

Leishmaniasis Aşı Çalışmalarında Son Gelişmeler: Ne Zaman Aşılanabileceğiz?

Nevin TURGAY

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir

ÖZET: Dünyada 8 ülkede, 350 milyon kişi leishmaniasis enfeksiyonuna yakalanma tehlikesi ile karşı karşıyadır. Tedavi için kullanılan ilaçların büyük bir kısmı toksik olup, pek çok yan etkileri bulunmaktadır. Şu anda leishmaniasis için bir aşı bulunmamaktadır. Paraziter enfeksiyonlara karşı aşı oluşturmak, karmaşık antijenik yapıları, konak-parazit etkileşimleri nedeniyle virus ve bakteri aşılarını oluşturmaktan daha zordur. Bu yazıda anti-leishmanial aşı adayları hakkındaki son bilgiler derlenmektedir.

Anahtar sözcükler: *Leishmania*, vaccine

Last Updates on *Leishmania* Vaccine Studies: When are we going to be vaccinated?

SUMMARY: Approximately 350 million people in 8 countries are estimated to be under the threat of leishmaniasis. Most of the drugs used for the treatment of leishmaniasis are toxic and have many side effects. At present there is no vaccine against leishmaniasis. Vaccine development for parasitic infections is more difficult than for viruses and bacteria because of the antigenic complexity and parasite-host interactions. Anti-leishmanial vaccine candidates are reviewed in this paper.

Key words: *Leishmania*, vaccine

GİRİŞ

Korumak, tedavi etmekten her zaman çok daha iyidir; zira kişileri hasta olma eziyet ve külfetinden uzak tutar... *Thomas Adams* (1629).

Aşı, spesifik olarak geliştirildiği enfeksiyon etkenine karşı uygulandığında sağlıklı kişiyi bu hastalığa karşı koruyacak immun yanıtı tetiklemesi beklenen ajandır. Aşılama başarılı bir şekilde uygulanırsa aşılanan kişinin koruyucu immun cevabı geliştirmesi beklenmektedir. İlk aşı denemesi 1721’de Dr. Jenner’in çiçek aşısı uygulamaları ile başlamış, 1885’deki kuduz aşısı ile elde edilen başarı insanlık için bulaşıcı hastalıklardan korunma yolunda büyük bir umut olmuştur. Daha sonra kolera, tifo, tuberkuloz, boğmaca, tetanoz, polio, kızamık, kabakulak, su çiçeği, hepatit, meningokok ve pneumokok aşısı ile devam eden süreçte, parazit enfeksiyonlarına karşı olan aşı denemeleri hayal kırıklıklarına neden olmuştur. Özellikle parazit enfeksiyonların immun cevabının tam anlaşıl-maması, belirli parazitlerin *in vitro* ortamda üretilmemesi ve parazitlerde sürekli görülen antijenik varyasyonlar nedenleriyle parazitlerin aşı çalışmaları zor ilerlemektedir.

Parazit aşısı konusunda en çok üzerinde durulan, her yıl yaklaşık 2-3 milyon kişinin öldüğü sıtmadır. Dünya Sağlık Teşkilatının oluşturduğu “malaria kontrol programı” önceliği, olguların tedavisi ve vektör kontrol programlarına, insektisitli cibinliklerin kullanımının yaygınlaşmasına ve yeni ilaçların geliştirilmesine vermekle birlikte, sadece Dünya Sağlık Teşkilatı bünyesinde malaria aşısı geliştirme programlarına geçen yıllarda ayrılan 70-80 milyon dolarlık bütçelerin son yıllarda daha da arttığı bildirilmektedir.

Leishmania’lar da *Plasmodium*’lar gibi bu konuda en çok araştırma yapılan protozoonlar arasında yer almaktadırlar. Dünya Sağlık Teşkilatına göre, tüm dünyada toplam 12 milyon leishmaniasis olgusu bulunmakta olup, her yıl 500,000 yeni visseral leishmaniasis (VL) olgusu hastalar arasına eklenmektedir. Anti-leishmanial ilaçların toksisiteleri ve yan etkilerinin çokluğu gözönüne alındığında uygulanan tüm kontrol programlarına ek olarak alternatif yöntemlerin uygulamaya konması gereği ortaya çıkmaktadır (7).

