

Leishmaniasise Karşı Aşı Geliştirilmesinde Yaklaşımlar ve Problemler

Adil ALLAHVERDIYEV, Melahat BAĞIROVA, Rabia ÇAKIR KOÇ, Olga Nehir ÖZTEL,
Serhat ELÇİÇEK, Sezen Canım ATEŞ, Tuğçe Deniz KARACA

Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Esenler, İstanbul, Türkiye

ÖZET: Leishmaniasis dünyanın ve Türkiye'nin ciddi halk sağlığı problemlerinden biridir. Son yıllarda leishmaniasis kontrol stratejileri arasında aşı çalışmalarına olan ilginin giderek artması konuyu daha güncel hale getirmiştir. Buna göre de derlemenin amacı; leishmaniasise karşı şimdiye kadar yapılan aşı çalışmalarlarıyla ilgili son bilgileri aktarmak, etkin bir aşı elde edilmesinde ortaya çıkan problemleri açıklamak ve bundan sonraki aşı çalışmalarında uygulanabilecek yeni yaklaşımları ortaya koymaktır. Leishmaniasise karşı geliştirilen aşı adayları üç jenerasyona ayrılabilir. Birincisi; ölü parazitlerden ve canlılığı azaltılmış parazitlerden, ikincisi, saflaştırılmış antijenlerden, canlı parazitlerden (knock out ve suicidal cassettes), rekombinant antijenlerden, üçüncü ise DNA aşılardan oluşmaktadır. Ayrıca tatarcık tükürük antijenleri, dendritik hücreler ve non-patojenik *L.tarentolae* türleri de aşı adayı olarak kullanılsa da henüz etkin bir aşı bulunmamaktadır. Son yıllarda birçok enfeksiyon hastalığı için polimerlere dayalı aşı çalışmalarına önem verilmektedir. Bunun nedeni polimere bağlanmış antijenlerden oluşan konjugatların immunojenliğinin, antijenlerin tek başına kullanılmasına göre daha yüksek olmasıdır. Ancak literatür analizine göre leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde polimerlere dayalı yaklaşım bulunmamaktadır. *Leishmania* promastigotlarının yüzey antijeni olan lipofosfolikan (LPG)-Poliakrilik asit polimeri (PAA) konjugasyonu leishmaniasise karşı aşı adayı olarak ümit verici olabileceğinden, tarafımızdan bu konuyla ilgili 1085170SBAG-4007 nolu TÜBİTAK proje çalışmaları yürütülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Aşı, *Leishmania*, Polimer, DNA Aşılı, Adjuvan

Approaches and Problems in Vaccine Development against Leishmaniasis

SUMMARY: Leishmaniasis is a major public health problem of the world and Turkey. Recently there has been increasing interest in vaccine studies among strategies for control of leishmaniasis. Recently the increase of interest in vaccine studies among leishmaniasis control strategies makes the subject more up to date. So the aim of this review is to present information about recent vaccine studies, problems and new strategies for vaccine development studies. There are 3 generations of vaccine against leishmaniasis. First-generation vaccines are killed or live attenuated parasites; second-generation vaccines are recombinant or native antigens and live genetically modified parasites (knock out and suicidal cassettes), third generation vaccines are DNA vaccines. Also vector salivary proteins, dendritic cells and non-pathogenic *L. tarentolae* have been used as vaccine candidates. However there is still no effective vaccine against leishmaniasis. Since polymer conjugates considerably increase immunogenicity, polymer based vaccine studies have gained importance in recent years. However, there has not been such a study for an anti-leishmanial vaccine yet. LPG, surface antigen of *Leishmania* promastigotes, and polymer conjugates may be promising in anti-leishmanial vaccine studies so we are carrying out a TÜBİTAK Project on this subject which has been given the number, 1085170SBAG-4007.

Key Words: Vaccine, *Leishmania*, Polymer, DNA vaccine, Adjuvant

GİRİŞ

Leishmaniasis enfekte tatarcıkların kan emme esnasında bulaştırdıkları, intrasellüler *Leishmania* protozoonlarının memeli konaklarda oluşturdukları bir hastalık grubudur.

Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği 6 önemli tropikal hastalıklar listesinde, sıtmadan sonra en önemli 2. hastalık olarak yerini korumaktadır. Dünyada 12 ile 40 milyon arasında kişinin *Leishmania* parazitleri ile enfekte olduğu, 350 milyona yakın kişinin ise bu hastalığa yakalanma riski altında olduğu bildirilmiştir (66). Her yıl 1,0-1,5 milyon kişi kutanöz leishmaniasis'e (KL), 500.000 kişi ise visseral leishmaniasis'e (VL) yakalanmaktadır. Küresel ısınmaya bağlı olarak hastalığın giderek artması beklenmektedir. Hastalığın yaygın olmasının nedenleri hastalığın etkenle-

Makale türü/Article type: **Derleme / Review**

Geliş tarihi/Submission date: 12 Aralık/12 December 2009

Düzeltilme tarihi/Revision date: 25 Mayıs/25 May 2010

Kabul tarihi/Accepted date: 26 Mayıs/26 May 2010

Yazışma /Corresponding Author: Adil Allahverdiyev

Tel: (+90) (212) 383 46 39 Fax: -

E-mail: adilmoğlu@gmail.com

rinde kullanılan ilaçlara, vektörlerinde ise kullanılan insektisitlere karşı dirençliğin gelişmesidir. Ayrıca HIV ve diğer immün yetmezliklerin giderek artması, seyahatler, savaşlar ve laboratuvar tanısındaki problemler de hastalığın yayılmasında önemli rol oynar (22). Buna göre de son yıllarda leishmaniasis kontrol stratejileri arasında aşı çalışmalarına olan ilginin giderek artması konuyu daha da güncel hale getirmiştir.

Aşı; konağa verildiğinde hümmoral veya hüresel yanıt oluşturarak, konağın belli bir enfeksiyona karşı korunmasını sağlayabilen aktif immunojenik bileşiklere denir. Çeşitli enfeksiyonlara karşı aşı geliştirilmesi çok uzun yıllar öncesine dayanır. Jenner' in 1796' da inek çiçeği (Cowpox) virüsünden hazırladığı attenüe zayıflatılmış canlı virüs aşısı, modern aşılanmanın ilk örneği olmasının yanında, sistematik aşılanmanın da başlamasını sağlamıştır (44). Daha sonraki yıllarda ise çeşitli bakteriyel ve virüslerin sebep olduğu birçok hastalığa karşı (çiçek hastalığı, çocuk felci, kızamık, boğmaca, difteri ve hepatit gibi) aşı geliştirilmesinde başarı sağlamıştır. Fakat parazitlerin biyolojik ve immuogenetik yapılarının daha karmaşık olması, bunların oluşturduğu enfeksiyonlara karşı aşı geliştirilmesinde zorluklara neden olmuştur. Buna rağmen parazitler hastalıklara ve özellikle malarya, leishmaniasis karşı uzun yıllardan beri yoğun şekilde çalışmalar yapılmaktadır (3, 4, 5, 6, 7, 56, 58). Ancak şimdiye kadar bu veya diğer parazitler hastalıklara karşı koruyuculuğu etkili olan bir aşı geliştirilememiştir (18).

