

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DÜNYADA YENİ AŞI ÜRETİMİNDE UYGULANAN  
TOKSİKOLOJİK DEĞERLENDİRMELERİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**Ecz. Merve YÜCETÜRK İŞ**

**Farmasötik Toksikoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA**

**2023**



**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DÜNYADA YENİ AŞI ÜRETİMİNDE UYGULANAN  
TOKSİKOLOJİK DEĞERLENDİRMELERİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**Ecz. Merve YÜCETÜRK İŞ**

**Farmasötik Toksikoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU**

**ANKARA**

**2023**

**ONAY SAYFASI****DÜNYADA YENİ AŞI ÜRETİMİNDE UYGULANAN TOKSİKOLOJİK  
DEĞERLENDİRMELERİN KARŞILAŞTIRILMASI****Öğrenci: Merve YÜCETÜRK İŞ****Danışman: Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU**

Bu tez çalışması 21.07.2023 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Toksikoloji Programı”nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Özge CEMİLOĞLU ÜLKER**(Ankara Üniversitesi)***Tez Danışmanı:** *Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU**(Hacettepe Üniversitesi)***Üye:** *Doç. Dr. Gözde GİRGİN**(Hacettepe Üniversitesi)*

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

**Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN****Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayımlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

O Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>

O Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>

O Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

.....

**Merve YÜCETÜRK İŞ**

<sup>1</sup>“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ay aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

\* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Merve YÜCETÜRK İŞ

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bilgisini esirgemeyen, beni her zaman destekleyen danışmanım sayın Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU' na,

Eğitimim boyunca bana katkı sağlayan sayın hocalarıma,

Tezimin her aşamasında bana yardımcı olan ve desteğini hiç esirgemeyen sevgili eşim Hüseyin İŞ'e, canım arkadaşlarım Azranur DAL'a ve Ebru ERDAĞ'a,

Her zaman yanımda olan, beni her adımda destekleyen ve yüksek lisans sürecini en güzel şekilde tamamlamam için özveride bulunan canım aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Yüçetürk İş, M., Dünyada Yeni Aşı Üretiminde Uygulanan Toksikolojik Değerlendirmelerin Karşılaştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023.**

Aşılar immün sistemi uyararak ve aktif bağışıklığı sağlayarak hasta olmayı önleyen; antijen, adjuvan, koruyucu gibi bileşenler içeren karmaşık yapıları biyolojik tıbbi ürünlerdir. Son yüzyılda aşılama, bulaşıcı hastalıkların yol açtığı hastalık ve ölüm oranlarını azaltmak için en etkili tıbbi yol haline gelmiştir. Toplum sağlığı açısından çok büyük bir kazanım olan aşılar, uygulandıktan sonra istenmeyen etkilere sebep olabilmektedir. Bu etkiler genellikle hafif olup nadiren ciddi olabilmektedir. Bu yüzden yeni geliştirilen aşılar, insan kullanımına sunulmadan önce prelinik çalışmalar yapılarak toksikolojik açıdan değerlendirilmeli ve güvenliliği ortaya konmaktadır. Bu çalışmaların sonucunda insan kullanımını için güvenli kabul edilen aday aşılar için klinik çalışmalar yapılmaktadır. Dünya’da aşı güvenliliğinin değerlendirilmesi, çeşitli toksisite testleri ile yapılmaktadır. Bu testler Tek Doz Toksikite Testleri, Tekrarlı Doz Toksikite Testleri, Üreme ve Gelişimsel Toksikite Testleri, Mutajenite ve Genotoksikite Toksikite Testleri, Karsinogenisite Testleri ve Güvenlilik Farmakolojisi Testleridir. Testlere ilişkin bazı uygulamalar ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Küresel kılavuzlara uyum, bölgeler arası farklılıkları azaltmaktadır. Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında ülkemizde ve dünyada aşı üretimini takiben ruhsat öncesinde yapılan toksisite değerlendirmelerinin ayrıntılı olarak incelenmesi, benzerlik ve farklılıkların ele alınması amaçlanmıştır. Ayrıca, ülkemizde ve dünya genelinde referans alınan kılavuzların incelenerek olası eksikliklerin ortaya konması amaçlanmıştır. Ulusal ve uluslararası güncel kaynakların kapsamlı olarak değerlendirilmesi sonucunda hazırlanan bu çalışma ile aşı üretiminde yapılan toksisite değerlendirme sürecinin tam olarak anlaşılmasına, farklılıkların ve eksikliklerin ortaya konmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Aşı üretimi, toksisite testleri, prelinik çalışmalar, klinik çalışmalar, 3R



## ABSTRACT

**Yüçetürk İş, M., Comparison of Toxicological Evaluations Applied in New Vaccine Production in the World, Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Pharmacy Department of Pharmaceutical Toxicology Master of Science Thesis, Ankara, 2023.** Vaccines are complex biological medicinal products containing components such as antigens, adjuvants, and preservatives. They prevent diseases by stimulating the immune system and providing active immunity. In the last century, vaccination has become the most effective medical way to reduce morbidity and mortality from infectious diseases. Vaccines, which are important advances for public health, can cause undesirable effects after administration. These effects are usually mild and rarely serious. Therefore, recent vaccines should be evaluated for their potential toxicity by performing preclinical studies. Therefore, their safety is demonstrated before the vaccine administered to human. As a result of these studies, clinical studies are carried out for candidate vaccines that are considered safe for human use. Assessment of vaccine safety worldwide is performed using various toxicity tests including Single Dose Toxicity Tests, Repeated Dose Toxicity Tests, Reproductive and Developmental Toxicity Tests, Mutagenicity and Genotoxicity Toxicity Tests, Carcinogenicity Tests and Safety Pharmacology Tests. Some test procedures differ among the national health authorities. Compliance with global guidelines reduces regional disparities. Based on this literature survey, the aim of this thesis to examine in detail the toxicity assessments performed before the license following the vaccine production in our country and in the world, and to discuss the similarities and differences. In addition, it is aimed to reveal possible lack of information by examining the reference guides in our country and around the world. It is thought that this study, which was prepared as a result of comprehensive evaluation of national and international current guides, will contribute to a full understanding of the toxicity assessment process in vaccine production and to reveal the possible shortcomings.

**Key Words:** Vaccine production, toxicity tests, preclinical studies, clinical trials, 3R

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvi
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	4
2.1. Aşı Teknolojisi ve Uygulamaları	4
2.1.1. Aşı Nedir?	4
2.1.2. Aşı Gelişiminin Tarihçesi	5
2.1.3. Aşı Türleri	8
2.1.4. Aşıların Yapısında Bulunan Bileşenler	12
2.2. Aşı Uygulamaları Sonrası Gelişen İstenmeyen Etkiler	19
2.2.1. Aşılama Sonrası Sıkça Görülen Hafif Yan Etkiler	20
2.2.2. Aşılama Sonrası Çok Nadir Görülen Ciddi Yan Etkiler	20
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	24
<b>4. BULGULAR</b>	26
4.1. Aşı Güvenliğinin Değerlendirilmesi	26
4.1.1. Aşı Güvenliliğinin Değerlendirmesi İçin Yapılan Preklinik Çalışmalar	29
4.1.2. Aşı Güvenliliğinin Değerlendirmesi İçin Yapılan Klinik Çalışmalar	58
4.3. Acil Kullanım Onayı	70
<b>5. TARTIŞMA</b>	77
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	85
<b>7. KAYNAKLAR</b>	87
<b>8. EKLER</b>	
EK-1: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	

EK-2: Dijital Makbuz

## **9. ÖZGEÇMİŞ**

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AB</b>	Avrupa Birliği
<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>AEFI</b>	Aşılama Sonrası Advers Etki ( <i>Adverse Events Following Immunization</i> )
<b>AFSA</b>	Hayvansız Güvenlik Değerlendirmesi İş birliği ( <i>Animal Free Safety Assessment Collaboration</i> )
<b>AKO</b>	Acil Kullanım Onayı
<b>ATT</b>	Anormal Toksikite Testi ( <i>Abnormal Toxicity Test</i> )
<b>BCG</b>	Tüberküloz aşısı ( <i>Bacille Calmette-Guérin</i> )
<b>BraCVAM</b>	Brezilya Alternatif Yöntemlerin Doğrulanma Merkezi ( <i>The Brazilian Centre for the Validation of Alternative Methods</i> )
<b>CCAAM</b>	Kanada Hayvan Yöntemlerine Alternatifler Merkezi ( <i>Canadian Centre for Alternatives to Animal Methods</i> )
<b>CDC</b>	Hastalık Kontrol Merkezi ( <i>Disease Control Center</i> )
<b>CHO</b>	Çin Hamsteri Yumurtalık hücresi ( <i>Chinese hamster ovary cells</i> )
<b>COFEPRIS</b>	Meksika Sıhhi Risklere Karşı Federal Koruma Komisyonu (Federal Commission for the Protection against Sanitary Risk)
<b>CPCSEA</b>	Hayvanlar Üzerinde Deney Kontrol ve Denetleme Amaçlı Komite ( <i>Committee for the Purpose of Control And Supervision of Experiments on Animals</i> )
<b>CTD</b>	Ortak Teknik Dokümanı
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
<b>DTB</b>	Dünya Tabipler Birliği
<b>DTP</b>	Difteri-Tetanoz-Boğmaca Aşısı ( <i>Diphtheria, Tetanus, Pertussis</i> )
<b>ECDC</b>	Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi ( <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> )
<b>ECVAM</b>	Biyolojik Standardizasyon Programı ve Avrupa Alternatif Yöntemleri Doğrulama Merkezi ( <i>The European Centre for the Validation of Alternative Methods</i> )

<b>EDQM</b>	Sağlık Hizmetleri Kalite Müdürlüğü ( <i>European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare</i> )
<b>EFPIA</b>	Avrupa İlaç Endüstrileri ve Dernekleri Federasyonu ( <i>European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations</i> )
<b>EFSA</b>	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi ( <i>European Food Safety Authority</i> )
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
<b>EMA</b>	Avrupa İlaç Ajansı ( <i>European Medicines Agency</i> )
<b>EPAA</b>	Hayvan Testlerine Alternatif Yaklaşımlar için Avrupa Ortaklığı ( <i>European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing</i> )
<b>EUA</b>	Acil Kullanım İzni ( <i>The Emergency Use Authorization</i> )
<b>EVIP</b>	Avrupa Aşılama Bilgi Portalı ( <i>European Vaccination Information Portal</i> )
<b>FDA</b>	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi ( <i>The United States Food and Drug Administration</i> )
<b>GBS</b>	Guillain-Barre Sendromu
<b>GCLP</b>	İyi Klinik Laboratuvar Uygulamaları ( <i>Good clinical laboratory practice</i> )
<b>GLP</b>	İyi Laboratuvar Uygulamaları ( <i>Good Laboratory Practice</i> )
<b>HgCl</b>	Civa Klorür
<b>HIST</b>	Histamin Sensitizasyon Testi ( <i>Histamine Sensitivity Test</i> )
<b>HIV</b>	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü ( <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
<b>HPLC</b>	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ( <i>High Performance Liquid Chromatography,</i> )
<b>HPV</b>	İnsan papilloma virüsü aşısı ( <i>Human Papilloma Virus</i> )
<b>HSI</b>	Uluslararası İnsani Toplum ( <i>Humane Society International</i> )
<b>IABS</b>	Uluslararası Biyolojik Standardizasyon İttifakı ( <i>International Alliance for Biological Standardization</i> )
<b>IACUC</b>	Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi ( <i>Institutional Animal Care and Use Committee</i> )

<b>ICCVAM</b>	Alternatif Yöntemlerin Validasyonuna İlişkin Kurumlar Arası Koordinasyon Komitesi ( <i>The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i> )
<b>ICH</b>	Uluslararası Uyumlaştırma Konseyi ( <i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i> )
<b>IOM</b>	Tıp Enstitüsü ( <i>Institute of Medicine</i> )
<b>ITP</b>	İmmün Trombositopenik Purpura ( <i>Immune Thrombocytopenic Purpura</i> )
<b>Iu</b>	Aşılammış popülasyondaki hastalık insidansı ( <i>Incidence in Unvaccinated Population</i> )
<b>Iv</b>	Aşılammış popülasyondaki hastalık insidansı ( <i>Incidence in Vaccinated Population</i> )
<b>JaCVAM</b>	Japon Alternatif Yöntemlerin Validasyon Merkezi ( <i>Japanese Center for the Validation of Alternative Methods</i> )
<b>JCR</b>	Ortak Araştırma Merkezi ( <i>Joint Research Centre</i> )
<b>KoCVAM</b>	Güney Kore Alternatif Yöntemlerin Doğrulanma Merkezi ( <i>The South Korean Centre for the Validation of Alternative Methods</i> )
<b>KU</b>	Birleşik Krallık
<b>MAT</b>	Monosit Aktivasyon Testi
<b>MCH</b>	Ortalama Eritrosit Hemoglobini ( <i>Mean Corpuscular Hemoglobin</i> )
<b>MERS-CoV</b>	Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü
<b>MMR</b>	Kızamık-Kabakulak-Kızamıkçık ( <i>Measles, Mumps, and Rubella</i> )
<b>mRNA</b>	Mesajcı RNA ( <i>messenger RNA</i> )
<b>NAT</b>	Hayvan Olmayan Teknolojiler
<b>NIH</b>	Ulusal Sağlık Enstitüsü ( <i>National Institutes of Health</i> )
<b>OECD</b>	Ekonomik İş birliği ve Kalkınma Örgütü ( <i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i> )
<b>OPV</b>	Oral çocuk felci aşısı ( <i>Oral polio vaccine</i> )

<b>PMS</b>	Pazarlama Sonrası Gözetim Çalışmaları ( <i>post-market surveillance</i> )
<b>PPV</b>	Pnömonokok Polisakkarid Aşıları ( <i>Pneumococcal polysaccharide vaccine</i> )
<b>PT</b>	Aktif Boğmaca Toksini ( <i>Pertussis toxin</i> )
<b>RPT</b>	Tavşan Pirojen Testi ( <i>Rabbit Pyrogen Test</i> )
<b>RR</b>	Bağıl Risk ( <i>Relative Risk</i> )
<b>SARS-CoV</b>	Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü
<b>SARS-CoV-2</b>	Yeni Akut Solunum Sendromu Koronavirüs 2
<b>SBML</b>	Sistem Biyolojisi Biçimlendirme Dili ( <i>Systems Biology Markup Language</i> )
<b>SPN</b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<b>TİTCK</b>	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
<b>TÜFAM</b>	Türkiye Farmakovijilans Merkezi
<b>TWI</b>	Tolere edilebilir haftalık alım ( <i>Tolerable Week Intake</i> )
<b>VAERS</b>	Aşı Olumsuz Olay Raporlama Sistemi ( <i>Vaccine Adverse Event Reporting System</i> )
<b>VAPP</b>	Aşıyla İlişkili Paralitik Çocuk Felci ( <i>Vaccine-Associated Paralytic Polio</i> )
<b>VARI</b>	Kızamık Aşısıyla İlişkili Döküntü Hastalığı ( <i>Vaccine-Associated Rash Illness</i> )
<b>VITT</b>	Aşı Kaynaklı İmmün Trombotik Trombositopeni ( <i>Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia</i> )
<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
<b>ZEBET</b>	Hayvan Deneylemleri için İkame ve Tamamlayıcı Yöntemlerin Kaydedilme ve Değerlendirilme Merkez Ofisi ( <i>Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch</i> )
<b>3R</b>	Azalatma, Değiştirme ve İyileştirme ( <i>Reduce, Replace, Refine</i> )
<b>4R</b>	Azalatma, Değiştirme, İyileştirme ve Sorumluluk ( <i>Reduce, Replace, Refine, Responsibility</i> )

## ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Aşı türleri ve örnekleri.	9
2.2.	Aşı bileşenleri.	13
4.1.	3R Prensiplerinin şematik gösterimi.	50
4.2.	Aşı geliştirme sürecinde izlenen basamaklar.	59
4.3.	Covid-19 aşısının olması gereken yarar-risk dengesi.	71
4.4.	Standart yeni bir aşı geliştirme süreci.	73
4.5.	Covid-19'u hedefleyen yeni bir aşı geliştirme süreci.	73
4.6.	Ülkemizde Covid-19 aşı üretim süreci.	75



## TABLOLAR

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
2.1.	Aşı tarihi.	7
2.2.	Aşı ile ilişkilendirilen ciddi yan etkiler.	23
4.1.	Aşıların klinik öncesi toksisite değerlendirmesinde kullanılan temel düzenleyici kılavuzlar.	27
4.2.	Aşı çalışmalarında kullanılan farklı hayvan türlerinin avantaj ve dezavantajları.	33
4.3.	Ükelere göre kullanılan hayvan türleri ve oranları.	35
4.4.	<i>In vivo</i> testlere alternatif <i>in vitro</i> yaklaşımlar.	53
4.5.	Klinik çalışmalarda FDA'in sağlıklı yetişkin ve ergen gönüllüler için belirlediği toksisite derecelendirme ölçeği.	62
4.6.	Klinik çalışmalarda FDA'in sağlıklı yetişkin ve ergen gönüllüler için belirlediği önemli belirtileri derecelendirme ölçeği.	63
4.7.	Klinik çalışmalarda FDA'in sağlıklı yetişkin ve ergen gönüllüler için belirlediği sistemsel etkileri derecelendirme ölçeği.	64
4.8.	WHO'ya göre AEFI nedenleri.	65
4.9.	WHO'ya göre nedensellik ilişkisinin sınıflandırılması.	65
4.10.	Farklı ülkelerde aşılamaı takiben advers olayların bildirilmesi için kullanılan ulusal sistemler.	69

## 1. GİRİŞ

Son yüzyılın halk sağlığını korumak üzere çeşitli salgın hastalıkların kontrol altına alınmasında önemli adımlar atılmasını sağlayan başarılı formülasyonlardan biri aşılardır ve her yıl milyonlarca insanın hayatını kurtardığı düşünülmektedir. Aşı uygulamalarını takiben yakın tarihte çiçek hastalığı ortadan kalkmış ve çocuk felci, kızamık gibi önemli bulaşıcı hastalıkların görülme sıklığı önemli ölçüde azalmıştır (1).

Aşılar, özellikle ulusal bağışıklama programlarının 1960' larda ilk kez düzenli organize edilmesinden itibaren, halk sağlığı uygulamalarının seyrini değiştirmiştir. Halk sağlığı politikasının mihenk taşı olan aşılama düşük maliyetle çocuk sağlığının korunmasına önemli katkılar sağlamış ve çocukluk çağında bulaşıcı hastalıklar nedeniyle görülen ölümleri belirgin şekilde azalmıştır (2). Aşıları diğer farmasötiklerden ayıran unsurlardan biri, çok sayıda sağlıklı insanlar ve ağırlıklı olarak sağlıklı çocuklarda kullanılabilmesidir. Bu da, aşıların güvenilir formülasyonlar olması zorunluluğunu ortaya koyan oldukça önemli bir noktadır (3).

Aşılanmanın hedefi, hastalığa yakalanma ve olası semptomlar meydana gelmeden ilgili patojene bağışıklık oluşturmaktır (1). Bağışıklık, başta enfeksiyon hastalıkları olmak üzere hastalıklara karşı direnç olarak tanımlanır. Aşılar bu hedefi özetle üç basamakta gerçekleştirebilir. Bu aşamalar, antijen sunan hücrelerden antijenlerin ve adjuvanların alınması, antijen sunan hücrelerin olgunlaşması ve sitotoksik T hücreleri ve antikorların oluşmasıyla spesifik B ve T antijenlerinin hazırlanması şeklinde özetlenebilir (4).

Aşılar sahip oldukları içerik ve özellikler bakımından farklı gruplara ayrılırlar. Bunlar canlı-zayıflatılmış aşılar, ölü aşılar, rekombinant vektör aşıları ve nükleik asit bazlı aşılardır (1, 4, 5). Aşı geliştirme, klinik, halk sağlığı, epidemiyoloji, immünoloji, toksikoloji gibi pekçok bilim dalının bir araya gelmesini gerektiren çok disiplinli bir faaliyettir. Aşı üretimi için, biyolojik sistemlerin aşıya karşı oluşturduğu yanıtın ve bu yanıtı etkileyen yaş cinsiyet gibi farklı faktörlerin rolünün anlaşılması önemlidir (6).

Genellikle bir aşının geliştirilmesi, on yıl veya daha fazla sürebilmektedir. Ancak Covid-19 pandemisi gibi olağanüstü koşullarda klasik ruhsat yerine hızlı güvenilirlik ve etkililik değerlendirme sonuçlarına göre acil kullanım onayı verilerek toplumsal aşılama geçilebilmektedir. Aşı, kullanıma sunulduktan sonra sürekli

olarak izlenir. Aşı güvenliğinin izlenmesi, dünyada aşı programlarına duyulan güveni korumak için önem teşkil etmektedir (7-9).

Ülkemizde aşı adaylarının klinik araştırmaları, ruhsatlandırılması ve piyasa arzı olmak üzere bütün konularda yetkili sağlık otoritesi Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK)'dır. Dünyada aday aşuların prelinik ve klinik toksisite değerlendirmesi yapılırken başlıca referans alınan kılavuzlar Dünya Sağlık Örgütü (*World Health Organization, WHO*), Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (*The United States Food and Drug Administration, FDA*), Avrupa İlaç Ajansı (*European Medicines Agency, EMA*) ve Uluslararası Harmonizasyon Konseyi (*The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH*) tarafından yayımlanan kılavuzlardır. Toksikite değerlendirme testleri iyi laboratuvar uygulamaları (*Good Laboratory Practice, GLP*) standartlarına sahip laboratuvarlarda yapılmalıdır (10, 11).

Aşıların prelinik toksisite değerlendirmesinde tek doz toksisite testi, tekrarlı doz toksisite testi, üreme ve gelişimsel toksisite testi, mutajenite ve genotoksisite testi, karsinojenite testi ve güvenlilik farmakolojisi testi yapılır (12-15). Prelinik çalışmaları tamamlanan ve insanlar üzerinde uygulanmasında sakınca görülmeyen aday aşular için Faz I, Faz II ve Faz III çalışmaları yapılmaktadır. İlaçta olduğu gibi Faz III çalışmalarını takiben pazarlama sonrası gözetim çalışmaları (*post-market surveillance, PMS*) olarak da adlandırılan Faz IV çalışmaları yapılmaya devam etmektedir (11, 16).

Sonuç olarak Dünya'da aşı güvenliliğinin değerlendirilmesi çeşitli toksisite testleri ile yapılmaktadır. Testlere ilişkin bazı uygulamalar ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Küresel kılavuzlara uyum, bölgeler arası farklılıkları azaltmaktadır (10). Aday aşuların piyasaya sunulmadan gerekli güvenlilik değerlendirmelerinden geçirilmesi aşının amacına uygun şekilde üretilebilmesi ve insan sağlığına zarar vermemesi, güvenli olması kullanılabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında ülkemizde ve dünyada aşı üretimini takiben ruhsat öncesinde yapılan toksisite değerlendirmelerinin ayrıntılı olarak incelenmesi, uygulamalardaki benzerlik ve farklılıkların ele alınarak karşılaştırılması hedeflenmiştir. Ayrıca, dünya genelindeki uygulamalarla ülkemizdeki

değerlendirmelerdeki olası eksiklikler de ortaya konmaya çalışılarak, konuya bilimsel olarak katkıda bulunulması amaçlanmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Aşı Teknolojisi ve Uygulamaları

#### 2.1.1. Aşı Nedir?

Geçtiğimiz yüzyılın halk sağlığı açısından en önemli keşiflerinden biri olan aşılarda, immün sistemi uyararak ve aktif bağışıklığı sağlayarak hasta olmayı önleyen; antijen, adjuvan, koruyucu gibi bileşenler içeren karmaşık yapıda biyolojik tıbbi ürünlerdir. Aşıların temel hedefi, hastalığa yakalanma riskini ortadan kaldırmak, güvenli şekilde koruyucu bağışıklık tepkisinin oluşmasını sağlamak ve immünolojik hafıza oluşturmaktır (1, 13). Aşılama, morbidite ya da mortaliteye sebep olan birçok bulaşıcı hastalığı önlemede kullanılan en etkili ve en ekonomik yöntemdir (17). Hastaneye yatış oranlarını azaltmakta ve hastalığa bağlı uzun vadede oluşacak patolojileri engellemektedir (18).

Bağışıklık sistemi, doğal ve adaptif immün yanıt olmak üzere iki sisteme ayrılmaktadır. Aşılar, ilk olarak doğal bağışıklık sistemini uyarmakta ve daha sonra antijene özgü adaptif immün yanıt oluşmasını sağlamaktadır. Doğal immün yanıt, maruz kalınan patojenlere karşı ilk savunmayı oluşturmaktadır. Belirli bir patojene özgü olmamakla birlikte hafızası da yoktur. Adaptif immün yanıt, hemen hemen bilinen tüm patojenleri tanıyabilen ve bunları yok eden çeşitli lenfositler ve antikorlar ile karakterize ikinci savunma hattını oluşturmaktadır (1, 6, 19). Adaptif immün yanıt, patojenin yok edilmesini takiben genellikle immünolojik hafıza oluşturur. İmmünolojik hafıza sayesinde uzun süreli koruma sağlanır ve patojene tekrar maruz kalındığında bağışıklık tepkisi indüklenir. Adaptif immün yanıtın oluşmasında T ve B lenfositleri görev alır. T hücreleri ile hücresel bağışıklık indüklenir ve fagosit aktivasyonu ile patojen ortadan kaldırılır. B lenfositleri ile humoral bağışıklık indüklenir ve hücre dışı patojenler yok edilebilir (1, 2, 20). Doğal ve adaptif immün yanıtın sıralı aktivasyonu, özelleşmiş antijen sunan hücreler (APC'ler) ile sağlanır ve bağışıklık yanıtı indüklenir. Bir enfeksiyonu takiben 4 ila 96 saat içinde, APC'lerin aktivasyonu, patojen ya da hasarla ilişkili molekülleri tanıyan model tanıma reseptörü (PRR'ler) ile gerçekleşir (20).

Aşılar, vücudun bağışıklık sistemini uyaran bir ajan içerir. Bu ajan, patojenin zayıflatılmış veya inert bir formu olabildiği gibi patojen tarafından üretilen toksinler veya patojenin yüzey proteinleri de olabilmektedir (17). Aktif bileşene ek olarak aşırı güvenli ve etkili tutabilmek için gereken farklı bileşenleri de ihtiva etmektedir. Bunlar adjuvanlar, prezervatifler, stabilizatörler, antibiyotikler ve kalıntılardır (21).

### 2.1.2. Aşı Gelişiminin Tarihçesi

Aşıların tarihi 18. yüzyılın sonlarına dayanır. 19. yüzyılın sonlarından itibaren laboratuvarlarda aşılar geliştirilebilmiştir. 20. Yüzyılda ise immünolojik belirteçlere dayanan aşılar geliştirmek mümkün hale gelmiştir (22).

Edward Jenner, 1798'de *An Inquiry into the Reasons and Effects of the Variolae Vaccinae* adlı monografisinde aşılanmanın ilk bilimsel tanımını yapmıştır. Çiçek aşısı Batı'ya tanıtılmadan uzun zaman önce, 1721 yılında İngiliz büyükelçisinin eşi Leydi Mary Montague'nin yazdığı bir mektupta İstanbul'da çiçek hastalığı vakalarından materyal alınmak suretiyle aşı çalışmaları yapıldığı bildirilmektedir. Jenner'in aşı tanımını yapmasından yaklaşık çeyrek yüzyıl önce, İngiltere'de bir çiftçi olan Benjamin Jesty, sığır çiçeği veziküllerinden virüs proteini içeren ve sağlıklı bireylere uygulanan aşılamayı ilk kez göstermiştir (23, 24).

19. yüzyılın sonlarına doğru Louis Pasteur'ün bulaşıcı hastalıkların aşılama ile önlenebileceğini gösteren çalışmaları, modern aşılama biliminin doğmasını sağlamıştır (25). Louis Pasteur 1881 yılında *Pasteurella multocida* dediğimiz hastalığın neden olduğu tavuk kolerasıyla ilgili çalışmalar yapmıştır. Yaz boyunca tezgâhta bırakılan bir kültür ile tavukları aşılamış fakat hastalığa neden olmadığını gözlemlemiştir. Daha sonra yeni bir kültür hazırlayıp aynı tavuklara uyguladığında tavuklarda direnç gözlemlemiş ve eski kültürün onları bağışık hale getirdiğini fark etmiştir. Bu gözlemler sonucunda Pasteur, patojenlerin yüksek sıcaklık, oksijen ve kimyasallar gibi çevresel faktörlere maruz bırakılarak zayıflatılabileceği hipotezini oluşturmuştur (26). 1885 yılında kuduz aşısını geliştiren Pasteur, yaptığı çalışmalarla terapötik aşı kavramını gündeme getirmiştir ve böylece aşının, öldürücü bir virüs olan kuduz etkenine maruz kalan bireyleri tedavi etmek için de kullanılabileceğini, maruziyetten hemen sonra uygulandığı durumlarda hastalık ve ölümlerin engellenebileceğini göstermiştir (25). Louis Pasteur ile aynı yıllarda çalışmalar yapan

Robert Koch 1882 yılında tüberküloz patojenini, bunu takip eden yılda ise kolera patojenini keşfetmiştir (27).

Aşıda bir sonraki büyük adım Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde gerçekleşmiştir. 1886'da Daniel Elmer Salmon ve Theobald Smith ölü domuz kolera virüsü aşısı üzerine çalışmalarını yayınlamış ve ilk kez ölü aşıları gündeme getirmişlerdir (28).

Bilim insanları Pasteur, Salmon ve Smith' in tekniklerinden yararlanarak 20. yüzyıldan önce tifo, kolera ve vebaya karşı birçok aşı geliştirmiştir. 20. yüzyıl boyunca canlı zayıflatılmış, tamamen öldürülmüş ve çeşitli alt birim aşılar geliştirilerek gripten rotavirüse kadar birçok bulaşıcı hastalık önlenebilmiştir. İlk rekombinant aşı olan Hepatit B aşısının geliştirilmesi 20. yüzyılın önemli gelişmelerindendir (24).

Son yüzyılda aşılama, bulaşıcı hastalıkların yol açtığı hastalık ve ölüm oranlarını azaltmak için en etkili tıbbi yol haline gelmiştir. Ayrıca adjuvanlar, vektörler, nükleik asit aşıları ve antijen tasarımları geliştirme konularında birçok yenilikçi teknoloji kullanılmaya başlanmıştır (29).

Günümüzde yapıya dayalı aşı tasarımı, genetik aşılama platformları ve güçlü adjuvanlarla rekombinant proteinlerin formülasyonundan yararlanan modern yaklaşımların önemi vurgulanmaktadır. 21. yüzyıl aşı teknolojilerinin, dünyadaki çeşitli bulaşıcı hastalıklara karşı yeni aşılar geliştirme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir (30).

Geçtiğimiz dönemde tüm dünyayı sarsan ve etkileri halen devam eden Covid-19 pandemisi sebebiyle acil kullanım izni ile çeşitli aşı çalışmaları yapılmış ve kullanıma sunulmuştur. Son birkaç yılın aşı gündemini Covid-19'a yönelik çalışmalar oluşturmaktadır (31). Aşıların tarihi Tablo 2.1.'de verilmiştir.

**Tablo 2.1.** Aşı tarihi (22, 28, 32, 33).

Canlı Aşılar	Ölü Aşılar	Protein ya da Polisakkarit Bazlı Aşılar	Rekombinant Aşılar
18. yüzyıl			
Çiçek Hastalığı (1798)			
19.yüzyıl			
Kuduz (1885)	Tifo (1896) Kolera (1896) Veba (1897)		
20.yüzyıl			
Tüberküloz (1927) Sarı Humma (1935) Oral Polio (1963) Kızamık (1963) Kabakulak (1967) Kızamıkçık (1969) Adenovirüs (1980) Tifo (Salmonella Ty21a) (1989) Kolera (1994) Suçiçeği (1995) Rotavirüs (1999)	Boğmaca (1926) Influenza (1936) Tifüs (1938) İnaktive Polio (1955) Kuduz (1980) Kene Kaynaklı Ensefalit (1981) Kolera (1991) Japon Ensefalit (Fare Beyni) (1992) Hepatit A (1996)	Difteri (1923) Tetanoz (1926) Polisakkarit Bazlı Meningokok (1974) Polisakkarit Bazlı Pnömonokok (1977) Polisakkarit Haemophilus influenzae Tip b (1985) Konjuge Haemophilus influenzae Tip b (1987) Polisakkarit Bazlı Tifo (1994) Aselüler Boğmaca (1996) Konjuge Meningokok Grup C (1999)	Hepatit B (1986) Kolera (1993) Lyme (1998)
21. yüzyıl			
Soğuğa Adapte Influenza (2003) Zayıflatılmış Rotavirüs (2006) Zona (2006) Ebola (2015) Zayıflatılmış Dang (2015)	Japon Ensefalit (Vero Hücresi) (2009)	Heptavalan Konjuge Pnömonokok (2000) Kuadrivalan Konjuge Meningokok (2005) 13 valan Konjuge Pnömonokok (2010)	Kuadrivalan Papilloma (2006) Bivalan Papilloma (2009) Meningokok Grup B (2013)

Son otuz yılın gündeminde yer alan mRNA aşı çalışmaları süreci incelendiğinde mRNA'nın, bir lipozomal nanoparçacık ile hücreye ilk



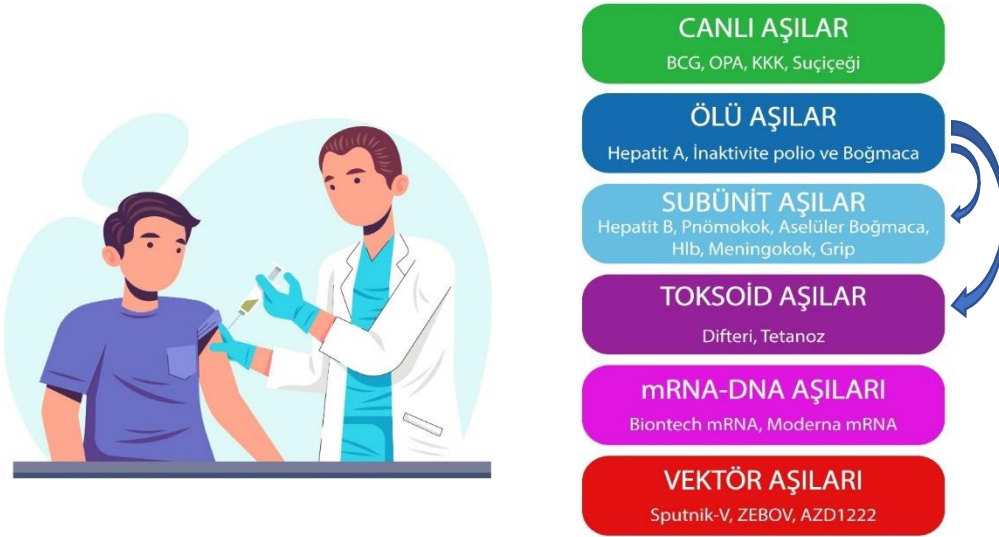
başarılı transfeksiyonunun 1989 yılında gerçekleştirildiğini söylemek mümkündür. Laboratuvar koşullarında üretilen çıplak mRNA, bir yıl sonra farelerin kaslarına enjekte edilmiştir (34). 1990'lı yıllarda, mRNA'nın, kanser ve bulaşıcı hastalıklara karşı aşı geliştirmek amacıyla kullanılması için prelinik çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. 2001 yılında tümör antijenlerini kodlayan mRNA içeren bir terapötik kanser aşısı ile transfekte edilmiş dendritik hücrelerinin kullanıldığı ilk klinik deneyler yapılmıştır (35). 2013 yılında ilk kez mRNA kuduz ve 2015 yılında mRNA influenza aşısı için klinik deney çalışmaları başlatılmıştır. 5 yıl kadar sonra ortaya çıkan ve dünyayı etkisi altına alan Covid-19 salgınına karşı mRNA aşısı geliştirilmiş ve acil kullanım onayı almıştır (36).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 1924-2010 yılları arasında yaklaşık 103 milyon çocukluk dönemi hastalık vakasının önlendiği bilinmekte ve aşılarla harcanan her doların, çocukların sağlıklı büyümesini sağlayarak yaklaşık 44 dolar getiri sağladığı düşünülmektedir (24).

