

SITMA AŞILARINDA YENİLİKLER

Kor YERELİ

Sıtma günümüzde dünyanın pek çok yöresi için en önemli mortalite ve morbidite nedenini oluşturmaktadır. Her yıl ortalama 300-500 milyon yeni sıtma olgusuna rastlanmakta ve yine her yıl sıtmaya bağlı, çoğunluğunu 5 yaşın altında çocukların oluşturduğu 1 milyon ölüm olgusuna rastlanmaktadır. Sıtmanın tüm dünyada % 2.3 görülme sıklığı ile, alt solunum yolu infeksiyonları (% 3.5) ve tüberkülozu (% 2.8) takiben üçüncü sırada yer aldığı bilinmektedir (11). Yalnızca Afrika'da sıtmanın doğrudan ve dolaylı maliyeti 1987 yılı için 800 milyon Amerikan doları olurken, bu rakam 1995'de 1 milyar 800 milyon Amerikan dolarına çıkmıştır. Sıtma infeksiyonu ile mülteciler, iş aramak amacıyla sürekli yer değiştiren göçmen topluluklar, ormanlar, maden ve su kaynakları gibi pek çok çevresel faktör direkt bağlantılıdır. Bu nedenle sıtma hareketli bir hedefi temsil etmektedir ve basit epidemiyolojik kontrol programları ile kontrol altına alınabilmesi mümkün değildir (4). Bununla birlikte hamile kadınlar ve 5 yaşın altındaki bebekler sıtma infeksiyonu için en önemli bir risk gruplarını oluşturmaktadır. Bugün için özellikle bu iki risk grubunu hedefleyen etkin bir sıtma aşısının geliştirilmesi sıtma kontrolü girişimlerine önemli bir ekonomik ilave sağlayan bir strateji olacaktır. Son 10 yıl içinde aşı adayı olabilecek antijenler ve bunların genlerinin tanımlanması konusunda oldukça önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Fakat aşı geliştirmenin oldukça karmaşık ve uzun bir süreç içermesi, maliyeti nedeniyle ticari ilginin az oluşu gibi nedenlerle klinik deneylerde aşılardan denenmesi tam olarak başarılamamıştır (1,8,10).

Normalde aşılardan virüs ve bakterilerin neden olduğu pek çok infeksiyon önlenmektedir. Bu aşılardan hedefi olan virüs ve bakteriler kolaylıkla in-vitro olarak üretilebilmektedir. Çünkü tümünün de çok basit bir yaşam döngüleri vardır. Böylece kolay üretilebilmeleri sayesinde antijenik fraksiyonlarının elde edilmesi ve bunların aşı geliştirme çalışmalarında kullanılmaları da çok kolay olmaktadır. Burada önemli olan aşısı üretilen mikroorganizmanın genelde tek bir yaşam formunun olması, az sayıda geninin bulunması ve tüm yaşam döngüleri boyunca sınırlı morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler geçirmeleridir. Burada aşı geliştirmek için gerekli olduğunu belirttiğimiz hiçbir özellik ne yazık ki *Plasmodium*'lar için geçerli değildir. Bu nedenle sıtmaya karşı aşı geliştirmede bilinen yollar yetmemiş, yeni arayışlar içine girilmiş ve belki de ileride pek çok kompleks mikroorganizma için de aşı geliştirmede geçerli olabilecek yeni deneyimler kazanılmıştır (1,2).

Sıtma aşılarının geliştirilmesinde karşılaşılan ana zorlukları şu şekilde maddelemek mümkündür (8):

1. Sıtma paraziti kültürde aşı oluşturmaya yetecek denli çok üretmek mümkün olmamaktadır. Elde edilen miktarlarda sadece klinik çalışmalar yapılabilir.
2. Sıtma paraziti yaşam döngüsü basit değil, oldukça karmaşıktır.
3. Aynı zamanda parazitin farklı hayat evreleri için farklı bağışıklık mekanizmalarına gerek duyulmaktadır.

Sonuç olarak, ideal bir sıtma aşısı parazitin tüm hayat evrelerinin antijenlerinin kimyasal veya DNA teknolojisi ile elde edilmesi sonucu hazırlanabilmeli ve birbirinden çok farklı bağışıklık mekanizmalarını aktive edebilecek düzeyde olmalıdır.

