



## Skualen'in Hastalık Modellerinde Etkisi

### The Impact of Squalene on Disease Models

Sülen SARIOĞLU, Resmîye IRMAK YÜZÜGÜLDÜ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, BALÇOVA, İZMİR

#### ÖZET

Bir isoprenoid bileşeni olan skualen ( $C_{30}H_{50}$ ), karaciğer ve deride sentezlenir ve köpek balığı karaciğeri ile zeytinyağı en önemli kaynaklarıdır. Skualen emülsiyonları aşılarda adjuvan olarak, kanser ve diğer bazı hastalıkların tedavisinde koruyucu ve önleyici etkileri nedeniyle, ilaç ve gen taşıyıcısı olarak çeşitli alanlarda kullanılmaktadır.

Türkiye'nin 2014 yılında skualen üretiminde dünya 4.sü olmasına karşın ülkemizden bu bileşiğin etkisi ile ilgili araştırma bulunmamaktadır. Araştırmalar zeytinyağı üretiminde ön planda olan İspanya ve İtalya kökenlidir.

Skualenin özellikle kanser ve diğer hastalıklardaki koruyucu ve önleyici etkilerine yönelik yapılan araştırmalar antioksidan ve antitümör etkilerine ilişkin iki ana konudur. Antioksidan araştırmalar arasında ülseratif kolit, miyokard infarktüsü, Parkinson hastalığı, ilaç ve radyoterapi yan etkileri üzerinde etkinliği bulunmaktadır. Antitümör etkileri ise kolon, akciğer, meme, nöroblastom, deri kökenli skuamöz hücreli karsinom alanlarında araştırılmıştır.

Bu derleme skualen hakkında kapsamlı bilgi sunmakta, çalışmaların laboratuvar ve patolojik metodoloji ve sonuçlarını içermektedir. Birçok alanda etkinliği henüz araştırılmamış olan skualenin özellikle önemli bir üretici olan Türkiye için önde gelen bir araştırma konusu olması gerektiği görülmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Skualen, Zeytinyağı, Antioksidan, Antitümör

#### ABSTRACT

Squalene ( $C_{30}H_{50}$ ), an isoprenoid compound, is synthesized in the liver and skin. Most important sources of squalene are olive oil and shark liver.

Squalene emulsions are used as adjuvant in vaccines, in the treatment of cancer and some other diseases due to their protective and preventive effects and in various fields as medicines and gene carriers.

Although Turkey is the 4th in the world for squalene production in 2014, there is no research in our country about the effects of this compound. Most of the literature of squalene is based on Spain and Italy, which are the forerunners in the production of olive oil.

Researches can be classified in two groups; related to the antioxidant effects and antitumor effects of squalene. Antioxidant investigations include efficacy on ulcerative colitis, myocardial infarction, Parkinson's disease, drug and radiotherapy side effects. Antitumor effects were investigated in colon, lung, breast and skin cancers and neuroblastoma.

The review provides comprehensive information on squalene, including the laboratory and pathological methodologies and results of current studies. Effectiveness of squalene in many areas have not yet been researched and it seems that squalene should be a leading research topic for Turkey as a particularly important producer.

**Key Words:** Squalene, Olive oil, Antioxidant, Antitumor

## GİRİŞ

Skualen endojen kolesterol sentezinde yer alan 6 izopren alt ünitesinden oluşan triterpen bileşiği olup, 2 molekül farnezil pirofosfatın NADPH aracılı redüksiyon tepkimesi ile kondanse olarak oluşur (1).

1916'da Tsujimoto'nun köpekbalığı karaciğerinden  $C_{30}H_{50}$  formülüne sahip hidrokarbon bileşiğini izole edip, "squalene" ismini verdikten sonra, skualenin farelerde sentezlenebildiği ve fare karaciğerinde de bulunduğu saptanmıştır (2).

Skualen; vitamin A, karoten, koenzim Q10, E vitamini, K vitaminine benzer yapıda olan isoprenoid bileşiğidir. 6 çift bağ içerir, güçlü radikal temizleme kapasitesine sahiptir ve deriyi lipid peroksidasyonunun zararlı etkilerinden korur (3). "Skualen" ise sebese gland sekresyonlarında doğal olarak bulunan, skualen'in komplet hidrojenizasyonu ile oluşan satüre formudur ve radikal temizleme kapasitesine sahip değildir.

Skualen köpekbalığı karaciğeri dışında doğada buğday tohumu, pirinç kabuğu, zeytinyağı, palm yağında bulunan bir bileşiktir (4). Özellikle zeytinyağı %0,7'lik oranla skualeni yüksek oranda içerir (5).

