

## TARTIŞILAN ADJUVAN: SKUALEN

Görkem YAMAN<sup>1</sup>, Mustafa BERKTAŞ<sup>2</sup>, Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

<sup>2</sup>Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, VAN

### ÖZET

2009 yılında pandemik influenza A H1N1 virüsüne bağlı olarak ortaya çıkan salgında en etkili korunma yönteminin aşılama olduğu vurgulanmasına rağmen, özellikle aşı içeriğinde bulunan skualen ve oluşturduğu yan etkiler konusundaki spekülasyonlar aşının etkinliğini gölgelemiş ve tartışmalara neden olmuştur. Terpenoidler içinde triterpen sınıfında yer alan doğal organik bir lipid olan skualen, biyolojik kökenli ve yıkılabilir bir yağ olması, besin takviyesi olarak ya da kozmetik endüstri alanında sıkça kullanılması yanında tedavi uygulamalarında su içi yağ emülsiyonu şeklinde aşı adjuvanı olarak da kullanılmaktadır.

İnfluenza aşı içeriğinde yer alan skualenin tween 80 ve span 85 ile beraber oluşturulan formülasyonlarının, güçlü hümmoral yanıt dışında, hüccresel tipte bağışıklık yanıtı da uyardığı ve etkisinin uzun zamandır kullanılan bir adjuvan olan alum'a göre daha güçlü ve uzun süreli olduğu saptanmıştır. Skualenin yan etkileri üzerinde yapılan çalışmalarda yerel ve kısa süreli yan etkilerinin adjuvansız aşılarla göre daha yüksek oranlarda saptanmasına rağmen, beklenmedik veya ciddi yan etkiler açısından anlamlı farklar bulunamamıştır.

Körfez savaşı harekâtına katılan askerlerde görülen kronik multisemptomatik hastalık (Körfez savaşı sendromu) etiolojisinde o dönem yapılan aşıların skualen içermesi ve hastalık ile anti-skualen antikolar arasında anlamlı bir ilişki bulunduğu raporlanmasına karşın, bu yayınların yeterliliği ve kullanılan yöntemlerin güvenilirliği ciddi şekilde tartışılmıştır. Son dönemde onaylanmış yöntemler ve kontrol grupları kullanılarak yapılan yayınlar sonucunda, skualen antikoları ve hastalık arasında var olduğu iddia edilen bu ilişki doğrulanamamıştır.

Bu derlemede, aşı uygulamaları yanında ilaç ve gen transferi konularında da gelecek vaat eden skualen, literatür bilgileri ışığında mercek altına alınmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Basra körfezi sendromu, influenza A H1N1, influenza aşıları, MF59 yağ emülsiyonu, skualen

### SUMMARY

#### Squalene: The Controversial Adjuvant

Although influenza vaccination is announced to be the most effective prevention method for the outbreak of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus, especially the speculations for vaccine ingredient squalene and its adverse effects have suppressed its effectiveness and caused controversy. Squalene, a natural organic lipid which belongs to triterpene class of terpenoids, is used for medical purposes, besides dietary supplement and in cosmetics industry, as oil-in-water emulsion vaccine adjuvant because of being degradable oil and its biological origin.

Formulations of squalene with tween 80 and span 85 which are ingredients of influenza vaccines, have proved to induce potent humoral responses as well as cellular immune responses and their effectiveness to be more potent and long lasting than alum which is an adjuvant used in vaccines for more than 70 years. In a series of studies on adverse effects of squalene, although local and short term adverse effects were detected to be more frequent compared to non-adjuvanted vaccines, there were no significant differences in terms of unexpected or serious adverse effects.

After it was reported that squalene was included in multi-vaccination program and there was a significant correlation with anti-squalene antibodies and chronic multisymptomatic illnesses (Gulf war syndrome) in American veterans during the Gulf war, the adequacy of these reports and validations of the performed methods were extensively questioned. As a result of recent reports using validated methods and control groups, the claimed correlation between squalene antibodies and the illness could not be confirmed.

In this review, squalene which has a bright future in drug and gene transfer as well as vaccine applications is examined into with the light of recent publications.

**Keywords:** influenza A virus H1N1, influenza vaccines, MF59 oil emulsion, Persian gulf syndrome, squalene

**İletişim adresi:** Görkem Yaman. Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Fevzi Çakmak Cad., Divan Sok. No.1, Maltepe, İSTANBUL

Tel: (0216) 458 08 78, GSM: (0532) 731 27 57

e-posta: gorkem.yaman@acibadem.edu.tr, gorkem.yaman@acibademlabmed.com.tr

Alındığı tarih: 25.11.2011, yayına kabul: 27.12.2011

## GİRİŞ

2009 yılı Nisan ayı sonlarında Meksika’da görülen grip ve akut respiratuvar hastalık olgularının ardından Amerika’da da domuz orijinli yeni H1N1 olgularının ortaya çıkmasıyla, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) durumu “uluslararası kaygı verici acil halk sağlığı sorunu” olarak nitelmiştir. Mayıs ayında Amerika’da Alberta ve Kanada’da bulunan çiftlik domuzlarında aynı virüsün raporlanmasının ardından bu grip pandemisi genel olarak “Domuz gribi” adını almıştır. Haziran ayında DSÖ, 2009 grip pandemisinin etkeninin yeni tür domuz-kökenli H1N1 virüsü olduğunu bildirmiş ve yine Haziran ayında pandeminin, kıtalararası salgını ifade eden, evre 6 düzeyinde olduğunu açıklamıştır. 24 Ocak 2010 tarihi itibarıyla DSÖ tarafından pandemiye bağlı olarak 209’dan fazla ülkede laboratuvar tarafından doğrulanmış 17,700 ölüm olduğu raporlanmış olup ülkemizde de 415 kişinin domuz gribi sebebiyle öldüğü bildirilmiştir. Özellikle daha önceki grip salgınlarında olduğu gibi yeni dalgaların beklediği ve dünya genelinde test edilen 15,000’in üzerinde H1N1 suşunun 190’ında oseltamivir direnci saptanmasıyla tamiflu’ya karşı direnç oranlarının arttığı pandemik domuz gribinden korunmak için en etkili yöntemin aşı yaptırmak olduğu vurgulanmıştır<sup>(41)</sup>.