Aşının hedefi olabilecek parazit evreleri konak hücrelerde hızla parçalanırlar. Bu nedenle eğer, aşıyla uyarılan koruyucu mekanizmaların bu evrelere karşı mücadele etmeleri isteniyorsa, hızla hareket etmeleri gerekmektedir. Doğal infeksiyonlardaki bağışıklığın neden olduğu sorunları aşacak bir aşılama stratejisi bulunabilse bile, bunun yine de parazitin aşırı antijen çeşitliliği ile uğraşması gerekecektir. Bu aşırı antijen çeşitliliği de bugün yürütülen aşı çalışmalarındaki en büyük zorluğu oluşturmaktadır (10).

Bugün yapılan aşı çalışmaları aşağıda maddeler halinde sıralanan tüm olasılıkları göz önüne almaktadır (8):

1. Aşılama parazitin hücre dışı evrelerine karşı bir korunma sağlayabileceği gibi normalde doğal infeksiyon sırasında uyarılmayan savunma mekanizmalarını da harekete geçirmelidir.
2. Aşı ile oluşturulan korunma doğal yollardan edinilen korunmadan daha uzun süreli olmalıdır.
3. *Plasmodium* türlerinin pek çok suşlarındaki ortak antijenleri tanımlayabilmek için monoklonal antikolar kullanılmalıdır.

Endemik bölgelerdeki insanlar sıtmaya karşı immunité geliştirmektedir. Antimalaryal aşıların geliştirilmesindeki en önemli etken, sıtma kontrolündeki zorlukların artışı ve diğer infeksiyöz hastalıklara karşı yapılan aşılamalardaki başarılar olmaktadır. Öncelikle, şimdiye kadar sıtma parazitinin karmaşık yapısına yakın bir organizmaya karşı üretilmiş ve insanlığın kullanımına sunulabilmiş hiçbir aşı geliştirilememiştir. Yıllar boyunca sıtma aşısı üretimindeki en büyük engel pratik antijen kaynağının eksikliği olmuştur. Büyük miktarda sporozoit çıkarılması için sivrisineklerin diseke edilmesi mümkün olmamıştır. Ayrıca insan eritrosit hücresinden, parazitin yapısal parçalarının ayrıştırılmasındaki zorluklar aşılamaz görülmüştür. Monoklonal antikolar ve rekombinant DNA teknolojisinin ortaya çıkışı bu konuya tüm bakışı değiştirmiş ve immunité oluşturabilecek spesifik parazit komponentlerinin yapay üretimine ve tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Parazitin tüm dönemlerine karşı bunun gibi alt birim aşıların araştırılması son on yıl boyunca sıtmadaki immunolojik çalışmalara hakim olmuştur. Parazitin her dönemi için, aday moleküller bulunmuş, üretilmiş ve değişik başarı dereceleriyle sonuçlanan değişik deneysel sistemlerde kullanılmıştır. Çok hızlı gelişme gösteren sporozoit aşılama alanı sonucu geliştirilen prototip aşılar oldukça sınırlı başarı sonuçlarıyla gönüllü insanlar üzerinde denenmiştir. Sıtmanın farklı evrelere karşı geliştirilen aşılarla ilgili immun mekanizmalar tablo 1'de özetlenmiştir (6).

1980'lerin başlarından itibaren monoklonal antikor ve rekombinant DNA teknolojilerinin gelişimi özgül protein antijenlerinin genlerini tanımlamayı mümkün kılmıştır. Bu gelişmeyi takiben, izole edilmiş proteinlerin saflaştırılması ve aminoasit dizilerinin belirlenmesi yönündeki buluşlar ile genlerin sentetik DNA problemleriyle tanımlanması gerçekleşmiştir. Genleri izole ederek rekombinant protein antijenlerinin sınırsız sentezleri mümkün olmuştur. 1987 yılında sadece 27 antijen klonlanabildiği halde 1997 yılında 3200 antijenin dizisi "TDR/IMMAL Sıtma DNA Sekans Veri Tabanı" adı verilen ortak bir bilgi deposunda saklanmaktadır. Böylelikle aslında, sıtma parazitinin yaşam döngüsünün tüm evrelerinden bir antijen dizisi tanımlanmıştır. Ancak, bu antijenlerin koruyucu bağışıklıkta oynadığı rol yalnızca deneysel infeksiyonlarda homolog olarak kullanılmasıyla test edilebilmektedir (8).

Bugün için sıtmaya karşı geliştirilen aşıları üç ana başlık altında incelemek mümkündür:

Tablo 1. Sıtmanın farklı evrelerine karşı geliştirilen aşılarda etkin immun yanıt.