İnsanlarda skualen karaciğer ve deride sentezlenir, kanda VLDL ve LDL ile taşınır, ve sebese bezlerden yüksek oranlarda sekrete edilir (6).

Skualen emülsiyonları aşılarda adjuvan olarak, kanser ve diğer bazı hastalıkların tedavisinde protektif ve preventif etkileri nedeniyle, ilaç ve gen taşıyıcısı olarak çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Biz skualen ile ilgili bu derleme yazısında özellikle kanser ve diğer hastalıklardaki koruyucu ve önleyici etkileri üzerine yapılan çalışmalara odaklanacağız.

Türkiye zeytinyağı ve bununla bağlantılı olarak da skualen üretiminde 2009'da 147 bin tonla 7. sıradayken, takip eden yıllarda üretimi artırarak 2014 yılında yıllık 180 bin tonla 4.sıraya yükselmiştir (7). Önemli bir noktada bulunmakla birlikte ülkemizden bu alanda hastalıklar üzerine bu bileşiğin etkisi ile ilgili araştırma bulunmamaktadır. Araştırmalar zeytinyağı üretiminde ön planda olan İspanya ve İtalya kökenlidir.

## ANTIOKSİDAN ETKİLERİ ÜZERİNE YAPILAN ARAŞTIRMALAR

Antioksidanlar vücudumuzda sentezlenen ancak dışarıdan da alınan ve birçok hücrel hasarlanmayı engelleyen, dış orbitalinde eşleşmemiş elektron bulunan serbest radikalleri ortadan kaldıran moleküllerdir ve skualenin de bunlar arasında bulunduğu düşünülmektedir. Bu nedenle bu alanda in vitro ve deneysel araştırmalar yapılmıştır ve bu modeller arasında nöroblastom hücre kültürü ve hayvan modelinde kemoterapötik etkilerin üzerine etkisi, myokard infarktüsü, meme, ülseratif kolit, Parkinson ve kanser tedavisinde önemli yeri olan radyoterapi üzerine etkileri yer almaktadır.

Bu araştırmalardan bazıları sadece hücre kültürü üzerinde, bazıları deneysel, bazıları ise her ikisini kapsar niteliktedir. Hücre kültürü çalışmaları normal ve kanserli hücrelerde araştırılmıştır.

Antioksidan etki, Warleta ve ark.nın araştırmasında immortal insan meme epitelyal hücreleri, minimal invaziv (östrojen ve progesteron reseptörleri pozitif) ve yüksek dereceli invaziv (östrojen ve progesteron reseptörleri negatif) meme kanserini hücre hatları kullanılarak araştırılmıştır (8). Araştırmada immortal non-tümörojenik insan meme epitel hücre hattında (MCF10A) doz bağımlı olarak, intraselüler ROS (Reaktif oksijen deriveleri) seviyelerini azalttığı,  $H_2O_2$  ile indüklenen oksidatif hasarı önlediği ve hücreleri DNA hasarına karşı koruduğu bulunmuştur. Ancak bu çalışmada skualenin sayılan etkileri insan minimal invaziv (MDA-MB-231) ve yüksek dereceli invaziv meme kanser hücre hatlarında (MCF7) göstermediği bulunmuştur. Bu çalışmada skualenin antiradikal etkisinin 800 mM'den sonra başladığı bulunmuştur. Bu antiradikal aktivitesinin araştırıldığı yöntemlerde kontrol olarak antioksidan etkisi bilinen -takiferol (TOC) ve 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilik asit (Trolox) kullanılmıştır.

$H_2O_2$  ile indüklenmiş DNA hasarına karşı skualen'in koruyucu etkisi her üç hücre hattında da alkalın tek hücre jel elektroforez (comet assay) kullanılarak, ölçülebilen en küçük göç eden DNA ve kırılmış DNA parçalarının sayısı ölçülerek hesaplanmıştır. MCF10A hücre hattında artan miktarlarda skualen ile 24 saatlik inkübasyonu sonucunda doz bağımlı olarak  $H_2O_2$  ile indüklenen DNA hasarında anlamlı bir azalma saptanmıştır. Ancak skualen tek zincir kırılmalarına karşı MCF7 and MDA-MB-231 tümör hücre hatlarında koruyucu etki göstermemiştir.