Temmuz 2009’da klinik çalışmalara başlanan aşı firmalarının ürettiği adjuvan içeren ölü aşular Eylül 2009’da Avrupa Birliği (AB) Komisyonu tarafından onaylanmış ve ülkemiz de toplam 43,000,000 doz aşı almak için anlaşmış, 6 milyon doz alınıp 3 milyonu uygulandıktan sonra pandeminin sonlanmasıyla kalan miktarın alınmasından vazgeçilmiştir. Bu dönemde aşı ile ilgili olarak gerek ülkemizde gerek dünyada ortaya atılan; aşının gerekli olup olmadığı, etkinliğinin yeterliliği ve en önemlisi içerdiği adjuvan madde skualen ile koruyucu civa bileşiği tiomersale bağlı olarak aşı sonrası ortaya çıkabilecek ciddi yan etkilerin olabileceği şeklindeki spekülasyonlar zihinleri karıştırmış ve tartışmalara yol açmıştır.

### Skualen: Yapısı ve kullanım alanları

Skualen, genelde ticari amaçlarla ve başlıca köpek balığı karaciğerinden olmak üzere,

horozibiği çiçeği tohumu, pirinç, zeytin ve buğday tohum özü gibi çeşitli botanik kaynaklardan elde edilebilen, terpenoid ailesi üyesi, doğal organik bir yağdır. Terpenler veya terpenoidler olarak adlandırılan molekül grubunun çeşitli kimyasal, yapısal ve işlevsel özellikleri bulunur. Günümüzde 30,000’in üstünde terpenoid bileşik tanımlanmış olup çeşitli terpenoid sınıfları farmakolojik (antibiyotik, antihiperglisemik, antiinflamatuvar, antikanser), toksin, çesni ve besinsel ilaveler gibi birçok alanda kullanılmaktadır<sup>(29)</sup>.

Terpenoidler içinde ve triterpen sınıfında sefalosporin ve lanosterol ile birlikte yer alan skualen, insanlar dâhil tüm yüksek organizmalar tarafından üretilirler. Skualen, 6 izopren ünitesi içeren poli-doymamış lineer bir hidrokarbondur ve kolesterol ile diğer steroidlerin biyokimyasal bir öncülüdür. Doğada özellikle zeytin, köpekbalığı karaciğeri (squalus), karaciğer yağı, buğday tohumu ve pirinçte yaygın olarak bulunması ve hücreler tarafından sentezlenmesine ek olarak insan diyetinin bütünleyici bir parçası olarak da tüketilir. Özellikle zeytinyağında skualen içeriği % 0.7 gibi yüksek seviyelere çıkmaktadır. İnsanlarda skualen karaciğer ve deride sentezlenir, kanda çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL) ile düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) tarafından taşındıktan sonra büyük oranda sebace bezler tarafından salgılanırlar<sup>(19,21,29)</sup>.

Skualen, intravenöz enjeksiyon veya oral tüketilmesi fark etmeksizin iyi tolere edilir. Oral olarak alınan skualen iyi absorbe edilir (% 60-85) ve çeşitli dokulara yayılır. Oral olarak sıçanlara verilen skualenin (3H-skualen) kolesterole (14C-kolesterol) benzer şekilde lenfatik damarlardan absorbe edildiği, emilen dozun yaklaşık % 20’sinin barsak duvarından geçişi sırasında sterollere dönüştüğü ve tekrar lümene salgılandığı görülmüştür. Skualenin, kolesterole göre daha hızlı şekilde sistemik dolaşımda saptandığı, bununla beraber skualenden zengin yağ ve kas dokularında anlamlı boyutta birikmediği saptanmıştır<sup>(34)</sup>. Aşırı skualen tüketiminin uzun dönem etkileri ve güvenilirliği bilinmemektedir.

Serumdaki skualenin metabolizmasını incelemek için sıçanlara [3H] skualen ve [14C] kolesterol içeren serum veya izole lipoprotein verilmiş, intravenöz (İV) enjeksiyon sonrasında

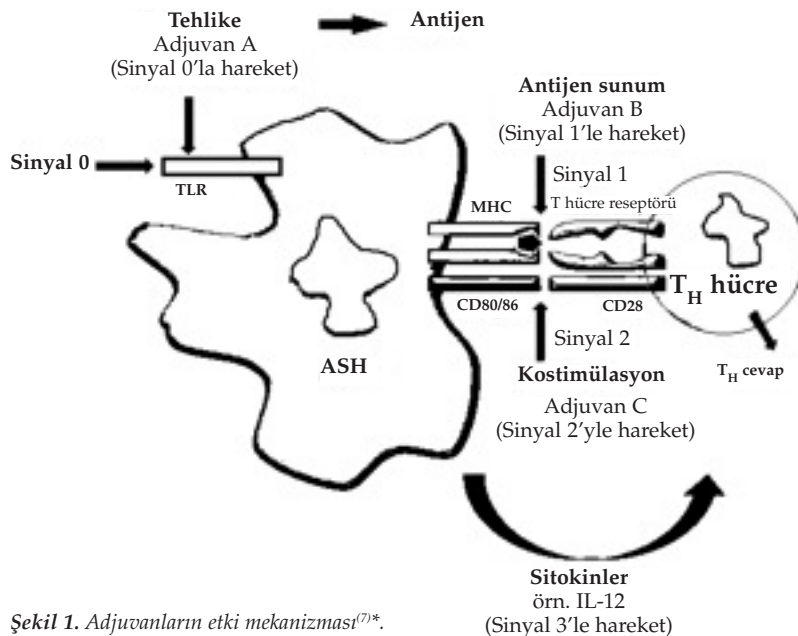
skualenin serumdan temizlenmesinin farklı kinetiklere sahip değişken faktörlere bağlı olduğu, dokularda birikmediği ve temizlenmenin kolesterolden daha hızlı gerçekleştiği görülmüştür<sup>(35)</sup>. İnsanlarda ise şilomikronları taklit eden lipid emülsiyon formunda İV injekte edilen skualenin, yine yağ emülsiyonlar olarak injekte edilen sterol ve trigliseridlerden daha yavaş temizlendiği ve skualenin İV enjeksiyonlarda, bitki sterollerine göre trigliseridlerden zengin lipoproteinler ile daha yakın ilişkide olduğu gözlenmiştir. Skualen içeren lipid emülsiyonların İV enjeksiyonundan sonra hiçbir yan etkinin görülmediği de bildirilmiştir<sup>(30)</sup>. Biyolojik kökenli yıkılabilir bir yağ olması ve besin takviyesi olarak sıkça kullanılması sebebiyle tedavi uygulamalarında su içi yağ emülsiyonların yağ partikülü şeklindeki squalen formülü, aşılarda için yeni adjuvan olarak kullanılmaktadırlar.