Evre/Hedef	Immün yanıt/ Etkin mekanizma	Yaklaşım şekli
Pre-eritrositik evreler		
1. Sporozoit	<ul style="list-style-type: none"> • Antikorlar • CD4⁺ ve CD8⁺ hücreleri • Antikorlar 	<ul style="list-style-type: none"> • Sporozoit dolaşımı dakikalarla sınırlıdır. • Parazit, T hücrelerince tanınabilen MHC molekülleri ve antijenleri eksprese edebilen karaciğer hücrelerinde gelişir. • Parazit antijenlerinin hücre yüzeylerinde ekspresyonu.
2. Hepatik formlar		
Aseksüel kan evreleri		
Merozoit/infekte eritrositler	<ul style="list-style-type: none"> • Antikor - eritrosit invazyonunun inhibisyonunu içerir; hücre yapışmasının ve serbest radikallerin indirgenmesinin inhibisyonu 	<ul style="list-style-type: none"> • Infekte eritrositler üzerinde hiçbir MHC molekülü eksprese edilmez. Hastalığa karşı geliştirilen aşılar sitokin oluşturan işlenmiş parazit antijenlerine veya toksinlere yönelebilir.
Sekstüel evreler		
Gametosit/gamet, ookinet	<ul style="list-style-type: none"> • Antikor - sivrisinekteki fertilizasyon öncesi ve aktivitesini içerir. • Hücreyel immunite - sitokinler? 	<ul style="list-style-type: none"> • Sporogonik gelişim önemli bir hedeftir. • Parazit gelişiminin bu evresine katılan hiçbir konak MHC molekülü yoktur. • Infekte hücre yüzeyinde hiçbir MHC molekülü eksprese edilmez.

1. Sporozoit aşıları: Sporozoitlere yönelik aşıların amacı *Plasmodium*'ların karaciğerden salınımını engelleyerek hastalığın patolojik semptomlarını önlemektir. Bu konudaki ilk çalışmalar *P.knowlesi* kullanılarak maymunlar üzerinde yapılmıştır. Ancak bu tip aşılarda bir adjuvanın varlığına gereksinim duyulmuştur. Fakat bu adjuvanın istenmeyen etkilerinin varlığı nedeniyle bu tip aşı geliştirmeden vazgeçilmiştir. Ayrıca, bu tip aşıların geliştirilebilmesi için bol miktarda antijen üretimine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu da ancak *P.falciparum* için yeni kültür teknikleri ve rekombinant tekniklerin geliştirilmesi ile mümkün olabilmıştır. New York'ta geliştirilen yeni tekniklerle, X ışını uygulanan hayvan sıtması sporozoitlerinin insanlarda dahi mükemmel immun yanıtlar oluşturması sağlanmıştır. Bu koruyucu yanıtı oluşturan antijenin parazitini kaplayan sirkumsporozoit protein (CS) olduğu anlaşılmış ve bu proteine karşı oluşan monoklonal antikorların sporozoitlerin infektivitesini nötralize ettiği gösterilmiştir. Bu proteinle yapılan ilk aşı çalışmalarında, tetanoz toksinini taşıyıcı olarak kullanan bir rekombinant füzyon proteini kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda bu aşıların sadece tek bir B hücre epitopuna sahip oldukları gösterilmiştir. Bu tip aşıların özellikle CD⁺ T hücreleri üzerine etkilerinin olduğu da kanıtlanmıştır. Yine de bu tip aşıların insanlardaki koruyuculuk düzeyi istenilen seviyelere ulaşamamıştır. Bu nedenle, çoklu antijen peptid sistemi (MAP) adı verilen 8 kollu peptid antijenik epitoplar yeni çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır. Bu MAP'ların yüksek düzeyde immuno-

lojik özellikte olduğu ve farelerde yapılan çalışmalarda % 50-80 oranında koruyuculuk sağlayabildiği gösterilmiştir. Ayrıca, bu tip aşuların tetanoz toksinini taşıyıcı olarak kullanılan CS aşularında karşılaşılan pek çok sorunu da önleyebildiği belirtilmiştir (1,2,8,9).