Bu derlemenin amacı; dünyada ve ülkemizde geniş bir alanda dağılım gösteren leishmaniasis karşı şimdiye kadar yapılan aşı çalışmaları ile ilgili geniş kapsamlı olarak son bilgileri aktarmak, etkin bir aşı elde edilmesinde ortaya çıkan problemleri açıklamak ve bundan sonraki aşı çalışmalarında uygulanacak yeni yaklaşımlardan hangisinin daha ümit verici olduğunu ortaya koymak olmuştur.

Leishmaniasis'in immunolojisini kısaca özetlersek hastalığa karşı direncin T hücre aracılı immünite ile sağlandığı bilinmektedir. Bunu destekleyen bazı çalışmalar mevcuttur. T hücre hasarı görmüş olan farelerde *Leishmania* ile enfeksiyon sonrası direnç oluşmazken, T hücrelerinin transferi ile bu hayvanlarda direnç oluştuğu gözlenmiştir. Ayrıca B lenfositleri eksik olan hayvanlarda, enfeksiyonun gidişatının etkilenmediği görülürken, anti- IgM ile antikorların baskılanmasının herhangi bir etki yaratmadığı da belirlenmiştir. Yüksek düzeyde IgG ve IgM seviyelerinin enfeksiyona karşı bir koruyucu etki göstermemesi de bağışıklığın tamamen hüresel bağışıklığa bağlı olduğunun göstergesidir (43). CD4+ taşıyan T hücreleri direnç için oldukça önemli iken, CD8+ taşıyan T hücreleri daha çok hafıza olaylarında görev alırlar. Son yıllarda CD4+ ve CD25+ T hücrelerinin *L.major'e* karşı dirençte rol oynadığı belirlenmiştir. İnsanda CL'e karşı direncin, yardımcı T hücre cevabı ile orantılı olduğu gösterilmiştir. İyileşen CL olgularında ge-

nelde IFN- γ üreten hücrelerinin yoğun olduğu görülürken, kronik kutanöz ve mukozal lezyonlarda IL-4 ve IL-10 üreten Th1 ve Th2 hücrelerinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. VL'de ise IL-4'ün artışı ile hastalığın seyri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Hastalığın aktif döneminde dalakta IFN- γ ve IL-4 üretim miktarının arttığı, iyileşme sonrası ise anlamlı ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Ancak VL'de Th1'in tamamen fonksiyon göstermemesi, Th2'nin ise aktivasyonunda önemli bir değişikliğin olmamasının nedeninin makrofaj yüzeyinde bulunan yardımcı uyarıcı moleküllerin parazitin yüzey molekülleri (LPG, GP63) tarafından inhibe edilmesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Leishmaniasis karşı aşı geliştirilmesinde şimdiye kadar farklı yaklaşımlar incelenmiştir. Bu yaklaşımların temelini bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı geliştirilen aşilar oluşturur. Leishmaniasis karşı geliştirilen aşiların da diğer enfeksiyonlarda olduğu gibi güvenilir olması, uzun süreli koruma sağlaması, tedavi edici ve önleyici etki göstermesi mümkün oldukça düşük maliyetli ve üretiminin kolay olması talep edilir.

Leishmaniasis karşı geliştirilen aşilar birinci, ikinci ve üçüncü jenerasyon aşilar olarak üç grup altında incelenebilir. Birinci jenerasyon aşilar 1941'den günümüze, ikinci ve üçüncü jenerasyon aşiları ise 1990'lardan günümüze kadar olan aşilarıdır.

BİRİNCİ JENERASYON AŞILAR

Ölü parazit aşiları

Ölü parazit aşiları, hem koruyucu hem de tedavi edici özelliğe sahip olmaları ile karakterize olurlar. Beş farklı *Leishmania* türünün öldürülmüş promastigotlarını içeren bir ölü parazit aşısının güvenli olduğu ancak koruma özelliğinin %50 olduğu tespit edilmiştir. Sadece *L. amazonensis'i* (IFLA/BR/67/PH8) içeren ve *Leishvacin* olarak bilinen aşı adayının güvenilir olduğu ancak Ekvator ve Kolombiya'da yapılan Faz III klinik denemelerinde koruma özelliğinin düşük olduğu gösterilmiştir (9, 57).

Öldürülmüş parazitlerden elde edilen birinci jenerasyon *Leishmania* aşiları son yıllarda yerlerini Leishmanizasyona bırakmıştır.

Canlı parazit aşiları

Zayıflatılmış canlı *Leishmania* parazitlerinden elde edilen aşilarıdır. Bu amaçla yapay veya doğal olarak virulansı azaltılmış suşları elde etmek için çeşitli yöntemler kullanılır. Leishmaniasis karşı zayıflatılmış canlı aşı yöntemlerinden biri de Leishmanizasyon'dur. Leishmanizasyon'un elde edilmesinde parazitlerin uzun süreli kültürde tutulması, gentamisin, radyasyon ve kimyasal ajanlarla muamele gibi çeşitli yöntemler kullanılmıştır (55).

Leishmanizasyon, eski Sovyetler Birliği, İsrail ve İran'da uzun süre insanlarda *L. major'* un neden olduğu KL'i önlemek için başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Leishmanizasyon halen Özbekistan gibi bazı Asya ülkelerinde benzer amaçlarla aşılama için kullanılmaktadır. Ancak yöntemin standardize edilememesi, kullanılan süşun virulansındaki değişiklikler, zaman zaman inoküle edilen bölgede inatçı ve devam eden lezyonların oluşması, yaygın kullanımını önleyen en önemli etkenler olmaktadır (54).

İKİNCİ JENERASYON AŞILAR

Gen Eklenmesi ve Uzaklaştırılması ile Elde Edilen Canlı Aşılar

Bu gruba ait olan aşılar canlı parazitlerden belli bir genin uzaklaştırılması (knock out) veya eklenmesi (knock in) yolu ile elde edilir. Birincisine dihidrofolat reduktaz, timidilat sentaz (19) sistein proteinaz (58, 2) veya biyoperitin transporter (46) gibi önemli genleri uzaklaştırılmış yani "knock-out" olmuş *Leishmania* türleri aittir. Bu tür canlı aşılar sadece immün cevap oluşturmada yeterli olup, hastalık oluşturmamaktadır. İkincisine ise, Herpes I virusunun ganciclovir-duyarlı timidin kinaz genleri (39) veya *Saccharomyces cerevisiae* ait 5-florositozine duyarlı sitozin deaminaz geni (20) gibi ilaç duyarlılık genlerinin *Leishmania* genomuna eklenmesi (knock in) ile elde edilen "suicidal cassettes" aşıları dahildir.