### Skualen: Potent adjuvan

Bağışıklık sisteminin koruyucu ve uzun süreli bir bağışıklık yanıtı geliştirmedeki hassas dengesi birçok olaya bağlıdır. Antijenin vücuda giriş yeri ve şekli, dolaşıma ne kadar süreyle ve hangi formda salındığı ile antijenin hangi hücreler ve uyarıcı sinyallerle MHC moleküllerine sunulduğu önemlidir. Antijenin işlenmesi ve sunumu ile ilgili birçok kavram anlaşılabilmiş de, küçük bir rekombinant veya sentetik mole-

külün nasıl hümoral ve hücrel bağışıklık yanıtını uyararak koruyucu bağışıklık sağladığı tam olarak bilinmemektedir. Bu yüzden en sonunda amaç iyi bir aşı elde etmekse, özgül olarak bağışıklık yanıtını arttıran moleküller (örn: adjuvanlar) ile birlikte antijenik uyarıyı vücudun belirli bölgelerine veya mukozal yüzeyler gibi farklı anatomik bölgelere hedefleme özelliği gösterebilen taşıyıcı sistemler üzerinde çalışmak gerekir<sup>(33)</sup>. Latince "yardım" anlamına gelen adjuvan terimi, ilk olarak 1920'lerde Ramon tarafından, difteri veya tetanoz toksinine karşı antikor titrelerini arttırmak için beraber kullanmış olduğu ufalanmış ekmek, agar, tapyoka unu, nişasta yağı veya saponin gibi maddeler için önerilmiştir. Daha sonraları alüminyum tuzlarının bağışıklık yanıtını arttırdığı doğrulanmış ve böylece alum, son on yıla kadar insanlarda onaylanan ilk ve tek adjuvan olmuştur<sup>(11)</sup>. "İmmünolojik adjuvan", bir antijene karşı bağışıklık yanıtını arttırmak veya düzenlemek üzere uygulanan maddeye verilen addır. İdeal özellikte bir adjuvanın, konağa toksik etki göstermeksizin bağışıklık yanıtını arttırması beklenir. Bu özellikleri nedeniyle adjuvanlar, 80 yılı aşkın bir zamandır aşı uygulamalarında bağışıklık yanıtını arttırmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır<sup>(7,29)</sup>.

Adjuvanlar çeşitli efektör mekanizmalara sahiptir (Şekil 1). Alüminyum hidroksit ve sku-

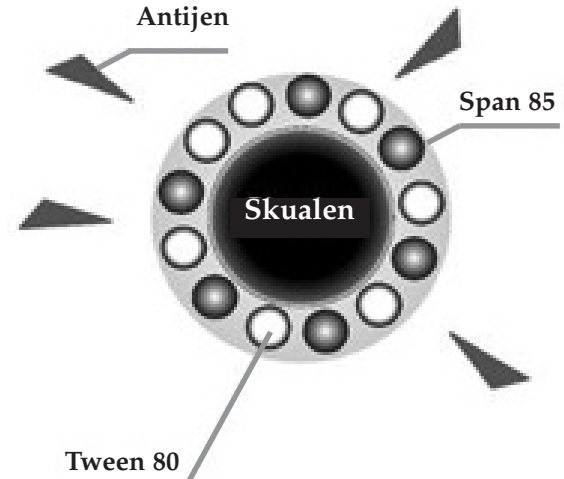


Şekil 1. Adjuvanların etki mekanizması<sup>(7)\*</sup>.

\*T<sub>H</sub> hücre yanıtı sinyal 0, sinyal 1 ve sinyal 2 üzerinden çalışır. Teorik olarak adjuvanlar bu üç sinyalin her birini tetikleyebilir. TLR agonistleri gibi son dönemde geliştirilen özgül adjuvanlara tip A adjuvanlar denir. ASH'leri hedef alan veya antijen yakalanmasını destekleyen, sinyal 1 üzerinden harekete geçen ve T hücrelere antijen sunumunu arttıran adjuvanlar tip B adjuvanlardır. Kostimülatuar moleküllerin özgül ligandları (bağlaçları) sinyal 2'yi arttırmak ve bunlar tip C adjuvanlardır. Sinyal 3, ASH'den T hücreye iletilen, sitokin IL-12 gibi mediyatörleri temsil eder.

alen gibi özgül olmayan adjuvanlar enjeksiyon bölgesinde bir depo oluşturarak yüksek bölgesel antijen konsantrasyonuna sebep olurlar ve bu yolla antijen sunan hücreler (ASH) tarafından alınımı arttırmaları. Üstelik bağışıklık hücrelerinin doğrudan uyarılması ile antijen tanımlanması da hızlanabilir. Bu şekilde etki eden tip B adjuvanlar antijen ve ASH'lerle özgül olmayan bir etkileşime girerler ve etkileri sinyal 1'in amplifikasyonuna bağlıdır. Tip B adjuvanların aksine, tip A adjuvanlar ise özgül bir etki mekanizmasına sahiptirler. Son dönemde geliştirilen çoğu tip A adjuvan (örn. monofosforil lipid A), toll benzeri reseptörler ("Toll Like Receptor" -TLR) için özgül agonistlerdir ve birincil olarak sinyal 0'la ve dolaylı olarak ASH'leri uyarıp IL-12 gibi sitokinlerin salınımı ile sinyal 2 üzerinden hareket ederler. Ek olarak TLR agonistleri, beraber uygulanan antijenin yeterli sunumunu destekleyerek sinyal 1 üzerinden de hareket edebilirler. Son olarak klinik kullanımı olmayan tip C adjuvanların (örn. TGN1412) etki mekanizması ise kostimulatuar moleküller aracılığı ile ASH'ler üzerine etki ederek sinyal 2'nin artırılmasına dayanır<sup>(7)</sup>.