Ülseratif kolitin mekanizması tam olarak aydınlatılmış olmasa da, COX-2 (siklooksijenaz) ve iNOS (indüklenbilir nitrik oksit sentetaz) gibi bazı proteinlerde upregülasyon olduğu ve immün disregülasyona yol açtığı kabul gören bir görüştür (9). Diğer yandan MAPKs (mitojen-aktive protein kinazlar) sinyal yolağının da nükleer transkripsiyon faktörleri üzerinden rol oynayarak patogeneze rol aldığı düşünülmektedir. Bunlar arasında özellikle NF-  $\kappa$ B (nükleer faktör kappa beta) çeşitli proinflamatuvar sitokin genlerinin aktivasyonunun kontrolünde rol oynar (10).

Bunlara ek olarak Janus- kinaz sinyal ileti ve aktivatör yolağı (JAK- STAT) da sitokinler ile aktive olan diğer bir inflamatuvar yolaktır. Özellikle STAT3 ülseratif kolit patogenezi klinik ve deneysel bilgiler ışığında en iyi dokümente edilmiş STAT ailesi üyesidir (11). Nükleer faktör- eritroid türevi- 2 (Nrf- 2) antioksidan ve detoksifiye edici enzimlerin transkripsiyonel regülasyonunda ve proinflamatuvar sinyal yolağının supresyonunda merkezi bir rol oynamaktadır (12). Ek olarak natural forkhead box P3 (FOXP3) ekspresyonu yapan T regülatuar hücreleri, patojenik oteoreaktivasyonu kontrol

altına almakta ve immünhomeostazisi devam ettirmekte sorumludurlar ve bunların fonksiyonlarının devamı inflamatuvar bağırsak hastalıklarının (IBH) iyileşmesinde önemlidir (13).

Bu patogenezi yolaklarının ışığında diyetle alınan skualenin IBH üzerine etkisini araştıran, DSS (dekstran sülfat sodyum) ile akut kolit modeli oluşturulmuş C57BL/6 fareler üzerinde yapılan çalışmada, skualenin anti-inflamatuvar etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada inflamatuvar mediyatörler, TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ , ELISA ile ölçülmüş, COX-2 ve i-NOS protein ekspresyonu western blot ile değerlendirilmiştir. Fareler plasebo, kontrol, %0,1'lik ve %0,02'lik skualen ile beslenmelerine göre 4 gruba ayrılmış. 4 haftalık diyetten sonra plasebo grubu dışında 5 gün boyunca %3'lük DSS içme sularına karıştırılarak içirilmiş ve 5 gün daha diyetle devam edilip sakrifiye edilmişler. DSS koliti için her hayvandan alınan 3 kolonik kesit; inflamasyon, yaygınlık ve kript hasarına göre patolojik tarafından skorlandırılmıştır. Buna göre skualen suplementasyonu yapılan gruplarda proksimal kolon ve rektumda mikroskobik hasar skoru anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır. Mukozal sitokin seviyeleri TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ , ELISA ile değerlendirilmiş ve skualen desteği yapılan gruplarda immün sinyallerde anlamlı olarak düşüklük bulunmuştur. MAPK proteinleri p38 ve JNK'nin western blot ile değerlendirilmesinde skualen suplementasyonu yapılan her iki grupta sadece p38 düzeyinde anlamlı bir düşüklük bulunmuştur. Kontrol grubunda, STAT3 aktivasyonu DSS grubu ile plasebo grubunda aynı seviyelerde bulunmuş ve skualen desteği ile değişiklik gözlenmemiştir. Selüler antioksidan cevapta anahtar rol oynayan transkripsiyon faktörü Nrf2'nin plasebo grubuna göre, DSS grubunda anlamlı bir azalma tespit edilmesine rağmen, skualen uygulanan grup ile grubu arasında anlamlı fark saptanmamıştır (14).

Parkinson hastalığı nigrostriatal sistemdeki dopaminerjik nöronların progresif hasarı ve striatumda dopaminerjik aktivitede azalma ile karakterizedir. Mekanizması henüz net olarak anlaşılmamışsa da, serbest oksijen radikallerinin hasarının mekanizmada önemli bir rol oynuyor olabileceği düşünülmektedir (15). 6 hidrokسيدopamin (6-OHDA) deneysel Parkinson modeli oluşturmak için kullanılan, otooksidasyon ile oksijen radikalleri oluşturan bir bileşiktir. 30-35 gram arasında değişen ağırlıklara sahip erkek farelere 14 gün boyunca %24'lük protein içeriğine sahip diyetle ek olarak, oral yolla, günde tek doz 1g ya da 0.1 g/kg dozunda boyunca skualan ya da skualen uygulaması yapılmıştır. 7 günlük uygulamanın ardından intraserebroventriküler olarak 60 mikrogram dozunda 6-OHDA enjekte edilmiş ve sonraki 7 gün boyunca skualan/ skualen uygulamasına devam edilmiştir. Son skualan/ skualen uygulamasından 24 saat sonra fareler sodyum pentobarbital anestezisi altında sakrifiye edilmiş ve striatumları -80 derecede saklanarak incelenmiştir. Dopaminerjik nöronal hasarın göstergesi olarak DA (Dopamin) ve metabolitlerinin (DOPAC [dihidroksi fenilasetik asit] ve

