmasının önemi göz önüne alındığında, meme kanserinde immünoterapi şu anda mevcut terapötik stratejilerle birlikte yeni bir tedavi kolu olarak değerlendirilmektedir (Basu et al., 2019).

İmmünoterapi yöntemlerinden birisi olan tümörlerde aşı kullanılarak aktif bağışıklık tedavisi pek çok yönden avantaj sağlamaktadır. Bu avantajlardan bazıları; bağışıklık sisteminin aktivasyonunu sağlamak, yalnızca hücresel değil aynı zamanda bağışıklık sisteminin humoral bileşenini de içerebilmek, doğuştan gelen bağışıklık sistemi ile etkileşimle adaptif immün sistemle sınırlı olmayan anti-tümör aktivitesine yol açmak ve diğer tümörle ilişkili ya da tümöre özgü antijenlere karşı bağışıklık tepkisinin aktivasyonunu sağlamak olarak sayılabilir (Costa et al., 2017). HER2 temelli aşılar son 20 yıldır büyük ilgi görmektedir; DNA, peptid ve protein aşıları gibi çeşitli HER2 hedefleme aşıları ile ilgili klinik araştırmalarda artış bulunmaktadır. Bununla birlikte, HER2 temelli aşıların klinik etkisi, oto immün tolerans, adjuvan ve benzeri etkenler yüzünden sınırlıdır (Tian et al., 2018).

Kanser aşılarında adjuvanların kullanımı oldukça önemlidir. Aşılarla adjuvanların eklenmesi, arzu edilen bağışıklık tepkilerini elde etmek için gereken antijen miktarını ve / veya aşı sayısını önemli ölçüde azaltabilir. Kanser antijenleri ile ilgili olarak, zayıf antijenlere karşı istenen bağışıklık tepkisini arttırmak için adjuvanlar gereklidir (Dubensky and Reed, 2010).

Saponinler, immünomodülatör, antitümör, antienflamatuar, antiviral, antifungal, hipoglisemik, hipokolesterolemik etkiler gibi birçok farklı biyolojik ve farmakolojik etki gösteren doğal steroidler ya da triterpen glikozitler olarak tanımlanabilir (Liu and Henkel, 2012). Saponinler proinflamatuar Th1 / Th2 veya

antienflamatuar Th2 bağışıklıklarını indükleyebilir (Marciani, 2018). Günümüzde aşı çalışmalarında en çok dikkat çeken ve yaygın kullanılan saponin adjuvanı olan QS-21 çeşitli kanser aşı denemelerinde kullanılmaktadır (Gin and Slovin, 2011). Saflaştırılmış bir saponin fraksiyonu olan QS-21, saponin bazlı adjuvanlar açısından “altın standart” molekül olarak kabul edilmektedir, Th1'i uyarlama kabiliyeti nedeniyle kanserlere ve hücre içi patojenlere karşı klinik çalışmalarda değerlendirilmektedir (Cibulski et al., 2018).

Grubumuzun daha önceki çalışmalarında *Cephalaria Spp.* türlerinden elde edilen saponinlerin hemolitik, sitotoksik ve immünomodülatör aktivitelerini belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmıştır (Sarıkahya et al., 2018; Top et al., 2017). Bu yüksek lisans tez çalışmasında da grubumuzun önceki çalışmalarının ışığında ülkemiz endemik *Cephalaria spp.* türlerinden elde edilmiş olan Aristatoside B., Scoposide A., Scoposide B., Elmalienoside A., Balansoide B. saponinlerinin peptid bazlı meme kanseri aşı formülasyonunda adjuvan olarak kullanım potansiyelleri *in vitro* olarak PMA + iyonominisin ile indüklenen tam kan kültüründe sitokin (IL-1 β , IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α) düzeylerindeki değişim ELISA ile analiz edilerek Her2/Neu peptidine karşı immün yanıt oluşturma potansiyeli araştırılmıştır.

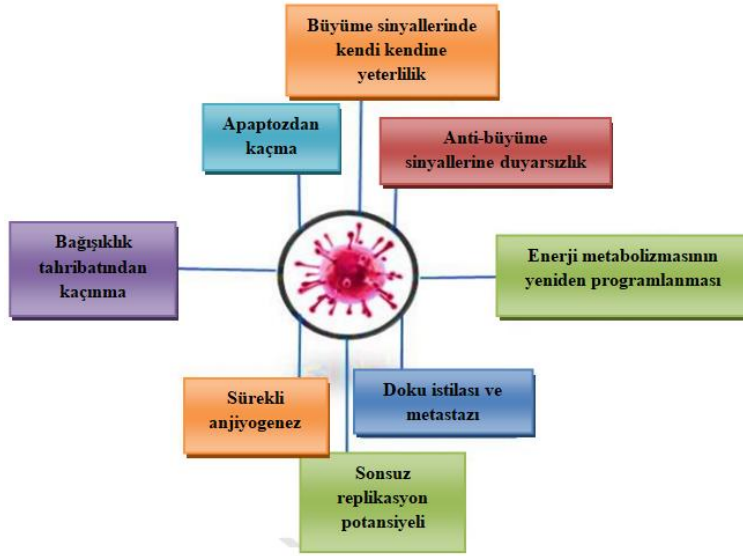
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, dünya çapında büyük bir nüfusun sağlığını etkileyen en karmaşık hastalıklardan biridir. Kanser ismi Latince yengeç anlamına gelen 'cancrum' teriminden kaynaklanır. Bu terim tümörün etrafındaki şişmiş damarlara atıfta bulunarak tutunmayı ve asla bırakmamayı gösteren yengeç uzuvlarına benzetilmektedir. Kanser, tümör olarak adlandırılan kitlelerin gelişmesine yol açan vücuttaki hücrelerin anormal büyümesi ile karakterize farklı kanser hastalıklarının bütünüdür. İki ana tümör kategorisi iyi huylu ve kötü huylu tümörlerdir. İyi huylu tümörler, çevreleyen dokuyu istila etmeyen yavaş büyüyen kitlelerdir. Lokalize kaldıkları için ameliyatla kolayca çıkarılabildikleri için daha az zararlıdır. Öte yandan, bitişik dokuları yok etme potansiyeline sahip malign tümörler invazivdir (Korgaonkar & Yadav, 2019).

Kanser hücre genotiplerinin geniş kataloğu, hücre fizyolojisinde malign büyümeyi kolektif olarak dikte eden altı temel değişikliğin bir sonucudur. Bu değişiklikler; büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, büyüme inhibitör sinyallerine duyarsızlık, programlanmış hücre ölümünden kaçış, sınırsız replikasyon potansiyeli, sürekli anjiyogenez, doku invazyonu ve metastazı olarak sayılabilir (Hanahan & Weinberg, 2000).

Kanser, hücre proliferasyonu, farklılaşması, transkripsiyon ve gen ifadeleri gibi hücresel süreçleri değiştiren genlerde birbirini izleyen mutasyonların ilerlemesi ile ortaya çıkar. Kanser hücreleri kendi kendine yeterlilik derecesi kazanır ve bu da kontrolsüz büyüme ve bölünmeye neden olur. Kanser hücre genomunda hücre bölünmesi ve duraklama fazı arasındaki dengeyi yok eden mutasyonların hastalığı olarak kabul edilir. DNA ilerlemesindeki değişiklikler, hızlı proliferasyon yoluyla mutasyonlara yol açar ve ardından ikinci bir mutasyon, mutasyonların başarılı olmasına ve bu hücrelerde tümörlü büyümeye yol açar ve bu nedenle bu mutasyonlar membranları parçalayan malign tümörlerle sonuçlanır ve metastaza neden olur (Korgaonkar and Yadav, 2019). Kanserli hücrelerin sahip olduğu başlıca özellikler Şekil 2.1.'de özetlenmiştir.



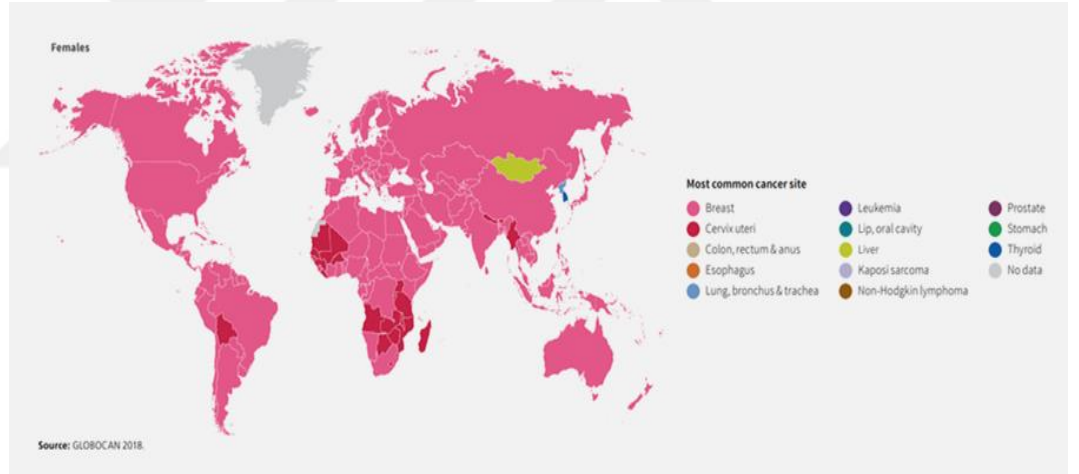
Şekil 2. 1.Kanserin başlıca özellikleri (Korgaonkar and Yadav, 2019)

Dünya çapında her 6 ölümden 1'nin sebebi kanserdir (AIDS, tüberküloz ve sıtmadan daha fazla) ve dünyada kardiyovasküler hastalıkları takiben ikinci önde gelen ölüm nedenidir. 2020 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 1.806.590 yeni kanser vakası ve 606.520 kanser ölümü gerçekleşeceği düşünülmektedir. Ayrıca 2040 yılına kadar, nüfus artışına ve yaşlanmasına bağlı olarak dünya genelinde 27.5 milyon yeni kanser vakasına ve 16.3 milyon kanser ölümüne ulaşılması beklenmektedir (American Cancer Society, 2018; Siegel et al., 2020)

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, memedeki malign hücrelerin varlığından kaynaklanır. Kanser hücreleri, anormal büyümeye (in situ karsinom) ve normal dokuları lokal olarak istila etme yeteneğine (invaziv kanser) yol açan kontrolsüz bölünme ile karakterize edilir. Memenin glandüler veya duktal ünitelerinin dahil olup olmadığını belirlemek patologların meme kanserini alt sınıfa ayırmasını sağlar (Chopra and Davies, 2019). Birincil tümör memede başlar, ancak invaziv hale geldiğinde bölgesel (aksiller / iç meme) lenf düğümlerine ilerleyebilir; daha sonra metastaz yapma yeteneğine sahip olur. Sistemik tutulumun en yaygın bölgeleri akciğer, kemikler, karaciğer, deri ve yumuşak dokudur. Kanser içeren bölgesel lenf nodlarının varlığı ve sayısı, kanserin metastaz yapıp yapmadığının en iyi göstergesi olarak görülür (Chopra and Davies, 2019).

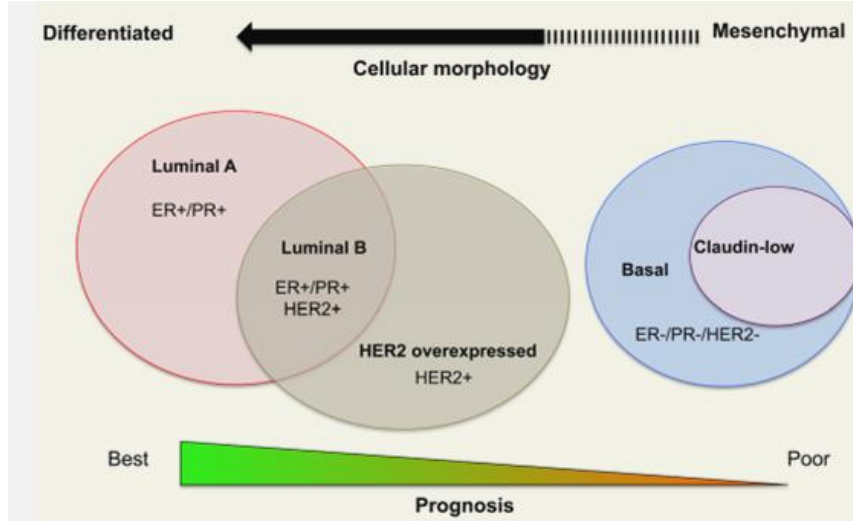
Meme kanseri kadınlar arasında en yaygın kanser türüdür. Dünya çapında yıllık yaklaşık 500.000 ölüm meme kanserine atfedilmektedir ve her 8 ila 10 kadından birinde meme kanseri gelişmektedir (Fang et al., 2020). Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelere meme kanserli hastaların sağkalım oranları önemli ölçüde değişmektedir. Gelişmiş ülkelere meme kanseri hastalarının 5 yıllık sağkalım oranı %80 kadar yüksek olabilir. Ancak bunun aksine, gelişmekte olan ülkelere meme kanserli hastaların 5 yıllık sağkalım oranı, istatistiksel verilere göre % 40'ın altındadır (Fang et al., 2020). Yapılan istatistiksel çalışmalar küresel meme kanseri insidansının aşağı yönlü bir eğilim göstermediğini ortaya koymaktadır. 2021 yılına kadar meme kanseri oranının 100.000 kadın başına 85 vaka artacağı tahmin edilmektedir (Fang et al., 2020). Çok sayıda meme kanseri tedavisi olmasına rağmen, radyoterapi, kemoterapi ve hormon tedavisi gibi geleneksel tedavilerin etkinliği, tedaviye direnç nedeniyle sınırlıdır (Xu et al., 2019). Bu nedenle, yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Dünyada kadınlar arasında en yaygın olarak görülmekte olan kanser türlerinin ülkelere göre dağılımı aşağıda gösterilmiştir (Şekil 2.2.).



Şekil 2. 2.Dünya'da kadınlar arasındaki en yaygın kanser türleri dağılımı (American Cancer Society, 2018).

2.3. Meme Kanserinin Alt Tipleri

Meme kanseri prognozla da ilişkili olacak şekilde beş moleküler alt tipte gruplandırılabilir. Bu gruplar; Luminal A, Luminal B, Bazal Benzeri, Claudin-low ve HER2 pozitif meme kanseri olacak şekildedir (Eroles et al., 2012). Bu alt tiplerin şematize edilmiş hali şekilde gösterilmiştir (Şekil 2.3.).



Şekil 2. 3. Meme kanseri alt tiplerinin şematik gösterimi (Heng et al., 2015).

2.3.1. Luminal A Meme Kanseri

Luminal A meme kanseri, toplamın %50-60'ını temsil eden en yaygın alt tiptir. Tipik olarak, meme kanallarını kaplayan luminal epitelyumda eksprese edilen ER transkripsiyon faktörü tarafından aktive edilen genlerin ekspresyonu ile karakterize edilir. Aynı zamanda hücre çoğalması ile ilgili düşük bir gen ifadesi sunar. Luminal A immünohistokimya (IHC) profili ER, PGR, Bcl-2 ve sitokeratin CK8 / 18'in ekspresyonu, HER2 ekspresyonunun yokluğu, Ki67 ile ölçülen düşük bir proliferasyon hızı ve düşük histolojik seviye ile karakterize edilir (Eroles et al., 2012). Pek çok luminal-A tümörü tamoksifen gibi endokrin tedavilerine oldukça duyarlı olmasına rağmen, önemli bir kısmı içsel ve / veya edinilmiş dirence sahiptir (Poudel et al., 2019). Diğer alt tiplere kıyasla, daha düşük relaps oranı ve bu relaps zamanına bağlı olarak daha uzun sağkalıma sahiptir (Caddeo et al., 2013).

2.3.2. Luminal B Meme Kanseri

Luminal B moleküler profiline sahip tümörler tüm meme kanserlerinin %10 ila % 20'sini oluşturur. Luminal A'ya göre daha agresif bir fenotip, daha yüksek histolojik derece ve proliferatif indeks ve daha kötü prognoza sahiptirler. Luminal A ve B her ikisi de ER'yi eksprese eder. İki alt tip arasındaki temel biyolojik farklılık, luminal B alt tipinde MKI67 ve siklin B1 gibi proliferasyon genlerinin ekspresyonundaki artıştır (Eroles et al., 2012). Moleküler düzeyde, luminal B kanserleri, gen ekspresyonu, gen kopyası, somatik mutasyon ve DNA metilasyon

seviyelerinde luminal A kanserlerinden dramatik olarak farklı görünür; luminal B kanserleri ayrıca luminal A kanserleriyle kıyaslandığında daha fazla genetik ve genomik olarak değişim gösterir (Creighton, 2012). Ek olarak, TP53 yolu luminal A'da korunur, ancak luminal B alt tipinde sıklıkla inaktive edilir. Ayrıca Luminal B tümörleri de ER1 olmasına rağmen, önemli bir oranda antiöstrojen tedavisine cevap vermez, bunun yerine kemoterapiye daha fazla yanıt verirler (Cadoo et al., 2013).

2.3.3. Bazal Benzeri Meme Kanseri

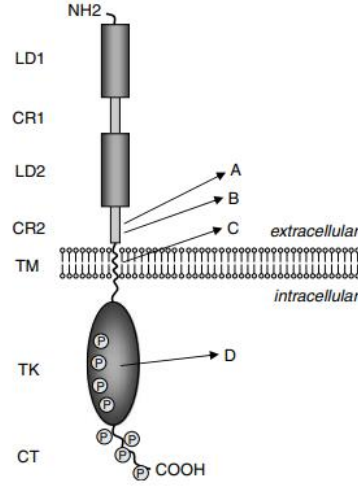
Bazal benzeri meme kanseri (BLBC), meme kanserlerinin yaklaşık %15'ini temsil eden agresif bir moleküler alt tiptir. Daha genç hastalarda görülür ve tipik olarak lokal bölgesel ve uzak metastazın hızlı gelişimini gösterir, bu da nispeten yüksek mortalite oranıyla sonuçlanır. Tanımlayıcı özellikleri, bazal sitokeratinler ve epidermal büyüme faktörü reseptörü ve / veya c-Kit için pozitif olmasıdır. Sorunlu olarak, östrojen reseptörü ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) için negatiftir, bu da hormon terapisi veya hedefli HER2 tedavisi için uygun olmadığı anlamına gelir (Alexandrou et al., 2019). BRCA1, DNA onarımında kritiktir ve bazal benzeri meme kanserinde bu genin inaktivasyonu, tümörlerin büyümesini destekleyen hataların ve genetik kararsızlığın artışına yol açar (Eroles et al., 2012).

2.3.4. Claudin-low Meme Kanseri

Claudin-low meme tümörlerinin çoğunlukla östrojen reseptörü (ER)-negatif, progesteron reseptörü (PR) -negatif ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) -negatif (üçlü negatif) olduğu ve zayıf prognozla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Fougner et al., 2020). Claudin-low tümörler tüm meme kanserlerinin %7 ila % 14'ünü oluşturur ve claudin ve E-cadherin dahil olmak üzere hücre-hücre yapışmasına katılan genlerin düşük ekspresyonuna sahiptir. Bu tümörler metaplastik ve medüller farklılaşmaya sahiptir ve baskın olarak triple negatif olarak bulunurlar. Bununla birlikte, claudin-low meme kanserlerinin % 15'inde ER eksprese edilmesi ve % 15'inde HER2'nun aşırı eksprese edilmesi ile triple negatif özellikleri ile uyumsuzdur (Cadoo et al., 2013).

2.3.5. HER2 Pozitif Meme Kanseri

HER2 pozitif olarak da adlandırılan meme kanseri tür, reseptör tirozin kinaz (RTK) insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2'nin (HER2) aşırı ekspresyonunu veya HER2 geninin amplifikasyonu içerir ve tüm meme kanserleri içerisinde %15-20'lik bir kısmı oluşturur (Vernieri et al., 2019). İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2 / ErbB-2), birçok insan malignitesinin patogeneğinde ve ilerlemesinde rol oynayan tümörle ilişkili bir antijendir. Birçok araştırma, artan HER2 ekspresyonunun sadece insan kanserlerinin gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunmadığını, aynı zamanda kemoterapiye, hormon tedavisine ve radyoterapiye dirençle de ilgili olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, HER2 gen ekspresyonunu bastırmayı veya fonksiyonunu bloke etmeyi amaçlayan moleküler stratejiler, insan kanserlerinin tedavisinde oldukça dikkat çekicidir (W. Zhang et al., 2018). Bu konuyla ilgili olarak, HER2 + meme kanseri için HER2'nun HER2'ya yönelik monoklonal antikorların (trastuzumab, pertuzumab ve TDM-1) tek başına veya kemoterapi ile kombinasyon halinde kullanılmasında pasif bağışıklık tedavisine yönelik bir hedef olarak kullanımının klinik yararına dair çok sayıda kanıt vardır (Costa et al., 2017). HER2'nun kanser hücrelerinde seçici olarak aşırı eksprese edilmesi ve hücre dışı, hücre içi alanları hedefleyen antikorlar tarafından etkili bir şekilde baskılanabilmesi onu kanser aşılı için iyi bir aday haline getirmiştir. Aşılar antikorların pasif uygulanmasına kıyasla, bir anti-tümör yanıtı oluşturmak için konağın kendi bağışıklık sistemini aktive etmenin avantajını sunar. Etkili bir HER-2 aşısı geliştirmek için hayvan çalışmalarında ve klinik çalışmalarda farklı peptid ve / veya protein aşısı yaklaşımları ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (Renold and Leach, 2007). HER2/neu protein yapısı aşağıdaki şekilde gösterilmiştir. Etki alanı yapısı solda iki ligand bağlayıcı bölge (LD1 ve LD2), iki sistein bakımından zengin bölge (CR1 ve CR2), kısa bir transmembran alanı (TM), bir katalitik tirozin kinaz alanı (TK) ve bir karboksi terminal kuyruğunda (CT) oluşur. TK ve BT alanları içinde yer çok sayıda tirozin fosforilasyon alanı daire içine alınmış P ile gösterilmiştir. (a) MMTV-neu farelerinde ortaya çıkan tümörlerde bulunan somatik mutasyonların yeri (b) Doğal olarak oluşan insan DHER2 izoformunda 48 bp delesyonun yeri (c) Başlangıçta bir sıçan kanserojen kaynaklı tümör modelinde keşfedilen ve daha sonra sayısız in vitro ve transgenik deneysel modelde kullanılan nöt onkogenindeki mutasyon yeri (d) İnsan akciğer kanserlerinin nadir vakalarında bulunan mutasyonların yerini göstermektedir (Moasser, 2007).



Şekil 2. 4. HER2 neu ptoein yapısı (Moasser, 2007)

2.4. Meme Kanserinde İmmun Sistem ve İmmunoterapi

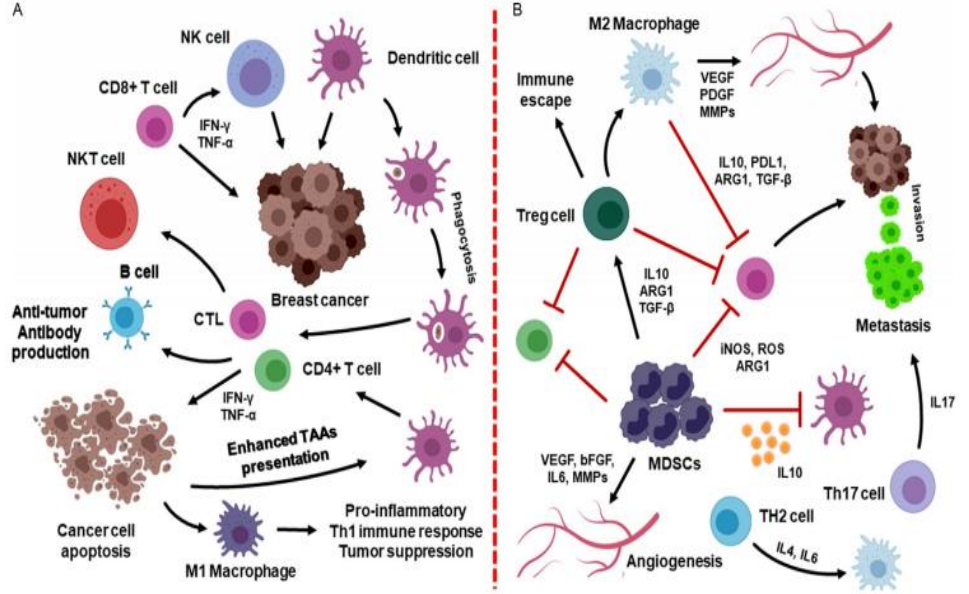
Kanser gelişimi, tümör hücreleri ile bağışıklık sisteminin elemanları arasındaki sürekli ve dinamik etkileşimi koordine etmek için sinyal yollarını tetikleyen genetik faktörlerden ve hücre dışı uyaranlardan etkilenen karmaşık bir süreçtir. 20 yılı aşkın bir süredir, kanser ilerlemesini kontrol eden bağışıklık mekanizmaları yoğun araştırmaların odak noktası olmuştur. Bağışıklık sisteminin, immünojenik tümör varyantlarını yok ederek koruyucu antitümör bağışıklığı taşıdığı, ayrıca "immüno-düzenleme" adı verilen bir işlemde tümör immünojenikliğini şekillendirerek tümör ilerlemesini kolaylaştırdığı iyi bilinmektedir. Ayrıca, bağışıklık rehberli tümör düzenlemesi, bağışıklık sürveyansından tümör kaçırma ile ilişkilidir ve buna bağlı olarak endojen antitümör bağışıklığının güçlendirilmesi kanser terapileri bağlamında istenen bir amaçtır (Baxevanis et al., 2019). Kanseri tedavi etmek için bağışıklık sistemini kullanmak için iki mevcut strateji, anahtar T hücresi inhibitör kontrol noktalarını modüle eden ilaçları ve aşılardan oluşur. Spesifik olarak, modern bağışıklık tedavisi stratejileri, bağışıklık sistemini tümörle ilişkili spesifik antijenlere karşı hazırlayarak, bağışıklık düzenleyici sinyalleri modüle ederek veya her ikisini birden yaparak T hücresi aracılı tümör regresyonunu kolaylaştırabilir (Sanchez et al., 2016). Kanser tedavisinde immunoterapi kullanımının avantajları ve dezavantajları Tablo 2.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 2. 1.Kanser tedavisinde immünoterapinin avantajları ve dezavantajları (Tan et al., 2020)

İmmünoterapinin Avantajları	İmmünoterapinin Dezavantajları
Tedavi etkisi yüksektir ve uzun süreli sağkalım oranı önemli ölçüde iyileşir.	Yüksek seçicilik vardır. İmmün baskılayıcı tümörlerde immünoterapinin etkisi zayıftır.
Yüksek doğruluk ve özgüllük sağlar.	Bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin kullanımı negatif düzenleme üreterek otoimmün hastalıklara ve hatta ölüme neden olabilir.
İmmünoterapi uzun süre etkilidir.	Bazı hastalarda kullanımdan sonra çeşitli spesifik olmayan toksik etkiler ve yan etkiler ortaya çıkabilir.
Geniş uyarlanabilirliğe sahiptir. Tedavi birden fazla tümörü kontrol edebilir ve öldürebilir.	İmmünoterapinin etkisi birçok faktörden etkilenir. Hastaların prognozu belirsizdir.
Kalıcıdır. Tedavi, bağışıklık fonksiyonunu eski haline getirmek ve tümör hücrelerini uzun süre öldürmek için vücudun bağışıklık sistemini etkinleştirir.	Tedavi maliyetleri yüksektir.
Kapsamlıdır. Vücudun bağışıklık fonksiyonunu restore edebilir ve iyileştirebilir, tümör hücrelerini tam olarak tanımlayabilir, arayabilir ve öldürebilir. Tümör nüksünü ve metastazını etkili bir şekilde önleyebilir.	
Kalıntı tümör hücrelerini ve mikroskopik lezyonları vücuttan iyice çıkartabilir.	
Yan etkileri geleneksel tedavilere göre daha azdır.	

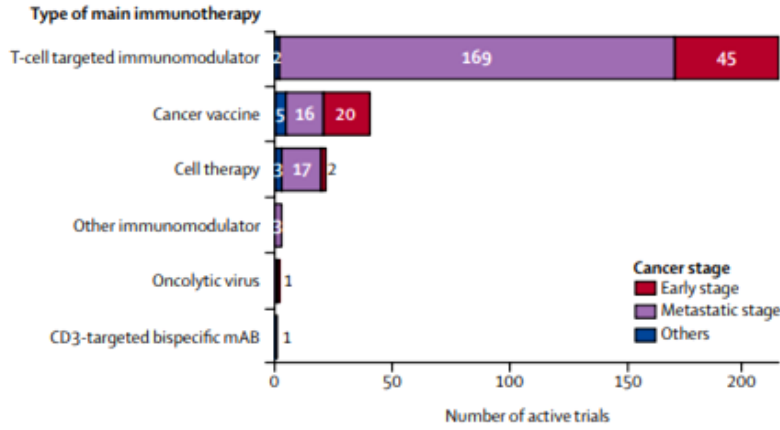
Kanser immünoterapisi pasif veya aktif immünoterapiyi içerir. Pasif immünoterapi, mAb, lenfositler veya mevcut anti-tümör yanıtını arttıran sitokinler gibi ajanların uygulanmasıdır; aktif immünoterapi, aşılama, spesifik olmayan immünomodülasyon veya spesifik antijen reseptörlerini hedefleme yoluyla tümör hücrelerine saldırmak için kendi kendine bağışıklık sistemini uyarmaya çalışır (Zhang and Chen, 2018).

Meme kanserinde en iyi karakterize edilen bağışıklık kaçırma mekanizmaları; inhibitör ko-uyarıcı moleküllerin (PD-L1, CTLA4, LAG-3) ekspresyonu, değiştirilmiş DC olgunlaşması, mikro ortamda baskılayıcı hücre popülasyonlarının (MDSC'ler, Treg'ler ve TAM'lar) infiltrasyonu, baskılayıcı faktörlerin varlığı (örneğin, IL-10, TGF- γ , IDO), NK hücresi aracılı lizisin önlenmesidir (Basu et al., 2019).



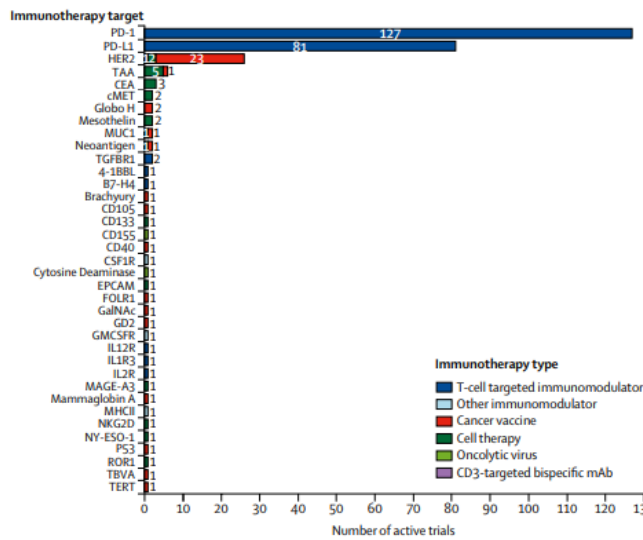
Şekil 2. 5. Meme kanserinde uyarıcı ve inhibe edici immün hücre popülasyonlarının anti-tümör immün yanıtının düzenlenmesine etkisi (Basu et al., 2019)

Şekilde de görüldüğü gibi geniş bir immün hücre spektrumu (B hücreleri, T hücreleri, NK ve NKT hücreleri ve DC'ler), birden fazla mekanizma yoluyla anti-tümör immün tepkisini indükler. NK ve NKT hücrelerinin doğrudan alınması tümör hücrelerinde apoptozu indükler. Hücre ölümü nedeniyle üretilen tümör döküntüleri fagositozlanır ve DC'ler tarafından T hücrelerine antijen sunumu için işlenir, bu da IFN- γ tarafından CD4 + Th1 bağışıklık tepkisine ve daha sonra tümörde CD8 + CTL aktivitesinin aktivasyonuna yol açar. Eşzamanlı olarak, artan tümörle ilişkili antijenler (TAA'lar) sunumu, M1 makrofaj aktivitesini artırır, anti-tümör immün yanıtını düzenler (Şekil 2.4-A). Karmaşık bir bağışıklık baskılayıcı mekanizmalar ağı, meme kanserinde bağışıklık kaçırma ve immüno-düzenlemeyi kolaylaştırır. Tregler, MDSC'ler, Th17 hücreleri ve düzenleyici DCler gibi inhibitör hücreler, tümör mikro çevresindeki efektör T hücresi fonksiyonunu baskılar. MDSC'lerden VEGF, IL-6 ve MMP'ler gibi inhibitör faktörlerin salgılanması protumörjenik anjiyogenezi artırır. MDSC'ler, DC olgunlaşmasını ve fonksiyonunu inhibe etmek ve Treg bolluğunu ve aktivitesini desteklemek için arginaz (Arg-1), IL-10 ve TGF- β salgılar. PD-1, LAG-3, TIM-3 gibi inhibe edici kostimülatör reseptörler ve bunların ortak yanıt veren ligandları, meme tümör hücreleri üzerinde aşırı eksprese edilir, bu da T hücresi anerjisine, T hücresi proliferasyonu kaybına ve bağışıklık toleransına yol açar (Şekil 2.4-B).