Bilimsel ilerlemeler sayesinde, 2018 verilerine göre yaklaşık 30 mikroorganizmaya karşı 70'ten fazla aşı geliştirilmiş ve bu sayının artması beklenmektedir. Bağışıklık programlarında yer alan ve günümüzde uygulanan aşılarla tüberküloz (*Basillus Calmette-Guerin*, BCG), OPV, Difteri-Tetanoz-Boğmaca (*Diphtheria, Tetanus, Pertussis*, DTP), kızamık-kabakulak-kızamıkçık (*Measles, Mumps, and Rubella*, MMR), Hepatit B, suçiçeği, pnömokok, kuduz, meningokok, influenza, insan papilloma virüsü aşısı (*Human Papilloma Virüs*, HPV) örnek verilebilir (18).

### 2.1.3. Aşı Türleri

Aşılar hazırlanışlarına göre canlı (atenüe) ve ölü (inaktive) aşılar olmak üzere iki gruba ayrılırlar (2). Aşılar sahip oldukları içerik ve özellikler bakımından farklı gruplara ayrılırlar (1, 4). Tez çalışmasında yapılan sınıflandırma, T.C. Sağlık Bakanlığı Covid-19 Aşısı Bilgilendirme Platformu'nda yer alan bilgiler ışığında yapılmıştır (37). Yapılan sınıflandırmaya göre aşı türleri ve örnekleri Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.1.** Aşı türleri ve örnekleri(38).

- **Canlı Zayıflatılmış Aşılar**

Canlı zayıflatılmış aşılar, organizmada çoğalmakta, öldürücü virüsün sebep olduğu enfeksiyonlar oluşmadan viral replikasyonu teşvik etmekte ve immün yanıtı uyarmaktadır. Bu aşılarla uyarılan immün yanıt, doğal enfeksiyonla uyarılan immün yanıtla benzerlik gösterir (1, 19).

Canlı zayıflatılmış aşılar, geliştirilen ilk aşı türüdür. Çiçek hastalığını ve çocuk felcinin neredeyse tamamen ortadan kaldırılmasını sağlayan aşı türüdür. Bu aşı sınıfının en önemli dezavantajı hastalık tablosu oluşturma potansiyeline bağlı güvenlik endişeleridir. Bu aşıların saklama koşullarına çok dikkat edilmeli, ısı ve ışıktan korunmalıdır. Soğuk zincir saklama koşullarına gereksinim duyulması dezavantajlarından bir diğeridir (1, 4). Diğer yandan en önemli avantajları oral uygulanan aşılar hariç tekrarlı doz uygulamasına gerek olmamasıdır (19). Ayrıca canlı zayıflatılmış aşılar adjuvana ihtiyaç duyulmayan tek aşı grubudur (4).

- **İnaktif (Ölü) Aşılar**

İnaktif başka bir deyişle ölü aşılar, hastalığa sebep olan patojen, virüs veya bakterilerin, ısı, ışık ve pH gibi faktörlerle fiziksel veya formaldehit, glutaraldehit, aseton gibi maddelerle kimyasal yöntemlerle inaktif hale getirilmesi, dolayısıyla

hastalık yapma potansiyellerinin ortadan kaldırılmasıyla elde edilmektedir. İnaktivasyon aşamasını takiben, immün yanıtı sebep olan özellikler korunmaktadır. Hepatit A, boğmaca, çocuk felci, tifo ve kuduz aşılı inaktif aşılardır. Bu aşılıların güvenilirliği yüksektir. Saklanması kolaydır ayrıca spesifik immün yanıt oluşturabilirler (39, 40).

Güvenlik nedeniyle sıklıkla tercih edilmekle birlikte kullanımda bazı sorunlarla karşılaşılabilir. Bunların başında vektör inaktivasyonunun tamamlanmamış olabilmesi ve bunun sonucunda aşılama sonrasında hastalık tablosu ortaya çıkabilmesidir. İkinci olarak, immün yanıt zayıf olabilir ve buna bağlı olarak tekrar dozuna gereksinim duyulabilir (40). Ayrıca yaşam döngüsü boyunca değişime uğrayan özelliklere sahip patojenler için ve bazı kronik enfeksiyonlar için uygun değildir (20).

İçerik olarak bakıldığında bir mikroorganizmanın tümünü öldürölmüş halde içeren aşılara tüm hücreli aşı, mikroorganizmanın yalnızca belli kısımlarını içeren aşılara ise fraksiyone (alt birim) aşı denir (4, 19, 41). Alt birim aşılı patojenin tamamını değil, belli antijenik kısımlarını ihtiva eder. Polisakkarit bazlı aşılı, protein bazlı aşılı alt birim aşılı grubundadır. Ülkemizde kullanılan pnömokok, Hepatit B, aselüler boğmaca aşılı ve risk gruplarına önerilen meningokok ve grip aşılı bunlara örnek olarak verilebilir (37, 41).

İnaktif aşılıların bir başka alt grubu olan konjuge aşılı, bir bakterinin hücre duvarından izole edilen antijenik kısımların bir polisakkarite bağlanmasıyla üretilir. Özellikle çocuklarda immünojenisitesini arttırmak için kullanılırlar (4, 19). Konjuge pnömokok aşılı, konjuge meningokok aşılı, Haemophilus influenzae tip b aşılı konjuge aşılılara örnektir (37). *Streptococcus pneumoniae* (SPN)' ye karşı multivalan aşılı (7-, 10-, 13-, 15-, 20-valan), yaklaşık son 20 yılda ruhsatlandırılmıştır. 1970'lerden bu yana, 6 ila 23 serotip arasında kapsöler polisakkaritler içeren birkaç pnömokok polisakkarid aşılı (*Pneumococcal polysaccharide vaccine, PPV*) geliştirilmiştir. Dünya çapında birçok ülkede yalnızca 23-valanlı PPV ruhsatlandırılmıştır. 65 yaş ve üstü bireyler ile kronik kardiyovasköler hastalık ve diyabet öyküsü olan 2 ila 64 yaş arası bireyler için önerilmektedir (42).

Toksoid aşılı, mikroorganizmaların toksinlerinin yapısı değiştirilerek hastalık yapma özellikleri ortadan kaldırılmış fakat immün sistemi uyarma kapasiteleri

korunmuş halini içeren inaktif aşılardır. Difteri ve tetanoz aşıları toksoid aşılarla örnektir. Bu aşılar yüksek oranda immünojenik değildirlir ve bir adjuvan içeren formülasyonun yanı sıra birden fazla uygulama gerektirirler (4, 41).

Alt birim (fraksiyone) aşılar, canlı zayıflatılmış aşılarla nispeten daha kolay üretilebilmektedir. Rekombinant teknolojilerin kullanımı, alt birim aşıların tasarım ve üretimini kolaylaştırmıştır. Daha az yan etkiye sahip olduklarından daha güvenilir aşılar olarak kabul edilirler. Bunun yanı sıra tekrar dozuna ve adjuvan kullanımına gereksinim vardır (43). Yaygın olarak, kas içi enjeksiyon, deri altı enjeksiyon, intraperitoneal enjeksiyon ve mukozal aşılama ile uygulanan ve in vivo bozunmaya uğramak gibi bir dezavantaja sahip alt birim aşıların etkinliği, adjuvan ve uygun aşılama yöntemi kullanımı ile artırılabilir. Bu yüzden, uygun bir adjuvan ve bağışıklama yönteminin seçilmesi, alt birim aşı araştırmaları için esastır (44). Hepatit B aşısı, asellüler boğmaca aşısı fraksiyone aşılarla örnektir (37).

- **mRNA ve DNA İçeren Aşılar**

Nükleik asit aşıları (mRNA ve DNA içeren aşılar) hedeflenen mikroorganizmanın antikor oluşturan antijenik yapısının mRNA ya da DNA'sını içeren aşılardır (37). Yakın zamanda geliştirilmiş olan bu aşılar, güncel klinik denemelerden hareketle, bulaşıcı hastalıklara karşı mücadelede umut verici yeni bir platformdur (45). Yenilikçi bir yaklaşım olarak kabul edilen bu aşılar, CD4+ ve CD8+ T hücresi tepkilerini indükleme yetenekleri bakımından geleneksel aşılarla göre önemli avantajlara sahiptir. CD4+ T hücresi tepkilerini indükleyerek güçlü hümmoral bağışıklık tepkisi oluşturur (46). Bulaşıcı hastalıklara ek olarak kanser immünoterapisi dahil pek çok alanda heyecan verici bir bağışıklama yaklaşımını temsil etmektedir (47). CD8+ T hücresi tepkilerini indükleyerek tümör hücrelerini tanımayı ve apoptozu sağlar (46).

Nükleik asit aşıların uygulamasından sonra hücreler antijeni üretmeye başlar ve bu da bağışıklık sistemini uyarır. Bu aşılar, antijene karşı güçlü bir antikor yanıtı üretirler. Bu aşıların oluşturulması ve üretilmesi nispeten kolay ve ucuz olarak kabul edilir (19). DNA ve mRNA içeren aşıların ortaya çıkmasıyla, aşı tasarımı ve üretimi için gerekli olan süre önemli ölçüde kısalmıştır (45).

Hem hümmoral hem de hüresel bağışıklık tepkilerini indükleyebilme özellikleri DNA aşılarını, inaktif aşılarından ve subünite aşılarından farklı kılmaktadır (47). mRNA

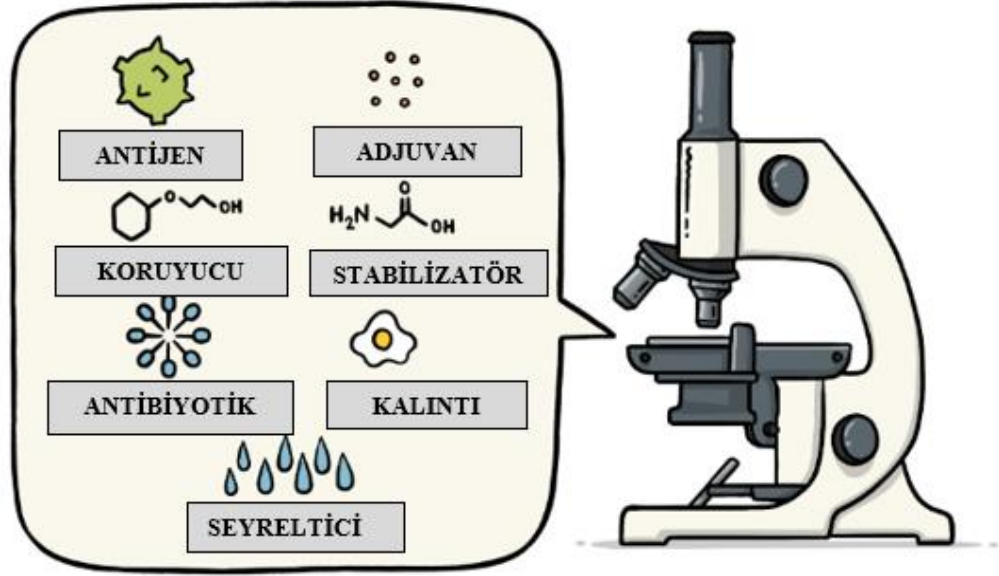
aşılarının DNA aşılara göre bazı avantajları vardır, bunlar bölünmeyen hücrelerde ekspresyon ve konakçı genoma entegrasyon riskinin olmamasıdır. Ayrıca, bağışıklık tepkisini başlatmak için genellikle daha düşük dozlar gerekir (45). mRNA aşılarının antijeni eksprese etmeleri için çekirdeğe girmeleri gerekmemektedir (48). RNA aşılarının stabilite eksikliği ve soğuk zincir gereksinimi nedeniyle dezavantajları mevcuttur (2). Pek çok çalışma, mRNA ve DNA içeren aşılarda ebola, insan immün yetmezlik virüsü (HIV), grip ve insan papilloma virüsüne (HPV) karşı prelinik ve klinik deneylerde umut verici olduğuna işaret etmektedir (46). Covid-19 salgını ile birlikte, SARS-CoV-2 'ye karşı mRNA aşısı geliştirilmiş ve klinik denemeleri yapılmıştır (48). Pfizer Biontech mRNA aşısı ve Moderna mRNA aşısı SARS-CoV-2 'ye karşı geliştirilen mRNA aşılardır (37).

- **Vektör Aşıları**

Vektör aşıları, canlı zayıflatılmış aşılardan ve subünite aşılardan avantajlarının birleşimine sahiptir. Bu aşılarda bir patojenin antijenik protein genlerini ifade eden patojenik olmayan virüsler içerir. Genellikle retrovirüslerden, herpes simpleks virüslerinden, adenovirüslerden veya poksivirüslerden üretilen viral vektörler kullanılmaktadır. Bununla birlikte, vektör olarak kullanılan virüslere önceden maruz kalma ile kullanımları sınırlanabilmektedir. İnsanlarda vektörlere karşı önceden var olan nötralize edici antikorlar immünojenisitenin azalmasına yol açabilmektedir (1, 2). Bu durum, insanlarda önceden neredeyse hiçbir bağışıklığın bulunmadığı simian adenovirüs gibi vektörler kullanılarak aşılabilir. Vektöre karşı bağışıklık tepkilerinin, vektörün farklı antijenlerle tekrarlanan aşılama için kullanımını sınırlayıp sınırlamayacağını araştırılması gerekmektedir (2). Ayrıca, vektör genomunda yabancı bir transgenin varlığı da aşının etkinliğini azaltan evrimsel mutasyonlara yol açabileceğinden immünojenisiteyi azaltabilmektedir (4).

#### **2.1.4. Aşıların Yapısında Bulunan Bileşenler**

Aşılar, patojene ait antijenik kısımları ve bu kısımları ekspre eden sistemleri içerir. Ayrıca aşının etkinliğini artırmak ve stabilitesini sağlamak amacıyla bazı bileşenleri de içerirler. Bunlar; adjuvanlar, prezervatifler, stabilizatörler, antibiyotikler ve kalıntılar olup Şekil 2.2.'de gösterilmiştir (21).



Şekil 2.2. Aşı bileşenleri (21).

### a. Aktif Bileşenler

Tüm aşılar, bağışıklık tepkisi oluşturan aktif bileşen (antijen) veya antijeni ekprese etmek için bileşenler içerir. Antijen, aşının türüne bağlı olarak patojenin küçük bir kısmı olabileceği gibi zayıflamış veya inaktif formda tüm patojen olabilir (21).

### b. Adjuvanlar

Adjuvanlar, tek başında antijenik özelliği olmayan, antijenlerle kombinasyon halinde immünolojik yanıtı artıran moleküllerdir (49). Aşılar genellikle, aşı antijenleri tarafından indüklenen bağışıklık tepkisini artıran maddeler olan adjuvanlarla formüle edilir (14).

Nihai aşıda birden fazla adjuvan bulunabilir. Bunlar tek bir antijenle ya da daha fazla antijenle kombine edilebilir. Adjuvanlar kaynaklarına (doğal, sentetik veya endojen), etki mekanizmalarına ve fizikokimyasal özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Adjuvanın fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri stabilite değerlendirmesinde göz önünde bulundurulur (50). "Kendinden olmayanın" daha etkili ve kolay tanınabilmesi ve immünolojik yanıtın artması için, adjuvanların antijenlerle kombinasyon halinde olması gereklidir (49). Adjuvan antijen

kombinasyonunun oluşması oldukça önemli olduğundan bağlanma özellikleri test edilerek değerlendirilmelidir (50).

Aşı bileşeni olarak adjuvanların kullanım nedenleri aşağıdaki gibidir;

-Aşılarda daha güçlü, spesifik olmayan ve uzun süreli bir immün yanıt sağlamak.

-Kullanılan antijen miktarlarını azaltmak.

-Uygulanması gereken doz sayısını azaltmak.

-Hafıza T hücrelerinin oluşmasını sağlamak.

-Yaş (bebekler ve yaşlılar), hastalık veya immün sistemi zayıflamış olması nedeniyle duyarlılığı azalmış popülasyonlarda bağışıklık oranlarını artırmak. (Yaşlı bireylerin grip aşısına karşı immün yanıtını artırmak için MF59 adjuvanının kullanımı buna örnek olarak verilebilir.)

-İnflamatuvar sitokinlerin salınmasının uyarılmasını sağlamak.

-Mukozal yoldan uygulanan aşılarda immün yanıtın güçlendirilmesini sağlamak (49, 51-53).

İdeal adjuvanlar sahip oldukları özellikler aşağıdaki gibidir;

-Uzun süreli yan etkilere sebep olmadığından güvenilirdir.

-İyi tolere edilebilir.

-Ekonomik olarak uygundur.

-Farklı aşı antijenleriyle uyumludur.

-Kolay üretilebilir.

-Biyolojik olarak parçalanabilir ve etkisi bittikten sonra vücuttan kolay uzaklaştırılabilir.

-Antijenin taşınmasını sağlar.

-İmmün yanıtları güçlendirir.

-Kullanılacakları ülkede geçerli olan farmakopeye uygun olmalıdır (15, 54).

Bir adjuvanın aşı formülasyonunda kabul edilebilmesi için EMA'ya göre, gerekliliği ve olası olumsuz etkileri kıyaslanmalıdır. Sağlıklı ve çoğunlukla da pediyatrik popülasyona da uygulandığından koruyucu aşıların güvenliğine büyük önem verilmektedir. Genellikle ağır hastalara veya yüksek risk gruplarına uygulanan terapötik aşılar için durum farklı olup bu koşullarda aşılama ile elde edilecek yarar daha önemli olabilir ve bu nedenle olası toksisite riski kabul edilebilir (55).

## Alüminyum

Alüminyum tuzları, 1932'den beri aşılarında adjuvan olarak kullanılmaktadır. En çok kullanılan alüminyum adjuvanları, alüminyum oksihidroksit ve alüminyum hidroksi fosfat ve alüminyum hidroksi fosfat sülfattır. Bunlar farklı fiziko-kimyasal özelliklere sahiptir. Aşıların neredeyse %60'ında bulunur ve en çok kullanılan formu alüminyum oksihidroksittir (53, 56).

Alüminyum doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini ve inflamasyonu uyarır. Dendritik hücreler ve makrofajlar gibi antijen sunan hücrelerin uyarılmasını sağlar. İnterlökin salınımını, T ve B lenfositlerinin aktivasyonunu ve antikor üretimini artırır. Alüminyum adjuvanları ayrıca hassas bireyleri alerjik reaksiyonlara yatkın hale getirebilen antijene özgü IgE tepkilerini de indükler. Bununla ilgili mekanizmalar hala tam olarak aydınlatılamamıştır (57, 58).

Alüminyum enjeksiyon yerinde kızarıklık, şişlik, lezyon, eritem, gronülom gibi lokal reaksiyonlara sebep olmaktadır (59). Bazı çalışmalar alüminyumun enjeksiyon bölgesinden lenf düğümleri ve beyin gibi dokulara geçtiğini göstermiştir. Alüminyumun beyin dokularına geçişini takiben fare ve koyunlarda davranış değişikliklerini gösteren çalışmalar da mevcuttur (56).

Crepeaux ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı bir çalışmada alüminyum adjuvanın sinir sistemi üzerindeki potansiyel etkisi fare modellerinde incelenmiştir ve farelerin motor ve bilişsel işlevlerinde değişiklikler gözlemlenmiştir. Çalışmada adjuvan olarak kullanılan alüminyum hidroksitin doğrusal olmayan doz yanıt eğrisi oluşturduğu sonucuna ulaşılmış, en düşük dozun farelerde nörotoksik olduğu; buna karşın en yüksek dozların nörotoksisiteye sebep olmadığı ileri sürülmüştür (60). Bunun aksine alüminyumun güvenli bir adjuvan olduğunu ve nörogelişimsel risk oluşturmadığını savunan çalışmalar da mevcuttur (61).

Aşılarında bulunan alüminyum birtakım endişelere sebep olsa da alüminyuma ana maruziyet besin ve içme suyudur. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (*European Food Safety Authority, EFSA*) tolere edilebilir haftalık alım (*Tolerable Week Intake, TWI*) sınırını 1 mg alüminyum/kg vücut ağırlığı/haftalık olarak belirlemiştir. Avrupa Farmakopesi, aşılar için doz başına 1,25 mg olarak bir alüminyum eşiği belirlemiştir. Bu eşik, yukarıda bahsedilen 1 mg alüminyum/kg vücut ağırlığı/haftalık Avrupa TWI'sine uygundur (62). T.C. Sağlık Bakanlığı Aşı Portal'ına göre bir insanın



yaşamı boyunca aşılardan maruz kaldığı toplam alüminyum miktarı 4,25 mg iken bazı ilaçlarda özellikle mide asidini kontrol etmek amacıyla kullanılan preparatlarda bulunan alüminyum miktarı 20-30 mg'dır (63). Bununla birlikte, yeni doğan ve bebeklerin aşılarla maruz kalmalarının, özellikle diyet ve diğer yollarla alüminyuma maruz kalmalarına göre önemli olup olmadığı konusunda tartışmalar devam etmektedir. Bazı aşılarda tek bir dozunun içerdiği alüminyum miktarının, bir bebeğin 150 günlük emzirmeden alacağı alüminyum maruziyetine eşdeğer olduğu ve aşı yoluyla alüminyuma maruz kalmanın, diyete kıyasla akut bir maruziyet olduğu ileri sürülmüştür (64).

Ağrı, enjeksiyon yerinde lokal reaksiyonlar, miyofasit sendromu, alzheimer ile ilişkili olabileceği düşünülse de alüminyum adjuvan olarak altın bir standarttır. Alternatif bir adjuvanın alüminyuma nispeten daha güvenilirdir, daha güçlü koruyucu olması ve daha tolere edilebilir olması gerekmektedir (59).

Oligonükleotitlerden biri olan CpG ve MF59 gibi yağ emülsiyonları bilinen ve kullanılan diğer adjuvanlardır (14). CpG'nin adjuvan etkisi, protein antijenlerine konjuge halde artmakta olup bu adjuvan kullanılarak, enfeksiyöz ajanlara, alerjenlere ve tümör hücrelerine yönelik aşılarda için çalışmalar yapılmaktadır (49). MF59, Avrupa'da yaşlı bireylerin bağışıklık yanıtının güçlendirilmesi amacıyla, mevsimsel grip aşılarda kullanılmak üzere ruhsatlandırılmıştır. Saponin bazlı adjuvanlar ise veteriner aşılarda yaygın olarak kullanılmaktadır (51).

### **c. Koruyucular**

Koruyucular aşı formülasyonlarına mikroorganizmaları, özellikle bakteri ve mantarları öldürmek veya büyümesini önlemek için eklenir. Genellikle çoklu doz aşı flakonların tekrar tekrar delinmesi ile kontaminasyon oluşabilmekte ve koruyucular bu durumu kontrol altına almak amacıyla kullanılmaktadır. Bazen de üretim esnasında mikrobiyal üremeyi engellemek için kullanılır (65). Yaygın olarak çoklu doz aşılarda kullanımı tavsiye edilse de aşılarda genellikle bulanık olmasından dolayı mikrobik kontaminasyon maskelenebileceğinden bir koruyucunun varlığı kontaminasyonun önlenmesi için önemlidir (66).

- **Tiyomersal**

Tiyomersal, aşı formülasyonlarında koruyucu işleve sahip, çoklu doz aşılarında kontaminasyonu önleyen antimikrobiyal bir madde olarak, 80 yılı aşkın süredir kullanılan bir organik civa bileşiğidir (67). Canlı aşıların etkin maddesi ile etkileşebileceğinden canlı aşılarında kullanılmamakla beraber bazen antijeni zayıflatmak amacıyla kullanılabilir. Boğmacanın ısı ile inaktivasyonuna katkıda bulunması için tiyomersalin kullanılması buna örnektir (66).

Aşıya ek olarak topikal farmasötik preparatlarda ve kozmetiklerde de koruyucu olarak kullanımı yaygındır. Tiyomersal %49,55 (a/a) civa (Hg) içerir ve metabolize olduğunda tiyosalisilik asit, ditiyobenzoik asit ve etil civa açığa çıkmaktadır. Hepatit B, influenza, Haemophilus influenzae tip b, difteri, tetanoz ve boğmaca aşılarında doz başına 0.50 ml'de 45 ila 55 µg arasında kullanılmaktadır (68).

Civa bileşikleri, bakteriyolojinin doğuşundan itibaren dezenfektan olarak kullanılmıştır. Uzun bir süre civa klorür (HgCl) gibi Hg bileşiklerinin bakteri ve diğer mikroorganizmaların öldürülmesinde yararlı olduğu düşünülmüştür (69).

Yararlı etkilerinin yanında Hg' nın sebep olduğu düşünülen kontakt dermatit gibi immünolojik reaksiyonlar, otizm ve nörolojik bozukluklar gibi olumsuz etkiler, özellikle Hg toksisitesine daha duyarlı bebekler için çeşitli endişelere yol açmaktadır (70).

Civa, yer kabuğunda, havada, toprakta ve suda doğal olarak bulunan bir elementtir. Bazı bakteri türleri inorganik civayı organik civaya (metil civa) dönüştürebilir. Metil civa balıklarla hayvan ve insanlara ulaşır. Civa yüksek konsantrasyonlarda nörotoksik olabilir. Ancak tiyomersal metil civa değil etil civa içermektedir. Etil civa, metil civadan çok daha hızlı parçalanır ve vücuttan atılır. Bu sebeple vücutta birikme ve zarar verme olasılığı çok daha düşüktür (71). Etil civanın yarılanma ömrünün bir haftadan daha kısa olduğu ve yaklaşık 4–9 günde vücuttan sindirim sistemi ile atıldığı bilinmektedir (63). Yine de çevresel faktörler ve balık tüketim alışkanlığına ek olarak tiyomersal içeren aşıların uygulanması Hg maruziyetine duyulan endişeleri artırmaktadır (70).

Difteri-Tetanoz-Boğmaca (DTB) aşılarıyla tiyomersalin otizm, dikkat eksikliği ve hiperaktivite gibi nörogelişimsel bozukluklar ile ilişkilendirildiği bazı çalışmalar bulunmaktadır (69). Bunun tam tersini savunan ve DTB aşıları yoluyla timerosal

maruziyetinin nörogelişimsel bozukluklara neden olduğuna dair hiçbir kanıtın bulunmadığını ileri süren çalışmalar da mevcuttur (72). 2003-2010 yılları arasında Danimarka, Birleşik Krallık ve ABD'den 690.000' den fazla çocuğu kapsayan büyük araştırmalar yapılmış, tiyomersal içeren aşilar ile otizm arasındaki ilişkiyi değerlendirmiş ve sonuç olarak tiyomersal içeren aşiların otizm riskini artırdığına dair bir kanıt bulunamamıştır (61). İhtiyati bir tedbir olarak, ABD tiyomersal içermeyen bir çocukluk aşısı programına geçiş yapmıştır. ABD' de yalnızca çok dozlu influenza aşiları timerosal içermektedir (71). Olası riskleri en aza indirmek için Avustralya Standart Aşısı Çizelgesindeki 5 yaşından küçük çocuklar için kullanılan aşilar da tiyomersal içermeyen ya da eser miktarda içerir (57).

Aşılarda tiyomersal ile ilgili olarak WHO kullanımının azaltılmasını, kaldırılmasını ya da değiştirilmesi tavsiye eder (73).

Aşılardaki tiyomersalin azaltılması ya da kaldırılmasına ilişkin EMA kılavuzunda olası istenmeyen etkilere karşı tiyomersal ve diğer organo civa koruyucular içermeyen aşiların kullanılması tavsiye edilmiştir. Kılavuzda bununla ilgili üç öneri bulunmaktadır. Tiyomersalin tamamen ortadan kaldırılması, nihai aşısı formülasyonunda tiyomersal miktarının azaltılması ve tiyomersale alternatif koruyucuların kullanılması. Değişirme, alternatif koruyucunun anti mikrobiyal etkinlik, antijen ile uyumluluk, risk yarar dengesi açısından dikkatli bir şekilde değerlendirilmesinden sonra yapılmalıdır (66).

Tiyomersalin yanı sıra, fenol, fenoksietanol, m -kresol, benzil alkol, klorobutanol ve metilparaben de aşısı formülasyonlarında koruyucu olarak kullanılmaktadır. Daha eski yıllarda aşılarda koruyucu olarak sadece fenol (tifo aşiları için), timerosal (difteri, tetanoz, boğmaca, grip, Japon ensefaliti, hepatit B ve pnömokok aşiları için) ve fenoksietanol (çocuk felci, pnömokok ve tifo aşiları) kullanılmıştır (74).

#### **d. Stabilizatörler**

Stabilizatörler, aşısı içinde meydana gelebilecek kimyasal reaksiyonları ve aşısı bileşenlerinin aşısı şişesine yapışmasını engeller. Şekerler (laktoz, sakaroz), amino asitler (glisin), jelatin ve proteinler (mayadan elde edilen rekombinant insan albümini) aşısı formülasyonlarında kullanılan stabilizatörlerdir (21). Jelatin, aşılama sonrası

ortaya çıkan ürtiker, anafilaksi veya lokal reaksiyonlar gibi bazı alerjik reaksiyonlarla ilişkilendirilmiştir fakat jelatinin anafilaksi insidansı oldukça düşüktür ve 2 milyon dozda yaklaşık bir vaka görülmüştür (57). Magnezyum klorid ve Polisorbitat 80 de aşılarda yaygın şekilde stabilizatör olarak kullanılmaktadır (63).

#### **e. Antibiyotikler**

Gentamisin, tetrasiklin, neomisin, streptomisin ve polimiksin B gibi antibiyotikler genellikle aşı üretimi sırasında bakteri ve mantar kontaminasyonunu önlemek için kullanılırlar. Anafilaksi dahil olmak üzere sistemik alerjik reaksiyonlara veya lokal deri reaksiyonlarına sebep olabilirler. Neomisinin sebep olduğu cilt reaksiyonları, anafilaksi için bir risk faktörü olmayıp, neomisin içeren aşıların kullanımını için bir kontrendikasyon olarak değerlendirilmez (57, 75). Kanamisin ve eritromisin de aşı içeriklerine dahil edilen antibiyotikler arasındadır (63).

#### **f. Kalıntılar**

Kalıntılar, aşıda aktif bileşen olmayan aşıların üretimi sırasında kullanılan küçük miktarlarda çeşitli maddelerdir. Aşı içeriğinde bulabilen kalıntılar genellikle maya ve yumurta proteinleridir (21). Aşılamadan sonra yumurta proteinlerine bağlı alerji riski bulunmaktadır fakat mevcut kılavuzlar, anafilaksi dışında yumurta alerjisi olan hastaların güvenli bir şekilde aşılanabileceğini bildirmiştir. Yumurta proteinlerinin yanı sıra bazı aşılar *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak üretilir. Ekmek mayası kullanılarak üretilen aşılarla maruz kalan hastalarda mayaya özgü IgE tespit edildiğine dair herhangi bir rapor bulunmamaktadır (57).

Bir aşı formülasyonunda bulunan bu bileşenler, kontaminasyon ve aşı tarafından indüklenen bağışıklık cevabının fazla olması bazı potansiyel güvenlik sorunlarına yol açabilmektedir (15).

### **2.2. Aşı Uygulamaları Sonrası Gelişen İstenmeyen Etkiler**

Modern tıptaki ilerlemeler nedeniyle, eskiden yaygın olan ciddi bulaşıcı hastalık oranları büyük ölçüde azalmıştır. Bununla birlikte, küresel aşılama

programlarındaki kazanımların sürdürülmesi, hem aşı etkinliği hem de aşı güvenliği konusunda yeni tartışmaları gündeme getirmiştir (61).

Aşılamadan sonra istenmeyen etkiler görülebilir. Bu etkiler, aşı bileşenlerine akut aşırı duyarlılık tepkilerinin gelişmesi, lokal doku reaksiyonları, otoimmün hastalıkların görülmesi ve anafilaksi olabilir (76).

### **2.2.1. Aşılama Sonrası Sıkça Görülen Hafif Yan Etkiler**

- **Ateş, Ağrı ve Enjeksiyon Bölgesinde Lokal Reaksiyonlar**

Aşılamadan sonra yaygın görülen lokal reaksiyonlar, enjeksiyon bölgesinde ağrı, şişme ve eritemdir. Ateş, sinirlilik, uyuşukluk ve döküntü gibi sistemik reaksiyonlar da ortaya çıkabilir. Daha uzun iğne kullanımı enjeksiyon bölgesinde olası reaksiyon riskini azaltır. Ateş ve ağrı görülmesi halinde parasetamol kullanımı tavsiye edilir (77).

### **2.2.2. Aşılama Sonrası Çok Nadir Görülen Ciddi Yan Etkiler**

- **Lenfadenopati**

Lenfadenopati aşılama sonrası lenf nodlarındaki reaktif değişikliklere bağlı olarak gelişebilir. Klinik olarak elle hissedilebilen ve radyolojik görüntüleme ile saptanan ağrılı yumrulardır. BCG, hepatit B, insan papilloma virüsü, tetanoz ve SARS-CoV-2 aşılarından sonra nadiren gözlenmiştir (78).

