

LEISHMANIA ENFEKSİYONLARININ İMMÜNOPATOGENEZİIMMUNOPATHOGENESIS OF *LEISHMANIA* INFECTIONS***Pınar YURDAKUL****

ÖZET: Leishmaniasis, klinik ve epidemiyolojik açıdan çeşitlilik gösteren bir hastalık kompleksidir. Ciddi bir sağlık problemi olarak tüm dünyada önemini koruyan leishmaniasis, vektörle taşınan bir hastalık olup, 88 ülkede 350 milyon insanı kapsayan bir popülasyon hastalığının etkisi altındadır. *Leishmania* cinsine dahil olan protozoonlarının etken olduğu hastalık, viseral (VL), kütanöz (KL), difüz kütanöz (DKL) ve mukokütanöz (MKL) olmak üzere 4 formda klinik tablo oluşturabilir. *Leishmania* enfeksiyonlarının kontrolünde, hücresel immünite ile beraber, parazitin virulans faktörleri, tropizmi, patojenitesi ve konağın genetik alt yapısına bağlı olarak geliştirdiği immünite ile vektörün evrimsel açıdan sahip olduğu avantajların tamamının rol aldığı etkileşimler sorumludur. Bu ökaryotik patojenler omurgalı immün sisteminde evrimleşmişlerdir ve en tipik özellikleri uzun süreli kronik enfeksiyon yapmalarıdır. Konakla etkileşimlerinde, doğal bağışık yanıt aşmaları en temel ve hastalığın gidişini belirleyen en önemli basamaktır. Hümmoral efektör mekanizmalardan (kompleman sistemi gibi) kaçmaları ve hücresel toksik metabolit ve lizozomal enzimlere dayanıklı olmaları da gerekmektedir. Bu nedenle, fagozomal kompartmanlarda yeniden şekillenmeye sebep olmaları ve hücresel sinyal yolları ile interferenste bulunarak antijen sunumunu ve dendritik hücrelerin immün regülasyonunu bozmaları da adaptif immüniteyi ele geçirmeleri açısından çok önemlidir. Hayvan deneyleri, tüm bu modifikasyon ve interferens mekanizmalarının, 2 farklı tipte immünopatogeneze şemasına yol açtığını ortaya koymuştur. KL’de tipik olarak Th1 tipi yanıtın Th2 tipi yanıtı polarize olması ve hastalığın kronik-persistan hale gelmesi söz konusudur. VL’de ise, bariz bir polarizasyon olmamakla birlikte, Th1 tipi immün yanıtın baskılandığı ve hastalığın sistemik hale geçtiği bir klinik tablo gözlenmektedir. Hayvan modelleri ve insan hastalığından elde edilen verilerin ışığında, yakın gelecekte hastalığın endemik olduğu bölgelerde kullanılması uygun olan yeni aşı ve yeni immünoterapötik yaklaşımlar geliştirilmesine çalışılmaktadır. Bu derleme yazıda leishmaniasis immünopatogenezi güncel yayınlar ışığında tartışılmaktadır.

Anahtar sözcükler: *Leishmania*, viseral leishmaniasis, kütanöz leishmaniasis, immünopatogeneze.

* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ABSTRACT: Leishmaniasis represents a complex of diseases with a clinical and epidemiological diversity. Leishmaniasis remains a severe public health problem and its burden is increasing. The disease is caused by a parasite belonging to the genus *Leishmania*. Approximately 350 billion people in 88 different countries are thought to be infected with *Leishmania spp.* Clinical forms of leishmaniasis are particularly diverse representing different diseases: visceral (VL), cutaneous (CL), diffuse cutaneous (DCL) and muco-cutaneous (MCL) leishmaniasis. Being the most important determinant not only cellular immunity plays the essential role in the control of leishmaniasis, but the virulence, tropism and pathogenicity that is modulated by environmental and genetic factors of their mammalian hosts and sandfly vectors, are the key interactions. These eukaryotic pathogens have evolved with the vertebrate immune system and typically produce long lasting chronic infections. A critical step in their host interaction is the evasion of innate immune defenses. The ability to avoid attack by humoral effector mechanisms, such as complement lysis, and to resist killing by lysosomal enzymes and toxic metabolites is of particular importance. They do so by remodelling the phagosomal compartments in which they reside and by interfering with signalling pathways that lead to cellular activation. In addition they modify the antigen presenting and immunoregulatory functions of dendritic cells, a process that facilitates their evasion of both innate and adaptive immunity. Experimental animal studies revealed that these modifications and interference mechanisms led to two different pathogenesis schemes. For CL, the polarization of Th2/Th1 cells is responsible for the progression of the disease which then leads to the chronic-persistent state. The Th2/Th1 paradigm does not apply for visceral leishmaniasis. Immunosuppression rather than polarization is responsible for the systemic and progressive outcome of the disease in VL. Based on experience with animal models and humans, new vaccine and novel immunotherapy strategies especially for the locations where the disease is endemic, hold promise for the near future. In this review article the immunopathogenesis of leishmaniasis has been discussed under the light of recent literature.

Key words: Leishmania, visceral leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis, immunopathogenesis.

G İ R İ Ş

Leishmaniasis, klinik ve epidemiyolojik açıdan çeşitlilik gösteren bir hastalık kompleksidir. Ciddi bir sağlık problemi olarak tüm dünyada önemini koruyan leishmaniasis, vektörle taşınan bir hastalık olup, 88 ülkede 350 milyon insanı kapsayan bir popülasyonu etkilemektedir^{1,2}. Düşük ekonomik koşullar, malnütrisyon, HIV enfeksiyonu, geniş ölçekli sulama projeleri nedeniyle hastalığın endemik olduğu bölgelere göç ve savaş gibi etkenlerin insidans artışında rol oynadığı bildirilmektedir. Bangladeş, Hindistan, Nepal, Sudan, Brezilya visceral leishmaniasis (VL) için endemik bölgeler iken, Afganistan, Cezayir, Brezilya, İran, Peru, Suudi Arabistan ve Suriye kütanöz leishmaniasis (KL) için endemik kabul edilmektedir¹⁻⁴.

Ülkemiz de özellikle KL açısından endemiktir. Kendi kendine iyileşebilen antroponotik KL olguları, %72'si Şanlıurfa'dan olmakla birlikte, Diyarbakır, Mardin, Adana ve Antep'ten bildirilmektedir. Diğer taraftan 1980'den beri prevalans artış göstermektedir. Sporadik VL olgu bildirimleri ise 1950'lerden beri süregelmekle beraber, KL kadar sıklıkla görülmemektedir. Ege, Akdeniz, Karadeniz ve Orta Anadolu bölgelerinden bildirilen viseral hastalık genellikle köpeklerin rezervuar olduğu zoonotik formdur⁵.

Leishmaniasis, viseral (VL), kütanöz (KL), difüz kütanöz (DKL) ve mukokütanöz (MKL) olmak üzere 4 formda klinik tablo oluşturabilir^{1,2}. Kala-azar olarak da bilinen VL hastalık tablosu kompleksin en ciddi formudur. Tedavi sağlanamadığı sürece %99 oranında ölümcül seyreden hastalığın en tipik belirtileri, ondulan ateş, hepatosplenomegali, kilo kaybı ve anemidir. KL ise, çoğunlukla kendi kendine iyileşen ama çoklu lezyonlar söz konusu olduğunda ömür boyu estetik bir işaret olarak kalmanın yanı sıra genel kabiliyeti de sınırlandıran bir hastalıktır. Hücrel immün yanıt bozukluğu söz konusu ise hastalık, DKL tablosuna çevirebilir. Lepramatöz lepra benzeri bir klinik oluşur ve spontan iyileşme yetisi olmayan hastalığın tedavi sonrası relaps oranı da çok yüksektir^{1,2,4}.

Hastalık etkeni *Leishmania*'lar, *Kinetoplastida* takımında bulunan protozoonlardır. Hayat döngülerinde promastigot ve amastigot olarak 2 form vardır. İnsan ve diğer memeli konaklarda, makrofaj ve dendritik hücre (DH) içinde intraselüler amastigot, omurgasız vektörlerin barsağında ise ekstraselüler promastigot halinde bulunurlar¹⁻⁶. Eski Dünya ülkelerinde hastalığın taşınmasından sorumlu vektörler *Phlebotomus* türleri iken, Yeni Dünya ülkelerinde *Lutzomyia* türleri bulaştan sorumlu olarak bildirilmektedir^{1,6,7}.