Şekil 2. 6.Meme kanserinde yapılan immünoterapi çalışmalarının kategorisine göre kanser aşamasına bağlı dağılımı (Esteva et al., 2019)

Meme kanserine yönelik yapılan immünoterapi çalışmaları göz önüne alındığında (Şekil 2.5) en fazla çalışmanın olduğu T hücrelerini hedefleyen immunomodülatör çalışmalar en üst sırada yer almakta ve bunun da büyük bir çoğunluğunu metastatik düzeydeki meme kanserlerinde yapılan çalışmalar oluşturmaktadır. Onu ise kanser aşılı ve hücre terapisi yöntemleri izlemektedir. Kanser aşılılarıyla yapılan immünoterapide ise erken aşama meme kanserleriyle çalışmalar daha fazladır.



Şekil 2. 7.Meme kanserinde yapılan tüm immünoterapi çalışmalarının bağışıklık hedefleri (Esteva et al., 2019)

Meme kanserine yapılan immünoterapi çalışmalarının bağışıklık hedefleri göz önüne alındığında en üst sırada T hücre hedefli terapi hedefleri olan PD-1 ve PD-L1 yer almaktadır. Bunları ise kanser aşılı için bağışıklık hedefi olan HER2 izlemektedir.

2.5. Meme Kanseri ve Sitokinler

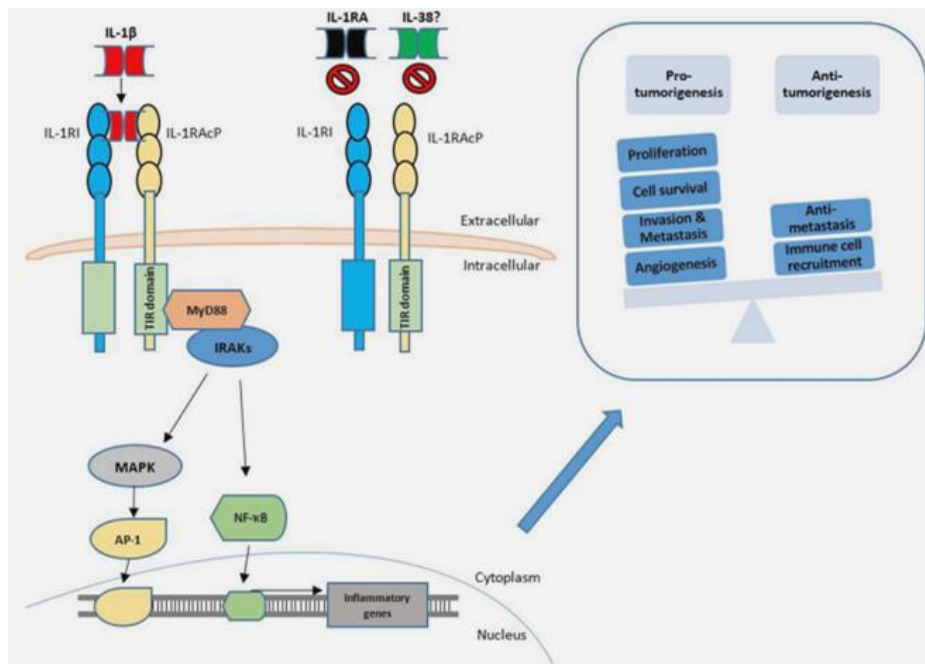
Sitokinler, bağışıklık sisteminde hücreler arası iletişime aracılık eden oldukça indüklenebilir, salgılayıcı proteinlerdir. Tümör nekroz faktörleri, interlökinler, interferonlar ve koloni uyarıcı faktörler olarak adlandırılan çeşitli protein ailelerine gruplandırılırlar. Sitokinler, enflamatuvar tümör mikro çevresini düzenlerler (Esquivel-Velázquez et al., 2015). Sitokinlerin etki şekli ve oluşan biyolojik tepki; konsantrasyonlarına, lokalizasyonlarına ve hedef hücrelerin tipine bağlıdır. Sitokinlerin yabancı tehditlere veya iltihaplanmaya karşı bağışıklık tepkileri indüklediği ve insan biyolojisi ve hastalıklarında önemli rol oynadığı düşünülmektedir. IFN γ , IL-2 ve TNF- β gibi sitokinler, tip 1 T yardımcı (Th1) hücreleri tarafından üretilir, makrofajları aktive eder. IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13, tip 2 Th (Th2) hücreleri tarafından üretilir ve makrofaj fonksiyonlarını inhibe eder. Kanser hücreleri konakçı ile öncelikle sitokinler aracılığıyla iletişim kurar ve bu iletişim sistemini tümör mikro çevresini şekillendirmek ve tümör yayılımı, motilite ve invazyonu kolaylaştırarak metastazı teşvik etmek için kullanırlar (King et al., 2017). Aşağıdaki tabloda sitokinlerin bir grubu olan intörlökinlerin farklı üyelerinin meme kanseri üzerindeki etkileri özetlenmiştir (Tablo 2.2.).

Tablo 2. 2.Meme kanserinde yer alan interlökinlerin ana işlevleri ve kaynakları (Fasoulakis et al., 2018)

İnterlökin	Kaynaklandığı Hücre	Meme Kanserindeki Ana İşlevi
IL-1	Epitel hücreleri, endotel hücreleri nötrofiller, mononükleer fagositler	Proinflamatuvar sitokin; Th17 hücrelerinin indüksiyonu
IL-2	Th1 hücreleri	İmmünoregülatör sitokin; NK hücrelerini ve monositleri aktive eder, B ve T lenfositleri için ana büyüme faktörü
IL-4	Th2 hücreleri, mast hücreleri, bazofiller	Paraziter enfeksiyonların kontrolü, IL-1'in inhibisyonu ile antienflamatuvar etki, monositler ile TNF ve IL-6 üretimi; Th17 yolunun inhibisyonu, antikor aracılı bağışıklık
IL-6	Makrofajlar, T hücreleri, fibroblastlar	Doku invazyonunu / epitelyaldan mezenkimal geçişi destekler, akut faz proteinlerinin indüksiyonu, B hücreleri üzerindeki etkiler, Th17 hücrelerinin indüksiyonu
IL-7	Stromal hücreler, timüs	Tip 1 bağışıklık tepkisini indükler; CD8 + spesifik sitotoksiteyi artırır; NK ve LAK hücrelerini indükler
IL-8	Makrofajlar, nötrofiller, endotel hücreleri, fibroblastlar	Nötrofil aktivatörü
IL-10	B hücreleri, T hücreleri, monositler	Anjiyogenez ve doku invazyonunu destekler. Büyüme ve metastaz süspansiyon mekanizmalarını engeller.
IL-11	Fibroblastlar, kemik iliğinin stromal hücreleri	Hematopoetik büyüme faktörü; Trombopoezi ve kemik iliği hücrelerinin büyümesini ve farklılaşmasını (makrofajlara dönüşen) uyarır.
IL-13	Th2 hücreleri, CD8 + T hücreleri, mast hücreleri; eozinofiller, bazofil	Proenflamatuvar sitokinleri inhibe eder; Makrofaj işlevini modüle eder; Aktif endotel yüzeyleri ile etkileşimi azaltır
IL-17	Th17 hücreleri	Hücre dışı patojenlerin kontrolü, TNF ve interlökin-1 ile sinerji, proinflamatuvar sitokin, matris yıkımının indüksiyonu
IL-19	B hücreleri, monositler	Büyüme, proliferasyon ve kanser ilerlemesini artırır.
IL-21	Th17 hücreleri	Otokrin tarzda Th17 yolunun amplifikasyonu
IL-23	M1 dendritik hücreler, Th1 hücreleri, monositler	Enflamasyonu artırır, Th17 stabilizasyonu
IL-32	Keratinler	Proinflamatuvar sitokin
IL-33	Th2 hücreleri; Mast hücreleri	Miyeloid türevi baskılayıcı hücrelerin apoptozunu azaltır.

2.5.1. IL-1 β

IL-1 β , TLR aracılı proenflamatuar süreçlerde önemli bir katılımcıdır ve çok sayıda otoimmün hastalıkta yer alır. Esas olarak miyeloid hücreler tarafından üretilir ve hedef hücrelerde geniş spektrumlu enflamatuar yanıtları tetikler. IL-1 β , kaspaz 1 tarafından biyolojik olarak aktif forma ayrılan aktif olmayan bir öncü (pro-IL-1 β) olarak sentezlenir (Patra et al., 2019). IL-1 β , esas olarak NF- κ B aktivasyonuna bağlı olarak kanser hücreleri immün kaçış kabiliyetini artırır. IL-1 β ayrıca antiapoptotik proteinin (BIRC3) yukarı regülasyonuna bağlı olarak meme kanserinin doksorubisine karşı olan direncini artırır (Tan and Hu, 2018). IL-1 sinyali yolu, IL-1 α veya IL-1 β 'nin IL-1RI'ya bağlanması yoluyla aktive edilir. Bunu, IL-1RI'nın IL-1RAcP ile dimerizasyonu takip eder. Bu etkileşim IL-1RA ve IL-38 tarafından rekabetçi bir şekilde inhibe edilebilir. Agonist bağlanmasını, NF- κ B ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktive edilmesiyle daha fazla sinyalleme ara maddesinin bağlanması izler. Enflamatuar genlerin transkripsiyonu yukarı regüle edilir, bu da pro-tümörjenik veya anti-tümörjenik fenotiplere neden olabilir (Şekil 2.7). IL-1 β 'nin yukarı regülasyonu pek çok farklı kanserler çeşidinde hücre invazyonu, epitel mezenkimal geçiş (EMT) ve metastaz ile ilişkili agresif tümör biyolojisini tetikler (Jeon et al., 2016). Çoğu çalışmada IL-1 β 'nin pro-tümörjenik etkilerinden bahsedilse de farklı bir çalışmada lenf nodu pozitif meme kanseri olan hastalarda yüksek primer tümör IL-1 β ekspresyonunun olduğunu genel sağkalım ve uzak metastazsız sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Baker et al., 2019).



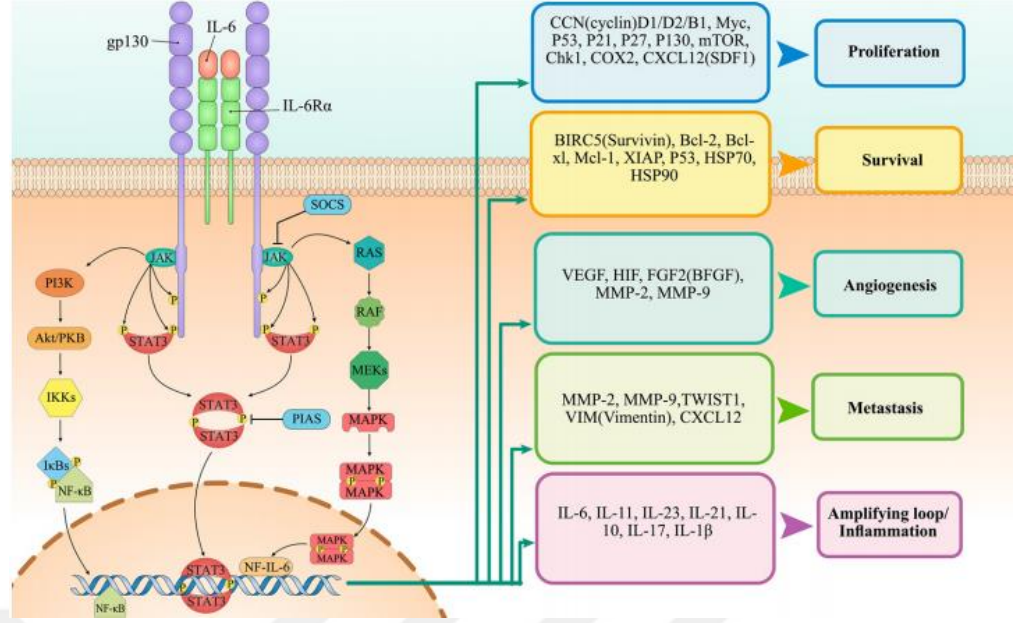
Şekil 2. 8. IL-1 β sinyalizasyonunun kanserdeki fonksiyonları (Baker et al., 2019)

2.5.2. IL-4

IL-4, Th2 farklılaşmasında önemli bir rol oynar ve immünoglobulin tiplerini değiştirerek B hücresi aktivitelerini düzenler (Patra et al., 2019). IL-4, Treglerin apoptozunun baskılanması yoluyla hayatta kalmasını kısmen uzatır, granüler enzimlerin ekspresyonunu artırır, NK hücrelerinin proliferasyonunu ve Treg aracılı immüno-supresyonu destekleyen T hücreleri tarafından IFN- γ üretimini inhibe eder (Wu et al., 2020). IL-4, CD4 T hücrelerinin Th2 fenotipine polarizasyonunda rol oynar. IL-4'ün, IgE'ye geçiş ve Th2 hücrelerinin üretimi olarak anlaşılan Th2 yanıtlarını kontrol etmek için kritik olarak gerekli olduğu bildirilmiştir. IL - 4 ve T-hücre reseptörü (TCR) aktivasyonu tek başına in vitro Th2 hücrelerinin üretimini teşvik edebilir (Chu et al., 2014).

2.5.3. IL-6

Pro-enflamatuar sitokin IL-6, istilacı patojenlere karşı immün yanıtın önemli bir aracısıdır, ancak neoplastik hastalıkta IL-6, dönüştürülmüş hücrelerin hayatta kalmasını artırarak pro-tümörjenik bir rol oynayabilir. Bu haliyle, artmış IL-6 seviyeleri, daha gelişmiş tümörlerin ayırt edilmesinde bir biyobelirteç olarak işlev görebilmektedir. IL-6, yüksek tümör oluşumuna ve belirli bir tümör içinde bulunan çeşitli hücre tiplerine yol açma yeteneğine sahip bir hücre havuzu oluşturabilir (Basu et al., 2019). IL-6 ve IL-6Ra, meme tümör invazyonunu ve metastazını teşvik eder (Baxevanis et al., 2019). Bazı çalışmalar, tümör sınırlayıcı T hücrelerini tümör mikroçevresinde harekete geçiren IL-6'nın antitümör rolünü göstermektedir. IL-6, tümör dokularındaki lenfosit sayısını, hayatta kalma ve çoğalmalarını arttırarak düzenleyebilir. Bununla birlikte, IL-6 genel olarak bir tümör mikroçevresinde kötü niyetli bir aktör olarak kabul edilir. Yapılan çalışmalarda TLR7 tarafından IL-6 üretimindeki artışın, insan miyelom hücrelerinde tümör hücresi sağkalımını arttırdığı bildirilmiştir (Patra et al., 2019). Yapılan çalışmalar ayrıca IL-6'nın CCAAT / arttırıcı bağlayıcı protein (C / EBP) bağlanma aktivitesini arttırarak ilaç direnci sağladığını ve çoklu ilaç direnci-1 (MDR1) geni gibi genlerin yukarı regülasyonuna yol açtığını ortaya koymuştur. Meme kanseri hücrelerinde IL-6 aktivasyonu, özellikle NF- κ B indüksiyonu ve fokal adezyon kinaz (Fak) fosforilasyonuna bağlı radyo-direnç kazanımı ile ilgilidir (Tan and Hu, 2018).

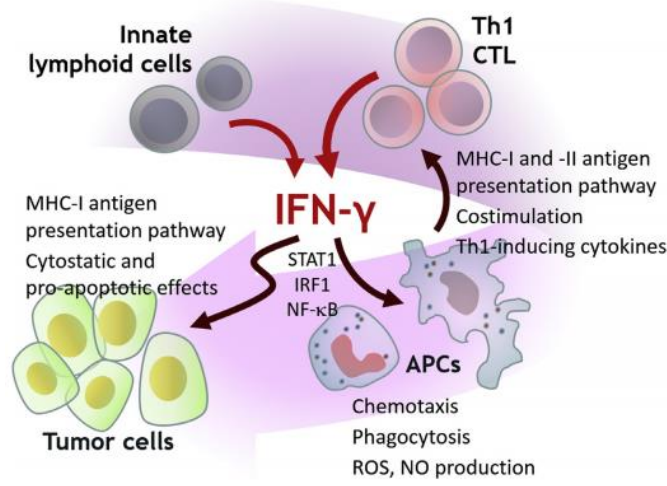


Şekil 2. 9.IL-6'nın tümör gelişimindeki rolü (Masjedi et al., 2018)

IL-6'nın kanser hücreleri üzerindeki reseptörü ile ligasyonu, hayatta kalma, çoğalma, istila, yer değiştirme ve anjiyogenez ile ilgili moleküllerin ekspresyonuna yol açan JAK / STAT3, PI3K / AKT ve Ras / MAPK dahil olmak üzere çeşitli tümör destekleyici yollar indükleyebilir (Masjedi et al., 2018). IL-6'nın tümör gelişimi üzerindeki rolünün yolları Şekil 2.8.'de gösterilmiştir.

2.5.4. IFN- γ

IFN- γ , tip II interferon ailesinin bir üyesidir ve önemli immünomodülatör ve antiviral özelliklere sahiptir (Tecalco-cruz et al., 2019). IFN- γ 'nın Th1 yanıtı domine eden sitokin olduğu söylenebilir (Ike et al., 2005). HER2 + meme kanserinde (NCT03112590) IFN- γ 'nın paklitaksel, trastuzumab ve pertuzumab ile kombinasyonunu değerlendiren devam eden çalışmalar, tümörlere özgü antijenlere / onkodiferlere karşı Th1 bağışıklık tepkisinin artırılmasının meme kanserinde önemli terapötik fayda sağlayabileceği düşünülmektedir (King et al., 2017). IFN- γ ayrıca IL-12 salgılamak için antijen sunan hücreleri uyarır ve bu da T hücresi bağışıklık tepkilerini aktive eder ve sonunda tümör hücrelerini öldürür (Wu et al., 2020).



Şekil 2. 10. IFN- γ 'nin klasik anti-tümör etkileri (Kursunel and Esendagli, 2016)

IFN- γ üreten bağışıklık hücreleri, kanser hücrelerinin ortadan kaldırılmasındaki başlıca oyuncularlardır. Kanser hücrelerinin proliferasyonu ve hayatta kalması doğrudan azalırken, tümör antijenlerinin sunumu, temelde STATN ve IRF1 transkripsiyon faktörleri yoluyla IFN- γ 'ya maruz kaldığında artmıştır. APC'ler fonksiyonel olarak etkili hale gelir ve adaptif bağışıklığı anti-tümör bağışıklığının eliminasyon fazına entegre etmek için T hücreleri ile pozitif bir geri besleme döngüsü oluşturur (Kursunel and Esendagli, 2016) (Şekil 2.9.).

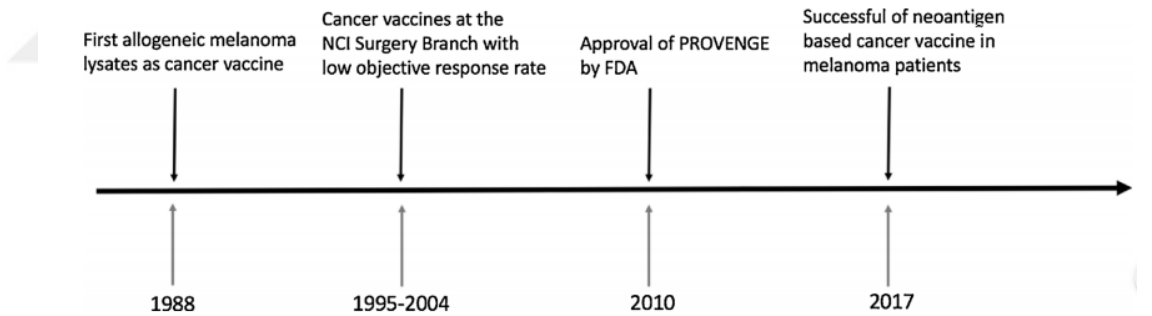
2.5.5. TNF- α

TNF- α , travma veya enfeksiyonlara yanıt olarak esas olarak makrofajlar ve DC'ler tarafından salgılanan bir proenflamatuar sitokindir. İlk olarak 1984 yılında klonlanmış ve tümör hücrelerinin nekrozuna neden olan çözünür bir faktör olarak tanımlanmıştır. IFN- γ ve TNF- α Th1 sitokinleri, tümör hücrelerinde tümör döküntüsünü arttıran apoptoz, yaşlanmaya ve bağışıklık tepkisini artırmak için TAA üretimine neden olur (Basu et al., 2019). Meme kanserinde dokularının daha yüksek TNF- α 'ya sahip olduğu görülmüş ve TNF- α 'nın meme kanseri hücrelerinin göç potansiyelini arttırdığı gösterilmiştir. IL6 ve TNF- α 'nın birlikte ekspresyonu, lenf nodu tutulumu ve daha kısa sağkalım ile ilişkilendirilirken, RAS ve TNF α birlikte meme kanserinde anjiyogenezi arttırmıştır (King et al., 2017). Yapılan çalışmalarda TNF- α 'nın kanser ilerlemesinde ve tedaviye yanıtta çok önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Doksorubisin, TNF- α -aracılı NF- κ B aktivasyonunu indükler ve EMT aktivasyonu yoluyla sürekli olarak meme kanseri direncini artırır. TNF- α ile indüklenebilir NF- κ B aktivitesinin, meme kanseri hücrelerinin radyo-

direncine katkıda bulunduğu iyi bilinmektedir. TNF- α , meme kanseri hücrelerinde metastaz ile ilişkili birçok proteini indükler ve aktivitesi östrojen ve EGF tarafından önemli ölçüde güçlendirilir. Ek olarak TNF-a, kemorezistans için NF- κ B yolunu aktive ederek IL-6 ve IL-8 ekspresyonunu artırır (Tan and Hu, 2018).

2.6. Kanser Aşıları

Kanser immünoterapisi veya immüno-onkoloji, bağışıklık yollarını anlayarak ve bunları kullanarak yeni kanser tedavileri geliştirmeye yönelik hızla büyüyen bir kanser araştırma alanıdır (DeMaria and Bilusic, 2019). 1891’de Dr. William Coley, inaktif edilmiş *Streptococcus pyogenes* ve *Serratia marcescens* bakterilerinin intratumoral enjeksiyonları ile bir kanser hastasının durumunu iyileştirmek için bağışıklık sistemini uyarmaya yönelik ilk girişimi yapmıştır bunun sonrasında devam eden pek çok çalışmanın ışığında 2010 yılına gelindiğinde prostat kanseri için PROVENGE isimli terapötik kanser aşısı FDA tarafından onaylanan ilk kanser aşısı olmuştur (Song et al., 2018). Kanser aşılarının tarih boyunca kat ettiği aşamalar aşağıda şematize edilmiştir (Şekil 2.10.).



Şekil 2. 11.Kanser aşılarının tarihsel gelişimi (Song et al., 2018).

Genel olarak sağlıklı bireylere uygulanan profilaktik aşıların aksine, terapötik kanser aşıları kanser hastalarına uygulanır ve hastanın kendi bağışıklık tepkilerini güçlendirerek kanser hücrelerini yok etmek için tasarlanır. Terapötik aşılarla ilgili harekete geçirilen çeşitli immün efektör mekanizmaları, kanser hücrelerine hücrelere spesifik olarak saldırır ve tahrip eder. Dolayısıyla, tedavi edici kanser aşıları, prensip olarak, cerrahi, radyasyon tedavisi ve kemoterapi gibi geleneksel tedavilere dirençli olan ileri kanserlerin ve / veya nüksetmiş tümörlerin daha da büyümesini engellemek için kullanılabilir (C. Guo et al., 2013). Hastalığın önlenmesini amaçlayan geleneksel bulaşıcı hastalık aşılarından farklı olarak, kanser

aşıları kansere karşı mücadele için esas olarak bağışıklık sistemini, özellikle de CD8 + T hücre yanıtını uyarmaya odaklanır (Song et al., 2018). Meme kanseri için kullanılan aşıları; peptit bazlı aşılar, tam hücreli lizat aşıları, viral veya DNA bazlı aşılar, dendritik hücre aşıları ve koruyucu aşılar olarak sınıflandırabiliriz.

2.6.1. Peptit Bazlı Aşılar

Peptit aşıları, yüksek oranda hedeflenmiş bağışıklık yanıtını oluşturmak için kısa peptit parçaları kullanan bir stratejidir. Peptit aşıları, istenilen T ve B hücresi aracılı immün yanıtı indüklemek için bir antijenin 8-11 amino asit epitopunu içerir. T hücresi aracılı immün yanıtlarda peptit antijenleri, MHC (Majör Histo-uyumluluk Kompleksi) sınıf I ve II molekülleri tarafından kanser hücrelerinin yüzeyinde spesifik T hücresi reseptörlerine (TCR) sunulur. Sınıf I MHC molekülleri ile birlikte sunulan, esasen endojen olarak proteolize proteinlerden türetilen 8-10 amino asitli kısa peptitler, CD8 + sitotoksik T lenfositleri (CTL) tarafından tanınır. Bununla birlikte, uzun peptitler (tipik olarak 12-28 amino asit) esas olarak yardımcı (CD4 +) T hücreleri tarafından tanımlanan Sınıf II MHC molekülleri ile ilişkili ekzojen antijenlerden türetilir (Mahdavi and Moreau, 2016).

Peptit bazlı aşılar, monovalent veya multivalent olabilir. Monovalent aşılar, tek bir antijene karşı bir bağışıklık tepkisi indüklerken, multivalent aşılar, birden fazla antijene karşı bir bağışıklık tepkisi indükler. Monovalent aşılar için ideal antijenler arasında tümör hücrelerinin çoğu tarafından eksprese edilen ve tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilen antijenler bulunur. Meme kanseri için önerilen çeşitli monovalent ve multivalent peptit bazlı aşılar vardır (Burke et al., 2019).

Meme kanseri için kullanılan peptit aşılarını genel olarak; HER2 hedefleyen peptit aşılar, karbonhidrat antijenlerini hedefleyen peptit aşılar, hTERT hedefleyen peptit aşılar ve WT1 hedefleyen aşılar olarak sınıflandırabiliriz (Solinas et al., 2020). Birçok çalışma, HER2 proteininin immünojenik olduğunu ve CD4+ ve CD8+ lenfosit antijenine spesifik immün tepkilerini indükleyebileceğini göstermiştir. En çok çalışılan HER2-protein aşısı E75 veya nelipepimut-S'dir (NeuVax). Bu peptit aşısı, HER2 / neu proteininin hücre dışı alanından HLA-sınıfı bir peptidi eksprese eder. Yapılan çalışmalarda E75 antijeninin immünojenik olduğu ve HER2'ye özgü bir CD8 + sitotoksik yanıtı uyardığı gösterilmiştir. E75 aşısı, adjuvan ortamında GM-CSF ile kombinasyon halinde de değerlendirilmiştir. Aşı, HER2'nin herhangi bir aşırı ekspresyonu derecesine sahip tümörlerin tedavisi için tasarlanmış ancak düşük veya orta HER2 ekspresyonu olan hastalarda daha iyi sonuçlar (hastalıklı sağkalım ve bağışıklık tepkileri) gözlenilmiştir (Sanchez et al.,

2016). Aşağıdaki tabloda peptit bazlı meme kanseri aşıları için hedeflenen antijenler gösterilmiştir (Tablo 2.3.).

Tablo 2. 3. Peptit bazlı meme kanseri aşılarının hedefi antijenleri (Solinas et al., 2020)

Antijen	Tümör Antijenin Türü	Diğer Bileşenler
MUC-1	TACA	L-BLP25 artı standart neoadjuvan kemoterapi veya adjuvan hormon tedavisi
HER2/neu	TAA	Standart tedaviyi takiben adjuvan trastuzumab artı NeuVax (peptit nelipepimut-S (E75))
HER2/neu	TAA	HER2 hedefli monoklonal antikor tedavisi ile eşzamanlı olarak HER-2 / neu ICD peptit bazlı aşı +/- Polisakkarit Krestin
HER2/neu	TAA	Standart terapi ardından dHER2 ASCI artı AS15 adjuvanı
HER2/neu	TAA	Standart adjuvan tedaviyi takiben, GM-CSF ile birleştirilmiş HER2 / neu türevi epitop (GP2) içeren GP2 / GM-CSF
HER2/neu	TAA	HER2 / neu'dan türetilen B-hücresi epitopları ile sentezlenen MVF'den türetilen karışık T hücresi epitopunun 2 kimerik peptidinin bir kombinasyon peptit aşısı
HER2/neu	TAA	Sistemik kemoterapi / radyoterapi sonrası HER2 türevi peptit aşısı
MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A10, CEA, NY-ESO-1, HER2 proteinleri	CTA	Tetanoz toksoidinden türetilmiş bir MHC sınıf II kısıtlamalı yardımcı peptit ile kombine edilmiş MHC sınıf I-sınırlı Meme kanseri ile ilişkili peptitlere dayanan bir peptit aşısı artı bir TLR3 agonisti (Poli ICLC)
Tri Tn Glycotope (MAG-Tn3)	TACA	Standart tedaviyi takiben adjuvan Magtrivacsein artı AS15
Hastaların kendi tümör antijenleri	TSA	Poly ICLC

2.6.2. Tam Hücre Lizat Aşıları

Hücre bazlı aşılar; bağışıklık sistemini hastadan ya da vericiden türetilen tümör ya da bağışıklık hücrelerinden tüm hücresel ya da modifiye edilmiş hücresel bileşenlerin eksojen kaynağına maruz bırakarak bir bağışıklık tepkisi indükler (Kurtz et al., 2014). Tüm tümör hücresi aşıları, APC'ler tarafından sunulabilen ve uygun bağışıklık tepkilerini uyaran karakterize ve karakterize edilmemiş TAA'ları içerirler.

Ayrıca bu aşıların MHC'si hastanın MHC'sine benzerdir ve APC'ler MHC sınıf I ve MHC sınıf II tarafından TAA'yı sırasıyla CD8+ ve CD4+ T hücrelerine sunabilirler. Bu nedenle, MHC I ve MHC II'nin eşzamanlı sunumu, tümöre karşı daha güçlü bir bağışıklık tepkisine yol açar (Razi and Keshavarz-fathi, 2019).

2.6.3. Viral veya DNA Bazlı Aşılar

Rekombinant DNA veya viral vektör bazlı aşılar, TAA'ya özgü hücresel ve humoral bağışıklık yanıtı üretmek üzere TAA'ları sağlamak için potansiyel olarak kullanılabilir (Burke et al., 2019). DNA aşıları, sitotoksik lenfositlerin ve B hücrelerinin proliferasyonunu aktive ederek tümör immün tepkisini aktive eder, böylece kanser hücrelerinde spesifik tümör antijeninin ekspresyonunu indükler ve bağışıklık toleransını kırar (Shanmugaraj et al., 2020). Plazmid DNA bazlı aşılar, antijen sunan hücreler plazmid DNA'yı alır, geni bir immünojenik proteine kopyalar, işler ve bağışıklık sistemine sunar. Metastatik meme kanseri hastalarında bir Mamaglobin-A (MAM-A) DNA aşısının bir faz I klinik çalışması, bu bileşiğin MAM-A'ya özgü CD8 + T hücre yanıtlarını ortaya çıkarabildiğini ortaya koymuştur (Solinas et al., 2020). Viral ve DNA bazlı aşılarıdaki bazı hedef antijenler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 2.4.).