Birçok adjuvan deneysel olarak denenmiş olmasına rağmen insanlar için kullanımı onaylanmış az sayıda adjuvan bulunmaktadır (Tablo 1). Bu adjuvanlardan biri olan MF59 (eski Chiron yeni Novartis firmaları tarafından geliştirilmiş) bir su-içi-skualen emülsiyonudur. İçeriğinde biyolojik olarak çözünebilir % 4.3 oranında skualen yağı, bunu stabilize eden 2 non-iyonik sürfaktan (% 0.5 Tween 80 ve % 0.5 Span 85) ve düşük iyonik güçte sitrat tamponu bulunur (Şekil 2). Bu formülün güvenilir bir adjuvan olduğu kanıtlandıktan sonra emülsiyon formunun mikrofluidize edildiğinde birkaç yıl stabil kaldığı da gözlenmiştir<sup>(11,18,40)</sup>. Bu özellikleriyle



Şekil 2. MF59 adjuvan emülsiyonunun yapısı.

MF59, 1997 yılında Avrupa ülkelerinde kullanılmaya uygun görülmüş ve ilk olarak influenza aşısında (Fluad, Chiron, İtalya) 10 mg/doz olacak şekilde kullanılmış olup günümüze kadar 30 milyonun üzerinde olguda uygulanmıştır.

İlk olarak 1980'lerde skualen ile birlikte hegzadekan ve diğer lipidler, *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) hücre duvarları ile birlikte tümörlere karşı özgül olmayan bağışıklığı arttırmak amacıyla hint domuzları üzerinde denenmiştir. Bu çalışmada skualen emülsiyonlarının mineral yağına eşdeğer hücre duvarı taşıyıcıları olduğu ve mineral yağı emülsiyonlarını stabilize eden Tween 80 konsantrasyonunun yüzde birine ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir<sup>(42)</sup>. Daha sonraları skualen ve skualen emülsiyonlarına antijenler eklenerek hem koruyucu antikorların hem de hücresel bağışıklık yanıtının oluştuğu gösterilmiştir<sup>(1)</sup>. Herhangi bir antikor izotipi yüksek afiniteye ve yeterli düzeye sahip olduğunda bakteriyel toksinleri ve hatta bazı virüsleri nötralize edebilir<sup>(6)</sup>. Bununla beraber bazı antikor izotipleri komplemanı etki-

Tablo 1. Klinikte kullanılan ve deneysel adjuvanlar<sup>(7)</sup>.

Adjuvan	Tipi	Kullanım	Uygulama yolu	Aşılar
Alüminyum hidroksid	Tip B	Klinik	İntramüsküler / İntradermal	Hepatit A/B
Monofosforil lipid A (MPL)	Tip A	Klinik	İntramüsküler	HPV (Cerverix®), Hepatit B,
MF59 (Skualen)	Tip B	Klinik	İntramüsküler	HSV-II
Lipozomal adjuvanlar	Tip B	Klinik	İntramüsküler	İnfluenza (Fluad®)
Freund adjuvanı	Tip B	Deneysel		Hepatit A (Epaxal®)
Nanopartiküller	Tip B	Deneysel		
Toksinden türetilen adjuvanlar	Tip B	Deneysel		
Flajellin		Deneysel		

li biçimde aktive ederek, monositlerde yüksek afiniteli reseptörlere bağlanır ve antikor bağımlı efektör hücrelere sinerjistik etki ile sitotoksiste sağlar. Yüksek afiniteli FcγI reseptörlerine bağlanma özelliği gösteren farelerdeki IgG2a ve insanlardaki IgG1 antikorları bu antikor izotiplerine örnek olarak verilebilir. Sonuç olarak, etkin bağışıklığı sağlamak için ağırlıklı olarak insanlarda IgG1, farelerde ise IgG2a izotipinde yüksek afiniteli antikorların yapımını sağlayan adjuvan formülleri tercih edilmektedir. 1980 ortalarında ilk skualen içeren aşı emülsiyonu olan SAF (Syntex Adjuvant Formulation) ile yapılan çalışmalarda, rölatif olarak yüksek IFNγ üretimi ile beraber Th1 yanıtının ortaya çıkarak koruyucu IgG2a izotipi antikor üretiminin uyarıldığı saptanmıştır<sup>(17)</sup>. İnfluenza infeksiyonları için de, yüksek virüs nötralizasyon aktivitesi yokluğunda bile, IgG2a izotip indüksiyonunun koruyucu olduğu<sup>(3,16)</sup>, bu alt sınıfa ait monoklonal antikorların antiviral koruyuculuğu etkili biçimde sağladığı vurgulanmaktadır<sup>(20)</sup>.