HVA [homovalinik asit]) 6-OHDA uygulamasından önce ve sonrasında striatumda HPLC (Yüksek Performanslı Likid Kromatografisi) ile ölçülen ortalama düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma saptanmıştır. Skualen uygulamasının doku DA ve metabolitlerinin seviyelerinin azalmasını azalttığı ve DA seviyelerini koruduğu, skualanın ise DA ve metabolitlerinin doku düzeyindeki seviyelerindeki azalmayı arttırdığı bulunmuştur. SOD (süperoksit dismutaz), katalaz ve GPX (glutatyon peroksidaz) seviyelerinin fare striatumlarının seviyesinde skualan/ skualen uygulanan olgularda anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. DHA (dokosaheksaenoik asit), EPA (eikosapentaenoik asit), araşidonik asit, linolenik asit, linoleik asit ve linoleik asit/linolenik asit oranının gaz kromatografi-kütle spektrofotometri ile doku düzeyleri ölçülerek karşılaştırıldığında skualan/ skualen ile yağ asidi düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiş, ancak linoleik asit/ linolenik asit oranında anlamlı bir düşme saptanmıştır. Bu orandaki değişikliğin skualan ve skualenin artan düzeylerinin membran bilaminer fosfolipid tabakası ile etkileşimleri sonucunda olabileceği düşünülmüştür (16).

Kanser kemoterapisinin en önemli kısıtlamalarından biri normal dokuları ayırt etmeden organ toksisitesine neden olması ve bunun da beraberinde doz kısıtlaması ve tedavide başarısızlığın gelmesidir. Miyelosupresyon, renal toksisite, nöropati gibi yan etkiler tedavi başarısızlığının yanısıra hayat kalitesinin ciddi şekilde bozulmasına da neden olan yan etkilerdendir. Normal dokuları kemoterapiklerin etkisinden korumak için amifostin, sodyum tiyosülfat, glutatyon, mesna, prokainamid birçok antioksidan ajan kullanılmıştır (17). Normal dokuları kemoterapisinin toksik etkilerinden korurken, tümör büyümesini stimüle etmeyen ve kemoterapik ajanın etkisini azaltamayacak, güvenli profile sahip, iyi oral tolerabiliteye sahip ajan ihtiyacı vardır. Birçok deneysel modelde skualenin heksaklorbifenil, heksaklorbenzen, arsenik, teofilin, fenobarbital ve strikinin gibi çeşitli kimyasal ajanlara karşı detoksifikasyon aktivitesi gösterilmiştir (18, 19). Bu potansiyel etkiyi araştırmak için skualenin protektif etkisi, kemik iliği hücrelerinde ve nöroblastom hücrelerinde sisplatin ile indükleniş toksisitede araştırılmış ve sisplatin toksisitesine karşı etkisi bilinen bir sitoprotektif ajan olan glutatyon (GSH) ile karşılaştırılmıştır (20).

CFU (colony factor unit- koloni faktör birimi) assay hematopoetik progenitör hücrelerin koloni oluşturma kapasitelerini ölçen bir testtir. CFU assayde, skualenin doz bağımlı olarak hematopoetik kolonilerin sayısını arttırdığı, koloni stimülasyonunun 12.5-25 mM doz aralığında maksimum olduğu izlenmiştir.

Skualen (25 mM) koloni büyümesini tek başına sisplatinin 2 mM ve 4 mM doz kullanıldığı gruba göre sırasıyla tüm koloni tiplerinde CFU-GEMM (granülosit, eritrosit, monosit, megakaryosit) ve CFU-GM (granülosit, monosit) sırasıyla %62

ve %32 oranında arttırmıştır ( $p=0.042$ ). Düşük dozlardaki skualenin ise yüksek sisplatin dozlarına karşı koruyucu etkisinin olmadığı görülmüştür. 8 mM dozundaki sisplatinine ise hem skualenin, hem de GSH'nin koruyucu etkilerinin olmadığı saptanmıştır. Skualen ve GSH'nun protektif etkilerinin karşılaştırılmasında ise skualenin 25 mM'lik dozunun GSH'nun 200 mM'lik dozuna eşdeğer olduğu ve sisplatinin 0.1- 4 mM'lik doz aralığında etkili oldukları gözlenmiştir.