Saflaştırılmış antijen aşıları

Bu gruba ait olan aşılar, parazitlerin hücre yüzeyinde bulunan immunojen glikokonjugatların izolasyonu ve daha sonra çeşitli yöntemlerle saflaştırılması ile elde edilir. Glikokonjugatlar parazitlerin en önemli yüzey molekülleri olup, parazitler bunları kendilerini memeli konak tarafından salgılanan çeşitli faktörlerden korumada ve mevcut ortama adapte olmada kullanırlar (21). Lipofosfoglikan (LPG), *Leishmania* promastigotlarının hücre yüzey glikokonjugatlarından elde edilir. Parazitlerin kamçısı da dahil olmak üzere bütün yüzeyinde bulunur (37). Parazitin makrofajlar tarafından reseptör aracılığıyla alınmasında bu antijenlerin önemli rolü vardır (61). *L. major* ve *L.donovani*'den izole edilen LPG ile yapılan çalışmalarda, LPG'nin ümit verici bir aşı adayı olabileceği iddia edilmiştir (47).

Diğer geniş kapsamlı çalışmalardan biri de parazitin yüzeyinde bulunan glikoprotein 63 (GP63) veya leishmanolizindir. GP63, çinko metalloproteazı olup, LPG gibi promastigotların yüzeylerinde eksprese edilir. Parazit bu antijen aracılığı ile makrofaj yüzeyinde bulunan reseptör 3 (CR3)'e bağlanarak hücreye girişini sağlamış olur (29). *L.major*'dan saflaştırılmış GP63 ile, hem *L.mexicana* hem de *L.major*'a karşı koruma sağlanmıştır (16)

Ancak saflaştırılmış antijen aşıları elde etmek için bol miktarda parazit üretimi gerektiğinden bu konuda yapılan çalışmalar faz IIa veya faz III aşamasına ulaşamamıştır. İkinci jenerasyon köpek aşılarında *L.infantum*'dan hazırlanan yarı- saflaştırılmış liyofilize proteinler faz III denemelerinde olumlu sonuçlar vermiştir (23).

L. donovani promastigotlarında bulunan diğer bir glikoprotein DP72'dir. Saf halde elde edilen bu proteinin *L. major*'a karşı farelerde koruma sağlayabildiği gözlenmiştir (48, 31).

Diğer bir aşı adayı GPI bağlı membran proteini, gp46/M-2 veya parazit yüzey antijen 2 (PSA-2) olup *L. braziliensis* hariç tüm *Leishmania* türlerinde bulunmaktadır (32). Doğal promastigot PSA-2'nin 3 polipeptidi ile aşılama, *L. major* enfeksiyonuna karşı farelerde koruma sağlamıştır. Ancak, *E.coli*'den elde edilen proteinler, Th1 hücre cevabına neden olmasına rağmen, yetersiz koruma göstermiştir. *L.mexicana* promastigotlarındaki episomlardan üretilen *L.major* PSA-2 ile aşılama, farede KL'e karşı koruma sağlamıştır (28).

Rekombinant Antijenler

Rekombinant protein aşıları ikinci jenerasyon aşılarının önemli bir bölümünü oluşturur ve 1990'lı yıllardan beri yoğun şekilde incelenmektedir. Bu tür çalışmaların temelini, *Leishmania* parazitlerine ait antijenleri eksprese edebilen canlı rekombinant bakteriler, parazitler veya virüsler oluşturur. Yani bu sistemlerde bakteri, parazit veya virüsler antijen taşıyıcısı ve adjuvant olarak görev yapmaktadırlar. Bakteri aşılarında *L.major* GP63 yüzey proteazı klonlanmış *Salmonella thypymurium* (67), *L.chagasi* antijeni klonlanmış BCG (17), parazit aşısında ise KMP-11 geni klonlanmış *Toxoplasma gondii* kullanılmıştır (50). *E.coli*'de rekombinant olarak üretilen GP63'ün kullanılmasıyla, farede *L.major* enfeksiyonuna karşı korumada yetersiz kalırken (27, 40, 41) GP63 BCG içinde veya zayıflatılmış *Salmonella* ile kullanıldığında başarılı bir aşılama gerçekleştirilmiştir. Ancak daha sonraki çalışmada bu ümit verici buluşlar, farede T hücre cevabının yetersizliği ile gölgelenmiştir (54). Rekombinant sistein proteinaz ile farelerde aşılama *L.major*'a karşı yüksek oranda IFN üretilmesini sağlamıştır (49).

Bugüne kadar, ikinci jenerasyon aşı adaylarından en ümit vericisi Leish-111f olup, faz 1 klinik deneyleri yapılmıştır (16). Leish-111f ardı ardına birleştirilmiş 3 molekülden; *L. major* homolog ökaryotik tiyol-spesifik antioksidanından (TSA), *L.major* stres-arttırıcı protein-1'den (LmST11) ve *L. braziliensis*'in uzatma ve başlatma faktöründen (LeIF) oluşan tek bir poliproteindir (65). Bu seçilen proteinler promastigot ve amastigotlarda tanımlanmış olup fare modellerinde kombine veya tek antijen olarak koruma sağlamıştır (15).

C kinaz aktivasyon reseptörü (LACK), *Leishmania* hayat döngüsünün tüm aşamalarında bulunan bir yapı olup, rekombinant LACK'ın IL-12 ile birlikte verilmesi ile aşılama, farede kısa süreli koruyucu cevabı tetiklemiş ancak uzun süreli immüniteyi sağlayamamıştır (27).

Memeli konaklarda immün cevabın oluşturulmasında parazitin amastigot formunda bulunan antijenler de önemli rol oynar. Amastigot sistein proteazları parazitin

yaşamı, çoğalması ve hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasında rol oynadıkları için ilaç veya aşı hedefleri olarak incelenmektedir. Sistein proteinazın (CPs) tanımlanan 3 sınıftan tip II-(CPA) ile tip I-(CPB)'den üretilen hibrit füzyon proteininin, *L.major* enfeksiyonuna karşı kısmi koruma sağladığı gösterilmiştir (69).