- **Artrit ve Artralji**

İlk olarak 1969 yılında yapılan kızamıkçık aşısı çalışmalarında, aşılamayı takiben hafif ve geçici artralji gözlenmiştir (79). Kızamıkçık aşısı ile artrit ve artralji arasındaki potansiyel ilişki ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmış ve çelişkili sonuçlar bulunmuştur (80).

Institute of Medicine (IOM), 2011'de Adverse Events Following Immunization (AEFI)'nin bir serisinin nedenselliğini değerlendirmiştir. Akut ve kronik formlar, reaktif, aseptik ve septik artrit ile artralji dahil olmak üzere artrit tanımlarının çeşitliliği, aşılarla olası bir nedensel ilişkiyi güvenilir bir şekilde değerlendirmede zorluklar ortaya çıkarmıştır. Kızamık, kabakulak ve kızamıkçık (MMR) aşısı ve bazı

kadın ve çocuklarda geçici artralji oluşumu olası nedensel ilişki olarak sınıflandırılırken, diğer aşılarda nedensel ilişkiyi kabul etmek veya reddetmek için yeterli kanıt bulunamamıştır (81).

- **Trombositopeni**

Aşı ile ilişkilendirilen nadir fakat ciddi advers reaksiyonlardan bir diğeri de sekonder immün trombositopeni (*Immune Thrombocytopenic Purpura*, ITP)dir. ITP, otoimmün kanama bozukluğu olup trombosit yıkımına ve trombosit üretiminin bozulmasına yol açar. Kızamık-kabakulak-kızamıkçık (MMR) aşısı, şu anda 100.000 dozda yaklaşık 0.087-4 insidansla immün trombositopeni ile neden-sonuç ilişkisinin gösterildiği tek aşıdır ve komplikasyon çoğunlukla çocuklarda görülür (82). Ek olarak tromboz ve trombositopeni ile sağlık kuruluşlarına başvuran ve adenoviral bazlı aşı (ChAdOx1 nCoV-19 ve Ad26.COV2-S) uygulanan bireylerde aşı kaynaklı immün trombotik trombositopeni (*Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia*, VITT) gözlenmiş ve bazı Covid-19 aşuları ile trombositopeni arasında ilişki olduğu düşünülmüştür (83).

- **Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları**

Aşıya bağlı aşırı duyarlılık reaksiyonları seyrek olmamakla birlikte ciddi akut başlangıçlı, IgE aracılı veya IgG ve kompleman aracılı anafilaktik veya ciddi gecikmiş başlangıçlı T hücresi aracılı sistemik reaksiyonların son derece nadir olduğu kabul edilir. Aktif aşı bileşeni (antijen) veya diğer bileşenler nedeniyle aşırı duyarlılık reaksiyonları oluşabilir. Görülen reaksiyonlar döküntü, ürtiker, anjiyoödem ve anaflaksiye kadar değişebilir (75).

Aşı formülasyonunda bulunan yumurta proteinleri, jelatin, sığır serum proteinleri, antibiyotikler gibi stabilizatör ve kalıntılara karşı atopiklerde IgE yanıtı ortaya çıkarabilir. IgE antikorları, cilt, bağırsak ve solunum yolu mukozalarındaki mast hücreleri üzerindeki reseptörler için yüksek bir afiniteye sahiptir. Aşılamayla vücuda giren antijen, mast hücreleri yüzeyindeki IgE ye bağlanır ve degranülasyona neden olur. Histamin gibi nörotransmitterlerin serbest bırakılmasıyla tip I aşırı duyarlılık reaksiyonları görülür (76).

McNeil ve arkadaşlarının yaptığı 3 yıl süren bir çalışmada, 25.173.965 aşı dozu uygulandıktan sonra 33 anafilaksi vakası görülmüş olup bu da milyonda 1,31 ihtimali ifade etmektedir (75).

Akut aşırı duyarlılık reaksiyonlarına ek olarak gecikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonları da nadir görülür. Lokalize veya nadiren diffüz ekzamatöz, kütanoz veya enjeksiyon yerinde deri altı nodüller şeklinde ortaya çıkabilirler (84).

- **Canlı Aşı Uygulama Sonrası Doğal Hastalığı Taklit Eden Hastalık Tablosu**

Oral çocuk felci aşıları (*Oral polio vaccine*, OPV) nadiren paralitık hastalığa neden olabilir. Dünya genelinde yaklaşık 1 milyonda 4,7 (aralık: 2,4-9,7) oranında aşı uygulanan ve aşı uygulananlarla yakın temasta bulunan bireylerde aşıyla ilişkili paralitık çocuk felci (*Vaccine-Associated Paralytic Polio*, VAPP) görülmüştür (85).

Kabakulak aşısı uygulamasından sonra parotis bezleri ve testisler etkilenip doğal hastalığın semptomları olan parotitis ve orşit görülebilir (86). Benzer şekilde kızamık ve kızamıkçık aşılarının uygulanmasından hemen sonraki dönemde (7-28 gün) hastalığa benzer şekilde ateş döküntü gözlenebilir. Aşı ile ilişkili kızamıkçık insidansı bilinmemektedir (87). Kızamık aşısıyla ilişkili döküntü hastalığı (*Vaccine-Associated Rash Illness*, VARI) kızamık aşısı uygulanan bireylerin %5 ila 15'i arasında gözlenebilmektedir (88).

- **Guillain-Barre Sendromu (GBS)**

Guillain-Barré sendromu (GBS), ekstremitelerin gevşek felci, duyuşal anormallikler ve kranial sinir felci ile karakterize bir otoimmün hastalıktır (89).

İnfluenza aşısı yapılan 100.000 kişide 1 vakada GBS görülmüş ve aşı ile ilişkilendirilmiştir. Fakat influenza enfeksiyonunun Guillain-Barré sendromu ile aşidan daha güçlü bir ilişkisi olduğunu, bu nedenle aşılamanın aslında genel insidansı azaltabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (77).

Chen ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptıkları çalışmada çocuk ve yetişkinlere Hepatit B, influenza, Hepatit A, suçiçeği, kuduz, çocuk felci (canlı), difteri, boğmaca, tetanoz, kızamık, kabakulak, kızamıkçık, Japon Ensefaliti ve menenjit aşıları uygulanmış ve aşılamaı takip eden 180 günde GBS riskinde artış saptanamamıştır (89).

Aşı uygulamalarından sonra görülen ve aşı ile ilişkilendirilen ciddi yan etkiler Tablo 2.2. 'de verilmiştir.

**Tablo 2.2.** Aşı ile ilişkilendirilen ciddi yan etkiler (77).

AŞI	GÖRÜLEN REAKSİYON	GÖRÜLME SIKLIĞI	ETKEN
Difteri ve Tetanoz Aşıları	Ciddi Alerjik Reaksiyonlar	1.000.000 da 1	Şırıngada bulunan lateks
Kabakulak Kızamık Kızamıkçık Aşıları	Trombositopeni Ciddi Alerjik Reaksiyonlar	20.000 de 1 1.000.000 da 1	Neomisin Jelatin
Kabakulak Kızamık Kızamıkçık, Suçiçeği Aşıları	Ateşli Nöbet	10.000 de 8,5	Neomisin Jelatin
Meningokok Aşıları	Ciddi Alerjik Reaksiyonlar	Nadir	Lateks (Bexero)
Rotavirüs Aşıları	İç Kanama	20.000 de 1	Oral Aplikatörde Bulunan Lateks (Rotarix)

Nadiren görülen aşı sonrası istenmeyen etkilerin oluşmasında aşı bileşenlerinden biri ya da birkaçı etken olabileceği gibi, uygulama aplikatörü ya da şırıngalar da istenmeyen etkilerden sorumlu olabilir (77). Bununla birlikte her aşı bileşeni belirli bir amaca hizmet etmekte ve her bileşen üretim sürecinde güvenlik açısından test edilmektedir (21).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farnasötik Toksikoloji Yüksek Lisans Programı kapsamında yapılan “Dünyada Yeni Aşı Üretiminde Uygulanan Toksikolojik Değerlendirmelerin Karşılaştırılması” başlıklı tez çalışması için Farnasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Akademik Kurul Kararı'nın alınmasının ardından, Hacettepe Üniversitesi Kütüphaneleri'nin erişimine açık olan veri tabanları kullanılarak gerekli kaynak taramaları yapılmıştır.

Öncelikli olarak kütüphanelere uzaktan erişime olanak sağlayan internet sayfasından yararlanılmıştır. Tezin ilk dört aylık sürecinde öncelikle “dünya”, “aşılar”, “yeni aşı üretimi”, “aşı toksisitesi”, “prelinik çalışmalar”, “klinik çalışmalar”, “farklı ülkeler”, “aşı güvenliği”, “hayvan deneyleri”, “3R”, “biyolojik ürünler” ve “kılavuz” anahtar kelimeleri farklı kombinasyonlarla PubMed başta olmak üzere ScienceDirect ve Google Akademik gibi veri tabanlarında kaynak taraması yapılmıştır.

Anahtar kelime kombinasyonlarla PubMed veri tabanında 1999 ve 2023 yılları arasında yayımlanmış pek çok makaleye erişim sağlanmıştır. Bu makalelerden tez çalışmasında kaynak olarak kullanılabileceği öngörülen 170 tanesi konu başlıklarına göre katagorize edilmiştir.

İlgili makaleler, başlıklarıyla EndNote uygulamasının PubMed arama çubuğunda aranmış ve yerel kütüphane oluşturularak kaydedilmiştir. Başlıkları ile arandığında bulunamayan makaleler yazar isimleriyle aranarak kaydedilmiştir. Her iki yöntemle EndNote uygulamasında aranan kaynak bulunamadıysa, ilgili kaynak bir makale ise başlık, yazar, dergi adı, yayınlanma yılı, sayfa sayısı, doi numarası, PMID, URL; bir kitap ise başlık, yazar, editör, yayınevi, yayınlanma yılı, sayfa gibi bilgiler kaydedilerek yerel kütüphanede arşivlenmiştir.

Tezin hazırlanmasında, ulusal ve uluslararası kabul edilen yayınevleri tarafından basılmış olan konu ile ilgili kitaplar ve dünya sağlık otoriteleri tarafından referans alınan kılavuzlardan da yararlanılmıştır. İlgili kaynaklar genellikle EndNote de kayıtlı olmadığı için bilgileriyle birlikte yerel kütüphaneye kaydedilmiştir.

Sağlık otoriteleri olan EMA, ICH, FDA ve TİTCK gibi kuruluşların resmi internet sitelerinde yer alan halka açık verilere ve kılavuzlara başvurulmuştur.

Ulusal ve uluslararası makaleler ile incelenen resmi internet siteleri dahil olmak üzere 179 adet kaynaktan yararlanılmasına karar verilmiştir.

Tez içinde kaynak eklenmesi için EndNote programından yararlanılmıştır. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzunda verilen kurala uygun olarak "Vancouver" kaynak gösterme biçimi kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

Dünyada yeni aşı üretimi ve toksisite değerlendirmesi konusunda belirlenen anahtar kelimeler kullanılarak, ulusal ve uluslararası veri tabanlarında zaman sınırlaması yapılmaksızın ağırlıklı olarak son 10 sene içerisinde yapılmış çalışmaların ve geçerliliğini sürdüren ulusal ve uluslararası kılavuzların taranması sonucunda aşağıdaki veriler toplanmıştır:

### 4.1. Aşı Güvenliğinin Değerlendirilmesi

Yeni geliştirilen aşılarda, insan kullanımına sunulmadan önce *in vitro*, *in vivo* ve *in silico* yöntemlerle tasarlanan prelinik çalışmalar yapılarak toksikolojik açıdan değerlendirilmeli ve güvenliliği ortaya konmalıdır. Biyoteknoloji ve aşı geliştirmedeki son gelişmeler, yeni adjuvanlar gibi yeni içerikler, güvenlik etki ve kalite kriterleri mevcut olmayabileceğinden bilimsel ve düzenleyici zorluklar sunmaktadır. Prelinik çalışmalarda aday aşının güvenlik, etki ve kalite değerlendirmesini mümkün kılan çalışmaların türü ve kapsamı bilime dayalı olarak seçilir ve klinik çalışmalar için uygun doz belirlenip bağışıklık tepkisi karakterize edilir (15, 52).

Aşıların etkinlik ve güvenilirlik düzeylerinin anlaşılabilmesi için ülkemizde ve dünyada çeşitli prelinik ve klinik çalışmalar yapılmaktadır. Hayvanlar üzerinde yapılan prelinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar olası toksisite potansiyelini ortaya koymakta ve klinik çalışmalar için yol göstermektedir (14, 15).

Ülkemizde aşı adaylarının klinik araştırmaları, üretim tesislerinin denetimleri ve ruhsatlandırılması ve piyasa arzı olmak üzere bütün konularda yetkili sağlık otoritesi TİTCK'dır (10).

Dünya çapında aday aşılarda toksisite değerlendirmesinde kullanılan temel standartlar WHO tarafından yayınlanmaktadır (15). Aşıların prelinik değerlendirmesine ilişkin kılavuz 1978'de hazırlanmış ve 2004'te revize hali kabul edilmiştir (90). Buna ek olarak ulusal düzenleyici otoriteler uluslararası standartlara uygun olmak koşuluyla ek çalışma standartları belirleyebilmektedir (15). Referans alınan diğer standartlar FDA, EMA ve ICH tarafından yayınlanan kılavuzlardır. Toksikite değerlendirme testleri GLP standartlarına uygun yapılmalıdır (10, 11).

Aşıların klinik öncesi değerlendirilmesine ilişkin düzenleyici ilk kılavuz 1997 yılında EMA tarafından, daha sonra klinik dışı çalışmalara ilişkin kılavuz 2005 yılında WHO tarafından yayınlanmıştır. Klinik dışı araştırmalara ilişkin kılavuz FDA ve EMA tarafından da tanınmıştır (10).

Aşıların klinik öncesi toksisite değerlendirmesi yapılırken referans alınan düzenleyici kılavuz örnekleri Tablo 4.1. 'de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Aşıların klinik öncesi toksisite değerlendirmesinde kullanılan temel düzenleyici kılavuzlar (91, 92).

Düzenleyici	Kılavuz	Yıl
<b>WHO</b>	Aşıların Klinik Dışı Değerlendirilmesine İlişkin Kılavuz	2005
<b>WHO</b>	Aşı Adjuvanlarının ve Adjuvanlı Aşıların Klinik Olmayan Değerlendirmesine İlişkin Kılavuz	2013
<b>EMA</b>	Aşıların Klinik Öncesi Farmakolojik ve Toksikolojik Testlerine İlişkin Kılavuz	1997
<b>EMA</b>	İnsanlarda Kullanımına Yönelik Aşı Adjuvanları Hakkında Kılavuz	2005
<b>FDA</b>	Endüstri Rehberi: Bulaşıcı Hastalık Endikasyonlarına Yönelik Koruyucu ve Terapötik Aşılar için Gelişimsel Toksikite Çalışmalarına İlişkin Kılavuz	2006
<b>SFDA Çin</b>	Önleyici Biyolojik Ürünlerde Klinik Öncesi Güvenlik Değerlendirmesinde Teknik İncelemenin Genel İlkeleri, GPT2-1	2005
<b>MHLW Japonya</b>	Bulaşıcı Hastalıkların Önlenmesine Yönelik Aşıların Klinik Olmayan Çalışmaları için Kılavuz	2010
<b>TİTCK</b>	Beşerî Aşıların Klinik Dışı Değerlendirilmesine İlişkin Kılavuz	2020

Preklinik toksisite çalışmaları yapılırken aşıların önemli bileşenlerinden olan adjuvanların toksikolojik olarak değerlendirilmesi oldukça önemlidir. WHO Biyolojik Standardizasyon Uzman Komitesi 64. Rapor Kılavuzuna göre adjuvanların olası toksisitesinin değerlendirilmesi için *in vivo*, *in vitro* preklinik araştırmalar ve klinik

çalışmalar yapılmalıdır. Hayvan modelleri ile ilgili sınırlamalar olduğunda *in vitro* çalışmaların yapılması uygun olabilir. Antijen sunan hücreler veya diğer bağışıklık hücreleri, adjuvanların doğrudan veya dolaylı etkilerini değerlendirmek ve izlemek için *in vivo* testler yaygın olarak kullanılmaktadır. *In vivo* çalışmalarda uygun tek bir türün kullanılması genellikle yeterlidir. Daha önce kullanılmamış bir adjuvanın tek başına toksikolojik değerlendirmesinin yapılması önerilmiştir. Preklinik çalışmalarda kullanılan adjuvan lot numaraları ile klinik çalışmalarda ilk kez kullanılacak adjuvan lot numaralı benzer olmalıdır. Bu mümkün olmadığında farklılıklar ayrıntılı olarak açıklanmalıdır (15, 49, 93).

Adjuvanların toksisitelerinin değerlendirilmesi hususunda genel olarak WHO, EMA ve FDA tavsiyelerinin uyumlu olduğunu söylemek mümkündür. WHO ve EMA tavsiyeleri arasındaki temel farklılık, çalışmalar için gerekli hayvan türünün sayısıdır. WHO testler için tek hayvan türünün yeterli olduğunu kabul ederken EMA bir kemirgen bir kemirgen olmayan olmak üzere iki hayvan türü üzerinde çalışma yapılması gerektiğini kabul etmektedir (50, 93).

Aşılarda bulunan adjuvanlara ilişkin EMA kılavuzuna göre kullanılması planlanan adjuvan üzerinde yapılacak olan testler adjuvan türüne göre belirlenir. Genellikle tek başına adjuvana yapılan değerlendirmeler lokal tolerans, anafilaksi, hipersensivite reaksiyonları, pirojenite, gelişimsel toksisite, genotoksisite, karsinojenite, sistemik toksisite üzerine olup antijen adjuvan kombinasyonu üzerine yapılan değerlendirmeler ise lokal tolerans, tekrarlı doz toksisitesi, immün cevabın karakterize edilmesi üzerinedir (50).

Klinik öncesi sonuçların değerlendirmelerini takiben klinik çalışmalar aşamasına geçilir. Preklinik çalışmalarda olduğu gibi referans alınan kılavuzlar, WHO, FDA ve EMA gibi sağlık otoriteleri tarafından yayınlanan kılavuzlardır. WHO, 2004 yılında aşıların klinik değerlendirmesine ilişkin kılavuz yayınlamış ve 2017 yılında güncellemiştir. FDA 1997 yılında kombinasyon aşıların klinik değerlendirmesine ilişkin kılavuz ve 2011 yılında küresel bulaşıcı hastalıklara karşı koruma sağlayan aşıların klinik değerlendirmesine ilişkin kılavuz yayınlamıştır. EMA ise 2006 yılında aşıların klinik değerlendirmesine ilişkin kılavuz yayınlamış ve Şubat 2023 yılında revizyon yapmıştır. Revize edilen kılavuz Ağustos 2023 itibarıyla geçerli olacaktır (94-98).

Ülkemizde aşuların klinik değerlendirmesine ilişkin bir kılavuz bulunmamaktadır. Aşular da dahil tüm ilaç ve biyolojik ürünlerin klinik değerlendirilmesinde TTCK Klinik Araştırmalar Daire Başkanlığınca hazırlanmış 13.04.2013 tarihli resm gazetede yayınlanan İlaç ve Biyolojik rnlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik referans alınmıştır. 27.05.2023 tarihi itibarıyla bu yönetmelik yürürlükten kaldırılmış ve Beşerî Tıbbi rnlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik yürürlüğe girmiştir (99, 100).

Dünya'da aşı ile ilgili süreçlerin takibini sağlayan çeşitli komisyon ve kontrol merkezleri bulunmaktadır. Avrupa Hastalık nleme ve Kontrol Merkezi (*European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC*), Avrupa komisyonu bunlara örnektir. ECDC'nin misyonu, bulaşıcı hastalıkların insan sağlığına yönelik mevcut ve ortaya çıkan tehditlerini belirlemek, değerlendirmek ve iletmektir. ECDC, EMA ve Avrupa Komisyonu iş birliği ile Avrupa Aşılama Bilgi Portalını (*European Vaccination Information Portal, EVP*) geliştirilmiştir (101). ABD için ulusal güvenlik izleme sistemi olan ve FDA ve Hastalık Kontrol Merkezi (*Disease Control Center, CDC*) gözetiminde alışan Aşı Olumsuz Olay Raporlama Sistemi (*Vaccine Adverse Event Reporting System, VAERS*), aşılamadan sonra gözlenen olumsuz olayları toplamakta ve analiz etmektedir (8, 102).

Dünya'da aday bir aşının toksikolojik açıdan değerlendirilmesi, insan kullanımına sunulduktan sonra izlenmesi gibi hususlarda takip edilen adımlar ve uygulamalar genel olarak benzerlik gösterse de bazı aşamalarda ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar aşı güvenliğinin değerlendirilmesi için yapılan prelinik ve klinik çalışmalar başlıkları altında açıklanmıştır. Küresel kılavuzlara uyum, güvenlik gereksinimlerinde bölgeler arası farklılıkları azaltmaktadır (10).

#### **4.1.1. Aşı Güvenliliğinin Değerlendirmesi İçin Yapılan Prelinik alışmalar**

Yeni bir aşı geliştirmedeki önemli aşamalardan biri, klinik öncesi güvenlik değerlendirmesi yapmaktır. Prelinik çalışmaların amacı, hayvanlarla yapılan *in vivo* alışmalar ya da *in vivo* alışmalara alternatif olan hücre ve doku kültürleri, biyomateryaller, organoid kültürü, basit organizmaların kullanılmasıyla yapılan çalışmalar ve *in silico* yöntemler ile yeni aşuların olası toksisitesini belirleyerek klinik

uygulama için güvenliği sağlamak, klinik çalışmalara dahil edilen bireylerin ve klinik kullanıcıların maruz kalacağı riskleri azaltmaktır (103, 104).

Aşıların prelinik toksisite çalışmaları, aşının eksipiyanlarının olası toksisitesini, kontaminantların veya formülasyon bileşenlerinin etkileşiminden kaynaklanan toksisiteye ek olarak bağışıklık tepkisinden kaynaklanan toksik etkileri değerlendirmek üzere tasarlanmalıdır (91).

- ***In vivo* Toksisite Testleri ve Uygulamalarında İzlenen Temel İlkeler**

Aday aşılar, insan kullanımına sunulmadan önce bir takım prelinik çalışmalar yapılarak belirli testlerden geçer. Olası toksisitenin değerlendirilmesi için *in vivo* hayvan testleri yapılmaktadır. Hayvanlar ile yapılan *in vivo* çalışmalar dünyadaki sağlık otoritelerinin benimsediği kurallara uygun olarak, insan sağlığına olan katkısının, hayvanların çektiği acıya ağır bastığı durumlarda yapılmalı ve çalışmalar mümkün olduğunda az sayıda hayvan kullanılacak şekilde planlanmalıdır (105).

Yeni üretilen bir aşının toksisite testlerinin yapılmasından önce amaçlanan klinik kullanım, hasta popülasyonu, uygulama yolu, formülasyon, doz seviyesi ve bağışıklama programı net bir şekilde belirlenmeli ve bu bilgiler ışığında çalışmalar planlanmalıdır. *In vivo* toksisite çalışmalarında amaçlanan klinik uygulama dozu ve yolu kullanılmalıdır. Aşılama için geleneksel uygulama yolları, kas içi, deri altı veya deri içi uygulamadır (106). Yapılan çalışmalarda geliştirilen aşının potansiyel toksik etkileri, hedef organ, doz, uygulama yolu, uygulama sıklığı ve toksik etkilerin geri dönüşümlü olup olmaması göz önünde bulundurularak değerlendirilmektedir (15). Klinik kullanımda aşının uygulanması için herhangi bir cihaz kullanılacaksa (örn. burun spreyi pompası), ölçek ve anatomik farklılıklara sebep olabileceğinden hayvan çalışmalarında da mümkün olduğunca aynı cihaz tercih edilmelidir. Bu sağlanamıyorsa benzer performans veren bir cihaz kullanılmalıdır (106).

- a. **Uygun Hayvan Modelinin Seçilmesi**

*In vivo* aşı çalışmalarında kullanılan hayvan modellerinde bağışıklama çalışmaları yapılmalı ve indüklenen bağışıklık tepkisi incelenmelidir (15). Bu çalışmalarda karşılaşılan zorluklardan biri araştırmanın kapsamına en uygun, insanlara benzer bağışıklık yanıtı verebilecek hayvan modelinin seçimidir (107). Uygun

olmayan türlerde yapılan toksisite çalışmaları yanıltıcı olabileceği için önerilmemektedir (108).

İdeal hayvan modeli aday aşırıya karşı insana benzer immün cevap oluşturur ve çalışılan patojene karşı duyarlıdır (15).

Çalışma için kullanılacak uygun hayvan aşağıda sıralanan noktalarda insanlara benzerlik göstermelidir (13).

- Bağışıklık sistemi organları gelişimi
- Antikorların mukozal yüzeyler boyunca taşınma şekli (yüzeysel IgA)
- Patojenin bulaş yolu
- Bağışıklık belleğin süresi
- Neonatal, adolosan ve yetişkin dönemi
- Pasif bağışıklığın plasenta ve süt yoluyla aktarımı

Aşının uygulama yolu da model seçimi için önemli bir kriterdir. Örneğin intranazal kullanılacak aşılar için tavşan ve köpekler daha idealdir (15).

Genel olarak, *in vivo* toksisitesi değerlendirme çalışmalarında kemirgenler (sıçanlar, fareler) veya kemirgen olmayan tavşanlar kullanılır. Bazı özel durumlarda primatlar kullanılır. Toksikite çalışmalarında grup, seçilen türe bağlıdır (14).

Yeni adjuvanları içeren aşuların prelinik toksisite değerlendirme testlerinde, EMA bir kemirgen ve bir kemirgen olmayan iki türün kullanılması gerektiğini kabul ederken WHO, özel bir durum olmadığı sürece tek türün yeterli olacağını kabul eder (12, 15). Aşuların türe özgü ya da suşa özgü farmakodinamik etkilerinin tam anlaşılabilmesi durumunda WHO, iki ya da daha fazla türün kullanılabilmesini de belirtir (10). Ülkemizde benimsenen beşerî aşuların klinik öncesi değerlendirilmesine ilişkin kılavuz WHO kılavuzu ile büyük ölçüde örtüşse de tür sayısı konusunda farklılık göstermektedir. Kılavuza göre tekrarlı doz toksisite çalışmaları, en az birisi kemirgen olmayan iki memeli türünde gerçekleştirilmelidir (92). İki memeli türünde tekrarlı doz toksisite çalışmalarının yapılması gerektiğini kabul eden tek kılavuz, ICH'ın M3(R2) kılavuzudur. Fakat bu kılavuz ilaçlar için geçerli olup aşularını kapsam dışı tutmuştur (10). Genellikle, kemirgenlerle yapılan çalışmalarda 10 hayvan/cinsiyet/grup kullanılır. Primatların kullanıldığı çalışmalarda kullanılan hayvan sayısının daha az olması beklenir (14). Doz başına kullanılan hayvan sayısı, toksisitenin saptanması üzerine doğrudan bir etkiye sahiptir. Küçük örneklem



büyüklüğü, toksik olayların doğru şekilde gözlemlenememesine yol açabilir. Genellikle her iki cinsiyet de kullanılmalı veya dışlanan grup olduğunda gerekçe gösterilmelidir (108). Kullanılan hayvanlar erişkin ve sağlıklı olmalıdır. Genellikle çalışmalarda kullanılmaya başlama yaşı yaklaşık olarak kemirgenler için 6-8 hafta, tavşanlar için ise 3-4 aydır (15).

Fareler, insanlara benzer bağışıklık sistemine sahip memeliler olmaları, küçük kafeslerde barınabilmeleri ve kobay, tavşan gibi diğer türlere göre daha az maliyetli olmaları nedeniyle aşı çalışmalarında en sık kullanılan türdür (13). Ayrıca fareler gen transferine dayalı toksisite çalışmaları (DNA aşıları, viral vektörler vb.) için de yaygın olarak tercih edilmektedir.

Tavşanlar antikor yanıtını uyarmak için tasarlanan aşı çalışmaları için idealdir ve tam insan dozu uygulanması için elverişli bir hayvan modelidir (52). Tavşanların kan hacmi, gerektiğinde tekrarlanan kan örneklemelerine izin vermesi avantajına sahiptir. Makak maymunu, kızamık aşının uygulanmasından sonra viremi geliştiren ve bu virüse maruz kaldığında kızamık benzeri bir hastalık geliştiren yaygın olarak kullanılan tek laboratuvar hayvanıdır. Gelincik, grip patofizyolojisi için en iyi hayvan modeli olarak ifade edilmektedir (106). Ayrıca gelincik, gastrit ve *Helicobacter felis* ile ilgili aşı çalışmaları için de tercih edilmektedir. İntrakütanoz ve topikal aşılar için mini domuzlar iyi bir model olarak kabul edilmektedir (13). *In vivo* çalışmalarda kullanılan farklı hayvan türlerinin avantaj ve dezavantajları Tablo 4.2. 'de verilmiştir (109).

**Tablo 4.2.** Aşı çalışmalarında kullanılan farklı hayvan türlerinin avantaj ve dezavantajları (109).

<b>Hayvan Türü</b>	<b>Avantajlar</b>	<b>Dezavantajlar</b>
<b>Fare</b>	Kafeslerde barındırılması kolay küçük hayvanlar olmaları. İnsanlara benzer bağışıklık sistemine sahip olmaları.	İnsanlardan farklı doku ve organa sahip olmaları (örneğin deri). Birçok enfeksiyöz ajana duyarlı olmamaları.
<b>Sıçan</b>	İnsanlara benzer bağışıklık sistemine sahip olmaları. Farelerden daha büyük oldukları için ameliyat için daha elverişli olmaları.	Farelerinkinden daha büyük kafesler gerektirmeleri.
<b>Kobay</b>	İnsanlara benzer bağışıklık ve solunum sistemine sahip olmaları.	Strese daha duyarlı bir tür olduklarından sonuçları etkileyebilmesi. Farelere nispeten daha büyük kafeslere ve daha deneyimli araştırmacılara ihtiyaç duyulması.
<b>Tavşan</b>	Kistik fibroz modeli için elverişli olmaları. Amelyata uygun olmaları.	Kafesteki diğer tavşanlarla sık kavga etmelerinden dolayı izolasyon süresinin uzaması ve veteriner müdahalesinin gerekmesi. Daha deneyimli araştırmacıya ihtiyaç duyulması.
<b>Domuz</b>	Biyolojik olarak insanlara benzemeleri (örn kalp ve deri). Transplantasyondan sonra immünolojik çalışmaların mümkün olması.	Çok büyük tesisler ve iyi eğitilmiş araştırmacılar gerekmesi. Maliyetli olması.
<b>Primatlar</b>	Biyolojik, anatomik ve fizyolojik olarak insanlara en çok benzeyen tür olmaları (deri hariç). Birçok bulaşıcı hastalık ve aşı değerlendirmesi için en uygun model olmaları (örn Covid-19).	Yalnızca alternatif model bulunmadığında kullanılmalıdır. Çok büyük tesisler ve iyi eğitilmiş araştırmacılar gerekmesi. Oldukça maliyetli olması Çalışmaların zaman alıcı olması.

Toksisite çalışmalarında hayvan kullanırken dikkat edilmesi gereken hususlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- Uygun sayıda hayvan kullanılmalıdır.
- Rahatsızlık sıkıntı ve ağrı en aza indirilmelidir.
- Uygun sedasyon analjezi ve anestezi yöntemleri kullanılmalıdır.
- Yeterli veteriner bakımı sağlanmalıdır.
- Taşıma, bakım ve toksisite çalışmaları uzman kişiler tarafından yapılmalıdır
- Gıda kısıtlamaları ve stres klinik patoloji verilerini etkiler ve kemirgenlerde kaçınılmalıdır.

kaçınılmalıdır.

- Herhangi bir hayvan türünde sık kan alımı (haftalık, aylık veya otopsi sırasında) için Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) yönergelerine uyulmalıdır.

- Her hayvandan haftalık veya aylık olarak alınan kan hacimleri klinik patoloji sonuçlarını etkilememelidir. Örneğin haftalık olarak fare, sıçan, köpek, maymun ve tavşanlardan alınan kan sırasıyla 0.075, 1, 50, 10 ve 10 mL'yi geçmemelidir (105, 110).

Bazı durumlarda uygun hayvan modeli mevcut olmayabilir. Hayvanları enfekte etmeyen bakteri ve virüs içeren canlı attenue aşılar, sadece insan ortalama eritrosit hemoglobinine (*Mean Corpuscular Hemoglobin*, MCH) bağlanabilen peptid aşılar ile yapılan çalışmalar bunlara örnektir. Bu durumlarda benzer bağışıklık tepkisi gösterecek bir model tasarlanmaktadır. Örneğin insan dentrik hücrelerinin cevabını taklit edebilmesi için antijen ya da virüs ile transfekte edilmiş fare dentrik hücreleri kullanılabilir (52). Bir diğer örnek de Dang humması aşısı için, dang virüsüne maruz kalma normal kemirgenlerde veya tavşanlarda enfeksiyona veya hastalığa neden olmazken, primatlarda viremi görülür fakat hastalık ortaya çıkmamaktadır.  $\alpha$ - ve  $\beta$ -interferon ile gama interferon reseptör genlerinden yoksun olan bir transgenik fare türünün dang virüsüne duyarlı olduğu kanıtlanmış ve bu model, dang humması aşısının geliştirilmesi için önerilmiştir (106). Sonuçların insanlara ekstrapolasyonunda zorluklar bulunmaktadır ve sonuçlar dikkatli şekilde değerlendirilmelidir. Transgenik hayvanlarla ve homolog proteinlerin kullanılmasıyla çalışmalar yapılabilir (52). Transgenik hayvan modellerinin veya homolog proteinlerin kullanılmasının mümkün olmadığı durumlarda, tek türde yapılan sınırlı toksisite çalışmaları ile potansiyel toksisite değerlendirilebilir. Ayrıca bazı çalışmalarda hayvanlarda belirli bir hastalık

modeli oluşturularak çalışılması gerekmektedir. Böyle durumlarda bilimsel gereklilik gözetilmelidir (108).

Hayvan seçiminden sonra hayvanın barınması, beslenmesi, taşınması ve bakımı ile ilgili bilgiler kaydedilmelidir (15). Prosedür olarak belirlenen ve hayvanlar üzerinde yapılan uygulamalar değiştirilmemelidir. Örneğin kan alma yeri olarak hayvanın kuyruğu belirtmişse ve bu prosedür otopsi gününde kontrol grubu için kullanılmışsa, kan alma yeri hiçbir zaman başka bir yerle (örn. ayak, göz veya kalp) değiştirilmemelidir (110).

Dünyanın farklı bölgelerinde 2009-2020 yılları arasında yapılan çalışmalara göre aşı çalışmalarında kullanılan hayvanlar ve bunların kullanım oranları Tablo 4.3.'de verilmiştir (111).