25 mM skualen eklenmesi apoptozu 2 kat azaltmış ( $p<0.05$ ) ve CFU-GEMM kolonilerinin sağ kalımını tek başına 2 mM dozunda sisplatin kullanılan grup ile karşılaştırıldığında 2.9 kat arttırdığı ( $p<0.05$ ) ve GSH'nun da benzer etkilere sahip olduğu görülmüştür. Platinüm bileşikler kemik iliği ve böbrek gibi dokularda başlangıç dozundan 6 ay sonrasında bile kalabilen ve persistant toksik etkiler yapabilen bileşiklerdir. Bu etkiyi in vitro düzeyde saptamak amacıyla 4 haftalık CFU-GEMM kolonilerinde köpük hücreleri (lipid yüklü vakuoller olan makrofajlar) sayılmış ve tek başına sisplatin kullanılan grupta köpüksü makrofajların 5 kat daha fazla olduğu, bunların sayısının GSH ve skualenin kullanıldığı gruplarda anlamlı olarak azaldığı görülmüştür.

Sitoprotektif ajanların tümör büyümesini stimüle etmemesi ve tümör hücrelerini kemoterapotik ajanların toksisitelerinden korumaması özelliklerine sahip olması kullanım açısından önemlidir. Skualenin NBL koloni büyümesine etki klonajenik assay ile ölçüldüğünde; yüksek malignite potansiyelli MYC amplifikasyonu gösteren hücre kültürlerinin büyümesini etkilemediği, ancak MYC amplifikasyonu göstermeyen NBL hücre kültürlerinde 25 mM skualen'in büyümeyi anlamlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca bu hücre kültürlerinde morfolojik diferansiyasyonun da arttırdığı gözlenmiştir. Skualenin, sisplatinin NBL hücrelerine olan toksisitesini artırıp arttırmağı araştırıldığında; MYC amplifikasyonu göstermeyen hücre kültüründe sisplatinin NBL hücrelerine olan toksik etkisini arttırdığı gözlenmiş, diğer NBL hücre serilerinde ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Skualenin NBL hücre serilerini diğer kemoterapotik ajanların etkisinden koruyup korumadığı araştırıldığında ise, sisplatinle beraber siklofosamid, etoposid, karboplatin, doksorubisin değişen dozlarda uygulanmış ve Alamar Mavisi Sitotoksik Assay ile ölçülen değerlerde skualen'in hiçbir ajanın EC50 (maksimum efektif konsantrasyonun yarısı) değerini değiştirmedeği gözlenmiştir (21).

Bu araştırmaya dayanarak elde edilen verilerle in vivo model tasarlanmış ve bu modelde nöroblastom hücre hattı, küçük hücreli karsinom hücre hattı ve medullablastom hücre hattı dişi farelere iki taraf flank bölgelerinden subkutan olarak enjekte edilmiştir. Karboplatin ile tedavi edilen grupta skualenin CFU-GM kolonisini toksisiteden koruduğu bulunmuştur. Skualenin kemik iliği mikroçevresinde bulunan mezenkimal kök hücrelerinin karakteristik özelliklerine sahip CFU-F (CFU-fibroblast) kolonilerini karboplatin ve sisplatin toksisitesine karşı koruduğu gözlenmiştir.

Platinlerle skualenin kombinasyon tedavisi, sisplatinin her 3 serideki tümör hücreleri üzerindeki kısa süreli toksisitesini (5. gün) etkilememiştir, yani tümörü sisplatin toksisitesinden koruyucu etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Sisplatinin kümülatif etkisi göz önüne alındığında ve uzun süreli toksik etkisi üzerine skualenin etkisi araştırıldığında farelere tümör inokülasyonundan 5 hafta sonra sisplatin veya karboplatin tedavisine haftalık olarak başlanmış ve her platin uygulamasından 3 saat önce de skualen uygulanmıştır. Skualen kombinasyonun kullanıldığı gruplarda kilo kaybının anlamlı ölçüde daha az olduğu, sisplatin tedavisine bağlı olarak deride oluşan keratin plaklarında anlamlı düzeyde azalma ve CFU ve CFU-F kolonilerinin sayısında anlamlı düzeyde koruma yaptığı bulunmuştur. Sadece 100 mg/ gün skualen ile tedavi edilen farelerin ise ksenograft tümör büyüklüğünde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca bu çalışmada skualen tedavisinin kemik iliği hücrelerinde ROS seviyelerini anlamlı düzeyde azalttığı ve GSH seviyelerini arttırdığı bulunmuştur. In vitro çalışmada gösterilen sisplatin tedavisi ile GSH seviyelerinde iki kata varan azalma in vivo çalışmada ile de desteklenmiş ve skualen ile bu etki tersine çevrilmiştir. Nöroblastom hücre hattında ise sisplatin tedavisine ek olarak uygulanan skualenin GSH ve ROS seviyelerinde anlamlı düzeyde değişiklik yapmadığı gösterilmiştir (22).