Amastigotlarda membrana bağlı bir nükleaz proteini olan P-4 ile aşılamanın, hayvanlarda IFN, lenfotoksin ve makrofaj göç inhibitör faktörü üreten CD4+ T hücreleri ile Yeni Dünya *Leishmania* türlerine karşı korunmada önemli rolü olduğu gösterilmiştir. P-8 proteininin fonksiyonu bilinmemekle birlikte, *L. pifanoi* polipeptidinin *L. amazonensis*'e karşı korumayı uyardığı ve P-4'e benzer olarak *L. amazonensis* ve *L. braziliensis* enfeksiyonuna karşı hastalarda T hücrelerinin uyarılmasını tetiklediği bildirilmiştir (30).

Ayrıca tanımlanmış tek moleküllerden farklı olarak, deney hayvanlarında VL'e karşı koruma geliştirmek amacıyla multikomponent aşilar incelenmiştir. *L. infantum*'daki dört sitoplazmik proteinin (Lip2A, Lip2B, P0 ve Histon2A) birleşmesiyle oluşan rekombinant Q proteini, canlı BCG ile köpeklerde klinik düzeyde en az %90 korunma sağladığı saptanmıştır (37).

Leishmaniasis karşı rekombinant protein aşı adayları tek başına (1, 68) kombine halde (14, 38) veya poliprotein veya kimerazlar olarak da incelenmiştir (26)

ÜÇÜNCÜ JENERASYON AŞILAR

DNA AŞILARI

DNA aşıları rekombinant protein aşılara göre bazı avantajlara sahiptir. Bunlar daha dayanıklı olmaları, üretim maliyetlerinin nispeten daha düşük olması, taşınmasında soğuk bir ortama ihtiyaç duymaması ve en önemlisi birçok geni bir araya getirebilme olanağı sağlaması ile karakterize olurlar (45).

Genelde rekombinant aşı adayı olarak kullanılan antijen dizileri DNA aşıları için de kullanılmaktadır. DNA aşıları, tekli aşı, genlerin kombinasyonu olarak, rekombinant proteinin enjeksiyonunu takiben veya rekombinant proteini eksprese eden *Vaccinia virusu* olarak denenmiştir. Yapılan çalışmalardan sadece ikisinde adjuvan kullanılmıştır (16).

DNA aşısı ile ilgili çalışmalar farelerde CL ve VL'ye, hamsterda VL'ye ve köpeklerdeki VL'ye karşı yapılmıştır. Bu çalışmaların bir kısmında kültür ortamında virulanslığı azaltılmış, başka bir kısmında ise *Leishmania* ile enfekte olmuş farelerden izole edilmiş virulans parazitler kullanılmıştır. Deney hayvanlarında LACK, LeIF, TSA, LmSTI1, H1, CpA+CpB, KMP11 ve NH36 gen bölgelerinin incelenmesi sonucunda her birinin ümit verici aday olduğu tesbit edilmiştir (45). Ancak farelerde LACK geni *L.major*'a karşı Th1 cevabını indüklerken, *L.donovani*'ye karşı cevap oluşturamamıştır. *L.major* enfeksiyonuna karşı LACK ve PSA2 geninin oluşturduğu immunitenin, GP63 ve p20 genine göre daha üstün olduğu saptanmıştır. HPB-LACK geni ile

aşılama farelerde ve köpeklerde VL'ye karşı immunitenin olduğu gösterilmiştir. İmmünizasyon sonrası deney hayvanlarında IgG2 ve IgG1 oranlarının, lenfositlerin proliferasyonunun yükseldiği, IFN- γ ve IL-12 ekspresyonunun arttığı, ancak klinik semptomlarda, hedef hücrelerde bulunan parazit miktarında ve IL-4 düzeyinde azalma olduğu görülmüştür. Farelerin TSA veya LmSTI1 ile aşılması sonucunda ise, *L.major* enfeksiyonuna karşı CD4+ T hücre aracılı koruyuculuk sağlamıştır (9).

Dört histon plazmitinin (H2A, H2B, H3, H4) karışımı BALB/c farede *L.major*'a karşı Th1 aracılı koruma sağlamıştır. CPA ve CPb plazmitleri tek başlarına etki göstermezken birlikte kullanıldıklarında farede *L.major*'a karşı koruma sağlamıştır. KMP 11 ile aşılama farelerde immün yanıt oluşurken, KMP 11, TRYP, LACK ve GP63'den oluşan karışım haldeki DNA ile aşılama köpeklerde *L.infantum*'a karşı koruma sağlanamamıştır. (35)

NH36 DNA aşısı ise farelerde Th1 yanıtı oluşturarak *L.chagasi*, *L.mexicana* ve *L.amazonensis*'e karşı rekombinant NH36 veya FML antijenleri ve saponinden daha yüksek koruma sağlamıştır (46).

Denenen aşı adaylarının henüz faz IIa aşamasında olduğu ve koruyucu özellikler gösterdiği bilinse de, şimdiye kadar faz III. aşamasında bulunan bir çalışma yoktur .

ADJUVANT SEÇİMİ

Şimdiye kadar tanımlanan aşı adayı antijenler leishmaniasis karşı korumada henüz yeterli değildir. Sadece antijenin verilmesi ile her zaman etkili bir yanıt oluşmadığından çeşitli adjuvantlar kullanılır.

Aşı geliştirilmesindeki en büyük engel T hücrelerini uyarıcı güvenli ve etkili adjuvanların elde edilememesidir. Daha önceleri sadece IL-12' nin CL hayvan modellerinde önleyici etkinliği gösterilmiştir. IL-12' nin uzun süreli immunité sağlamadığı belirlendiğinden beri yeni bir adjuvant geliştirilememiştir. Coler ve Reed (2005) farklı adjuvanların varlığında insanlarda kullanılması için daha uygun aday olması muhtemel monofosforil lipid A (MPL®)'nin leishmanyal antijenler ile değerlendirmiştir. MPL®*Salmonella minnesota*' dan elde edilen lipopolisakkarit monophosphoryl lipid A' nın detoksifiye türevidir. MPL® klinikte insanda, malarya aşılama, hepatit B' de, genital herpes, alerji aşısı duyarlılığında ve insan papilloma virüsünde adjuvan olarak kullanılmaktadır. İnsan hastalıkları için muhtemel aşı adayı olan MPL®'nin, sistemik toksisitesi olduğuna dair kanıt bulunamamış ve iyi tolere edildiği belirlenmiştir. MPL® insan kullanımı için ilk T-hücre adjuvanı olarak onaylanmıştır. Böylece MPL®'nin leishmaniasis için aşı adjuvanı olarak kullanılmasının iyi bir çözüm olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra MPL®, TLR-4 (Toll benzeri reseptör 4)' e antijen sunan hücreleri aktive ettiği için, *Leishmania* enfeksiyonuna karşı doğal ve kazanılmış bağışıklığa katkıda bulunan en uygun adjuvandır (16).