En iyi bilinen skualen tabanlı aşı adjuvanı olan MF59 ise enjeksiyon bölgesinde ASH'lerle etkileşime girmekte ve enjeksiyondan 2 gün sonra en yüksek konsantrasyonda olacak şekilde lenf düğümlerine yayılmaktadır. Bu adjuvan, lenf düğümlerinde ASH hücre özelliğinde olan yerel hücreler tarafından endositozla alınır ve böylece antijen sunumunun etkinliği artar. Buna ek olarak makrofajların enjeksiyon bölgesine kemoatraksiyonları da gösterilmiştir<sup>(10,31)</sup>. MF59'un bir yandan BALB/c farelerde, Th2 sitokinleri IL-5 ve IL-6 sekresyonuna eşlik eden yüksek IgE ve orta düzey IgG antikor titrelerini indükleyebildiği<sup>(37)</sup>, diğer yandan da makaklarda Th1 sitokinleri olan IFN-γ ile IL-2 salınımını tetiklediği gösterilmiştir<sup>(38)</sup>. Sonuç olarak MF59, etkin sitotoksik T hücrelerinin üretimini uyaran predominant bir Th1 yanıtı ortaya çıkararak hümmoral yanıt yanında etkili bir hüccresel yanıt da oluşturur<sup>(28)</sup>. Alüminyum bileşikleriyle karşılaştırıldığında MF59 uygulamasının daha güçlü immün yanıtlar oluşturduğu da gözlenmiştir<sup>(36,39)</sup>. MF59, alum, kalsiyum fosfat, PLG gibi adjuvanların etkinliğinin kıyaslandığı bir çalışmada, MF59'un tek başına en güçlü adjuvan olduğu, özellikle H3N2 antijenine karşı diğer adjuvanlar ile 2-3 kat artmış hemaglutinasyon

inhibisyon titreleri sağlanırken MF59'un 9 kat titre artışı sağladığı ve diğerlerine göre uzun süreli hemaglutinasyon inhibisyon ve nötraliz edici titreler oluşturarak T hücre yanıtını indüklediği raporlanmıştır. MF59'la indüklenen T hücre yanıtlarının, aşılama 6 ay sonra bile açıkça saptanabilir ve diğer yanıtlardan çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir<sup>(39)</sup>. Başka bir çalışmada ise influenza aşısının etkinliğini arttırmak için MF59 kullanılmış ve tek başına influenza antijeni kullanımına göre titreleri 5-250 kat arttırdığı bildirilmiştir<sup>(22)</sup>. Diğer çeşitli rekombinant antijenlerin (örn: hepatit B virüsü, hepatit C virüsü, sitomegalovirüs, herpes simpleks virüs, HIV) yenidoğanlar dâhil çeşitli yaş gruplarında uygulanmasında da MF59'un etkinliği ve güvenilirliği gösterilmiştir<sup>(26)</sup>. B hücre lenfomalı hastalarda yürütülen tümör aşı çalışmalarında da adjuvansız antijen (kansere hücrelerinin idiyotipik yüzey immünoglobulini) uygulamaları zayıf anti-idiyotipik yanıtlara sebep olurken, skualen emülsiyonlu antijen kompleksi uygulamasıyla aşılama hastaların yaklaşık yarısında tümör immünoglobulin idiyotiplerine karşı özgül bağışıklık yanıtları oluşmuş ve bu hastalar hastalığın progresyonunun engellenmesi açısından anlamlı ilerlemeler göstermişlerdir<sup>(15)</sup>. Benzer şekilde metastatik melanomalı hastalarda, antijenin skualen emülsiyon formülasyonu halinde uygulandığı anti-idiyotip aşı immünoterapisinde, etkili bir antikor yanıtı elde edilerek 26 hastanın 6'sında anlamlı klinik anti-tümör etki görülmüş ve 1 hastada tam klinik remisyon saptanmıştır<sup>(27)</sup>.

### Skualen: Güvenilirlik ve yan etkiler

2009 grip pandemisinin yarattığı en büyük spekülasyonlardan biri grip aşısının içerdiği skualen bazlı MF59 ve bir civa bileşiği olan tiomersalin sebep olabileceği yan etkilerdi. Bunlardan bazıları, grip aşısından sonra ortaya çıkabileceği söylenen Guillain Barre sendromu, çeşitli otoimmün hastalıklar ve özellikle Körfez savaşı sendromu gibi skualenden kaynaklanabileceği öne sürülen ciddi yan etkileri içeriyordu. Diğer yandan pandemik influenza suşlarına karşı aşılama, sadece antijen kullanılması durumunda düşük immünojenite göstermesi ve özellikle pandemik aşılama stratejilerinin doz tutum-



lu, çapraz reaksiyon ve immün hafıza indüksiyonu yapabilme özellikleri gerektirmesi de potent bir adjuvan olan skualenin önemini arttırmıştır. Skualen içeren MF59'un influenza aşılardaki güvenilirliği konusunda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan biri olan, MF59 adjuvanlı Fluad aşısının Avrupa kaydı için yürütülen ve 20 klinik basamaktan (birinci aşılama için 13, ikinci aşılama için 5 ve üçüncü aşılama için 2 basamak) oluşan bir program dâhilinde 10,000'in üzerinde 65 yaş üstü hasta alınarak adjuvan (MF59) içeren ve içermeyen aşılarda immünize edilmiştir. Bu çalışma sonucunda adjuvanlı aşı verilenlerde hiçbir ani, alerjik tipte reaksiyon görülmemesine rağmen adjuvansız aşılarla göre daha yüksek oranlarda ağrı, eritem, endürasyon gibi yerel reaksiyonlar ile halsizlik, miyalji, ateş gibi sistemik hafif seyirli reaksiyonlara rastlanıldığı bildirilmiştir. En sık görülen yerel reaksiyon ağrı (% 32) iken en sık görülen sistemik reaksiyonun miyalji (% 8) olduğu vurgulanmıştır. Buna rağmen 3. günün sonunda Fluad ve diğer aşılarda bağışıklananlarda şikâyetler arasında bir fark görülmemiştir. Sonuç olarak MF59 içeren Fluad'ın yaşlılarda genel olarak iyi tolere edildiği, ayrıca nadir görülen ve tekrar doktor kontrolü gerektiren daha ciddi yan etkilerin takibi açısından yapılan faz 4 çalışmanın da kontrol grubundan farklı olmadığı, adjuvansız aşılarla göre kayda değer bir bağışıklık yanıtı artışı sağlayarak influenza virüs infeksiyonlarında morbidite ve mortaliteyi azaltabileceği bildirilmiştir<sup>(25)</sup>. Son dönemde yapılan geniş tabanlı bir çalışmada 64 klinik basamağı içeren 20,447 MF59 pozitif ve 7526 MF59 negatif olgu değerlendirilmiştir. Bağışıklamayı takiben beklenen yan etkiler (enjeksiyon bölgesinde ağrı, sıcaklık artışı, sertlik ve kızarıklık) MF59 pozitif grupta daha sık ortaya çıkmış fakat lokal ve hafif/orta şiddette seyretmiştir. Beklenmeyen yan etkiler olarak MF59 pozitif grupta en sık nazofarenjit, rinit, baş ağrısı ve öksürük (tümü % 2), MF59 negatif grupta ise üst solunum yolu infeksiyonu, öksürük, baş ağrısı ve rinit raporlanmıştır. Bununla beraber kardiovasküler yan etkiler, yeni kronik hastalık başlangıçları, hospitalizasyon ve ölüm gelişimi, MF59 pozitif grupta MF59 negatif gruba göre daha az sıklıkta saptanmıştır. Tüm