Skualenin isoproterenol ile indüklenen miyokard infarktüsü üzerine etkisini araştıran bir deneysel modelde; 45 gün boyunca öğünlerinde %2 lik skualen ile beslenen sıçanlarda 45. gün sonunda intraperitoneal isoproterenol 2 gün boyunca tek doz şeklinde enjekte edilmiş ve 2 günün sonunda sıçanlar sakrifiye edilerek miyokardial dokuda ve kanda lipid peroksidleri, glutasyon seviyesi ve antioksidan enzim seviyeleri ölçülmüştür. Isoproterenol uygulaması öncesi skualen kullanımının lipit peroksidasyonunun etkisini tersine çevirdiği ve GSH seviyelerini koruduğu gözlenmiştir. Ayrıca glutasyon bağımlı antioksidan enzimler (GPX ve GST [Glutasyon-S Transferaz]) ve antiperoksidatif enzimlerin (CAT [Katalaz] ve SOD) seviyelerinin skualen uygulanması ile korunduğu bulunmuştur (23).

Skualenin radyoprotektif etkisini araştıran bir deneysel çalışmada, 14 gün boyunca %2'lik skualen ile beslenen fareler 14. gün sonunda tüm vücut radyasyonuna maruz bırakılmış ve hayvanların ağırlıkları, total beyaz küre ve lenfosit seviyeleri, jejunal villus hücrelerinin nükleer alanları, intestinal mukoza ve plazmada skualen seviyeleri ve hayvanların yaşam süreleri araştırılmıştır. 7 günlük radyasyon uygulamasından sonra skualen verilen grupta ölçülen beyaz küre ve lenfosit sayılarında artış gözlenmiş olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 6G veya 7G radyasyon dozundan sonraki 6, 10, 16 ve 20. gün vücut ağırlığı ölçümlerinde skualen ile beslenen grupta anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Skualen uygulanan grup ve kontrol gruplarında apikal villüs nükleer alanı, radyasyona maruz kalmayan grupta maruz kalan gruba göre, anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Benzer

şekilde radyasyona maruz bırakılan gruplar arasında, skualen suplementasyonu verilen grupta nükleer alanın anlamlı derece fazla olduğu görülmüştür. Skualenin survi üzerine etkisi ise en belirgin olarak 7G radyasyon dozunda saptanmıştır. Global analizde skualen uygulamasının daha uzun survi için belirleyici bir faktör olduğu saptanmıştır ( $p=0.0054$ ) (24).

### KANSER ÇALIŞMALARI

Son yıllarda skualenin kanser hücrelerinde inhibisyon ve kanserden koruyucu etkisine odaklanan birçok in vitro ve deneysel hayvan çalışması bulunmaktadır. Bu alanda yapılmış araştırmalar *kolon, deri, akciğer* ile ilişkili olup tümü deneysel araştırma niteliğindedir.

Aberrant kriptomatik fokus (ACF) APC ve RAS mutasyonları içerebilen, kolon kanserli hastaların kolon mukozalarında saptanan erken preneoplastik bir lezyondur (25). Aberrant kriptomatik çevredeki normal kriptomatiklerden artmış büyüklükleri, hücrelerin lamina- bazal yüzleri arasındaki artmış uzaklık ve belirgin perikriptomatik zonları ile ayrılırlar (26). Bu çalışmada ACF'leri değerlendirmede kullanılan parametreler ışık mikroskopunda bu foküslerin varlığı ve multiplitesidir. Kript multiplitesi her fokustaki kript sayısı ve bunların 3, 4 veya 4'ten fazla ACF içermelerine göre kategorize edilmiştir. Azoksimetan ile indüklenmiş kolonda aberrant kriptomatik fokus (ACF) deneysel hayvan modelinde %1 içerikli skualen diyeti uygulanmış erkek sıçanlar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında total ACF/ kolon sayısında ve her odaktaki aberrant kript multiplitesinde anlamlı bir azalma saptanmıştır (26).