İnsan aşılarında onaylanmış 2 adjuvant vardır. Bunlar kuvvetli antikor cevabını uyaran, ancak antijen-spesifik Th1 yanıtının zayıf indükleyicisi olan, alum ve squalendir. Canlı vektörlerin, IL-12'nin, saf DNA'nın veya mikrokürelerin kullanımı ile oligonükleotidler içine DNA eklenmesi (CpG dizileri) gibi stratejiler, klinik öncesi modellerde geniş olarak değerlendirilmiştir. IL-12'nin subkutanöz enjeksiyonu, çözünebilir leishmanial antijenler (SLA'lar) ile güçlü bir anti-SLA Th1 yanıtını oluşturur. Bu antijen karışımlarına karşı Th2 cevabı görülmemektedir. IL-12 antijenlere karşı Th1 yanıtı oluşturarak fare ve primatlarda leishmaniasis de dahil çeşitli enfeksiyon hastalıklarında başarıyla kullanılmıştır. Ancak IL-12'nin dezavantajı immünize antijenlere güçlü immün yanıt oluşturmada yetersiz olmasıdır. Bu yüzden BALB/c farenin *Leishmania C* kinaz (LACK) proteini ve adjuvan olarak IL-12 karışımıyla aşılamaıyla *L.major*'e karşı kısa süreli immün yanıt oluşumu görülmüştür. Buna karşın hem LACK DNA hem de LACK protein ve IL-12 DNA'sıyla uzun süreli koruma sağlanmıştır.

Histon H1, sistein proteinaz B (CPB) ve sistein proteinaz A (CPA) DNA aşıları hem tek başına hem de kombine olarak, mikroküreler içine kapsülünerek fareye verilmiştir. Bu çalışma sonucunda CPA DNA'nın tek başına koruma sağlamadığını ve CPB DNA ve her iki DNA ile aşı kombinasyonlarının ise *L.major*'le enfeksiyon sonrası 14 hafta sonrasında kısmi koruma sağladığı görülmüştür. Rekombinant CPA ve CPB proteinlerinin poloxamer ile karışımı *L.major* ile enfekte CL fare modellerinde test edilmiş, CPA'nın koruma sağlamadığı, CPB'nin ise sadece kısmi koruma sağladığı belirlenmiştir. Fukoz mannoz (FML) ligandı *L.donovani* ve *L.infantum*'a karşı fare ve köpeklerde immün yanıt oluşturmak için kullanılan kompleks bir glikoprotein fraksiyonudur. Alum, BCG, IL-12, saponin ve QuilA içeren FML antijen kompleksleri, GP63 komponentleri veya FML ile adjuvant kombinasyonları olarak kullanılmıştır. Bu çalışmalarda FML/gp36 içeren aşılarda *L.donovani* ile enfekte fare modellerinde koruma sağladığı gösterilmiştir (53).

Günümüze kadar birçok önemli adjuvan ve taşıyıcı sistem çalışması yapılmıştır. Bunlar vektör DNA (adenovirüs ve pox virüsü), APC (antijen sunucu hücre) hedefleyen peptidler, yağda su emülsiyonu, suda yağ emülsiyonu (MF59) ve monofosforil lipid A içeren TLR agonistleri (MPL®) ve CpG gibi antijen taşıyıcı metodları içerirler (16).

TATARCİK TÜKÜRÜK ANTİJENLERİNİ İÇEREN AŞILAR

Leishmania parazitleri, bir konaktan diğerine, tatarcığın ısırması sırasında tükürüğündeki süspansiyonun geçmesi ile bulaşır. Yaklaşık 30 farklı kum sineği türü *Leishmania* parazitlerini taşır ve bulaştırır. Eski dünya *Leishmania* parazitleri *Phlebotomus* cinsi kum sinekleri tarafından bulaşırken, yeni dünyadakiler *Lutzomyia* cinsi sinekler ile bulaşır. Endemik alanlardaki hayvan ve insanlar enfekte olmamış kum sinekleri tarafından daha sık ısırılır ve

bundan dolayı hücre aracılı anti tükürük antikorları ısırsınan kısımda gecikmiş tip hipersensitif reaksiyon gösterir (10).

Kum sineği tükürüğü ve onun vazodilatör peptidi, maxadılan, enfeksiyonun ilk aşamasında *Leishmania* enfeksiyonunu desteklemiş ve birkaç fare türünde CL'in daha da ilerlemesine neden olmuştur (8). İlginç olarak, *Lutzomyia longipalpis* maxadılan veya *Phlebotomus papatasi* SP-15 protein gibi bileşenlere önceden bağışıklı farelerde *L.major* enfeksiyonuna karşı korunmalı oldukları görülmüştür (63). Bu sonuçlar, kum sineğine-spesifik bileşenlere hedefli bir aşı ile farelerde, ciltte kum sineği ısırıkları gibi yerel yanıtların değişmesine ve mikro ortamda parazit için koloni oluşmayı zorlaştırmasına neden olabileceğini göstermiştir. Bu tip aşılarda parazite spesifik hedeflenen aşılara göre daha avantajlıdır. Çünkü doğada kum sineği tekrarlanan ısırıkları korumayı artırır. Eğer insan denemelerinde etkinliği kanıtlanırsa, bu leishmaniasisin ve diğer vektörle bulaşan hastalıkların kontrol stratejisi için oldukça önemli olacaktır. Bu tür aşılarda için esas problem farklı kum sineği türleri ve *L.major* dışındaki farklı *Leishmania* türleri için ortak koruyucu antijenleri tanımlamaktır (36, 59).

Gözlemlere dayanarak kum sineği ve tükürük bileşenlerinin patojenlerin enfektifliğini arttırdığı (35), aşılarda tükürük bileşenleri veya vektör barsak antijenlerinin enfeksiyona karşı korumayı arttırdığı söylenebilir. Max veya Maxadılan proteinleri ve *Phlebotomus papatasi*'den elde edilen SP15 antijeni farede *L.major* enfeksiyonuna karşı direnç oluşumunu sağlamıştır (62).

DENDRİTİK HÜCRE TEMELLİ AŞILAR

Dendritik hücreler (DH) vücudun tüm dokularında bulunurlar ve birçok *Leishmania* parazit türleri için konak hücre görevi yaparlar. Vücutta bulunan parazitler DH'lere direk olarak veya kan hücrelerini enfekte ettikten sonra girerler (42). Parazitler DH üzerinde bulunan amastigotlara uygun DC-SIGN reseptörlerini kullanırlar. Daha sonra enfekte olmuş DH hücrelerinin yüzey fenotipleri olgunlaşarak değişime uğrar. Enfekte DH'ler, Th1 tipi immün hücrelerini indükleyerek *Leishmania*'nın ortadan kaldırılmasında önemli rolü olan IL-12'yi üretirler.