Leishmania enfeksiyonlarının kontrolünde, hücrel immünite ile beraber, parazitin invazif özelliği, tropizmi, patojenitesi ve konağın genetik alt yapısına bağlı olarak geliştirdiği immünite ile vektörün evrimsel açıdan sahip olduğu avantajların tamamının rol aldığı etkileşimler sorumludur^{8,9}. Bu ökaryotik patojenler omurgalı immün sisteminde evrimleşmişlerdir ve en tipik özellikleri uzun süreli kronik enfeksiyon yapmalarıdır¹⁰. Konakla etkileşimlerinde, doğal bağışık yanıtı aşmaları en temel ve hastalığın gidişini belirleyen en önemli basamaktır. Hümmoral efektör mekanizmalardan (kompleman sistemi gibi) kaçmaları ve hücrel toksik metabolit ve lizozomal enzimlere dayanmaları gerekmektedir. Bu nedenle, fagozomal kompartmanlarda yeniden şekillenmeye sebep olmaları ve hücrel sinyal yolları ile interferenste bulunarak antijen sunumunu ve DH'lerin immün regülasyonunu bozmaları da adaptif immüniteyi ele geçirmeleri açısından çok önemlidir¹⁰. Tüm bu modifikasyon ve interferens mekanizmaları 2 farklı tipte immünopatogenez şemasına yol açmaktadır:

- 1.VL'de ortaya çıkan, efektör hücrel immün yanıtın baskılanması,
- 2.KL'de ortaya çıkan, yardımcı T lenfosit (Th) yanıtının parazitin yararına olan Th2'ye polarize olması.

VİRÜLANS FAKTÖRLERİ ve İMMÜNOPATOGENEZ

Her ne kadar immünopatogenezde, memeli konağın genetik alt yapısı doğrultusunda oluşturduğu immün yanıt ile vektörün çevresel ve genetik faktörleri rol alıyor olsa da; pek çok mikroorganizma ile enfeksiyon sırasında da

olduğu gibi ilk ve anahtar görevi gören elemanlar *Leishmania* türlerinin moleküler determinantlarıdır^{9,11}. Bu determinantlar; a) enfeksiyon için gereken invazif determinantlar ve b) immünopatolojiden sorumlu determinantlar şeklinde 2'ye ayrılabilir.

İnvazif Determinantlar: Parazit için primer konak hücre olan makrofajların enfekte edilmesi, fagolizozomlar veya parazitofor vakuollerde başarılı hücre içi yaşam için gereken virülans faktörleri ile gerçekleşir. Bunlar arasında; glikozil-fosfatidilinositol (GPI), glikozil-fosfolipid (GIP), lipofosfo-glikan (LPG), fosfoglikan (PG), proteo-fosfoglikanlar (PPG), leishmanolizin (gp63) ve sistein proteaz (CPs) sayılabilir. Enfeksiyon için zorunlu olduğu saptanan bu faktörlerin immünopatolojide rol oynamadıkları belirtilmektedir^{9,11}.

Promastigotların makrofajları enfeksiyonu çok çalışılmış olmakla birlikte, moleküllerin enfeksiyondaki rolleri hala tam aydınlatılmış değildir. Bu moleküllerden özellikle gp63 ve LPG en çok çalışılan moleküller olup, parazitin bulunduğu hayat döngüsüne göre farklı düzeylerde eksprese edilen determinantlardır⁷⁻⁹. Makrofaja tutunma ve kompleman (C')'dan korunmada rol oynarlar. Benzer şekilde her iki molekül fagosit içinde yaşamın devamından sorumludur. Promastigot-amastigot değişimi ve amastigotun replike olarak diğer hücrelere yayılımında da rol oynamaktadırlar^{6,8,12-14}.

Pato-antijenik Determinantlar: Enfekte hücreden köken alan bazı parazite özgül antijenlerin, konak immün yanıtı ile negatif yönde etkileşerek, immünopatoloji olarak gözlenen klinik semptomlardan sorumlu olduğu düşünülmektedir^{9,11,15}. VL'li hastalarda, enfekte makrofajların konaktaki diğer elemanlarla (immün sistem hücreleri gibi) etkileşimleri sonucunda ortaya çıkan bu antijenik epitoplara karşı, çok yüksek miktarda *Leishmania*'ya özgü ancak koruyucu olmayan antikorlar saptanmaktadır. Klinik semptomlardan da sorumlu olduğu düşünülen bu antijenlerin immünopatogeneze rol oynadığı kabul edilmektedir⁹. Bu determinantlar; hücre iskeleti proteinleri (kinesin=rK39, tübülün), şaperonlar, ısı şok proteinleri (HSP 60, 70, 83, LmSti1), ribozomal proteinler (eIF, LiPO, Lip2a, Lip2b) nükleozomlar, histon proteinleri ve glikozomlar (TPI, TSA, LACK, LeIF gibi antijenler) gibi protein komplekslerinin içinde bulunan sitoplazmik özgün epitoplardır^{9,15}. Tüm determinantlar leishmaniasis oluşturabilmek için immün sistemin belirli kompartmanları ile etkileşime girerler. İnvazif determinantlar, yani virülen fenotipe indirek olarak katkıda bulunan virülans faktörleri, *Leishmania*'nın immün ve immün olmayan engelleri aşarak intraselüler enfeksiyon oluşturmaya olanak sağlar. Devam eden kronik süreçte, bazı intraselüler amastigotlar ölür ya da lizise uğrar ve amastigotların bir takım sitoplazmik molekülleri (pato-antijenik determinantlar) ortaya saçılır. Bu özgün epitoplara karşı gelişen konak immün yanıtı, *Leishmania*'ya karşı immünite sağlamakta yetersiz kalır ve leishmaniasiste gözlenen klinik semptomlara neden olur⁹.

Leishmaniasis immünopatogenezi 3 ayrı aşamayı içine alan bir etkileşim zinciri olarak ele alınabilir. Hastalık patogenezinde en çok role sahip olduğu belirtilen "parazit-memeli konak" aşaması bu derlemenin asıl içeriğini oluşturmaktadır. Son yıllarda önemi ortaya konan "parazit-vektör" ve "vektör-memeli konak" ilişkilerinden de kısaca bahsedilmektedir. Bu 2 aşamaya dair detaylı bilgi son yıllarda yayınlanan bazı derlemelerde bulunabilir^{6,8,13}.

PARAZİT-VEKTÖR İLİŞKİSİ ve İMMÜNOPATOGENEZ

Bilindiği gibi parazitin amastigot ve promastigot olarak 2 hayat formu vardır. Dişi *Phlebotom* kan emerek amastigotu alır, barsağında promastigota çevirir. Promastigot, ekstraselüler olarak vektör barsağındaki mikrovillüslerle tutunur^{1,6}. Bölünme yeteneği olan bu prosiklik promastigot, bölünme yeteneğini kaybetmiş metasiklik promastigota dönüştüğünde (metasiklogenez) memeli konak için enfektif olan formunu kazanır. Ortalama 1-1000 metasiklik promastigot ile döngüsünü tamamlar. Vektör, bir sonraki konak teması vakti geldiğinde, maksimum enfektif kapasitesine erişmiş olur^{4,6,8}.

VEKTÖR-KONAK İLİŞKİSİ ve İMMÜNOPATOGENEZ

Vektör kan emmek için deri ile tekrar temasa geçer ve metasiklik promastigotu dermise enjekte eder. Leishmaniasis oluşumunda sadece metasiklik promastigotun enjekte edilmesi yeterli değildir. Promastigotun, mekanik hareketle dermisin derin tabakalarına itilmesi gereklidir, aksi halde hedeflediği dermal kapillerlere ulaşması zordur. Çok daha önemli bir nokta, inokülasyon bölgesindeki doğal immün engellerin aşılması gerekliliğidir. Vektörün tükrüğündeki hyaluronidaz-maksadılan gibi vazodilatatör etkili salgılar, enjeksiyon bölgesinde hızlı bir şekilde hareket ederek temel immün engellerin aşılmasını sağlar ve enfeksiyonun başlamasına yardımcı olur⁸.

PARAZİT-MEMELİ KONAK İLİŞKİSİ ve İMMÜNOPATOGENEZ

Doğal İmmün Yanıtın Aşılması: İnoküle edilen promastigotun ilk hedefi makrofajlardır. Metasiklik promastigot, makrofajdaki C' reseptörü 1-3, mannoz-fukoz reseptörü ve Fc reseptörünü kullanarak tutunmayı gerçekleştirir¹⁰. Anti-leishmanial antikorlar ve C' parazitin yüzeyinde birikmeye başlar. Bu noktada parazitin yüzeyinde bulunan LPG ve gp63 çok önemli rol oynar^{1,6-8,13,14}. C3 molekülü aktif litik formu olan C3b ile LPG ve gp63'ün yüzeyine tutunur ve klasik yoldan C' aktivasyonu yapar. *Leishmania*'lar C3bi ile opsonize olmaları sayesinde CR1-3'ü kullanarak reseptöre bağlı endositozla makrofaj içine girer. Ancak yüzeylerinde eksprese ettikleri kalın LPG ve gp63, parazitleri C5-9 litik kompleks etkisinden korur^{6,8,10}.