basamakların analizi sırasında MF59 pozitif 8 hastada otoimmün kökenli olabilecek istenmeyen yan etkiler saptanmış ve bu hastaların 5'inde (2 Crohn hastalığı, 1'er romatoid artrit, diabetes mellitus, multiple sklerozis) tanılar doğrulanmıştır. Aynı şekilde MF59 negatif grupta da 2 hastada (1 romatoid artrit, 1 temporal arterit) tanılar doğrulanmıştır. Kontrol deneme grubunda ise MF59 uygulanan 2 hasta ile MF59 uygulanmayan 2 hastada otoimmün hastalıklara rastlanmıştır. Karşılaştırmalı analizde otoimmün kaynaklı yan etkilerin insidanslarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmemiştir. Sonuç olarak, bu geniş tabanlı çalışma ile MF59 adjuvanlı aşıların güvenilirliği desteklenmiş, adjuvansız aşılarla göre klinik yararının daha fazla olduğu raporlanmıştır. Özellikle influenza pandemisi gibi kısıtlı antijen miktarının söz konusu olduğu durumlarda düşük immünojenite ve çapraz reaksiyon problemlerini aşabilmek için geniş çaplı immünizasyonlarda kullanılması konusunda güvenilir olduğu vurgulanmıştır<sup>(23)</sup>.

Skualen antijenik epitoplara sahip bir bileşik olduğundan immünoestimulan özellikler barındırabilir. 2000 yılında yayınlanan bir çalışmaya göre Körfez savaşı sendromu semptomları gösteren eski askerlerde skualene karşı antikolar saptanmış, oysa sağlıklı eski askerlerde bu antikolara rastlanmamıştır<sup>(4)</sup>. Körfez savaşı sendromu; 1990-1991 yıllarında Basra Körfezindeki askeri müdahaleye katılan erkek ve bayan askerlerde görülen yorgunluk, döküntü, baş ağrısı, artralji, miyalji, lenfadenopati, ishal, hafıza kaybı, otoimmün tiroid hastalığı, çevresel elemanlara duyarlılık ve alerjide artış ile nörolojik anormallikler gibi semptomlara topluca verilen isimdir<sup>(8,12,14)</sup>. Çalışmada çöl kalkanı/çöl fırtınası hizmeti için aşılansın 144 Körfez savaşı dönemi eski asker, 48 kan donörü, 40 sistemik lupus eritematozus hastası, 34 silikon meme implantlı hasta ile 30 kronik yorgunluk sendrom hastası değerlendirilmiş ve serum skualen antikoları ölçülmüştür. Bu grup içinde bağışıklanmış Körfez savaşı sendromu hastalarının büyük çoğunluğunun anti-skualen antikolara sahip olduğu, buna karşın Körfez savaşı sendromu hastalık belirtilerini göstermeyen kişilerde bu antikolara rastlanmadığı bildiril-

miştir. Bu iki grup dışında kalan idiopatik otoimmün hastalığa sahip olanlar ve kontrol grubunda da skualene karşı serum antikorlarına rastlanmamıştır. Bütün bu bulgular yanında çalışmada askeri personele yapılan bu aşılardan herhangi birinin skualen içerip içermediğinin bilinmediği belirtilmiştir<sup>(4)</sup>. Bu çalışma, uygun pozitif ve negatif kontrollerin bulunmaması ve onaylanmış analitik yöntemlerin kullanılmaması gerekçeleriyle eleştirilse de<sup>(2)</sup> aynı grup tarafından 2001 yılında bağışıklama programı dâhilinde kullanılan şarbon aşısının bazı lotlarının skualen içerdiği ve Körfez savaşı sendromunun anti-skualen antikorlarla bağlantılı olduğu bildirilmiştir<sup>(5)</sup>. Ayrıca bu çalışmada aşılama programına dâhil olan 2 hastada aşılama öncesi anti-skualen antikorlar bulunmazken aşı sonrası antikorlara rastlandığı bildirilmiştir. Sonradan bu çalışma Tıp Enstitüsü tarafından "yetersiz" olarak değerlendirilmiş<sup>(13)</sup> ve yapılan başka bir çalışmada test edilen şarbon aşılarının neredeyse tümünde skualen bulunmadığı bildirilmiştir<sup>(32)</sup>.

Adjuvan olarak skualen kullanımının anti-skualen antikorlar meydana getirerek özellikle otoimmün rahatsızlıklara sebep olabileceğini savunan bu yayınlardan sonra onaylanmış ELISA kitleri kullanılarak insanlarda skualene karşı hem IgM hem de IgG yapısında antikorlar araştırılmış ve hayatlarında skualen içeren aşılarla bağışıklanmamış kişilerde bile sık oranda ve düşük düzeylerde anti-skualen antikorlar tespit edilmiştir. Daha önemlisi MF59 adjuvanı içeren subunit influenza aşısı ile bağışıklama sonrasında ne anti-skualen antikorların indüklediğine ne de daha önceden varolan antikor seviyelerinin arttığına rastlanmıştır<sup>(9)</sup>. Son dönemde yapılan bir çalışmada kronik multisemptomatik hastalığa sahip sahada görevlendirilmiş ve görevlendirilmemiş toplam 579 eski askerin skualen antikor durumu değerlendirilmiştir. Hasta olanların içinde sahada görevlendirilmişlerin sayısının görevlendirilmeyenlerin 2 katı fazla olduğu vurgulanan çalışmada skualen antikor oranları neredeyse eşit bulunmuş ve skualen antikor durumu ile kronik multisemptomatik hastalık arasında anlamlı bir korelasyon saptanamamıştır. Sonuç olarak Körfez savaşı sendromunun etiyolojisinin bilinmemesine rağmen

men skualen antikor durumu ile hastalık arasında herhangi bir bağlantı olmadığı vurgulanmıştır<sup>(24)</sup>.