**Tablo 4.3.** Ükelere göre kullanılan hayvan türleri ve oranları (111).

Ülke	Hayvan Türü	Kullanım Oranı (%)
<b>Avrupa Birliği</b>	Fare	%60,79
	Kobay	%1,54
	Hamster	%0,14
	Tavşan	%3,75
	Kedi	%0,02
	Köpek	%0,15
	Maymun	%0,08
<b>Amerika Birleşik Devletleri</b>	Kobay	%22
	Hamster	%10,3
	Primat	%9,1
	Köpek	%7,6
	Kedi	%2,4
	Tavşan	%17,1
<b>Avustralya</b>	Fare	%7,30
	Kobay	%0,04
	Tavşan	%0,02
	Kedi	%0,01
	Köpek	%0,06
	Domuz	%0,39
<b>Kanada</b>	Fare	%30,50
	Kobay	%0,45
	Köpek	%0,27
	Kedi	%0,13
	Tavşan	%0,12
	Primat	%0,11
	Domuz	%0,72

**Tablo 4.3.(Devam) Ülkelere göre kullanılan hayvan türleri ve oranları (111).**

<b>Yeni Zelanda</b>	Sığır Fare Koyun Geyik Kuş Kedi	%41,16 %13,37 %18,69 %3,02 %3,82 %0,36
<b>Güney Kore</b>	Fare Kobay Tavşan Maymun Köpek	%73,5 %1,9 %0,9 %0,1 %0,4
<b>Japonya</b>	Fare Kobay Tavşan Köpek Maymun	%84,09 %1,75 %0,44 %0,08 %0,10
<b>Çin</b>	Fare Tavşan Köpek Maymun Domuz	%81,26 %15,07 %1,91 %0,06 %1,14
<b>İsrail</b>	Fare Kuş Tavşan Primat	%61,27 %5,09 %0,32 %0,01
<b>Türkiye</b>	Balık Sıçan Bıldırcın dışı kuşlar Fare	%36 %21 %14 %13

Genellikle çoğu ülkede çalışmalarda tercih edilen tür fareler olurken Yeni Zelanda 'da en çok sığırların ve ülkemizde balıkların kullanılması bir farklılık olarak görülmektedir (111). 2020 Hayvan Denekleri Merkezi Etik Kurulu istatistiklerine göre ülkemizde balıklar %37,01, sıçanlar %17,2 ve fareler %11,91 kullanılmıştır (112).

#### **b. Uygun Dozun Belirlenmesi**

Toksisite çalışmaları için ideal hayvan modeli seçimine ek olarak uygun dozun belirlenmesi bir diğer önemli noktadır. Letal dozun belirlenmesi gerekli değildir. Çalışmalarda klinik olarak amaçlanan en yüksek doz kullanılırken bazen bu doz tek enjeksiyonla uygulanabilecek miktar ile sınırlı olup hayvan refahı göz önünde bulundurulmalıdır (15). Tam insan dozunun uygulanmasıyla ilgili karşılaşılan zorluklar birkaç uygulama yerinin kullanılmasıyla kısmen aşılabılır (106). Uygulanan

doz sayısı da amaçlanan klinik kullanım sayısına eşit ya da bundan daha fazla olmalıdır (15).

Uygun hayvan modeli ve doz seçiminden sonra gerekli görülen toksisite test çalışmalarına geçilir. Aşıların olası toksisite değerlendirme çalışmalarında genellikle beş tür test yapılır;

- Tek ve/veya tekrarlı doz toksisite testleri
- Üreme ve gelişim toksisite testleri
- Genotoksisite ve Mutajenite testleri
- Karsinojenite testleri
- Güvenlilik farmakolojisi testleri (13).

### **I. Tek Doz Toksisite Testleri**

Klinikte kullanılması amaçlanan uygulama yolu ile yapılan tek doz çalışmaları, genellikle doz düzeyleri ile immünojenisite arasındaki ilişkiyi tanımlamak ve olası akut toksisitenin yalnızca mortalite, klinik belirtiler, vücut ağırlığı ve makroskopik inceleme gibi büyük etkilerini ölçmek için tasarlanmıştır (52). Tek doz toksisite testlerinden elde edilen sonuçlar, tekrarlı doz toksisite testleri için kullanılacak dozun belirlenmesinde kullanılabilir (108).

Bu çalışmalar genellikle kemirgenler üzerinde gerçekleştirilmekte olup EMA aşı kılavuzuna göre insanlara uygulanması amaçlanan ve yeterli güvenlik marjı sağlayan bir dozla en az bir hayvan türü üzerinde yapılmalıdır (3). İstenen veriler genelde tekrarlı doz toksisite çalışmalarından elde edilir (106). Bu veriler kabaca mortalite, morbidite, davranış değerlendirmesi, gıda tüketimi, vücut ağırlığı, vücut ısısı, enjeksiyon bölgesi değerlendirmesi, oftalmik muayene, biyokimya parametreleri (elektrolit dengesi, enzim, böbrek fonksiyonu vb.), hematoloji ve idrar analizleridir (13).

Genel olarak, bir tekrarlı doz toksisite çalışması mevcut olduğunda genellikle ayrı tek doz toksisite çalışmaları yapılmaz. Fakat bazı durumlarda yapılması önemli olabilmektedir. Örnek olarak birinci uygulama tarafından indüklenen bağışıklık tepkisinin, ikinci bir uygulamaya yönelik reaksiyonları önemli ölçüde değiştirdiği durumlar verilebilir. Antijenin veya aşı formülasyonunun başka bir bileşeninin önemli toksisitesinin olduğu ve antijenin güçlü farmakolojik etkiye sahip olduğu durumlarda

bu testlerin yapılması, toksisite değerlendirmesinde kritik bir unsur olabilmektedir (106).

Adenovirüs aşısının bağışıklık tepkisinde olduğu gibi, aşı ile indüklenen bir antikorun canlı viral vektörü nötralize etmesi ve dolayısıyla gen ekspresyonunun kısıtlanması gibi durumlarda WHO, tek doz toksisite testlerinin yapılmasını önermektedir. Ayrıca hayvanlarda indüklenen bağışıklık tepkisinin aşı formülasyonlarında bulunan türe özgü proteinlerden (örneğin adjuvan olarak kullanılan insan rekombinant sitokinleri) etkilenmesi durumunda da tek doz toksisite testleri yapılabilir (15). Bu konuda TİTCK ve WHO kılavuzu önerileri örtüşmektedir (92).

Tek doz toksisite çalışmaları, TİTCK kılavuzuna göre insanlarda önerilen doz ile ilgili olarak yeterli bir güvenlik aralığı sağlayan bir dozla en az bir hayvan türü ile gerçekleştirilmelidir. Ancak, bu çalışmada toksik bulgular görülür ise doz yanıt ilişkisi daha fazla karakterize edilmelidir. Bu veriler, önemli organların histopatolojisinin dâhil edilmesi koşuluyla, hayvan immünojenisite çalışmalarının veya güvenlik farmakolojisi çalışmalarının bir parçası olabilir. Bununla birlikte, akut toksisite verisi herhangi bir çalışmadan elde edildiğinde, tek doz toksisite çalışmalarının ayrıca yapılmasına gerek bulunmamaktadır. Aşılamanın akut etkileri tercihen tekrarlı doz toksisite çalışmalarında araştırılmalıdır (örn. ilk uygulama sonrası değerlendirme yapılır). Tek doz toksisite çalışmaları konusundan kabul edilen hususlar EMA ile uyumludur ve bu hususlar EMA kılavuzunda da yer almaktadır (12, 92).

Tek doz toksisite değerlendirmesi açısından Japonya'da 2010 yılında yayınlanmış Ulusal Bulaşıcı Hastalıkları Önleyici Aşılarla İlişkin Klinik Dışı Çalışmalar Rehberi, FDA ve EMA ile benzerdir (55).

## **II. Tekrarlı Doz Toksisite Testleri**

Aşıların çoğu tekrar dozlama gerektirdiğinden güvenliği desteklemek için genellikle GLP uyumlu tekrarlı doz toksisite testleri yapılır (52).

Tekrarlı doz toksisite testlerinde tam insan dozu uygulanması gerekmektedir. Tam insan dozunun uygulanamadığı durumlarda uygulanabilir maksimum doz kullanılmalıdır. Toksik etkilerin görüldüğü ve herhangi bir ters etkinin gözlenmediği

düzeylerin (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL) belirlenmesi gerektiği durumlarda çalışmaya daha düşük doz düzeyleri dahil edilebilmektedir (106).

Klinik araştırmada TİTCK kılavuzlarına göre kullanılması önerilen en yüksek doz değerlendirilmelidir. Bununla birlikte, bazen dozun tek bir enjeksiyonda hayvana uygulanabilecek toplam hacmi sınırlıdır ve hayvan refahı ile ilgili kurallara uyulmalıdır. Bu gibi durumlarda, toplam hacim aynı uygulama yolu kullanılarak birden fazla bölgeye uygulanabilir. Alternatif olarak, insan dozunu mg/kg olarak aşan ve hayvan modelinde bir bağışıklık tepkisini indükleyen bir doz da kullanılabilir. Bu gibi durumlarda, insan ve hayvan dozu arasındaki ekstrapolasyonda kullanılan güvenlik faktörü gerekçelendirilmelidir (92).

Testler aşının uygulanması amaçlanan grubu içermelidir. Testler adjuvanlar ve antijenler dahil edilerek tasarlanır (13). Testlerde amaçlanan klinik uygulama dozuna ek olarak amaçlanan uygulama yolu kullanılır. Ayrıca uygun hayvan modeli seçimi oldukça önemlidir (12).

İzlenen parametreler arasında günlük klinik belirtiler, vücut ağırlığı, gıda tüketimi, vücut ısısı, oftalmoloji, klinik patoloji (hematoloji ve serum klinik kimyası), organ ağırlıkları, histopatolojik inceleme ve otopsi yer alır (3). İnsanlar ve hayvanlar arasındaki potansiyel yanıt süresindeki farklılıklar hesaba katılmalıdır (12). Pratik nedenlerden ötürü hayvanlarda dozlamalar arasındaki süre kısa tutulmaktadır (3). Ardışık uygulamalar 2-3 hafta aralıkla yapılır ve amaçlanan klinik dozlama sayısına göre çalışma tasarlanarak hayvanlarda bağışıklığı yükseltecek destek dozlama yapılır. Yani toksisite çalışmalarında uygulama sayısı amaçlanan uygulama sayısından fazla olmalıdır. Bu genellikle n+1 kuralı olarak adlandırılır (106).

Japonya sağlık otoritesi, EMA ve FDA bu noktada hemfikirdir. Farklı olarak Japonya'da aşı mekanizmasının bilindiği ve vücut ağırlığına göre yeterli dozun kullanıldığı durumlarda hayvanlar ve insanlar arasındaki dozlama sıklığı eşit olabilir. Dozlamalar arasındaki süre WHO, EMA ve TİTCK'ya göre genellikle 2-3 haftadır. Ancak antikor yanıtın mekanizması tam bilinmiyorsa daha geniş bir zamanı kapsayan bir çalışma tasarımı daha uygun olabilir (55, 92).

Biyoteknolojik farmasötiklerin klinik öncesi değerlendirilmesine ilişkin ICH kılavuzuna göre rekombinant DNA protein aşıları için tasarlanan tekrarlı doz toksisite



testlerinde olası toksisitenin geri dönüşümlü olup olmadığının gözlenebilmesi için genellikle bir iyileşme süresi dahil edilir (108).

Tekrarlı doz toksisite çalışmalarında kullanılacak tür sayısı ile ilgili düzenleyici otoritelerin arasında bazı farklılıklar bulunmaktadır. WHO bu çalışmalar için tek hayvan türünün yeterli olduğunu belirtir ve EMA da bunu destekler. TİTCK yaklaşımı bu hususta farklı olup tekrarlı doz toksisite çalışmalarının en az biri kemirgen olmayan iki memeli türde yapılması gerektiğini belirtir (10, 12, 15, 92).

Lokal tolerans testleri WHO'ya göre tek başına bir çalışma olarak yapılacağı gibi tekrarlı doz toksisite testleri kapsamında da yapılabilir. Kas içi uygulanan aşılarda lokal toksisitesini test etmek için yeterli kas kütlelerine sahip hayvanlar kullanılmalıdır. Bu testlerle aşının uygulanmasından sonra temas bölgesindeki tolerans değerlendirilir (15). Histopatolojik inceleme ve genel gözlem ile enjeksiyon bölgesinde görülen reaksiyonlar incelenir. Gözlenen tipik bulgular, hastalığın ciddiyetine bağlı olarak doku reaksiyonları, lokal reaksiyonlar, ağrı, kızarıklık, şişlik, granülom oluşumu, apse, nekroz ve bölgesel lenfadenopati (106). Enjeksiyon bölgesine ek olarak nazal ve oral uygulanan aşılarda için de mukoza üzerinde lokal tolerans testleri yapılır (52).

Ülkemizde referans alınan TİTCK kılavuzu bu konuda WHO kılavuzu ile uyumlu olmakla birlikte farklı olarak lokal toksisite testlerinin tekrarlı doz toksisite testlerinden bağımsız olarak tek başına yapılmasını tavsiye eder (92). Bu çalışmalar için uygun model olarak genellikle tavşanlar kabul edilir (106).

Klinik kullanımda birden fazla doz gerektirecek aşılarda yanı sıra tek sefer uygulanacak aşılarda için de tekrarlı doz toksisite testlerinin yapılması EMA'ya göre uygundur ve tekrarlı doz toksisite çalışmaları güvenlik farmakolojisi çalışmalarıyla birleştirilebilir (12).

### **III. Üreme ve Gelişimsel Toksikite Testleri**

Çocuk doğurma çağındaki kadınlarda kullanılması amaçlanan aşılarda için gelişimsel toksisite testi yapılmasını öneren aşılarda prelinik farmakolojik ve toksikolojik testlerine ilişkin bir kılavuz, 1997 yılında EMA tarafından yayınlamıştır. Kılavuzda çalışma tasarımları hakkında herhangi bir rehberlik verilmediğinden aşılarda klinik öncesi üreme ve gelişimsel toksisite değerlendirmesine ilişkin ilk teknik kılavuz, 2006 yılında FDA'ın CBER Aşılarda ve İlgili Ürünler Uygulamaları Bölümü

tarafından yayınlanmıştır (113). 2020 yılında da ICH, üreme ve gelişimsel toksisite testlerine ilişkin bir kılavuzun revize edilmiş halini yayınlamıştır (114).

Gelişimsel toksisite testlerinin gerekliliğine, FDA kılavuzuna göre aşının özellikleri ve hedef popülasyon göz önünde bulundurularak vaka bazında karar verilir ve yapılması tavsiye edilir. Testlerde potansiyel risklerin öngörülmesinde bazı sınırlamalar olabilir. Hayvanlarda gelişimsel toksik etki görülmemesi insanlarda görülmeyeceği anlamına gelmez (115).

Koruyucu bir aşı için üreme toksisitesi değerlendirmeleri gelişmekte olan embriyo, fetüs veya yeni doğan üzerinde potansiyel toksik etkilerden dolayı genellikle doğum öncesi ve doğum sonrası gelişim çalışmaları ile sınırlıdır (15). Üreme işlevi ile ilgili testler genellikle gerekli değildir. Histopatolojik çalışmalarda üreme organlarının büyüklüğü kaydedilir (12). Fakat EMA, yeni bir adjuvanın kullanılması durumunda üreme toksisitesi testlerinin yapılmasını tavsiye eder (50). FDA de EMA ile paralellik gösterir ve yeni adjuvanlar kullanılacaksa üreme ve gelişimsel toksisite testlerinin yapılması gereklidir (94).

Gelişimsel toksisite testlerinin yapılmasını genellikle gerekli görmeyen WHO kılavuzu, bu testlerin çocukluk dönemi aşuları için yapılmasını uygun kabul eder. Fakat hedef aşı popülasyonu hamile kadınları ve çocuk doğurma potansiyeli olan kadınları kapsıyor ise üretici tarafından gelişimsel toksisite testlerinin yapılmasının gerekli olmadığını gösteren bilimsel ve klinik olarak sağlam kanıtlar gösterilmediği sürece bu testler yapılmalıdır (15). Ayrıca, WHO'ya göre, erkek üreme toksisitesi çalışmaları için özel bir muafiyet bulunmaz ve değerlendirme gerekliliğine vaka bazında karar verilir. Aşıların erkek fertilitesi üzerindeki olası etkilerinin değerlendirilme gerekliliği, uygulama sıklığına, Faz III'te ve piyasaya sunulduğunda maruz kalacak erkeklerin sayısına ve yaşına ayrıca antijenin erkek üreme dokularında eksprese edilip edilmediğine bağlıdır. Bunun yanı sıra FDA kılavuzuna göre aşıların erkek fertilitesi üzerine etkisinin değerlendirilmesi normalde gerekli değildir (91).

Embriyo/fetal ve perinatal toksisite testlerinin genellikle yapılmasına gerek olmadığı konusunda EMA da WHO kılavuzunu destekler ve bazı aşıların hamile kadınlarda malformasyonlara sebep olma ihtimalinden dolayı bu testlerin doğurganlık çağında ve hamile kadınların hedef popülasyon olduğunda yapılmasını tavsiye eder (12). Antikorların pasif olarak taşınıp yeni doğanda bulaşıcı hastalığa karşı koruma

amacıyla anne bağışıklamasında kullanılacak aşılar için de bu testler yapılmalıdır. (13).

Bu testler ile indüklenen antikorun düzeyleri ve fetal kan ya da kordon ile embriyo veya fetüse geçişinin olup olmaması doğrulanmalıdır (15). Testlerde kullanılacak tür seçimi aşının immünojenitesine, antikorun plasentaya geçme hızı ve oranına bağlıdır. Örneğin sıçanlarda ve farelerde antikorların %90'ı süte geçer. Bununla birlikte, tavşanlarda antikor transferinin çoğunluğu plasenta ile gerçekleşir (13).

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre yapılan testlerde amaçlanan klinik uygulama yolu ve mümkünse maksimum insan dozu kullanılmalıdır. Maksimum insan dozu kullanılamıyorsa tam insan dozu kullanılır (15). TİTCK kılavuzunda yer alan üreme ve gelişimsel toksisite testlerinde kullanılacak doz bilgisine ilişkin tavsiyeler de WHO kılavuzu ile örtüşmektedir (92). 1994 yılında düzenlenen ICH kılavuzuna göre aşıları test ederken, bağışıklık reaksiyonları genellikle antijenin plazma konsantrasyonuna göre klasik bir doz-yanıt ilişkisi göstermediğinden, doz seviyelerini hayvanın boyutuna göre ölçeklendirmek mantıklı değildir. Bu nedenle, mümkün olduğunda, vücut ağırlığına bakılmaksızın hayvana tam bir insan dozu verilmelidir (116). ICH'nin 2020 yılında yayımladığı kılavuza göre de maksimum insan dozu hayvan ağırlığına bakılmaksızın uygulanabilir fakat bu mümkün değilse mg/kg bazında insan dozunu aşan bir doz kullanılmalıdır. EMA kılavuzuna göre maksimum insan dozunun kullanılmama sebepleri açıklanmalıdır (örn. uygulanabilir total hacim sınırlamaları, lokal ya da sistemik toksisiteye sebep olan doz limiti ) (114).

Aşının potansiyel toksik etkilerinin değerlendirilebilmesi için hayvanlara organogenez döneminde uygulama yapılır. WHO kılavuzuna göre nispeten kısa gebelik nedeniyle kullanılan çoğu hayvan modelinde, embriyo veya fetüsün maksimum aşı kaynaklı bağışıklık tepkisi maruziyetini sağlamak için çiftleşme öncesi aşı uygulanır. Çalışmalar, test gruplarının alt gruplara ayrılması şeklinde tasarlanır. Hayvanların yarısı sezaryen ile doğurtulur diğer yarısı ise normal doğurtulur (15). Bu hususlarda TİTCK kılavuzu ve EMA Kılavuzu, WHO kılavuzuna paralellik gösterir (92, 113).

Ayrıca yavruların doğum sonrası takibinin bir süre daha yapılması önerilir ve doğumdan süttten kesmeye kadar olan süre büyümenin normalliği, vücut ağırlığı artışı,

emme aktivitesinin değerlendirilmesi için çalışma tasarımına dahil edilir (15). Bu süre genellikle 6-8 haftadır (13).

Embriyonik, fetal ve doğum sonrası erken dönemler boyunca maternal antikör titrelerini optimize etmek için her aşı için özel olarak hazırlanmış bir aşılama rejimi kullanılarak tek bir doz seviyesi değerlendirilir (116).

Üreme ve gelişimsel toksisite testleri FDA kılavuzuna göre, Faz III çalışmaları ile paralel yapılırken EMA ve Japonya'ya göre çalışma zamanına ilişkin belli bir politika olmayıp Faz III çalışmalarından önce tamamlanması gerekir (55).

Ülkemizde üreme ve gelişimsel toksisite testlerine ilişkin izlenecek adımlar TİTCK kılavuzunda açıklanmış olup bu testlerin yapılmasında ICH' nin üreme ve gelişimsel toksisite testlerine ilişkin kılavuzunun referans alınabileceği bildirilmiştir (92).

#### **IV. Genotoksisite ve Mutajenite Testleri**

Genellikle WHO kılavuzuna göre nihai aşı için genotoksisite çalışmalarının yapılmasına gerek yoktur. Fakat yeni adjuvan ve bileşenler için gerekli olabilir (15). Primer DNA hasarı, kromozom aberasyonları ve mutasyonlara sebep olma potansiyeline sahip sentetik adjuvanların kullanılması buna örnektir (13). Yapılması gerektiğinde ise kromazal hasar ve mutasyonların anlaşılması için *in vitro* çalışmalar yapılmalıdır (15). Yapılan mutajenite testlerine *in vivo* kemirgen mikronükleus testi, *in vitro* kromozom testleri, Comet testi ve Ames testi örnek verilebilir (52).

Genotoksisite ve mutajenite testlerinin gerekliliği konusunda EMA, FDA, TİTCK ve Japonya sağlık otoritesi tavsiyeleri, WHO kılavuzu tavsiyeleri ile uyumluluk göstermektedir (55, 92).

#### **V. Karsinojenite Testleri**

Nihai aşı için genotoksisite testlerinde olduğu gibi WHO kılavuzuna göre, karsinojenite testlerinin yapılmasına da gerek yoktur. Aynı şekilde yeni adjuvan ve bileşenler için gerekli olabilir (15). EMA, FDA, TİTCK ve Japonya WHO kılavuzu tavsiyeleri ile uyumluluk göstermektedir (55, 92). Bunun sebebi adjuvanların düşük dozlarda kullanılmasından dolayı tümör oluşturma riskinin düşük olarak değerlendirilmesidir (13).

Karsinogenisite testleri yapılırken TİTCK kılavuzunda “ICH S1(A): The need for carcinogenicity studies of pharmaceuticals”, “ICH S1B: Carcinogenicity: testing for carcinogenicity of pharmaceuticals” ve “ICH S1C (R2) Dose selection for carcinogenicity studies of pharmaceuticals” kılavuzlarının referans alınabileceği belirtilmiş olup bunlar doğrudan aşılarla yönelik karsinogenisite testlerine ilişkin kılavuzlar değildir (92).

## VI. Güvenlilik Farmakolojisi Testleri

Sekonder farmakodinamik çalışmaların bir diğer ismi olan güvenlilik farmakolojisi çalışmalarının amacı, aday aşının hayati fonksiyonlar üzerindeki etkilerini araştırmaktır. WHO kılavuzuna göre eğer prelinik ve klinik çalışmalardan elde edilen bilgiler aşının bağışıklık sistemi dışında fizyolojik fonksiyonları etkilediğini (örn. sinir sistemi, solunum, kardiyovasküler ve renal fonksiyonlar) gösteriyorsa, güvenlilik farmakolojisi çalışmaları toksisite değerlendirmesine dahil edilmelidir. Ayrıca aşı bileşimine girecek yeni bir adjuvanın doz optimizasyonları için güvenlilik farmakolojisi testleri yapılabilir (15, 49, 93). Ülkemizde ise güvenlilik farmakolojisi çalışmaları toksikoloji çalışmalarından bağımsız olarak yapılmaktadır (92). Güvenlilik farmakolojisi çalışmaları, olumsuz etkilerin gözlenmesiyle ilişkili olarak aşının doz-yanıt ilişkisini tanımlayacak şekilde tasarlanmalıdır (117).

Uluslararası Uyumlaştırma Konseyi 2000 yılında güvenlilik farmakolojisi çalışmaları ile ilgili bir kılavuz yayınlamış olup bu kılavuz doğrudan aşılarla yönelik değildir. ICH resmi internet sitesine göre EMA ve FDA gibi otoriteler bu kılavuzu kabul etmiştir. Brezilya, Singapur, Kanada, Kore, Japonya, Çin, İsviçre kabul eden ülkeler olup Türkiye bunun dışındadır (118). Buna rağmen TİTCK kılavuzunda güvenlilik farmakolojisi testleri yapılırken bu kılavuzun referans alınabileceği bildirilmiştir. Türkiye'nin ICH'nin ilgili kılavuzuna uyum sağlamasıyla ilgili ifadeler çelişkilidir (92). Bu kılavuza göre *in vivo*, *ex vivo* ve *in vitro* test sistemleri olarak kullanılabilir. *Ex vivo* ve *in vitro* sistemler, bunlarla sınırlı olmamak üzere şunları içerebilir: izole edilmiş organlar ve dokular, hücre kültürleri, hücre parçaları, hücre altı organeller, reseptörler, iyon kanalları, taşıyıcılar ve enzimler. *In vivo* çalışmalarında anestezi almamış hayvanlar kullanılır (114).

Japon yönergeleri, WHO kılavuzundan farklı olarak güvenlilik farmakolojisi uç noktalarının değerlendirilmesini zorunlu kılmıştır (119).

## VII. Anormal Toksisite Testleri

*In vivo* toksisite testlerinde bazı noktalarda ayrımlar olsa da genel olarak ICH, WHO, EMA ve FDA gibi sağlık otoritelerinin birbiriyle paralel kılavuzlar yayınladıklarını söylemek mümkündür. TİTCK kılavuzunda da bu kılavuzlar referans alınmıştır. Küresel kılavuzlara uyum, klinik olmayan güvenlik gereksinimlerinde bölgeler arası farklılıkları azaltmaktadır. Yine de bazı uygulamalar ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir (10, 55).

Anormal toksisite testlerinin gerekliliği konusunda farklı yaklaşımların olması buna örnektir. Anormal Toksisite Testi (ATT), seri salım testi için kullanılan bir kalite kontrol testidir. Amaç, her bir aşı partisinin herhangi bir kontaminasyon ihtiva edip etmediğini değerlendirmektir (120).

Dünya sağlık örgütünün 1979 yılında yayınladığı Biyolojik Standardizasyon Üzerine Uzman Komitesi 30. Rapor Kılavuzuna göre ATT gereklidir ve basitçe şu şekilde yapılır: Kobaylar veya uygun hayvanlara 5 ml aşı intraperitoneal olarak enjekte edilir. Hayvanlar 7-12 gün gözlemlenir. Eğer anormal bir belirti yoksa ürün ATT'yi geçer. Güvenilirlik değerlendirmesi için en sık kullanılan parametreler, ölüm oranı ve anormal vücut ağırlığı değişikliklerdir (121).

Anormal toksisite testlerinin gerekliliği yıllardır tartışılmakta ve farklı ülkelerde güncellemeler devam etmektedir (120). ATT'nin spesifik, güvenilir ve tekrarlanabilir olmaması bu testlerin gerekli olmadığını düşündürmüştür ayrıca hayvan refahı için de bu testlerin yapılmaması gerektiği ileri sürülmüştür (122).

Avrupa İlaç Endüstrileri ve Dernekleri Federasyonu (EFPIA)'na göre yeni geliştirilen aşılarda ve beşeri tıbbi ürünlerin, GLP uygulamalarına göre uygun şartlarda üretilmeleri ve gerekli kalite kontrolden geçmeleri ATT'nin gereksizliğini desteklemektedir (123). Bu sebeple FDA, ATT'yi 2015 yılında kaldırmıştır. 2019 yılında Avrupa Farmakopesinden anormal toksisite testinin tamamen kaldırılması yürürlüğe girmiştir. 80'den fazla monograftan anormal toksisite testi çıkarılmıştır (120, 124).

Uluslararası Biyolojik Standardizasyon İttifakı (*International Alliance for Biological Standardization, IABS*) ve Hayvan Testlerine Alternatif Yaklaşımlar için Avrupa Ortaklığı (*European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing EPAA*), 2005 yılında anormal toksisite testinin gerekliliğinin tartışıldığı uluslararası konferanslar düzenlemiş ve ATT'nin kılavuzlardan çıkarılması yönünde talep ile birlikte WHO'nun ATT hakkındaki tavsiyeleri yeniden şekillenmeye başlamıştır (124). WHO'nun 2018 yılında yayınladığı Biyolojik Standardizasyon Üzerine Uzman Komitesi 69. Rapor Kılavuzuna göre bu testlerin gerekli olmadığı kabul edilmiştir (125).

Hayvansız Güvenlik Değerlendirmesi İş birliği (*Animal Free Safety Assessment Collaboration, AFSA*), Uluslararası İnsani Toplum Kuruluşu (*The Humane Society International, HSI*), EFPIA ve Uluslararası ittifak iş birliğiyle 14 Ekim 2021'de, aşılar ve biyolojik maddeler için Anormal Toksikite Testinin Küresel Olarak Silinmesini Hızlandırma çalıştayı organize edilmiştir. Çalıştayda çeşitli ülkelerden katılımcılar yer almış ve bu ülkelerin ATT'nin kaldırılmasına yönelik bakış açıları görüşülmüştür (120).

Mevcut durumda ABD, Kanada, Tayland ve Avrupa ülkeleri ATT'nin gerekli olmadığına karar vermiştir. Arjantin, Brezilya, Güney Kore ve Japonya'da ATT kısmen gerekli olmakla birlikte Rusya, Çin ve Endonezya 'da ATT gereklidir. Ayrıca ATT Hindistan'da insan kullanımı için geliştirilen aşılara yönelik çoğu monograftan silinmiştir Güney Afrika'da da ATT'nin yapılması durdurulmuştur (120, 126).

- ***In Vivo* Çalışmalara Alternatif Yaklaşımlar ve 3R Prensipleri**

Hayvanların bilimsel deneyler sırasında yaşadıkları acı, sıkıntı ve ölümler uzun süredir tartışılan bir konudur. Hayvanların etik dışı kullanımı üzerinde kontrol sağlamak ve deneyler sırasında hayvanlara verilen acıyı en aza indirmek için çeşitli kanunlar ve yasalar çıkarılmıştır. Örneğin, 1824 yılında Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals tarafından hayvan hakları örgütü kurulmuş, 1876'da İngiltere'de hayvanlara acı veren uygulamaların yapılmasını önlenmesi için bir yasa oluşturulmuştur (127).

William Russell ve Rex Burch 1959'da hayvan refahını en üst düzeye çıkarmak için bir rehber yayınlamıştır. Daha sonra rehberde bulunan “İnsani teknikleri hayvan

araştırmalarında uygulama” kavramı, 3 R’nin temel ilkeleri olarak tanımlanmıştır. Bu ilkeler Değiştirme (Replace), Azaltma (Reduce) ve İyileştirme (Refine). Bunu takip eden 1960, 1963 ve 1966 yıllarında Hindistan, Fransa ve ABD’de sırasıyla hayvan refahı için yasalar çıkarılmıştır (103, 127).

İskandinav ülkelerinde 1970’lerin sonlarına doğru *in vitro* yöntemlerin kullanılması başlamış olup 1983 yılında uluslararası bir proje başlatılmış ve insanlarda potansiyel toksisiteyi tahmin etmek için *in vitro* yöntemlerin kullanılabileceği ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. 1989 yılında Almanya’da Hayvan Deneyleeri için Yerine Koyma ve Tamamlayıcı Yöntemlerin Kaydedilme ve Değerlendirilme Merkez Ofisi (*Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch*, ZEBET) kurulmuştur. Almaya, Hindistan, İsviçre, Hollanda ve ABD’de 2002 yılında LD50 testine odaklanmış ve alternatif yaklaşımlara yoğunlaşmıştır (128).

İtalya’nın Ispra kentindeki Ortak Araştırma Merkezi (*Joint Research Centre*, JRC)’nde 1993 yılında, Avrupa Alternatif Yöntemleri Doğrulama Merkezi (*The European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM) kurulmuştur. Çok merkezli validasyon çalışmalarını kolaylaştıran Avrupa İlaç ve Sağlık Hizmetleri Kalite Müdürlüğü (*European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare*, EDQM)’nün Biyolojik Standardizasyon Programı ve ECVAM referans laboratuvarları olarak görev yapmakla birlikte Avrupa ve uluslararası araştırma girişimlerinde iş birliği yapmak, alternatif yöntemlerin ve 3R’lerin teşviki amacıyla faaliyetlerine devam etmektedir (129-131).

Amerika Birleşik Devletleri’nde 1995 yılında, Alternatif Yöntemlerin Validasyonuna İlişkin Kurumlar Arası Koordinasyon Komitesi (*The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM) kurulmuştur. Bu komite ile ABD’de hayvan kullanımına alternatif uygulamalara yönelmiş ve 3R prensipleri benimsenmiştir. Çin’de diğer ülkelere nispeten, hayvan deneyleerine alternatif yaklaşımlar, 3R prensipleri ve hayvan refahı kavramlarının çok daha geç dönemlerde gündem olduğunu söylemek mümkündür. Brezilya’da 3R prensipleri kapsamında *in vitro* yöntemler 2003’ten beri kullanılmakta ve Çin’de olduğu gibi 3R kavramı yeni sayılmaktadır (128).



Japon Alternatif Yöntemlerin Validasyon Merkezi (*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*, JaCVAM) 2005 yılında kurulmuş ve 3R prensiplerinin uygulanması amaçlanmıştır (130).

Sırasıyla 2010, 2013 ve 2017 yıllarında Güney Kore Alternatif Yöntemlerin Doğrulanma Merkezi (*The South Korean Centre for the Validation of Alternative Methods*, KoCVAM), Brezilya Alternatif Yöntemlerin Doğrulanma Merkezi (BraCVAM) ve Kanada Hayvan Yöntemlerine Alternatifler Merkezi (*Canadian Centre for Alternatives to Animal Methods*, CCAAM) kurulmuş, buna ek olarak Uluslararası Alternatif İşbirliği aracılığıyla farklı ülkelerdeki düzenleyici otoritelerin 3R prensiplerini uygulamak amacıyla kurduğu komiteler cesaretlendirilmiştir (128).