Benzer biçimde IgM'ye bağlı immünoaderans mekanizmaları da, C' bağlı lizis gelişmeden çok önce Fc reseptörü yolu ile fagositoza olanak sağlamaktadır⁸. Burada dikkat çeken bir başka nokta, çok az sayıda parazitin makrofajlarda olmasıdır. Diğer bir çok mikroorganizma için sorun olacak bu durum *Leishmania*'lar için avantaj olarak kullanılmaktadır, çünkü "ignorance" tetiklemek yolu ile de doğal bağışıklığın ilk basamaklarında konağa üstün gelebilmektedirler. Chang ve McGwire⁹'in ortaya koyduğu şekilde, LPG ve gp 63 invazyon sonrası "down" regüle edilmektedir ki bu regülasyon da parazitin hedeflediği gözden kaçma ve düşük immünojenite olgularını desteklemektedir. Promastigotların fagositozunu takiben, tutunma ve bağlanmada önemli rol oynayan parazit ürünleri ve virülans faktörleri tekrar devreye girer. Hücre içi öldürme ve degradatif makrofaj yolları ile interfere olarak parazitin zarar görmeksizin makrofaj içinde yaşamasını ve çoğalmasını sağlarlar^{8,10,13}.

LPG molekülünün fonksiyonları şu şekilde özetlenebilir:

1. Adezyon moleküllerini (ICAM ve VCAM) ve makrofaj kemotaktik protein-1'i (MCP-1) inhibe ederek makrofaj göçünü engeller.
2. Oksijen radikalleri ile NO ve NOS₂ inhibiyonu ve protein kinaz C (PKC) sinyal yolunun inhibisyonu üzerinden oksidatif yıkımı engeller^{6,10}.
3. Fagozom-endozom füzyonunu geciktirir.

Gp 63'ün fonksiyonları ise şöyledir:

1. Makrofaj içi oksidatif yıkım inhibisyonu yapar.
2. Proteaz aktivitesi ile lizozomal sitoliz ve degradasyondan korunma sağlar^{8,13}.

Bu etkilere, tükrüğün makrofaj anti-leishmanial aktivite baskılama etkisi ve vazodilatasyon etkisi eklendiğinde, parazit promastigottan, dirençli olan amastigot formuna dönüşecek zamanı kazanır (immün yanıt oluşumunu erteleyerek ve geçici olarak baskılayarak zaman kazanır) ve yeterli derecede çoğalarak asıl hedefi olan yeni hücreleri enfekte edecek kapasiteye ulaşır. Bu kapasite sağlandıktan sonra fagozom-sekonder lizozom füzyonu gerçekleşir ve parazitofor vakuol oluşur. Bunu takiben makrofajlar parazit tarafından lizise uğratılır. Enfeksiyon bölgesine gelen diğer mononükleer fagositler ve antijen sunan hücre (ASH) kapasitesine sahip hücreler -özellikle DH- sekonder enfeksiyon hedefi haline gelir.

Adaptif İmmün Yanıtın Aşılması: Kütanöz lezyonlarla seyreden, tedavisiz bile %95 oranında spontan iyileşebilen KL etkeni *L.major* ile tedavisiz %95 ölümle sonuçlanan ve viseral özellik gösteren VL etkeni *L.donovani*'nin patogenezi, hayvan (özellikle fare) modelleri üzerinde yapılan çalışmalar ile bugünkü düzeye ulaşmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar iki etkenin de her iki tipte hastalık oluşturabileceğini gösterir niteliktedir. *Leishmania* enfeksiyonun gidişişi, koruyucu hücrel immün yanıt ile patoloji meydana getiren ve hastalığı ağırlaştıran immün yanıt arasındaki kompleks etkileşimler sonucunda belli olmaktadır.

Farelerin *L.major* ile enfeksiyonları, hastalık patogenezinin aydınlatılması açısından önemli olmanın yanı sıra, immün yanıt fonksiyonlarının anlaşılmasını da sağlayan çok değerli bir modeldir. Bazı fareler (C7BL-6), *L.major* ile enfekte edildikten sonra kütanöz lezyonlar geliştirirler ve hastalığı bölgesel lenf nodlarında sınırlandırır. Bu hayvanlar insandaki KL'ye model olmaktadır. Enfeksiyonu kontrol edemeyen ve sistemik hale getiren fareler (Balb-C) ise, insandaki VL ya da DKL immünopatogenezi için model teşkil eder^{8,10,16}. *Leishmania* enfeksiyonlarına direnç ya da duyarlılıktan sorumlu olan immünolojik yolların açığa çıkarılması, immün sistemin Th1/Th2 dengesine bağlı olan, hücrel-hümmoral polarizasyon farklılığını ortaya koymuştur⁶. Th1/Th2 dengesi, patojenin tipine ve virülans faktörlerine, ASH'lerin "naïve" T hücreleri ile etkileşimlerine ve salgılanan sitokinlere bağlı olarak gelişmektedir. Th1/Th2 dengesinin Th2 yönüne kayması veya Th1 yanıtının baskılanması leishmaniasisten sorumlu olarak düşünülmektedir. Adaptif immün yanıtın *L.major* ve *L.donovani* tarafından modülasyonu ve hastalık gidişine ait bilgiler deneysel hayvan modellerinden köken almaktadır. Bu derlemede de bahsi geçen tüm veriler, fare kütanöz veya viseral leishmaniasis modellerinin ortaya koyduğu çalışmalardan alınmıştır.

KÜTANÖZ LEISHMANIASIS (KL)

KL'ye duyarlılık interkokin (IL)-4 artışı ile oluşan Th2 yanıtı ile ilişkilidir ve hastalıkla sonuçlanır. IL-12 ile yönlendirilen ve interferon-gama (IFN γ)'nın dominant olduğu Th1 yanıtı da hastalığın çözülmesi ile sonuçlanmaktadır^{10,16,17}.

Th2 Yanıtı ve Hastalığa Duyarlılık: Hastalık progresyonundan sorumlu olan Th2 yanıtı, erken dönemde sentezlenen IL-4 ile sağlanır. IL-4, temel olarak IFN γ 'yı ve IL-12'yi baskılayarak Th1 yanıtını baskılar. Th2 polarizasyonundan sorumlu olduğu düşünülen olaylar şu şekilde sıralanabilir^{10,13,16,17}:

1. Yüzey polimorfizmleri ve glikan-peptit farklılıklarının etkisi: *L. major*'un yüzeyinde eksprese edilen pato-antijenik peptitlerden özellikle LACK antijeninin, farklılaşma öncesinde oligoklonal CD4+ T hücrelere bağlanarak bu hücreleri aktive ettiği gösterilmiştir. Bu uyarım sonrasında gözlenen LACK reaktif hücre fazlalığı Th2 sitokin (IL-4,10,13,TGF- β) artışından ve polarizasyondan sorumludur¹⁶.
2. IL-12 hücrel immün yanıtın oluşturulmasında ve devam ettirilmesinde rol oynayan kilit sitokindir¹⁸. Duyarlı ve dirençli tüm konaklarda IL-12 sentezinde bir gecikme olmaktadır. Th2 yanıtına dönüş açısından önemli olan bu gecikme ve/veya inhibisyonunda, IL-4'ün sebep olduğu sinyalizasyon veya reseptör "down" regülasyonu etkili gibi görünmektedir.
3. İnflamatuvar doku çevresindeki aşırı nötrofil varlığının, TGF- β sentezi üzerinden polarizasyona yardım ettiği bilinmektedir.
4. Enfeksiyon bölgesi ve lokal olarak farklılık gösteren DH alt tipleri de Th2 gelişiminde rol oynar. Regülasyon yeteneği olan bu DH'lerin lokal olarak salgıladıkları sitokin ve kemokinler farklıdır ve tolerojenik CD4+ Th yanıtını tetikleyebilirler¹⁶.
5. Enfeksiyon bölgesinde bulunan ko-stimülatör ve ligandlardaki lokal farklılıklar, (CTLA4/CD28-B7 veya OX40-OX40L) lokalize ASH davranışına neden olarak patogeneze katkıda bulunmaktadır.
6. Konağın genetik alt yapısının ve T hücre kompartmanları dışındaki hücreler ile en az 6 farklı genetik bölgenin duyarlılıkta rolü olduğu da gösterilmiştir.