## Sonuç

Doğal bir bileşik olan skualen; farmakolojik işlevleri, biyolojik olarak parçalanıp kolayca elimine edilebilmesi ve özellikle güçlü şekilde bağışıklık sistemini uyarabilmesi nedeniyle tıbbi uygulamalarda geniş kullanım alanı bulmuştur. Her ne kadar skualen içeren formülasyonların kullanıldığı adjuvanlarla aşı uygulamalarından sonra anti-skualen antikorların indüklenmesi ve bu durumun bazı otoimmün hastalıklarla korelasyon göstermesi ile ilgili tartışmalar bulunsada özellikle son dönemde onaylanmış yöntemlerin kullanılmasıyla yürütülen çalışmalar, skualen içeren adjuvanların güvenilir olduğunu ortaya koymuşlardır. Günümüzde skualen kullanımını tıbbi açıdan sadece aşı uygulamasında yer bulmuş olsa da son dönemde yapılan ilaç ve gen transferi çalışmalarında alınan başarılı sonuçlar, bu bileşiğin özellikle çeşitli hastalıkların tedavisi için parlak bir geleceğinin olduğunu ipuçlarını vermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Allison AC, Byars NE. An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotypes and of cell-mediated immunity, *J Immunol Methods* 1986;95(2):157-68. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90402-3](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(86)90402-3)
2. Alving CR, Grabenstein JD. Re: Antibodies to squalene in Gulf War Syndrome, *Exp Mol Pathol* 2000;68(3):196-8. <http://dx.doi.org/10.1006/exmp.2000.2314> PMID:10816387
3. Arulanandam BP, Mittler JN, Lee WT, O'Toole M, Metzger DW. Neonatal administration of IL-12 enhances the protective efficacy of antiviral vaccines, *J Immunol* 2000;164(7):3698-704. PMID:10725728
4. Asa PB, Cao Y, Garry RF. Antibodies to squalene in Gulf War syndrome, *Exp Mol Pathol* 2000;68(1):55-64. <http://dx.doi.org/10.1006/exmp.1999.2295> PMID:10640454
5. Asa PB, Wilson RB, Garry RF. Antibodies to squalene in recipients of anthrax vaccine, *Exp Mol*

- Pathol* 2002;73(1):19-27.  
<http://dx.doi.org/10.1006/exmp.2002.2429>  
 PMid:12127050
6. Bachmann MF, Kalinke U, Althage A et al. The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection, *Science* 1997;276(5321):2024-7.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.276.5321.2024>  
 PMid:9197261
  7. Brunner R, Jensen-Jarolim E, Pali-Schöll I. The ABC of clinical and experimental adjuvants-A brief overview, *Immunol Lett* 2010;128(1):29-35.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2009.10.005>  
 PMid:19895847 PMCID:2999744
  8. Coker WJ, Bhatt BM, Blatchley NF, Graham JT. Clinical findings for the first 1000 Gulf war veterans in the Ministry of Defence's medical assessment programme, *BMJ* 1999;318(7179):290-4.  
<http://dx.doi.org/10.1136/bmj.318.7179.290>  
 PMid:9924053 PMCID:27710
  9. Del Giudice G, Fraganane E, Bugarini R et al. Vaccines with the MF59 adjuvant do not stimulate antibody responses against squalene, *Clin Vaccine Immunol* 2006;13(9):1010-3.  
<http://dx.doi.org/10.1128/0148-0156-06>  
 PMid:16960112 PMCID:1563566
  10. Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D et al. Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection, *Cell Immunol* 1998;186(1):18-27.  
<http://dx.doi.org/10.1006/cimm.1998.1283>  
 PMid:9637761
  11. Edelman R, Tacket CO. Adjuvants, *Int Rev Immunol* 1990;7(1):51-66.  
<http://dx.doi.org/10.3109/08830189009061764>  
 PMid:2132879
  12. Fukuda K, Nisenbaum R, Stewart G et al. Chronic multisymptom illness affecting Air Force veterans of the Gulf War, *JAMA* 1998;280(11):981-8.  
<http://dx.doi.org/10.1001/jama.280.11.981>
  13. Fulco CE, Liverman CT, Sox HC. Gulf War and health: depleted uranium, pyridostigmine bromide, sarin, vaccines, *National Academy Press*, Washington D.C. (2000).
  14. Grady EP, Carpenter MT, Koenig CD, Older SA, Battafarano DF. Rheumatic findings in Gulf War veterans, *Arch Intern Med* 1998;158(4):367-71.  
<http://dx.doi.org/10.1001/archinte.158.4.367>  
 PMid:9487234
  15. Hsu FJ, Caspar CB, Czerwinski D et al. Tumor-specific idiotype vaccines in the treatment of patients with B-cell lymphoma-long-term results of a clinical trial, *Blood* 1997;89(9):3129-35.  
 PMid:9129015
  16. Huber VC, McKeon RM, Brackin MN et al. Distinct contributions of vaccine-induced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a antibodies to protective immunity against influenza, *Clin Vaccine Immunol* 2006;13(9):981-90.  
<http://dx.doi.org/10.1128/0148-0156-06>  
 PMid:16960108 PMCID:1563571
  17. Kenney JS, Hughes BW, Masada MP, Allison AC. Influence of adjuvants on the quantity, affinity, isotype and epitope specificity of murine antibodies, *J Immunol Methods* 1989;121(2):157-66.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90156-7](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(89)90156-7)
  18. Lidgate DM, Byars NE. Vaccine design: The subunit and vaccine approach, "Powell MF, Newman MJ (eds): Vaccines" kitabında s. 313-24, Plenum, London (1995).
  19. Liu GC, Ahrens EH Jr, Schreiberman PH, Crouse JR. Measurement of squalene in human tissues and plasma: validation and application, *J Lipid Res* 1976;17(1):38-45.  
 PMid:1255019
  20. Mozdzanowska K, Furchner M, Washko G, Mozdzanowski J, Gerhard W. A pulmonary influenza virus infection in SCID mice can be cured by treatment with hemagglutinin-specific antibodies that display very low virus-neutralizing activity in vitro, *J Virol* 1997;71(6):4347-55.  
 PMid:9151823 PMCID:191651
  21. Newmark HL. Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6(12):1101-3.  
 PMid:9419410
  22. Ott G, Barchfeld GL, Van Nest G. Enhancement of humoral response against human influenza vaccine with the simple submicron oil/water emulsion adjuvant MF59, *Vaccine* 1995;13(16):1557-62.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0264-410X\(95\)00089-J](http://dx.doi.org/10.1016/0264-410X(95)00089-J)
  23. Pellegrini M, Nicolay U, Lindert K, Groth N, Della Cioppa G. MF59-adjuvanted versus non-adjuvanted influenza vaccines: integrated analysis from a large safety database, *Vaccine* 2009;27(49):6959-65.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.08.101>  
 PMid:19751689
  24. Phillips CJ, Matyas GR, Hansen CJ, Alving CR, Smith TC, Ryan MA. Antibodies to squalene in US Navy Persian Gulf War veterans with chronic multisymptom illness, *Vaccine* 2009;27(29):3921-6.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.091>  
 PMid:19379786
  25. Podda A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine, *Vaccine* 2001;19(17-19):2673-80.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00499-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00499-0)