Günümüzde dünyanın her yerinde, 3R'ler, araştırmalarda kullanılan hayvanları koruyan Avrupa Birliği mevzuatı olan 2010/63/EU Direktifi gibi, hayvanların bilimsel amaçlarla kullanılmasını düzenleyen mevzuatlara dahil edilmiştir. ICH, Hayvanlar Üzerinde Deney Kontrol ve Denetleme Amaçlı Komite (*Committee for the Purpose of Control And Supervision of Experiments on Animals*, CPCSEA), Ulusal Sağlık Enstitüsü (*National Institutes of Health*, NIH) ve Ekonomik İş birliği ve Kalkınma Örgütü (*Organisation for Economic Corperation and Development*, OECD) hayvanların barınma, üreme, beslenme, nakliye ve esas olarak bilimsel deneylerde kullanımları için yönergeler sağlar (103, 127).

Hayvan deneyleri yerine alternatifleri kabul eden 3R kavramı, gereksiz ve aşırı sayıda hayvan kullanılmasını, acı veren ve iyileştirilemeyen şiddetli uzun süreli ağrı içeren uygulamaları reddeden çok sayıda bilimsel yayın, ağ ve organizasyonların da etkisiyle giderek daha önemli hale gelmiştir. Bu nedenle, Hayvan Etik Kurulları, hayvanlarla çalışmayı amaçlayan araştırmacılara, 3R ilkelerine uymaları ve daha iyi hayvan refahı için sunulan protokollerin kalitesini iyileştirmeleri veya gerekirse yetersiz gerekçelendirme durumunda bu protokolleri reddetmeleri konusunda uygun şekilde tavsiyede bulunma sorumluluğunu paylaşır (103).

Hayvanların etik kullanımının temeli olarak kabul edilmiş olan 3R prensiplerinin, uygulanması konusunda titizlik gösterilmesi gerektiğini şiddetle tavsiye eden WHO ve EMA, *in silico* ve *in vitro* yöntemlerin kullanımını teşvik etmiştir (98, 111). Avrupa Birliği (AB) ülkeleri, ABD'nin bazı eyaletleri, Kanada ve Güney Kore de dahil olmak üzere birçok ülkenin, deney hayvanları üzerinde test

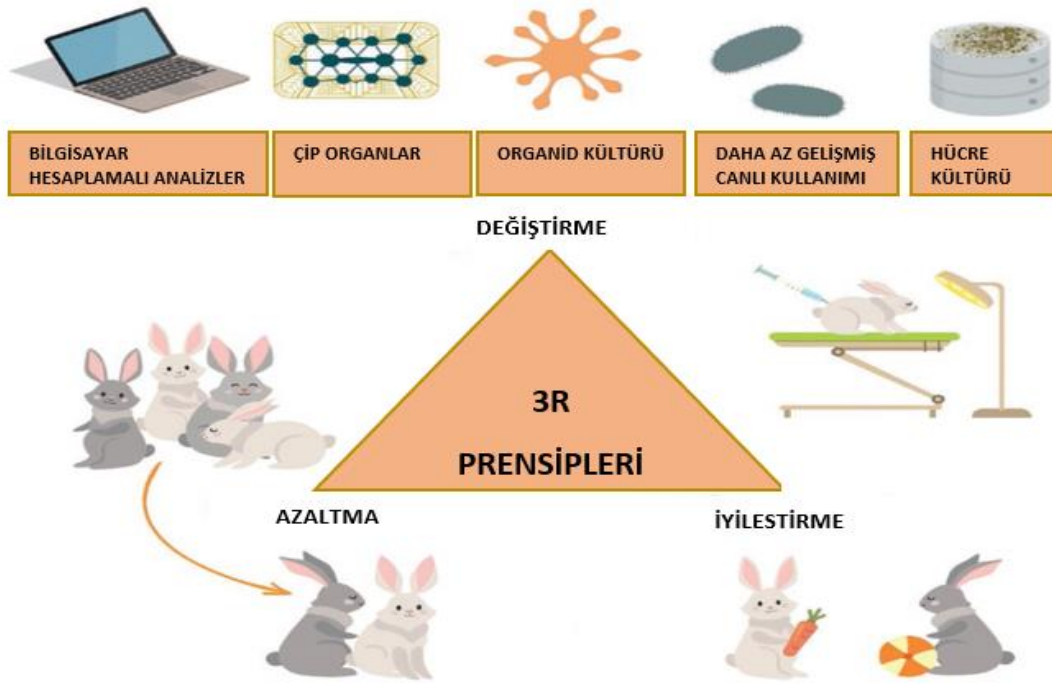
edilmiş kozmetiklerin ve içeriklerinin satışını resmi olarak yasaklaması 3R prensiplerine uyumun göstergesi olarak kabul edilebilir (111).

Ülkemizde de deney hayvanları ile yürütülecek aşı toksisitesi değerlendirme çalışmalarının, 3R ilkeleri göz önünde bulundurularak planlanması beklenmektedir (92).

Ayrıca 3R kuralına bir güncelleme olarak, deney hayvanlarına karşı sorumluluk (Responsibility) 4R ve bazı kesimlerde karşımıza çıkan saygı (Respect) olarak 5R kuralı da eklenmiştir. "4R" ilkesi, Chicago'da bulunan ABD Uluslararası Etik Araştırma Vakfı'nın katkılarıyla 3R prensiplerine sorumluluk ilkesinin de eklenmesiyle gündeme gelmiş olup araştırma faaliyetlerinde etik sorunların ortadan kaldırılmasını sağlayabilecek azaltma (*reduction*), değiştirme (*replacement*), iyileştirme (*refinement*) ve sorumluluk (*responsibility*) ilkelerine dayanmaktadır (132). 4. ilke olan sorumluluk, laboratuvar hayvanlarını bir değer olarak görüp onlara karşı sorumlulukların bilmesi ve hayvan etiği bilincinin geliştirilerek bireysel sorumluluğun artırılmasını ifade etmektedir (133).

### **1. Yer Değiştirme**

Avrupa'nın 2010/63/EU Direktifine göre "Bir hayvanın kullanılmasını gerektirmeyen, aranan sonucu elde etmek için bilimsel olarak tatmin edici başka bir yöntem makul ve uygulanabilir bir şekilde mevcutsa, hayvan deneyi gerçekleştirilmeyecektir." (103, 134).



Şekil 4.1. 3R Prensiplerinin şematik gösterimi (103).

Aşılarda, kalite ve güvenlik testleri için hayvan testlerine alternatif yöntemlerin geliştirilmesinde önemli bir ivme kazanılmış olup, Şekil 4.1.'de verilen bu alternatif yöntemler Değişirme, İyileştirme ve Azaltma (3R'ler) prensiplerinin uygulamasına imkân sağlamaktadır. (135).

Hayvanlar ile yapılan çalışmaların yerini etik nedenlerden dolayı *in vitro in silico* çalışmalar almaktadır. *In vivo* çalışmaların bazı dezavantajları da alternatif çalışmaları cazip kılmaktadır (127).

*In vivo* çalışmaların dezavantajlar aşağıdaki gibidir.

- Hayvanlara acı ve sıkıntı veren uygulamaların olması ve etik kaygıların varlığı
- Biyolojik süreçlerin karmaşık olması ve çevresel faktörlerin sürekli etkisine maruz kalması
- Hayvan vücudunda temel süreçlerin ve homeostazın değişmesi durumunda ortaya çıkan patolojileri anlamak için kontrollü ve tekrarlanabilir incelemelerin gerekmesi
- *In vitro* olarak pek çok şey incelenebilirken, memeli organizmanın entegre doğasının, canlı hayvanlarda yürütülecek özel çalışmaları gerektirmesi

- Tecrübeli insan gücü gerektirmesi
  - Zaman alıcı protokollerin olması
  - Maliyetli olması (103, 127).
- In vitro* çalışmaların avantajları aşağıdaki gibidir.
- Uygulanması kolaydır ve hızlı sonuç alınır
  - Daha az insan gücü gerektirir
  - Maliyet etkinliği gibi avantajları bulunmaktadır
  - İnsan ve hayvanlardan izole edilmiş doku ve hücreler kullanılarak, hedef organ /doku /hücrede oluşacak etki ve bu etkinin mekanizması aydınlatılabilir.
  - Kontrollü test koşulları oluşturulabilir (127, 130).

Hayvan kullanımına gerek kalmamasının yanı sıra zaman ve maliyet etkin *in vitro* çalışmaların da bazı dezavantajları bulunmaktadır ve bunlar aşağıda sıralanmıştır.

- Test edilen adjuvan ya da bileşenin farmakokinetik özellikleri tam olarak değerlendirilememesi
- Kronik etkilerin değerlendirilmesine olanak sağlamaması
- Sistemik etkilerin değerlendirilememesi
- Spesifik doku ve organ duyarlılığının değerlendirilememesi
- *In vitro* test yöntemleri kullanılarak aşı kaynaklı bağışıklık tepkilerinin taklit edilmesinin zor olması (130, 131).

Hücre ve doku kültürleri, biyomateryaller, organoid kültürü, hayvanların yerine organizmaların kullanılması ve *in silico* yöntemler *in vivo* çalışmalara alternatiftir (103).

### ➤ Hücre ve Doku Kültürleri

Hücre kültürü, tüm organizmanın karmaşık fizyolojisini tam olarak modelleyemediklerinden *in vivo* çalışmalar için yüzeysel bilgiler sağlasa da, hücre ve doku bazlı toksikolojik analizler, güvenlik değerlendirmelerinde kullanılan temel araçlar olarak kabul edilir (111). Bu testlerde hücre yapısını ve ya fonksiyonlarını bozup hücre ölümüne neden olan bileşikler, bu etkinin gözlemlendiği konsantrasyonlar, doz - yanıt ilişkisi ve zaman-etki ilişkisi ile ilgili veriler elde edilir (136).

Hücre ve dokuların kültürlenmesi, araştırmalarda hayvan kullanımını dışlamak için en kolay ve daha düşük maliyetli seçenektir. Kontrollü koşullar altında

hücrelerin/dokuların vücut dışında büyümesi esasına dayanır. Karaciğer, böbrek, beyin, deri vb. hücreler ve dokular bir hayvandan alınır ve vücudun dışında, uygun büyüme ortamında birkaç günden birkaç aya ve hatta birkaç yıla kadar tutulabilir. Hücre ve doku kültürlerinin büyük bir avantajı, ticari olarak temin edilebilmeleri ve pluripotent kök hücreler de dahil olmak üzere farklı türlere ait çeşitli organlardan çok sayıda farklı hücre tipinin kullanılabilmesidir. Bu kültürler toksisite değerlendirmelerine olanak sağlar. İnsan hepatosit kültürü, embriyonik kök hücre kültürü, tahriş testlerinde kullanılan sığır kornea kültürü bunlara örnektir (103, 127).

Histamin Sensitizasyon Testi (HIST), aşılarda aktif boğmaca toksinin (*Pertussis toxin*, PT) bulunmadığını test etmek için kabul edilen bir test olup çok sayıda fare kullanılmasını gerektirir. Vaessen ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada HIST testlerine alternatif olarak PT analizi için 6 çeşit insan hücresi (bronşiyal epitel hücre dizisi BEAS-2B, fetal akciğer fibroblast hücre dizisi MRC-5, birincil kardiyak mikrovasküler endotel hücreleri, birincil pulmoner arter düz kas hücreleri, EA.Hy926 hücresi ve olgunlaşmamış monosit türevli dendritik hücreler) kullanmış ve *in vitro* yaklaşımın başarılı olduğunu göstermişlerdir (137). HIST testine alternatif olarak farklı *in vitro* yaklaşımlara ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) ölçümü ile enzim aktivitesi değerlendirmesi ve Çin Hamsteri Yumurtalık hücresi (*Chinese hamster ovary cells*, CHO) testi de örnek verilebilir (138).

Hayvan kullanımına alternatif bir başka yeni yaklaşım, biyomateryallerin kullanılmasıdır. Biyomateryaller, tek başına veya karmaşık bir sistemin parçası olarak, araştırma ve klinik uygulama dahil olmak üzere farklı uygulamalarda kullanılabilen bir form almak üzere tasarlanmış maddelerdir. Doku mühendisliği ve 3B biyobaskı, hayvanların kullanımını azaltmayı, test sonuçlarının güvenilirliğini artırmayı, *in vitro* çalışmaların yapılmasını *in vivo* çalışmalarda kullanılan insan dokularının veya organlarının yerini almayı amaçlar (103, 139).

3B biyobaskı sistemleri, fizyolojik olarak ilgili fonksiyonel insan dokuları oluşturmak için hücre dışı matrisin dokuya özgü hücreleştirilmiş bileşenlerini biyomürekkepler olarak kullanır. Bu teknik, 3 boyutlu bir modelin oluşturmasına izin verir (103, 140). Bu modeller, koşullar üzerinde daha iyi kontrol sağlamanın yanı sıra

daha hızlı ve kolay toksisite değerlendirme olanağı sağlar (141). Üç R'nin ilk prensibi olan değiştirme kuralına göre *in vivo* çalışmalar yerine alternatif kabul edilen *in vitro* yaklaşımlara Tablo 4.4.'de verilmiştir (131).

**Tablo 4.4.** *In vivo* testlere alternatif *in vitro* yaklaşımlar (131).

Test Amacı	<i>In vivo</i> Test	<i>In vitro</i> Test
Boğmaca aşılı için güvenlik testi	Farelerde yapılan Histamin Sensitizasyon Testi (HIST Testi)	Çin hamsteri yumurtalık hücre (CHO cell) deneyi
Difteri aşılı için güvenlik testi	Kobaylarla yapılan toksisite testleri	VERO hücreleri (Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücreleri) ile yapılan toksisite testleri
Pirojenite Testi	Tavşanlarda yapılan pirojenite testi	Monosit Aktivasyon Testi (MAT)

WHO, Monosit Aktivasyon Testini (MAT) tavşan pirojen testine alternatif kabul etmiştir (90). MAT tamamen kantitatif olup fizyolojik insan ateşi yanıtıyla ilgili güçlü tahminler sunmaktadır. 2010 yılından beri Avrupa Farmakopesinde yer almaktadır. 2014 yılında Birleşik Krallık'ta pediatrik aşılarda tavşan pirojenite testi yerine MAT kullanımı onaylanmıştır (128). Bakteriyel Endotoksin Testi (BET) de tavşanlarla yapılan pirojenite testlerine alternatif olarak kullanılmakta ve gereksiz hayvan kullanımının önüne geçmektedir (134).

#### ➤ Organoid Kültürü

Organoidler, doku düzeyinde işlevlere ve çeşitli hastalık fenotiplerine sahip sağlam bir organ benzeri üç boyutlu mimari ve fizyoloji sergileyen kök hücre kaynaklı üç boyutlu, kendi kendini organize eden mikro sistemlerdir. Aslında *in vitro* yetiştirilen minyatür organlar olarak kabul edilirler ve araştırmacılara geniş olanaklar sağlarlar. Organoidlerin avantajlarından bazıları, taşınabilir olmaları, 2D modellerin geliştirilmiş versiyonları ve manipüle edilmelerinin kolay olmasıdır (103, 142).

Tüm organoidler, modellenen dokunun tüm hücre tiplerini içermez ve bu durum organoidlerin kullanımını için bir sınırlamadır. Yine de organoidlerin hayvan deneylerinin yerini tam olarak alamasa da gelecekte toksikoloji testlerinde tamamlayıcı olarak kullanılabilmesi öngörülmektedir (143).

### ➤ **Hayvanlar Yerine Kullanılan Organizmalar**

Toksisite değerlendirme testlerinde özellikle kemirgenler olmak üzere büyük ölçüde hayvanlar kullanılmaktadır. Etik nedenler, zaman alması ve maliyetli olmasından dolayı omurgasız hayvanların ve daha basit organizmaların (prokaryotların, protistlerin, mantarların) kullanılması hayvan testlerine mantıklı bir alternatif olarak kabul edilmektedir. İyi karakterize edilmiş genetik sistemlerinin olması, hızla büyümeleri ve ucuz olmalarından dolayı *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi tek hücreli mikroorganizmalar, araştırma için elverişli modeller olarak kabul edilir. Özellikle amip *D. Discoideum* konak-patojen etkileşimlerini araştırmak için model olarak kullanılmıştır. *Galleria mellonella*, konak-patojen etkileşimlerini, virülansı, toksisiteyi araştırmak için uygun bir modeldir. Alt omurgalılarla ilgili olarak, *Danio rerio* (zebra balığı), şeffaf özelliğinden dolayı, çok çeşitli iç anatomi çalışmalarında kullanılmıştır. Tuzlu su karidesi, yumuşakça, midye, yuvarlak kurt ve tavuk embriyosu kullanılacak diğer alternatiflerdir (103, 109, 144).

Bazı durumlarda da etik açıdan daha kabul edilebilir olması için alternatif olarak omurgasız hayvanlar ve prokaryot canlılardan başka farklı bir hayvan türü kullanılabilir. Oral polio aşılarının toksisite değerlendirmesinde maymunlar kullanılırken, çocuk felci virüsünün maymun hücrelerine girmek için kullandığı reseptör bölgesi tanımlandıktan sonra ilgili gen klonlanıp enfeksiyona duyarlı transgenik fareler elde edilmiş ve bu farelerin kullanımı, maymun kullanımına nispeten daha uygun bir alternatif kabul edilmiştir (128).

Bu yaklaşım sayesinde, daha basit organizmalarla yapılan ilk testlerden elde edilen veriler, daha sonra hayvanlarda yapılacak çalışmaların kapsamını daraltmaya yardımcı olabilir ve kullanılan hayvan sayısını azaltabilir. Bununla birlikte, omurgasızların, bağışıklık sistemlerinin basitliğinden dolayı insan fizyolojisini tam olarak yansıtamadıklarından, bu modellerin aşı toksisitesi değerlendirmesinde

kullanımları sınırlıdır (111). Buna ek olarak daha az etik engel bulunmaktadır. Yavru zebra balıklarının çok az acı hissettiğine ya da hiç acı hissetmediğine inanılır. Ayrıca 14 gününü doldurmamış civcivler gelişmemiş sinir sistemlerinden dolayı hissizlerdir ve bu örnekler daha az etik engel bulunduğunu desteklemektedir (144).

### ➤ Çip Organların Kullanılması

Çip organlar insan fizyolojisi ve hastalığının modellenmesini sağlayan, *in vitro* olarak oluşturulan basitleştirilmiş ancak gerçekçi doku ve organlardır. Tasarım ilkeleri, çalışılan organ sisteminin fizyolojisini özetlemeye dayanmaktadır. Hayvan modelleri, hücre kültürü ve klinik çalışmalar arasında gözlemlenen güvenlik ve potans değerlendirilmelerinde gözlemlenen tutarsızlıkları egale ederek üretim sürecini hızlandırmaya yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Çip organların toksisite değerlendirme testlerinde hayvanların yerini alacak umut vadeci bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (103, 145).

Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'daki teknolojik gelişmeler, 2000 yılından bu yana, cilt, gastrointestinal sistem, karaciğer, kalp ve kan damarları gibi çeşitli organ dokularını taklit edebilen çip organlarının geliştirilmesindeki ilerlemelere katkıda bulunmuştur (111).

### b. Azaltma

Hayvan kullanımına alternatif yöntem mümkün olmadığında, azaltma düşünülmelidir. Azaltma, deney protokollerinde kullanılan hayvan sayısının azaltılması anlamına gelir. 2010/63/EU sayılı Direktif, hayvanların sayısını azaltmak için, araştırmacıların öldürülen hayvanların organlarını ve dokularını paylaşmaya yönelik programların oluşturulmasını önermektedir. Hayvan sayısını azaltmak için takip edilecek adımlar pilot deneyler yapmak, deney protokolünü doğru bir şekilde tasarlamak, ve modern protokoller ve teknikler uygulayarak elde edilebilecek deneysel değişkenliği azaltmaktır (103, 146).

### c. İyileştirme

Deney için hayvan sayısını azaltmak için yol izlendiğinde ve değiştirme bir alternatif olmadığında, iyileştirme prensibi uygulanır. Acı, ağrı ve sıkıntıyı en aza



indirmek ve refahı artırmak için deney protokollerine dahil edilir. Dikkat edilen başlıca hususlar şunlardır:

- Barınma ve taşıma koşullarının hayvanların strese girmeyecek şekilde tasarlanması
- Isı, ışık, nem, koku, ses gibi dış etmenlerin hayvan homeostazını olumsuz etkilememesi
- Kan örneklenmesinin daha az acı veren bölgeden yapılması
- Gerekli olduğunda analjezik kullanılması
- Mümkün olduğunca acısız bir ölümün sağlanması (103, 146).

İyileştirme yapılmadığında görülen stres ve rahatsızlık hayvanlarda hormonal dengesizliğe sebep olabilir ve bu da sonuçlarda dalgalanmalara yol açabilir. Deneilerin tekrarlanması gerekirse kullanılan hayvan sayısı artar. İyileştirme yalnızca laboratuvar hayvanlarının yaşamını iyileştirmek için değil, aynı zamanda araştırma kalitesini artırmak için de gereklidir (127).

- **3R Prensiplerinin Uygulanmasında Karşılaşılan Zorluklar ve Farklı Ülkelerin Yaklaşımları**

Aşı çalışmalarında 3R uygulanmasında karşılaşılan zorluklar ve öncelikler hakkında 4 Aralık 2019 tarihlerinde IABS tarafından organize edilen bir konferans düzenlenmiştir. Hindistan'ı temsilen katılan Dr. Sunil Goel alternatif yöntemler olduğu halde hayvan çalışmalarının yapılmasına açık kapı bırakan bazı farmakope monograflarının gözden geçirilmesini önermiştir. Tespit edilen en büyük engel, aşı üreticilerini ihracat yaptıkları ülkelerin farklı otoritelerinin farklı şartlarını yerine getirmeye zorlayan uluslararası uyum eksikliğidir. Avrupa konseyini temsilen katılan Eriko Terao *in vivo* çalışmaların yerine *in vitro* çalışmalara yönelmek gerektiğini vurgulamış, tavşan pirojen testleri yerine bakteriyel endotoksin testi yapılmasını, Hepatit A aşıları için serolojiye alternatif olarak doğrulanmış bir ELISA'nın eklenmesine değinmiştir. İtalya'yı temsilen katılan Eliana M Coccia, MAT, Tavşan Pirojen Testinden (*Rabbit Pyrogen Test*, RPT) daha güvenilir ve tercih edilesi olduğunu ifade etmiştir. Fransa 'dan Sylvie Uhlrich, Çin'den Li Shi, Yeni Zelanda 'dan Jim Webster ve Hollanda'yı temsilen katılan Coenraad Hendriksen, *in vitro* alternatiflere yönelmenin önemini vurgulamış ve bunların maliyet ve hayvan refahı

açısından avantajlarına değinmiştir. Vietnam'dan Tuan Dat Japon Ensefaliti aşısının üretiminde Vero hücrelerinin kullanılması ile hayvan kullanımının önüne geçildiğini belirtmiştir. Katılımcılar uluslararası uyum eksikliğinin önüne geçilmesi ve 3R prensiplerinin uygulanmasını vurgulamıştır (135).

Lilley ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptığı 16 farklı ülkedeki 25 aşı üreticinin katıldığı bir anket çalışmasında üreticilerin %90'ının 3R prensiplerine aşına olduğu, ilginçtir ki %64'ünün müsait olduklarında hayvan olmayan teknolojileri (NAT) kullandıkları sonucuna ulaşılmıştır. Anket sonuçlarına göre NAT hakkında farkındalık yüksekken genel olarak NAT kullanım oranları düşüktür. NAT kullanmadıklarını belirten üreticilerin çoğu, elde edilen sonuçların düzenleyiciler tarafından kabul edilmeyeceği konusunda endişe duyduklarını ifade etmiştir (147).

- ***In Silico* Çalışmalar**

*In silico* (biyoinformatik), bilgisayar ortamında gerçekleştirilen çalışmaları tanımlamak için kullanılan bir terimdir (111). Kullanılmaya başlanması 19. Yüzyıla kadar uzanır. Kantitatif yapı-etki ilişkisinin açıklanmasını ve çapraz okuma ile toksisite tahmini sağlar (128). *In silico* çalışmalar sayesinde yeni aşı tasarımı, T ve B hücresi epitoplari tahmini ve alerjenite değerdendirme kolaylıkla yapılabilmektedir (148). Buna ek olarak *in silico* çalışmalar geliştirilen molekülün çeşitli olası biyolojik ve toksik etkilerini tahmin etmek için kullanılır. Yalnızca birincil taramadan elde edilen en umut verici moleküller, *in vivo* deneyler için kullanılır (127).

*In vivo* çalışmaların yerini tam olarak alamasa da, yapılacak olan *in vivo* çalışmalarda mevcut verilerin verimli şekilde kullanılmasını sağlar (141). Bu modeller sadece *in vitro* ve *in vivo* yöntemler arasında bir köprü görevi görmeye kalmayıp aynı zamanda klinik deneylerin desteklenmesine ve optimizasyonuna da katkı sağlamaktadır. *In silico* çalışmaların hayvanlarla yapılan *in vivo* çalışmalara göre avantajları, hızlı ve nispeten ucuz olmalarıdır (127). Ayrıca *in silico* testlerin sonuçları ile hayvan deneylerinin sonuçları arasında güvenilir derecede benzerlik olduğu görülmüş ve hayvan kullanımını azaltmakla kalmayıp sonuçların güvenilirliğini de artırdığı ileri sürülmüştür (111).

Aday aşılarda immünojenik peptit epitopunun olası toksisite profiliyle ilgili tahminler sunan ToxinPred sunucusunun kullanımını bu çalışmalara örnektir. ToxinPred

1805 adet toksik peptit ve 3593 adet toksik olmayan peptitten oluşan bir veri tabanı kullanarak peptitlerin fizikokimyasal özelliklerine dayalı olarak toksisite tahmini yapar. Aşılarda immünojenik peptitin alerji oluşturma potansiyeliyle ilgili tahminler sunan AllerTop sunucusu da *in silico* çalışmalarda kullanılmaktadır. AllerTop sunucusu, 2427 bilinen alerjen ve 2427 alerjen olmayan proteinden oluşan güncellenmiş bir set kullanarak analiz edilmek istenen epitoplara, hizalamadan bağımsız olarak alerjik özelliklerini tahmin etmektedir. Bir başka örnek Peptitlerin antijenik özellikleriyle ilgili tahminler sunan VaxiJen sunucusudur. VaxiJen, protein dizilerinin anahtar aminoasit özelliklerinin tek düze vektörlerine otomatik çarpaz kovaryans dönüşümüne dayalı olan ve bu sayede hizalamaya bağlı dizi benzerliği yöntemlerinin sınırlamalarını egale eden, hizalamadan bağımsız bir sunucudur. Hindistan Brezilya, Malezya ve çeşitli ülkelerde bu sunucular kullanılarak aşı üretimi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (149, 150).

Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ülkeleri, Japonya ve Avustralya'da da *in silico* yöntemlerin kullanımı teşvik edilmektedir (128).

*In silico* çalışmalardan elde edilen verilerin paylaşılması ve bir veri tabanına işlenmesi hayvan kullanımının azaltılması için oldukça önemlidir. Biyolojik sistemlerin hesaplamalı modellenmesi ile elde edilen modelleri depolamak ve değiştirmek için en yaygın olarak kabul edilen açık yazılım platformu olan Biyolojik Sistemleri Biçimlendirme Dili (*Systems Biology Markup Language, SBML*)'dir (103).

Bir rekombinant protein aşısı ile çalışırken, proteomik türevli bir dış yüzey proteini için, SWISSPROT, TrEMBL veya GenBank gibi veritabanlarını taramak yararlı olabilir (52).

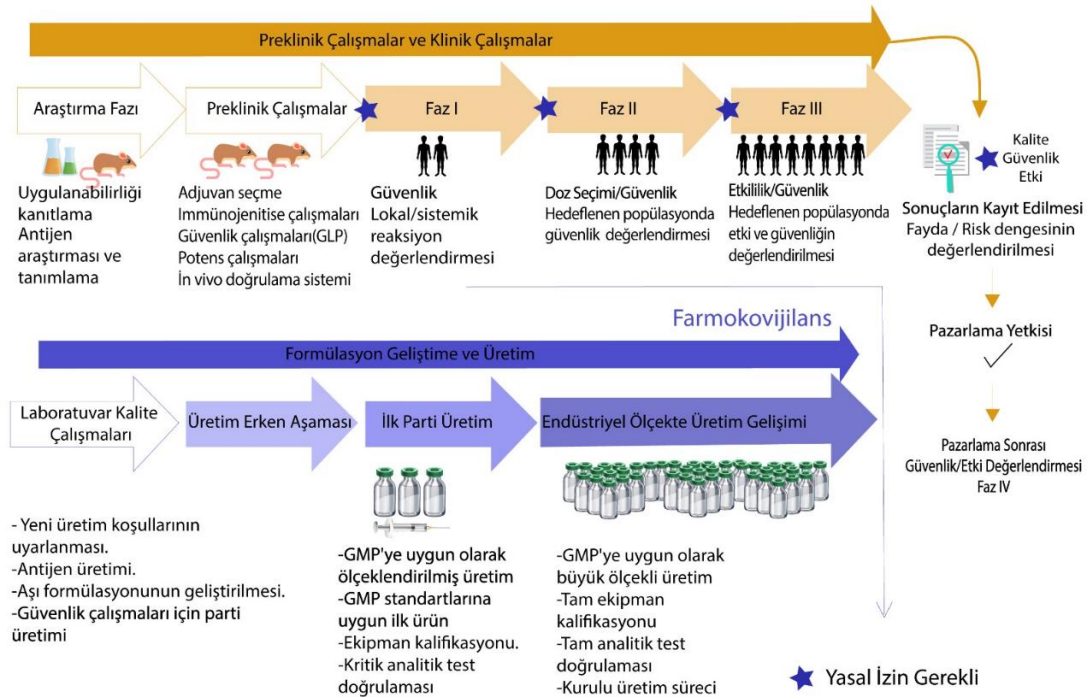
#### **4.1.2. Aşı Güvenliliğinin Değerlendirmesi İçin Yapılan Klinik Çalışmalar**

Preklinik çalışmalar, klinik çalışmalardan önce konak-patojen etkileşimi, bağışıklık mekanizmaları ve antijen-adjuvan kombinasyonu bakımından aşının uygun olarak tasarlanması için zemin sağlar. Bunu takip eden *in vivo* çalışmalarda hayvanlarla yapılan deneylerde aşı dozu, uygulama yolu ve aday aşının oluşturduğu etkiler üzerinde çalışılır ve tatmin edici sonuçlardan sonra klinik çalışmalar başlatılır (20).

Yeni üretilen aday aşular, kullanım için onaylanmadan önce insanlarda güvenlik, immünojenisite, uygun doz programının test edilmesi ve koruyucu etkinlik açısından değerlendirilmeli ve klinik çalışmaların önemi göz önünde bulundurulmalıdır (11, 151).

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre klinik çalışmaların yapısı ve işleyişi aşının türüne ve antijen içeriğine göre tasarlanır. Yeni antijenler ihtiva eden aşuların klinik değerlendirilmesi daha önce çalışma yapılmış antijenleri içeren aşuların klinik değerlendirmesinden farklıdır (97).

Klinik çalışmalar birbirini izleyen fazlardan oluşur. Faz I çalışmaları güvenlik hedefleyen çalışmalardır. Faz II çalışmaları ise belirlenen doz aralığında immünojenisite değerlendirmesi hedeflenir. Bunları takip eden ve daha büyük çalışma gruplarını kapsayan Faz III çalışmalarında, dozlama ve aşılama programının amaçlanan sonuçları sağlayıp sağlamadığını değerlendirmek amaçlanır (20, 152). Preklinik çalışmalar ve klinik faz çalışmalarını kapsayan aşı geliştirme adımları Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Aşı geliştirme sürecinde izlenen basamaklar (153).

Aşıların değerlendirilmesi için yapılan klinik çalışmalar, etik kurallara uygun olarak yapılmalıdır. Bu çalışmalar yapılırken yararlı olma, özerklik, zarar vermeme ve eşitlik kabul edilen etik ilkelerdir (154). Klinik çalışmaların, deney tasarımı, yürütülmesi, kaydedilip raporlanması aşamalarında uluslararası etik ve bilimsel standart olan İyi Klinik Uygulamaları esas alınır (9).

Dünya Tabipler Birliği (DTB), insanları içeren tıbbi araştırmalar için etik ilkeler beyanı olarak Helsinki Bildirgesi'ni yayınlamıştır. Bildirge öncelikle hekimlere yönelik olup DTB, insan içeren tıbbi araştırmalara katılan diğer bireyleri de bu ilkeleri benimsemeye davet eder. Yapılan araştırmalar, çalışma grubundaki bireylere saygı gösterilmesini teşvik eder buna ek olarak bireylerin sağlıklarını ve haklarını koruyan etik kurallara tabidir (155).

Dünya Sağlık Örgütü Biyolojik Standardizasyon Üzerine Uzman Komitesi 52. Rapor Kılavuzunda da çalışma gruplarının insan olduğu araştırmalarda, Helsinki Bildirgesine uygun adımlar izlenmesi gerektiği vurgulanmıştır (97).

Ülkemizde yürütülen klinik çalışmalara ait etik esasları açıklayan İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu'nun temeli de Helsinki Bildirgesine dayanmaktadır (156).

Aday aşının prelinik çalışmalardan klinik çalışmalara geçme sürecinde düzenleyici kurumların gereklilikleri ülkeye ve bölgeye göre değişebilir (9). Buna ek olarak genellikle prelinik çalışmalarda olduğu gibi aşı adaylarının klinik değerlendirilmesinde de EMA, WHO ve FDA tarafından yayınlanan kılavuzlar referans alınmaktadır (11).

Aşılar için yapılan klinik değerlendirmeler, ilaçlar için yapılan klinik değerlendirmelere nispeten WHO ve EMA'ya göre bazı özel önlemleri ve farklı adımları gerektirir. Bunun sebepleri aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Aşılar sağlıklı bireylere uygulandığından güvenlik marjının yüksek olması gerekir.
- Buzdolabında saklanması gereken aşılar için lojistik önlemler alınmalıdır.
- Bağışıklık tepkisini artırmak için formülasyona dahil edilen adjuvanların, aşı antijenleri ile uyumlu olup olmamasının değerlendirilmesi dikkate alınması gereken bir unsurdur.
- Aşıların klinik değerlendirilmesinde antikor yanıtın kalitesi değerlendirilmelidir.

- Bağımsızlık sistemi tam olarak gelişmemiş bebek ve çocuklara birden fazla antijen içeren aşuların uygulanması durumunda çapraz reaksiyon görölme ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır (11, 96, 97).