Her ne kadar erken dönem Th2 yanıtı progresif hastalıktan tek başına sorumlu olmasa da, bu gidişten IL-4 ve IL-4 reseptörlerini paylaşan IL-13'ün sürekli salgılanmasının sorumlu olduğu düşünülmektedir^{16,17}. Özellikle T hücre "priming" sırasında sentezlenen IL-4, IL-12'yi veya reseptörünü inhibe ederek kalıcı bir Th2 yanıtı oluşmasına ve TGF- β ile birlikte makrofaj aktivasyon inhibisyonuna neden olur^{13,16}. Tam olarak açığa kavuşturulmamış olmakla beraber, hayvan modellerinde anti-IL-10 terapisi ya da reseptör blokajının parsiyel de olsa direnç sağladığı ispatlanmıştır¹⁷. Makrofajların, IgG ile kaplı amastigotların Fc reseptörleri ile temas sonrasında IL-10 salgılayarak IL-12'yi baskılıyor olmaları da bu veriyi destekler niteliktedir. Ancak son günlerde dikkatler hem IL-4 hem IL-10 sentezi açısından, CD4+CD45Rb^{low} immünoregulator T hücrelere kaymıştır. IL-12 sentezinin inhibisyonuna bağlı olarak, geri çevrilemeyen Th2 yanıtı sonucunda, bu hücreler klonal olarak artmakta ve baskın hale gelmektedir¹⁷. Bu baskınlık ve lokal DH etkisi ile Th1 yanıtı kalıcı olarak baskılanmakta ve tolerans tetiklenmektedir.

Th1 Yanıtı ve Hastalığa Direnç: Parazitin intradermal-subkütan enjeksiyonu sonrasındaki erken dönemde IL-4 ve diğer bazı Th2 sitokinleri sentezlenir. Enfeksiyonun başlangıcında, hem dirençli hem duyarlı konaklarda karışık (Th1/Th2) sitokin cevabı söz konusudur. Önemli olan hangi tip yanıtın baskınlık sağlayacağıdır. KL sırasında parazit, enfeksiyon bölgesi ve bölgesel lenf nodunda sınırlı kalır. Bu bölgede bulunan DH'ler (miyeloid kökenli DH; DH1), amastigot artışını takiben hızla artan IFN γ ve CD40L gibi agonistlere cevaben yüzeylerinde CD40 ve diğer ko-stimülatörleri artırır ve IL-12 sentezlemeye başlarlar. Erken dönem IL-4 sentezinin indüklediği Th2 cevabının geri döndürülmesi hastalık tablosunun gelişimini önler^{13,17}. Bahsi geçen lokal stimülasyon sonucunda CD4+ T hücreler, yüksek düzey IFN γ ve TNF sentezleyerek makrofajların hücre içi öldürme mekanizmalarını aktive eder ve paraziti temizlerler. CD8+ T hücreler de, litik aktiviteleri ve IFN γ sentez yetenekleri ile enfeksiyonun kontrolünde rol alırlar¹⁶. İyileşme sonrasında enfeksiyon bölgesindeki makrofaj, DH ve fibroblastlarda belli miktar amastigot persistan olarak kalır. Bu persistans, regülatör fonksiyonlu bazı CD4+ T hücrelerin sentezledikleri IL-10 sayesinde oluşur ve uzun dönem hafıza sağlar. IL-12, IFN γ veya CD40-CD40L ilişkisi bozuk olduğu takdirde hastalığa dirençli olan hayvanlarda da Th2'ye polarizasyonu takiben diseminasyon gözlenir¹⁶. IL-18 ve wxs-1 sitokin reseptörlerinin de önemli olduğu ancak kilit sitokinin IL-12 ve IL-12 reseptörü olduğu gösterilmiştir. IL-12, Th1 yanıtının sadece oluşturulmasında değil devamında da çok önemli role sahiptir. Büyük ihtimalle IL-12 yeni T hücre öncüllerin Th2 hücrelere farklılaşmasını da engellemektedir, çünkü enfeksiyonun başlangıcında yani IL-12 sentezlenmeden önce Th2'ye yönelen durum bu sitokin ortamdan çekildiğinde tekrar kurulmaktadır^{16,18}.

Normal koşullar altında IL-12, pro-inflamatuvar uyarı sonrası enfeksiyonun primer hedefi olan makrofajlar ve takibinde amastigotları alan DH'ler tarafından sentezlenmektedir. Deneysel sistemler göstermiştir ki, dirençli hayvanlarda bile IL-12 sentezi gecikmektedir. *Leishmania* enfeksiyonunu takiben makrofajların IL-12 sentezleyemediği, bu sitokini sentezleyebilen ve immün sistemi Th2 yönüne çevirebilen tek hücre grubunun DH'ler olduğu ispatlanmıştır^{10,13,16-18}. Bu nedenle hastalığa dirençli hayvanlarda bile hücrel immün yanıtın oluşması ertelenmektedir. Makrofajlardan farklı olarak DH'ler (epidermal Langerhans hücreleri de dahil), *L.major* paraziti alır almaz MHC II ve ko-stimülatör ekspresyonunu artırır ve IL-12 üzerinden immün sistemi Th1 yönüne kaydırırlar. Belirli kemokinlerin ekspresyonunun sonucunda da antijeni lenf nodunda T hücrelerine sunarak efektör hücrel yanıtı tetiklerler.

Leishmaniasis sırasında, doğal öldürücü (NK) hücrelerin de rol oynadığı bilinmektedir. Salgıladıkları IFN γ üzerinden makrofaj aktivasyonu yapmaları, DH'lerden IL-12 salgısını optimize etmeleri ve aktive T hücrelerinden IL-12 reseptör ekspresyonunu artırmak suretiyle Th1 yanıtının kurulmasında görev alırlar. Ancak hem kurulum hem idame dönemde varlıkları şart değildir¹⁹.

Antijen Sunan Hücreler ve Sinyal Yolakları ile *L.major* İlişkisi

Makrofajlar: *Leishmania*'lara primer konaklık yapan hücre grubu makrofajlardır^{8,17}. Parazitin yüzeyinde eksprese edilen özgül peptitler „Toll benzeri reseptör“ (TLR) bağlantısını takiben beklendiği şekilde aktivasyon gerçekleştiremezler. Bu aktivasyon bozukluğu çeşitli mekanizmalarla açıklanabilir:

1. Enfekte makrofajlarda aktivasyon ve MHC class I-II artışı başta LPG olmak üzere diğer antijenik determinantlar ile inhibe edilir^{6,7,13}.
2. Makrofajların bölgesel lenf noduna göçleri inhibe edilir. Bu sayede parazit aktivasyonu engellenmiş makrofajlarda başlangıçtaki sessiz fazı yaşar.
3. Belirli bir süreden sonra sekonder faz başlar. Lezyon oluşumu, inflamatuvar hücre toplanması, DH'lerin enfeksiyonu ve IFN γ artışı ile karakterize olan bu dönemde viseralizasyon için gerekli parazit yükü sağlanmış olur.
4. Parazitin yüzeyinde bulunan bazı peptit ve antijenler TLR'e bağlandığında ya da C ile opsonizasyon sonrası Fc reseptörüne tutunur ve en önemli sitokin olan IL-12'nin salgılanması engellenir. Yapılan çalışmalar parazit antijenlerinin Fc reseptörüne bağlandıktan sonra makrofajın IL-10 salgılamasını tetiklediklerini göstermiştir. IL-12, Th1 tipi immün yanıtı geçište olduğu kadar, NK hücreleri ve diğer T hücrelerinden IFN γ salgılanması ve makrofajların hücre içi öldürme işlevleri açısından da önemlidir. Bunun nötralizasyonu, hem *L.donovani* hem *L.major* enfeksiyonlarında hastalık gelişimine neden olur. Doayısıyla tüm *Leishmania* türleri potansiyel ve seçici olarak makrofajlardan sentezlenen IL-12'nin inhibitörü olarak hareket eder. Diğer pro-inflamatuvar sitokinler üzerinde benzer inhibitör etkiye rastlanmamıştır. *Leishmania*'lar, JAK-2 ve STAT-1 fosforilasyon inhibisyonu üzerinden IFN γ veya CD-40 bağımlı IL-12 oluşumunu engellerler^{7,10}. IFN γ 'nın baskılanması, makrofajların temel fonksiyonu olan oksidatif yıkımın da baskılanmasına neden olur. Kostimülatör ekspresyonu da enfeksiyonu takiben parazitin yararına değişmektedir.
5. Makrofaj apoptozunun inhibe edilmesi de parazitin kronikleşmesine olanak sağlamaktadır^{8,16}.