Smith ve ark.nın diyetel zeytinyağı ve skualenin farelerde akciğer tümörögenез üzerine etkisini araştıran çalışmada, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (NNK) (103 mg/kg, i.p.) ile akciğer tümörögenезi indüklenmiş ve gruplar %5'lik mısır yağı (kontrol), %19.6 zeytinyağı ve %2'lik skualen ile beslenmelerine göre karşılaştırılmıştır. Sigara spesifik nitrozaminler olan NNK (nitrosomonikotin) ve N9 sigara içimi sırasında nikotinin nitrozasyonu ile oluşurlar ve sigara ilişkili kanserlerde önemli bir role sahip oldukları düşünülmektedir. NNK laboratuvar hayvanlarında en potent akciğer karsinogenidir (27). NNK'nin karsinogenезi indüklenmesi için P450 enzimleri ile metabolik olarak aktif hale gelmesi gerekmektedir (28).

NNK uygulanmasından 3 hafta önce gruplar, gruplara eşleştirilen diyetler uygulanmış ve NNK uygulamasından 16 hafta sonra da aynı diyetlere devam edilmiş ve bütün gruplarda akciğer tümörü geliştiği saptanmıştır.

Tek doz NNK (103mg/ kg) uygulanımı sonrası kontrol grubu+ NNK uygulanan grupta akciğer tümör insidansı %100, tümör multiplitesi 16 tümör/ fare ve tümör volümü 1.84 mm<sup>3</sup> olarak bulunmuştur. Diyetel zeytinyağı ve skualen uygulaması tümör insidansı üzerine anlamlı bir etki yaratmamakla birlikte, multiplitesi ve volümünü anlamlı

bir şekilde ( $p<0,05$ ) azaltmıştır. (zeytinyağı ile %46- 58, skualen ile %33-47). Bu sonuçlar zeytinyağı ve skualenin akciğer tümörlerinin gelişimini ve büyümesini azalttığını desteklemiştir. Histopatolojik analizlerde skualenin akciğer hiperplazisini (%70), zeytinyağı ve skualenin akciğerde adenom formasyonunu (%34 ve %52) anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüştür (29).

Kimyasal olarak indüklenen deri kanseri deneysel modelinde, 50 dişi farede deri tümörü oluşumu indüklenmiş ve devam ettirilmiştir. Farelerin her bir grubu mineral yağı, %5'lik skualen ve Roideks (skualen, A vitamini, E vitamini ve aloe-veradan oluşan formülasyon) ile tedavi edilmişlerdir. Tümöröjenik kimyasal maddenin uygulamasından 13 hafta sonra tümör insidansları mineral yağı, skualen ve roideks için sırası ile %33, %27 ve %20 olarak gözlenmiştir. Roideks uygulanan hayvanlarda tümör multiplitesi skualen uygulanan gruba göre 2.8 kat, mineral yağı uygulanan gruba göre ise 3 kat daha az bulunmuştur. Tümör regresyonunu karşılaştırmak amacıyla eşit tümör sayısına sahip fareler 2 gruba bölünmüş ve bir gruba roideks diğer gruba mineral yağı uygulanmıştır. Roideks uygulanan grupta tümör sayısında %33.34 oranında gerileme izlenirken, mineral yağı uygulanan grupta ise %3.44 oranında gerileme izlenmiştir (30).

### KAYNAKLAR

1. Goodman DS, Popjak G. Studies on the biosynthesis of cholesterol. XII. Synthesis of allyl pyrophosphates from mevalonate and their conversion into squalene with liver enzymes. J Lipid Res. 1960;1:286-300.
2. Langdon RG, Bloch K. The biosynthesis of squalene. J Biol Chem. 1953;200:129-34.
3. Kohno Y, Egawa Y, Itoh S, Nagaoka S, Takahashi M, Mukai K. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. Biochim Biophys Acta. 1995;1256:52-6.
4. Dickhart W. The squalene contents of various oils. American journal of pharmacy and the sciences supporting public health. 1955;127:359-61.
5. Liu GC, Ahrens EH, Jr., Schreiber PH, Crouse JR. Measurement of squalene in human tissues and plasma: validation and application. J Lipid Res. 1976;17:38-45.
6. Goodman DS. Squalene in Human and Rat Blood Plasma. J Clin Invest. 1964;43:1480-5.
7. T.C Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü. Zeytin ve Zeytinyağı Raporu 2013.
8. Warleta F, Campos M, Allouche Y, Sanchez-Quesada C, Ruiz-Mora J, Beltran G, et al. Squalene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. Food Chem Toxicol. 2010;48:1092-100.
9. Kolios G, Valatas V, Ward SG. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. Immunology. 2004;113:427-37.