Tablo 2. 4. Viral veya DNA bazlı meme kanseri aşılarının hedef antijenleri (Solinas et al., 2020)

Antijen	Tümör Antijenin Türü	Aşının Türü	Diğer Bileşenler
HER2/neu	TAA	Viral Aşı	Standart terapi / +/- trastuzumab ve ardından MVA-BN-HER2 aşısı
MUC-1 CEA	TACA TAA	Viral Aşı	PANVAC (MUC-1 ve CEA'yı kodlayan rekombinant aşı virüsü ve rekombinant kümes hayvanı virüsü) artı Dosetaksel
hNIS	TAA	Viral Aşı	Standart tedavinin başarısız olmasından sonra hNIS kodlayan bir onkolitik kızamık virüsü olan MV-NIS
hNIS	TAA	Viral Aşı	Kutanöz ve / veya yüzeysel lezyonlara enjekte edilen HF10 (replikasyona yetkin bir HSV-1 onkolitik virüs)
p53	TAA	Viral Aşı	p53MVA (vahşi tip p53 transgenini eksprese eden genetik olarak değiştirilmiş modifiye bir aşı Ankara virüsü) artı pembrolizumab
HTERT	TAA	DNA Aşısı	Standart terapi ardından INO-1400 +/- IL12 adjuvanı
CD105, Yb-1 SOX2,CDH3 MDM2	TAA	DNA Aşısı	STEMVAC: CD105 (Endoglin), Yb-1, SOX2, CDH3 ve MDM2 proteinlerinin epitoplarını kodlayan memeli ekspresyon vektörü pUMVC3 (pNGVL3) içeren bir plazmid DNA aşısı
Hastaların kendi tümör antijenleri	TSA	DNA Aşısı	Kişiselleştirilmiş poliepitope DNA aşısı

2.6.4. Dendritik Hücre Aşıları

Dendritik hücreler (DH), bağışıklık sistemindeki en güçlü antijen sunan hücrelerdir. Bu nedenle; çevredeki antijenleri yakalama, işleme ve bağışıklık sisteminin T hücrelerine antijenik peptitler olarak sunma rolüne aracılık ederler. Normal şartlar altında, DH'ler bağışıklık sisteminin nöbetçileri olarak hareket eden olgunlaşmamış ve inaktive bir durumda tutulurlar. Enflamatuvar sitokinler, mikrobiyal faktörler veya endojen alarminler gibi optimal uyaranlara maruz kaldıktan sonra ise DH'ler olgunlaşma olarak adlandırılan karmaşık bir dizi fenotipik ve fonksiyonel değişikliğe uğrarlar. Olgun DH'ler, bir dizi fenotipik ve

fonksiyonel özelliğe sahiptir: i) kemokin reseptörlerinin alınması (örneğin, CCR7); ii) yapışma moleküllerinin, T hücresi kostimulatör moleküllerin (CD80 ve CD86), immünoproteasomların ve peptit-MHC sınıf I ve II moleküllerinin upregülasyonu; ve iii) hücrelerin lenfoid dokulara taşınması ve bağışıklık yanıtlarının optimum aktivasyonu için gerekli olan farklı sitokinleri (örneğin, IL-12) salgılama kabiliyeti bunlardan bazılarıdır (Yang et al., 2019). DH'ler, immün yanıtları başlatmak için MHC sınırlandırılmış T hücrelerini duyarlılaştıran en etkili antijen sunan hücreler olarak görev yaparlar. DH'nin kanser aşısı stratejilerinden biri olmasının nedeni, tümörün olgunluğu baskılayabilmesi ve endojen DH'nin apoptozunu teşvik edebilmesidir. DH bazlı aşılar, tümörün süpresyonun üstesinden gelmek ve tümörün antijenine spesifik T hücresi tepkilerini tümöre karşı uyarmak için dışsal APC'ler olarak görev yaparlar (Song et al., 2018). Aşağıdaki tabloda dendritik hücre bazlı meme kanseri aşılarında hedeflenen bazı antijenler gösterilmiştir (Tablo 2.5.).

Tablo 2. 5.Dendritik hücre bazlı meme kanseri aşılarının hedef antijenleri (Solinas et al., 2020)

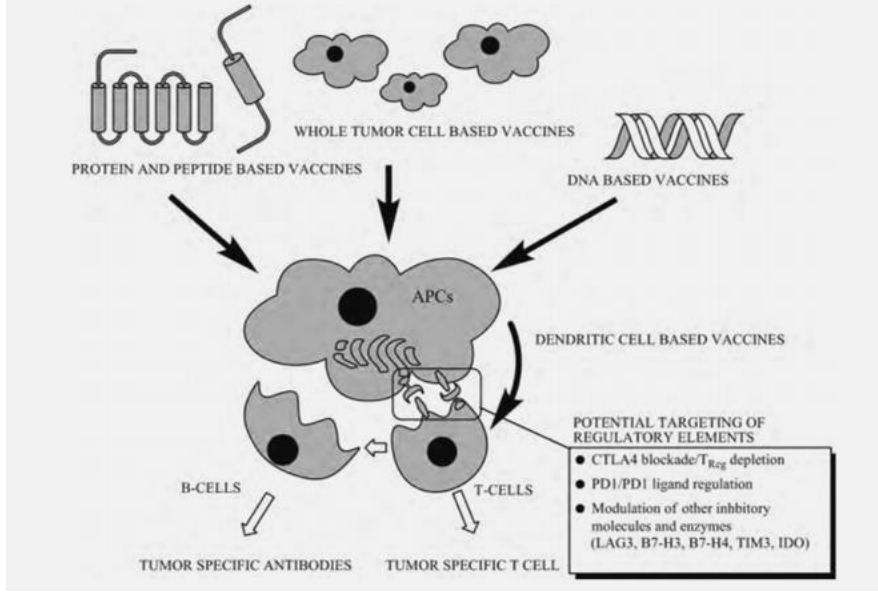
Antijen	Tümör Antijenin Türü	Diğer Bileşenler
HER2/neu	TAA	AdHER2/neu
TBVA	TAA	α DC1-TBVA aşısı artı Gemsitabin
p53, Survivin, HTERT	TAA	MRNA artı siklofosfamid kodlayan p53, survivin ve hTERT ile transfekte edilmiş otolog dendritik hücreler
Hastaların kendi antijenleri	TSA	Otolog dendritik hücre aşısı artı standart neoadjuvan kemoterapi
Cyclin B1, WT-1, CEF	TAA	Siklin B1 / WT-1 / CEF (antijen) yüklü dendritik hücre aşısı artı standart neoadjuvan kemoterapi
p53	TAA	Ad.p53 artı l-MT
Hastaların kendi antijenleri	TSA	Dendritik hücre / Tümör hücresi füzyon aşısı artı IL-12

2.6.5. Koruyucu Aşılar

Meme kanseri için önleyici veya profilaktik aşı stratejisi, erken premalign lezyonlarından meme kanseri gelişiminin olası önlenmesi için önerilmiştir. Bununla birlikte, koruyucu aşıların geliştirilmesindeki ana zorluk, otoimmün aracılı komplikasyonların gelişmesidir. Bunun aksine, koruyucu aşıların meme kanseri için hayvan modellerine karşı güvenli ve oldukça etkili olduğunu göstermiştir (Song et al., 2018).

2.7. HER2 Pozitif Meme Kanserinde Kullanılan Aşılar

Anti-HER2 immünizasyonu tam HER2 proteini, HER2'nin hücre dışı veya hücre dışı alanından türetilmiş peptitler veya kostimülatör molekülleri ya da immün aktifleştirici sitokinleri eksprese etmek için genetik olarak modifiye edilmiş tüm tümör hücreleri kullanılarak sağlanabilir. Ayrıca, çıplak veya viral vektörlerde enkapsüle edilmiş DNA, spesifik bir anti-HER2 bağışıklık tepkisini ortaya çıkarmak için kullanılabilir. Başka bir strateji türü, HER2 ile ilişkili peptitleri sunmak üzere tasarlanmış dendritik hücrelerinin alınmasıdır. Son olarak, kanser hücrelerinin bağışıklıktan kaçmasına katkıda bulunan inhibitör elementler (bağışıklık kontrol noktaları) üzerinde olası modülasyon müdahaleleri yapılabilir. En umut verici olanlardan biri, düzenleyici T hücreleri (TReg) tarafından yüksek seviyelerde ifade edilen ve T hücresi aktivasyonu üzerinde engelleyici etkiler uygulayan CTLA4'ün blokajıdır. Benzer şekilde PD1 ve PD1 ligand inhibisyonu veya diğer inhibitör moleküller ve metabolik enzimler (IDO) üzerindeki modülasyon müdahale incelenmektedir (Milani et al., 2013). HER2 pozitif meme kanserine yönelik aşı formülasyonları aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 2.11.).



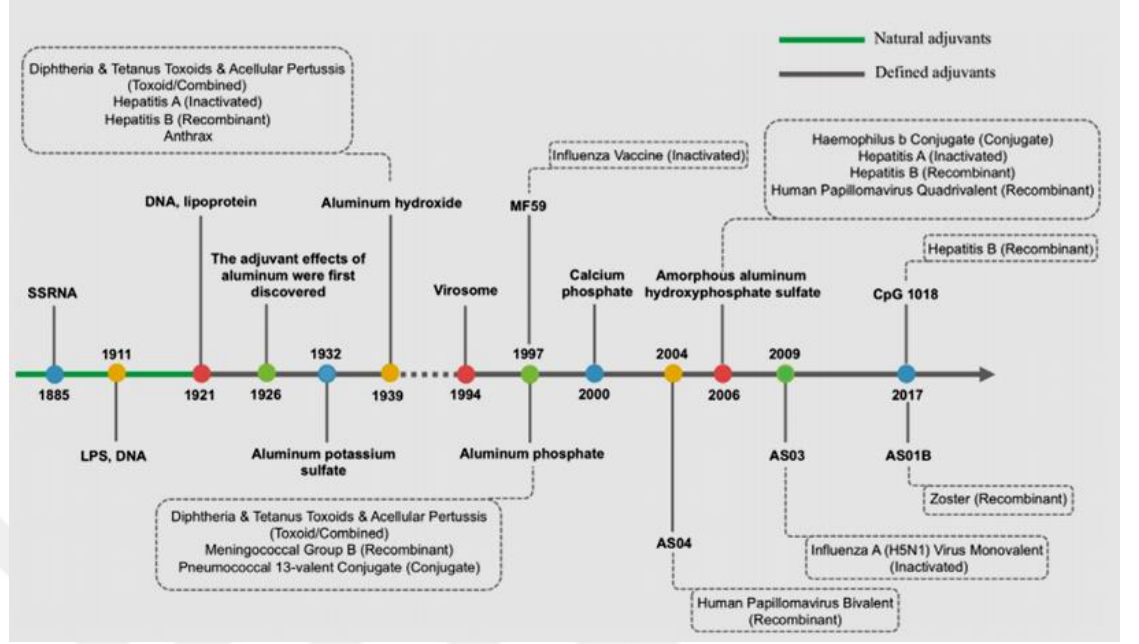
Şekil 2. 12.HER2 pozitif meme kanserinde farklı aşı formülasyonlarına genel bakış (Milani et al., 2013)

2.8. Aşı Adjuvanları

"Adjuvan" kelimesi, "yardım etmek" anlamına gelen Latince adiuvere'den gelir. Aşı adjuvanları, aşı formülasyonlarındaki bağışıklık tepkisini güçlendiren bileşenlerdir. Bunlar immünomodülatörler ve / veya iletim sistemleri olabilir. Genellikle infiltre edici fagositik hücrelerin uygulama yerine alımını ve tanıtımını destekleyen proenflamatuar bir ortam yaratarak etki ederler. Aşı adjuvanlarının karakteristik özellikleri olarak; aşıyı daha uygun maliyetli hale getirmek (gerekli dozun azalmasıyla), doğal bağışıklık sinyallerinin etkinliğini arttırmak, iyi immünomodülatör kapasite, yüksek spesifik antikor üretimi, sitotoksik T hücrelerinin üretimi, uzun süreli adaptif bağışıklık yanıtı ve antijeni daha güçlü hale getirmek sayılabilir (Bonam et al., 2017).

Birçok önemli tıbbi buluş gibi, bir aşıya adjuvan eklemenin bağışıklık arttırıcı etkilerinin keşfi de tesadüfî olmuştur. Fransız bir veteriner olan Gaston Ramon, enjeksiyon bölgesinde apse geliştiren atlarda tetanoz ve difteri anti-serum veriminin daha yüksek olduğunu gözlemlerken aynı dönemde, Londra'daki meslektaşları ile çalışan Alexander Glenney, alüminyum tuzlarının bağışıklık arttırıcı etkilerini keşfetmiştir. Bu çalışmalar ışığında devam eden araştırmalar sonucunda alüminyum ilk olarak 1932 yılında insan aşılarında kullanılmış ve yaklaşık 70 yıl boyunca lisanslı aşılarla kullanılan tek adjuvan olmuştur. Günümüzde adjuvanlar 90 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır ve şu anda farklı üreticilerin 30'dan fazla

lisanslı aşısının bileşenleridir (Pasquale et al., 2015). Aşağıdaki çizelgede aşı adjuvanlarının gelişimindeki önemli olaylar gösterilmiştir (Şekil 2.12.).



Şekil 2. 13. Aşı adjuvanlarının gelişimindeki önemli olayların zaman çizelgesi (Shi et al., 2019)

2.9. Adjuvanların Etki Mekanizmaları

Aşı bileşini olarak kullanılan farklı adjuvanların birbirinden farklı etki mekanizmaları vardır. Bazı adjuvanlar, immün sistemde stimülasyona devam etmek için yavaş salım sağlayan, enjeksiyon bölgesinde antijenleri yakalayan dağıtım sistemleri olarak işlev görürler. Bu adjuvanlar, enjeksiyon bölgesinde antijen kalıcılığını artırır ve antijen sunan hücrelerin (APC'ler) alım ve aktivasyonunu arttırırlar. Partiküllü adjuvanlar (örneğin alum), APC'lerin alımını teşvik edecek çok moleküllü agregatlar oluşturmak için antijenleri bağlama kabiliyetine sahiptir. Ayrıca bazı adjuvanlar majör doku uygunluk kompleksleri (MHC) ile antijen sunumunu yönlendirebilirler (Leroux-roels, 2010). Temelde motif tanıma reseptörleri (PRR) için ligandlar olan adjuvanlar, adaptif immün yanıtı etkileyip doğal immüniteyi indükleyerek hareket ederler. Neredeyse tüm PRR ailelerinin üyeleri adjuvanlar için potansiyel hedeflerdir. Bunlar arasında Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), NOD benzeri reseptörler (NLR'ler), RIG-I benzeri reseptörler (RLR'ler) ve C tipi lektin reseptörleri (CLR'ler) bulunur. Adjuvanlar, farklı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açan farklı adaptör moleküllerini içeren yolları da kullanırlar. Bu transkripsiyon faktörleri (NF-B,

IRF3), immün yanıtların polarizasyonunda anahtar rol oynayan sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini indükler. NLR ailesinin bazı  yelerinin (NLRP3 ve NLRC4 gibi) aktivasyonu, proinflatuar sitokinlerin IL-1  ve IL-18'in indüklenmesinde rol oynayan protein kompleksinin oluşumunu tetikler (Li et al., 2014).

 nsan a ıalarında en sık kullanılan adjuvan olan alum, güçlü bir Th2 tepkisi tetikler, ancak Th1 hücre aracılı bağışıklık gerektiren patojenlere karşı etkisizdir. Alum, APC'lerin depo etkisi ve aktivasyonu ile bağışıklık tepkisini tetikler (Li et al., 2014). Freund's Incomplete Adjuvant (IFA) ve MF59  gibi emülsiyonlar (su içinde ya  veya ya da su) MHC tepkilerinin indüklenmesini tetikleyebilir. IFA, bazı Th1 hücresel yanıtlarla birlikte ağırlıklı olarak Th2 yanlı bir yanıt indükler. MF59  hem hücresel (Th1) hem de hümoral (Th2) immün yanıtların güçlü bir uyarıcısıdır (Ott et al.,1995). Bununla birlikte, emülsiyon bazlı adjuvanların kesin etki şekli hala belirsizdir. Tablo 2.6.'da kullanılan bazı a ı adjuvanları ve adjuvaların etki mekanizmaları gösterilmiştir.

Tablo 2. 6.Adjuvanlar ve etki mekanizmaları (Leroux-roels, 2010)

Adjuvanlar	Etki Mekanizmaları
Alüminyum Tuzları	Dendritik hücreler ile doğrudan etkileşim yoluyla doğuştan gelen bağışıklık yanıtın aktivasyonu yoluyla veya dendritik hücreleri aktive edebilen hücrel bileşenlerin salımının in vivo indüklenmesi yoluyla etki ettiklerine inanılmaktadır.
Yağ-su Emülsiyonları	Doğuştan gelen enflamatuar yanıtlar, APC alımı ve aktivasyonu, enjeksiyon bölgesinde antijen kalıcılığının artırılması ve immün sistem hücrelerine sunulması ile etki ederler.
Su-yağ Emülsiyonları	Lokal inflamasyonun indüksiyonu ve artan APC alımı ve aktivasyonu yoluyla etki ettiklerine inanılmaktadır.
Virozomlar	Etki mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır. Öncelikle antijen için bir dağıtım aracı olarak hareket ederler. Adjuvanlıkları, APC'ler ile antijen etkileşimini belirleyen lipozomun yapısal özelliklerine bağlıdır.
Bağışıklık Uyarıcı Kompleksler (ISCOM, ISCOMATRIX)	APC'lerde sınıf II MHC ekspresyonunu arttırarak antijenlerin artmış sunumuna neden olurlar.
MPL	TLR4'e bağlanır, gelişmiş humoral ve hücrel tepkileri indükler (ağırlıklı olarak Th1 bazlı).
QS21-Saponinler	APC'lere antijen sunumunu geliştirir, ağırlıklı olarak hem Th1 hem de Th2 sitokin sekresyonunu ortaya çıkaran CTL üretimini indüklerler.
ISS-CpG	TLR agonistleri ve pro-enflamatuar sitokinlerin indükleyicisi, adaptif immün yanıtın amplifikasyonuna yol açarlar.
İmidazokinolinler	Doğal TLR reseptör ligandını mimiklerler.

2.10. Kanser Aşılarında Adjuvanların Kullanımı

Kanser aşılarında adjuvanların kullanımı oldukça önemlidir. Adjuvan kullanımıyla birlikte immunojenitesi düşük olan antijenlerin immunojenitesinde artış sağlanırken, daha az miktarda antijen kullanılarak immün yanıt indüklenebilmekte ve aşının etkinlik süresi uzatılabilmektedir (Gin and Slovin, 2011).

Kanser aşılarında adjuvan kullanımının getirdiği avantajlar; Tümörde antijene spesifik bağışıklık yanıtının başlangıcını, gücünü ve süresini etkileme, immünofenotipi ve dolayısıyla tümörün antijen ile yönlendirilmiş adaptif lenfosit yanıtının kalitesini güçlü bir şekilde etkileme, zayıf bağışıklık yanıtını telafi ederek tümör antijenlerine karşı bağışıklık toleransını tersine çevirme, anti tümör bağışıklık yanıtının indüksiyonu için gerekli olan tümör antijen dozunu azaltma, aşı antijen stabilitesini artırma(raf ömrünü uzma),tümör antijenlerine karşı bağışıklık tepkilerini genişleterek aynı tümör içinde ortaya çıkan farklı hücresel mutantlara karşı çapraz korumayı artırma ve daha geniş bir tümör antijenine karşı aşı kapsamını artırma olarak sayılabilir (Schijns et al., 2014).

2.10.1. MPL İçeren Adjuvanlar

MPL-A (Monofosforil lipit A), TLR4 uyarımı yoluyla immünite tepkilerini indükleyen detoksifiye edilmiş bir lipopolisakarit (LPS) çeşitidir (Ko et al., 2018). MPL-A, hem hücresel hem de humoral bağışıklıkta adjuvan aktivite göstermiştir. Monofosforil lipit A (MPL-A), lipozomal aşılar da etkili bir adjuvan olarak sıklıkla kullanılmakla birlikte FDA, MPL'yi insan aşıları için güvenli bir adjuvan olarak onaylamıştır (Shariat et al., 2014). Lipid Bir TLR4 agonisti olan bir mimetik Monofosforil lipit-A (MPL-A), immünomodülatör potansiyele sahiptir ve bağışıklık tepkisinin indüklenmesinde güvenli ve etkilidir. MPL sistemik bağışıklık tepkisine yol açar ve Th1 tipi yanıtı teşvik eder. Tüm TLR agonistleri arasından MPL, bugün çeşitli bulaşıcı hastalıklara karşı ticari olarak satılan tek lisanslı, toksik olmayan adjuvandır (Ratnapriya et al., 2019). Yapılan çalışmalarda MPL'nin adjuvan sistemlerinde kullanıldığında aşıda erken bağışıklık tepkisine aracılık eden ana bileşen olduğu gösterilmiştir. Alüminyum tuzları MPL ile sinerjik olmamasına rağmen, depo etkisinin fonksiyonu nedeniyle MPL varlığının bağışıklık tepkisini uzattığı görülmüştür. Ayrıca MPL ve QS21 adjuvan sistemlerinde birlikte kullanıldığında kemokinlerin salınımını arttırmak, granülositi dolaştırmak, monositlerin ve dendritik hücrelerin alımını arttırmak için sinerjik olarak çalışabildiği anlaşılmıştır (Shi et al., 2019).

2.10.2. Poly-ICLC

Poly-ICLC, DH'leri doğrudan aktive eden ve aynı zamanda tümör hücrelerini öldürmek için NK hücrelerini tetikleyen sentetik bir dsRNA kompleksidir.

LPS ve R848 ile karşılaştırıldığında, IL-10 yokluğunda IL-12 gibi sitokinlerin indüklenmesi ve DH'lerde yüksek CD80 ve CD86 seviyelerinin korunması nedeniyle Poy-ICLC en güçlü TLR adjuvanıdır (Sabado et al., 2015).

Faz 1 aşamasındaki bir yumurtalık kanseri çalışmasında, IFA'daki NY-ESO1 uzun örtüşen peptitlerden oluşan bir aşıya poly-ICLC eklenmesinin, sadece aşıya kıyasla hızlı ve etkili CD4 ve CD8 T hücresi tepkilerini çarpıcı bir şekilde uyardığı görülmüştür. Maymunlarda yapılan bir çalışmada agonistik CD40 antikoru ile kombinasyon halinde kullanılan poly-ICLC'nin, sadece adjuvan ile karşılaştırıldığında hem CD4 hem de CD8 yanıtlarını önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. Ayrıca poly-ICLC, glioma, melanom, karsinom ve HER-2 pozitif meme kanseri dahil olmak üzere diğer kanserler için klinik çalışmalara girmiştir (Khong and Overwijk, 2016).

2.10.3. CpG Oligodenükleotid Adjuvanı

Metillenmemiş sitosineguanin motifleri içeren kısa tek sarmallı sentetik DNA molekülleri olan CpG oligodeoksineükleotitler (CpG-ODN), antijen-spesifik bağışıklık tepkilerini destekleme gücü nedeniyle yaygın olarak kullanılan aşı adjuvanlarının bir tipidir. CpG motifleri mikrobiyal genomlarda bol miktarda bulunur, ancak omurgalı genomlarında nadirdir ve bu nedenle patojene bağlı moleküler desenler olarak kabul edilir (Huang et al., 2017). CpG, B hücreleri ve plazmasitoid dendritik hücreler üzerinde Toll benzeri reseptör 9'u aktive edebilir ve böylece immün yanıtı düzenleyebilir. TLR9'un CpG ODN tarafından aktivasyonu, antijenlere spesifik humoral ve hücresel bağışıklık tepkilerini artırır (Bode et al., 2011).

CpG ODN, güçlü sitotoksik T lenfosit (CTL) ve IFN- γ salgılanmasını indüklemeye yeteneğini destekleyen Th1 tepkilerini indüklemek için güçlü bir adjuvandır. Bu özellikleri göz önüne alındığında, CpG ODN, kas içi, deri altı, oral ve burun içi yollarla aşılama için adjuvan olarak kullanılabilir. Etkili aşı adjuvanı olarak CpG ODN, antijenlerin immün sistemi uyarıcı etkisini artırabilir, APC'yi aktive edebilir ve bağışıklık yanıtlarını hızlandırabilir. CpG ODN'leri pDH'ler üzerinde MHC, CD40 ve CD86'nın ekspresyonunu kolaylaştırabilir ve antijen işleme ve sunumunu geliştirebilir (Shi et al., 2019). Dizilerine ve ikincil yapılarına dayanarak beş CpG ODN sınıfı (Sınıf A, Sınıf B, Sınıf C, Sınıf P ve Sınıf S) vardır. Bunların arasında Sınıf A ve Sınıf B CpG ODN'ler, melanom, akciğer, yumurtalık, meme ve kolon kanserli hastaları tedavi etmek ve T hücresi aracılı antitümör

tepkisini arttırmak en sık kullanılan adjuvanlardır (Huang et al., 2017). CpG ODN'nin kanser aşılarda adjuvan olarak kullanıma dair örnekler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 2.7.).

Tablo 2. 7. CpG ODN'nin kanser aşılarda adjuvan olarak kullanımı (Shirota and Klinman, 2017)

Melan-A/MART1 + CpG 7909 (0.5 mg)	Melanom	Faz I	Klinik cevap yok ama antijen özgü CD8 T hücrelerinde artış (>% 3)
NY-ESO-1 7909 (2.5 mg)	Prostat Kanseri	Faz I	CpG tarafından ortaya çıkarılan Tümör Antijenine spesifik Ab (% 100) ve hücrel (% 69) tepkiler; hastalık 2/13 oranında azalmış ve 8/13 hastada stabil
MAGE-3 + CpG 7909 (1 mg)	Melanom	Faz I/II	26 hastada kısmi yanıt ve 4 karışık yanıt
HER2 CpG/MPL/QS21	Meme Kanseri	Faz I	Tüm hastalarda tümöre özgü antikor indüklenmesi, 1 hastada HER2'ye özgü T hücreleri
MAGE-3 CpG/MPL/QS21	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri	Faz II, Faz III	MAGE-A3-AS15 kolunda, klinik aktivite daha yüksekti ve bağışıklık tepkisi daha sağlamdı.

2.10.4. Büyüme Faktörü ve Sitokinler

Sitokinler, hematopoietik fonksiyonu uyarma, bağışıklık yanıt ve enflamatuar yanıtı aracılık etme ve düzenlemeyle birlikte doku onarımına katılan düşük molekül ağırlıklı ve oldukça aktif glikoprotein sınıfıdır. Birçok sitokinin, koruyucu bağışıklığı ve aşılarda etkinliğini arttırmak için adjuvan olarak kullanılabilirliği kanıtlanmıştır. Yağ adjuvanları ve alüminyum tuzları adjuvanları gibi en çok kullanılan adjuvanlarla karşılaştırıldığında, sitokin adjuvanları, antijen sunan hücrelerin polarizasyonunu ve yardımcı uyarıcı moleküllerin ekspresyonunu ortaya çıkarma avantajlarına sahiptir (Guo et al., 2018). İmmünoterapi için yaygın olarak kullanılan en önemli sitokin IL-2'dir. IL-2, 1992'de metastatik renal hücreli karsinom ve 1998'de metastatik melanom tedavisi için FDA onayı almıştır. IL-2, tümöre özgü T hücrelerini ve NK hücrelerini aktive ederek antitümör aktivitesine aracılık eder (Khong and Overwijk, 2016).

GM-CSF büyüme faktörünün; periferik kan monositlerinin ve lenfositlerin sitotoksik aktivitesini arttırdığı ve birçok insan tümör tipine karşı antikorlara bağımlı hücrel sitotoksisiteyi arttırdığı gösterilmiştir. GM-CSF ayrıca tümörle

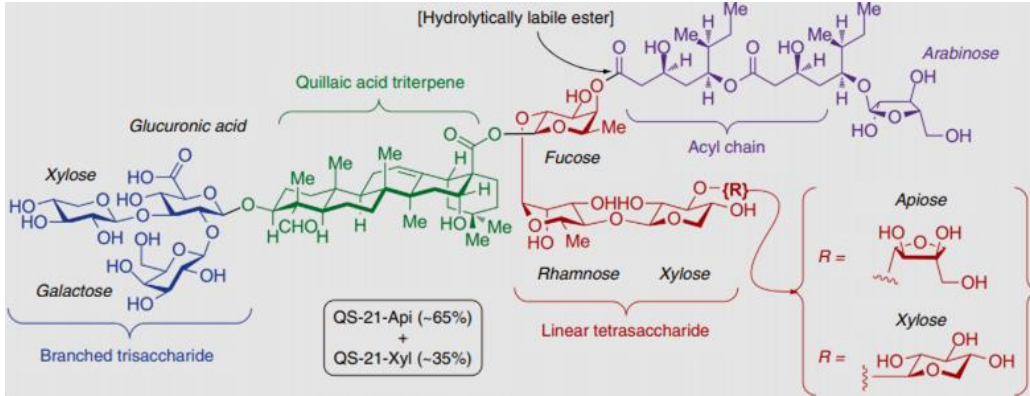
ilişkili antijenlerin (TAA'lar) sunumunu artırarak tümör hücrelerinin immünojenisitesini artırabilir. GM-CSF'nin, IL-1, TNF ve IL-6 dahil olmak üzere çoklu sitokinlerin üretimini arttırdığı ve böylece B ve T lenfositlerin farklılaşmasını da desteklediği gösterilmiştir. Bu özellikleri de GM-CSF'yi kanser aşılı için iyi bir adjuvan adayı haline getirmiştir (Clive et al., 2010). Ayrıca, GM-CSF'nin antitümör immün yanıtlarını ortaya çıkarma ve aşı verimliliğini artırma yeteneği, ilk lisanslı kanser aşısı Provenge'da da bulunmuştur. GM-CSF, prostat kanseri için bir dendritik hücre tedavisi ve kemik iliği nakli ve kemoterapiyi takiben beyaz kan hücrelerinin geri kazanımı ve değiştirilmesi için bir adjuvan olarak kullanılmak üzere lisanslanmıştır (Somasundaram, 2015).

2.10.5. Saponinler ve QS-21 Adjuvanı

Saponinler, hem Th1 bağışıklığını hem de sitotoksik T-lenfositlerin (CTL) üretimini uyarak memeli bağışıklık sistemini tetikleme kapasitesine sahip steroid veya triterpenin bitki bazlı doğal glikozidleridir (Ratnapriya et al., 2019). Adjuvan araştırmalarında en yaygın olarak kullanılan Quil-A ve türevleri, adjuvan aktiviteleri ve toksisitelerinde farklılık gösteren heterojen bir triterpen glikozit karışımından oluşan Quillaja saponaria ağacının kabuğundan çıkarılır (Jr & Reed, 2010). Saponinlerin memeli immün sistemini uyarma özellikleri potansiyel aşı adjuvanı olarak kullanılmasına olan ilgiyi artırmıştır. Saponin adjuvanların en sık kullanılanları Quil A ve ondan köken alan QS-21 adjuvanıdır. Bu moleküller gine pig ve insanda HIV aşısında, primat ve farede malaria aşısında, farede sinsitial solunum virüsü, sitomegalovirüs, toxoplasma gondi ve visseral leishmaniasis ve insanda kanser aşısı çalışmalarında kullanılmaktadır (Sun et al., 2009).

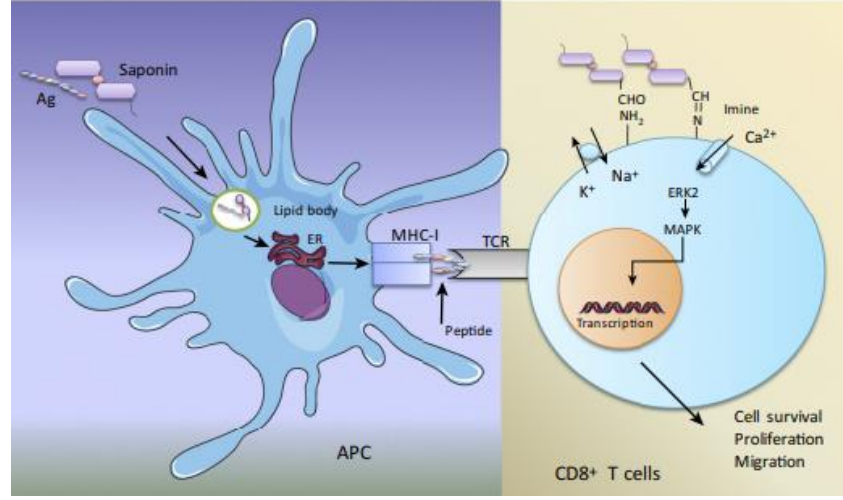
Quil-A adjuvanı ilk olarak veteriner aşılarında kullanılmış, ancak reaktogenisitesi nedeniyle insanlarda kullanımı sürdürülmemiştir. QS21 adı verilen saflaştırılmış bir Quil A fraksiyonun ise APC'lere antijen sunumunu arttıran ve ağırlıklı olarak CTL üretimini indükleyerek, hayvan modellerinde hem Th1 hem de Th2 sitokin sekresyonunu ortaya çıkaran güçlü adjuvan yetenekleri olduğu gösterilmiştir (Leroux-roels, 2010). QS-21, aşı çalışmalarında kullanılan en bilinen ve en yaygın saponin adjuvanıdır ve meme, prostat, yumurtalık ve akciğer gibi çeşitli kanser aşılara yönelik çalışmalarda kullanılmaktadır. QS-21'in yan zincirleri hem hidrofilik hem de hidrofobik fonksiyonel gruplarının ve aldehit gruplarının mevcudiyeti adjuvan aktivitesine katkıda bulunur. Lipofilik yan zincirine bağlı olarak Quillaja saponinlerin sitotoksik T-hücresi proliferasyonunu uyarma özelliği, görünmektedir (Ragupathi et al., 2011). QS-21 gibi triterpen

saponin adjuvanları, genellikle ester bağları ve/veya O-heterosidik bağlarla bağlanmış bir veya iki hidrofilik sakkarit zincirini taşıyan bir lipofilik triterpen çekirdeği olan amfifilik glikozitlerdir (Press et al., 2000) (Şekil 2.13.).