Dendritik Hücreler: DH'ler immatür şekilde bekleyen profesyonel bir ASH ailesi olup, patojenin kendisi ya da antijeni ile teması takiben oldunlaşır ve periferik lenfoid organlara göç eder. Bu organlarda T hücresinden zengin bölgelerde antijen sunumunu gerçekleştirir^{20,21}. Mikroorganizmaların karakteristik "patojen asosiy moleküler yapıları" (PAMP), DH yüzeyinde eksprese edilen C tipi lektinler (CTL) ve çeşitli patern tanıyan reseptör (PRR), örneğin TLR'ler tarafından tanınırlar^{8,20-22}. PAMP'ler, dokudaki sitokin-adezyon moleküllü-kostimülatör varlığına bağılı olarak immün sistemi, Th1, Th2 veya regülatör tipteki T hücrelerinin oluşumunu indükleyebilirler²⁰. DH'ler, myeloid (CD11c+ DH/CD1), plazmositoid (CD11c- DH/CD2) ve epidermal Langerhans hücreleri (LH) olmak üzere 3 farklı alt tipe ayrılırlar^{20,21}.

Leishmania enfeksiyonu sırasında, öncelikle monosit/makrofajlar ve daha sonra DH'lerin enfeksiyonu, yani sıralı bir parazitizm gözlenmektedir⁸. Bu mekanizma tam olarak açıklanamamakla beraber, DH'lerin promastigotlardan ziyade amastigotları doğal olarak tanıyıp alabildiğine dair bulgular vardır^{8,17}. Dolayısıyla DH'lerin enfeksiyonu daha geç dönemde, amastigotlar makrofaj ve nötrofiller tarafından işlenip dokuya salındıktan sonra gerçekleşir¹⁷. Yukarıda da bahsedildiği gibi, makrofajların IL-12 sentez yeteneklerinin parazit tarafından inhibisyonu, *Leishmania* enfeksiyonu sırasında aktif olarak bu kilit sitokini sentezleyen ve CD4+ T hücrelerini

Th1'e yönlendirme ve primer immün yanıtı indüklemeye rolünü tamamen DH'lere vermiş olur^{17,22}. DH'ler *Leishmania*'ya özgü T hücre cevabının başlatılması, regülasyonu ve sürdürülmesinde en kritik role sahiptirler²². Hastalığa dirençli hayvanlarda, LH'ler deriden *L.major*'u almalarını takiben, MHC II, kostimülatör ve IL-12 salgılarını artırır. Aktive LH'leri deriden aldıkları bu antijeni lenf noduna götürerek primer immün yanıtı tetiklerler ve buna "primer sensitizasyon" adı verilir. Hayvan iyileştikten sonra da, DH'lerin leishmaniasis'e karşı koruyucu immüniteye katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bu immünitenin, T hücrelerini sürekli stimüle eden IL-10/12 sentezi sayesinde olduğu düşünülmektedir^{20,21,22}.

Dendritik Hücreler (DH) ile *L.major* ilişkisi

İlginç olarak dirençli ve duyarlı konaklarda DH ile *Leishmania* ilişkisinin akıbeti oldukça farklı olmaktadır. Duyarlı hayvanların LH'lerindeki kostimülatör B7.1 ekspresyonunda, "down" regülasyon ve kostimülatör CD40 aktivitesinde azalma gösterilmiştir^{13,20-22}. Bu durum da IL-12 sentezinin baskılanması ve *Leishmania* ile ilişkideki LH'lerden IL-4 salgılanmasını tetiklemektedir. IL-4'ün ise hem DH gelişimi hem de T hücre farklılaşması üzerine en başta öngörülenden farklı etkisi vardır²². DH'lerin başlangıç aktivasyonu sırasında ortamda olması, IL-12 sentezi üzerinden Th1 yönüne farklılaşmaya ve hastalığın sınırlandırılmasına olanak sağlar. Ancak T hücresi, "priming" safhasında IL-12 ile geri çevrelenemezse Th2 yanıtını ve hastalığın progresyonunu indükler. Dolayısıyla başlangıçta düşünülen tez, yani "*Leishmania* enfeksiyonu sırasında, makrofajlardan IL-12 sentezi baskılanırken, DH'ler bu önemli sitokini sentezleyen ve Th1'e yönelmeyi sağlayan tek hücre grubudur" yaklaşımı, duyarlı konaklar için geçerli olmamaktadır. Enfeksiyon sonrasında IL-12 sentezi ve sonraki olgunlaşması, inflamasyon bölgesindeki DH alt tipine ve enfekte eden parazit türüne bağlı olarak da değişir²⁰. Türler arası LPG-GIPL polimorfizmleri, hatta aynı türün promastigot-amastigot evreleri bile TLR tarafından algılanmaktadır. Hastalığın sınırlandırılıp sınırlandırılmamasından türe bağımlı CD40/IL-12 sentezinin sorumlu olabileceği düşünülmektedir^{7,21}. İnsan leishmaniasis'inde de gözlemlenen CD40 ya da CD40L ekspresyon yetersizliğinin düzeltilmesi immünoterapötik yaklaşımlar arasında yerini almıştır.

Moll²², başta inanıldığı ve gösterildiğinden farklı olarak, *Leishmania* ile enfekte olan epidermal LH'lerin lenf noduna göç etmediğini, aslında lenf noduna göç eden DH'lerin parazit ile enfekte olmadığını ileri sürmüştür. Deneysel sistemler, *Leishmania* enfeksiyonu sırasında iki farklı tipte DH varlığına işaret etmektedir. Olgunlaşma ve farklılaşma işareti taşıyan hiç bir DH parazit ile enfekte değildir, zira *Leishmania*, enfeksiyonu takiben DH'lerin sinyal yolları ile interfere olarak, kronik enfeksiyonu kurabilmek ve persistans sağlayabilmek için sitokin sentezi ve Th1'i baskılamaya başlar. Enfekte olmayan grup, parazit antijeni ile temas sonrasında IL-12 salgılar ve kostimülatör ekspresyonunu değiştirerek periferik lenfoid organlarda T hücrelerine antijen sunumunu gerçekleştirmek üzere yola çıkar²⁰.

DH'ler doğal ve adaptif immün yanıt arasında köprü görevi gördüğünden, DH olgunlaşmasının baskılanması, göç ve antijen sunumunun baskılanması, parazitin konakta yaşamasını kolaylaştırmaktadır. *L.major*'ün, DH antijen sunumundan kaçış yolları şu şekilde sıralanabilir:

- 1.DH göçünün engellenmesi: Dalaktaki DH'lerin hareket ve göç yetenekleri *L.major* ürünleri tarafından inhibe edilir. CCR2 veya CCR7 kemokin ekspresyon bozukluğu LH'lerin lenf noduna göçünü ve Th1 "priming"ini bozar^{7,20}. Lenfoid dokuya ya da lenfoid doku içinde antijen transportu parazit enfeksiyonu sonucunda değişir.
- 2.DH olgunlaşmasının engellenmesi: Hem duyarlı hem dirençli hayvanlarda, makrofajlarda da gözlenen hücresel cevabın gecikmesi, DH enfeksiyonunda da mevcuttur. Çünkü *Leishmania*'lar, adaptif immün yanıt oluşmadan önce enfeksiyonu oluşturmayı hedeflerler. Bu nedenle *L.major* enfeksiyonu sonrasında, lezyon oluşumu ve inflamasyon 7-8 gün sonra başlar²⁰.
- 3.IL-12 sentez inhibisyonu: Daha önce de söz edildiği gibi, parazitte enfekte olan DH grubu için geçerli olan bir durumdur. Fonksiyonel düzenleyici IL-12 sentezinin bozulması hastalığın gelişimi açısından parazite büyük avantaj sağlamaktadır.
- 4.IL-10 indüksiyonu: Enfekte olan DH grubu, lökosit inhibitör IgG reseptörü (LIR-2) üzerinden bağlanarak IL-10 sentezleyebilir. IL-10 da tolerojenik DH'leri uyatarak T hücre yanıtızlığı meydana getirebilir. Hem dirençli hem duyarlı hayvanlarda yüksek IL-10 varlığı yüksek parazit yükü ile ilişkilidir¹⁷.
- 5.Hemen hemen tüm myeloid ve doku kökenli DH'lerin ekprese ettiği DC-SIGN üzerinden bağlanma da, persistans ve kronikleşmeye yardımcı olarak düşünülmektedir.