Son yıllarda doğal bağışıklık sisteminin rolünün anlaşılması, anti-leishmanial bağışıklığın başlaması ve gelişmesi için, aşı antijenlerinin taşınmasında dendritik hücrelerin kullanımı sağlamıştır (12, 64). Dendritik hücreler, özel antijenlerle inkübe edilip bu antijenleri fagosite ettikten sonra, antijene spesifik immune yanıt oluşturmaktadırlar. Heidrun Moll'un grubunun öncülük ettiği BALB/c fare modelinde yapılan bir çalışmada, *Langerhans* hücrelerinin doğal bir adjuvant gibi davrandığı ve bir *L. major* parçasıyla uyarılmış *Langerhans* hücrelerinin, IL-12 aracılı korumaya benzer şekilde, enfeksiyondan korumayı da desteklediğini göstermiştir (25).

Ex vivo antijen-sinyalli *Langerhans* hücrelerinin (LCs), myeloid DH'ler (mDH), ya da plasmacytoid DH'ler (pDH)'lerinin BALB/c farelerde *L. major* enfeksiyonuna karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. Farklı GP63 kaynaklı peptidlerle yüklenmiş dendritik hücreler; kullanılan peptide bağlı olarak çok güçlü korumadan hastalığın şiddetlenmesine kadar farklı sonuçlara yol açmıştır (11, 51, 52, 60).

LEISHMANIASİSE KARŞI NON-PATOJENİK AŞI ADAYI: *L. tarentolae*

İnsanlar için patojen olmayan etkenlerin aynı türden olan enfeksiyonlara karşı aşı geliştirilmesinde önemli olduğu bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda parazitik ancak patojen olmayan protozoan olan *L. tarentolae*'nın da leishmaniasis için aşı geliştirilmesinde umut verici olduğu ortaya çıkmıştır. Bu türden olan etkenler enfeksiyonu en iyi şekilde taklit eder ve immun sistem aktivasyonunu artırır. Yapılan bir çalışmada *L. tarentolae* canlı aşı adayı olarak kullanıldığında aşı adayının dendritik hücreler ve lenfoid organlar tarafından etkili şekilde tanındığı, antijen sunumunu gerçekleştirdiği ve sonuç olarak T hücre yanıtını sağladığı tespit edilmiştir. Böylece *L. tarentolae*'nin antijen sunumundaki artış sonucunda T-hücrelerin immun yanıtındaki etkisinin oldukça büyük ve kaliteli olduğu ortaya çıkmıştır. *L. tarentolae* dendritik hücre olgunlaşmasını aktive etmekle T-hücre proliferasyonunu artırır ve gama interferon üretimini indüklemiş olur. *L. tarentolae* parazitleri ile enfekte olan BALB/c farelerinde *L. donovani*'ye karşı koruyucu bir immün yanıtın oluştuğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar canlı aşı adayı olarak *L. tarentolae* vektörlerinin kullanılmasının ümit verici bir yaklaşım olduğunu göstermektedir (13).

SENTETİK AŞILAR

Polimer Bazlı Yapay Aşılar

Son yıllarda polimerlere dayalı aşı çalışmalarına daha çok önem verilmektedir. Bunun nedeni polimere bağlanmış antijenlerden oluşan konjugatların immunojenliğinin, antijenlerin tek başına kullanılmasına göre daha yüksek olmasıdır.

Doğal polielektrolitlerin (proteinler, polisakkaritler, nükleik asitler) ve bunların yapısal analoglarının (polipeptitler, polinükleotidler) organizmada antijenik özellik gösterdiği bilinmektedir. İmmün uyarıcı olarak görev yapan doğal polielektrolitlerin (polisakkaritler, doğal nükleik asitler, çift kenarlı sentetik polinükleotidler) diğer antijenlere karşı bağışıklık sistemini harekete geçirdiği bilinmektedir (26).

Sentetik polielektrolitler, tipik antijenler (protein, doğal mikrobiyal polisakkaritler ve onların sentetik analogları) ile karıştırıldıkları zaman, immün uyarıcı olarak görev yapıp bağışıklık yanıtını birkaç kat güçlendirir. Ayrıca, kendileri yeterince aktif olmayan bireysel bakteriyel veya viral antijenler, kimyasal sentetik polielektrolitlere bağlandığında güçlendirilmiş spesifik immün yanıtı uyarırlar (33).

Salmonella ile yapılan bir çalışmada iki çeşit konjugat hazırlanmış ve farelerde uygulanmıştır. Birinci grup deneylerde, bakteriden izole edilen polisakkarit antijen (PS) AA-VP kopolimeri ile (konjugat 1), ikinci grup deneylerde ise, PS ve flagellin proteinleri, aynı AA-VP kopolimeri ile konjuge edilmiştir (konjugat 2). Belirli bir süreden sonra (14-30 gün), bağışıklı fareler ile kontrol grubu paralel olarak öldürücü dozda bakteri ile enfekte edilmiştir. Kontrol grubundaki tüm hayvanlar ölürken, tüm bağışıklı hayvanlar iyileştirilmiştir. Sadece polisakkarit içeren antijen ile aşılama %100 koruma sağlayabilmek için dozun konjugat 2'ye göre 10 kat fazla olması gerekmiştir. Sadece polisakkarit antijeninin makul dozlarda immunizasyonu neredeyse hayvanları korumamıştır. Bu nedenle, ilk kez antijen-SPE konjugatlarının antibakteriyel aşılama gibi görev yapabileceği gösterilmiştir. Polyoxidonium'un hemaglutinin ve nöraminidaz ile konjugatı, grip virüslerinin protein alt birimleri, Rusya'da başarılı bir şekilde de kullanılan Pasteurian olmayan ilk aşı olarak ortaya çıkmıştır (son 7 yıl için yaklaşık 50 milyon bağışıklı kişi). Bu prensibin kullanılmasıyla polimer-alt birimi insan aşısının dünyada ilk kez yapılabilirliğini gösterilmiştir. Örneğin Grippol aşısı diğer tehlikeli enfeksiyonlara karşı yeni jenerasyon aşılamanın geliştirilmesi için yol açmıştır (33).

Ancak literatür analizine göre leishmaniasis için aşı geliştirilmesinde sentetik polielektrolitlere dayalı bir yaklaşım bulunmamaktadır. *Leishmania* promastigotlarının yüzey antijeni olan LPG moleküllerinin kimyasal yapılarının çeşitli polimerler ile konjugasyon oluşturma yetenekleri, LPG polimer konjugasyonunun leishmaniasis için aşı adayı olarak ümit verici olmasının nedenidir. Bu nedenle tarafımızdan bu konu ile ilgili 1085170SBAG-4007 nolu TÜBİTAK proje çalışmaları yürütülmektedir. Elde edilen ön bulgulara göre PAA'nın parazitlerin enfektifliğini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir ve çalışmalara devam edilmektedir (24).