2. Peptid aşuları: Sıtma geliştirme sürecinde sentetik peptidler de bir yaklaşım tarzı olarak ele alınmaktadır. Bu konuda en büyük gelişme Spf66 adı verilen 45 aminoasitten oluşan bir sentetik monomerin alüminyum hidroksit (ALUM) ile karıştırılması ile oluşan çok bileşenli bir aşının ortaya konulması ile yaşanmıştır. Ayrıca *P.falciparum* kan evrelerindeki iki antijenden (MSP-1 ve MSP-2 – Merozoit yüzey proteini) türeyen epitoplara dayanan sentetik kökenli bir aşı adayı Sri-Lanka'daki faz-I çalışmalarında denenmiştir. Bundan başka sentetik peptid olarak Serin Tekrar Antijeni (SERA) üzerinde de çalışmalar yapılmıştır. Yapılan araştırmalarda bu tip aşuların koruyuculuğunun % 38-60 düzeyinde olduğu saptanmıştır. Ancak, bu peptidlerin immunolojik olarak hangi mekanizmayı aktive ettikleri de tam olarak saptanamamıştır. Bu arada peptidlerin yaklaşık 100 aminoasitlik uzunlukta olmaları, gerekli epitoplara sahip olabilmeleri konusunda büyük dezavantaj yaratmaktadır (3,5,8).

3. DNA aşuları: DNA aşularının temelinde aşılınması istenen canlıya, parazite ait immunojeni kodlayan nükleik asit dizilerini içeren DNA plasmidinin doğrudan verilmesi ve bu parazite ait antijenlerin endojen olarak oluşturulması yatmaktadır. Bu teknik bugün için biyolojinin "soğuk füzyon tekniği" olarak tanımlanabilmektedir. Antijenlerin endojen olarak sentezlenmesiyle CD8+ T hücreleri uyarılabilmektedir. Üretilmesi istenen antijenler MHC Class I antijenleri ile sunulacağı ve her insanda farklı HLA antijenleri olduğu için toplumda en sık rastlanan HLA antijenlerinin sunulabildiği epitoplara DNA aşuları tarafından üretilebilmesi planlanmalıdır. Ayrıca, istenen antijenin PCR tekniği ile elde edilmesi sonucu parazitin kültürüne gereksinimi ortadan kaldırmaktadır. Bu arada aynı plasmidin üzerine birden fazla immunojeni kodlayan dizilerin yerleştirilebilmesi mümkün olabilmektedir. DNA aşuları ile birlikte IL-12, IL-2 ve Gamma İnterferon gibi sitokinlerin genlerinin de enjeksiyonunun immunolojik yanıtı arttırdığı bildirilmektedir. Bu konuda en ileri çalışmalar, A.B.D. Deniz Kuvvetleri Araştırma Enstitüsünde *P.yoelii* suşları ile sıçanlar kullanılarak yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarla, DNA aşularının endojen antijen sentezinin devamlı olmaması, sürekli üretilen antijene karşı immunolojik bir tolerans mekanizmasının gelişmesi ve enjekte edilen DNA'nın hücre genomuna entegre olabilmesi gibi bazı sakıncaları bulunmaktadır (1,7,8,10).

Bugün için yukarıda özetlenen tüm bu teknikleri kullanarak *P.falciparum* için geliştirilen aşular tablo 2'de şematik olarak gösterilmiştir (1).

Önümüzdeki birkaç yıl boyunca aday aşı moleküllerinin sayısının artışına paralel olarak insan denekli araştırmaların oranında da artış olacaktır. Sıtma aşısı araştırma teknikleri hızla gelişecektir ama yine de aşılması beklenen problemler oldukça fazla görünmektedir. Parazitin biyolojik detaylarındaki çeşitlilik karşısında, güvenilir ve daha kuvvetli koruyucu yanıt geliştirilmekteki zorluklar henüz aşılabilir gibi görünmektedir. Pratik bir aşının üretimi hiçbir şekilde yolun sonuna geldiği anlamına gelmeyecektir, tek bir aşıya ihtiyaç duyulan bölgelerde önlenemez hastalıklardan çocukluk döneminde ölenlerin sayısı artmaya devam etmektedir. Tüm bu nedenlerden ötürü sıtma aşularının gelecek pek çok yıllar boyunca daha, sıtma morbidite ve mortalitesinde büyük bir değişiklik yapamayacağı düşünülmektedir (1,6).

Tablo 2. P.falciparum için 1994 yılından günümüze aşı denemeleri.