Bulaşıcı hastalıkların sebep olduğu ağır tablolar, sınırlı kaynaklara sahip ölkelerde meydana geldiğinden, aşuların bu bölgelerde test edilmesi önemli bir unsurdur (157, 158). Ek olarak, bir aşının belirli bir bölgede kullanılmasının onaylanması için, iyi tolere edilmeli ve ilgili ortamda etkili olduğu kanıtlanmalıdır. Bu sebeple, ilgili aşuların geç dönem klinik denemeleri, Sahra altı Afrika bölgelerinde yaygın olarak yürütölmektedir (151).

Gerçekleştirilmesi planlanan klinik çalışmanın bir araştırma kayıt sistemine kaydının yapılması, izleme numarası alınması gerekmektedir. Araştırma kayıt sistemine gereksinim duyulmasının en önemli sebebi, araştırmanın her adımında şeffaflığın sağlanması ve yürütölmekte olan bütün araştırmalara bu merkezlerin herkese açık olan kayıt sistemleri vasıtasıyla erişiminin sağlanmasıdır. WHO Uluslararası Klinik Çalışmalar Kayıt Platformu, Avrupa Birliği Klinik Araştırmalar Kayıt Merkezi, ABD’de Ulusal Tıp Kütüphanesi ve Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından desteklenen “clinicaltrials.gov” kayıt sistemlerine örnektir (159).

Klinik çalışmalar ve sürekli izleme sürecinde güvenlik önemli bir unsurdur. Bu sebeple olumsuz olayların saptanması ve kaydedilmesi gerekmektedir. Ağrı, şişlik, kızarıklık, ya da ateş gibi etkiler bunlara örnek olarak verilebilir. Adjuvana bağlı görölen lokal reaksiyonlar, oral polio virüs ve MMR aşularında olduğu gibi zayıflatılmış aşı sonrası hastalık tablosunu taklit eden tablolar raporlanır. Sonuçlara göre hedef popölasyon sınırlandırılabilir ya da genişletilebilir (20).

Klinik denemeler boyunca üzerinde çalışılan her dozdan WHO, FDA ve EMA kılavuzlarına göre 4-7 gün sonra görölen advers olaylar kaydedilir. Bu süre canlı aşular için daha uzun olup 14 güne kadar ya da bir sonraki doza kadar aynı şekilde görölen advers olaylar kaydedilir. WHO ve EMA’ya göre de çalışmalar, yaygın olmayan (1/100 ile 1/1000 arasında görölen) advers etkileri saptamak için güvenilir veriler sunulmalıdır (94, 96, 97).

Klinik çalışmalar sırasında görölen olumsuz olaylar derecelendirilerek kaydedilir. FDA’ in sağlıklı yetişkin ve ergen gönüllüler için belirlediği toksisite derecelendirme ölçeği Tablo 4.5.'de verilmiştir (20, 160).

**Tablo 4.5.** Klinik çalışmalarda FDA ’in sağlıklı yetişkin ve ergen gönüllüler için belirlediği toksisite derecelendirme ölçeği (160).

<b>Lokal Reaksiyonlar</b>	<b>Hafif (Seviye 1)</b>	<b>Orta (Seviye 2)</b>	<b>Şiddetli (Seviye 3)</b>	<b>Potansiyel Hayati Tehlike (Seviye 4)</b>
Ağrı	Günlük aktiviteyi etkilemez	Günlük aktiviteyi etkiler. Narkotik olmayan ağrı kesici kullanımını gerektirir.	Günlük aktiviteyi etkiler. Narkotik kullanımını gerektirir.	Acil servise gitmeye veya Hastane yatışına sebep olur.
Hassasiyet	Temas sonrası hafif hassasiyet görülür.	Hareket sonrası hassasiyet görülür.	İstirahat döneminde önemli ölçüde rahatsızlık hissedilir.	Acil servise gitmeye veya Hastane yatışına sebep olur.
Eritem/Kızarıklık	2.5-5 cm	5.1-10 cm	>10 cm	Nekroz
Sertlik/Şişkinlik	2.5-5 cm olabilir ve günlük aktiviteyi etkilemez.	5.1-10 cm olabilir ve günlük aktiviteyi etkilemez.	10 cm' den büyük olabilir ve günlük aktiviteyi engeller.	Nekroz

FDA sağlıklı yetişkin ve ergen gönüllüler için yaşamsal fonksiyonları etkileyen ve önemli kabul edilen toksisite belirtilerini Tablo 4.6.’daki gibi ölçeklendirmiştir (160).

**Tablo 4.6.** Klinik çalışmalarda FDA ’in sağlıklı yetişkin ve ergen gönüllüler için belirlediği önemli belirtileri derecelendirme ölçeği (160).

Önemli Belirtiler	Hafif (Seviye 1)	Orta (Seviye 2)	Şiddetli (Seviye 3)	Potansiyel Hayati Tehlike (Seviye 4)
Ateş (°C)	38.0 – 38,4	38.5 – 38,9	39.0 – 40	> 40
Taşikardi-Yüksek Nabız	101 – 115	116 – 130	> 130	Acil servis ziyareti veya hastane yatışına sebep olan aritmi görülür
Bradikardi-Düşük Nabız	50 – 54	45 – 49	<45	Acil servis ziyareti veya hastane yatışına sebep olan aritmi görülür
Sistolik Hipertansiyon mm Hg	141 – 150	151 – 155	> 155	Acil servis ziyareti veya hastane yatışına sebep olur
Diastolik Hipertansiyon mm Hg	91 – 95	96 – 100	> 100	Acil servis ziyareti veya hastane yatışına sebep olur
Sistolik Hipotansiyon mm Hg	85 – 89	80 – 84	<80	Acil servis ziyareti veya hastane yatışına sebep olan hipotansif şok görülür
Diastolik Hipotansiyon mm Hg	17 – 20	21 – 25	> 25	Entübasyon

FDA ’in sağlıklı yetişkin ve ergen gönüllüler için özellikle gastrointestinal sistemi etkileyen sistemik etkileri derecelendirme ölçeği Tablo 4.7.' de verilmiştir (160).



**Tablo 4.7.** Klinik çalışmalarda FDA'in sağlıklı yetişkin ve ergen gönüllüler için belirlediği sistemsel etkileri derecelendirme ölçeği (160).

Sistemik Etkiler	Hafif (Seviye 1)	Orta (Seviye 2)	Şiddetli (Seviye 3)	Potansiyel Hayati Tehlike (Seviye 4)
Mide bulantısı/ Kusma	Günlük aktiviteyi etkilemez ya da 24 saatte 1-2 kez görülür	Günlük aktiviteyi biraz etkiler ya da 24 saatte 2'den fazla görülür	Günlük aktiviteyi engeller ya da iv hidrasyon gerektirir	Acil servis ziyareti veya hastane yatışına sebep olan hipotansif şok görülür
İshal	Günde 2-3 defa sulu dışkı görülür	Günde 4-5 defa sulu dışkı görülür	Günde 6 daha fazla sulu dışkı görülür	Acil servis ziyareti veya hastane yatışına sebep olur
Baş ağrısı	Günlük aktiviteyi etkilemez	24 saatten uzun süreyle narkotik olmayan ağrı kesici kullanımının tekrarını gerektirir ya da günlük aktiviteyi etkilemez	Narkotik kullanımını gerektirir ya da günlük aktiviteyi engeller.	Acil servis ziyareti veya hastane yatışına sebep olur
Yorgunluk / Halsizlik	Günlük aktiviteyi etkilemez	Günlük aktiviteyi biraz etkiler	Günlük aktiviteyi engeller	Acil servis ziyareti veya hastane yatışına sebep olur
Kas Ağrısı	Günlük aktiviteyi etkilemez	Günlük aktiviteyi biraz etkiler	Günlük aktiviteyi engeller	Acil servis ziyareti veya hastane yatışına sebep olur

Aşıdan kaynaklı olup olmadığına bakılmaksızın aşılama sonrasında görülen advers olaylar, AEFI olarak adlandırılır. Yukarıda tabloda verilen etkilerin dışında bazı aşılarda otizm, trombositopeni, tip 1 diyabet, lösemi gibi durumlarla ilişkilendirilmiş olsa da son çalışmalar bu ihtimallerin çok düşük olduğunu göstermektedir. Advers olaylar raporlanırken, tesadüfi ya da aşı ile nedensel ve zamansal bir ilişkisi olup olmadığının değerlendirilmesi oldukça önemlidir. İzleme sistemleri, gerekli durumlarda daha fazla sorgulamayı yapabilecek kadar hassas olmalıdır. WHO'ya göre AEFI sebepleri ve AEFI'lerin nedensellik değerlendirme sınıflandırması sırasıyla Tablo 4.8. ve Tablo 4.9.'da verilmiştir (20, 161, 162).

**Tablo 4.8.** WHO'ya göre AEFI nedenleri (162).

Aşı ile ilgili reaksiyon	Aşının doğasında bulunan bir veya daha fazla özellik sebebiyle aşının neden olduğu bir AEFI
Aşının kalite kusuruyla ilgili reaksiyon	Üretici tarafından sunulan uygulama cihazı da dahil olmak üzere aşıda bir veya daha fazla kalite kusurundan kaynaklanan AEFI
Aşılama hatasıyla ilgili reaksiyon	Uygun olmayan aşının uygulanması, reçete yazma veya uygulamadan kaynaklanan ve dolayısıyla doğası gereği önlenemez bir AEFI
Aşılama kaygısı ile ilgili reaksiyon	Bağışıklama ile ilgili kaygıdan kaynaklanan bir AEFI
Tesadüfi olay	Aşı, aşılama hatası veya aşılama kaygısı dışında başka bir etkenin neden olduğu bir AEFI,

**Tablo 4.9.** WHO'ya göre nedensellik ilişkisinin sınıflandırılması (162).

Aşılama ile tutarlı nedensellik ilişkisi bulunan	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aşı ile ilgili reaksiyon.</li> <li>• Aşının kalite kusuruyla ilgili reaksiyon.</li> <li>• Aşılama hatasıyla ilgili reaksiyon.</li> <li>• Aşılama kaygısı ile ilgili reaksiyon.</li> </ul>
Aşılama ile nedensellik ilişkisi belirsiz	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geçici bir ilişki var fakat kanıt yetersiz.</li> <li>• Çelişkili sonuçlar mevcut.</li> </ul>
Aşılama ile nedensellik ilişkisi tutarsız	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aşılama dışında maruz kalınan bir etken nedeniyle tesadüfi gelişen reaksiyonlar.</li> </ul>
Sınıflandırılmayan	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sınıflandırma için spesifik ek belirtilere ihtiyaç duyulan reaksiyonlar.</li> </ul>

Dünya Sağlık Örgütü Biyolojik Standardizasyon Üzerine Uzman Komitesi 52. Rapor Kılavuzunda belirtildiği gibi araştırma ve raporlama yapılırken standardize edilmiş yöntemler kullanılmalıdır. Raporlamanın kim tarafından nasıl planlanacağı, takip süresinin ne kadar olacağı ve ne sıklıkla raporlama yapılacağı belirtilmelidir (97).

Klinik çalışmalarda yukarıda bahsedilen advers olaylar gözlenebilse de bilimsel katkıları ve buna ek olarak toplumsal katkıları göz ardı edilemez. Klinik çalışmalarla

aşı uygulanan bireylerin bağışıklık kazanması sağlanabilmekte, araştırma kitlesi çok büyükse sürü bağışıklığı bile oluşabilmektedir. Gambiya' da yürütülen pnömokok aşısı çalışmalarından sonra bebek ölümlerinde azalma buna örnek teşkil edebilir (151).

### **a. Faz-I Çalışmaları**

Faz-I de aday aşılarda ilk kez sağlıklı insanlara uygulanır. Amaç güvenlik ve bağışıklık yanıtının değerlendirilmesidir. Doz, bağışıklama programı ve uygulama yolu değerlendirilen diğer noktalar. (96, 97, 163).

Faz-I çalışmaları aşıyla ilişkili enfeksiyon kapma riski düşük olan küçük gruplar üzerinde çalışma yapılır. Genellikle çalışmalar 100 gönüllüden daha az katılımcıyı içerir. Yetişkinlerde yapılan Faz-I çalışmalara Faz-Ia çalışmaları denir. Hedef popülasyona yakın farklı yaş gruplarında çalışmaları takiben elde edilen sonuçlarla farklı coğrafyalarda çalışmalar yapılır ve bunlara ise Faz-Ib çalışmaları adı verilir. Bununla birlikte çalışma grubu hedef popülasyonu içermeyebilir (8, 9, 11).

Faz-I çalışmaları genellikle randomize değildir fakat plasebo kullanılarak randomize kontrollü çalışmalar yapılabilir. Yapılan çalışma tek kör ya da çift kör olabilir (11, 97, 163).

Faz I çalışmasının gerçekleştirildiği sahanın üçüncü basamak bir hastanenin içinde veya yakınında olması tavsiye edilir. Bağışıklamadan sonra, günlük bakım izleme ihtiyacı, olumsuz olayları izleme ihtiyacından doğar. Laboratuvar testleri, başlangıçta belli aralıklarda ve araştırma sonunda toplanan verilerin bir kısmını oluşturur. Yapılan çalışmalar GLP ve İyi Klinik Laboratuvar Uygulamaları (GCLP)'na uygun olmalıdır (11, 157).

### **b. Faz -II Çalışmaları**

Faz I çalışmaları sonunda immün yanıt ve güvenlik açısından yeterli sonuçlar elde edilmesi halinde Faz II çalışmaları yapılmaya başlanır. Faz II çalışmalarında, Faz III çalışmaları için uygun doz ve aşılama planı belirlenir ve bu çalışmalar birkaç yüz katılımcı içerir (8, 11). Amaç uygun doz, uygulama yolu, uygulama sıklığı bilgilerini doğrulamak ve hedef popülasyonda immünojenisite verisi oluşturmaktır (9).

Bu çalışmalarda hangi tür bağışıklık tepkisinin oluştuğu belirlenir (hümorale, hücresele, mukozale vb.). Hedef patojene karşı antikor tepkisi değerlendirilir (163).

Faz II çalışmalarda etnik köken, yaş, cinsiyet anneden var olan antikorların bebeğe geçip geçmemesi gibi farklı değişkenler değerlendirilir. Aşının ilk uygulama yaşı, doz sayısı, aşının verilme yolu, tekrar dozlama için geçen süre, bağışıklık süresi Faz II çalışmalarda değerlendirilen diğer unsurlardır (11, 97).

Faz 2 denemeleri, doğru doz ve uygun aşılama programı belirlenene kadar (genellikle birkaç yıl) devam eder (8).

Faz II çalışmalarının yapıldığı popülasyon, çalışma amacına bağlı olarak yetişkinler, ergenler, çocuklar, bebekler ve hamile kadınlar olabilir. HPV aşı çalışmaları genç erkek ve kadınlar ile yapılırken rotavirüs aşı çalışmaları bebek ve çocukları kapsar. Buna ek olarak, bebekler için geliştirilen aşılama ile ilgili, genellikle kademeli bir yol izlenir ve deneme çalışmaları sırasıyla yetişkinler, ergenler, çocuklar ve bebeklerde yapılır. Geliştirilen aday aşı randomize kontrollü çalışmalarda plaseboya ya da farklı bir aşıya karşı değerlendirilir (11, 153).

Faz II çalışma sonuçlarının iyi değerlendirilebilmesi için hedef patojen açısından insidansın yüksek olduğu ortamlarda yapılır. Sağlıklı bireylere hedeflenen patojen bulaştırılarak aşının koruyuculuğu değerlendirilebilir. Bu çalışmalar Faz IIa kapsamındadır ve hedeflenen patojenin öldürücü olmadığı ve tedavi edilebilir hastalıklar için yapılır (11, 163).

Faz IIa çalışmalarda immünojenisite, uygun doz ve aşılama programı temel alınırken; Faz IIb çalışmaları, aşı etkinliğinin ortaya konmasına yönelik tasarlanır (153).

### **c. Faz III Çalışmaları**

Faz III çalışmalarda nihai aşının onaylanması ve pazara sunulmasından önce aşı etkileri değerlendirilir (11, 16). Bu çalışmalar yapılmaya başlandığında uygun doz, aşılama programı, hedef popülasyonda güvenlik profili bilinir (9).

Faz III çalışmalarının amacı aşının güvenliği ve etkinliği, yüzlerce kişiden binlerce kişiye kadar büyük çalışma grupları üzerinde değerlendirmektir. Aşı etkinliği, aşılama popülasyonu arasında hastalık veya enfeksiyon insidansındaki azalma yüzdesi olarak ifade edilir. Aşılama popülasyonundaki hastalık insidansı  $I_u$ , aşılama

popülasyondaki hastalık insidansı  $I_v$  ve bağıl risk  $RR$  olarak kabul edildiğinde hesaplama şu şekilde yapılır (8, 11, 163).

$$(I_u - I_v / I_u) \times \%100 = (1 - I_v / I_u) \times \%100 = (1 - RR) \times \%100$$

Faz III çalışmaları büyük bir popülasyonla ve uygun görülen çalışma koşullarında yapılır. Yapılan randomize kontrollü çalışmalar ile yanlılık egale edilir ve geliştirilen aşı ile kontrol arasındaki farkların tespiti etkili bir şekilde yapılır (11, 163).

Tasarımı iyi yapılmış çift kör, üçlü kör randomize kontrollü denemeler standart koşullar altında bir aşının etkinliği ile ilgili güçlü tahminler sunar (8, 9).

Faz III çalışmaları, WHO'ya göre klinik çalışmaların en önemli ve kilit aşamasıdır. Bu çalışmaların sonuçlarının yeterliliğine göre ürünün ruhsatlandırılıp ruhsatlandırılmayacağına karar verilir (97). Faz III çalışma sonuçları etkinlik ve güvenlik gösterirse, aşı üreticisi ürünün onaylanması ve pazarlanması için ulusal düzenleyici makama başvurabilir (11, 16).

Faz III çalışmaları ile, aday aşının hedef popülasyonda rutin olarak uygulanacak diğer aşularla aynı zamanda uygulandığında bağışıklık ve güvenlik profilini de inceleme imkânı sağlayabilir (9).

#### **d. Faz IV Çalışmaları**

Ruhsat alındıktan sonra Faz IV çalışmaları ve ruhsat sonrası gözetim çalışmaları yürütülür. Amaç, Faz III çalışmalarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan ama lisans sonrası izlemeye değer uzun vadeli etkinlik ve güvenlik endişelerini değerlendirmektir. Faz IV çalışmaları, düzenleyici kurumlar tarafından ruhsatlandırma sürecinin ayrılmaz bir parçası olarak kabul edilir. Hem ABD'de hem de AB'de aşular piyasaya sunulduktan sonra olumsuz olayların gözetimi zorunludur (8, 9).

Amerika Birleşik Devletleri'nde tetanoz toksini ile kontamine olmuş difteri antitoksinine maruz kalan birkaç çocuğun ölümü üzerine 1902 yılında Biyolojik Kontrol Yasası çıkmıştır. 1955 yılında çocuk felci aşularının bazı partilerinde inaktivasyon işlemi tam sağlanamadığından, aşı uygulanan birçok çocukta çocuk felci gelişmiştir. Bunun üzerine ABD'de Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) bünyesinde Biyolojik Standartlar Bölümü kurulmuştur (8).

Aşı sonrası olumsuz olayları raporlamak üzere, CDC ve FDA tarafından ortak yönetilen VAERS, sağlık hizmeti sunucularından, aşı üreticilerinden, aşı uygulanan bireylerden gelen verileri kabul eder. Raporlar veri tabanına işlenir. İşlenen veriler CDC ve FDA’de çalışan bilim insanları tarafından incelenir (8, 102).

Dünya Sağlık Örgütü’ne göre aşının pazarlanmasından sonra risk-yarar dengesi ile ilgili kesin bir fikir edinmek için sürveyans programı uygulanmalıdır (97).

Aşıların güvenliği, saflığı ve etkinliği, onaylanmadan önce dikkatlice değerlendirilir, ancak güvenlik ve etkinliğin bazı yönleri, onaydan sonra sürekli izleme gerektirir; pazarlama sonrası faaliyetler, aşı kalitesini izlemek ve halk sağlığı programlarını bilgilendirmek için önlisans faaliyetleri için gerekli bir tamamlayıcıdır (8). Aşılamaı takiben görülen advers olayların bildirilmesi için kullanılan farklı ülkelerdeki ulusal sistemler Tablo 4.10’da verilmiştir (161).

**Tablo 4.10.** Farklı ülkelerde aşılamaı takiben advers olayların bildirilmesi için kullanılan ulusal sistemler (161).

Ülke	Sistem	Organizasyon
Amerika Birleşik Devletleri	Aşı Olumsuz Olay Raporlama Sistemi (VAERS)	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC); Gıda ve İlaç İdaresi (FDA)
Çin	Çin Olumsuz İlaç Reaksiyonu İzleme Sistemi	Çin Gıda ve İlaç İdaresi
Japonya	İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu	Sağlık, Çalışma ve Refah Bakanlığı
Rusya	Halk Sağlığının Denetlenmesi için Federal Hizmet	Rusya Sağlık Bakanlığı
Avustralya	Avustralya Advers İlaç Reaksiyonu Raporlama Sistemi	Tedavi Ürünleri İdaresi
Kanada	Aşılamanın Ardından Kanada Advers Olayları	Kanada Halk Sağlığı Kurumu
Belçika	Belçika Beşerî İlaçlar için Farmakovijilans Merkezi	Federal İlaç ve Sağlık Ürünleri Ajansı
Tayland	Ulusal Advers Ürün Reaksiyonu İzleme Merkezi	Tayland Gıda ve İlaç İdaresi
Türkiye	Türkiye Farmakovijilans Merkezi (TÜFAM)	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK)
İtalya	İtalya Farmakovijilans Advers Olay Spontan Raporlama Sistemi	İtalya İlaç Kurumu
Singapur	Sağlık Bilimleri Kurumu	Sağlık Bilimleri Kurumu
Polonya	Tıbbi Ürünler, Tıbbi Cihazlar ve Biyosidal Ürünlerin Ruhsat Ofisi	Polonya Düzenleme Kurumu

Sağlık hizmeti sunucuları, yerel raporlama sistemleri ile AEFI'leri bildirmeleri teşvik edilir. Dünya çapında bütün kaynaklardan gelen AEFI raporları, ilgili üreticiye iletilir ve merkezi güvenlik veri tabanına kaydedilir. Teşhis için yapılan testler ve tedavilerin de bulunduğu AEFI kaydı oluşturulur. Vakaların nedensellik değerlendirmesini yapmak için tüm bilgiler toplanır. AEFI raporlarının ayrıntı düzeyi, doğru ve eksiksiz olması, aşı güvenliğine dair güvenilir verilerin oluşturulmasında çok önemli bir rol oynar. Aşı uygulaması ile zamansal bir ilişki veya diğer aşılınmış bireylerde benzer AEFI'ler, nedensellik düşündürülebilir ancak nedenselliği kanıtlamak için ayrıntılı incelemeler gerekir (152, 161).

Son 15-20 yılda aşı güvenliği değerlendirmesi için çeşitli sistemler kurulmuştur. Küresel Aşı Güvenliği Danışma Komitesi, WHO'ya aşı güvenliği konusunda tavsiyede bulunan bağımsız bilimsel danışma organıdır. Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'nın bazı bölgelerinde yürürlükte olan başka sistemler de vardır. Bununla birlikte, düşük ve orta gelirli ülkelerde pazarlama sonrası güvenlik gözetim sistemi bulunmadığı ve aşı güvenliğinin izlemesi için küresel bir sisteme ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir. Uluslararası düzeyde iş birliği, lisans sonrası süreçlerin en uygun şekilde yürütülmesini sağlamak için gereklidir (8, 161).

### **4.3. Acil Kullanım Onayı**

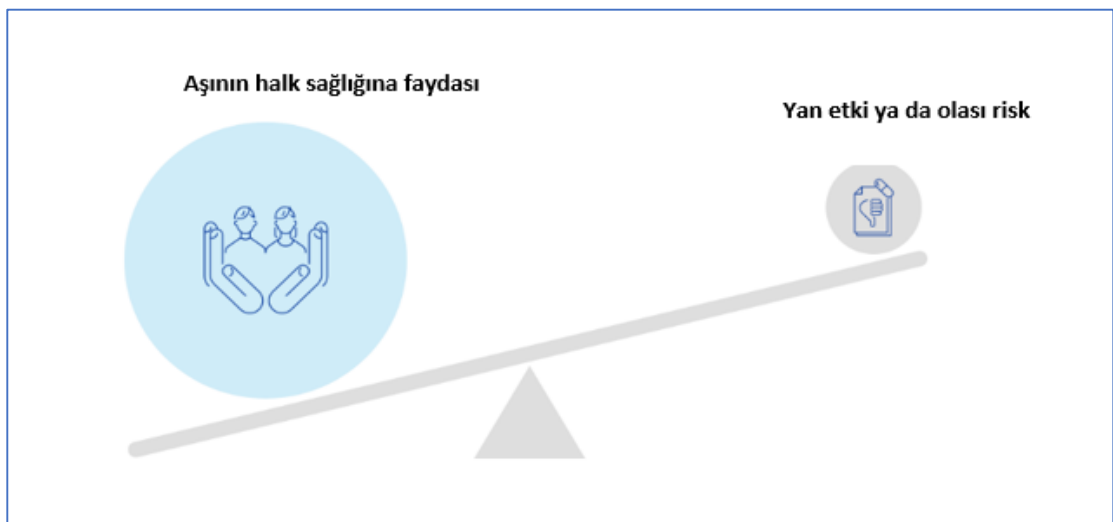
Bir aşının geliştirilmesi, test edilmesi ve ruhsatlandırılması genellikle on yıl veya daha fazla sürebilmektedir. Bu süreç, ulusal düzenleyici kurumlarca lisans başvurusunun incelenmesi ve değerlendirilmesi için olanak tanır. Ancak içinde bulunduğumuz Covid-19 pandemisi gibi olağanüstü koşullarda; klasik ruhsat yerine hızlı güvenilirlik ve etkililik değerlendirme sonuçlarına göre sınırlı kullanım onayı veya acil kullanım onayı verilerek toplumsal aşılamaya geçilebilmektedir. Aşı kullanıma sunulduktan sonra sürekli olarak izleme yapılır. Aşı güvenliğinin izlenmesi, dünyada aşı programlarına duyulan güveni korumak için önem teşkil etmektedir. Bir aşı ruhsatlandırıldıktan ve piyasaya sunulduktan sonra, güvenlik profili ve koruyucu etkinliği zamanla değişebileceğinden, tüm yaşam döngüsü boyunca güvenliği ve etkinliği izlenmelidir (7-9).

Koronavirüs (COVID-19), ilk kez Çin'in Wuhan bölgesinden bildirilmiş ve daha sonra yeni akut solunum sendromu koronavirüs 2'ye (SARS-CoV-2) neden olan

akut bir solunum yolu enfeksiyonu olarak tanımlanmıştır. SARS-CoV-2, insanları enfekte ettiği bilinen Orta Doğu solunum sendromu koronavirüsü (MERS-CoV) ve şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü (SARS-CoV)'dan sonra üçüncü patojenik Betakoronavirüstür. WHO, Mart 2020'de COVID-19'u küresel bir salgın olarak ilan etmiştir. COVID-19, dünya çapında ciddi bir halk sağlığı tehdidi haline gelmiştir. COVID-19 semptomları hafif ile şiddetli arasında değişmekte olup ateş, öksürük, yorgunluk, baş ağrısı, boğaz ağrısı ve pnömoni ile karakterizedir (107, 164).

Ocak 2021 itibarıyla WHO, aşılarda ön yeterliliği için ICH tarafından oluşturulan Ortak Teknik Dokümanı (CTD)'ni zorunlu hale getirmiştir (165). Ülkemizde de 2023'te revize edilen ve uygulamada olan Koşullu Ruhsatlandırma (Acil Kullanım Onayı) Başvurusu ve Değerlendirmesi Hakkında Kılavuz'da da etkililik, güvenilirlik ve kalite verileri CTD'ye uyumlu olacak şekilde liste halinde sunulur (166).

Acil durum kullanım listesi prosedürü, halk sağlığı için acil durumlar mevcut olduğunda yeni sağlık ürünlerinin uygun olup olmadığını değerlendirir. Amaç, güvenlik, etkinlik ve kaliteye bağlı olarak acil duruma müdahale etmek için ilaçları ve aşılarda en kısa sürede kullanıma sunmaktır. Acil durumun oluşturduğu tehdide ek olarak ürünün kullanımından elde edilecek yarar olası risklere karşı değerlendirilir (167). Aşının halk sağlığına olan yarar ve olası risk dengesi Şekil 4.3.'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.3.** Covid-19 aşısının olması gereken yarar-risk dengesi (168).



Dünya Sağlık Örgütü'ne göre bir aşının acil kullanım listesi prosedürüne uygun olması için bazı kriterleri yerine getirmesi gerekmektedir. Bunlar aşağıdaki gibi sıralanabilir (169).

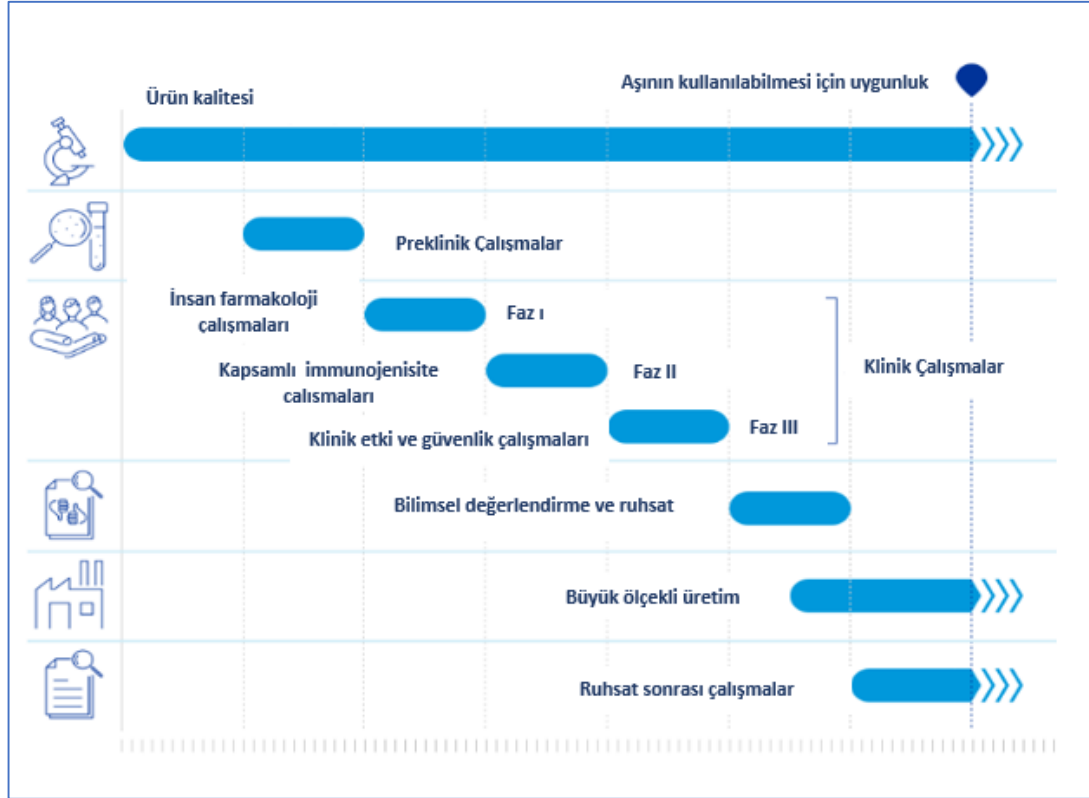
- Aşının koruma sağlamayı hedeflediği hastalık ciddi veya doğrudan yaşamı tehdit eden ve pandemiye neden olma potansiyeline sahip bir hastalık olmalı ve bu hastalık için lisanslı ürün olmamalıdır.
- Mevcut ürünler, salgınları önlemede başarısız olmalıdır.
- Ürünler İyi Üretim Uygulamalarına uygun üretilmelidir.
- Başvuru sahibi ürün lisanslandıktan sonra WHO ön yeterliliğine başvurmayı taahhüt etmelidir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde Acil Kullanım İzni (*The Emergency Use Authorization, EUA*) ve Avrupa ve Birleşik Krallık'ta Şartlı Pazarlama İzni ile COVID-19'a karşı aşılama uygulamasına geçilmiştir (31). Şartlı pazarlama izni , bazı ülkelerin acil bir durumda bir ilacın geçici kullanımına izin vermek için kullandığı acil durum kullanım izninden farklıdır . Acil kullanım izni, pazarlama izni değildir. Acil durumlarda EMA ve Birleşik Krallık prosedürü WHO ve FDA'den farklılık gösterir (168).

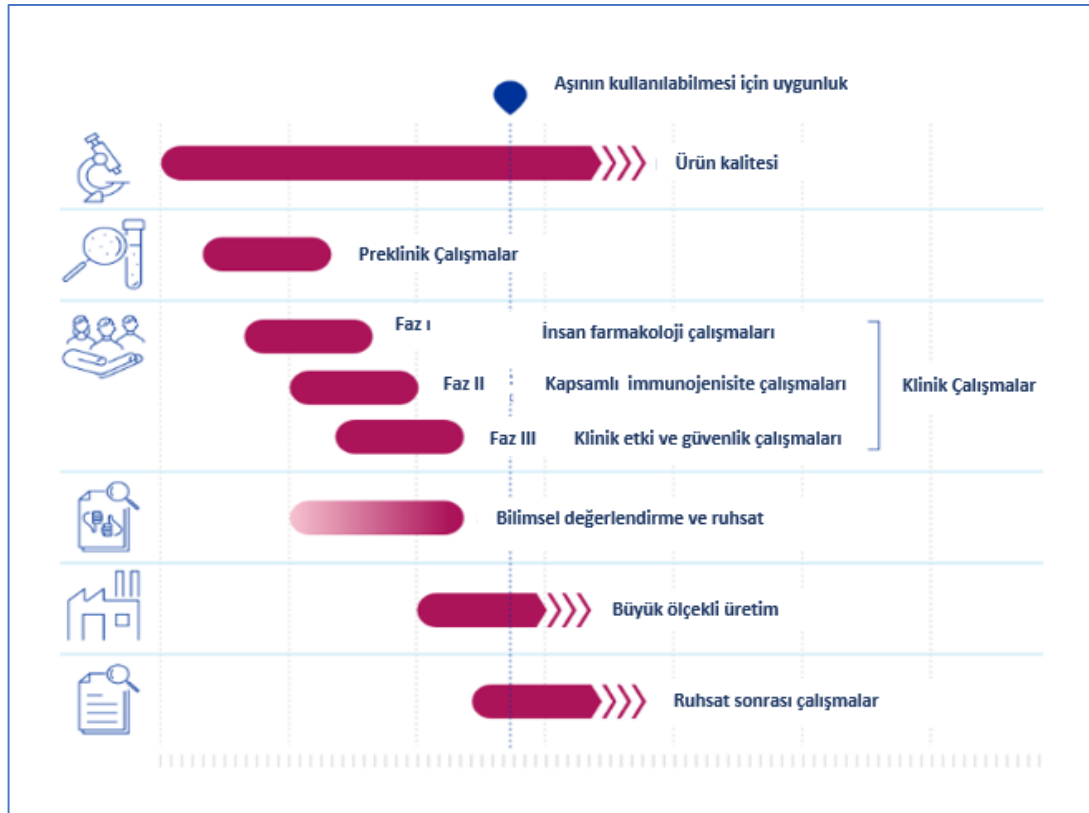
Avrupa İlaç Ajansı'nın şartlı pazarlama iznini onaylaması için kriterleri aşağıdaki gibidir (170).