Sonuç olarak uzun yıllardan beri leishmaniasis için çeşitli yaklaşımlar uygulanmasına rağmen, henüz etkin bir aşı elde edilememiştir. Küresel ısınmaya bağlı olarak hastalığın giderek artması, hastalığın etkenlerinde kullanılan ilaçlara, vektörlerinde ise kullanılan insektisitlere karşı dirençliliğin gelişmesi, ayrıca HIV ve diğer immün yetmezliklerin giderek artması, leishmaniasis için aşı geliştirilmesini zorunlu bir hale getirmiştir. Ancak leishmaniasis aşı ile kontrol edilebilecek bir hastalık olduğundan son yıllarda aşı geliştirilmesi konusunda ortaya çıkan yeni yaklaşımlar hastalık ile mücadelede daha ümit verici sonuçların elde edilebileceğine olan inancı artırmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu derlemenin yazılmasında gösterdiği ilgi ve önerilerinden dolayı Prof. Dr. Yusuf Özbek'e ve 1085170SBAG-4007 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında yazıldığından dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Aguilar-Be I, Zardo RS, Paraguai de Souza E, Borja-Cabrera GP, Rosado-Vallado M, Mut-Martin M**, 2005. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infect Immun*, 73: 812-819.
2. **Alexander J, Coombs GH, Mottram JC**, 1998. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a TH1 response. *J Immunol*, 161: 6794-801.
3. **Allahverdiyev AM**, 2009. Leishmaniasis: investigation of new vaccines. Eurasia Congress of Infectious Diseases (EACID), October 1-4, Bakü-Azerbaycan
4. **Allahverdiyev AM**, 2000. The basic principals to create of vaccine in the tropical diseases. II. National Congress of Tropical Diseases, September 25-29, SanliUrfa-Turkey.
5. **Allahverdiyev AM**, 1998. Molecular approaches to development vaccines in *Malaria*. *Advanced Biopolymer systems "First Japanese - Turkish Workshop"*, September, 16-19 Gebze, Turkey.
6. **Allahverdiyev AM, Koksall F**, 1997. The new molecular biotechnological methods for creation vaccine against infection diseases. First Congress of Physiologists and Pulmonologists of Azerbaijan, October, 27-28, Baku-Azerbaijan.
7. **Allahverdiyev AM**, 1994. The molecular and biotechnological approach in creation vaccine against to malaria. XII Congress of Medical Days. Kayseri, Turkey.
8. **Andrade BB, de Oliveira CI, Brodskyn CI, Barral A, Barral-Netto M**, 2007. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Scand J Immunol*, 66: 122-127.
9. **Armijos RX, Weigel MM, Calvopina M, Hidalgo A, Cevallos W, Correa J**, 2004. Safety, immunogenicity, and efficacy of an autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, 22: 1320-1326.
10. **Belkaid Y, Valenzuela JG, Kamhawi S, Rowton E, Sacks DL, Ribeiro JM**, 2000. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proc Natl Acad Sci*, 97: 6704-6709.
11. **Berberich C, Ramirez-Pineda JR, Hambrecht C, Alber G, Skeiky YA, Moll H**, 2003. Dendritic Cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens. *J Immunol*, 170: 3171-3179.
12. **Brandonisio O, Spinelli R, Pepe M**, 2004. Dendritic cells in *Leishmania* infection. *Microbes and Infection*, 6:1402-1409.
13. **Breton M, Tremblay MJ, Ouellette M, Papadopoulos B**, 2005. Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Infect Immun*, 73: 6372-6382.
14. **Campos-Neto A, Porrozzi R, Greeson K, Coler RN, Webb JR, Seiky YA**, 2001. Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and non-human primate models of the human disease. *Infect Immun*, 69: 4103-4108
15. **Campos-Neto A, Webb JR, Greeson K, Coler RN, Skeiky YA, Reed SG**, 2002. Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTI1 leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Infect Immun*, 70: 2828-2836.
16. **Coler RN, Reed SG**, 2005. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol*, 21: 244-249.
17. **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*, 15: 11473-11477.
18. **Cornelissen AW, Schetters TP**, 1996. Vaccines against protozoal diseases of veterinary importance. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 15: 61-72.
19. **Cruz A, Coburn CM, Beverley SM**, 1991. Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 7170-7174.
20. **Davoudi N, Tate CA, Warburton C, Murray A, Mahboudi F, Mc Master WR**, 2005. Development of a recombinant *Leishmania major* strain sensitive to ganciclovir and 5-fluoro cytosine for use a live challenge in clinical trials. *Vaccine*, 23: 1170-1177.
21. **Descoteaux A, Turco SJ**, 2002. Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes Infect*, 4:975-81.
22. **Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, Mazeris A, Ozbek Y, Boelaert M**, 2008. Spread of Vector-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis*, 14: 1013-1018.
23. **Dunan S, Frommel D, Monjour L, Ogunkolade BW, Cruz A, Quilici M**, 1989. The Phocian veterinary study group on visceral leishmaniasis. Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 11: 397-402.
24. **Elcicek S, Bagirova M, Allahverdiyev AM**, 2009. Poliakrilik asite maruz kalmış *L.infantum* promastigotlarının J774 makrofaj hücrelerine enfektifliğinin incelenmesi. 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım 2007, Adana-Türkiye
25. **Flohe SB, Bauer C, Flohe S, Moll H**, 1998. Antigen-pulsed epidermal *Langerhans* cells protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite *Leishmania major*. *European J Immunol*, 28: 3800-3811.
26. **Gradoni L, Foglia Manzillo V, Pagano A, Piantadosi D, De Luna R, Gramiccia M**, 2005. Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected. *Vaccine*, 23: 5245-5251.
27. **Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Seder RA**, 1998. Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. *Nature Medicine*, 4: 1409-1415.
28. **Handman E, Button LL, McMaster RW**, 1990. *Leishmania major*: production of recombinant GP63, its antigenicity and immunogenicity in mice. *Exp Parasitol*, 70: 427-435.