10. Wei J, Feng J. Signaling pathways associated with inflammatory bowel disease. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2010;4:105-17.
11. Musso A, Dentelli P, Carlino A, Chiusa L, Repici A, Sturm A, et al. Signal transducers and activators of transcription 3 signaling pathway: an essential mediator of inflammatory bowel disease and other forms of intestinal inflammation. *J Inflamm Bowel Disord.* 2005;11:91-8.
12. Li W, Khor TO, Xu C, Shen G, Jeong WS, Yu S, et al. Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFkappaB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2008;76:1485-9.
13. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol.* 2005;6:353-60.
14. Sanchez-Fidalgo S, Villegas I, Rosillo MA, Aparicio-Soto M, de la Lastra CA. Dietary squalene supplementation improves DSS-induced acute colitis by downregulating p38 MAPK and NFkB signaling pathways. *Mol Nutr Food Res.* 2015;59:284-92.
15. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006;97:1634-58.
16. Kabuto H, Yamanushi TT, Janjua N, Takayama F, Mankura M. Effects of squalene/squalane on dopamine levels, antioxidant enzyme activity, and fatty acid composition in the striatum of Parkinson's disease mouse model. *J Oleo Sci.* 2013;62:21-8.
17. Hensley ML, Schuchter LM, Lindley C, Meropol NJ, Cohen GI, Broder G, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants. *J Clin Oncol.* 1999;17:3333-55.
18. Kamimura H, Koga N, Oguri K, Yoshimura H. Enhanced elimination of theophylline, phenobarbital and strychnine from the bodies of rats and mice by squalane treatment. *J Pharmacobiodyn.* 1992;15:215-21.
19. Richter E, Schafer SG. Effect of squalane on hexachlorobenzene (HCB) concentrations in tissues of mice. *J Environ Sci Health B.* 1982;17:195-203.
20. Hospers GA, Eisenhauer EA, de Vries EG. The sulfhydryl containing compounds WR-2721 and glutathione as radio- and chemoprotective agents. A review, indications for use and prospects. *Br J Cancer.* 1999;80:629-38.
21. Das B, Yeger H, Baruchel H, Freedman MH, Koren G, Baruchel S. In vitro cytoprotective activity of squalene on a bone marrow versus neuroblastoma model of cisplatin-induced toxicity. implications in cancer chemotherapy. *Eur J Cancer.* 2003;39:2556-65.
22. Das B, Antoon R, Tsuchida R, Lotfi S, Morozova O, Farhat W, et al. Squalene selectively protects mouse bone marrow progenitors against cisplatin and carboplatin-induced cytotoxicity in vivo without protecting tumor growth. *Neoplasia.* 2008;10:1105-19.
23. Sabeena Farvin KH, Anandan R, Kumar SH, Shiny KS, Sankar TV, Thankappan TK. Effect of squalene on tissue defense system in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Pharmacol Res.* 2004;50:231-6.
24. Storm HM, Oh SY, Kimler BF, Norton S. Radioprotection of mice by dietary squalene. *Lipids.* 1993;28:555-9.
25. Pretlow TP, O'Riordan MA, Pretlow TG, Stellato TA. Aberrant crypts in human colonic mucosa: putative preneoplastic lesions. *J Cell Biochem Suppl.* 1992;16G:55-62.
26. Rao CV, Newmark HL, Reddy BS. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis.* 1998;19:287-90.
27. Hoffmann D, Brunnemann KD, Prokopczyk B, Djordjevic MV. Tobacco-specific N-nitrosamines and Areca-derived N-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. *J Toxicol Environ Health.* 1994;41:1-52.
28. Crespi CL, Penman BW, Gelboin HV, Gonzalez FJ. A tobacco smoke-derived nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, is activated by multiple human cytochrome P450s including the polymorphic human cytochrome P4502D6. *Carcinogenesis.* 1991;12:1197-201.
29. Smith TJ, Yang GY, Seril DN, Liao J, Kim S. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis.* 1998;19:703-6.
30. Desai KN, Wei H, Lamartiniere CA. The preventive and therapeutic potential of the squalene-containing compound, Roindex, on tumor promotion and regression. *Cancer Letters.* 1996;101:93-6.