Şekil 2. 14.QS-21'in temel moleküler bileşenleri (Ragupathi et al., 2011)

Saponin adjuvanlarının keşfedilmesinden itibaren saponinlerin etki mekanizmasını aydınlatmaya ve sentetik türevlerini hazırlamaya yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu adjuvanların immünolojik aktiviteleri birbirine göre farklılık göstermektedir. Saponinlerin immün uyarıcı etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır, ancak birçok açıklama yapılmıştır. Saponinlerin, immünstimülan etkilerine aracılık edebilecek interlökinler ve interferonlar gibi sitokinlerin üretimini indükledikleri bildirilmiştir. Saponinler bu yanıtların çoğunu indüklemek için antijen sunan hücrelerle etkileşime girmektedirler. Saponinler, kolesterol ile etkileşerek, hücre yüzeyinde delikler veya gözenekler oluşturur ve böylece interkalasyon gösterirler. Saponinlerin adjuvan etkisinin gözenek oluşumuna bağlı olup olmadığı bilinmemektedir, bu durum antijenlerin endojen sunum yoluna erişmesine izin vererek sitotoksik T-lenfosit (CTL) yanıtını teşvik etmektedir (Sjo et al., 2001).



Şekil 2. 15. Saponinlerin etki mekanizmaları (Bonam et al., 2017)

Aldehit içeren saponinler (örn., QS-21) iki farklı mekanizma yoluyla etki eder. Birincisi, MHC antijenlerinin APC'ler tarafından sunumuna katılan bir lipid gövdesinin oluşturulmasıdır. İkincisi, TCR'lerde bulunan amino asit kalıntıları ile etkileşime girerek T hücrelerinin doğrudan aktivasyonudur. Bu etkileşim adımlarını ERK2, MAPK ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu izler ve sitokin salınımına ve hücre çoğalmasına, yer değiştirmesine ve farklılaşmasına yol açar (Bonam et al., 2017) (Şekil 2.14.).

Bu tez çalışması kapsamında ise moleküler yapıları şekilde gösterilen (Şekil 2.15.) ve *Cephalaria spp.* türlerinden elde edilen; Aristatoside B, Scoposide A, Scoposide B, Elmalienoside A, Balansoide B, saponinlerinin aşı adjuvanı olarak kullanım potansiyeli araştırılmıştır.

Compounds	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Purity (%)
Aristatoside B			-OH		99.17
Scoposide A	-H	-H	-H		99.80
Scoposide B (7)			-H		99.91
Elmalienoside A (17)	-H		-OH		99.59
Comp.	R				
Balansoide B					

Şekil 2. 16. Tez çalışmasında kullanılacak olan saponinlerin moleküler yapıları (Ozer et al., 2018; Sarikahya Boke et al., 2018)

2.10.6. Adjuvan Sistemleri

Adjuvan Sistemler, aşıların alüminyum tuzları içeren klasik formülasyonlardan daha iyi ve daha geniş bir koruma sağlaması için tasarlanmış immün sistemi uyarıcı moleküllerin kombinasyonlarıdır. Adjuvan Sistemlerinin hikayesi, yeni tanımlanan immünostimülatör moleküllerin klasik adjuvanlarla birleştirilmesi konseptiyle başlamıştır. Adjuvan kombinasyonların kullanıldığı aşılar, dendritik hücre olgunlaşması, T hücrelerinin gelişmesi ve tümörle ilişkili immün baskılanmanın hafifletilmesi de dahil olmak üzere çeşitli hücreleri ve immün mekanizmaları uyararak ve aktive ederek immün yanıtın sinerjik bir şekilde artmasına neden olabilir. Bu sistemlere örnek olarak Glaxo-Smith-Kleine (GSK) firması tarafından geliştirilen adjuvan sistemleri gösterilebilir. Bu firma tarafından geliştirilen formülasyonlardan olan AS2 ve AS15 kansere karşı kullanılmaktadır (Garçon and Pasquale, 2016) (Tablo 2.8.) .

Tablo 2. 8.GSK kanser aşılarında kullanılan adjuvan sistemleri (Garçon & Pasquale, 2016)

AS02	QS-21, MPL, Yağ-Su Çözeltilisi
AS15	QS-21, CPG, MPL, Lipozom

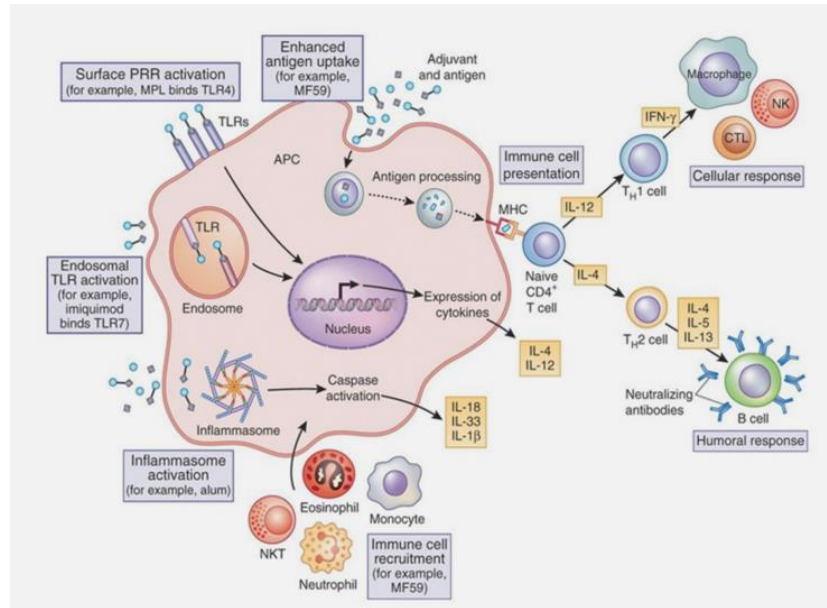
Tablo 2. 9.Faz çalışmalarındaki bazı kanser aşıları ve kullanılan adjuvanlar

Aşı	Kanser Türü	Faz Çalışması	Kullanılan Adjuvan	Kaynak
PVX-410	Multipl Miyelom	FAZ I	Polyinosinic polycytidylic acid-poly-L-lysine (sentetik adjuvanlar)	(Nooka et al., 2018)
MUC-2-KLH	Prostat Kanseri	FAZ I	QS21	(U.S. National Library of Medicine, 2020)
AutoSynVax™	Solid Tümör	FAZ I	QS-21 Stimulon®	(U.S. National Library of Medicine, 2020)
MUC1-KLH	Prostat Kanseri	FAZ I	QS21	(U.S. National Library of Medicine, 2020)
HER-2/neu peptit aşısı	Meme, Akciğer, Yumurtalık Kanseri	FAZ I	GM-CSF	(U.S. National Library of Medicine, 2020)
Aldesleukin	Cilt Kanseri	FAZ II	Freund's adjuvant (mineral yağda emülsiyon haline getirilmiş antijen)	(U.S. National Library of Medicine, 2020)

2.11. Aşı Adjuvanlarının İmmün Sistem Üzerindeki Etkileri

Yaygın olarak kullanılan adjuvanlar, çoğunlukla hücresel ve moleküler etki mekanizmalarını net bir şekilde anlamadan ampirik olarak geliştirilmiştir. Bununla birlikte veriler hepsi olmasa da çoğu adjuvanın, lenfositlerin kendileri üzerindeki doğrudan etkilerden ziyade, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bileşenlerini birleştirerek T ve B hücre yanıtlarını artırdığını göstermektedir (Coffman et al., 2010). Genel olarak, adjuvanlar, immün hücrelerde bulunan PRR'ler yoluyla doğuştan gelen bağışıklık sistemini aktive eder. İmmünostimülatör adjuvanların çoğu PRR'ler için ligand görevi görür ve doğrudan bir aktivasyon yolunu artırarak

sitokinlerin salgılanmasına yol açar. Reseptör-ligand etkileşimleri, bağışıklık yanıtlarının hazırlanmasından, genişlemesinden ve polarizasyonundan sorumlu sitokinleri, kemokinleri ve kostimulatör moleküllerini kodlayan genlerin ekspresyonuna yol açar. Öte yandan, adjuvanlar ya T hücresi tepkilerini arttırarak, humoral bağışıklığı uyararak ya da her ikisini birden uyarlamalı bağışıklık tepkileri uyarabilir. İmmün uyarıcı kompleksler (ISCOM'lar) antikor üretimini ve dengeli Th1 ve Th2 bağışıklık tepkilerini indükleyerek etki gösterirken, monofosforil lipit A (MPL) bir Th1 tepkisini ortaya çıkarır ve kolera toksin (CT) bir Th2 tepkisini uyarır (Bastola et al., 2017). Suda yağ emülsiyonu olan AS03, enjeksiyon bölgesinde koloni uyarıcı faktör 3 (CSF3), IL-6 ve lökosit kemokinler CCL2, CCL3 ve CCL5'i tetiklemek için antijen ile birlikte lokalize olur. Yapılan *in vivo* çalışmalarda antijen-spesifik B hücrelerinin proliferasyonu ve optimal antikor üretimi için gerekli olan fare dalağında IL-4 üreten Gr1 + hücrelerinin alum ile indüklendiği görülmüştür. Ayrıca alum IL-12p35 transkripsiyonunun seçici inhibisyonu yoluyla dendritik hücreler tarafından biyoaktif IL-12'nin indüksiyonunu inhibe edebilir ve Th1 yanıtlarını baskılayan IL-10 üretimini teşvik edebilir. Bir TLR9 agonisti olan CpG; MyD88, IRAK ve TRAF-6'nın aktivasyonu yoluyla sinyal verir, bu da pro-enflamatuar genleri ve protein ekspresyonunu (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 ve TNF-a) enjeksiyondan sonraki 3 saat içinde yukarı regüle eder (Awate et al., 2013; Oleszycka et al., 2018). Şekil 2.16'da bazı adjuvanların etki mekanizmaları şematize edilmiştir (Rambe et al., 2015). Ayrıca aşağıdaki tabloda bazı adjuvanların uyardıkları bağışıklık yanıtları gösterilmiştir (Tablo 2.10.).



Şekil 2. 17. Bazı adjuvanların etki mekanizmaları (Rambe et al., 2015)

Tablo 2. 10 Bazı önemli adjuvanlar ve bağışıklık yanıtları (Coffman et al., 2010)

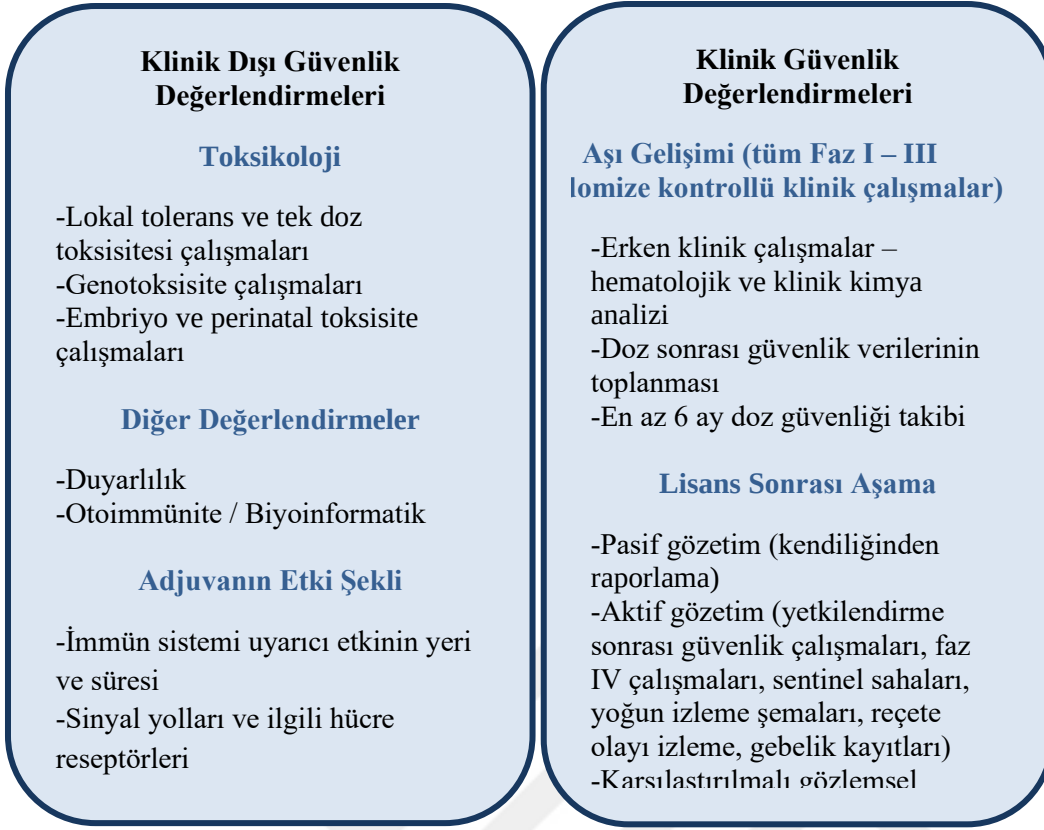
Adjuvan	Başlıca İmmünostimülatör Bileşenler	Uyarılmış Başlıca Bağışıklık Tepkileri
Alum	Alüminyum tuzları	Ab, Th2 (+ Th1 insanda)
MF59 ve AS03	Suda skualen emülsiyonları	Ab, Th1 + Th2
AS04	MPL ve alum	Ab, Th1
Poli-IC (ayrıca Poli-ICLC)	dsRNA'nın sentetik türevleri	Ab, Th1, CD8+ T hücreleri
MPL and formülasyonlar (AS01, AS02)	MPL ve QS-21	Ab, Th1
Flagellin, flagellin-Ag füzyon proteinleri	<i>S. typhimurium</i> 'dan Flagellin	Ab, Th1 + Th2
İmikimod	İmidazokinolin türevleri	Ab, Th1, CD8 + T hücreleri (konjüge edildiğinde)
CpG oligodeoksinükleotitler ve formülasyonlar (IC31, QB10)	Optimize CpG motifli sentetik fosforotioat bağlantılı DNA oligonükleotitler	Ab, Th1, CD8 + T hücreleri (konjüge edildiğinde)
ISCOMS ve ISCOMATRIX	Saponinler	Ab, Th1+ Th2, CD8+ T hücreleri
IFA (ve Montanid formülasyonları)	Mineral veya parafin yağı + yüzey aktif madde	Ab, Th1 + Th2
CFA	IFA + peptidoglikan, trehaloz dimikolat	Ab, Th1, Th17

2.12. Adjuvan Adaylarının Değerlendirilmesi

Adjuvanlı ve adjuvansız aşı formülasyonlarını değerlendirmek için bir adjuvan kullanımını destekleyen bazı çalışmaların yapılması gerekir. Dikkate alınan spesifik antijen ve / veya adjuvana bağlı olarak, bu tip çalışmaların olası örnekleri şu şekildedir;

- Humoral bağışıklık tepkilerinin büyüklük (örn., Ortalama titre veya konsantrasyon), kalite (örn., Afinite veya avidite) ve fonksiyonel aktivite (örn. Nötralize edici aktivite) açısından değerlendirilmesi.
- Belirli tiplerde hücrel yanıtın indüksiyonunun değerlendirilmesi de dahil olmak üzere hücrel immün yanıtların değerlendirilmesi (örn., Th1 veya Th2 sitokin profillerinin incelenmesi veya sitotoksik T hücrelerinin indüksiyonu için test etme)
- Uygun hayvan veya in vitro hastalık modelleri kullanılarak ilgili patojene karşı koruyucu veya terapötik yanıtların değerlendirilmesi ve / veya fonksiyonel bağışıklık yanıtlarının değerlendirilmesi.
- Uyarılmış bağışıklık tepkisi tarafından sağlanan çapraz korumanın süresi ve kapsamının değerlendirilmesi (World Health Organization, 2013).

Klinik dışı testlerin amacı, hayvanlarda veya in vitro test sistemlerinde potansiyel olumsuz etkileri tanımlamaktır. Bu klinik olmayan çalışmalar, takip edilmesi gereken özel dikkat gerektiren olayları belirleyerek, aşının insanlarda güvenlik değerlendirmesini yönlendirir. Bu nedenle, testin uygun hayvan türlerinde, bilimsel olarak sağlam bir şekilde ve mevcut tekniklerle gerçekleştirilmesi gereklidir. Adjuvanların güvenlik değerlendirmelerine yönelik çalışmalar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Garçon et al., 2011)



Şekil 2. 18. Adjuvanlara yönelik güvenlik değerlendirmeleri (Garçon et al., 2011)

In vitro model sistemlerin, özellikle insan hücrelerini kullananların geliştirilmesi, adjuvanların etki mekanizmasını aydınlatmak için ek ilgili bilgi sağlayabildiğinden, mümkün olduğunca önerilmektedir. Fonksiyonel *in vitro* biyo-analizler ayrıca belirli bir adjuvanın etki biçimini anlamada yararlı bilgiler sağlayabilir ve hayvan çalışmalarına değerli tamamlayıcı ve tamamlayıcı veriler sağlayabilir. Bu, özellikle türe özgü farklılıklar (örneğin TLR reseptörleri) gibi hayvan modellerinde sınırlamalar olduğunda önemlidir (World Health Organization, 2013).

2.12.1. *In vitro* etkinlik testleri

“*In vitro* çalışmalar”, esas olarak canlı bir organizmadan elde edilen bileşenler (örn., Serum, hücreler veya dokular) kullanılarak bir laboratuvar ortamında yapılan çalışmaları ifade eder. Aşı adjuvanı çalışmalarında preklinik insan *in vitro* modelleri, uygun hayvan modellerinde ve nihayetinde hedeflenen klinik çalışmalarda test edilecek hipotezler oluşturabilir. Aday aşı antijenlerinin uzun listesi; aday adjuvanların, kombinasyon adjuvanlarının ve bunların formülasyonlarının artan sayısı, hedef popülasyonların çeşitliliği ve değişkenliği,

her bir potansiyel adjuvanlanmış aşı formülasyonu için *in vivo* çalışmalar yapılması oldukça zordur bu anlamda aşı formülasyonlarının değerlendirilmesi için *in vitro* çalışmalar oldukça önemlidir (Nanishi et al., 2020). Özellikle immünoterapiye yönelik aşı çalışmaları için formülasyonların immün sistem üzerindeki etkilerini incelemek için çeşitli testler geliştirilmiştir (Morse et al., 2001).

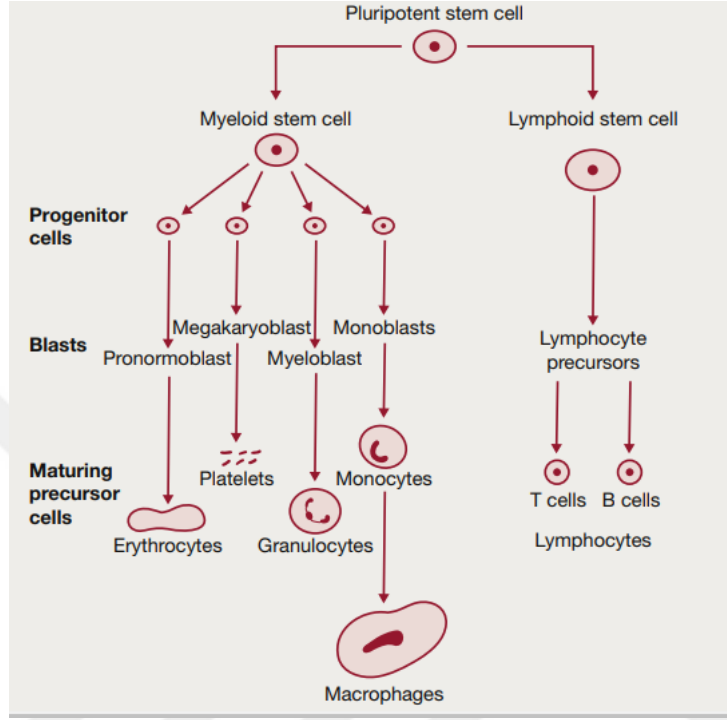
- **Periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) testleri**

PBMC kullanılarak yapılan testler lenfoproliferasyon testleri olarak sayılabilir. Bu testlerde T hücrelerinin antijene tepki olarak çoğalma kabiliyeti antijene spesifik CD41 yardımcı T hücrelerinin varlığının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Morse et al., 2001). En basit test prosedürü, donör PBMC'lerinin büyük gruplarını ortalama donör-donör varyasyonları ile test etme veya donöre özgü belirli yanıtları (örn. HLA16 kısıtlaması) belirleme fırsatı sunar (Giese and Marx, 2014). Terapötik protein ile inkübe edilen PBMC'ler, tam bir bağışıklık yanıtı simülasyonuna izin verir, ancak bu testler hücre proliferasyonunu olumsuz etkilemeyecek maddeler ile sınırlıdır (immünomodülatör ilaçlar için yetersiz) (Groell et al., 2018). Ayrıca PBMC testleri, WB(tam kan) testlerine kıyasla büyük miktarda kan örneği gerektirir (Deenadayalan et al., 2013).

- **Tam kan testleri**

Tam kanın spesifik antijenlerle *in vitro* uyarılması çeşitli amaçlar için kullanılır. Periferik kan mononükleer hücre (PBMC) kültürünün aksine, bir tam kan tahlili (WBA), serum biyomarker profillerinin daha geniş bir değerlendirmesini sağlayabilecek fizyolojik bir ortam sağlar. PBMC kültürleri, muhtemelen bazı hücre popülasyonlarına zararlı toksik olan PBMC ayırma prosedürlerine (örn., Ficoll veya Lymphoprep yoğunluk gradyan santrifüj teknikleri) bağlı olarak tam kandan daha düşük hücre yaşayabilirliğine sahiptir. Bunun dışında tam kan analizinin daha hızlı olması (işlemek için yaklaşık 15 dakika), daha ucuz olması, daha az laboratuvar eğitimi ve ekipmanı gerektirmesi, daha fizyolojik bir ortam sağlaması (plazma ve granüositler gibi hücresel ve hücresel olmayan bileşenler korunur) ve daha küçük bir numune hacmi kullanılması (yaklaşık 1-2 ml) gibi avantajları da vardır (Silva et al., 2013). Tam kan, hücreler ve plazmadan oluşur. Kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri ve trombositler hücresel bileşenleri oluşturur. Kanın birincil işlevi, dokulara oksijen sağlamak, karbondioksit ve atık ürünleri uzaklaştırmaktır.

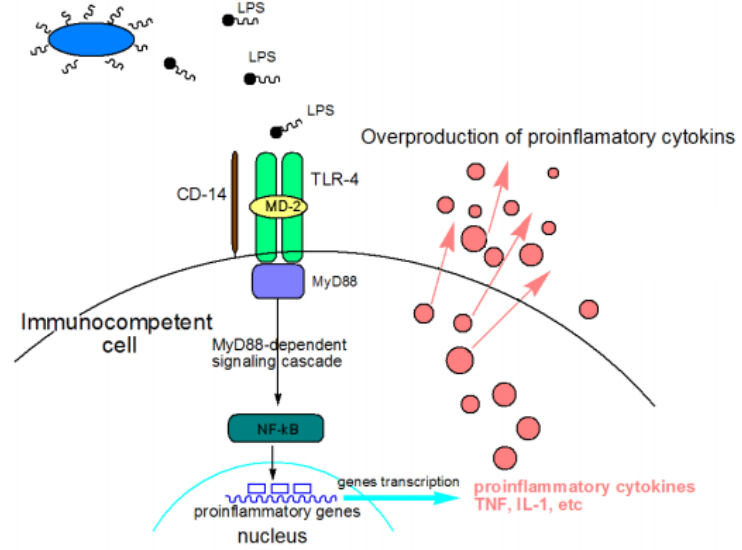
Diğer önemli roller arasında bağışıklık savunma, homeostaz ve hemostaz yer alır. Tüm kan hücreleri pluripotent kök hücrelerden türetilir. Bunlar da çeşitli kan hücresi türlerine farklılaşır (Glenn and Armstrong, 2019). Farklı türlerdeki kan hücrelerinin gelişimi ve olgunlaşmasını aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.



Şekil 2. 19. Farklı türlerdeki kan hücrelerinin gelişimi ve olgunlaşması (Glenn and Armstrong, 2019)

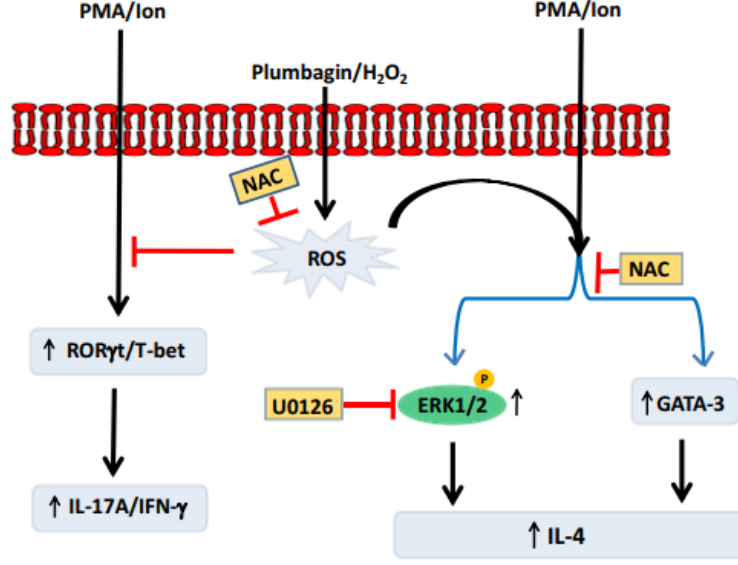
Tam kan kültürüyle yapılan in vitro çalışmalarda mümkün olan en kısa sürede tam kan numuneleri üzerinde stimülasyon yapılmalıdır. Çoğu tam kan analizinde stimülasyon için Toll benzeri reseptör-4 (TLR4) ligandı olan *Escherichia coli* lipopolisakkarit (LPS) kullanılır (May et al., 2009). Lipopolisakkarit (LPS) ve fitohemagglutinin A (PHA), sıklıkla monositlerden ve lenfositlerden sitokinlerin salgılanması için kullanılan güçlü uyarıcılardır. Yapılan bir çalışmada PHA tarafından uyarılan PBMC'lerde TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN- γ sitokin konsantrasyonlarında artış görülmüştür (Hanlon et al., 2009). LPS, insan kanında sırasıyla monositlerin ve Th2 lenfositlerinin interlökin IL-1 β ve IL-4 üretmesine neden olur (Aiba and Kimura, 2017; Thurm and Halsey, 2005). LPS, bağışıklık hücrelerinde Toll benzeri reseptör 4 (TLR-4) tarafından tanınır. Tanıma, CD14 ve MD-2 olarak bilinen iki yardımcı protein tarafından desteklenir.

TLR-4'ün uyarılması, adaptör molekölü MyD88 (miyeloid farklılaşması birincil yanıt proteini 88) ile reaksiyonu tetikler. MyD88'e bağılı sinyalleme yolu, pro-enflamatuar araçları kodlayan hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyen nükleer faktör- $\kappa\beta$ 'nin (NF- $\kappa\beta$) aktivasyonuna yol açarak aktivite gösterir (Solov'eva et al., 2013) (Şekil 2.19.).



Şekil 2. 20. LPS etki mekanizması (Solov'eva et al., 2013)

Mitomisin C'nin ise IL-5 sekresyonunun azaltılması ile GM-CSF sentezini inhibe etmede etkili olduğu gösterilmiştir (Borges Crosara et al., 2005). Tam kan kültüründe stimilasyon için kullanılan bir diğer yöntem ise PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)/ionomisin kullanımıdır. PMA, protein kinaz C'yi aktive ederken, ionomisin bir kalsiyum iyonofordur ve bu bileşimle yapılan stimülasyon, T hücresi membran reseptör kompleksini atlar ve çeşitli hücre içi sinyal yollarının aktivasyonuna yol açarak T hücresi aktivasyonu ve çeşitli sitokinlerin üretilmesine neden olur. Birçok klinik çalışma, PMA'nın belirli sitokinlerin (özellikle Th1 tipi sitokinlerin) üretimini spesifik olarak artırabileceğini de doğrulamıştır (Ai et al., 2013). Barten ve arkadaşları PMA ve ionomisin tarafından uyarılan sağlıklı insan tam kanında IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6 üretimi artışı rapor etmiştir (Barten et al., 2006). Yapılan bir diğer çalışmada ise 24 saatlik kültürden sonra, PMA / ionomisinin sağlıklı insanlardan seyreltilmiş tam kanda IFN- γ , IL-6 ve TNF- α salgılanmasını arttırdığı bulunmuştur (Keski-Nisula et al., 2004). Bu sonuçlara bakılarak PMA / ionomisin kombinasyonun Th1 yanıtını indüklemek için iyi bir araç olduğu söylenebilir. PMA / ionomisin kombinasyonun sitokin salgılama mekanizması aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 2.20.).

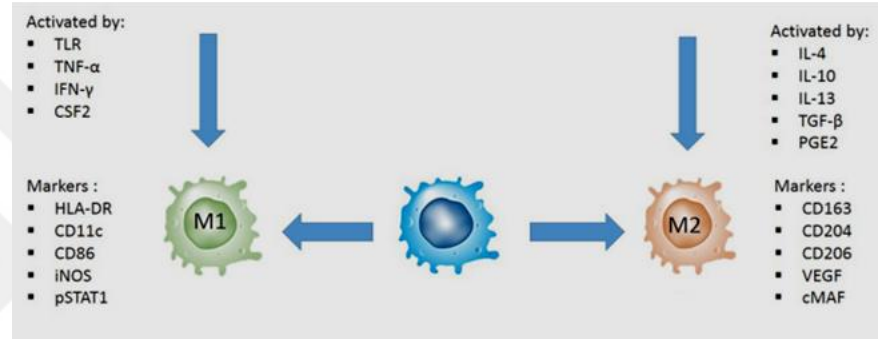


Şekil 2. 21. PMA / iyonomisin kombinasyonun mekanizması (Abimannan et al., 2016)

• Makrofaj polarizasyonu

Makrofajlar miyeloid soyundan türetilmiş ve doğuştan gelen bağışıklık sistemine ait hücrelerdir. Dokuya göç eden kan monositlerinden türetilirler (Weagel et al., 2015). Makrofajlar, bağışıklık savunması, doku homeostazının korunması, yara iyileşmesi ve iltihaplanma gibi birçok fizyolojik süreçte merkezi bir role sahiptir (Jeannin et al., 2018). Metabolizma makrofaj farklılaşmasını, polarizasyonunu, mobilizasyonunu ve bunların antitümör yanıtını düzenler. Makrofajların fagositik aktivitesi ölü ve ölmekte olan hücreleri temizler. Bununla birlikte, tümörler makrofaj aracılı inflamasyonu ve tümör hücrelerinin öldürülmesini önlemek için makrofaj metabolizmasını yeniden programlar. Makrofajlar, metabolik yollarında, çeşitli sitokin uyarımlarına yanıt olarak enflamatuar (M1) veya düzenleyici (M2) alt tiplere farklılaşmaya yol açan bir anahtardan geçer (Mehla and Singh, 2019). M1 makrofajları agresif ve yüksek oranda fagositiktir, büyük miktarlarda reaktif oksijen ve azot türü üretir ve Th1 yanıtı teşvik ederler. Kansere bağlamında M1 makrofajların, kanser hücrelerinin tanınmasında ve yok edilmesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir ve bunların varlığı genellikle iyi prognozu göstermektedir. M2 makrofajları, tümör bölgesinde kan damarlarının toplanmasına yardımcı olan ve tümör hücrelerinin diğer dokuları istila etmesine izin veren tümörle ilişkili makrofajlara (TAM) benzer. Katı tümörlerin çoğunda makrofajların (M2d olduğu düşünülmektedir) varlığı, tedavi başarısı ve daha uzun sağkalım oranları ile negatif korelasyon gösterir (Weagel et al., 2015).