29. **Handman E, Symons FM, Baldwin TM, Curtis JM, Scheerlinck JP**, 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.
30. **Handman E**, 1999. Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol*, 44: 1-39.
31. **Handman E**, 2001. Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev*, 14: 229-243.
32. **Iborra S, Carrion J, Anderson C, Alonso C, Sacks D, Soto M**, 2005. Vaccination with the *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice. *Infect Immun*, 73: 5842-5852.
33. **Jimenez-Ruiz A, Boceta C, Bonay P, Requena JM, Alonso C**, 1998. Cloning, sequencing, and expression of the PSA genes from *Leishmania infantum*. *European J Biochem*, 251: 389-397.
34. **Kabanov VA**, 2004. From synthetic polyelectrolytes to polymer-subunit vaccines. *Pure Appl Chem*, 76: 1659-1677.
35. **Kedzierski L, Zhu Y, Handman E**, 2006. *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitol*, 133: 87-112.
36. **Lima HC, Titus RG**, 1996. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect Immun*, 64: 5442-5445.
37. **Marr JJ, Nilsen TW, Komuniecki RW**, 2003. *Molecular Medical Parasitology*. Amsterdam: Academic Press, p.231-236
38. **Molano I, Alonso MG, Miron C, Redondo E, Requena JM, Soto M, Nieto CG, Alonso C**, 2003. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L.infantum*. *Vet Immun Immunopathol*, 92: 1-13.
39. **Moreno J, Nieto J, Masina S, Cañavate C, Cruz I, Chicharro C**, 2007. Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine*, 25: 5290-300.
40. **Muyombwe A, Olivier M, Harvie P, Bergeron MG, Ouellette M, Papadopoulou B**, 1998. Protection against *Leishmania major* challenge infection in mice vaccinated with live recombinant parasites expressing a cytotoxic gene. *J Infect Dis*, 177: 188-195.
41. **Olobo JO, Handman E, Curtis JM, Mitchell GF**, 1981. Antibodies to *Leishmania tropica* promastigotes during infection in mice of various genotypes. *Australian J Exp Biol Med Sci*, 58: 595-601.
42. **Olobo JO, Anjili CO, Gicheru MM, Mbatia PA, Kariuki TM, Githure JI, Koech DK, McMaster WR**, 1995. Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniasis using recombinant *Leishmania* 'major surface glycoprotein' (GP63). *Vet Parasitol*, 60: 199-212.
43. **Onji M, Akbar SMF**, 2008. Dendritic Cells in Clinics, 2nd Edition *Springer Japan*.
44. **Ozcel MA**, 2007. *Tıbbi Parazit Hastalıkları*. İzmir: Dernek, s.197- 244.
45. **Ozbal Y**, 2000. *Temel İmmünoloji*. İkinci Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. s.399.
46. **Palatnik-de-Sousa CB**, 2008. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*, 26: 1709-1724.
47. **Papadopoulou B, Roy G, Breton M, Kunding C, Dumas C, Fillion I**, 2002. Reduced infectivity of a *Leishmania donovani* bioprotein transporter genetic mutant and its use as an attenuated strain for vaccination. *Infect Immun*, 70: 62-68.
48. **Piedrafita D, Proudfoot L, Nikolaev AV, Xu D, Sands W, Feng GJ, Thomas E, Brewer J, Ferguson MAJ, Alexander J, Liew FY**, 1999. Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania phosphoglycans*. *Eur J Immunol*, 29: 235-244.
49. **Rachamim N., Jaffe CL**, 1993. Pure protein from *Leishmania donovani* protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis. *J Immunol*, 150: 2322-2331.
50. **Rafati S, Salmanian AH, Hashemi K, Schaff C, Belli S, Fasel N**, 2001. Identification of *Leishmania major* cysteine proteinases as targets of the immune response in humans. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 113:35-43.
51. **Ramirez-Pineda, JR, Gilchrist K, Robledo S, Sep'ulveda JC, Moll H, Soldati D**, 2001. Attenuated *Toxoplasma gondii* ts-4 mutants engineered to express the *Leishmania* antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice. *Vaccine*, 20: 455-461.
52. **Ramirez-Pineda JR, Frohlich A, Berberich C, Moll H**, 2004. Dendritic cells (DC) activated by CpG DNA *ex vivo* are potent inducers of host resistance to an intracellular pathogen that is independent of IL-12 derived from the immunizing DC. *J Immunol*, 172:6281 - 6289.
53. **Remer KA, Apetrei C, Schwarz T, Linden C, Moll H**, 2007. Vaccination with plasmacytoid dendritic cells induces protection against infection with *Leishmania major* in mice. *Eur J Immunol*, 37: 2463 - 2473.
54. **Sharifi I, Fekri AR, Aflatonian MR**, 1998. Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *Lancet*, 351: 1540-1543.
55. **Silvaa VO, Borja-Cabrera GP, Pontesa NNC, Souza EP, Luzb KG, Palatnikc M, Sousa CPB**, 2000. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *Vaccine*, 19:1082-1092.
56. **Silvestre R, Cordeiro-da-Silva A, Ouass A**, 2008. Live attenuated *Leishmania* vaccines: a potential strategic alternative, *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 56: 123-126.
57. **Tertyshnikova SM, Yurovski VV, Ivanov BB, Allahverdiyev AM**, 1991. Immunochemical Study Of Surface Protein Antigenic Determinants of Tropical Malaria Parasite Plasmodium-Falciparum with The Use Of Synthetic Peptides. *Bioorganicheskaya Khimiya*, 17, 494-503.
58. **Turgay N**, 2007. *Tıbbi ve veteriner immunparazitoloji*. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları No: 21 İzmir, p.163-164.

59. **Souza AE, Barres PA, Coombs GH, Mottram JC**, 1994. Null mutants for the *lmcpa* cysteine proteinase gene in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*, 63: 213-220.
60. **Thiakaki MI, Rohousova V, Volf VP, Chang KP, Soteriadou K**, 2005. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. *Microbes Infect*, 7:760-766.
61. **Tsagozis P, Karagouni E, Dotsika E**, 2004. Dendritic cells pulsed with peptides of GP63 induce differential protection against experimental cutaneous leishmaniasis. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 17: 343-352.
62. **Turco SJ, Descoteaux A**, 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Ann Rev Microbiol*, 46: 65-94.
63. **Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Mendez S, Kamhawi S, Rowton ED**, 2001. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med*, 194: 331-342.
64. **Valenzuela JG, Garfield MK, Rowton ED, Pham VM**, 2004. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *J Exp Biol*, 207: 3717-3729.
65. **Vanloubbeek Y, Jones DE**, 2004. The immunology of *Leishmania* infection and the implications for vaccine development. *Ann NewYork Acad Sci*, 1026: 267-272.
66. **Webb JR, Campos-Neto A, Skeiky YA, Reed SG**. 1997. Molecular characterization of the heat-inducible LmSTI1 protein of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*, 89: 179-193.
67. **World Health Organization**, 1993. Global health situation in selected infections and parasitic diseases due to identification organisms. *Wkly Epidemiol Rec*, p.641-648.
68. **Xu D, McSorley SJ, Chatfield SN, Dougan G, Liew FY**, 1995. Protection against *Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/c mice by GP63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA- AroD-). *Immunol*, 85: 1-7
69. **Yang DM, Fairweather N, Button LL, McMaster WR, Kahl LP, Liew FY**, 1990. Oral *Salmonella typhimurium* (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (GP63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *J Immunol*, 145: 2281-2285.