Aşı tipi	Hedeflenen evre (Mekanizması)	Klinik deneme evresi	Araştırma kuruluşu
Pre-eritrositik evre			
R32NSI (lipozom)	CS protein (Humoral)	Faz I/II 1995	Amerikan Ordusu
RTS,S + farklı formülasyonlar	CS protein (Humoral + hücresele)	Faz I/II 1996	Amerikan Ordusu
RTS,S + SBAS2 (MPL + QS-21)	CS protein (Humoral + hücresele)	Faz IIb 1997	TDR/NYU
CSP MAP alum+QS-21	CS protein (Humoral+hücresele)	Faz I 1997	TDR/NYU
P2P30 (NANP) 6 MAP	CS protein (Humoral)	Faz I 1997	TDR/NYU
CSP protein DNA aşısı	CS protein (Humoral + hücresele)	Faz I 1997	Amerikan Ordusu
Bulaşma önleyiciler			
Pfs25 + alum	Seksüel evre (In-vitro humoral)	Faz I 1996	TDR/NIH
NYVAC-Pf27 prime	Seksüel evre (In-vitro humoral)	Faz I 1997	Amerikan Ordusu
Pfs25 + alum boost			
Çok komponentliler			
SPf66 + alum	Preeritrositik / aseksüel kan evresi (Humoral)	Faz II/III 1998	TDR/LSH/SODA
NYVAC - Pf7	Çok fazlı (Humoral + hücresele)	Faz I/II 1995	Amerikan Ordusu
Aseksüel kan evresi			
CSP-MSP-2 + alum	Preeritrositik / aseksüel kan evresi (Humoral + hücresele)	Faz I 1995	MRI-PNG
MSP - I/MSP - 2/SERA + montanie	Aseksüel kan evresi (Humoral-hücresele)	Faz I/II 1998	MRI-PNG
MSP-1 / MSP-2 + alum	Aseksüel kan evresi (Humoral)	Faz I 1994	Sri Lanka
P ₂ P ₃₀ MSP-1 19 kDa - alum	Aseksüel kan evresi (In-vitro)	Faz I 1997	TDR
AMA-1 + montanide	Aseksüel kan evresi (In-vitro)	Faz I 1998	EU/TDR

TDR: Dünya Sağlık Örgütü Tropik Hastalıklar Araştırma Bölümü, NYU: New York Üniversitesi, NIH: ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü, LSH: Londra Halk Sağlığı Okulu, SODA: İspanyol Denizaşırı Gelişme Örgütü, MRI-PNG: Papua Yeni Gine Tıbbi Araştırma Enstitüsü, EU: Avrupa Birliği.

KAYNAKLAR

- 1- Engers HD, Godal T: Malaria vaccine development, *Parasitol Today* 14:56 (1998).
- 2- Hagan P, Bjorvatn B, Jepsen S: European malaria vaccine initiative, *Parasitol Today* 15:47 (1999).
- 3- Haywood M, Conway DJ, Weiss H, Metzger W, D'Alessandro U, Snounou G, Targett G, Greenwood B: Reduction in the mean number of Plasmodium falciparum genotypes in Gambian children immunized with the malaria vaccine SPf66, *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93 (Suppl 1):65 (1999).
- 4- Mendis KN: Malaria vaccine research - a game of chess, "GAT Targett (ed): *Malaria-Waiting for the Vaccine*" kitabında s. 183, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex (1991).
- 5- O'Donnell RA, Saul A, Cowman AF, Crabb BS: Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP-119 across distantly related Plasmodium species, *Nat Med* 6:91 (2000).
- 6- Özbilgin A, Balcıoğlu C, Yereli K: Sıtmanın immunolojisi, "MA Özcel (ed): *Sıtma (Malaria)*" kitabında s. 135, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları 16, İzmir (1999).
- 7- Ranjit MR, Sharma YD: Genetic polymorphism of falciparum malaria vaccine candidate antigen genes among field isolates in India, *Am J Trop Med Hyg* 61:103 (1999).

- 8- Soares IS, Rodrigues MM: Malaria vaccine: Roadblocks and possible solutions, *Braz J Med Biol Res* 31:317 (1998).
- 9- Vaughan JA, Scheller LF, Wirtz RA, Azad AF: Infectivity of Plasmodium berghei sporozoites delivered by intravenous inoculation versus mosquito bite: implications for sporozoite vaccine trials, *Infect Immun* 67:4285 (1999).
- 10- Walliker D: Malaria vaccine trials, *Parasitol Today* 15:348 (1999).
- 11- White NJ: Malaria, "GC Cook (ed): *Manson's Tropical Disease*, 20. baskı" kitabında s. 1087, WB Saunders Co, London (1996).