Genellikle, M1 makrofajları olarak bilinen lipopolisakkaritlere (LPS) makrofajlar daha yüksek glikoliz gösterir. Aksine, M2 makrofajları olarak bilinen interlökin-4 (IL-4)'e bağlı makrofajlar, esas olarak biyoenerjetik talepleri için oksidatif fosforilasyona dayanır. Geleneksel olarak makrofaj polarizasyonu, qPCR ve FACS analizi kullanılarak M1 ve M2 markörlerinin gen ve protein ekspresyonundaki değişiklikler açısından ölçülür (Liu and Ho, 2019). İmmünohistokimyasal yöntemler ise iki ana tespit yöntemine ayrılır; immünofloresan ve kromojenik yöntem. Her iki yöntemin ilkeleri benzerdir; spesifik antijenantik reaksiyon, hedef antijenleri lokalize etmek için etiketli bir antikor tarafından incelenir (Jayasingam et al., 2020). M1 ve M2 makrofajlara yönelik aktivatörler ve markerlar aşağıdaki şekilde gösterilmiştir(Şekil 2.22.)



Şekil 2. 22. M1 ve M2 makrofajlara yönelik aktivatör ve markerlar (Jayasingam et al., 2020)

Tablo 2. 11. Sıklıkla kullanılan makrofaj/monosit hücre hatları (ATCC, 2020)

Hücre Hattı	Organizma	Hücre Tipi
RAW 264.7	<i>Mus musculus</i> , Fare	Makrofaj
J774A.1	<i>Mus musculus</i> , Fare	Monosit; makrofaj
P388D1	<i>Mus musculus</i> , Fare	Monosit; makrofaj
U-937	<i>Homo sapiens</i> , İnsan	Monosit
THP-1	<i>Homo sapiens</i> , İnsan	Monosit
NR8383	<i>Rattus norvegicus</i> , Sıçan	Makrofaj (alveoler)

Bu yüksek lisans tez çalışmasında grubumuzun önceki çalışmalarının ışığında ülkemiz endemik *Cephalaria spp.* türlerinden elde edilmiş olan Aristatoside B., Scoposide A., Scoposide B., Elmalienoside A., Balansoide B. saponinlerinin peptid bazlı meme kanseri aşısı formülasyonunda adjuvan olarak kullanım potansiyellerinin *in vitro* olarak PMA + iyonominisin ile indüklenen insan tam kan kültüründe sitokin (IL-1 β , IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α) düzeylerindeki değişim ELISA ile analiz edilerek ve HER2/neu peptidine karşı immün yanıt oluşturma potansiyeli belirlenerek araştırılması amaçlanmıştır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Analizlerde Kullanılan Malzemeler

RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute-1640 (ThermoFisher Scientific, ABD), fetal sığır serumu (FBS) (Gibco, ABD), penisilin-streptomisin Pen/Strep (Serox GmbH, Almanya), %99 saflıkta azot gazı (EgeVet, Türkiye), 25cm² -75cm² -175cm² T-flask (ThermoFisher Scientific, ABD), tripsin-EDTA (%0.25) (Gibco, ABD), PBS (10X) (ThermoFisher Scientific, ABD), hemositometre (Marienfeld, GmbH, Almanya), tek kullanımlık plastik malzeme (15 ve 50 ml'lik santrifüj tüpü, pipet, petri, 96 gözlü pleyt, 6 gözlü pleyt, kriyotüp (Kirgen, USA)), PMA (Phorbol 12-miristat 13-asetat)(Sigma-Aldrich, Missouri, ABD), iyonomisin (Sigma-Aldrich, Missouri, ABD), HER2/ErbB2 Proteini (Acro Biosystems, ER2-M5220, ABD), insan IL-4 ELISA kiti (Diacclone, Fransa), insan IL-1 β ELISA kiti (Diacclone, Fransa), insan IL-6 ELISA Kiti (Boster, ABD), insan TNF α ELISA Kiti (Boster, ABD), insan IFN- γ ELISA Kiti (ThermoFisher Scientific, ABD), QS-21 (Desert King, San Diego, CA), çalışmada kullanılacak olan saponinler (Aristatoside B., Scoposide A., Scoposide B., Elmalienoside A., Balansoide B.) Doç.Dr.Nazlı Sarıkahya tarafından temin edilmiş ve grubumuzun önceki çalışmalarında da kullanılmış olup laboratuvar stoklarımızda mevcuttur.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Tam Kan

Çalışmada gönüllülerden alınan insan tam kan kültürü kullanılmıştır (Devam etmekte olan çalışmalar kapsamında insan etik kurul onayı daha önceden alınmıştır. Onay No: E.215344).

3.1.3. Cihazlar

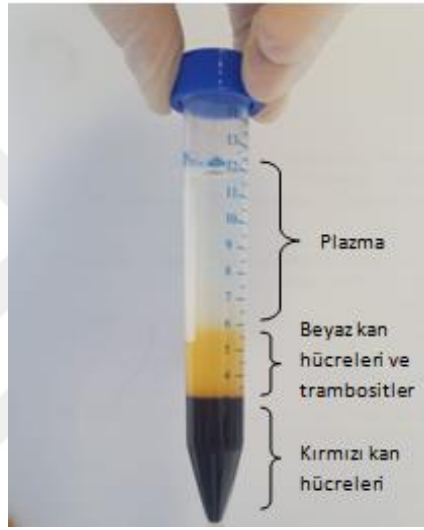
Sınıf 2 laminar akışlı biyogüvenlik kabini (ThermoFisher Scientific, ABD), CO₂ inkübatör (ThermoFisher Scientific, ABD), ES-20 Orbital shaker inkübatör (Biosan, Türkiye), BD Accuri C5 flow sitometri (BD Biosciences, ABD), su banyosu (LKTC-L Controller, Türkiye), vorteks karıştırıcı (ThermoFisher Scientific, ABD), NF 800 santrifüj (Nüve, Türkiye), - 86 °C dondurucu (ThermoFisher Scientific, ABD), derin dondurucu (Uğur, Türkiye), +4 °C buzdolabı (Arçelik, Türkiye), spektrofotometre (BioTek, USA), 2L manyetik karıştırıcı (Pfeiffer Cell Control, GmbH, Almanya), ters faz mikroskop (Zeiss,

ABD), soğutmalı mikrosantrifüj (Mikro 200R) (Hettich, GmbH, Almanya), ışık mikroskobu (Olympus, Hamburg, Almanya).

3.2. Metot

3.2.1. İnsan Tam Kanının Kültüre Alınması ve Madde Eklenmesi

Gönüllülerden ilk olarak heparinli tüp içerisine toplanan insan tam kanı steril santrifüj tüpü içerisine alınarak 2000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatantta kalan plazma kısmı atılmıştır (Şekil 3.6.).



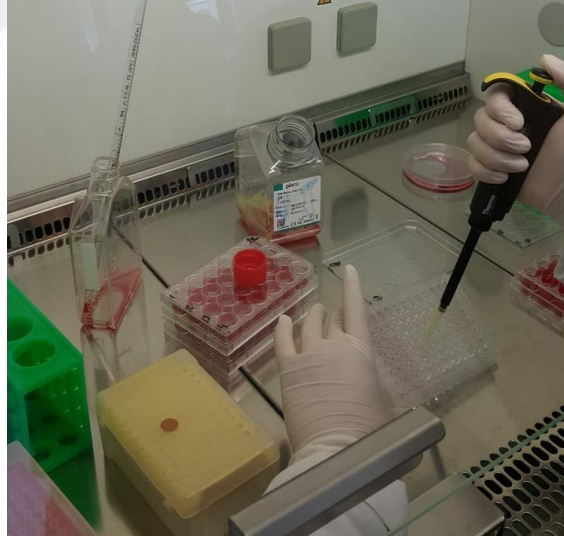
Şekil 3. 1. Kanın santrifüj sonrası görünümü

Daha sonra PBS ile yıkama işlemi iki defa daha tekrar edilerek plazma kısmının tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Elde edilen kan hücreleri %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 besin ortamı kullanılarak 1:20 oranında dilüe edilmiştir. Hiçbir işlem uygulanmamış (untreated) grup için bu tam kan-ortam karışımından 1 ml ayrılmış. Kalan besin ortamıyla dilüe edilmiş tam kana immün sistemi stimüle etmek amacıyla konsantrasyonu 50 ng/ml olacak şekilde PMA ve konsantrasyonu 400 ng/ml olacak şekilde ionomisin eklenmiştir (Top et al., 2017). Daha sonra bu hücreler aşağıda belirtilen 17 grup için her gözde 1ml olmak üzere 24 gözlü pleyte ekilmiştir (Şekil 3.7.).

Test Grupları

1. Untreated (Sadece ortam)
2. Untreated + PMA + İyonomisin
3. DMSO + PMA + İyonomisin

4. QS-21 + PMA + İyonomisin
5. Scoposide A + PMA + İyonomisin
6. Scoposide B + PMA + İyonomisin
7. Elmalienoside A + PMA + İyonomisin
8. Balansoide B + PMA + İyonomisin
9. Aristatoside B + PMA + İyonomisin
10. HER2/neu + PMA + İyonomisin
11. HER2/neu + QS-21 + PMA + İyonomisin
12. HER2/neu + Scoposide A + PMA + İyonomisin
13. HER2/neu + Scoposide B + PMA + İyonomisin
14. HER2/neu + Elmalienoside A + PMA + İyonomisin
15. HER2/neu + Balansoide B + PMA + İyonomisin
16. HER2/neu + Aristatoside B + PMA + İyonomisin
17. %0.1 BSA + PMA + İyonomisin



Şekil 3. 2. 24 gözlü pleyte ekim yapılması

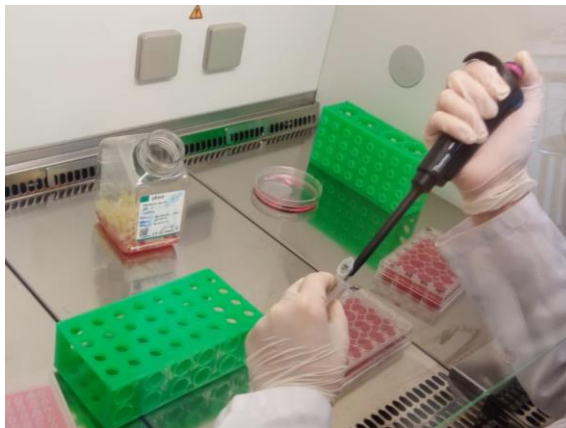
Hücre ekimleri sonrasında 1mg/ml konstasyonundaki saponin ve Her2/neu aşı antijeni stoklarından çekilerek aşağıda verilen şablona uygun olacak şekilde (Şekil 3.8.) gözlere aktarılmıştır. 24 gözlü pleyt içerisinde çözülerek hazırlanmış olan saponin stoğundan 3 µl (konsantrasyonu 3 µg/ml olacak şekilde (Top et al., 2017)) ve HER2/neu aşı antijeni stoğundan 10 µl (konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde (Shariat et al., 2014)) belirlenen gözlere eklenmiştir. Aşı antijeni

(HER2/neu) ve adjuvanlar(saponinler) 24 gözlü pleytin gözlerine stok solüsyonlardan eklenmeden önce ayrı bir steril ependorf içerisinde bir araya getirilmiş daha sonra istenilen konsantrasyonlara ulaşacak şekilde gözlerle eklenmiştir.

	1	2	3	4	5	6
A	Untreated	Untreated PMA İyonomisin	DMSO PMA İyonomisin	QS21 PMA İyonomisin	Scoposide A PMA İyonomisin	Scoposide B PMA İyonomisin
B	Elmalienoside A PMA İyonomisin	Balonside B PMA İyonomisin	Aristoside B PMA İyonomisin	Her2 PMA İyonomisin	Her2 QS21 PMA İyonomisin	Her2 Scoposide A PMA İyonomisin
C	Her2 Scoposide B PMA İyonomisin	Her2 Elmalienoside A PMA İyonomisin	Her2 Balonside B PMA İyonomisin	Her2 Aristoside B PMA İyonomisin	%0,1 BSA PMA İyonomisin	
D						

Şekil 3. 3. İmmünojenite potansiyelinin belirlenmesi için 24 gözlü pleyt şablonu

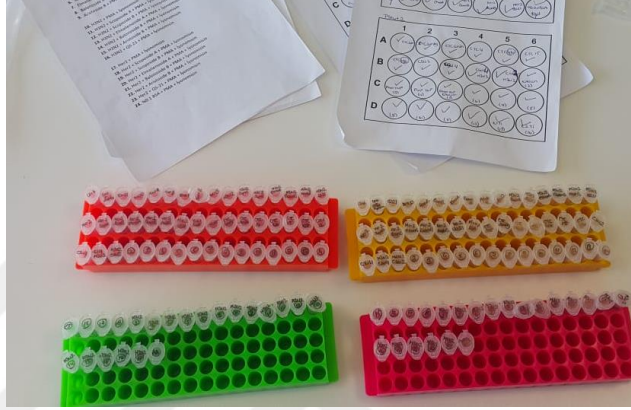
Şekil 3.8.'deki şablonda belirtildiği şekilde hücre ekimleri ve gözlerle antijen-adjuvan eklenmesi yapıldıktan sonra pleyt 24 saat boyunca 37°C'ye ayarlanmış %95 nemli atmosferde %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.9.)



Şekil 3. 4.24 gözlü pleytlere antijen-adjuvan eklenmesi

3.2.2. ELISA ile Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi

24 saat inkübasyon sonrasında mikropleytler inkübatörden alınmış, her bir gözde kültüre alınmış örneklerin süpernatantları ependorflara toplanarak mikrosantrifüj ile +4°C 2000 rpm’de 5dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısımları ticari ELISA kitleri ile sitokin analizlerinde kullanılmak yeni ependorflara aktarılmıştır (Şekil 3.10.).



Şekil 3. 5.ELISA testi için ependorflara ayrılan örnekler

IL-4 (Diacclone, Fransa), IL-1 β (Diacclone, Fransa), IL-6 (Boster, ABD), TNF α (Boster, ABD), IFN- γ (ThermoFisher Scientific, ABD) ELISA testleri için Ticari olarak temin edilen test kitlerinin protekollerine bağlı olarak sitokin analizleri gerçekleştirilmiştir.

• IL-4 Sitokin Analizi

IL-4 sitokin analizi yapılırken Diacclone İnsan IL-4 ELISA kiti kullanılmış ve bu kite ait protokol uygulanmıştır. Bu protokole bağlı olarak ilk olarak standart eğrisinin çıkartılabilmesi için kit içeriğinde bulunan 96 gözlü pleyt üzerinde 1:1 dilüsyonlarla konsantrasyonları 35 pg/ml ile 1.1 pg /ml arasında değişen standartlar hazırlanmıştır. Bu standartlardan ve blank için standartları çözmek için kullanılan solüsyondan 100 μ l ilgili gözlere eklenmiştir. Yukarıda 96’lı gözlü plate şablonunda görüldüğü gibi ilgili örneklerden 100’er μ l kuyucuklara eklenmiş ve üzeri kapatılarak 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. 2 saat sonunda kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılmış ve kuyucuklar kitin içeriğinde bulunan ve dilüe edilerek 1x’e getirilen yıkama solüsyonundan her kuyucuğa 300 μ l konulmuş daha sonra bu bu solüsyon uzaklaştırılarak yıkama işlemi yapılmıştır. Bu işlem 2 kez daha tekrar edilmiştir. Daha sonra her göze yine kit içeriğinde bulunan

biyotinlenmiş anti-IL-4'den 50'şer µl eklenmiş ve pleyt kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha önce yapılan yıkama solüsyonu kullanılarak pleytin yıkanması adımı tekrar edilmiş ve her göze 100µl Streptavidin-HRP solüsyonu eklenmiş, pleyt kapatılarak oda sıcaklığında 30dk inkübasyona bırakılmıştır. 30 dk sonunda yıkama işlemi tekrar edilmiş ve kullanıma hazır olarak kit içerisinde bulunan TMB substrat solüsyonundan her göze 100µl eklenmiş ve yaklaşık 10dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamada pleytin ışık almasının engellenmesi için pleyt alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Daha sonra her göze H₂SO₄ (durdurma solüsyonu) eklenmiş ve 450 nm'de spektrofotometre kullanarak absorbans ölçülmüştür.

• IL-1β Sitokin Analizi

IL-1β sitokin analizi yapılırken Diaclone İnsan IL-1β ELISA kiti kullanılmış ve bu kite ait protokol uygulanmıştır. Bu protokole göre ilk önce standart eğrisinin çıkartılabilmesi için kit içeriğinde bulunan 96 gözlü pleyt üzerinde 1:1 dilüsyonlarla konsantrasyonları 500 pg/ml ile 15.6 pg/ml arasında değişen standartlar hazırlanmıştır. Bu standartlardan ve blank için standartları çözmek için kullanılan solüsyondan 100µl ilgili gözlere eklenmiştir. Yukarıda gösterilen 96 gözlü pleyt şablonuna bağlı olarak denemesi planlanan örneklerden 100'er µl ilgili kuyucuklara eklenmiş üzerlerine ise 50 µl biyotinlenmiş anti-IL-1β eklenmiştir. Pleyt kapatılarak oda sıcaklığında 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. 3 saat sonra pleyt içerisindeki sıvı boşaltılmış dilüe edilerek 1x'e getirilmiş yıkama solüsyonundan her göze 300'er µl eklenmiş daha sonra bu solüsyon uzaklaştırılarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu yıkama işlemi 2 kez daha tekrarlanmıştır. Daha sonra her kuyucuğa 100 µl Streptavidin-HRP solüsyonu eklenmiş ve 30 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 30 dakikanın sonunda 3 kez yapılan yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Yıkama sonrasında her kuyucuğa 100µl kullanıma hazır olarak kit içeriğinde TMB substrat solüsyonunda eklenmiştir. Bu işlemden sonra yaklaşık 15dk boyunca pleyt oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamada pleytin ışık almasının engellenmesi için pleyt alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Daha sonra her göze H₂SO₄ (durdurma solüsyonu) eklenmiş ve 450 nm'de spektrofotometre kullanarak absorbans ölçülmüştür.

• IL-6 Sitokin Analizi

IL-6 sitokin analizi yapılırken Boster IL-6 ELISA kiti kullanılmış ve bu kite ait protokole göre analiz gerçekleştirilmiştir. Bu protokole göre ilk olarak standart eğrisinin oluşturulabilmesi için konsantrasyonları 300pg/ml ile 4.6875pg/ml arasında değişen standartlar hazırlanmış ve kit içeriğinde bulunan 96 gözlü pleytin ilgili kuyucuklarına 100'er µl eklenmiştir. Blank için ise 100µl standartları çözmek için kullanılan solüsyondan eklenmiştir. Daha sonra yine yukarıdaki şablonda görüldüğü gibi denemede kullanılacak olan örneklerden 100'er µl ilgili kuyucuklara eklenmiş, pleyt kapatılarak 37°C'de 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 2 saat sonra pleytin içerisindeki sıvı uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa 100 µl biyotinlenmiş anti-IL-6 eklenmiştir. Pleytin üzeri tekrar kapatılarak 60 dakika boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 60 dakikanın sonunda her kuyucuğa 300 µl yıkama solüsyonu eklenmiş ve bu solüsyon uzaklaştırılarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve yıkama 2 kez daha tekrarlanmıştır. Yıkama işlemleri sonrasında her kuyucuğa 100'er µl Avidin-Biyotin-Peroksidaz kompleksi eklenmiştir ve pleytin üzeri kapatılarak 37°C'de 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon sonrasında yukarıda belirtildiği şekilde yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama gerçekleştirilmiş ve her kuyucuğa 90'ar µl renk geliştirme reaktifi (Color Developing Reagent) ismi verilen solüsyondan eklenmiştir. Bu işlemden sonra yaklaşık 15dk boyunca pleyt oda sıcaklığında ve karanlıkta (pleytin ışık almasının engellenmesi için pleyt alüminyum folyo ile kaplanarak) inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her göze durdurma solüsyonu eklenmiş ve 450 nm'de spektro-fotometre kullanarak absorbans ölçülmüştür.

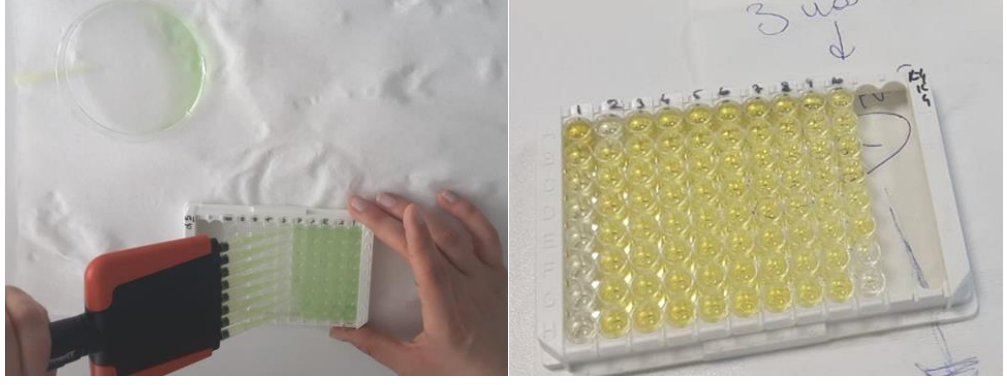
• TNFα Sitokin Analizi

TNFα sitokin analizi yapılırken Boster TNFα ELISA kiti kullanılmış ve bu kite ait protokol dikkate alınarak analiz yapılmıştır. Bu protokole bağlı olarak ilk önce standart eğrisinin çıkartılması için 1:1 dilüsyonlarla konsantrasyonları 1000pg/ml ile 15.625pg/ml arasında değişen standartlar hazırlanmış ve kitin içeriğinde yer alan 96 gözlü pleytin ilgili kuyucuklarına 100'er µl eklenmiştir. Blank için ise 100µl standartları çözmek için kullanılan solüsyondan eklenmiştir. Daha sonra yukarıdaki şablonda görülen şekilde analizi yapılacak örneklerden 100'er µl ilgili kuyucuklara eklenmiş ve üzeri kapatılarak 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. 2 saat sonra kuyucuklara 100'er µl biyotinlenmiş anti-insan TNFRSF1B antikoru eklenmiştir. Daha sonra üstü kapatılıp oda sıcaklığında 90 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 90 dakikanın sonunda dilüsyonla 1x konsantrasyona getirilmiş yıkama solüsyonundan her kuyucuğa 300 µl eklenmiş daha sonra bu solüsyon uzaklaştırılarak yıkama işlemi tamamlanmıştır. Bu işlem 2 kez daha tekrar edilmiştir. Yıkama işlemleri sonrasında

her kuyucuğa 100'er μ l olmak üzere kit içeriğinde bulunan ve analiz öncesinde 1x konsantrasyona getirilmiş olan Avidin-Biyotin-Peroksidaz kompleksinden eklenmiştir. Pleyt üzeri kapatılarak oda sıcaklığında 40dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 40 dakika sonra pleyt daha önce belirtildiği şekilde yıkama solüsyonu kullanılarak 5 kez yıkanmış ve her kuyucuğa 90'ar μ l renk geliştirme reaktifi (Color Developing Reagent) ismi verilen solüsyondan eklenmiştir. Daha sonra yaklaşık 15dk boyunca pleyt oda sıcaklığında ve karanlıkta (pleytin ışık almasının engellenmesi için alüminyum folyo ile kaplanarak) inkübasyona bırakılmıştır. Kuyucuklardaki renk değişimine de bağlı olarak kuyucuklara 100'er μ l durdurma solüsyonu eklenmiş ve 450 nm'de spektrofotometre kullanarak absorbans ölçümü yapılmıştır.

• İnsan IFN- γ Sitokin Analizi

IFN- γ sitokin analizi yapılırken ThermoFisher Scientific İnsan IFN- γ ELISA kiti kullanılmış ve bu kite ait protokol uygulanmıştır. Bu protokole göre ilk olarak kit içerisinde konsantre olarak (20x konsantrasyonunda) kit içerisinde bulunan ve 1x'e dilüe edilmiş olan yıkama solüsyonunda her göze 400 μ l eklenip daha sonra bu solüsyon boşaltılarak yıkama işlemi yapılmış ve bu işlem 2 kez tekrar edilmiştir. Daha sonra standart eğrisinin oluşturulabilmesi için 1:1 dilüsyonlarla konsantrasyonları 100.0 pg/ml ile 1.6 pg/ml arasında değişen 7 standart hazırlanmıştır. Sonra bu standartlardan, blank kuyucuğu için standartları çözmek için kullanılan solüsyondan ve analiz edilmesi planlanan örneklerden 100'er μ l yukarıdaki şablonda şematize edilen ilgili gözlemlere eklenmiştir. Daha sonra her göze 50 μ L biyotin konjugat eklenmiş ve üstü kapatılarak oda sıcaklığına 2 saat boyunca shaker içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında daha önce belirtildiği şekilde üç kez yıkama işlemi yapılmıştır. Daha sonra her göze 100'er μ l dilüe edilerek hazırlanmış olan Streptavidin-HRP eklenmiş ve tekrar shaker içerisine alınarak oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında tekrar yıkama solüsyonu ile üç kez yıkama işlemi yapılmış ve her kuyucuğa 100'er μ l TMB substrat solüsyonu eklenmiştir. Daha sonra yaklaşık 10dk boyunca pleyt oda sıcaklığında ve karanlıkta (pleytin ışık almasının engellenmesi için alüminyum folyo ile kaplanarak) inkübasyona bırakılmış ve sonrasında her göze 100'er μ l durdurma solüsyonu eklenmiştir. Absorbans 450 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçülmüştür.



Şekil 3. 6.ELISA testlerinin yapılışı ve meydana gelen renk değişimleri

3.2.3. Sonuçların



Şekil 3. 7.ELISA testlerinin okutulduğu spektrofotomerte

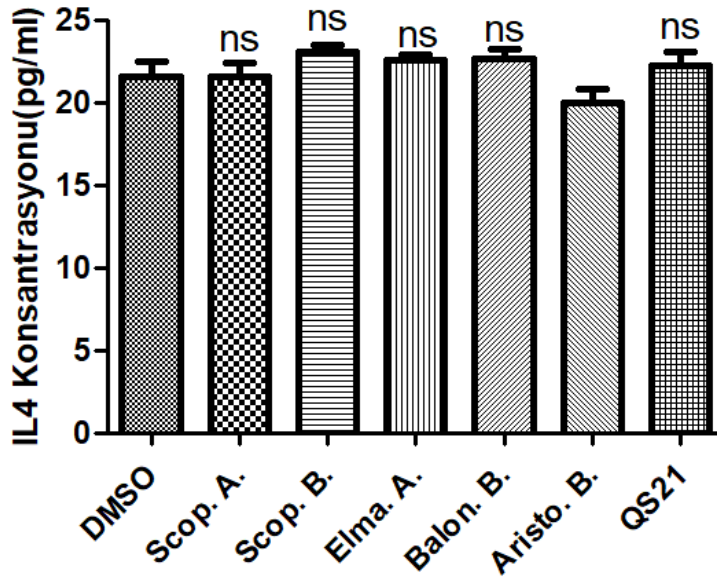
Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Verilerin normalliği SPSS programı kullanılarak incelenmiştir. Farkın istatistiksel anlamlılığı ise GraphPad5 Prism programı kullanılarak One Way ANOVA ve ardından Dunnett Çoklu Karşılaştırma Testi ve Student t testi ile yapılmış, 0.05 veya daha küçük P değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

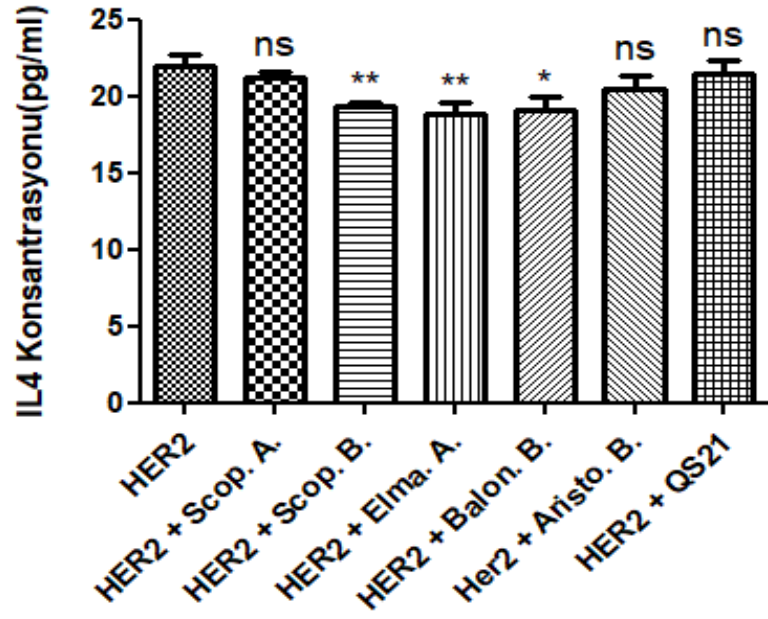
IL-1 β , IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α sitokin analizleri ticari ELISA kitleri kullanılarak ve yöntemler açıklanan kit protokolleri uygulanarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar SPSS programı ile normallik kontrolleri yapıldıktan sonra Graphpad programında One Way ANOVA, Dunnett Çoklu Karşılaştırma Testi ve Student t testi yapılarak istatistiksel analizler gerçekleştirilmiş, bu analizlerin sonuçları aşağıda grafiklerle sunulmuştur.

4.1. IL-4 Sitokin Analizi



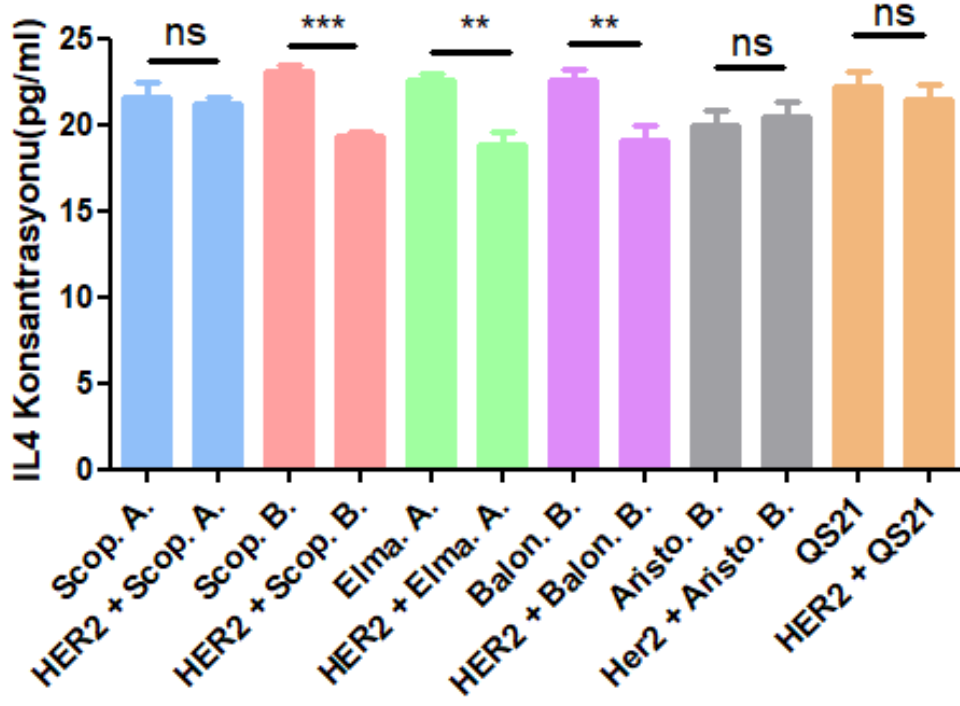
Şekil 4. 1.Saponinlerin PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IL4 seviyesine etkisi

Yapılan ELISA testine göre tam kan kültüründe saponinlerin IL-4 sitokin salınımına etkisi incelenirken saponinlerin çözöldüğü DMSO ile kıyaslama yapılmıştır. Aristatoside B. dışındaki saponinlerin IL-4 salınımını arttırdığı görülse de DMSO ile karşılaştırılarak yapılan t testinde ortaya çıkan p değerlerine göre bu artışta bir anlamlılık olmadığı görölmüştür (Şekil 4.1.).