Hatırlanacağı gibi, intraselüler *Leishmania* enfeksiyonunun erken döneminde DH'lerden IL-12 salgılanmasını stimüle edebilmesi, IFN γ 'ya bağlı kontrol açısından çok önemlidir²¹. Bütün bu şartlar yerine gelse, farklılaşma ve lenf noduna göç gerçekleşse bile, DH'lerin Th1/Th2 tetiklemesi lenf nodundaki mikroçevreye (doku veya kandaki lokal histamin, prostaglandin varlığı, trombosit, mast ve bazofil hücrelerinden IL-4 sentezi) de bağlı olacaktır^{8,16,17}.

VİSERAL LEISHMANIASIS (VL)

VL'de bir çok doku ve organ aynı anda enfektedir. Vektörün, parazitin enfektif formunu intradermal olarak enjekte etmesini takiben, parazit ya makrofajlar tarafından retiküloendotelial sisteme geçer ya da direk kana karışarak sistemik dolaşıma katılır. Hepatik enfeksiyon kendisini sınırlarken, dalakta parazitin çoğalması önlenemez ve harabiyet belirgin hale gelir. Dalaktaki bu yapısal bozukluk ve immün disfonksiyondan TNF α ve IL-10 sorumlu tutulmaktadır. Bu iki sitokinin etkisi ile, dalakta marjinal zon makrofajlarında (MZM), stromal hücrelerde ve splenik DH'lerde kayıp veya yeniden şekillenme söz konusu olur. Enfeksiyon sırasındaki stromal hücre davranış değişikliğinin bu yeniden şekillenmede temel rolü üstlendiği düşünülmektedir^{23,24}.

L.donovani'nin primer konak hücreleri makrofajlardır^{8,23,24}. Leishmaniasis sırasında öncelikle monosit ve makrofajlar enfekte olur, daha sonra DH'ler, dokuya saçılan parazit formlarını veya antijenlerini alarak T hücrelerine sunar ve hücresel immüniteyi yönlendirirler. Enfeksiyonun çözülmesinde Th1 tipi immün yanıt rol

oyunarken *L.major* enfeksiyonlarından farklı olarak, polarize olmuş bir Th2 yanıtı değil, baskılanmış bir Th1 yanıtı parazitin persistansına olanak sağlayarak viseralizasyon ve hastalığın kronikleşmesinden sorumludur²³⁻²⁵. Makrofajlar, parazitin içeri alınması ve hücre içi öldürmeden sorumludur, ancak VL sırasında da primer immün yanıtı tetikleyemezler. Yapılan çalışmalar, DH'lerin VL'ye karşı ortaya koyulan hücresele immün yanıtın tetiklenmesinde ve kilit sitokinlerin salgılanmasında rol oynayan temel hücre grubu olduğunu göstermiştir²⁶.

Antijen Sunan Hücreler ve Sinyal Yolakları ile *L.donovani* İlişkisi

Makrofajlar: Dalak makrofajlarının immünohistokimyasal analizlerinde, amastigotların temel olarak dalakta MZM'ler ve "marjinal metallo makrofajlar" (MMM; fare dalağına özgü bir grup makrofaj) tarafından alındığını göstermiştir^{23,24}. Karaciğerde ise bu görevi Kuppfer hücreleri yapmaktadır²³.

Mononükleer fagositlerin *L.donovani* amastigotlarını tanıması PAMP-PRR ilişkisi ve TLR bağlantısı ile gerçekleşmektedir. TLR tanınmasını takiben, TNF, IL-12 ve IL-10 sentezlenmekte ve makrofajlarda olgunlaşma ve hücre içi öldürme mekanizmaları aktive edilmektedir^{23,24}. Ancak, *L.donovani* tüm diğer türler arasında makrofajlardan sitokin salınımını en sınırlı tetikleyen türdür. Yapılan çalışmalarda intrasellüler amastigotun makrofajlardan sitokin salınımını aktif olarak baskıladığı gösterilmiştir²³.

Dendritik Hücreler: Dalak ve lenf nodunda, T hücrelerinden zengin bölgede amastigot varlığına rastlanmadığı yani göç eden DH'lerin *L.donovani* amastigotu ile enfekte olmadığı ortaya konmuştur^{23,24,26}. KL'de olduğu gibi, DH cevabı genellikle parazitle enfekte olmamış DH'lerden çıkmaktadır. *L.donovani* ile enfeksiyonunu takiben DH olgunlaşması da inhibe olmaktadır. KL'ye benzer şekilde farklılaşma ve olgunlaşma işareti içeren hiç bir DH enfekte değildir.

L.donovani 'nin DH ve makrofaj sinyal iletim yolları ile interferens mekanizmaları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- 1.*L.donovani* ile enfeksiyonu takiben makrofajlar özellikle MZM'ler IL-10 sentezleyerek Th1 yanıtının baskılanması ve hastalığın progresif hale gelmesine neden olurlar. TGF- β da bu duruma yardımcıdır.
- 2.VL'de *L.donovani* ile enfeksiyon sonrası IL-10'a bağlı olarak CCR7 kemokin ekspresyonu azalır ve DH'lerin marjinal zondan (MZ) dalaktaki T hücre zengin bölgelere geçişi engellenir.
- 3.*L.major*'ün aksine, *L.donovani* ile enfekte miyeloid hücreler, CD40L ile indüklenen IL-12 sentezini başlatamazlar. Araştırmacılar *L.donovani*'nin viseralize olmasının, IL-12 sentezindeki bu gecikme ve süpresyona bağlı olduğunu belirtmektedirler^{16,23,24,27}.
- 4.*L.donovani* yüzeyde eksprese edilen bir çok molekülün özellikle de CD1'in ekspresyonunu inhibe ederek antijen sunumunu bozar ve T hücre aktivasyonunu geciktirir¹⁶.

Beklendiği üzere, IL-12 nötralizasyonu ilk günlerde artmış parazit üremesi ile karakterizedir. Erken dönemde MZ'dan salgılanan IL-10 da hastalık gelişmesinde çok önemli role sahiptir^{16,23,28}. IL-10'un VL'de hastalığa duyarlılıkta rolü olması, bu sitokini de immünoterapötik hedef haline getirmiştir.

Karaciğer ve Dalakta İmmün Yanıt

VL, belirgin splenomegali, immünoşüpresyon ve regülatör sitokin sentezleyen tipte CD4+ T hücrelerin oluşması ile seyretmektedir. Hepatik parazit yükü granümatöz inflamasyonla sınırlandırılırken, dalakta uzun süre devam eden parazit persistansı gözlenir²³. Enfeksiyon sırasında oluşan lokal immün yanıt yetersiz kalmakta ve klerens sağlanamamaktadır. Hem lokal immünoşüpresyon hem de doku patolojisi parazit persistansına yol açmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, özel bir grup DH'nin parazit persistansında rol oynayan kilit hücreler olduğunu ortaya koymuştur. Kronik enfeksiyon sırasında, bir çok hematopoetik progenitor hücrenin (HPH) lokal olarak regülatör DH'lere farklılaştığı düşünülmektedir. Bu farklılaşma, splenik stromal hücreler (fibroblast ve stromal makrofajlar) tarafından regüle edilmektedir. HPH ve stromal hücreler arasındaki aderansa bağımlı ve aderanstan bağımsız etkileşimleri içine alan farklılaşmada, adezyon moleküllerinin de rolü olabileceği üstünde durulmaktadır. Regülatör DH'ler parazit persistansını desteklemenin yanı sıra, in vivo koşullarda antiijene özgü toleranstan sorumlu olan Tr-1 CD4+ T hücrelerini de tetikleyebilirler. Sonuç olarak *Leishmania* ile enfekte hayvanlarda süregelen hücresel değişiklikler, dalağı regülatör T hücre farklılaşma fabrikası haline getirmektedir^{23,27,29}.

Dalak, VL'de kronik inflamasyon odağıdır ve dalakta kronik enfeksiyon sırasında bazı değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Bu değişiklikler; MZ yapısında değişme ve yeniden şekillenme, stromal hücre kaybı ve genel fonksiyon değişikliği, DH göçünün inhibisyonu ve hematopoez artışı, ve belki de hastalığın gidişini belirlemede en kritik role sahip olan stromal hücre bazlı DH regülasyonu şeklinde özetlenebilir. Splenik patoloji ve immün disfonksiyonun temel mediatörü, kronik fazda dramatik artış gösteren TNF ve yeniden şekillenmeden sorumlu temel hücre grubu stromal hücreler olarak düşünülmektedir^{23,29-31}. Dalaktaki destrüktif patoloji nedeni TNF, hepatik direnç ve karaciğerin parazitten temizlenmesi için çok önemli bir role sahiptir. TNF yokluğunda karaciğerde sitokin yanıtı ve granülom oluşumu bozulmaktadır. Granülom oluşumu için TNF varlığının şart olmadığı gösterilmiştir, ancak TNF +/- fareler enfeksiyonun geç döneminde granülom oluşturabilmelerine rağmen, hepatik nekroz ve aşırı nötrofil infiltrasyonundan ölmüşlerdir. Bu çalışmaların sonuçlarına göre, TNF sadece hepatik direnç gelişiminde rol oynamakla kalmaz ölümcül inflamatuvar olaylara karşı da koruyucu rol oynar²³. VL, aynı sitokin farklı doku ve organlarda farklı kalite ve kantitede immün yanıt oluşturmalarının (dikotom konak yanıtı) güzel bir örneğidir.