- İlacın yararı olası riskten fazladır
- Başvuru sahibi, onay sonrasında kapsamlı veri sunmalıdır.
- İlaç daha önce karşılanmamış bir tıbbi ihtiyacı karşılamalıdır
- İlacın hastalar için hemen bulunmasının yararı, olası riskten daha fazla olmalıdır.

Avrupa İlaç Ajansı'nın standart yeni bir aşıya ve Covid-19'a karşı geliştirilen yeni bir aşıya onay verme süreçleri sırasıyla Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.'de gösterilmiştir (168).



Şekil 4.4. Standart yeni bir aşı geliştirme süreci (168).



Şekil 4.5. Covid-19'u hedefleyen yeni bir aşı geliştirme süreci (168).

Avrupa İlaç Ajansı'na göre yasal gerekliliklere bağlı kalarak geliştirme zamanını kısaltmak için önceden yapılmış çalışmaların sonuçlarını daha hızlı analiz etmek, kaynak, finansman ve düzenleyici strateji ile ilgili sonraki adımları planlamak için daha fazla insan kaynağını aynı anda kullanmak, klinik deneme fazlarını birleştirmek ya da güvenli ise bazı çalışmaları eş zamanlı yürütmek gibi yaklaşımlar kullanılabilir. AB ilaç mevzuatına göre, yeni bir ilacın değerlendirmesindeki standart süreç maksimum 210 günken EMA, COVID-19 aşılıları için pazarlama izni başvurularını ve değerlendirme sürecinin 150 iş gününün altına inmesini sağlamıştır (168).

Amerika Birleşik Devletleri'de FDA'e göre ciddi ya da hayati tehlikeye sebep olabilen hastalıkları veya durumları belirlemek, tedavi etmek veya engellemek için acil bir durumda kullanılmak üzere onaylanmamış tıbbi ürünlere veya onaylı tıbbi ürünlerin onaylanmamış kullanımlarına izin verebilir. Avrupa'da EMA'ya göre ilacın hemen bulunmasının yararının olası risklere ağır bastığı durumlarda rutinden daha az kapsamlı klinik veriler ışığında koşullu pazarlama izni verilebilir. Birleşik Krallık' ta, İlaçlar ve Sağlık Ürünleri Düzenleme Kurumu da EMA ile hemfikirdir (31, 170, 171).

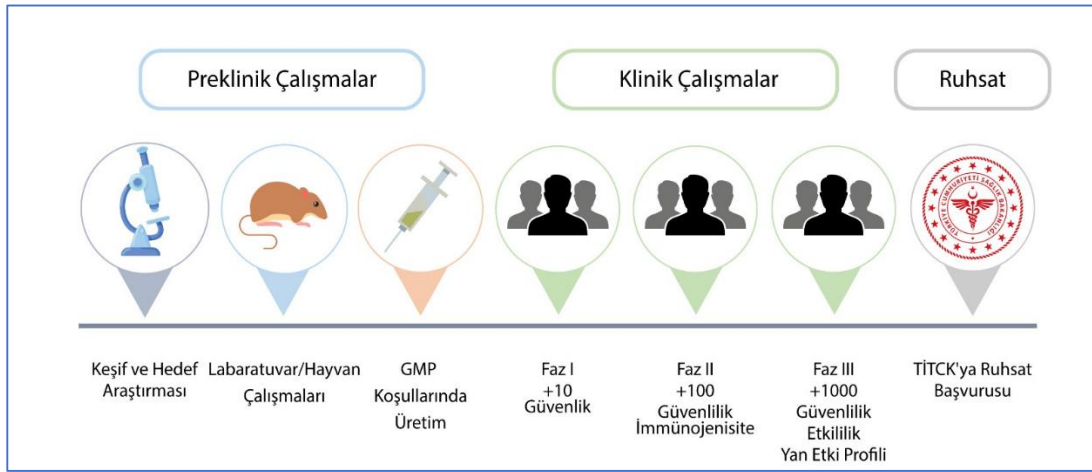
FDA'in acil kullanım onayı verme kriterleri aşağıdaki gibidir (172).

- Hedeflenen hastalık ciddi sonuçlara ya da hayati tehlikeye sebep olmalıdır
- Kullanılması planlanan ürünün etkinlik ve güvenliğini destekleyen yeterli çalışmalar olmalıdır.
- Kullanılması planlanan ürünün halk sağlığı için sağlayacağı yarar potansiyel risklerinden ağır basmalıdır.
- Hedeflenen hastalık için onaylanmış ürün bulunmamalıdır.

Acil bir durumda bir ürünün kullanılmasını onaylaması ya da şartlı pazarlama izni vermesi için değerlendirdiği kriterler WHO FDA ve EMA'ya göre benzer olup en önemli ortak nokta yarar -risk dengesinde yararın ağır basma gerekliliğidir. TİTCK'nın koşullu ruhsatlandırma onayı verirken gözettiği koşullar WHO, EMA ve FDA şartlarının tamamını kapsamaktadır (166, 169, 170, 172).

Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'nun koşullu ruhsatlandırma değerlendirme kılavuzunda 23/01/2023 tarihinde yapılan revizyonda Acil Kullanım Onayı (AKO) ifadesi koşullu ruhsatlandırma olarak değiştirilmiştir (166).

Ülkemizde Covid-19 aşuları da dahil olmak üzere viral aşuların klinik değerlendirmesinde yol gösterici olarak kullanılabilecek fakat yasal bağlayıcılığı olmayan 2020 yılında yayınlanan Viral Aşı Adaylarının Klinik Araştırmalara Geçişi İçin Gereklikler Tablosu bulunmaktadır. Bu tablo genel olarak WHO, ICH ve Avrupa Farmakopesini referans almıştır. ICH kılavuzlarının genellikle ilaçlara yönelik olduğunu ve aşuları kapsamadığını daha önce belirtmiştir (173). Ülkemizde Covid-19 aşı üretim süreci Şekil 4.6.'da verilmiştir.



**Şekil 4.6.** Ülkemizde Covid-19 aşı üretim süreci (174).

Covid-19 aşularının acil kullanım onayına ilişkin FDA'in kılavuzunda platform teknolojisinin kullanımına onay verilmiştir. Platform teknolojisi tek değişikliğin antijen ya da antijeni eksprese eden nükleik asit sekansında olduğu, hedeflenen aşular arasında standartlaştırılmış bileşenlere sahip olan bir teknoloji olarak tanımlanabilir. Klinik dışı değerlendirme yapmak yerine toksisite değerlendirmesi yapılırken platform teknolojisi ile elde edilen veriler kullanılabilir. Benzer Şekilde EMA, SARS-CoV-2'nin varyant suşlarına karşı koruma sağlaması amaçlanan aşular için düzenleyici gereklikler belgesi yayınlamış ve burda varyant aşuların geliştirilmesini onaylamak için daha fazla *in vivo* ve *in vitro* alışma yapılmasına gerek olmadığını belirtmiş fakat 2021 sonlarında yayınlanan koronavirüse karşı koruma amaçlı aşılarda varyant suşların güncellenmesi için kılavuzda daha fazla test yapılabileceği belirtilmiştir (31, 172).

Meksika’da aşı ürünlerini düzenlemekten sorumlu ulusal düzenleyici kurum olan Sıhhi Risklere Karşı Federal Koruma Komisyonu (*Federal Commission for the Protection against Sanitary Risk, COFEPRIS*) da CTD formatını benimsemiş ve Covid-19’a karşı geliştirilen aşuların üretilmesi ve yetkilendirmesine ilişkin CTD’ye uygun kılavuz yayınlamıştır. Meksika da diğer ülkeler gibi acil durum kullanım yetkilendirmesi planı kapsamında çok sayıda aşuyu onaylamıştır (165).

Covid-19 için geliştirilen aşular ile ilgili dünyanın farklı bölgelerinde faaliyet gösteren düzenleyici kurumların ortak paydada buluşup küresel uygulamalar benimsemesi, gerekli olan klinik çalışmaların gereksiz yere tekrarlanmasını önleyecek ve aşının piyasaya sunulmasını hızlandıracaktır (16).

## 5. TARTIŞMA

Aşılar, bulaşıcı hastalıkları kontrol etmenin en etkili yollarından biri olarak görülmektedir (168). Dünya çapında her yıl yaklaşık 2,5 milyondan fazla çocuğun hayatını kurtarmaktadır. Kullanıma sunulan aşı sayısının artmasıyla birlikte yaşamı tehdit eden birçok hastalığa karşı koruma sağlanmaktadır (169).

Ulusal bağışıklama programları ve bilimsel çalışmalar sayesinde çiçek hastalığı ve çocuk felci dünyanın çoğu yerinde ortadan kaldırılmış, kızamık, kızamıkçık, difteri, boğmaca, tetanoz, influenza, menenjit ve kabakulak insidansı önemli ölçüde azaltılmıştır. Gelişmiş bağışıklama programlarının bulunduğu ülkelerde, aşının önlenebildiği hastalıkların insidans oranları %99 oranında düşmüştür (170).

Bir aşı formülasyonu belirli bir amaca hizmet etmekte olan farklı bileşenlerden ve antijenden oluşur. Kontaminasyona karşı formülasyonu koruyacak bir koruyucu, aşının oluşturacağı immün yanıtı artıracak bir adjuvan ve aşının stabilitesini koruyabilmesi için kullanılan bir stabilizatör bu bileşenlerin başlıcalarıdır (21).

Adjuvan olarak yaygın kullanılan alüminyumun potansiyel toksisitesi yıllardır tartışma konusudur. Mevcut veriler ışığında EFSA'nın alüminyum için belirlediği TWI sınırlarının aşı formülasyonlarında bulunan miktarı aşmadığını göz önünde bulundurarak bu miktarın kabul edilebilir olduğunu söylemek mümkündür (14, 59). Bir başka tartışma konusu olan bileşen ise tiyomersaldir. Yapısı, asıl toksisiteden sorumlu olan metil civadan farklı da olsa bazı çalışmalarda nörolojik bozukluklarla ilişkilendirilmiştir (54, 67, 68). Alüminyumda olduğu gibi tiyomersalin masum olduğu savunan çalışmalar mevcut olsa da dünya genelinde tedbir amaçlı bazı kısıtlamalar önerilmiştir (58). Aşılarda tiyomersal kullanımının kaldırılması, değiştirilmesi ya da azaltılması WHO ve EMA tarafından tavsiye edilmektedir. ABD tiyomersal içermeyen bir çocukluk aşı programına geçiş yapmıştır. Avusturya'da 5 yaşından küçük çocuklarda kullanılan aşılardan tiyomersal içermemesi ya da eser miktarda içermesi için sınırlama getirilmiştir. Ülkemizde de çocukluk çağında uygulanan aşı formülasyonlarından tiyomersal çıkarılmıştır. Düzenleyici otoritelerin tiyomersalin kullanılmaması hakkındaki tavsiyeleri genel olarak benzer olsa da katılık dereceleri farklılık göstermektedir (57, 66, 71, 73).

Aşılar güvenli şekilde tasarlanmış ve üretilmiş olsa da aşı uygulamasının ardından istenmeyen olaylara rastlanabilmektedir. Bu olayların çoğu, ya tedavi gerekmeksizin kendiliğinden iyileşen küçük reaksiyonlar olabilir (örn. enjeksiyon yerindeki lokal reaksiyonlar) ya da ortaya çıkması tesadüfi olup aşı uygulaması ile nedensellik ilişkisi bulunmayabilir. Buna ek olarak, nadiren ciddi reaksiyonlara ve önemli sağlık sorunlarına yol açabilir (175).

Aşıların insan kullanımına sunulmadan önce antijen ya da diğer bileşenlere bağlı toksisite potansiyelinden dolayı bir dizi testten geçmesi gerekmektedir. Antijen ve aşı formülasyonu için keşif araştırmaları bittikten sonra prelinik çalışmalar yapılır. Bu çalışmaların yürütülmesinde referans alınacak düzenleyici kılavuzlar mevcuttur. WHO'nun 2005 yılında yayınladığı kılavuz birincil standarttır. Buna ek olarak ulusal düzenleyici otoriteler uluslararası standartlara uygun olmak koşuluyla sekonder çalışma standartları belirleyebilmektedir (11, 15, 57, 61, 93). Sekonder çalışma standartlarının ülke şartlarına göre şekillendirilebilmesi güvenli aşı üretiminde ülkelerin yaklaşımlarını değiştirebileceğinden uzmanlar tarafından dikkatli değerlendirilmelidir.

Aşıların prelinik çalışmaları için kullanılacak ilk kılavuz 1997 yılında yayınlanan EMA kılavuzudur. Bir diğer referans da FDA'in 2006 yılında aşıların gelişimsel toksisite çalışmalarına ilişkin kılavuzudur. FDA'in tüm prelinik toksisite çalışmalarını içeren bir kılavuzuna rastlanmamıştır. Çin ve Japonya'da sırasıyla 2005 ve 2010 yıllarında aşıların prelinik toksisite çalışmalarında referans olabilecek ulusal kılavuzlar yayınlanmıştır (12, 91, 115). Ülkemizde ise böyle bir kılavuzun ilk kez yayınlanması 2020 yılının sonlarını bulmuştur. Aşıların klinik dışı değerlendirmesine ilişkin kılavuzun ülkemizde 2020 yılına kadar yayınlanmamış olmasını bir eksiklik olarak değerlendirmek mümkünken bu kılavuzun yayınlanmasında ki itici gücün Covid-19 pandemisi olup olmaması merak edilen bir husustur. Aşıların prelinik toksisite çalışmalarına ilişkin uluslararası uyumu sağlayacak bir ICH kılavuzunun mevcut olmaması ise global bir eksiklik olarak değerlendirilebilir. ICH'nin toksisite testlerine ilişkin kılavuzları ilaçlara yönelik olup genelde aşılar kapsam dışı tutulmuştur. Aşıları kapsayan sadece üreme ve gelişimsel toksisite değerlendirilmesine ilişkin kılavuz mevcuttur. Tüm bu kılavuzların bazı farklı yaklaşımları olsa da en

büyük ortak payda toksisite değerlendirme testlerinin iyi laboratuvar uygulamaları (GLP) standartlarına uygun yapılması gerektiğidir.

*In vivo* prelinik çalışmalar olan tek doz toksisite testleri, tekrarlı doz toksisite testleri, üreme ve gelişimsel toksisite testleri, karsinojenisite testleri, genotoksisite ve mutajenite testleri ve güvenlik farmakolojisi testleri yapılırken hayvanlara aşılar uygulanır ve etkileri izlenir. Bu aşamadaki en kritik nokta uygun hayvan türünün seçilmesidir. Hem hedeflenen patojene duyarlı hem de immün yanıtı insanlara benzeyen hayvan modelinin kullanılması doğru veri elde edilmesi için oldukça önem arz etmektedir. Küçük kafeslerde taşınmaları, bakımının kolay olması ve bağışıklık yanıtın insanlara benzemesinden dolayı en çok tercih edilen tür farelerdir. Yaygın tercih edilen diğer türler ise kobaylar ve tavşanlardır. Dünyanın farklı bölgelerinde 2009-2020 yılları arasında yapılan çalışmalara göre kullanılan hayvanlar ve bunların kullanım oranları incelendiğinde farelerin en çok kullanılan tür olduğunu doğrulamak mümkünken Yeni Zelanda'da %41,16 oranında en yaygın kullanılan birinci türün sığır, %18,69 oranında en yaygın kullanılan ikinci türün ise koyun olması, ülkemizde ise en çok kullanılan türün %37,01 oranında balık olması önemli bir farklılıktır (13, 14, 105, 107, 111).

Prelinik çalışmalar kapsamında yapılacak toksisite değerlendirme testleri aşı formülasyonu ve hedeflenen popülasyona bağlı olarak değişebilir. WHO ve EMA'ya göre rutinde nihai aşı ürünü için mutajenite genotoksisite ve karsinojenisite testlerinin yapılmasına gerek yokken, yeni bir adjuvan formülasyona dahil edilecekse bu testler gerekli olabilmektedir. Bu konuda hemfikir olan bu iki düzenleyici kurumun yaklaşımındaki farklılık ise toksisite değerlendirmesinde kullanılacak tür sayısıdır. WHO bu çalışmaların tek türde yapılmasının yeterli olacağını belirtirken EMA biri kemirgen diğeri kemirgen olmayan iki farklı türde yapılması gerektiğini belirtmektedir. WHO'nun hayvan kullanımının minimum düzeyde tutulması yönündeki bu yaklaşımı 3R prensiplerine daha uygun olarak etik açıdan kabul edilebilmekle birlikte toksisite testlerinin güvenilirliği açısından yeterli olup olmadığı iyi değerlendirilmelidir. TITCK'nın aşuların klinik dışı değerlendirilmesine ilişkin kılavuzunda adjuvan ve adjuvan- aşı kombinasyonlarının değerlendirilmesinde WHO ve EMA kılavuzlarının referans alınacağı belirtilmiştir. Ancak, değerlendirme yapılırken üzerinde çalışılması gereken tür sayısı belirtilmemiştir (14, 50, 92, 93). Bu



durum toksisite çalışmalarının planlanması sırasında eksikliklerin ortaya çıkmasına neden olabilir.

Aşının kullanımı sırasında hedeflenen popülasyona göre yapılmasına karar verilen bir başka toksisite değerlendirme çalışması üreme ve gelişimsel toksisite testleridir. Genel yaklaşım, gelişimsel toksisite testler genellikle gerekli olmamakla birlikte çocukluk çağı aşıları için yapılmasının uygun olacağı ve hedef popülasyon hamile kadınları ya da çocuk doğurma potansiyeli olan kadınları kapsıyor ise testlerin yapılması gerektiği yönündedir. WHO, EMA, FDA, ICH ve TİTCK' nın bu konudaki tavsiyelerinin genel olarak örtüştüğü söylenebilir (12, 15, 92, 115). WHO ve FDA'ın erkek üreme toksisitesi çalışmalarıyla ilgili yaklaşımında ise bir farklılık söz konusudur. FDA kılavuzlarında aşının erkek fertilitesi üzerinde etkisinin değerlendirilmesi gerekli görülmezken, WHO tarafından yayınlanan kılavuz erkek üreme toksisite çalışmalarını da üreme toksisite testlerine dahil etmektedir (91). Başka bir ayırım ise üreme ve gelişimsel toksisite çalışmalarının yapılma zamanıdır. FDA bu çalışmaların Faz III ile paralel yapılabileceğini tavsiye ederken, EMA'ya göre çalışmalar Faz III çalışmalarından önce tamamlanmalıdır (55).

Aşıların çoğu için tekrar dozlama gerektiğinden toksisite değerlendirme çalışmalarından biri de tekrarlı doz toksisite testleridir. Dünyanın farklı bölgelerinde bulunan düzenleyici otoriteler bu testlerin yapılması gerektiği konusunda hemfikir olsa da yaklaşımları bazı farklılıkları içermektedir. Bunlardan en önemlisi yukarıda bahsedilen testlerde kullanılan tür sayısıdır. WHO ve EMA kılavuzlarında adjuvanların toksisite değerlendirmesinde kullanılacak tür sayısı ile ilgili tavsiyelerinin aksine tekrarlı toksisite testlerinin tek hayvan türünde yapılması gerektiği belirtilirken; TİTCK kılavuzunda tekrarlı doz toksisite testlerinin en az biri kemirgen olmayan iki memeli türe yapılması gerektiği belirtilmektedir. İki memeli türünde tekrarlı doz toksisite çalışmalarının yapılması gerektiğini kabul eden tek kılavuz, ICH M3(R2) kılavuzu olup bu kılavuzda aşılar kapsam dışı tutulmuştur. TİTCK kılavuzunun büyük ölçüde WHO ve EMA ile örtüşmesine rağmen bu konuda farklı bir kural belirlemiştir (12, 15, 52, 92). Ayrıca Özdem'in 2022 yılında yaptığı çalışmada TİTCK kılavuzundaki ilgili cümlelerin, tavsiye mi yoksa gereklilik mi olduğu açıkça belirtilmediği, ifadenin 3R prensiplerine uygun olmadığı ve WHO kılavuzuna aykırı olduğu gerekçesiyle eleştirilmiş buna ek olarak bu cümlelerin kılavuzdan

çıkarılması gerektiği ileri sürülmüştür (10). EMA'nın adjuvanların toksisite değerlendirmesinde iki türde çalışılması gerektiği yaklaşımı dolayısıyla TİTCK'nın EMA'ya referans alması ve tekrarlı doz toksisite testleri için en az iki farklı türün kullanılması söz konusu olabilir.

Tekrarlı doz toksisite çalışmalarında ana farklılıklardan biri de doz aralıkları arasında bırakılan süre ile ilgili Japonya'nın yaklaşımıdır. Japonya'nın düzenleyici otoritesine göre, aşı mekanizmasının bilindiği ve vücut ağırlığına göre yeterli dozun kullanıldığı durumlarda hayvanlar ve insanlar arasındaki dozlama sıklığı eşit olabilir. WHO, EMA, FDA ve TİTCK dozlama arası süreyi genellikle 2-3 hafta olarak kabul etmektedir. Tekrarlı doz toksisite testleriyle ilgili bir diğer farklılık ise testlerin kapsamı ve bazı testler ile birleştirilmesi konusundadır. Örneğin WHO'ya göre lokal toksisite testleri tek başına yapılabileceği gibi tekrarlı doz toksisite çalışmaları kapsamında da yapılabilir. TİTCK kılavuzunda lokal toksisite testleri ayrı olarak yapılır. EMA'ya göre ise tekrarlı doz toksisite çalışmaları güvenlik farmakolojisi testleriyle birleştirilebilir (12, 55, 92, 97).

Aday aşının bağışıklık sistemi dışındaki sistemlere etkisinin olduğuna dair gözlemler mevcut ise WHO, güvenlik farmakolojisi çalışmalarının, toksisite değerlendirme çalışmalarına dahil edilmesi gerektiğini belirtmektedir (15). Ülkemizde ise bu çalışmalar farmakodinamik çalışmalar kapsamında yapılmaktadır (92). ICH'nin 2000 yılında güvenlilik farmakolojisi çalışmalarına ilişkin kılavuzu genelde olduğu gibi aşıları kapsamamaktadır. ICH'nin resmi internet sitesindeki verilere göre bu kılavuz, FDA ve EMA gibi otoriteler ile Brezilya, Singapur, Kanada, Kore, Japonya, Çin, İsviçre gibi ülkeler tarafından tanınmıştır. Kılavuzu kabul eden ülkeler arasında Türkiye bulunmamasına rağmen TİTCK kılavuzunda güvenlik farmakolojisi çalışmaları için bu kılavuzun referans alınabileceği belirtilmektedir (92, 118).

Dünyanın farklı bölgelerinde gerekliliği konusunda pek çok tartışma olan toksisite değerlendirme testlerinden biri de ATT'lerdir. ATT'lerin yapılma amacı her bir aşı partisinin herhangi bir kontaminasyon içerip içermediğini değerlendirmektir (120). Tekrarlanabilir, spesifik ve güvenilir olmamalarının yanı sıra 3R ilkelerine uygun olmaması gerekçesiyle birçok ülkede uygulanmamaktadır ve 80' den fazla monograftan çıkarılmıştır. Ayrıca, FDA, WHO ve EMA sırasıyla 2015, 2018 ve 2019 yıllarında bu testin gerekli olmadığını duyurmuştur (122, 124).

Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa ülkelerinin yanı sıra Kanada ve Tayland da ATT'nin gerekli olmadığına karar vermiştir. ATT'nin kısmen gerekli olduğu ülkeler arasında Arjantin, Brezilya, Güney Kore ve Japonya yer alırken; Rusya, Çin ve Endonezya 'da ATT gereklidir. ATT Hindistan'da insan kullanımını için geliştirilen aşılara yönelik çoğu monograftan kaldırılmış ve Güney Afrika'da da ATT uygulaması durdurulmuştur (120, 126). TİTCK kılavuzunda ATT'nin gerekliliği ile ilgili bilgiye rastlanılmamıştır. Kılavuzun 2020 yılında yayınlandığı ve genel olarak WHO ve EMA'yı referans aldığı dikkate alındığında bu testlerin yapılmasının gerekli görülmediği değerlendirilmiştir. Ancak konuya ilişkin bir notun eklenmesi karışıklıkların ve hatalı yorumlamaların önüne geçebilecektir.

Dünya genelinde farklı ülkelerin ATT yaklaşımları incelendiğinde Çin'in sıklıkla salgın ile mücadele eden ve aşı gereksinimi yüksek olan oldukça kalabalık bir ülke olması nedeniyle ATT'yi uygulamaktadır. Çin ve Japonya'nın birçok farklı alanda gerisinde olan Hindistan ve Güney Afrika gibi bölgeler ise ATT konusunda WHO kılavuzunu referans aldığı görülmektedir.

Aşıların *in vivo* prelinik toksisite değerlendirme çalışmalarında kullanılan hayvan sayısının fazla olması ve işlemlerin acılı olması nedeniyle alternatif yaklaşımlar geliştirilmektedir. Bu yaklaşımla yakın gelecekte aşı güvenliliğinin değerlendirilmesinde yeni alternatif yöntemler kullanılarak hayvan testlerini minimuma indirecektir. Ayrıca 3R kuralına ilişkin bilgilerin üretici-toplum-düzenleyici otorite arasında paylaşılması ile yeni test yöntemlerine gereksinimin uluslararası kabulü sağlanabilir (138, 176).

Farklı ülkelerin bir araya gelerek yaptığı çalıştay sonucunda 3R prensiplerinin uygulanmasında en büyük engelin, aşı üreticilerini ihracat yaptıkları ülkelerin otoritelerinin farklı kurallarını yerine getirmeye zorlayan uluslararası uyum eksikliği olduğu ifade edilmiştir (135). Farklı ülkelerde bulunan aşı üreticilerine yapılan bir anket çalışmasında üreticilerin toksisite değerlendirme sürecinde hayvansız teknolojiler kullanma konusundaki çekincelerinin elde ettikleri verilerin otoritelerce kabul edilmeyeceğiyle ilgili endişelerden kaynaklı olduğu fark edilmiştir (147).

Prelinik çalışmaların tamamlanmasını takiben klinik çalışmalar başlatılır. 100 kişiden daha az gönüllünün bulunduğu Faz I çalışmalarında güvenliğe odaklanır, Faz II çalışmalarında, birkaç yüz gönüllü üzerinde belirlenen doz aralığı ile

immünojenisite değerlendirilir ve daha büyük çalışma gruplarını kapsayan Faz III çalışmalarında, dozlama ve aşılama programının amaçlanan sonuçları sağlayıp sağlamadığını değerlendirmek amaçlanır (20, 152). Faz III çalışmalarını takiben PMS olarak da adlandırılan Faz IV çalışmaları yapılmaya devam etmektedir (11, 16). Klinik çalışma uygulamaları incelendiğinde WHO, EMA ve FDA uygulamalarının büyük ölçüde benzerlik gösterdiği görülmüştür (94, 96, 97). Ülkemizde aşuların klinik değerlendirmesine ilişkin bir kılavuz bulunmamakla birlikte aşular da dahil tüm ilaç ve biyolojik ürünlerin klinik değerlendirilmesinde son birkaç aya kadar 13.04.2013 tarihli resmi gazetede yayınlanan İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik referans alınmıştır. 27.05.2023 tarihinde bu yönetmelik yürürlükten kaldırılmış ve Beşeri Tıbbi Ürünlerin Klinik Araştırmasına Yönelik Yönetmelik yürürlüğe girmiştir (99). Ülkemizde yeni bir aşının toksisite değerlendirme sürecine ilişkin saptanan en büyük eksiklik aşuların klinik araştırmalarına yönelik ayrı bir kılavuzun mevcut olmamasıdır. Bu durum uygulamada birtakım eksikliklerin ve farklılıkların ortaya çıkmasına neden olabileceğinden, yeni bir kılavuzun oluşturulmasının uygun olacağı değerlendirilmiştir.

ICH' nin son halini tamamlayıp 2021 yılında yayınladığı klinik araştırmalara ilişkin kılavuzda net bir şekilde aşuların kapsam dışı tutulduğu ifade edilmese de ilaç ibaresi üzerinden klinik çalışmalara ilişkin hususlar açıklanmıştır. İlgili kılavuzun uygulandığı ülkeler arasında ABD, Singapur, Kanada, Japonya, İsviçre ve Avrupa ülkeleri bulunurken, kılavuz Çin ve Brezilya'da uygulama sürecindedir. Suudi Arabistan, Meksika ve Türkiye uygulanmayan ülkelerdir (177).

Birçok ülkede aşının ruhsatlandırılmasını takiben aşı etkilerini izlemeye yönelik farmakovijilans sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemlerinin genel prensipleri benzer olup bazı yaklaşımlar, bağışıklamanın organizasyon yapısına ve ülkedeki mevcut kaynaklara bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Bu farklılıkları ortadan kaldırmak ve uluslararası uyumu sağlamak amacıyla 2011 yılında Küresel Aşı Güvenliği Planı geliştirilmiştir. Bu sayede, tüm düşük ve orta gelirli ülkelerde aşı farmakovijilansına sistemik bir yaklaşım oluşturmak ve desteklemek amaçlanmıştır. (175). Farmakovijilans sistemleri, nedenselliği hızlı bir şekilde araştırarak değerlendirmek, yarar-risk dengesini belirlemek, etkili iletişim ve doğru veri sağlamak için yeterli olmalıdır (178).

Aralık 2019'da SARS-CoV-2'nin Çin'de ortaya çıkmasından bu yana, dünyada bu salgın tam olarak başarılı bir şekilde engellenememiştir. Salgını kontrol etmek amacıyla pek çok aşı başarılı klinik deney sonuçları ile WHO tarafından acil kullanım için yetkilendirilmiştir (179).

Amerika Birleşik Devletleri'nde EUA ve Birleşik Krallık'ta Şartlı Pazarlama İzni ile COVID-19'a karşı geliştirilen aşılardan kullanımı başlamıştır (31). Acil durumlarda EMA ve Birleşik Krallık prosedürü WHO ve FDA'dan farklılık gösterir (168).

TİTCK'nın koşullu ruhsatlandırma değerlendirme kılavuzunda 23/01/2023 tarihinde yapılan revizyonda Acil Kullanım Onayı (AKO) ifadesi koşullu ruhsatlandırma olarak değiştirilmiştir. Aynı revizyonda Beşerî Tıbbi Ürünler Ruhsatlandırma Yönetmeliği'nin zaten AB ile uyumlu olmasından dolayı kılavuzun dayanak bölümünde bu mevzuata tekrar yer verilmesine gerek görülmemiş ve dayanak kısmı da değiştirilmiştir. Bunlardan hareketle ülkemizde acil durumlarda şartlı ruhsatlandırmada izlenecek adımlarda EMA'nın referans aldığı görülmüştür (166).

Tez kapsamında aşı güvenliliğinin ortaya konması amacıyla yapılan toksisite testlerinin dünyada ve ülkemizde uygulanış şekilleri ortaya konmuş, farklılıklar, benzerlikler ve olası eksiklikler özetlenmiştir. Ülkemizdeki uygulamalarda bu eksikliklerin giderilmesi, aşı güvenliğinin uluslararası standartlarda ortaya konması ve aşılarda uyuncun artması aşamalarında yararlı olabilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında dünyada yeni aşı üretiminde uygulanan toksikolojik değerlendirmelerin karşılaştırılmasıyla varılan sonuç ve öneriler aşağıda özetlenmiştir:

- Aşılar halk sağlığının korunmasında çok önemli role sahip olup her yıl milyonlarca yetişkin ve çocuğun hayatını kurtarmaktadır (1, 175).
- Aşıların güvenlilikleri, kullanıma sunulmadan önce prelinik ve klinik çalışmaları içeren toksikolojik testler kullanılarak değerlendirilmektedir (11, 91).
- Sağlık otoritelerinin referans aldığı kılavuzlar genel olarak birbiri ile uyumlu olsa da belirli noktalarda yaklaşım farklılıkları bulunmaktadır (12, 15, 91).
- Küresel kılavuzlara uyum, bölgeler arası farklılıkları azaltmakta, dünya genelinde geçerliliği bulunan aşıların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (10).
- Yeni bir adjuvanın aşı formülasyonuna dahil edilmesi halinde yapılması tavsiye edilen toksisite çalışmaları WHO'ya göre bir türde yapılabilirken EMA en az iki türde çalışma yapılması gerektiğini belirtmektedir. TİTCK' nın aşıların klinik dışı değerlendirilmesine ilişkin kılavuzunda adjuvan ve adjuvan-aşı kombinasyonlarının değerlendirilmesinde WHO ve EMA kılavuzlarının referans alınacağı belirtilmiş olmakla birlikte değerlendirme yapılırken üzerinde çalışılması gereken tür sayısı net olarak verilmemiştir. Bu da ülkemizdeki aşı çalışmalarında dünya standardizasyonunu sağlamak açısından eksiklik olarak görülmüştür (12, 15, 92).
- Aşıların klinik dışı değerlendirilmesi için yayınlanan TİTCK kılavuzunda güvenlilik farmakolojisi çalışmaları için ICH' nin güvenlilik farmakolojisine ilişkin kılavuzunun referans alınabileceği belirtilmekteyken, ICH resmi internet sitesinde ilgili kılavuzun henüz uygulanmadığı ülkeler arasında Türkiye bulunmaktadır (92, 118). Bu bilgiler birbiriyle çelişmekte olup TİTCK kılavuzunda güvenlilik farmakolojisi çalışmaları ile ilgili hususların aydınlatılması gerekmektedir. Buna ek olarak aday aşının bağışıklık sistemi dışında farklı sistemleri etkileyebileceği öngörülüyorsa bu çalışmaların WHO kılavuzu referans alınarak toksisite çalışmalarına dahil edilmesi uygun olacaktır.