Şekil 4. 2. Saponin-HER2/neu peptit formülasyonlarının P MA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IL4 seviyesine etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$)

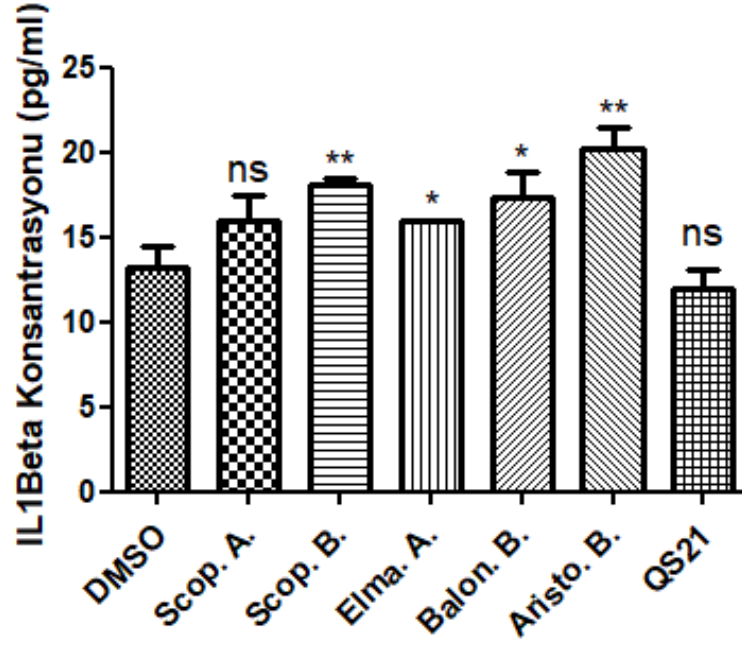
Saponinlerin HER2/neu antijeniyle formülasyon haline getirilerek IL-4 salınımına etkisinin incelendiği gruplarda ise HER2/neu antijeninin tek başına olduğu grupla kıyaslama yapılmıştır. Bu analize göre değerlendirilmesi amaçlanan saponinlerin HER2/neu antijenine göre IL-4 salınımında azalma meydana getirdiği görülmüştür. Scoposide A ($p>0.1$), Aristatoside B ($p>0.05$) ve QS21 ($p=0.5$) saponinlerinin meydana getirdiği azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, Scoposide B ($p<0,01$), Elmalienoside A ($p<0.01$) ve Balansoide B ($p<0.05$) saponinlerinin HER2/neu ile kıyaslandığında IL-4 konsantrasyonunda anlamlı bir azalma meydana getirdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 3. HER2/neu peptidinin PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IL4 seviyesine etkisi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$)

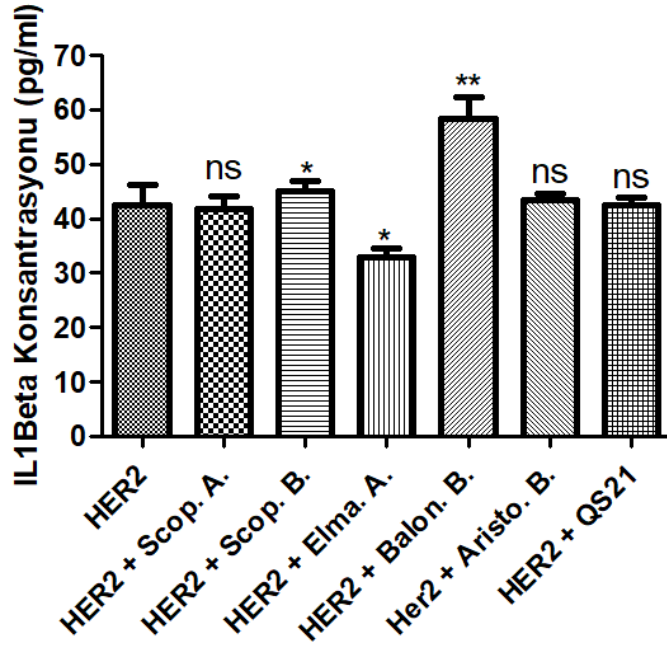
Saponinlerin tek başına olduğu ve HER2/neu antijeniyle formülasyon halinde denendiği gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında ise Scoposide B ($p < 0.001$), Elmalienoside A ($p < 0.001$) ve Balansoide B ($p < 0.001$) IL-4 sitokini salgılamalarının HER2/neu ile birlikte oldukları formülasyonlara göre daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 4.3.).

4.2. IL-1 β Sitokin Analizi



Şekil 4. 4. Saponinlerin PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IL1 β seviyesine etkisi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$)

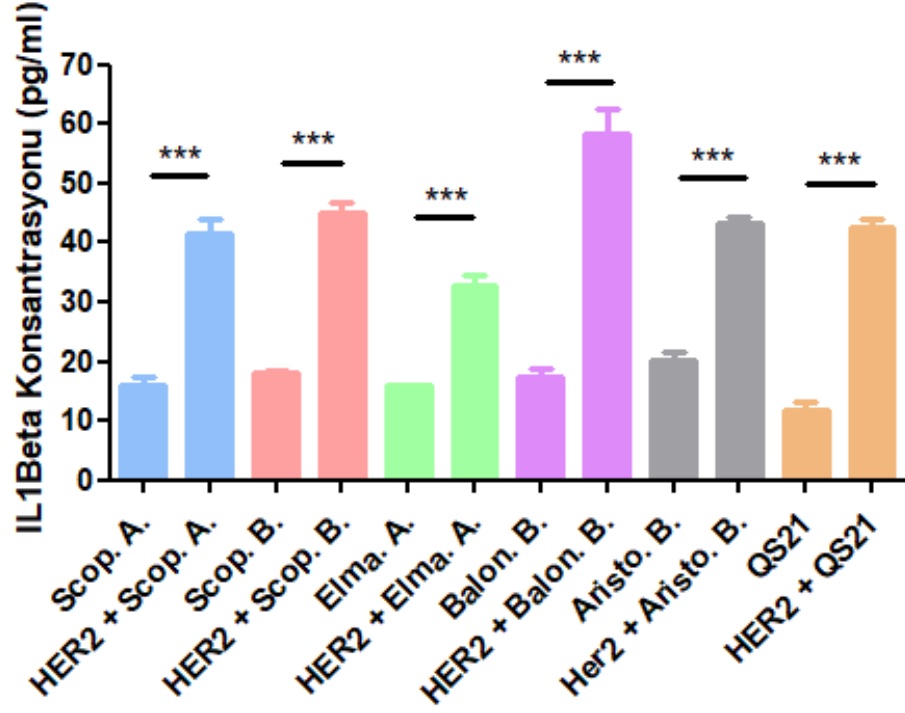
Saponinlerin IL-1 β sitokin konsantrasyonlarının analizinin sonuçlarına bakıldığında Scoposide A ($p > 0.05$) ve QS21 ($p > 0.5$) saponinlerinin DMSO ile olan farklarında anlamlılık bulunamamıştır. Scoposide B ($p < 0.01$), Elmalienoside A ($p < 0.005$), Balansoide B ($p < 0.05$) ve Aristatoside B ($p < 0.005$) de ise sadece DMSO'nun olduğu gruba göre IL-1 β konsantrasyonunda anlamlı bir artış olmuştur. Elmalienoside A saponini ise HER2/neu antijeni ile formüle edildiğinde antijenin tek başına olduğu gruba kıyasla IL-1 β konsantrasyonunda anlamlı bir azalma meydana getirmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.4.).



Şekil 4. 5. Saponin-HER2/neu peptit formülasyonlarının P MA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IL1 β seviyesine etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$)

Saponinlerin HER2/neu antijeniyle bir araya getirildikleri formülasyonların IL-1 β konsantrasyonlarında yarattığı farklılık araştırılırken HER2/neu antijenin tek başına olduğu grupla karşılaştırma yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre HER2/neu antijenin Scoposide A ($p>0.5$), Aristatoside B ($p>0.5$) ve QS-21 ($p>0.5$) saponinleriyle birlikte oldukları gruplarda HER2/neu'nun tek başına olduğu gruba kıyasla anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

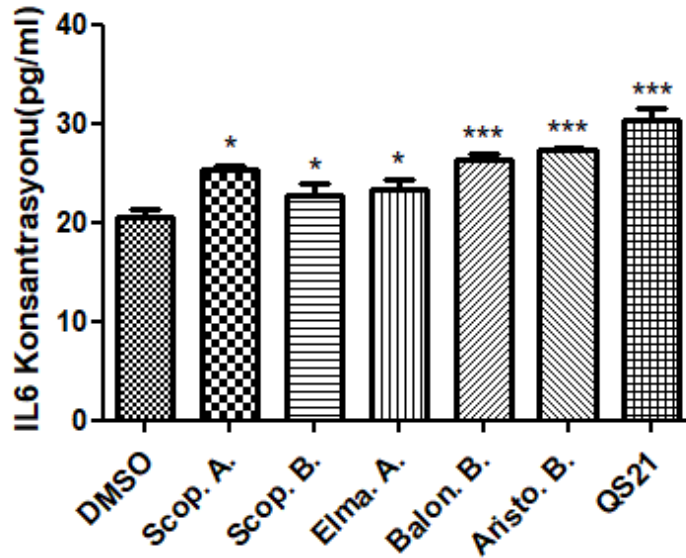
Scoposide B ($p>0.5$) ve Balansoide B ($p<0.01$) saponinlerinin ise HER2/neu antijeniyle birlikte formüle edildikleri hallerinde ise HER2/neu antijenin tek başına olduğu gruba göre IL-1 β konsantrasyonunda anlamlı bir artışa yol açtığı görülmüştür (Şekil 4.5.).



Şekil 4. 6. HER2/neu peptidinin PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IL1 β seviyesine etkisi (*p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001)

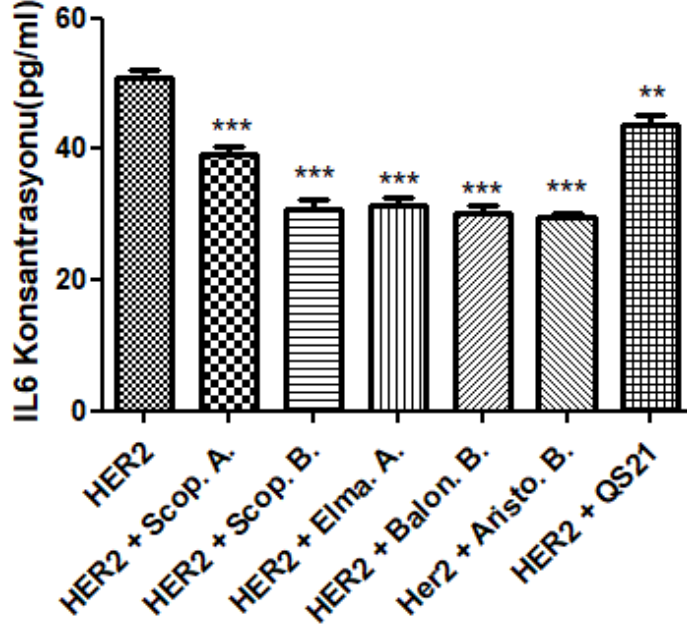
Saponinlerin tek başına olduğu ve HER2/neu antijeniyle formülasyon halinde denendiği gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında ise tüm saponin-HER2/neu formülasyonlarında IL-1 β konsantrasyonlarının daha fazla olduğu görülmüştür.

4.3. IL-6 Sitokin Analizi



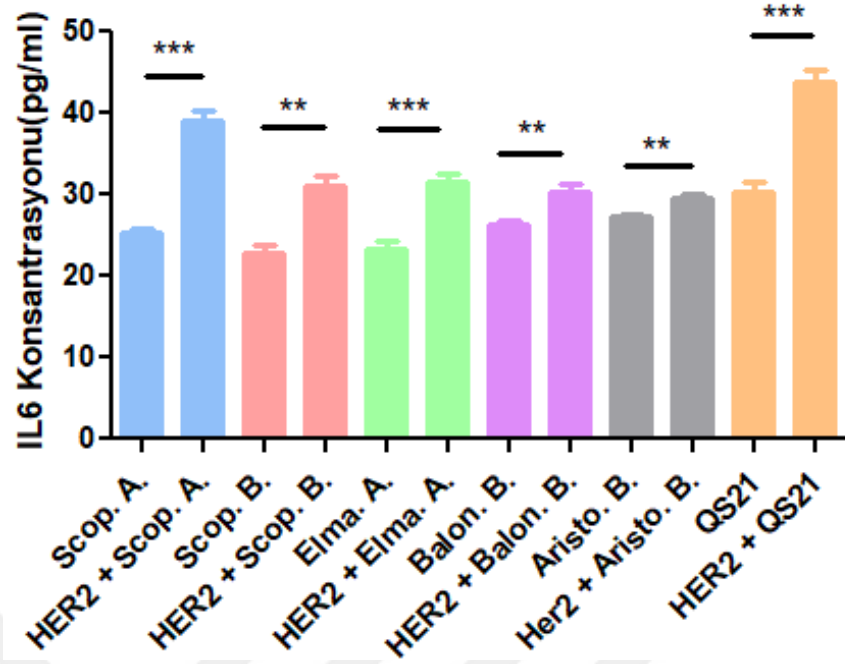
Şekil 4. 7. Saponinlerin PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IL-6 seviyesine etkisi (*p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001)

Saponinlerin IL-6 seviyesinde meydana getirdikleri değişimleri bulmak için yapılan analizler sonucunda tek başına kullanıldığında tüm saponinlerin DMSO'ya göre IL-6 konsantrasyonunda anlamlı bir artışa sebep olduğu görülmüştür. Bu artışı en fazla QS-21 ($p<0.0005$), Aristatoside B ($p<0.0005$) ve Balansoide B ($p<0.001$) saponinlerinde görmek mümkündür. Scoposide A ($p<0.005$), Scoposide B ($p<0.05$) ve Elmalienoside A ($p<0.05$) saponinlerinde ise diğerlerindeki kadar olmasa da DMSO'ya göre anlamlı bir artış vardır (Şekil 4.7.).



Şekil 4. 8. Saponin-HER2/neu peptit formülasyonlarının PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IL-6 seviyesine etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$)

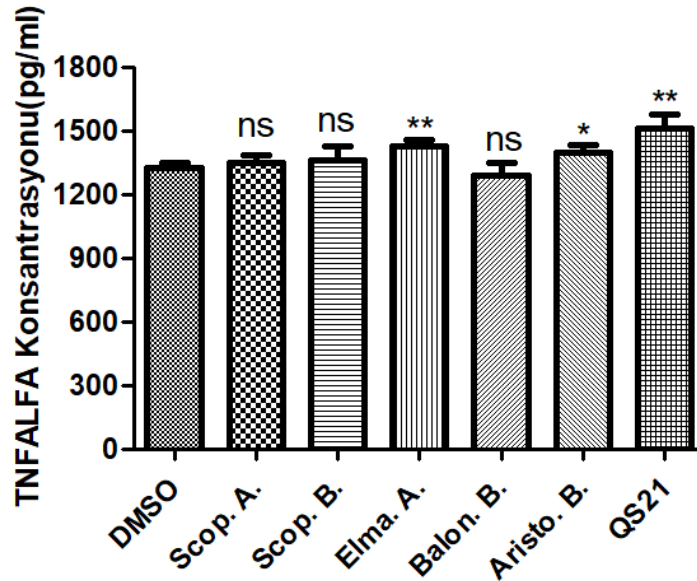
HER2/neu antijeniyle birlikte formüle edilmiş saponin adjuvanlarının IL-6 konsantrasyonları arasında karşılaştırma yapılırken HER2/neu'nun tek başına olduğu grupla kıyaslama yapılmıştır. Bu kıyaslamaya göre saponinlerle yapılan tüm formülasyonlarda HER2/neu'nun tek başına olduğu druba göre IL-6 konsantrasyonunda anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür. En az farklılık QS-21 adjuvanıyla yapılan formülasyonda ($p<0,005$) görülürken araştırılan saponinlerin IL-6 konsantrasyonunda yarattığı farklılık QS-21 adjuvanına göre daha fazladır (Scoposide A ($p<0,0005$), Scoposide B ($p<0,0001$), Elmalienoside A ($p<0,0001$), Balansoide B ($p<0,0001$), Aristatoside B ($p<0,0001$)).



Şekil 4. 9. HER2/neu peptidinin formülasyonlarının PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IL-6 seviyesine etkisi (*p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001)

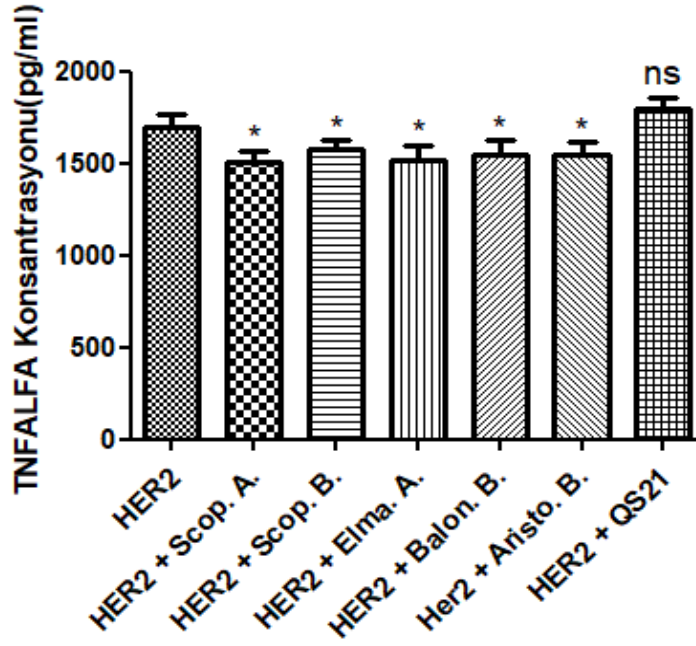
Saponinlerin tek başına olduğu ve HER2/neu antijeniyle birlikte formülasyon olarak hazırlanıp denendiği gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında tüm saponinlerin HER2/neu ile birlikte oldukları formülasyonlarında IL-6 konsantrasyonlarının daha fazla olduğu görülmüştür.

4.4. TNF α Sitokin Analizi



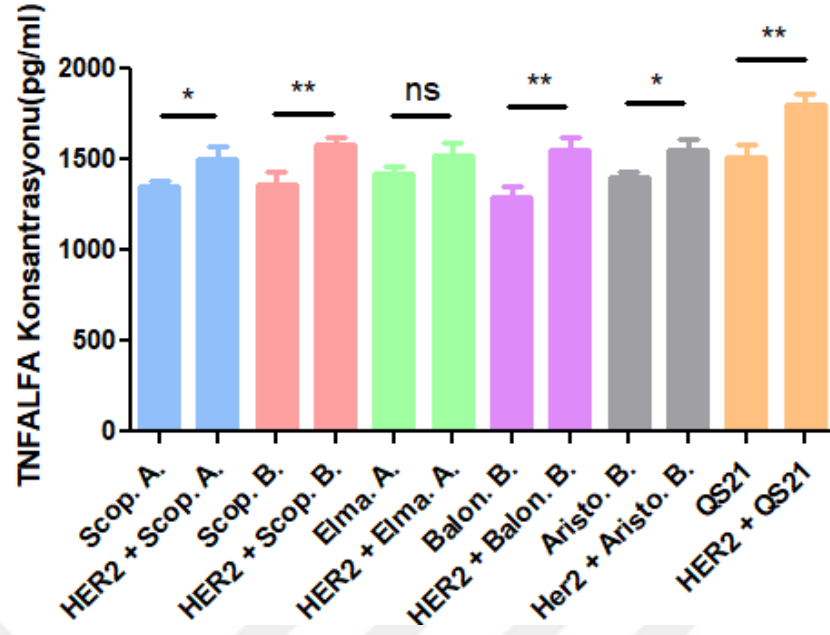
Şekil 4. 10. Saponinlerin PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe TNF α seviyesine etkisi (*p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001)

Saponinlerin TNF- α sitokin konsantrasyonu üzerindeki etkisi incelenirken yapılan istatistiksel analizlerde saponinler, saponinlerin içerisinde çözöldüğü DMSO ile karşılaştırılmıştır. Bu analizin sonuçlarına göre Scoposide A ($p>0.1$), Scoposide B ($p>0.1$) ve Balansoide B ($p>0.1$) saponinlerinin DMSO ile karşılaştırıldığında TNF- α sitokin konsantrasyonu üzerinde anlamlı bir farklılık yaratmadığı görölmüşür. Aristatoside B ($p<0.05$), Elmalienoside ($p<0.01$) ve QS-21 ($p<0.005$) saponinleri ise TNF- α sitokin konsantrasyonlarını anlamlı bir şekilde arttırmıştır.



Şekil 4. 11. Saponin-HER2/neu peptit formülasyonlarının PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe TNF α seviyesine etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$)

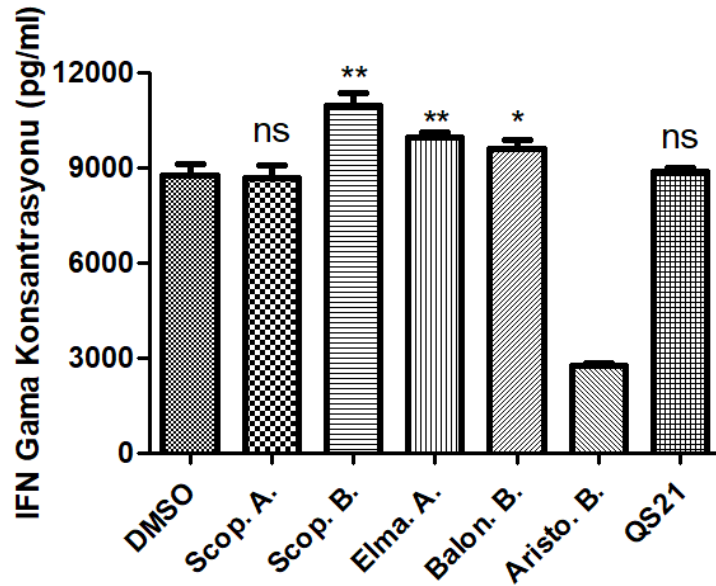
HER2/neu antijeniyle birlikte formüle edilmiş saponin adjuvanlarının TNF- α sitokin konsantrasyonları arasında karşılaştırma yapılırken HER2/neu'nun tek başına olduğu gruba kıyaslama yapılmıştır. Bu kıyaslamaya göre QS-21 saponini kullanılarak hazırlanan formülasyonda HER2/neu'nun tek başına olduğu gruba göre anlamlı bir farklılık olmadığı görölmüşür ($p>0.05$). Araştırılması planlan diğer saponinlerin ise TNF- α sitokin konsantrasyonunu anlamlı bir şekilde azalttığı görölmüşür (Scoposide A ($p<0.05$), Scoposide B ($p<0.05$), Elmalienoside A ($p<0.05$), Balansoide B ($p<0.05$), Aristatoside B ($p<0.05$)).



Şekil 4. 12. Saponin-HER2/neu formülasyonlarının PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe TNF α seviyesine etkisi (*p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001)

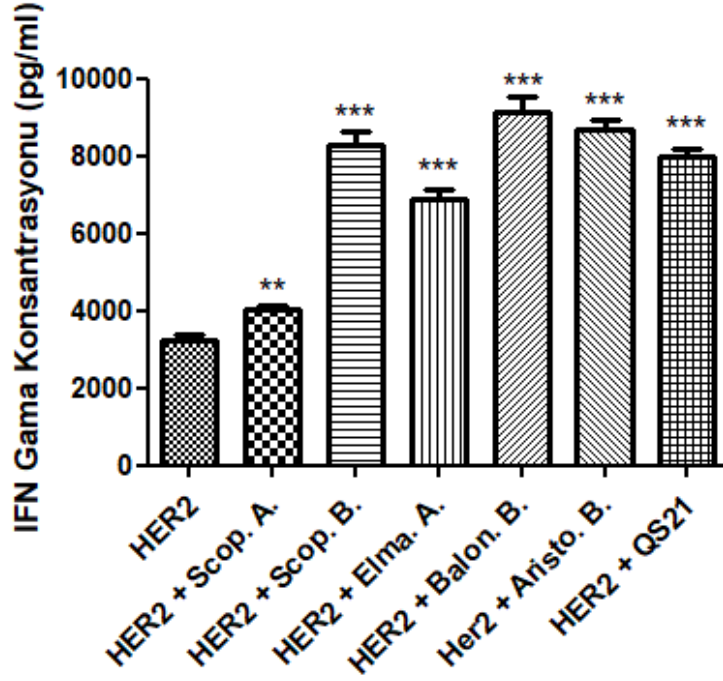
Saponinlerin tek başına olduğu gruplar ile HER2/neu antijeniyle birlikte formülasyon olarak hazırlanıp denendiği gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında Elmalienoside A hariç tüm saponinlerin HER2/neu ile birlikte oldukları formülasyonlarında TNF- α sitokin konsantrasyonlarının anlamlı bir şekilde daha fazla olduğu görülmüştür.

4.5. IFN- γ Sitokin Analizi



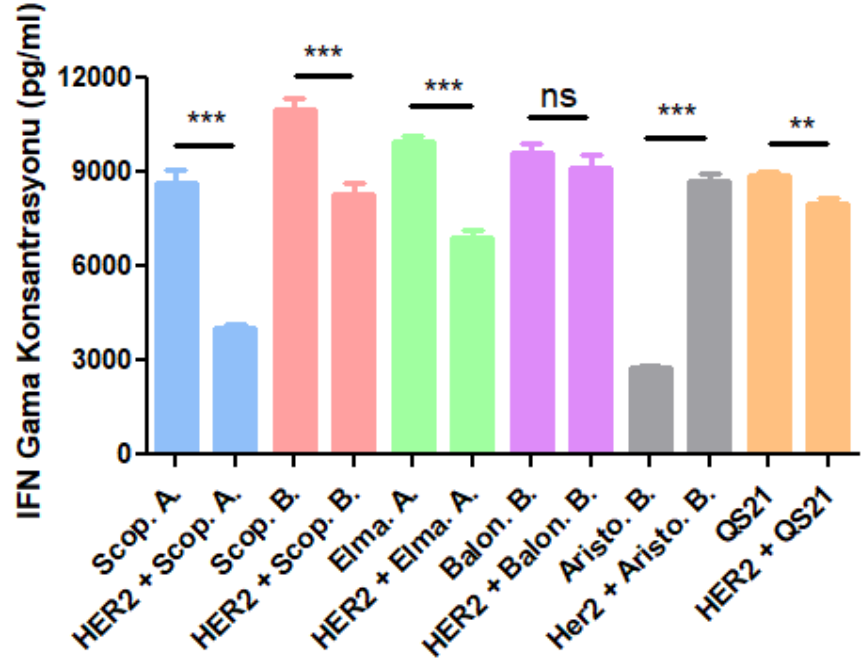
Şekil 4. 13. Saponinlerin PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe TNF α seviyesine etkisi (*p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001)

Farklı saponinlerin IFN- γ sitokin konsantrasyonu üzerindeki etkisi incelenirken yapılan istatistiksel analizlerde saponinlerin olduğu grupların IFN- γ sitokin konsantrasyonları ile saponinlerin içerisinde çözöldüğü DMSO'nun IFN- γ sitokin konsantrasyonu karşılaştırılmıştır. Bu analizin sonuçlarına göre Scoposide A ($p>0.5$) ve QS-21 ($p>0.5$) saponinlerinin IFN- γ sitokin konsantrasyonu üzerinde anlamlı bir farklılık yaratmadığı görölmüştür. Scoposide B ($p<0.005$), Elmalienoside A ($p<0.01$) ve Balansoide B ($p<0.05$) saponinlerinin ise IFN- γ sitokin konsantrasyonunda anlamlı bir artışa sebep olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4. 14. Saponin-HER2/neu peptit formülasyonlarının PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IFN- γ seviyesine etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$)

HER2/neu antijeniyle birlikte formüle edilmiş saponin adjuvanlarının IFN- γ konsantrasyonları arasında karşılaştırma yapılırken HER2/neu'nun tek başına olduğu grupla kıyaslama yapılmıştır. Bu karşılaştırmanın sonucunda Her/neu antijeniyle saponinlerin bir araya getirilmesiyle oluşturulan tüm formülasyonların HER2/neu'nun tek başına olduğu grupla kıyaslandığında IFN- γ konsantrasyonunda anlamlı bir artış meydana getirdikleri görölmüştür (Scoposide A ($p<0.005$), Scoposide B ($p<0.0001$), Elmalienoside A ($p<0.0001$), Balansoide B ($p<0.0001$), Aristatoside B ($p<0.0001$), QS21 ($p<0.0001$)).



Şekil 4. 15. Saponin- HER2/neu formülasyonlarının PMA+iyonomisin ile indüklenen kan kültüründe IFN- γ seviyesine etkisi

Saponinlerin tek başlarına oldukları ve HER2/neu ile formülasyon haline getirildikleri hallerindeki IFN- γ konsantrasyonları birbirleri ile kıyaslandığında Aristatoside B dışındaki tüm saponinlerin tek başlarına oldukları gruplardan IFN- γ konsantrasyonlarının daha fazla olduğu görülmüştür. Aristatoside B saponinin tek başına olduğu grupta meydana gelen beklenmeyen azalmanın deneysel hatalardan meydana gelebileceği düşünülmektedir.

Tablo 4. 1. Saponinlerin tek başına oldukları grupların DMSO'ya göre sitokin seviyelerinde meydana getirdikleri değişimler (ns : anlamlı bir değişim yok, + : pozitif yönde değişim, - : negatif yönde değişim)

Bileşik	IL4	IL1 β	IL6	TNF α	IFN γ
QS-21	ns	ns	+	+	ns
Aristatoside B	ns	+	+	ns	-
Scoposide A	ns	ns	+	+	ns
Scoposide B	ns	+	+	ns	+
Elmalienoside A	ns	+	+	ns	+
Balansoide B	ns	+	+	+	+

Tablo 4. 2. Her2/neu peptidi ile yapılan formülasyonların HER/neu'nun tek başına olduğu gruba kıyasla Sitokin seviyelerinde meydana getirdiği değişimler (ns : anlamlı bir değişim yok, + : pozitif yönde değişim, - : negatif yönde değişim)

Bileşik	IL4	IL1 β	IL6	TNF α	IFN γ
Her2+QS-21	ns	ns	-	ns	+
Her2+Aristatoside B	ns	ns	-	-	+
Her2+Scoposide A	ns	ns	-	-	+
Her2+Scoposide B	-	+	-	-	+
Her2+Elmalienoside A	-	-	-	-	+
Her2+Balansoide B	-	+	-	-	+

Tablo 4. 3. Saponin+Her2/Saponin oransal bilgileri (ns : anlamlı bir değişim yok, + : pozitif yönde değişim, - : negatif yönde değişim)

Bileşik	IL4	IL1 β	IL6	TNF α	IFN γ
Her2+Scoposide A /Scop A	ns	+	+	+	-
Her2+Aristatoside B/Scop B	+	+	+	+	-
Her2+Elmalienoside A/Elma A	+	+	+	ns	-
Her2+Balansoide B/Balon B	+	+	+	+	Ns
Her2+Aristatoside B/Aristo B	ns	+	+	+	+
Her2+QS-21/QS-21	ns	+	+	+	-

5. TARTIŞMA

Yapılan bu tez çalışmasında ülkemizde endemik olarak yetiştirilen *Cephalaria spp.* türlerinden elde edilen; Aristatoside B, Scoposide A, Scoposide B, Elmalienoside A, Balansoide B, saponinlerinin peptid bazlı HER2-pozitif meme kanseri aşı formülasyonunlarında adjuvan kullanım potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla saponinlerin HER2/neu peptit antijeni ile immün yanıt oluşumuna etkisi insan tam kan kültüründe sitokin analizleri yapılarak belirlenmiştir.

CD4 + yardımcı T hücreleri esas olarak tümör immünolojisine katılırlar ve indükleyici ajanlara göre sitokinler aracılığıyla immünolojik rollere göre işlevsel olarak farklı alt gruplara Th1, Th2 ve Th17 e farklılaşırlar. Th1 sitokinleri IL-1 β , IL-2, IL-12, TNF- α , ve IFN- γ ; Th2 sitokinleri IL-4, IL-5 ve IL-10; Th17 sitokinleri IL-17, IL-21 ve IL-22 olarak sayılabilir (Lee et al., 2019). Bu çalışmada ELISA ile analiz edilen IL-4, IL-1 β , IL6, TNF α , IFN- γ sitokinleri Th1 ve Th2 enflamatuvar yanıtı belirlemek için seçilmiştir.

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen, tüm kanser türleri içinde ise en yaygın görülen ikinci kanser türüdür. Her yıl 1,5 milyondan fazla kadın (tüm kadınların% 25'i) meme kanserine yakalanmaktadır (Bray et al., 2018). Çok sayıda meme kanseri tedavisi olmasına rağmen, radyoterapi, kemoterapi ve hormon tedavisi gibi geleneksel tedavilerin etkinliği, tedaviye direnç nedeniyle sınırlıdır. Son birkaç yılda, kanser immünoterapisi ile ilgili gelişmeler, kanser tedavisinde paradigma değişikliğine yol açmıştır. Kanser immünoterapisi, hastanın bağışıklık sistemini kansere karşı savaşmak için değiştiren ve / veya geliştiren herhangi bir tedaviyi ifade eder. Son zamanlarda kanser immünoterapisi ile yapılan çalışmalar bir dizi kanser için hayatta kalmada sürelerinde iyileşmeler olduğunu göstermiştir (Nathan and Schmid, 2017). Yirmi yıl önce meme kanserinin immünojenisitesi hakkında çok az şey biliniyordu. İlerleyen çalışmalarla birlikte ise meme kanseri, lezyonda bağışıklık sistemi hücrelerinin varlığı için en sık çalışılan tümörlerden biri haline gelmiş ve devam eden klinik çalışmaların puanları, meme kanseri tedavisi ve önlenmesinde immünoterapinin önemini arttırmıştır (Disis and Stanton, 2017). Bağışıklık kontrol noktası blokajı, kemoterapi ve / veya moleküler olarak hedeflenmiş ajanları içerebilen diğer ilaçlarla birlikte bağışıklık efektörlerini aktif olarak indüklemek için kanser aşısının kullanılması dikkat çekici bir stratejidir (Solinas et al., 2020).