***Leishmania* aşı denemeleri:** İlk leishmaniasis aşı denemelerinde tarihte aktif lezyonlu bölgeden alınan sürüntünün özellikle kız çocuklarının gluteal bölgesine inoküle edilmesiyle gizli bir bölgede oluşturulan lezyonun iyileşmesi sonucu korunmanın elde edilmesi planlanmıştır (9). “Leishmanizasyon”

olarak bilinen bu yöntem ile, halen Özbekistan gibi bazı Asya ülkelerinde, besiyeri ortamında üretilen canlı promastigotlar benzer amaçlarla aşılama için kullanılmaktadır (15). Ancak yöntemin standardize edilememesi, kullanılan suşun virulansındaki değişiklikler, zaman zaman inoküle edilen bölgede inatçı ve devam eden lezyonların oluşması, yaygın kullanımını önleyen en önemli etkenler olmuştur.

Leishmania'nın promastigotunun bütün olarak kullanıldığı aşilar: Özellikle *Leishmania* promastigotlarının otoklavlanması ile elde edilen aşilar 1990'ların sonlarında Ekvator ve İran'da denenmiştir. Ekvator'da 2 doz otoklavlanmış "*Leishmania braziliensis* + *Leishmania guyanensis* + *Leishmania amazonensis*" ile kombine edilen BCG ile aşılama çocuklarda yeni kutanöz leishmaniasis (KL) oranı %2,1 bulunurken, sadece BCG ile aşılama kontrol grubunda %7,6 olarak tespit edilmiştir (23). İran'da ise KL'nin yaygın olduğu iki farklı bölgede Faz III aşı çalışması yapılmış, *L.major*'ın otoklavlanması ile elde edilen antijen yine adjuvant olarak BCG ile kombine edilerek kullanılmıştır. Çalışma ile 2 yıl sonunda %55'lik bir korunma elde edilmiştir (18). Yapılan çeşitli aşı çalışmalarında KL'e karşı korunma %0-76 arasında tespit edilirken VL'e karşı elde edilen korunma %6'nın altında kalmıştır (6, 11, 14, 17).

İkinci-nesil Leishmania aşiları: Fare modellerindeki çeşitli çalışmalar sonucunda tanımlanmış spesifik moleküllerin kullanıldığı aşı modellerinde korunmanın elde edilebileceği gösterilmiştir (3). Çeşitli *Leishmania* proteinleri, parazitte bulunma miktarlarına, parazit yüzey membranındaki yerlerine, T hücre klonları veya antijen havuzları kullanılarak yapılan taramalar sonucunda elde edilen verilere göre tanımlanmışlardır. Glikoprotein 63 (gp63), membran glikoproteini 46 (M-2), reseptörle aktive olan kinaz C (LACK), sistein proteinaz B ve A (CPB, CPA), histone H1, tükrük proteini 15 (SP15), promastigot yüzey antijeni (PSA-2), *Leishmania* uzama ve başlangıç faktörü (LeIF), *L.major*'da bulunan "ökaryotik stres uyaran protein-1" homoloğu (LmST11), *L.major*'da bulunan "ökaryotik thiol spesifik anti-oksidan molekül" homoloğu (TSA) bunların arasında sayılabilmektedir (2, 4, 5, 10, 12, 16, 20, 21, 22, 24, 25).

Spesifik Leishmania Moleküllerinin Adjuvantlarla Yapılan Kombinasyonları: İdeal aşının, güvenli, en az sayıda immunizasyonla en uzun süreli korunmayı sağlayan, en az toksisiteye sahip ve hayvansal kökenli olmayan bir molekül olup, ayrıca ucuz da olması beklenmektedir. Örnekleri yukarıda sıralanan *Leishmania* spesifik molekülleri içerisinde, amastigotta en yoğun olarak bulunanların seçilmesi ve bunların en ideal koşullarda, korunmak istenen konağa verilmesi amaçlanmaktadır. Elde edilen aşı adayı olan moleküllerin, konak organizma immun sistemine doğru bir şekilde sunulması, konakta antijene spesifik koruyucu Th1 cevabının (özellikle IFN sentezininin) güçlü bir şekilde oluşmasını sağlayacaktır. Antijenin doğru sunumu sayesinde, "aşı molekülünün immunojenik özellikleri, doğru şekilde ortaya çıkıp, immun cevabın istenen yönde oluşması sağlanacaktır. Bu amaçla,