Marjinal zon, parazit klerensinin primer bölgesidir ve lenfositlerin toplandığı alandır. Enfeksiyonun kronik fazında seçici ama baskın bir MZ yeniden şekillenmesi gözlenmektedir. MZM'ler MZ'den yok olur ve böylece lenfositlerin beyaz pulpaya göçü sınırlanır^{23,24,30,31}.

Stromal hücreler, PALS'da retiküler bir ağ oluştururlar. Temelde bu ağ fibroblastik hücreler ve endotel hücrelerden oluşur²⁹. Bu tübüler stromal hücreler CCR-7 kemokinini eksprese eden „naïve“ T hücrelerinin ve olgun DH'lerin birikmesini tetikleyen CCL19-21'in temel kaynaklarıdır.

L.donovani enfeksiyonu sırasında, MZM'ler ile birlikte bu stromal hücreler de ortadan kaybolur. CCL19-21 konstitütif kemokin yapımının da azalması ile T hücre ve DH'lerin olgunlaşma ve hareketi sınırlanmış olur³⁰⁻³².

TNF'in dalaktaki artışı, IL-10'un da artışına neden olur. IL-10 artışı DH yüzeyinde CCR-7 reseptör ekspresyonunun azalmasına yol açarak bu hücrelerin PALS'a göçünü engeller.

L.donovani ile enfekte hayvanlarda hematopoetik aktivitenin arttığı gözlenmektedir. Artmış hematopoetik aktivite ile artmış parazit üremesi ve konak duyarlılığı arasında ilişki olduğu ortaya konmuştur^{23,24,29,33}. Fare dalağında DH'lerin bir çok alt tipi tanımlanmıştır. Çalışmalar, her alt tipin adezyon molekülleri veya TLR ekspresyon farkları nedeniyle farklı immün yanıt oluşturdugunu ortaya koymaktadır. Normal dalakta DH'lerin çoğunu CD11c^{hi} DH'ler oluşturur. Bu DH'lerin bazıları (CD11c^{low} CD45+) regülatör fonksiyona sahiptir ve dalakta çok az sayıda bulunur. Oysa enfeksiyonun kronik fazında CD11c^{low}CD45RB+ DH'ler sayıca artmaya başlar. Dolayısıyla enfeksiyon normalde ortamda olmayan ya da sayıca çok az olan regülatör potansiyele sahip bazı DH'lerin oluşmasını indükler. Bu DH'lerin enfekte konaklara adoptif transferi parazit yükünü artırmaktadır^{23,24,29,33}. Son yıllarda VL progresyonu açısından dikkatler regülatör fonksiyonlara sahip bu DH'ler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Doğal olarak oluşan regülatör DH'ler (CD11c^{low}CD45RB+), stimülasyon sonrası IL-10 sentezlemekte ve T hücre farklılaşmasını Tr-1 yönüne çevirmektedir. Normal dalakta az sayıda bulunan bu hücrelerin lokal olarak mı üretildikleri yoksa farklılaşma sonrası kemik iliğinden mi kaynaklandıkları bilinmemektedir. Bu regülatör fenotipe sahip DH'lerin toleransı indükledikleri bilinmekle birlikte kronik enfeksiyona olan katkıları aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Normal koşullar altında, regülatör DH'ler lokal olarak bulunan hematopoetik progenitör (HPH) hücrelerden düşük frekansta farklılaşır. Oysa parazitle enfeksiyonu takiben HPH'ler çok daha hızlı ve sık olarak, stromal hücreler tarafından yüksek potansiyele sahip regülatör hücrelere dönüştürülür. Bu veri de, stromal hücrelerin daha önceden keşfedilmemiş ama çok dikkat çeken immünoregülatör rolleri olduğunu gösterir niteliktedir. Sonuç olarak artmış progenitör hücre sayısı ve stromal hücre aktivitesinin kombinasyonu, VL sırasında dalağı regülatör DH'lerin farklılaşma merkezi konumuna getirir. Bu durum da hastalığın kronik persistan doğasına bir açıklama getirebilir²⁹.

DH farklılaşmasının terapötik manipülasyonu, enfeksiyonun gidişini değiştirebilecek efektif bir hedeftir ancak stromal hücre-HPH ilişkisinin moleküler temelini ortaya konması gerekmektedir. Bulgular, kronik leishmaniasis enfeksiyonu sırasında, DH kompartmanında kompleks değişiklikler olduğunu göstermektedir. Bu kompleks değişikliğin daha ileri düzeyde anlaşılması, VL için önerilen yeni immünoterapilerin potansiyel etkileri ile hastalığın patogenezinin anlaşılması açısından önem taşımaktadır.

AŞI STRATEJİLERİ VE İMMÜNOTERAPİ

Leishmaniasis fakir ülkelerde görülen bir hastalıktır; sosyoekonomik düzey düşüklüğü, eğitimsizlik ve son yıllarda insan kökenli bir takım davranış biçimlerinin (iv ilaç kullanımının ve dolayısıyla insanın rezervuar olduğu antroponotik hastalık

bulaşının artması gibi) ortaya çıkması, periyodik olarak ölümcül epidemilere yol açmaktadır²⁻⁴. VL, AIDS hastalarındaki fırsatçı enfeksiyonlardan biri olarak da önemini korumaktadır^{35,36}. Leishmaniasis/HIV ko-enfeksiyonu, hastalığın bulaş yollarını, bilinen lokalizasyonlarını değiştirmekte ve viseral olmayan türlerin sistemik hale gelmesine olanak sağlamaktadır^{2,4}.

Genel olarak pentavalan antimon bileşikler ve çok pahalı olmaları nedeni ile sadece dirençli ya da ağır seyreden VL'de ikincil ilaç olarak, amfoterisin B ve diğer amfoterisin B lipid formülasyonları tedavide kullanılabilir. Tedavi pahalı, uzun süreli ve hastanede yatış gerektiren bir şemaya sahip olduğundan ulaştığı hedef kitle sınırlıdır. Her ne kadar Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) desteği ile, olgu saptanması, tedavi ve mümkün olduğunca vektör ve rezervuar kontrolüne yönelik çalışmalar ile hızlı tanı testleri endemik bölgelerde sınırlı derecede başarı sağlamış olsa da, henüz erken tanıya ve hastalığı önlemeye yönelik yeterli güçte araç yoktur^{2,3}. WHO'nun öncelikli araştırma listesinde temel olarak, oral kullanıma uygun yeni ilaç geliştirilmesi, hastalığın patogenezinin ve konak-parazit ilişkisinin anlaşılması sayesinde, yeni aşı ve ilaç hedefi oluşturulması, mevcut aşılarda optimizasyonu, ucuz ve güvenilir tanı yöntemleri geliştirilmesi gibi birçok yaklaşım mevcuttur^{2,4}.

Leishmaniasis patogenezinin ve parazite yönelik immün yanıtın tam olarak anlaşılmasına yönelik tüm çalışmalar temelde, aşı geliştirilmesi, immünomodülasyonu olanaklı hale getirmek ve yeni kemoterapilerin geliştirilmesi gibi belirli hedeflere odaklanmıştır. Tüm paraziter hastalıklar içinde leishmaniasis'in, aşı geliştirilmesine en uygun olan enfeksiyon olduğu düşünülmektedir³⁴. Parazitin oldukça basit bir yaşam döngüsüne sahip olması, özellikle KL'de gözlenen hastalığın resolüsyonunu takiben re-enfeksiyona direnç sağlanması ve deneysel modellerin ortaya koymuş olduğu, Th1 tipteki hücresel immün yanıtın hastalığa karşı mutlak koruyuculuğu, aşı hedefi için uygunluk oluşturmaktadır.