- Ülkemizde yürürlükte olan Beşerî Tıbbî Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmeliğin revize edilip ilaç ve aşılar için ayrı kılavuzlar hazırlanması gerekmektedir. Hazırlanacak olan aşılarla ilişkin klinik değerlendirme kılavuzunun dünya genelinde aşı standartlarını karşılaması açısından sağlık otoritesi olarak WHO'yu referans alması, ilaçların klinik değerlendirme sürecine ilişkin kılavuzda ise WHO ve ICH'nin ilaçların klinik değerlendirmelere ilişkin kılavuzun referans alınarak hazırlanması uygun olabilir. Buna ek olarak ICH' nin aşıları kapsayan klinik ve klinik dışı değerlendirilmesine ilişkin kılavuzlar yayınlaması aşı çalışmalarında uluslararası uyumu güçlendirebileceği değerlendirilmiştir.
- 3R prensiplerinin karşılaştığı sorunları saf dışı bırakmak için 3R prensiplerinin daha açık bir şekilde kılavuzlarda yer alması, test yöntemlerine yönelik gerekliliklerin uluslararası uygulamalarla paralel hale getirilmesi ve 3R ile ilgili bilgilerin üretici-toplum-düzenleyici otorite arasında paylaşılması gerekmektedir (176).
- Söz konusu tez çalışmasının aşı üretiminde yapılan toksisite değerlendirme sürecinin tam olarak anlaşılmasına, eksikliklerin ortaya konmasına, aşı ile ilgili tereddütlerin azalmasına ve böylece aşı uygulama uygulamasına olan uyuncun artmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Vetter V, Denizer G, Friedland LR, Krishnan J, Shapiro M. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Ann Med*. 2018;50(2):110-20.
2. Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(2):83-100.
3. Verdier F, Non-clinical vaccine safety assessment. *Toxicology*. 2002;174(1):37-43.
4. D'Amico C, Fontana F, Cheng R, Santos HA. Development of vaccine formulations: past, present, and future. *Drug Deliv Transl Res*. 2021;11(2):353-72.
5. Alharbi N, Skwarczynski M, Toth I. The influence of component structural arrangement on peptide vaccine immunogenicity. *Biotechnol Adv*. 2022;60:108029.
6. Cunningham AL, Garcon N, Leo O, Friedland LR, Strugnell R, Laupeze B, et al. Vaccine development: From concept to early clinical testing. *Vaccine*. 2016;34(52):6655-64.
7. Hartmann K, Pagliusi S, Precioso A. Landscape analysis of pharmacovigilance and related practices among 34 vaccine manufacturers' from emerging countries. *Vaccine*. 2020;38(34):5490-7.
8. Lopalco PL, DeStefano F. The complementary roles of Phase 3 trials and post-licensure surveillance in the evaluation of new vaccines. *Vaccine*. 2015;33(13):1541-8.
9. Preiss S, Garcon N, Cunningham AL, Strugnell R, Friedland LR. Vaccine provision: Delivering sustained & widespread use. *Vaccine*. 2016;34(52):6665-71.
10. Ozdem SS, An overview of non-clinical safety studies in current Turkish regulations for the development of COVID-19 vaccines. *Biologicals*. 2022;75:1-2.
11. Singh K, Mehta S. The clinical development process for a novel preventive vaccine: An overview. *J Postgrad Med*. 2016;62(1):4-11.
12. European Medicines Agency (EMA). Note For Guidance on Preclinical Pharmacological And Toxicological Testing Of Vaccines. London: EMA; 1997.
13. Green MD, Al-Humadi ND, Preclinical Toxicology of Vaccines. Faqi AS, editor. *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*. Amerika Birleşik Devletleri : Elsevier Inc; 2017.
14. Wolf JJ, Kaplanski CV, Lebron JA. Nonclinical safety assessment of vaccines and adjuvants. *Methods Mol Biol*. 2010;626:29-40.
15. World Health Organization (WHO). Who Expert Committee on Biological Standardization. Geneva :WHO;2005.1-154. Report No:Fifty-fourth.



16. Black S, Bloom DE, Kaslow DC, Pecetta S, Rappuoli R. Transforming vaccine development. *Semin Immunol.* 2020;50:101413.
17. Dumpa N, Goel K, Guo Y, McFall H, Pillai AR, Shukla A, et al. Stability of Vaccines. *AAPS PharmSciTech.* 2019;20(2):42.
18. Shukla VV, Shah RC. Vaccinations in Primary Care. *Indian J Pediatr.* 2018;85(12):1118-27.
19. Clem AS. Fundamentals of vaccine immunology. *J Glob Infect Dis.* 2011;3(1):73-8.
20. Stern PL. Key steps in vaccine development. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2020;125(1):17-27.
21. How are vaccines developed? [Internet].2020 [Erişim tarihi 29 Ocak 2023]. Erişim adresi: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/how-are-vaccines-developed>.
22. Plotkin S. History of vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(34):12283-7.
23. Türkiye'de Aşımın Tarihçesi [Internet]. [Erişim tarihi 29 Ocak 2023]. Erişim adresi: <https://asi.saglik.gov.tr/genel-bilgiler/33-asinin-tarihcesi>.
24. Iwasaki A, Omer SB. Why and How Vaccines Work. *Cell.* 2020;183(2):290-5.
25. Smith KA. Louis pasteur, the father of immunology? *Front Immunol.* 2012;3:68.
26. Plotkin SA. Vaccines: past, present and future. *nature medicine.* 2005;5-11.
27. Lombard M, Pastoret PP, Moulin AM. A brief history of vaccines and vaccination. *Rev Sci Tech.* 2007;26(1):29-48.
28. Plotkin SA, Susan L, Vaccines. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2013.
29. Delany I, Rappuoli R, De Gregorio E. Vaccines for the 21st century. *EMBO Mol Med.* 2014;6(6):708-20.
30. Mascola JR, Fauci AS. Novel vaccine technologies for the 21st century. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(2):87-8.
31. Baldrick P. Development of COVID-19 therapies: Nonclinical testing considerations. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2022;132:105189.
32. Agnandji ST, Huttner A, Zinser ME, Njuguna P, Dahlke C, Fernandes JF, et al. Phase 1 Trials of rVSV Ebola Vaccine in Africa and Europe. *N Engl J Med.* 2016;374(17):1647-60.
33. Norshidah H, Vignesh R, Lai NS. Updates on Dengue Vaccine and Antiviral: Where Are We Heading? *Molecules.* 2021;26(22).
34. Xu S, Yang K, Li R, Zhang L. mRNA Vaccine Era-Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospection. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18).
35. Sahin U, Kariko K, Tureci O. mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(10):759-80.

36. Dolgin E. The tangled history of mRNA vaccines. *Nature*. 2021;597(7876):318-24.
37. T.C. Sağlık Bakanlığı Covid-19 Aşısı Bilgilendirme Platformu [Internet]. [Erişim tarihi 29 Ocak 2023]. Erişim adresi: <https://covid19asi.saglik.gov.tr/TR-77805/asi-turleri.html>.
38. Aşı Türleri [Internet]. 2022 [Erişim Tarihi 23 Nisan 2023]. Erişim adresi: <https://www.acilcalisanlari.com/asilar.html>.
39. Kersten G, Jiskoot W. Vaccines. Nijkamp FP, Parnham MJ, editors. Principles of Immunopharmacology. Basel: Birkhäuser Basel; 2011.
40. Delrue I, Verzele D, Madder A, Nauwynck HJ. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(6):695-719.
41. Aşı Portalı [Internet]. [Erişim tarihi 29 Ocak 2023]. Erişim adresi: <https://asi.saglik.gov.tr/genel-bilgiler/41-asi-turleri.html>.
42. Micoli F, Romano MR, Carboni F, Adamo R, Berti F. Strengths and weaknesses of pneumococcal conjugate vaccines. *Glycoconj J*. 2023;40(2):135-48.
43. Hansson M, Nygren PA, Stahl S. Design and production of recombinant subunit vaccines. *Biotechnol Appl Biochem*. 2000;32(2):95-107.
44. Yang N, Jin X, Zhu C, Gao F, Weng Z, Du X, et al. Subunit vaccines for *Acinetobacter baumannii*. *Front Immunol*. 2022;13:1088130.
45. Naik R, Peden K. Regulatory Considerations on the Development of mRNA Vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2022;440:187-205.
46. Melo A, de Macedo LS, Invencao M, de Moura IA, da Gama M, de Melo CML, et al. Third-Generation Vaccines: Features of Nucleic Acid Vaccines and Strategies to Improve Their Efficiency. *Genes (Basel)*. 2022;13(12).
47. Li Liu MPM, veMark Bagarazzi. Clinical Use of DNA Vaccines. *Handbook of Electroporation*. 2017:193-1952.
48. Fuller DH, Berglund P. Amplifying RNA Vaccine Development. *N Engl J Med*. 2020;382(25):2469-71.
49. Guimaraes LE, Baker B, Perricone C, Shoenfeld Y. Vaccines, adjuvants and autoimmunity. *Pharmacol Res*. 2015;100:190-209.
50. European Medicines Agency (EMA). Guideline on Adjuvants in Vaccines for Human Use. London:EMA; 2005.
51. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*. 2010;33(4):492-503.
52. Brennan FR, Dougan G. Non-clinical safety evaluation of novel vaccines and adjuvants: new products, new strategies. *Vaccine*. 2005;23(24):3210-22.
53. Badran G, Angrand L, Masson JD, Crepeaux G, David MO. Physico-chemical properties of aluminum adjuvants in vaccines: Implications for toxicological evaluation. *Vaccine*. 2022;40(33):4881-8.

54. O'Hagan DT, De Gregorio E. The path to a successful vaccine adjuvant--'the long and winding road'. *Drug Discov Today*. 2009;14(11-12):541-51.
55. Sun Y, Gruber M, Matsumoto M. Overview of global regulatory toxicology requirements for vaccines and adjuvants. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2012;65(2):49-57.
56. Angrand L, Elnar AA, Authier FJ, Gherardi RK, Crepeaux G. [Aluminium adjuvant exposure through vaccines in France in 2018]. *Ann Pharm Fr*. 2020;78(2):111-28.
57. Eldred BE, Dean AJ, McGuire TM, Nash AL. Vaccine components and constituents: responding to consumer concerns. *Med J Aust*. 2006;184(4):170-5.
58. Thakkar SG, Xu H, Li X, Cui Z. Uric acid and the vaccine adjuvant activity of aluminium (oxy)hydroxide nanoparticles. *J Drug Target*. 2018;26(5-6):474-80.
59. Petrovsky N. Comparative Safety of Vaccine Adjuvants: A Summary of Current Evidence and Future Needs. *Drug Saf*. 2015;38(11):1059-74.
60. Crepeaux G, Eidi H, David MO, Baba-Amer Y, Tzavara E, Giros B, et al. Non-linear dose-response of aluminium hydroxide adjuvant particles: Selective low dose neurotoxicity. *Toxicology*. 2017;375:48-57.
61. Conklin L, Hviid A, Orenstein WA, Pollard AJ, Wharton M, Zuber P. Vaccine safety issues at the turn of the 21st century. *BMJ Glob Health*. 2021;6(Suppl 2).
62. Loffler P. Review: Vaccine Myth-Buster - Cleaning Up With Prejudices and Dangerous Misinformation. *Front Immunol*. 2021;12:663280.
63. Aşı İçerikleri [Internet]. [Erişim Tarihi:12 Mayıs 2023]. Erişim adresi: <https://asi.saglik.gov.tr/genel-bilgiler/36-asi-icerikleri.html>.
64. Exley C. An aluminium adjuvant in a vaccine is an acute exposure to aluminium. *J Trace Elem Med Biol*. 2020;57:57-9.
65. Geier DA, Jordan SK, Geier MR. The relative toxicity of compounds used as preservatives in vaccines and biologics. *Med Sci Monit*. 2010;16(5):SR21-7.
66. European Medicines Agency (EMA). Points to Consider on the Reduction, Elimination or Substitution of Thiomersal in Vaccines. London:EMA;2001.
67. Clements CJ, Ball LK, Ball R, Pratt D. Thiomersal in vaccines. *Lancet*. 2000;355(9211):1279-80.
68. Pedrozo-Penafiel MJ, Miranda-Andrades JR, Gutierrez-Beleno LM, Larrude DG, Aucelio RQ. Indirect voltammetric determination of thiomersal in influenza vaccine using photo-degradation and graphene quantum dots modified glassy carbon electrode. *Talanta*. 2020;215:120938.
69. Geier DA, King PG, Hooker BS, Dorea JG, Kern JK, Sykes LK, et al. Thimerosal: clinical, epidemiologic and biochemical studies. *Clin Chim Acta*. 2015;444:212-20.
70. Dorea JG. Abating Mercury Exposure in Young Children Should Include Thimerosal-Free Vaccines. *Neurochem Res*. 2017;42(10):2673-85.

71. DeStefano F, Bodenstab HM, Offit PA. Principal Controversies in Vaccine Safety in the United States. *Clin Infect Dis*. 2019;69(4):726-31.
72. Andrews N, Miller E, Grant A, Stowe J, Osborne V, Taylor B. Thimerosal exposure in infants and developmental disorders: a retrospective cohort study in the United Kingdom does not support a causal association. *Pediatrics*. 2004;114(3):584-91.
73. World Health Organization (WHO). WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva:WHO;2012. Report No: Sixty-third report.
74. Miao C, Ma X, Fan J, Shi L, Wei J. Methylparaben as a preservative in the development of a multi-dose HPV-2 vaccine. *Hum Vaccin Immunother*. 2022;18(5):2067421.
75. McNeil MM, DeStefano F. Vaccine-associated hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(2):463-72.
76. Gershwin LJ. Adverse Reactions to Vaccination: From Anaphylaxis to Autoimmunity. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2018;48(2):279-90.
77. Spencer JP, Trondsen Pawlowski RH, Thomas S. Vaccine Adverse Events: Separating Myth from Reality. *Am Fam Physician*. 2017;95(12):786-94.
78. Chua TH, Takano A. Pathological Findings in COVID-19 and Non-COVID-19 Vaccine-Associated Lymphadenopathy: A Systematic Review. *J Clin Med*. 2022;11(21).
79. Dudgeon JA, Marshall WC, Peckham CS, Hawkins GT. Clinical and laboratory studies with rubella vaccines in adults. *Br Med J*. 1969;1(5639):271-6.
80. Panozzo CA, Pourmalek F, Brauchli Pernus Y, Pileggi GS, Woerner A, Bonhoeffer J, et al. Arthritis and arthralgia as an adverse event following immunization: A systematic literature review. *Vaccine*. 2019;37(2):372-83.
81. In: Stratton K, Ford A, Rusch E, Clayton EW, editors. *Adverse Effects of Vaccines: Evidence and Causality*. Washington (DC)2011.
82. Gan G, Liu H, Liang Z, Zhang G, Liu X, Ma L. Vaccine-associated thrombocytopenia. *Thromb Res*. 2022;220:12-20.
83. Greinacher A, Thiele T, Warkentin TE, Weisser K, Kyrle PA, Eichinger S. Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 Vaccination. *N Engl J Med*. 2021;384(22):2092-101.
84. Zanoni G, Migliorini M, Gallo T, Guidolin L, Schena D. Recurrent injection site reactions to vaccines: Two clinical patterns of presentation. *Vaccine*. 2020;38(45):6985-9.
85. Bandyopadhyay AS, Garon J, Seib K, Orenstein WA. Polio vaccination: past, present and future. *Future Microbiol*. 2015;10(5):791-808.
86. Ternavasio-de la Vega HG, Boronat M, Ojeda A, Garcia-Delgado Y, Angel-Moreno A, Carranza-Rodriguez C, et al. Mumps orchitis in the post-vaccine era (1967-2009): a single-center series of 67 patients and review of clinical outcome and trends. *Medicine (Baltimore)*. 2010;89(2):96-116.

87. Ong SWX, Vasoo S, Sadarangani SP, Cui L, Marimuthu K, Lim PL, et al. Vaccine-associated Rubella - a report of two cases and a review of the literature. *Hum Vaccin Immunother.* 2021;17(1):224-7.
88. Cui A, Wang H, Zhu Z, Mao N, Song J, Zhang Y, et al. Measles Vaccine-Associated Rash Illness in China: an Emerging Issue in the Process of Measles Elimination. *J Clin Microbiol.* 2020;58(11).
89. Chen Y, Zhang J, Chu X, Xu Y, Ma F. Vaccines and the risk of Guillain-Barre syndrome. *Eur J Epidemiol.* 2020;35(4):363-70.
90. World Health Organization (WHO).WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva:WHO;2022.Report No:Seventy-fifth report.
91. Segal L., Toxicity Studies in Vaccine Clinical Development and Registry Technology Networks Biopharma [Internet].2021 [Erişim Tarihi 13 Mayıs 2023]. Erişim adresi:<https://www.technologynetworks.com/biopharma/articles/regulatory-requirements-for-toxicity-studies-to-support-vaccine-clinical-development-and-348662>.
92. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK). Beşeri Aşıların Klinik Dışı Değerlendirilmesine İlişkin Kılavuz.Ankara:TİTCK; 2021:2-15.
93. World Health Organization (WHO).WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva:WHO;2014. Report No:Sixty-fourth report.
94. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry for The Evaluation of Combination Vaccines for Preventable Diseases: Production, Testing and Clinical Studies. Rockville:FDA; 1997.
95. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry General Principles for the Development of Vaccines to Protect Against Global Infectious Diseases. Rockville:FDA; 2011.
96. European Medicines Agency (EMA). Guideline on Clinical Evaluation of New Vaccine EMEA/CHMP/VWP/164653/2005.London:EMA; 2006.
97. World Health Organization (WHO).WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva:WHO;2004. Report No: Fifty-second report
98. World Health Organization (WHO).WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva:WHO;2017. Report No:Sixty-seventh report
99. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik [Internet]. 2013 [Erişim tarihi 20 Mayıs 2023] Erişim adresi: <https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=17285&MevzuatTur=7&MevzuatTertip=5>.
100. Beşeri Tıbbi Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik 2023 [Internet].2023 [Erişim tarihi 10 Temmuz 2023 ].Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2023/05/20230527-5.htm>
101. European Union agencies. [Internet]. [Erişim tarihi 26 Mart 2023 ] Erişim adresi: <https://www.ema.europa.eu/en/partners-networks/eu->

- partners/european-union-agencies#european-centre-for-disease-prevention-and-control-(ecdc)-section.
102. Understanding the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) [Internet]. [Erişim Tarihi 28 Mart 2023] Erişim adresi: <https://www.fda.gov/media/83546/download>.
  103. Diaz L, Zambrano E, Flores ME, Contreras M, Crispin JC, Aleman G, et al. Ethical Considerations in Animal Research: The Principle of 3R's. *Rev Invest Clin*. 2020;73(4):199-209.
  104. Huang Z, Jiang Q, Wang Y, Yang J, Du T, Yi H, et al. SARS-CoV-2 inactivated vaccine (Vero cells) shows good safety in repeated administration toxicity test of Sprague Dawley rats. *Food Chem Toxicol*. 2021;152:112239.
  105. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. 8th ed. Washington (DC)2011.
  106. Forster R. Study designs for the nonclinical safety testing of new vaccine products. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2012;66(1):1-7.
  107. Da Costa CBP, Cruz ACM, Penha JCQ, Castro HC, Da Cunha LER, Ratcliffe NA, et al. Using in vivo animal models for studying SARS-CoV-2. *Expert Opin Drug Discov*. 2022;17(2):121-37.
  108. European Medicines Agency (EMA). ICH guideline S6 (R1) – preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. London:EMA; 2011.
  109. Chiarot E, Pizza M. Animal models in vaccinology: state of the art and future perspectives for an animal-free approach. *Curr Opin Microbiol*. 2022;66:46-55.
  110. Al-Humadi N. Pre-clinical toxicology considerations for vaccine development. *Vaccine*. 2017;35(43):5762-7.
  111. Lee SY, Lee DY, Kang JH, Jeong JW, Kim JH, Kim HW ve ark. Alternative experimental approaches to reduce animal use in biomedical studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022;68:1-21.
  112. Hayvan Deneyleleri Merkezi Etik Kurulu 2020 Yılı Deney Hayvanı Kullanım İstatistikleri [Internet]. 2020 [Erişim Tarihi ] Erişim adresi: <https://hadmek.tarimorman.gov.tr/Sayfa/Detay/648>.
  113. Barrow P. Developmental and reproductive toxicity testing of vaccines. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2012;65(2):58-63.
  114. European Medicines Agency (EMA). ICH Harmonised Guideline Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals S5(R3). .Amsterdam:ICH;2000.
  115. Food and Drug Administration (FDA). Considerations for Developmental Toxicity Studies for Preventive and Therapeutic Vaccines for Infectious Disease Indications. Rockville: FDA; 2006.
  116. Verdier F, Barrow PC, Burge J. Reproductive toxicity testing of vaccines. *Toxicology*. 2003;185(3):213-9.

117. European Medicines Agency (EMA). Note For Guidance on Safety Pharmacology Studies For Human Pharmaceuticals (CPMP/ICH/539/00). London:EMA; 2001.
118. Safety Guidelines [Internet]. [Erişim Tarihi 26 Mart 2023].Erişim adresi: <https://www.ich.org/page/safety-guidelines>
119. Nomura Y, Noda K, Oohashi Y, Okuda S, Maki K, Ogawa T, et al. Proposal for the revision of the guidelines for Non-clinical studies of vaccines for the prevention of infectious diseases in Japan. *Vaccine*. 2022;40(19):2810-8.
120. Viviani L, Reid K, Gastineau T, Milne C, Smith D, Levis R, et al. Accelerating Global Deletion of the Abnormal Toxicity Test for vaccines and biologicals. Planning common next steps. A workshop Report. *Biologicals*. 2022;78:17-26.
121. Mizukami T, Masumi A, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Naito S, et al. An improved abnormal toxicity test by using reference vaccine-specific body weight curves and histopathological data for monitoring vaccine quality and safety in Japan. *Biologicals*. 2009;37(1):8-17.
122. Garbe JHO, Ausborn S, Beggs C, Bopst M, Joos A, Kitashova AA, et al. Historical data analyses and scientific knowledge suggest complete removal of the abnormal toxicity test as a quality control test. *J Pharm Sci*. 2014;103(11):3349-55.
123. Rationale for Removing Abnormal Toxicity Testing [Internet]. 2015 [Erişim tarihi 03 Nisan 2023].Erişim adresi:<https://www.efpia.eu/media/25713/position-paper-on-rationale-for-removing-abnormal-toxicity-testing-1.pdf>.
124. Lei D, Schmidt H, Knezevic I, Zhou T, Kang HN, Kopp S. Removal of the innocuity test from The International Pharmacopoeia and WHO recommendations for vaccines and biological products. *Biologicals*. 2020;66:17-20.
125. World Health Organization (WHO). WHO Expert Committee on Biological Standardization.Geneva:WHO;2018. Report No: Sixty-ninth report.
126. Viviani L, Halder M, Gruber M, Bruckner L, Cussler K, Sanyal G, et al. Global harmonization of vaccine testing requirements: Making elimination of the ATT and TABST a concrete global achievement. *Biologicals*. 2020;63:101-5.
127. Doke SK, Dhawale SC. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm J*. 2015;23(3):223-9.
128. Balls M, Combes R, Worth A. The History of Alternative Test Methods in Toxicology. Londra: Academic Press; 2018.
129. Laboratory for alternatives to animal testing [Internet].[Erişim tarihi 06 Nisan 2023]. Erişim adresi: [https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eu-reference-laboratory-alternatives-animal-testing-eurl-ecvam\\_en](https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eu-reference-laboratory-alternatives-animal-testing-eurl-ecvam_en).
130. Spielmann H, Grune B, Liebsch M, Seiler A, Vogel R. Successful validation of in vitro methods in toxicology by ZEBET, the National Centre for Alternatives in Germany at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment). *Exp Toxicol Pathol*. 2008;60(2-3):225-33.

131. van den Biggelaar R, Hoefnagel MHN, Vandebriel RJ, Sloots A, Hendriksen CFM, van Eden W, et al. Overcoming scientific barriers in the transition from in vivo to non-animal batch testing of human and veterinary vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2021;20(10):1221-33.
132. Kang M, Long T, Chang C, Meng T, Ma H, Li Z, et al. A Review of the Ethical Use of Animals in Functional Experimental Research in China Based on the "Four R" Principles of Reduction, Replacement, Refinement, and Responsibility. *Med Sci Monit*. 2022;28:e938807.
133. Tüfek H, Özkan Ö. 4R Rule in Laboratory Animal Science. *Commagene Journal of Biology*. 2018;55-60.
134. Rastogi S, Kalaivani M, Bhatia AK, Prakash J, Singh GN, Implementing the Principle of the 3 Rs Through the Indian Pharmacopoeia. *Ther Innov Regul Sci*. 2015;750-5.
135. Akkermans A, Chapsal JM, Coccia EM, Depraetere H, Dierick JF, Duangkhae P, et al. Animal testing for vaccines. Implementing replacement, reduction and refinement: challenges and priorities. *Biologicals*. 2020;68:92-107.
136. Faqi AS. A comprehensive guide to toxicology in preclinical drug development. Faqi AS, editor 2013.
137. Vaessen SF, Bruysters MW, Vandebriel RJ, Verkoeijen S, Bos R, Krul CA, et al. Toward a mechanism-based in vitro safety test for pertussis toxin. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(5):1391-5.
138. Hoonakker M, Arciniega J, Hendriksen C. Safety testing of acellular pertussis vaccines: Use of animals and 3Rs alternatives. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(11):2522-30.
139. Zhu W, Ma X, Gou M, Mei D, Zhang K, Chen S. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 2016;40:103-12.
140. Yu C, Ma X, Zhu W, Wang P, Miller KL, Stupin J, et al. Scanningless and continuous 3D bioprinting of human tissues with decellularized extracellular matrix. *Biomaterials*. 2019;194:1-13.
141. Rai J, Kaushik K. Reduction of Animal Sacrifice in Biomedical Science & Research through Alternative Design of Animal Experiments. *Saudi Pharm J*. 2018;896-902.
142. Bredenoord AL, Clevers H, Knoblich JA. Human tissues in a dish: The research and ethical implications of organoid technology. *Science*. 2017;355(6322).
143. Bartfeld S, Clevers H. Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment. *J Mol Med (Berl)*. 2017;95(7):729-38.
144. Khabib MNH, Sivasanku Y, Lee HB, Kumar S, Kue CS. Alternative animal models in predictive toxicology. *Toxicology*. 2022;465:153053.
145. Ronaldson-Bouchard K, Vunjak-Novakovic G. Organs-on-a-Chip: A Fast Track for Engineered Human Tissues in Drug Development. *Cell Stem Cell*. 2018;22(3):310-24.



146. European Medicines Agency (EMA). Guideline on the principles of regulatory acceptance of 3Rs (replacement, reduction, refinement) testing approaches. London:EMA; 2016.
147. Lilley E, Coppens E, Das P, Galaway F, Isbrucker R, Sheridan S, et al. Integrating 3Rs approaches in WHO guidelines for the batch release testing of biologicals: Responses from a survey of vaccines and biological therapeutics manufacturers. *Biologicals*. 2023;81:101660.
148. Kardani K, Bolhassani A, Namvar A. An overview of in silico vaccine design against different pathogens and cancer. *Expert Rev Vaccines*. 2020;19(8):699-726.
149. Thangamariappan E, Mohan M, Sundar K. Computational Mapping of Class I HLA-A Specific Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes of Mycobacterium tuberculosis and Their Potential Role in Vaccine Design. *Turk J Immunol* 2021;20-7.
150. Campos DMO, Silva MKD, Barbosa ED, Leow CY, Fulco UL, Oliveira JIN. Exploiting reverse vaccinology approach for the design of a multiepitope subunit vaccine against the major SARS-CoV-2 variants. *Comput Biol Chem*. 2022;101:107754.
151. Idoko OT, Kochhar S, Agbenyega TE, Ogutu B, Ota MO. Impact, challenges, and future projections of vaccine trials in Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88(3):414-9.
152. Bonhoeffer J, Bentsi-Enchill A, Chen RT, Fisher MC, Gold MS, Hartman K, et al. Guidelines for collection, analysis and presentation of vaccine safety data in pre- and post-licensure clinical studies. *Vaccine*. 2009;27(16):2282-8.
153. Artaud C, Kara L, Launay O. Vaccine Development: From Preclinical Studies to Phase 1/2 Clinical Trials. *Methods Mol Biol*. 2019;2013:165-76.
154. Molyneux M. New ethical considerations in vaccine trials. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(9):2160-3.
155. The World Medical Association (WMA). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. Fortaleza:WMA;2013.
156. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK). İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu. Ankara:TİTCK ;2015.
157. Molyneux E, Mathanga D, Witte D, Molyneux M. Practical issues in relation to clinical trials in children in low-income countries: experience from the front line. *Arch Dis Child*. 2012;97(9):848-51.
158. Heaton PM. Challenges of Developing Novel Vaccines With Particular Global Health Importance. *Front Immunol*. 2020;11:517290.
159. Okyay P. Covid-19 Aşı Çalışmaları. Türk Tabipleri Birliği Covid-19 Pandemisi Altıncı Ay Değerlendirme Raporu [Internet]. 2020 [Erişim tarihi 13 Temmuz 2023]. Erişim adresi: [https://www.ttb.org.tr/kutuphane/covid19-rapor\\_6.pdf](https://www.ttb.org.tr/kutuphane/covid19-rapor_6.pdf)

160. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventive Vaccine Clinical Trials. Rockville: FDA; 2007.
161. Di Pasquale A, Bonanni P, Garcon N, Stanberry LR, El-Hodhod M, Tavares Da Silva F. Vaccine safety evaluation: Practical aspects in assessing benefits and risks. *Vaccine*. 2016;34(52):6672-80.
162. World Health Organization (WHO). Causality assessment of an adverse event following immunization (AEFI). Geneva: WHO; 2019.
163. Hudgens MG, Gilbert PB, Self SG. Endpoints in vaccine trials. *Stat Methods Med Res*. 2004;13(2):89-114.
164. Shanmugaraj B, Khorattanakulchai N, Panapitakkul C, Malla A, Im-Erbsin R, Inthawong M, et al. Preclinical evaluation of a plant-derived SARS-CoV-2 subunit vaccine: Protective efficacy, immunogenicity, safety, and toxicity. *Vaccine*. 2022;40(32):4440-52.
165. Padron-Regalado E, Medina-Rivero E. Perspectives for licensing vaccines in Mexico. *Vaccine*. 2022;40(34):4979-85.
166. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK). Koşullu Ruhsatlandırma (Acil Kullanım Onayı) Başvurusu Ve Değerlendirmesi Hakkında Kılavuz. Ankara: TİTCK; 2023.
167. WHO lists additional COVID-19 vaccine for emergency use and issues interim policy recommendations [Internet]. 2021 [Erişim Tarihi 11 Mayıs 2023 ] Erişim adresi: <https://www.who.int/news/item/07-05-2021-who-lists-additional-covid-19-vaccine-for-emergency-use-and-issues-interim-policy-recommendations>.
168. COVID-19 vaccines: development, evaluation, approval and monitoring [Internet]. [Erişim Tarihi 11 Mayıs 2023] Erişim adresi: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/vaccines-covid-19/covid-19-vaccines-development-evaluation-approval-monitoring#accelerated-evaluation>.
169. Emergency Use Listing Procedure for vaccines [Internet]. [Erişim Tarihi 11 Mayıs 2023 ] Erişim adresi: <https://www.who.int/teams/regulation-prequalification/eul/eul-vaccines>.
170. Conditional marketing authorisation Table of contents [Internet]. [Erişim Tarihi 10 Mayıs 2023] Erişim adresi: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/marketing-authorisation/conditional-marketing-authorisation>.
171. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry Development and Licensure of Vaccines to Prevent COVID-19. Rockville: FDA; 2020.
172. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry Emergency Use Authorization for Vaccines to Prevent COVID-19. Rockville: FDA; 2022
173. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK). Viral Aşı Adaylarının Klinik Araştırmalara Geçişi İçin Gereklilikler Tablosu. Ankara: TİTCK; 2020.

174. Aşı Geliştirme Sürecinde Titck [Internet]. 2020 [Erişim Tarihi: 12 Mayıs 2023] Erişim adresi: <https://cleanroomnews.org/asi-gelistirme-surecinde-titck-1>.
175. Amarasinghe A, Black S, Bonhoeffer J, Carvalho SM, Dodoo A, Eskola J, et al. Effective vaccine safety systems in all countries: a challenge for more equitable access to immunization. *Vaccine*. 2013;31 Suppl 2:B108-14.
176. McFarland R, Verthelyi D, Casey W, Arciniega J, Isbrucker R, Schmitt M, et al. Non-animal replacement methods for human vaccine potency testing: state of the science and future directions. *Procedia Vaccinol*. 2011;5:16-32.
177. ICH Harmonised Guideline General Considerations for Clinical Studies E8(R1) Implementation Status [Internet]. [Erişim Tarihi: 13 Temmuz 2023] Erişim adresi: <https://www.ich.org/page/efficacy-guidelines#8-1>
178. Phillips A, Carlson S, Danchin M, Beard F, Macartney K. From program suspension to the pandemic: A qualitative examination of Australia's vaccine pharmacovigilance system over 10 years. *Vaccine*. 2021;39(40):5968-81.
179. Hassan PM, Ali T, Saber E, Asghar A, Delaram D, Mostafa SV, et al. Potency, toxicity and protection evaluation of PastoCoAd candidate vaccines: Novel preclinical mix and match rAd5 S, rAd5 RBD-N and SOBERANA dimeric-RBD protein. *Vaccine*. 2022;40(20):2856-68.

## 8. EKLER

### EK-1: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

merve yücetürk iş tez

#### ORIGINALITY REPORT

<b>2</b> %	<b>2</b> %	<b>0</b> %	<b>2</b> %
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

#### PRIMARY SOURCES

<b>1</b>	<a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080">www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</a> Internet Source	<b>2</b> %
----------	---	------------

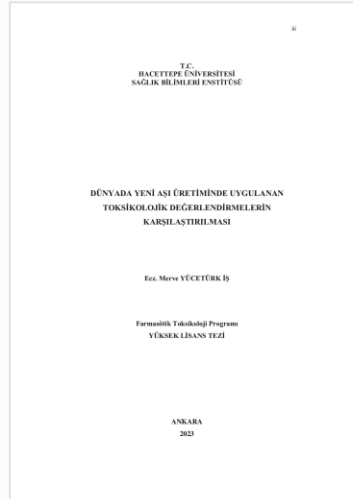
Exclude quotes	On	Exclude matches	< 2%
Exclude bibliography	On		

**EK-2: Dijital Makbuz****Digital Receipt**

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Merve Yücetürk İş  
Assignment title: merve yücetürk iş tez  
Submission title: merve yücetürk iş tez  
File name: Merve\_Y\_CET\_RK\_-TEZ2.pdf  
File size: 1.84M  
Page count: 109  
Word count: 23,300  
Character count: 163,623  
Submission date: 21-Jul-2023 02:37PM (UTC+0300)  
Submission ID: 2134512537



## 9. ÖZGEÇMİŞ