adjuvant alternatifleri olarak, IL-12, alüminyum tuzları, çıplak DNA, mikrosfer içerisine yerleştirilmiş DNA, antijenin sunumunda alternatif yöntemler olarak, çeşitli prelinik çalışmalarda denenmiştir. IL-12, Th1 cevabını, IFN-gama sentezini uyarması sonucunda tetiklemektedir ve bu özelliği koruyucu immun cevabın aktiflenmesini sağladığı için, immunizasyon mekanizmalarında istenen bir adjuvant niteliğindedir. Özellikle *Leishmania* eriyik antijeninin, immun cevabı Th1 yönünde uyaran IL-12'nin adjuvant olarak kullanıldığı bir çalışmada, fare modellerinde kısa süreli korunma sağladığı gösterilmiştir (1). LACK molekülü veya LACK DNA'sının IL-12 DNA'sı ile birlikte aynı fare modellerinde korunma amaçlı denendiğinde ise *L.major*'a karşı uzun dönem bir korunma elde edilmiştir (13).

H1, CPA veya CPB'nin kullanıldığı DNA aşılarda ise belirgin bir korunma elde edilememesi dikkat çekmektedir (3).

Son dönemlerde özellikle rIL-12, ilk izole edildiğinde insan aşı çalışmalarına spesifik olarak planlanmaması, pahalı olması, üretiminde güçlükler bulunması sebepleriyle eleştiriler almış ve diğer adjuvant alternatifleri araştırılmıştır. Bu amaçla, *Salmonella minnesota*'a ait, monofosforil lipid A molekülü (MPL), *Leishmania*'nın bir trifuzyon molekülü olan Leish-111f ile birlikte adjuvant olarak kullanılmaya başlanmıştır (3). Fare modellerinde yapılan çalışmalarda Leish-111f ve MPL kombinasyonunun koruyucu immun cevabı uyardığı saptanmıştır (19). LeIF, LmST11 ve TSA moleküllerinin sentetik bir bileşkesi olan Leish-111f ile, dünyanın farklı yerlerinde çalışmalar halen devam etmekte olup, Faz I denemeleri Dünya Sağlık Teşkilatının'da desteği ile şu an ABD'de sürmektedir. Ancak aynı Leish-111f molekülü MPL adjuvantı ile birlikte İtalya'da VL'nin endemik olarak görüldüğü bir bölgede köpeklerde yapılan bir Faz III denemesinde kullanılmış, fakat hastalıktan korunma ve hastalık ilerlemesinde etkili bulunamamıştır (8).

Leishmania Aşısına Ne kadar Yakınız? Bilim adamlarının laboratuvarlarda keşfettiği "umut vaat eden" pek çok spesifik moleküle rağmen leishmaniasis aşısının piyasaya çıkabilmesi için daha uzun yıllar gerektiği anlaşılmaktadır. Bilim adamlarının yaptıkları çalışmaların tekrarlanabilir olma özelliği, farklı laboratuvar koşulları nedeniyle sıkıntıya girmektedir. Özellikle standart çalışma ortamlarının olmaması, bunun en önemli nedeni gibi görünmektedir. İlaç sanayisinin de, özellikle "parazit aşıları"na gösterdiği yetersiz ilgi, işleri daha da zor hale getirmektedir. Politik olarak enfeksiyonun yoğun görüldüğü ancak alt yapı yetersizlikleri ve toplum sağlığı politikaları eksik olan gelişmekte olan ülkeler ile, katı sağlık politikaları olup finansal kaynakların da merkezinde bulunan batı ülkelerinin ortak çalışma platformu oluşturma çabalarının, politikacılar tarafından daha çok desteklenmesi gerekmektedir.

Son yıllarda yepyeni antijen ve adjuvantların birbiri ardına keşfedilmesine rağmen, bilim dünyası için endemik bir bölgeye ziyarete giderken sağlıklı bir kişinin leishmaniasisten korunmak için kullanılacak aşıya ulaşabilmesi için daha çok yol gidilmesi gerektiği görünmektedir.