Kanser aşıları, kanserin gelişimini önlemek veya önlemek ve yerleşik tümör yüklerini azaltmak için test edilmiştir. Meme kanseri tedavisi veya önlenmesi için henüz onaylanan bir aşı bulunmamaktadır. Kanser aşılarının ana avantajları düşük toksisite, oldukça spesifik adaptif bağışık yanıtın oluşumu ile tedavi etkinliğini arttıracak potansiyele sahip immünolojik hafıza oluşturulmasıdır. Meme kanseri, melanom ve serviks kanserini takiben kanser aşılması için en çok çalışılan üçüncü tümörü temsil eder. Meme kanserinde hedeflenen en yaygın tümörle ilişkili antijenler HER2, MUC-1, karsinoembriyonik antijen (CEA) ve hTERT'dir (Solinas et al., 2020).

HER2 temelli aşı çalışmaları son 20 yıldır büyük ilgi görmekte; DNA, peptid ve protein aşıları gibi çeşitli HER2 hedefleme aşıları ile ilgili klinik araştırmalar devam etmektedir (Tian et al., 2018). İmmünojenik özelliğe sahip HER2 peptidi, HER2 pozitif meme kanserine karşı güçlü HER2 spesifik Th1 yanıtı indüklemesi ile tedavide etkin olacağı düşünülmekte olup erken faz aşı klinik çalışmalarında araştırılmaktadır (Costa et al., 2017). Kanser aşıları, tıpkı diğer aşılar gibi, antikorların üretimini arttırarak ve daha uzun süreli bir kapsama alanı sunarak, böylece enjekte edilmesi gereken antijen miktarını azaltarak bağışıklık tepkisini optimize eden adjuvanların ilavesinden yararlanır. Adjuvanlar, aşı potansiyelinin arttırmada, anijen dozunu azaltmada, stabilite güvenlik ve biyoyararlanım sorunlarının üstesinden gelmede önemli bir role sahiptir (Ruggiero and Pacini, 2018; Yakubogulları et al., 2019). Adjuvan kullanımıyla birlikte immunojenitesi düşük olan antijenlerin immunojenitesinde artış sağlanırken, daha az miktarda antijen kullanılarak immün yanıt indüklenebilmekte ve aşının etkinlik süresi uzatılabilmektedir (Gin and Slovin, 2011). Bu amaçla geliştirilen ve 1926 yılında klinik olarak onay almış ilk adjuvan alum adjuvanıdır. Ancak, aşı üretiminde alüminyum adjuvanının kullanılması kısıtlar mevcuttur. Alum sadece antijene özgü Th2 bağışıklık hücrelerini uyarır ve bunun sonucunda IL-4, IL-5 ve IL-10 salgılanması ve buna bağlı olarak antijen spesifik antikor üretimi meydana getir. Her ne kadar alum insan kullanımı için onaylanan ilk adjuvan olsa da, özellikle viral enfeksiyondan korunmak için sitotoksik toksik T lenfosit (CTL) tepkilerini indüklemekte yetersiz kalabilmekte ayrıca alerjiye sebep olabilmektedir (Ebensen et al., 2019; Sivakumar et al., 2011).

Saponinler, immünomodülatör, antitümör, antienflamatuar, antiviral, antifungal, hipoglisemik, hipokolesterolemik gibi birçok farklı biyolojik ve farmakolojik etki sergileyen steroid veya triterpenin doğal glikozidleridir. QS-21 gibi triterpen saponin adjuvanları, genellikle sırasıyla monodesmosidik veya

bidesmosidik glikozitler olmak üzere ester bağları ve / veya O-heterosidik bağlarla bağlanan bir veya iki hidrofilik sakarit zinciri içeren amfifilik glikozitlerdir (Marciani, 2018; Sun et al., 2009). Saponinler özellikle memeli bağışıklık sistemini aktive edebilmelerinden dolayı aşı adjuvanları olarak önemli potansiye sahiptirler. Saponinler, proinflamatuvar Th1 / Th2 veya tek anti enflamatuvar Th2 immünitelerini indükleyebilir (Marciani, 2018; Skene and Sutton, 2006).

Günümüzde aşı çalışmalarında en çok dikkat çeken ve yaygın olarak kullanılan saponin adjuvanı olan QS-21 çeşitli kanser aşı adjuvan sistemlerinde kullanılmaktadır. Bu sistemlere örnek olarak Glaxo-Smith-Kleine (GSK) firması tarafından geliştirilen adjuvan sistemleri gösterilebilir. Bu firma tarafından geliştirilen formülasyonlardan olan AS2 ve AS15 QS-21 saponini içermekte ve kansere karşı kullanılmaktadır (Garçon and Pasquale, 2016; Gin and Slovin, 2011). QS-21 adjuvanının meme kanseri aşılarda denendiği çalışmalar da bulunmaktadır. Gilewski ve arkadaşları (2000) meme kanseri hastalarında MUC1-key limpet hemosiyanin (KLH) konjugatı ve QS-21 adjuvan kullanarak yaptıkları aşılama MUC1 peptidine ve tümör hücresinde bulunan MUC1'e karşı bir immün yanıt etkinliğini çalışmışlardır. Meme kanseri öyküsü olan dokuz hastaya 100 µg MUC1 ve 100 µg QS-21 içeren MUC1-KLH konjugatı + QS-21 uygulanmıştır. Hastalardan düzenli olarak alınan periferik kan analizlerinde sentetik MUC1'e karşı yüksek IgM ve IgG antikor titreleri tespit edilmiştir (Gilewski et al., 2000). Aynı araştırmacılar meme kanseri hücrelerinde yaygın olarak bulunan karbohidrat antijen globo H'i aşı tedavisi için potansiyel bir hedef olarak kullanmış ve yaptıkları faz I çalışması ile üç sentetik globo H-key limpet hemosiyanin konjugat + QS-21 aşı formülasyonunun toksisitesini ve immünojenisitesini belirlemişlerdir. 27 metastatik meme kanseri hastasına beş doz aşı uygulayarak sonuçta aşının iyi tolere edildiğini, minimal IgG antikor stimülasyonu ile IgM antikor titlerinde artış olduğunu göstermişlerdir (Betz et al., 2001). Bir başka çalışmada ise QS-21 adjuvanı riskli meme kanseri hastalarının sTn-KLH aşı formülasyonuna ilaveten immünizasyonunda da kullanılmıştır. sTn peptidini ifade eden tümörlere karşı klinik toksite ve antijen yanıtını belirlemek için yürütülen klinik çalışmada 27 adet evre II, III ve IV hastalarına 5 doz aşı uygulanmıştır. Enjeksiyon bölgesinde geçici lokal deri reaksiyonları ve hafif grip benzeri semptomlar görülmüş olsa da tüm hastalar sTn 'ye karşı anlamlı IgM ve IgG antikor titreleri geliştirmiştir (Gilewski et al., 2007). Ayrıca grubumuz tarafından gerçekleştirilen HER2 / neu pozitif meme kanserine karşı QS-21 adjuvanı ile birlikte dendritik hücre bazlı bir aşının anti-PD-L1 monoklonal antikoruna ile birlikte kombinasyonun denendiği çalışmada elde edilen tümör boyutları ve tümöre özgü immün yanıtlar açısından ümit verici sonuçlar elde edilmiştir (Özverel, 2018).

Ülkemizde ve dünyada artan aşı çalışmalarına paralel olarak yeni aşı adjuvanlarına olan ihtiyacı da beraberinde getirmekte ve aşı adjuvanı çalışmaları da buna bağlı olarak günden güne hız kazanmaktadır. QS-21'in meme kanseri aşıları için adjuvan olarak kullanımının olumlu sonuçları ve aşı adjuvanlarına duyulan ihtiyacın hızlı artışı göz önüne alındığında farklı saponinlerin de meme kanseri aşısı için potansiyel aşı adjuvanları olarak kullanımları önem arz etmektedir.

Bu çalışmada da daha önce grubumuz tarafından izolasyonu yapıp immünomodülatör etkileri, hemolitik özellikleri ve sitotoksik aktiviteleri incelenen (Sarıkahya et al., 2018; Top et al., 2017) saponinlerin HER2 pozitif meme kanseri aşılarında adjuvan olarak kullanım potansiyeli değerlendirilmiştir.

Bu kapsamda HER2/neu antijeni ile Aristatoside B, Scoposide A, Scoposide B, Elmalienoside A, Balansoide B saponin formülasyonlarının *in vitro* şartlarda pma+iyonomisin ile indüklenen tam kan kültüründe sitokin düzeylerine etkisi araştırılmıştır.

Bu amaçla ELISA kitleri kullanılarak IL-4, IL-1 β , IL6, TNF α ve IFN- γ için sitokin analizleri gerçekleştirilmiştir. IL-4, TH2 farklılaşmasında önemli bir rol oynayarak ve immünoglobulin tiplerini değiştirerek B hücresi aktivitelerini düzenlemektedir (Patra et al., 2019). Artmış IL-4 seviyelerinin, hayvanların tümörlerinde ve birden fazla primer ve metastatik kanser tipine sahip hastalarda yaygın olduğu tespit edilmiştir. Klinik kanıtlar, IL-4'ün tümörü teşvik eden bir sitokin olarak hareket edebileceğini düşündürmektedir. Bu, IL-4'ün tümör büyümesini kolaylaştırabildiğini ve IL-4 sinyallemesinin bloke edilmesinin kanser hücresi çoğalmasında önemli ölçüde geciktirebileceğini gösteren hayvan modellerindeki çalışmalarla tutarlıdır (Ito et al., 2017). Gaggianesi ve arkadaşlarının (2017) yaptığı bir çalışmada da metastatik eğilimli meme kanseri hücrelerinin DUSP4'ün aşağı regülasyonu ile birlikte yüksek IL-4 seviyeleri eksprese ettiğine dair kanıt sağlanmış ve meme kanseri hastalarının nüksüz sağkalımı ile IL-4 ekspresyonu arasındaki ters korelasyon ile doğrulanmıştır. Bu amaçla immün yanıt potansiyellerini belirlemek için ELISA ile IL-4, IL-1 β , IL6, TNF α ve IFN- γ için sitokin analizleri gerçekleştirilmiştir. IL-4, Th2 farklılaşmasında önemli bir rol oynayarak ve immünoglobulin tiplerini değiştirerek B hücresi aktivitelerini düzenlemektedir (Patra et al., 2019). Çalışmamızda saponinlerin IL-4 düzeyindeki etkilerini incelediğimizde saponinlerin tek başlarına IL-4 seviyesinde anlamlı bir farklılığa neden olmadığı görülmüştür. Ancak HER2/neu antijeniyle bir araya getirilen formülasyonlarda Scoposide B ($p < 0.01$),

Elmalienoside A ($p<0.01$) ve Balansoide B ($p<0.05$) saponinlerinin HER2/neu antijeninin tek başına olduğu grup ile kıyaslandığında IL-4 konsantrasyonunda anlamlı bir azalma meydana getirdikleri gözlemlenmiştir. IL-4'ün tümör büyümesini kolaylaştırıcı etkileri ve IL-4 ekspresyon seviyesi ile meme kanseri hastalarında sağ kalım arasındaki ters orantının gösterildiği çalışmalar göz önüne alındığında bu saponinlerin IL-4 konsantrasyonunda meydana getirdikleri anlamlı azalmanın meme kanseri aşılarda adjuvan olarak kullanılma potansiyeli için olumlu bir etki olduğu söylenebilir. Grenfell ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir çalışmada da saponin adjuvanı kullanılan iki farklı aşının BALB / c farelerinin *Leishmania chagasi* enfeksiyonuna karşı korumadaki etkinlikleri test edilmiş, aşı formülasyonlarının farelerdeki IL-4 sitokinini baskıladığı görülmüştür (Grenfell et al., 2010). Bu anlamda saponinlerin IL-4 konsantrasyonu üzerinde meydana getirdikleri azalma literatür ile uyumludur. Saponinlerin tek başına olduğu ve HER2/neu antijeniyle formülasyon halinde denendiği gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında ise Aristatoside B dışındaki tüm saponinlerin IL-4 sitokini salgılamalarının HER2/neu ile birlikte oldukları formülasyonlara göre daha fazla olduğu görülmüştür. Bu da HER2/neu antijenin IL4 konsantrasyonunu azaltma yönünde bir etkisi olduğunu göstermektedir. IL4'ün Th2 bağışıklık yanıtı için bir belirteç olduğu göz önüne alındığında HER2/neu antijeniyle bir araya getirilen Scoposide B, Elmalienoside A ve Balansoide B saponinlerinin Th2 yanıtını baskılayıcı bir etkiye yol açtıkları söylenebilir.

IL-1 β 'nın kanser üzerindeki etkilerine bakıldığında esas olarak NF- κ B aktivasyonuna bağlı olarak kanser hücreleri immün kaçış kabiliyetini artırırken aynı zamanda antiapoptotik proteinin (BIRC3) yukarı regülasyonuna bağlı olarak meme kanserinin doksorubisine karşı olan direncini arttırdığı bilinmektedir (Tan and Hu, 2018). Ayrıca IL-1 β 'nın stimülasyonunun pek çok farklı kanserler çeşidinde hücre invazyonu, epitel mezenkimal geçiş (EMT) ve metastaz ile ilişkili agresif tümör biyolojisini tetiklediği ortaya konmuştur (Jeon et al., 2016). IL-1 β 'nın pro-tümörjenik sitokinlerin ekspresyonunu ve üretimini sağlamada önemli bir rol oynamaktadır. IL-1 β , meme kanseri hücrelerinde IL-6 üretiminin yanı sıra TGF- γ , TNF- α ve EGF gibi diğer sitokin ve büyüme faktörlerini indüklemiştir. Meme kanseri hücrelerinde, epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) ve kök hücre benzeri fenotiplerin, anti-IL-6 veya anti-IL-1 β antikör tedavisi ile zayıflatıldığı görülmüştür. Ancak farklı bir çalışmada ise lenf nodu pozitif meme kanseri olan hastalarda yüksek primer tümör IL-1 β ekspresyonunun olduğunu genel sağkalım ve uzak metastazsız sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Baker et al., 2019).

Bizim çalışmamızda ise saponinlerin tek başına denendiği gruplar arasında Scoposide A ($p>0.05$) ve QS21 ($p>0.1$) saponinlerinin DMSO ile olan farklarında anlamlılık bulunamamıştır. Scoposide B ($p<0.005$), Elmalienoside A ($p<0.005$), Balansoide B ($p<0.05$) ve Aristatoside B ($p<0.005$) de ise sadece DMSO'nun olduğu gruba göre IL-1 β konsantrasyonunda anlamlı bir artış olmuştur. HER2/neu antijenin Scoposide A ($p>0.5$), Aristatoside B ($p>0.5$) ve QS-21 ($p>0.5$) saponinleriyle birlikte oldukları gruplarda HER2/neu'nun tek başına olduğu gruba kıyasla anlamlı bir farklılık bulunamazken, Scoposide B ($p<0.05$) ve Balansoide B ($p<0.01$) saponinlerinin ise HER2/neu antijeniyle birlikte formüle edildikleri hallerinde ise HER2/neu antijenin tek başına olduğu gruba göre IL-1 β konsantrasyonunda anlamlı bir artışa yol açtığı görülmüştür. Elmalienoside A saponini ise HER2/neu antijeni ile birlikte formüle edildiğinde antijenin tek başına olduğu gruba kıyasla IL-1 β konsantrasyonunda anlamlı bir azalma meydana getirmiştir ($p<0.05$). Saponinlerin tek başına olduğu ve HER2/neu antijeniyle formülasyon halinde denendiği gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında ise tüm saponinlerin HER2/neu ile birlikte oldukları formülasyonlarında IL-1 β konsantrasyonlarının daha fazla olduğu görülmüştür. Balansoide B, Scoposide B, Elmalienoside A saponinlerinin IL-1 β konsantrasyonunda meydana getirdiği bu anlamlı artış grubumuzun önceki çalışmalarıyla da örtüşmektedir (Sarıkahya et al., 2018; Top et al., 2017). Bu sonuca bakarak HER2/neu antijenin IL-1 β salgılanmasında pozitif yönlü bir etki yaptığı söylenebilir. Literatürde meme kanseri hastaları üzerinde yapılan çalışmalarda IL-1 β 'nin hem protümörjenik hem de antitümörjenik etkileri olduğu gösterilmiştir. Buna dayanarak çalışmamızda kullanılan saponinlerin IL-1 β sitokinini artırma ve baskılama yönünde yaptıkları etkileri pozitif ve negatif olarak değerlendirebilmek için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

IL-6, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını artırarak pro-tümörjenik bir etki yapabilmektedir. (Basu et al., 2019). IL-6 ve IL-6Ra, meme tümör invazyonunu ve metastazını teşvik eder (Baxevanis et al., 2019). IL-6 genel olarak bir tümör mikroçevresinde pek istenmez. Yapılan çalışmalarda TLR7 tarafından IL-6 üretimindeki artışın, insan miyelom hücrelerinde tümör hücresi sağkalımını arttırdığı bildirilmiştir (Patra et al, 2019). Meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanserde serum ve tümör bölgesindeki artmış IL-6 seviyeleri gösterilmiştir. Bu artışa genellikle meme kanseri hastalarında kötü prognoz ve daha düşük sağkalım eşlik ederken, IL-6'nın down regülasyonu tedaviye daha iyi yanıt verilmesiyle ilişkilidir. IL-6, proliferasyon, apoptoz, metabolizma, hayatta kalma, anjiyogenez ve metastazı düzenleyerek tümör oluşumu sürecinin tüm yönlerini

etkileyebilir. IL-6 ayrıca çoklu ilaç direnci (MDR) gibi bir tümör terapötik direncini modüle edebilir (Masjedi et al., 2018). Ayrıca meme kanseri hücrelerinde IL-6 aktivasyonu, özellikle NF- κ B indüksiyonu ve fokal adezyon kinaz (Fak) fosforilasyonuna bağlı radyo-direnç kazanımı ile ilgilidir (Tan and Hu, 2018).

Yaptığımız çalışmada tek başına kullanıldığında tüm saponinlerin DMSO'ya göre IL-6 konsantrasyonunda anlamlı bir artışa sebep olduğu görülmüştür. Bu artışı en fazla QS-21

($p < 0.0005$), Aristatoside B ($p < 0.0005$) ve Balansoide B ($p < 0.001$) saponinlerinde görmek mümkündür. Scoposide A ($p < 0.005$), Scoposide B ($p < 0.05$) ve Elmalienoside A ($p < 0.05$) saponinlerinde ise diğerlerindeki kadar olmasa da DMSO'ya göre anlamlı bir artış göstermiştir. HER2/neu antijeniyle birlikte formüle edilmiş saponin adjuvanlarının IL-6 konsantrasyonları arasında karşılaştırma yapıldığında ise yapılan tüm formülasyonlarda HER2/neu'nun tek başına olduğu gruba göre IL-6 konsantrasyonunda anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür. En az farklılık QS-21 adjuvanıyla yapılan formülasyonda ($p < 0.005$) görülürken araştırılan saponinlerin IL-6 konsantrasyonunda yarattığı farklılık QS-21 adjuvanına göre daha fazladır (Scoposide A ($p < 0.0005$), Scoposide B ($p < 0.0001$), Elmalienoside A ($p < 0.0001$), Balansoide B ($p < 0.0001$), Aristatoside B ($p < 0.0001$)). Saponinlerin tek başına olduğu ve HER2/neu antijeniyle birlikte formülasyon olarak hazırlanıp denendiği gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında tüm saponinlerin HER2/neu ile birlikte oldukları formülasyonlarında IL-6 konsantrasyonlarının daha fazla olduğu görülmüştür. HER2/neu antijenin meydana getirdiği bu artış negatif olarak yorumlansa da saponinlerin HER2/neu antijeni ile bir arada formüle edildiklerinde IL-6 konsantrasyonunda anlamlı bir azalma meydana gelmesi önemlidir. Özellikle en yaygın kullanılan QS-21 saponiniyle kıyaslandığında denen saponinlerin IL-6 konsantrasyonunda meydana getirdikleri azalmanın daha fazla olması bu saponinlerin kanser aşılarda adjuvan olarak kullanım potansiyelleri için oldukça dikkat çekicidir. Ayrıca yapılan bir çalışmada *Stauntonia hexaphylla* bitkisinden eldilen triterpen bir saponin birleşiminin RAW264.7 makrofaj hücreleri üzerindeki etkileri incelendiğinde LPS ile indüklenmiş kontrol grubuyla kıyaslandığında saponin içeren grubun IL-1 β sitokin salgılanmasını baskıladığı görülmüştür (Vinh et al., 2019). Bu anlamda çalışmadan elde edilen sonuçların literatür ile bağdaştığı görülmüştür.

TNF- α , travma veya enfeksiyonlara yanıt olarak esas olarak makrofajlar ve DC'ler tarafından salgılanan bir proenflamatuar sitokindir (Basu et al., 2019). Meme karsinomu dokularının daha yüksek TNF- α 'ya sahip olduğu görülmüş ve

yapılan çalışmalarda TNF- α 'nın meme kanseri hücrelerinin göç potansiyelini arttırdığı gösterilmiştir. IL6 ve TNF- α 'nın birlikte ekspresyonu, lenf nodu tutulumu ve daha kısa sağkalım ile ilişkilendirilirken, RAS ve TNFa birlikte meme kanserinde anjiyogenezi arttırmıştır (King et al., 2017). Meme kanserinde TNF- α 'nın protumorjenik etkilerini gösteren çalışmalarda; TNF- α , çeşitli meme kanseri hücre hatlarında hücre büyümesini, göçünü ve istilasını teşvik etmiş, tümör büyümesinin bir baskılayıcı olan Nischarin'i inhibe ederek, AKT / NF- κ B sinyal yolu yoluyla miRNA-23b ve miRNA-27b ekspresyonunu ve ayrıca MMP-9 ekspresyonunu uyarmıştır. Bütün bunlar HER2/neu ve üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde kötü prognoz ve hücre invazyonu ile ilişkilidir. TNF- α reseptörüne (TNFR) karşı yönlendirilen antikor infliksimab ile m / sTNF-a aktivitesinin bloke edilmesinin ise tümör büyümesini yavaşlattığı tümör regresyonunu indüklediği ve farelerde kemik metastazlarını inhibe ettiği görülmüştür. Bu da TNF- α 'nın tümörjenik etkilerini vurgulamaktadır (Martínez-Reza et al., 2017). TNF- α ile indüklenebilir NF- κ B aktivitesinin, meme kanseri hücrelerinin radyo-direncine katkıda bulunduğu iyi bilinmektedir. TNF- α , meme kanseri hücrelerinde metastaz ile ilişkili birçok proteini indükler ve aktivitesi östrojen ve EGF tarafından önemli ölçüde güçlendirilir. Ek olarak TNF-a, kemorezistans için NF- κ B yolunu aktive ederek IL-6 ve IL-8 ekspresyonunu artırır (Tan and Hu, 2018).

Saponinlerin TNF- α sitokin konsantrasyonu üzerindeki etkisini incelediğimizde Scoposide A ($p>0.1$), Scoposide B ($p>0.1$) ve Balansoide B ($p>0.5$) saponinlerinin DMSO ile karşılaştırıldığında TNF- α sitokin konsantrasyonu üzerinde anlamlı bir farka neden olmadığı görülmüştür. Aristatoside B ($p<0.05$), Elmalienoside ($p<0.01$) ve QS-21 ($p<0.005$) saponinleri ise TNF- α sitokin konsantrasyonlarını anlamlı bir şekilde arttırmıştır. HER2/neu antijeniyle birlikte formüle edilmiş saponin adjuvanlarının TNF- α sitokin konsantrasyonları arasında karşılaştırma yapılırken ise HER2/neu'nun tek başına olduğu grupla kıyaslama yapılmıştır. Bu kıyaslamaya göre QS-21 saponini kullanılarak hazırlanan formülasyonda HER2/neu'nun tek başına olduğu gruba göre anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p> 0.05$). Araştırılması planlan diğer saponinlerin ise TNF- α sitokin konsantrasyonunu anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüştür (Scoposide A ($p<0.05$), Scoposide B ($p<0.05$), Elmalienoside A ($p<0.05$), Balansoide B ($p<0.05$), Aristatoside B ($p<0.05$)). Bu sonuçlara bakıldığında HER2/neu antijeniyle yapılan formülasyonlarda literatürde meme kanserinde pek çok negatif etkisi olduğu kanıtlanan TNF- α sitokin konsantrasyonunun adjuvan olarak en sık kullanılan saponin olan QS21 ile bir değişime uğramazken bizim adjuvan olarak kullanım potansiyelini

değerlendirdiğimiz saponinlerle yapılan formülasyonların kanıtlanan TNF- α sitokin konsantrasyonunda anlamlı bir azalma meydana getirmesi bu saponinlerin kanser aşılarda adjuvan olarak kullanım potansiyelleri açısından oldukça önemlidir.

IFN- γ , tip II interferon ailesinin bir üyesidir ve önemli immünomodülatör ve antiviral özelliklere sahiptir (Tecalco-cruz et al., 2019). HER2 pozitif meme kanserinde (NCT03112590) IFN- γ 'nın paklitaksel, trastuzumab ve pertuzumab ile kombinasyonunu değerlendiren devam eden çalışmalar, tümörlere özgü antijenlere karşı Th1 bağışıklık tepkisinin artırılmasının meme kanserinde önemli terapötik fayda sağlayabileceği düşünülmektedir (King et al., 2017). IFN- γ ayrıca IL-12 salgılamak için antijen sunan hücreleri uyarır ve bu da T hücresi bağışıklık tepkilerini aktive eder ve sonunda tümör hücrelerini öldürür (Wu et al., 2020).

Yaptığımız çalışmada farklı saponinlerin IFN- γ sitokin konsantrasyonu üzerindeki etkisi incelenirken saponinlerin olduğu grupların IFN- γ sitokin konsantrasyonları ile saponinlerin içerisinde çözöldüğü DMSO'nun IFN- γ sitokin konsantrasyonu karşılaştırılmıştır. Bu analizin sonuçlarına göre Scoposide A ($p>0.5$) ve QS-21 ($p>0.5$) saponinlerinin IFN- γ sitokin konsantrasyonu üzerinde anlamlı bir farklılık yaratmadığı görülmüştür. Scoposide B ($p<0.005$), Elmalienoside A ($p<0.01$) ve Balansoide B ($p<0.05$) saponinlerinin ise IFN- γ sitokin konsantrasyonunda anlamlı bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Scoposide B, Elmalienoside A ve Balansoide B saponinlerinin IFN- γ sitokin konsantrasyonunda meydana getirdikleri bu anlamlı artış grubumuzun önceki çalışmalarıyla da paralellik göstermektedir (Sarıkahya et al., 2018; Top et al., 2017). HER2/neu antijeniyle birlikte formüle edilmiş saponin adjuvanlarının HER2/neu peptidinin tek başına olduğu grupla karşılaştırma sonucunda HER2/neu antijeniyle saponinlerin bir araya getirilmesiyle oluşturulan tüm formülasyonların HER2/neu'nun tek başına olduğu grupla kıyaslandığında IFN- γ konsantrasyonunda anlamlı bir artışa neden oldukları görülmüştür (Scoposide A ($p<0.005$), Scoposide B ($p<0.0001$), Elmalienoside A ($p<0.0001$), Balansoide B ($p<0.0001$), Aristatoside B ($p<0.0001$), QS21 ($p<0.0001$)). Saponinlerin tek başına oldukları gruplar karşılaştırıldığında, en sık kullanılan saponin adjuvanı QS-21 anlamlı bir artış sağlamadığı görülmüştür. Bunun yanında Scoposide B, Elmalienoside A ve Balansoide B saponinlerinin meme kanseri üzerinde önemli anti-tümör etkileri olan IFN- γ sitokin konsantrasyonu üzerindeki istatistiksel olarak anlamlı pozitif etkileri bu saponinlerin adjuvan olarak kullanım potansiyelleri açısından oldukça önemlidir. HER2/neu antijeniyle yapılan formülasyonlarda yine

Scoposide B, Balansoide B, Aristatoside B saponinleri QS-21 saponini ile kıyaslandıklarında kanserde oldukça önemli olan Th1 yanıtını temsil eden IFN- γ sitokin konsantrasyonunda daha fazla bir artışa sebep olmaları adjuvan olarak kullanım potansiyelleri açısından önemlidir.

Sonuç olarak; ülkemizde endemik olarak yetiştirilen *Cephalaria spp.* türlerinden elde edilen; Aristatoside B, Scoposide A, Scoposide B, Elmalienoside A, Balansoide B, saponinlerinin peptid bazlı HER2-pozitif meme kanseri aşı formülasyonlarında *in vitro* olarak yapılan çalışma kapsamında adjuvan kullanım potansiyeli olduğu belirlenmiştir. Özellikle Scoposide B, Elmalienoside A ve Balansoide B saponinlerinin IL-4 seviyesinde meydana getirdikleri anlamlı düşüş, tüm saponinlerin IL-6 konsantrasyonunda QS-21 adjuvanına göre daha fazla ve anlamlı bir azalmaya neden olması, saponinlerle oluşturulan tüm formülasyonların HER2/neu'nun tek başına olduğu grupla kıyaslandığında IFN- γ konsantrasyonunda anlamlı bir artış meydana getirmesi bu saponinlerin meme kanseri aşısı önemli adjuvan adayları olabileceğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlara bakılarak bu saponinlerin aşı adjuvanı olarak kullanımına yönelik çalışmaların ilerletilmesi için bir kapı açılmıştır. Ayrıca adjuvanların ortaya çıkardıkları immün yanıtlar göz önüne alındığında bu adjuvanların farklı meme kanseri alt tipleri ya da farklı kanser türleri için de aşı adjuvanı olarak değerlendirilmeleri mümkündür.

7. ÖNERİLER

Yapılan çalışma sonunda *Cephalaria spp.* türlerinden elde edilen; Aristatoside B, Scoposide A, Scoposide B, Elmalienoside A, Balansoide B, saponinlerinin meme kanseri aşılarda adjuvan olarak kullanım potansiyeli olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuçlara bağlı olarak ilerleyen çalışmalarda bu formülasyonların etkinlikleri *in vivo* olarak fare modellerinde incelenebilir. Hayvan modellerinde yapılacak denemelerde olumlu sonuçlar elde edilmesi durumunda klinik denemelere geçilebilir.

Literatürde daha önce yapılmış olan çalışmalarda aynı sitokinin meme kanseri üzerinde hem pozitif hem negatif etkiler yaratabildiği görülmüştür. Çalışmamız sonucunda sitokin konsantrasyonlarında meydana gelen artış ve azalmaların hastalık üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesine yönelik çalışmalar yapılabilir.

Adjuvanların etkinliğinin artırılarak immün sistemin daha yüksek seviyede indüklenebilmesi ve daha etkin sitokin salımının sağlanabilmesi için bu adjuvanların farklı adjuvanlarla kombinasyonlar halinde kullanımları araştırılabilir.

Bu tez çalışması kapsamında adjuvanların HER2 pozitif meme kanseri aşılarda kullanım potansiyeli araştırılmıştır. Bu saponinlerin meme kanserinin farklı alt tipleri için ve farklı kanser türleri için adjuvan olarak kullanım potansiyeli araştırılabilir.

Ayrıca bu adjuvan adaylarının farkıaşı antijenleriyle bir araya getirilmesiyle oluşturulan aşı formülasyonlarının etkinliği araştırılabilir.

8. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abimannan, T., Peroumal, D., Parida, J. R., Barik, P. K., Padhan, P., Devadas, S.** ,2016, Oxidative stress modulates the cytokine response of differentiated Th17 and Th1 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 99, 352–363. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.026>
- Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L., Chen, H.**,2013, Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(9), 3834–3842. <https://doi.org/10.3390/ijerph10093834>
- Aiba, S. and Kimura, Y.** ,2017, In vitro test methods to evaluate the effects of chemicals on innate and adaptive immune responses. *Current Opinion in Toxicology*, 5, 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.06.010>
- Alexandrou, S., George, S. M., Ormandy, C. J., Lim, E., Oakes, S. R., Elizabeth Caldon, C.** (2019). The proliferative and apoptotic landscape of basal-like breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms20030667>
- American Cancer Society.** ,2018, *Global Cancer Facts & Figures 4 th Edition*.
- ATCC**, <https://www.lgcstandards-atcc.org/>. Retrieved May 28, 2020, from <https://www.lgcstandards-atcc.org/>
- Awate, S., Babiuk, L. A., Mutwiri, G.** ,2013, Mechanisms of action of adjuvants. *Frontiers in Immunology*, 4(MAY), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00114>
- Baker, K. J., Houston, A., Brint, E.** ,2019,. IL-1 family members in cancer; two sides to every story. *Frontiers in Immunology*, 10,JUN,. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01197>
- Barten, M. J., Rahmel, A., Bocsi, J., Boldt, A., Garbade, J., Dhein, S., ... Gummert, J. F.** ,2006,. Cytokine analysis to predict immunosuppression. *Cytometry Part A*, 69,3,, 155–157. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20215>
- Bastola, R., Noh, G., Keum, T., Bashyal, S., Seo, J. E., Choi, J., ... Lee, S.** ,2017,. Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Archives of Pharmacal Research*, 40,11,, 1238–1248. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0969-z>
- Basu, A., Ramamoorthi, G., Jia, Y.** ,2019,. *Immunotherapy in breast cancer : Current status and future directions*. *Immunotherapy of Cancer* ,1st ed., Vol. 143,. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2019.03.006>

KAYNAKLAR DİZİNİ(devamı)

- Baxevanis, C. N., Fortis, S. P., Perez, S. A.** ,2019,. The balance between breast cancer and the immune system: challenges for prognosis and clinical benefit from immunotherapies. *Seminars in Cancer Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.12.018>
- Betz, A., Lampen, N., Martinek, S., Young, M. W., Darnell, J. E., Ganguly, S., ... Danishefsky, S. J.** ,2001,. Immunization of metastatic breast cancer patients with a fully synthetic globo H conjugate : A phase I trial. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98,17,.
- Bode, C., Zhao, G., Steinhagen, F., Kinjo, T., Klinman, D. M.** ,2011,. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Review of Vaccines*, ,July,, 499–511.
<https://doi.org/10.1586/erv.10.174>
- Bonam, S. R., Partidos, C. D., Halmuthur, S. K. M., Muller, S., Jenner, E., Coley, W. B., ... Glenny, A. T.** ,2017,. An Overview of Novel Adjuvants Designed for Improving Vaccine Efficacy. *Trends in Pharmacological Sciences*, xx, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.06.002>
- Borges Crosara, P. F. T., Vasconcelos, A. C., Santos Guimarães, R. E., Gonçalves Becker, H. M., Gonçalves Becker, C., Reis Crosara, S. L., Nascimento, E.** ,2005,. Effect of mitomycin C on the secretion of granulocyte macrophages colonies stimulating factor and interleukin-5 in eosinophilic nasal polyps stromal culture. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 71(4), 459–463. [https://doi.org/10.1016/s1808-8694\(15\)31199-x](https://doi.org/10.1016/s1808-8694(15)31199-x)
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A.** ,2018,. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Burke, E. E., Kodumudi, K., Czerniecki, B. J.** ,2019,. Vaccine Therapies for Breast Cancer Breast Cancer: Vaccine Therapy Oncodrivars Breast Cancer Immunity. *Surgical Oncology Clinics of NA*, 28(3), 353–367.
<https://doi.org/10.1016/j.soc.2019.02.004>
- Cadoo, K. A., Traina, T. A., King, T. A.** ,2013,. Advances in Molecular and Clinical Subtyping of Breast Cancer and Their Implications for Therapy, 22, 823–840. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2013.06.006>
- Chopra, S., and Davies, E. L.** ,2019,. Breast cancer. *Medicine*, 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.11.009>
- Chu, D. K., Mohammed-Ali, Z., Jiménez-Saiz, R., Walker, T. D., Goncharova, S., Llop-Guevara, A., ... Jordana, M.** ,2014,. T helper cell IL-4 drives intestinal Th2 priming to oral peanut antigen, under the control of OX40L and independent of innate-like lymphocytes. *Mucosal Immunology*,

KAYNAKLAR DİZİNİ(devamı)

- Cibulski, S. P., Rivera-Patron, M., Mourglia-Ettlin, G., Casaravilla, C., Yendo, A. C. A., Fett-Neto, A. G., ... Silveira, F.**, 2018,. Quillaja brasiliensis saponin-based nanoparticulate adjuvants are capable of triggering early immune responses. *Scientific Reports*, 8,1,, 1–15.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-31995-1>
- Clive, K. S., Tyler, J. A., Clifton, G. T., Holmes, J. P.**, 2010,. Use of GM-CSF as an adjuvant with cancer vaccines : beneficial or detrimental ? *Expert Review of Vaccines*, 9, 519–525. <https://doi.org/10.1586/erv.10.40>.
- Coffman, R. L., Sher, A., Seder, R. A.**, 2010,. Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. *Immunity*, 33(4), 492–503.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>
- Costa, R. L. B. , Soliman, H. , Czierneicki, B. J.**, 2017,. The clinical development of vaccines for HER2+ breast cancer: current landscape and future perspectives. *Cancer Treatment Reviews*.
<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.10.005>
- Creighton, C. J.**, 2012,. The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics: Targets and Therapy*, 6, 289–297.
<https://doi.org/10.2147/BTT.S29923>
- Deenadayalan, A., Maddineni, P., Raja, A.**, 2013,. Comparison of whole blood and PBMC assays for T-cell functional analysis. *BMC Research Notes*, 6(1), 2–6. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-120>
- DeMaria, P. J. and Bilusic, M.**, 2019,. Cancer Vaccines. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 33(2), 199–214.
<https://doi.org/10.1016/j.hoc.2018.12.001>
- Disis, M. L., and Stanton, S. E.**, 2017,. Immunotherapy in breast cancer : An introduction. *The Breast*, 5–8. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2017.01.013>
- Eroles, P., Bosch, A., Pérez-fidalgo, J. A., Lluch, A.**, 2012,. Molecular biology in breast cancer : Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 38,6,, 698–707.
<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005>
- Esquivel-Velázquez, M., Ostoa-Saloma, P., Palacios-Arreola, M. I., Nava-Castro, K. E., Castro, J. I., & Morales-Montor, J.**, 2015,. The role of cytokines in breast cancer development and progression. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 35(1), 1–16.
<https://doi.org/10.1089/jir.2014.0026>

KAYNAKLAR DİZİNİ(devamı)

- Fang, X., Cao, J., Shen, A.** ,2020,. Advances in anti-breast cancer drugs and the application of nano-drug delivery systems in breast cancer therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101662>
- Fougner, C., Bergholtz, H., Norum, J. H., Sørli, T.** ,2020,. Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype. *Nature Communications*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15574-5>
- Garçon, N., and Pasquale, A. Di.** ,2016,. From discovery to licensure , the Adjuvant System story. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 5515(September),, 19–33. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1225635>
- Garçon, N., Segal, L., Tavares, F., Van Mechelen, M.** ,2011,. The safety evaluation of adjuvants during vaccine development: The AS04 experience. *Vaccine*, 29(27), 4453–4459. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.046>
- Giese, C., and Marx, U.** ,2014,. Human immunity in vitro - Solving immunogenicity and more. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 69–70, 103–122. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.0>
- Gilewski, T. A., Ragupathi, G., Dickler, M., Powell, S., Bhuta, S., Panageas, K., ... Livingston, P. O.** ,2007,. Immunization of High-Risk Breast Cancer Patients with Clustered sTn-KLH Conjugate plus the Immunologic Adjuvant QS-21. *Clinical Cancer Research*, 13(10), 2977–2986.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2189>
- Gilewski, T., Adluri, S., Ragupathi, G., Zhang, S., Yao, T.-J., Panageas, K., ... Livingston, P. O.** ,2000,. Vaccination of high-risk breast cancer patients with mucin-1 (MUC1, keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS-21. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-00-0001>
- Gin, D. Y. and Slovin, S. F.** ,2011, Enhancing Immunogenicity of Cancer Vaccines : QS-21 as an Immune Adjuvant. *Current Drug Therapy*, 207–212.
- Glenn, A. and Armstrong, C. E.** ,2019,. Physiology of red and white blood cells. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 20(3), 170–174.
<https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2019.01.001>
- Grenfell, R. F. Q., Marques-da-Silva, E. A., Souza-Testasica, M. C., Coelho, E. A. F., Fernandes, A. P., Afonso, L. C. C., Rezende, S. A.** ,2010,. Antigenic extracts of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* associated with saponin partially protects BALB/c mice against *Leishmania chagasi* infection by suppressing IL-10 and IL-4 production. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(6), 818–822. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000600015>

KAYNAKLAR DİZİNİ(devamı)

- Groell, F., Jordan, O., Borchard, G.**, 2018,. In vitro models for immunogenicity prediction of therapeutic proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 130, 128–142. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.06.008>
- Guo, C., Manjili, M. H., Subjeck, J. R., Sarkar, D., Fisher, P. B., Wang, X. Y.**, 2013,. *Therapeutic cancer vaccines. Past, present, and future. Advances in Cancer Research* (1st ed., Vol. 119). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407190-2.00007-1>
- Guo, M., Tang, X., Sheng, X., Xing, J., Zhan, W.**, 2018,. Comparative study of the adjuvant potential of four Th0 cytokines of flounder (*Paralichthys olivaceus*) on an *E. tarda* subunit vaccine. *Developmental and Comparative Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.05.001>
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A.**, 2000,. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 57–70.
- Hanlon, P. R., Robbins, M. G., Scholl, C., & Barnes, D. M.**, 2009,. Aqueous extracts from dietary supplements influence the production of inflammatory cytokines in immortalized and primary T lymphocytes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-9-51>
- Hernandez-Fuentes, M. P. and Salama, A.**, 2006,. In vitro assays for immune monitoring in transplantation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 333, 269–290. <https://doi.org/10.1385/1-59745-049-9:269>
- Huang, L., Wang, Z., Liu, C., Xu, C., Mbofung, R. M., McKenzie, J. A., ... Peng, W.**, 2017,. CpG-based immunotherapy impairs antitumor activity of BRAF inhibitors in a B-cell-dependent manner, (September 2016), 1–6. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.35>
- Ike, K., Uchida, Y., Nakamura, T., Imai, S.**, 2005,. Induction of interferon-gamma (IFN- γ) and T helper 1 (Th1) immune response by bitter melon extract. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67(5), 521–524. <https://doi.org/10.1292/jvms.67.521>
- Ito, S. ei, Shirota, H., Kasahara, Y., Saijo, K., Ishioka, C.**, 2017,. IL-4 blockade alters the tumor microenvironment and augments the response to cancer immunotherapy in a mouse model. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66(11), 1485–1496. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-2043-6>
- Jayasingam, S. D., Citartan, M., Thang, T. H., Mat Zin, A. A., Ang, K. C., Ch'ng, E. S.**, 2020,. Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Frontiers in Oncology*, 9(January), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01512>

KAYNAKLAR DİZİNİ(devamı)

- Jeannin, P., Paolini, L., Adam, C., Delneste, Y.** ,2018,. The roles of CSFs on the functional polarization of tumor-associated macrophages. *FEBS Journal*, 285(4), 680–699. <https://doi.org/10.1111/febs.14343>
- Jeon, M., Han, J., Jin, S., Eon, J., Kim, S.** ,2016,. Elevated IL-1 b expression induces invasiveness of triple negative breast cancer cells and is suppressed by zerumbone. *Chemico-Biological Interactions*, 258, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.08.021>
- Jr, T. W. D. and Reed, S. G.** ,2010,. Adjuvants for cancer vaccines. *Seminars in Immunology*, 22(3), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2010.04.007>
- Keski-Nisula, L., Roponen, M., Hirvonen, M., Heinonen, S., Pekkanen, J.** ,2004,. Stimulated cytokines production correlates in umbilical arterial and venous blood at delivery. *European Cytokine Network*, 347–352.
- Khong, H. and Overwijk, W. W.** ,2016,. Adjuvants for peptide-based cancer vaccines. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0160-y>
- King, J., Mir, H. Singh, S.** ,2017,. *Association of Cytokines and Chemokines in Pathogenesis of Breast Cancer. Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.003>
- Ko, E., Lee, Y., Lee, Y., Kim, Y., Kim, K., Kang, S.** ,2018,. MPL and CpG combination adjuvants promote homologous and heterosubtypic cross protection of inactivated split influenza virus vaccine. *Antiviral Research*, 156, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.06.004>
- Korgaonkar, N. and Yadav, K. S.** ,2019,. Understanding the biology and advent of physics of cancer with perspicacity in current treatment therapy. *Life Sciences*, 117060. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117060>
- Kursunel, M. A. and Esendagli, G.** ,2016,. The untold story of IFN- γ in cancer biology. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 31, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.07.005>
- Kurtz, Samantha L; Ravindranathan, Sruthi; Zaharoff, D. A.** ,2014,. Current status of autologous breast tumor cell-based vaccines, 13(12), 1439–1445. <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.969714>
- Lee, H. L., Jang, J. W., Lee, S. W., Yoo, S. H., Kwon, J. H., Nam, S. W., ... Yoon, S. K.** ,2019,. Inflammatory cytokines and change of Th1/Th2 balance as prognostic indicators for hepatocellular carcinoma in patients treated with transarterial chemoembolization. *Scientific Reports*, 9(1), 4–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40078-8>

KAYNAKLAR DİZİNİ(devamı)

- Leroux-roels, G.** ,2010,. Unmet needs in modern vaccinology Adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*, 28S, C25–C36.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.021>
- Li, H., Willingham, S. B. and Ting, J. P.** ,2014,. Cutting Edge: Inflammasome Activation by Alum and Alum's Adjuvant Effect Are Mediated by NLRP3. *The Journal of Immunology*, 181, 17–21.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.17>
- Liu, J. and Henkel, T.** ,2012,. Traditional Chinese Medicine (TCM): Are Polyphenols and Saponins the Key Ingredients Triggering Biological Activities? *Current Medicinal Chemistry*, 9(15), 1483–1485.
<https://doi.org/10.2174/0929867023369709>
- Liu, P.-S. and Ho, P.-C.** ,2019,. Determining Macrophage Polarization upon Metabolic Perturbation. *Methods in Molecular Biology*, 1862, 64–69.
<https://doi.org/10.4324/9780429030772-13>
- Mahdavi, M. and Moreau, V.** ,2016,. In silico designing breast cancer peptide vaccine for binding to MHC class I and II: A molecular docking study. *Computational Biology and Chemistry*, 65, 110–116.
<https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2016.10.007>
- Marciani, D. J.** ,2018,. Elucidating the Mechanisms of Action of Saponin-Derived Adjuvants. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(6), 573–585.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.03.005>
- Martínez-Reza, I., Díaz, L., García-Becerra, R.** ,2017,. Preclinical and clinical aspects of TNF- α and its receptors TNFR1 and TNFR2 in breast cancer. *Journal of Biomedical Science*, 24(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0398-9>
- Masjedi, A., Hashemi, V., Hojjat-Farsangi, M., Ghalamfarsa, G., Azizi, G., Yousefi, M., Jadidi-Niaragh, F.** ,2018,. The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 108(September), 1415–1424. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.177>
- May, L., van Bodegom, D., Kuningas, M., Meij, J. J., de Craen, A. J. M., Frölich, M., Westendorp, R. G. J.** ,2009,. Performance of the whole-blood stimulation assay for assessing innate immune activation under field conditions. *Cytokine*, 45(3), 184–189.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.12.010>
- Mehla, K. and Singh, P. K.** ,2019,. Metabolic Regulation of Macrophage Polarization in Cancer. *Trends in Cancer*, 5(12), 822–834.
<https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.10.007>

KAYNAKLAR DİZİNİ(devamı)

- Milani, A., Sangiolo, D., Montemurro, F., Aglietta, M., Valabrega, G. ,2013.,** Active immunotherapy in HER2 overexpressing breast cancer: current status and future perspectives. *Annals of Oncology*, (January), 1740–1748. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt133>
- Morse, M. A., Clay, T. M., Hobeika, A. C., Mosca, P. J., Lyerly, H. K. ,2001.,** Assays for Monitoring cellular immune responses to cancer immunotherapy. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 3(1), 45–52.
- Nanishi, E., Dowling, D. J., Levy, O. ,2020.,** Toward precision adjuvants : optimizing science and safety, 0. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000868>
- Nathan, M. R. and Schmid, P. ,2017.,** The emerging world of breast cancer immunotherapy. *The Breast*, 37, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2017.05.013>
- Nooka, A. K., Wang, M. L., Yee, A. J., Kaufman, J. L., Bae, J., Peterkin, D., ... Raje, N. S. ,2018.,** Assessment of Safety and Immunogenicity of PVX-410 Vaccine With or Without Lenalidomide in Patients With Smoldering Multiple Myeloma A Nonrandomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*, 02114, 1–5. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.3267>
- Oleszycka, E., McCluskey, S., Sharp, F. A., Muñoz-Wolf, N., Hams, E., Gorman, A. L., ... Lavelle, E. C. ,2018.,** The vaccine adjuvant alum promotes IL-10 production that suppresses Th1 responses. *European Journal of Immunology*, 48(4), 705–715. <https://doi.org/10.1002/eji.201747150>
- Ott, G., Barchfeld, G. L., Chernoff, D. ,1995.,** MF59 Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines. *Pharmaceutical Biotechnology*, 277–296. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1823-5_10
- Ozer, O., Sarikahya, N. B., Nalbantsoy, A., Kirmizigül, S. ,2018.,** Increased cytotoxic potential of infrequent triterpenoid saponins of *Cephalaria taurica* obtained through alkaline hydrolysis. *Phytochemistry*, 152, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.04.015>
- Özverel, C. S. ,2018.,** *Meme Kanserine Karşı HER2/Neu Antijeni Ve Saponin Adjuvanı İçeren Aşı Kombinasyonunun Geliştirilmesi.*
- Pasquale, A. Di, Preiss, S., Fleming, A. ,2015.,** Vaccine Adjuvants : from 1920 to 2015 and Beyond, 320–343. <https://doi.org/10.3390/vaccines3020320>
- Patra, M. C., Shah, M., Choi, S. ,2019.,** Toll-like receptor-induced cytokines as immunotherapeutic targets in cancers and autoimmune diseases. *Seminars in Cancer Biology*, (January), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.05.002>

KAYNAKLAR DİZİNİ(devamı)

- Poudel, P., Nyamundanda, G., Patil, Y., Cheang, M. C. U., Sadanandam, A.**, 2019,. Heterocellular gene signatures reveal luminal-A breast cancer heterogeneity and differential therapeutic responses. *Npj Breast Cancer*, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41523-019-0116-8>
- Press, J. B., Reynolds, R. C., May, R. D., Marcianp, D. J.**, 2000,. Structure/function relationships of emmunostimulating saponins. *Studies in Natural Products Chemistry*, 24, 131–174.
- Ragupathi, G., Gardner, J. R., Livingston, P. O., Gin, D. Y.**, 2011,. Natural and synthetic saponin adjuvant QS-21 for vaccines against cancer. *Expert Review of Vaccines*, 10, 463–470. <https://doi.org/10.1586/erv.11.18>
- Rambe, D. S., Giudice, G. Del, Rossi, S., Sanicas, M.**, 2015,. Safety and Mechanism of Action of Licensed Vaccine Adjuvants. *International Current Pharmaceutical Journal*, 4(8), 420–431. <https://doi.org/10.3329/icpj.v4i8.24024>
- Ratnapriya, S., Sahasrabuddhe, A. A., Dube, A.**, 2019,. Visceral leishmaniasis : An overview of vaccine adjuvants and their applications. *Vaccine*, 37(27), 3505–3519. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.092>
- Razi, S. and Keshavarz-fathi, M.**, 2019,. *Chapter 7 - Whole Tumor Cell Vaccine for Cancer. Vaccines for Cancer Immunotherapy.* Nima Rezaei and Mahsa Keshavarz-Fathi. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814039-0.00007-2>
- Renold, V. and Leach, D.**, 2007,. Perspectives on the development of a therapeutic HER-2 cancer vaccine, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.05.060>
- Ruggiero, M. and Pacini, S.**, 2018,. A Novel potential Adjuvant for Cancer Vaccines. *Madridge Journal of Vaccines*, 2(1), 57–61. <https://doi.org/10.18689/mjv-1000112>
- Sabado, R. L., Pavlick, A. C., Gnjjatic, S., Hasan, Farah Spadaccia, M., Dong, B. S. O., Holman, R. M., ... Bhardwaj, N.**, 2015,. Poly-ICLC as an adjuvant for NY-ESO-1 protein vaccination with or without Montanide ISA-51 VG in patients with melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33. https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.e14034
- Sanchez, K., Page, D., Heather, L.**, 2016,. Immunotherapy in breast cancer: An overview of modern checkpoint blockade strategies and vaccines. *Current Problems in Cancer*, 40, 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2016.09.009>

KAYNAKLAR DİZİNİ(devamı)

- Sarikahya Boke, N., Nalbantsoy, A., Top, H., Suleyman, R. ,2018,.** Phytomedicine Immunomodulatory , hemolytic and cytotoxic activity potentials of triterpenoid saponins from eight *Cephalaria* species. *Phytomedicine*, 38(September 2017,, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.11.009>
- Schijns, V., Tartour, E., Michalek, J., Strioga, M. M. ,2014,.** Immune adjuvants as critical guides directing immunity triggered by therapeutic cancer vaccines. *International Society for Cellular Therapy*, (June 2013,, 427–439). <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.09.008>
- Shanmugaraj, B., Priya, L. B., Mahalakshmi, B., Subbiah, S., Hu, R., Velmurugan, B. K., Baskaran, R. ,2020,.** Bacterial and viral vectors as vaccine delivery vehicles for breast cancer therapy. *Life Sciences*, 117550. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117550>
- Shariat, S., Badiee, A., Amir, S., Mansourian, M., Yazdani, M., Alireza, S., Reza, M. ,2014,.** P5 HER2/neu-derived peptide conjugated to liposomes containing MPL adjuvant as an effective prophylactic vaccine formulation for breast cancer. *Cancer Letters*, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.016>
- Shi, S., Zhu, H., Xia, X., Liang, Z., Ma, X., Sun, B. ,2019,.** Vaccine adjuvants : Understanding the structure and mechanism of adjuvantcity. *Vaccine*, 37(24), 3167–3178. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.055>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A. ,2020,.** Cancer statistics, 2020. *Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Silva, D., Ponte, C. G. G., Hacker, M. A., Antas, P. R. Z. 2013.** A whole blood assay as a simple , broad assessment of cytokines and chemokines to evaluate human immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Acta Tropica*, 127(2), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.04.002>
- Sivakumar, S. M., Safhi, M. M., Kannadasan, M., Sukumaran, N. ,2011,.** Vaccine adjuvants – Current status and prospects on controlled release adjuvantcity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 19(4), 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2011.06.003>
- Sjo, A., Drane, D., Maraskovsky, E., Scheerlinck, J. ,2001,.** Immune responses to ISCOM ® formulations in animal and primate models. *Vaccine*, 19, 2661–2665.
- Skene, C. D. and Sutton, P. ,2006,.** Saponin-adjuvanted particulate vaccines for clinical use. *Methods*, 40, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.05.019>

KAYNAKLAR DİZİNİ(devamı)

- Solinas, C., Aiello, M., Migliori, E., Willard-Gallo, K., Emens, L. A.** ,2020,. Breast cancer vaccines: Heeding the lessons of the past to guide a path forward. *Cancer Treatment Reviews*, 84, 101947. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101947>
- Solov'eva, T., Davydova, V., Krasikova, I., Yermak, I.** ,2013,. Marine compounds with therapeutic potential in gram-negative sepsis. *Marine Drugs*, 11(6), 2216–2229. <https://doi.org/10.3390/md11062216>
- Somasundaram, C.** ,2015,. Recent Advances and Current Status of GM-CSF as an Adjuvant in DNA Vaccines for Viral Diseases. *Journal of Investigative Genomics*, 2(3), 54–56. <https://doi.org/10.15406/jig.2015.02.00025>
- Song, Q., Zhang, C. dong, Wu, X. hua.** ,2018,. Therapeutic cancer vaccines: From initial findings to prospects. *Immunology Letters*, 196(270), 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.011>
- Sun, H., Xie, Y., Ye, Y.** ,2009,. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*, 27, 1787–1796. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.091>
- Tan, C. and Hu, W.** ,2018,. Cytokine-mediated therapeutic resistance in breast cancer. *Cytokine*, 108(March), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.03.020>
- Tecalco-cruz, A. C., Cortés-gonzález, C. C., Cruz-ramos, E., Ramírez, J. O., Romero-mandujano, A. K., Sosa-garrocho, M.** ,2019,. Interplay between interferon-stimulated gene 15 / ISGylation and interferon gamma signaling in breast cancer cells. *Cellular Signalling*, 54(November 2018), 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.11.021>
- Thurm, C. W., and Halsey, J. F.** ,2005,. Measurement of Cytokine Production Using Whole Blood. *Current Protocols in Immunology*, 1–12. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0718bs66>
- Tian, H., He, Y., Song, X., Jiang, L., Luo, J., Xu, Y., ... Yao, W.** ,2018,. Nitrated T helper cell epitopes enhance the immunogenicity of HER2 vaccine and induce anti-tumor immunity. *Cancer Letters*, 430, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.05.021>
- Top, H., Sarikahya, N. B., Nalbantsoy, A., Kirmizigul, S.** ,2017,. Immunomodulatory, hemolytic properties and cytotoxic activity potent of triterpenoid saponins from *Cephalaria balansae*. *Phytochemistry*, 137, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.02.015>
- U.S. National Library of Medicine.** ,2020,. No Title. Retrieved March 30, 2020, from <https://clinicaltrials.gov/>

KAYNAKLAR DİZİNİ(devamı)

- Verch, T., Trausch, J. J., Shank-Retzlaff, M.** ,2018,. Principles of vaccine potency assays. *Bioanalysis*, 10(3), 163–180. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-017>
- Vernieri, C., Milano, M., Brambilla, M., Mennitto, A., Maggi, C., Cona, M. S., ... de Braud, F.** ,2019,. Resistance mechanisms to anti-HER2 therapies in HER2-positive breast cancer: Current knowledge, new research directions and therapeutic perspectives. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 139(October 2018), 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.05.001>
- Vinh, L. B., Jang, H. J., Phong, N. V., Cho, K., Park, S. S., Kang, J. S., ... Yang, S. Y.** ,2019,. Isolation, structural elucidation, and insights into the anti-inflammatory effects of triterpene saponins from the leaves of *Stauntonia hexaphylla*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 29(8), 965–969. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.02.022>
- Weagel, E., Smith, C., Liu, P. G., Robison, R., O'Neill, K.** ,2015,. Macrophage Polarization and Its Role in Cancer. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 06(04), 4–11. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000338>
- World Health Organization** ,2013,. Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines. *WHO Press*, (October), 56. Retrieved from https://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/ADJUVANTS_Post_ECBS_edited_clean_Guidelines_NCE_Adjuvant_Final_17122013_WEB.pdf%0Ahttps://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/ADJUVANTS_Post_ECBS_edited_clean_Guidelines_NCE_Adjuvant_Final_17122013_WEB.pdf?
- Wu, Y., Li, J., Kaboli, P. J., Shen, J., Zhao, Y., Ji, H., ...** Immunotherapy, A. C. ,2020,. Natural Killer Cells as a Double-edged Sword in Cancer Immunotherapy: A Comprehensive Review from Cytokine Therapy to Adoptive Cell Immunotherapy. *Pharmacological Research*, (February). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104691>
- Xu, X., Ye, J., Huang, C., Yan, Y., Li, J.** ,2019,. M2 macrophage-derived IL6 mediates resistance of breast cancer cells to hedgehog inhibition. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 364, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.12.013>
- Yakubogulları, N., Genç, R., Çöven, F., Nalbantsoy, A., Erdal, B.** ,2019,. Development of adjuvant nanocarrier systems for seasonal influenza A (H3N2) vaccine based on Astragaloside VII and gum tragacanth (APS). *Vaccine*, 37, 3638–3645. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.05.038>
- Yang, J., Shangguan, J., Eresen, A., Li, Y., Wang, J., Zhang, Z.** ,2019,. Dendritic cells in pancreatic cancer immunotherapy : Vaccines and combination immunotherapies. *Pathology - Research and Practice*, (October). <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152691>

KAYNAKLAR DİZİNİ(devamı)

- Zhang, H., and Chen, J.** ,2018,. Current status and future directions of cancer immunotherapy. *Journal of Cancer*, 9(10), 1773–1781.
<https://doi.org/10.7150/jca.24577>
- Zhang, W., Wang, S., Gu, J., Gao, Y., Wang, Z., Zhang, K., ... Zhang, C.** ,2018,. Synergistic tumoricidal effect of combined hPD-L1 vaccine and HER2 gene vaccine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 497(1), 394–400.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.092>



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca yol göstericiliği ve tecrübesiyle çalışmam süresince bana her zaman destek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe Nalbantsoy'a,

Lisans ve yüksek lisans sürecim boyunca bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalandığım değerli bölüm hocalarıma,

Laboratuvarıda tüm çalışma sürecim boyunca beni yalnız bırakmayan, gerektiğinde fikir alışverişlerinde bulunduğum immünoyoteknoloji ve biyoaktivite tarama laboratuvarında yüksek lisans ve doktarısını yapmakta olan çalışma arkadaşlarıma,

Başta annem Neslişah Akağaç, babam Orhun Akağaç ve kardeşim Orhan Akağaç olmak üzeri, tüm eğitim öğretim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen aileme,

Bu yoğun ve stresli süreç boyunca yanımda olan tüm arkadaşlarıma,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

.../.../2020

İmza

Gülşah AKAĞAÇ

ÖZGEÇMİŞ

Eğitim

2018-2020 Yüksek Lisans
Ege Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik Ana Bilim Dalı
Biyomühendislik Tezli Yüksek Lisans Programı

2013-2018 Lisans
Ege Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

Diller

İngilizce

Katıldığı Kongreler

- **Biopharmaceutical Production An Interactive Workshop**, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, 03.10.2018-04.10.2020
- **3. Kök Hücre Bölge Toplantıları**, Kök Hücre ve Hücresel Tedavi Derneği, 31.10.2018
- **22.Ege Onkoloji Günleri-Onkolojide Yeni Tedavi Arayışları Sempozyumu**, Ege Üniversitesi Kanserle Savaş Uygulama ve Araştırma Merkezi, 26.02.2020-28.02.2020

Sertifika Programları

- **Üretim Yönetimi Eğitimi**, İstanbul İşletme Enstitüsü, 12.04.2020
- **İç Denetim Eğitimi**, İstanbul İşletme Enstitüsü, 09.02.2020
- **GMP**, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi, 08.12.2018
- **GLP**, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi, 09.12.2018

- **ISO/IEC 17025: 2017**, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi, 10.12.2018
- **ISO 9001: 2015**, TSC Kalite Yönetim Sistemi, 11.12.2018
- **Akan Hücre Ölçer Çalıştayı**, BD Bioscience, 13.11.2018

Posterler

Hasan Cenk Ağba, Mohamed Chanfiou Mkouboi, Gülizar Çalışkan, Tuğçe Muta, Gülşah Akağaç, Kardelen Dalım Filiz, Nazlı Sarıkahya, Ayşe Nalbantsoy, Murat Elibol, Yeşil Kimya Yaklaşımı ile Biyo-Nanopartkül Sentezi ve Bazı Kanser Hücreleri Üzerine Potansiyel Sitotoksik Etkileri, 22. Ege Onkoloji Günleri, Onkolojide Yeni Tedavi Arayışları Sempozyumu, İzmir/Türkiye, 2020

Kadir Alptekin, Gülşah Akağaç, Kardelen Dalım Filiz, Ayşe Nalbantsoy, Oleuropein'in Raw 264.7 Makrofaj Hücrelerindeki Apoptotik Etkisinin Araştırılması, İzmir Üniversiteleri Platformu Teknoloji Günleri, İzmir/Türkiye, 2019

Ödüller

E-Poster Bildiri İkincilik Ödülü, Hasan Cenk Ağba, Mohamed Chanfiou Mkouboi, Gülizar Çalışkan, Tuğçe Muta, Gülşah Akağaç, Kardelen Dalım Filiz, Nazlı Sarıkahya, Ayşe Nalbantsoy, Murat Elibol, Yeşil Kimya Yaklaşımı ile Biyo-Nanopartkül Sentezi ve Bazı Kanser Hücreleri Üzerine Potansiyel Sitotoksik Etkileri, 22. Ege Onkoloji Günleri, Onkolojide Yeni Tedavi Arayışları Sempozyumu, İzmir/Türkiye, 2020