26. Podda A, Giudice GD, O'Hagan D. MF59 adjuvant emulsion, "Levine MM, Kaper JB, Rappuoli R, Liu MA, Good MF (eds.): New Generation Vaccines" kitabında s. 225-35, Marcel Dekker, New York (2004).
27. Quan WD Jr, Dean GE, Spears L et al. Active specific immunotherapy of metastatic melanoma with an antiidiotype vaccine: a phase I/II trial of I-Mel-2 plus SAF-m, *J Clin Oncol* 1997;15(5):2103-10.  
PMid:9164224
28. Radošević K, Rodríguez A, Mintardjo R et al. Antibody and T-cell responses to a virosomal adjuvanted H9N2 avian influenza vaccine: impact of distinct additional adjuvants, *Vaccine* 2008; 26(29-30):3640-6.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.04.071>  
PMid:18514980
29. Reddy LH, Couvreur P. Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy, *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61(15):1412-26.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.005>  
PMid:19804806
30. Relas H, Gylling H, Miettinen TA. Fate of intravenously administered squalene and plant sterols in human subjects, *J Lipid Res* 2001;42(6):988-94.  
PMid:11369807
31. Schultze V, D'Agosto V, Wack A, Novicki D, Zorn J, Henning R. Safety of MF59 adjuvant, *Vaccine* 2008;26(26):3209-22.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.093>  
PMid:18462843
32. Spanggard RJ, Sun M, Lim P, Ellis WY. Enhancement of an analytical method for the determination of squalene in anthrax vaccine adsorbed formulations, *J Pharm Biomed Anal* 2006;42(4):494-9.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.009>  
PMid:16762524
33. Tagliabue A, Rappuoli R. Vaccine adjuvants: the dream becomes real, *Hum Vaccin* 2008;4(5):347-9.  
<http://dx.doi.org/10.4161/hv.4.5.6438>  
PMid:18682690
34. Tilvis RS, Miettinen TA. Absorption and metabolic-fate of dietary 3H-squalene in the rat, *Lipids* 1983;18(3):233-8.  
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02534554>  
PMid:6855483
35. Tilvis RS, Miettinen TA. Fate of intravenously administered squalene in the rat, *Biochim Biophys Acta* 1982;712(2):374-81.  
PMid:7126611
36. Vajdy M, Selby M, Medina-Selby A et al. Hepatitis C virus polyprotein vaccine formulations capable of inducing broad antibody and cellular immune responses, *J Gen Virol* 2006;87(Pt 8):2253-62.  
<http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.81849-0>  
PMid:16847121
37. Valensi JP, Carlson JR, Van Nest GA. Systemic cytokine profiles in BALB/c mice immunized with trivalent influenza vaccine containing MF59 oil emulsion and other advanced adjuvants, *J Immunol* 1994;153(9):4029-39.  
PMid:7930610
38. Verschoor EJ, Mooij P, Oostermeijer H et al. Comparison of immunity generated by nucleic acid-, MF59-, and ISCOM-formulated human immunodeficiency virus type 1 vaccines in Rhesus macaques: evidence for viral clearance, *J Virol* 1999;73(4):3292-300.  
PMid:10074183 PMCID:104093
39. Wack A, Baudner BC, Hilbert AK et al. Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice, *Vaccine* 2008;26(4):552-61.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.11.054>  
PMid:18162266
40. Wintch J, Chaignat CL, Braun DG et al. Safety and immunogenicity of a genetically engineered human immunodeficiency virus vaccine, *J Infect Dis* 1991;163(2):219-25.  
<http://dx.doi.org/10.1093/infdis/163.2.219>  
PMid:1988506
41. Writing Committee of WHO Consultation on Clinical Aspects of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza (Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z et al.) Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection, *N Engl J Med* 2010; 362(18):1708-19.  
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1000449>  
PMid:20445182
42. Yarkoni E, Rapp HJ. Influence of type of oil and surfactant concentration on the efficacy of emulsified Mycobacterium bovis BCG cell walls to induce tumor regression in guinea pigs, *Infect Immun* 1980;28(3): 881-6.  
PMid:6995325 PMCID:551033