KAYNAKLAR

1. Afonso LCC, Scharton TM, Vieira LQ, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P, 1994. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science*, 263: 235–237.
2. Champi J and McMahon-Pratt D, 1998. Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect Immun*, 56: 3272–3279.
3. Coler RN, Reed SG, 2005. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 21 (5): 244-249
4. Connell ND, Medina-Acosta E, McMaster WR, Bloom BR, Russell DG, 1993. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guerin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 11473–11477.
5. Dole VS, Raj VS, Ghosh A, Madhubala R, Myler PJ, Stuart KD, 2000. Immunization with recombinant LD1 antigens protects against experimental leishmaniasis. *Vaccine*, 19: 423–430.
6. Genaro O, Peixoto de Toledo VPC, Da Costa CA, Hermeto MV, Afonso LCC, Mayrink W, 1996. Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. *Clin Dermatol* 14: 503–512.
7. Ghosh M, Bandyopadhyay S, 2003. Present status of antileishmanial vaccines. *Mol Cell Biochem*, 253: 199-205.
8. Gradoni L, Foglia Manzillo V, Pagano A, Piantadosi D, De Luna R, Gramiccia M, Scalone A, Di Muccio T, Oliva G, 2005. Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine*, 23(45): 5245-5251.
9. Handman E, 2001. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev*, 14: 229–243.
10. Handman E, Symons FM, Baldwin TM, Curtis JM, Scheerlinck J-PY, 1995. Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response. *Infect Immun*, 63 : 4261–4267.
11. Mayrink W, Antunes CM, Da Costa CA, Melo MN, Dias M, Michalick MS, Magalhães PA, De Oliveira Lima A, Williams P, 1986. Further trials of a vaccine against American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 80: 1001.
12. McMahon-Pratt D, Rodriguez D, Rodriguez J-R, Zhang Y, Manson K, Bergman C, Rivas L, Rodriguez JF, Lohman KL, Ruddle NH, Esteban M, 1993. Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against *Leishmania* infection. *Infect Immun* 61: 3351–3359.
13. Méndez S, Gurunathan S, Kamhawi S, Belkaid Y, Moga MA, Skeiky YA, Campos-Neto A, Reed S, Seder RA, Sacks D, 2001. The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge. *J Immunol*, 166: 5122–5128.
14. Modabber F, 1995. Vaccines against leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*, 89: (Suppl 1), pp. 83–88.
15. Modabber F, 2000. First generation leishmaniasis vaccines in clinical development: Moving, but what next? *Curr Opin Anti-Infect Invest Drugs*, 2: 35–39.
16. Mougneau E, Altare F, Wakil AE, Zheng S, Coppola T, Wang Z-E, Waldmann R, Locksley RM, Glaichenhaus N, 1995. Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science* 268: 563–566.
17. Nadim A, Javadian E, Tahvildar-Bidruni G, Ghorbani M, 1983. Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 76: 377–383.
18. Sharifi I, Fekri AR, Aflatonian MR, Khamesipour A, Nadim A, Mousavi MR, Momeni AZ, Dowlati Y, Godal T, Zicker F, Smith PG, Modabber F, 1998. Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *Lancet*, 351(9115): 1540-1543.
19. Skeiky YA, Coler RN, Brannon M, Stromberg E, Greeson K, Crane RT, Webb JR, Campos-Neto A, Reed SG, 2002. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. *Vaccine*, 20(27-28): 3292-3303.
20. Skeiky YAW, Kennedy M, Kaufman D, Borges MM, Guderian JA, Scholler JK, Ovendale PJ, Picha KS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Campos-Neto A, Reed SG, 1998. LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. *J Immunol*, 161: 6171–6179.
21. Solioz N, Blum-Tirouvanziam U, Jacquet R, Rafati S, Corradin G, Mauël J, Fasel N, 1999. The protective capacities of histone H1 against experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, 18 :850–859.
22. Stager S, Smith DF, Kaye PM, 2000. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *J Immunol*, 165: 7064–7071.
23. TDR News, 1998. Advances in battle against leishmaniasis. *TDR News*, (57): 2.
24. Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Mendez S, Kamhawi S, Rowton ED, Sacks DL, Ribeiro JMC, 2001. Toward a Defined Anti-Leishmania Vaccine Targeting Vector Antigens. Characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med*, 194: 331–342.
25. Wilson ME, Young BM, Andersen KP, Weinstock JV, Metwali A, Ali KM, Donelson JE, 1995. A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice. *Infect Immun*, 63: 2062–2069.