Elimizdeki veriler, *Leishmania* enfeksiyonlarından korunmak için, belirli hücre gruplarının aktivasyonlarının gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu hücre grupları DH'ler, CD4+ ve CD8+ T hücreler ile makrofajlardır³⁷. Uygun bir *Leishmania* aşısı geniş etkili, çapraz koruyuculuğa sahip ve uzun süreli etki gösterebilen bir aşı olmalıdır. Son yıllarda en çok üzerinde durulan ve geliştirilmekte olan aşı yaklaşımları şu şekilde özetlenebilir^{20,21,34,37-39}:

1. DH bazlı aşılarda: Tümörlere ve bazı diğer kronik enfeksiyonlara karşı geliştirilen ve başarı gösteren DH bazlı aşılama stratejileri, leishmaniasis'e karşı da denenmektedir. DH'lerin mikroorganizmalarla ve adaptif immünite açısından T hücreleri ile etkileşimleri daha net ortaya çıkarıldıkça, bu hücrelerin immünoterapötik amaçlı manipülasyonları olanaklı hale gelmektedir. Belirli adjuvanların, sitokinlerin, *Leishmania* antijenik peptitleri (TSA, LACK, LeIF gibi) ile kombinasyonları ya da ex vivo olarak antijenler ile tetiklenen DH'ler, *Leishmania* aşı veya aşı taşıyıcısı olarak kullanılabilir. DH'ler ayrıca, yakın gelecekte immünoterapötik olarak kullanılabilir^{21,39}.
2. DNA bazlı aşılarda: Sitokin ve adjuvanlarla kombine edilmiş parazit antijenlerinin, plazmid DNA'sı tarafından kodlandığı aşı sistemleridir. Literatürde örneği olan bu aşı yaklaşımı, hem CD4+ hem CD8+ T hücre grubunu uyarabilme kapasitesine sahiptir.

3. Son yıllarda önemi ortaya konmuş olan, vektörün tükrüğündeki immünomodülatör etkili bir takım maddeler de aşı bileşiklerine eklenmeye başlamıştır. "Transmission blocking vaccine" adı da verilen bu yeni aşılar, maksadılan gibi regülatör fonksiyonlu parazitik maddeleri içermekte ve vektör tekrar konakla temasa geçtiğinde lokal inflamasyona neden olarak enjekte edilen parazitin yaşamını engellemektedir.

Özellikle KL'ye karşı umut vaad eden ve klinik kullanıma en yakın iki aşıdan söz etmek mümkündür. Bunlardan birincisi, "Leishmanization" (doğal direnç oluşturmak için aktif enfeksiyon oluşturulması) adı verilen canlı-virulan doğal aşıdır^{9,34,37,38}. Bu aşı, otoklavlanmış canlı *L. major*'u içeren, birinci jenerasyon aşıdır. İdeal edilebilmiş bir antijen preparasyonu olamamasına rağmen, Orta Doğu ve Doğu Avrupa'da kullanılmış olan bu aşı, KL'de %0-75 oranında kuvvetli ve uzun süreli koruma sağlarken, virülansının ayarlanamaması ve katlanılamayacak boyutta lezyonlar oluşturması sebebiyle kullanımdan kaldırılmıştır. Şu anda, WHO'nun öncelikli optimizasyon programında, endemik bölgelerde rutin kullanıma uygun hale getirilmesine çalışılmaktadır^{3,4,9,34}. İkinci aşı ise "Trifusion" adı ile anılan, üç farklı rekombinant *Leishmania* antijenini (TSA, LACK, LeIF), alum adjuvanı ve IL-12 ile kombine halde taşıyan bir rekombinant alt ünite aşısıdır^{4,34,37,38}. Bu aşının, hem CD4+ hem CD8+ T hücrelerini indüklediği ve uzun süreli immünite sağlaması açısından umut verici olduğu düşünülmektedir.

VL için ise durum bu derece iç açıcı görünmemektedir. VL immünopatolojisi daha kompleks olduğundan ve net bir Th1/Th2 polarizasyonu söz konusu olmadığından, aşı adayı geliştirmek daha zor olmaktadır. Bazı pato-antijenik determinantları ve hedef proteinleri kodlayan terapötik yaklaşımlar, makrofaj içindeki enfeksiyonu ve hastalık gelişimini engelleyebilecek gibi düşünülse de, henüz net bir veri ortaya konmamıştır. IL-10 ile birlikte transkütanöz koruyucu antijen uygulamasının karaciğer parazit yükünü azaltmada etkili olabileceği düşünülmektedir³⁸. Çözünebilir *L. donovani* antijenleri ile indüklenmiş DH'ler, fare leishmaniasis immünoterapisinde konvansiyonel kemoterapi ile birlikte uygulanmış ve bu kombinasyon hem karaciğer hem de dalakta parazitin total klerensini sağlamıştır²⁰. Bu tip aşılama sadece insan KL ve VL'sine karşı değil, özellikle köpeklerin rezervuar olduğu Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkelerinde, köpek leishmaniasis'inin de temel domestik rezervuarının ortadan kaldırılmasını sağlayabilir^{2-4,20,34}. Bu bölgelerde köpeklerdeki hastalığın kırılması, insan hastalığının kontrolü açısından önemlidir.

Parazit biyolojisi, genetiği, patogenezi ve immünolojisinin anlaşılması, *Leishmania* genomunun tam olarak ortaya çıkması, VL için immünoterapötik yaklaşımlarda bulunulmasına olanak sağlamaktadır. İmmünopatogenezi çalışmaları ile ortaya konan dalak ve karaciğerdeki yapısal değişiklikler, makrofaj ve DH'lerdeki farklılaşma ve yeniden şekillenme ile diğer immün yolların ince yapılarının anlaşılması, hastalığın patoloji oluşturmaksızın çözülmesi ya da uzun süreli immünite geliştirilmesi açısından yeni stratejiler geliştirilmesine yardımcıdır^{23,24}. VL'deki patolojinin temel olarak parazit persistansına bağlı olduğu düşünülerek, bu persistansta rol oynayan sitokinlerin,

ko-stimülatörlerin veya reseptörlerin manipülasyonu da (konvansiyonel kemoterapi ile birlikte TNF blokajı, OX40 Fc reseptörü artmış regülasyonu ya da anti CTLA-4 uygulaması gibi) tedavi amacı ile denenmektedir^{23,39}.

Hayvan modelleri ve insan hastalığından elde edilen verilerin ışığında yakın gelecekte uygun bir immünoprofilaksinin geliştirilmesi mümkün görünmektedir. Canlı aşı ve rekombinant alt ünite aşıları hedefe en yakın grubu oluşturmaktadır. Yakın gelecekteki en rasyonel yaklaşım; geliştirilen stratejilerin ve yeni buluşların, hastalığın endemik olduğu fakir ülkelere olabildiğince ucuz ve geniş uygulamaya uygun bir biçimde sunmak olmalıdır. Bu hastalığın, bir çok diğer gelişmekte olan ülke hastalıkları ile birlikte ihmal edilmesi; yeni ilaç gelişim ya da aşı çalışmaları için ayrılan maddi desteğin düşük olması, aday terapilerin preklinik fazdan klinik kullanıma geçmesini engellemektedir. Bu nedenlerden ötürü, çalışmaların yararları laboratuvar sınırları içinde kalmaktadır. Gerçekten tıbbi amaçlara ve halk sağlığına hizmet edilebilmesi için, uluslararası düzeyde koordinasyona gerek vardır. Ancak ortak bilinç geliştirilmesi sayesinde harcanan çaba laboratuvarlardan gerçek hizmet alanına taşınabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Pearson RD, Sousa ADQ, Jeronimo SM: *Leishmania* Species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis, p: 2831-2841. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed, 2005. Churchill Livingstone, Philadelphia.
2. Desjeux P: Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004, 27: 305-318.
3. Leishmaniasis: Strategic Direction for Research, Feb 2002. TDR, www.who.int/dr/diseases/leish/direction.htm
4. TDR Publications: Scientific Working Group on Leishmaniasis, Meeting Report. Feb 2004. www.who.int/dr/publications/publications/swg_leish.htm
5. Uz O, Balcioglu IC, Taylan Ozkan A, Ozensoy S, Ozbel Y: Leishmaniasis in Turkey. Acta Trop 2002, 84: 43-48.
6. Alexander J, Satoskar AR, Russhell DG: *Leishmania* species: Models of intracellular parasitism. J Cell Sci 1999, 18: 2993-3002.
7. Awasthi A, Mathur RK, Saha B: Immune response to *Leishmania* infection. Indian J Med Res 2004, 119: 238-258.
8. de Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M: Leishmanial infection: Analysis of its first steps. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003, 98: 861-870.
9. Chang KP, McGwire BS: Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. Kinetoplastid Biol Dis 2002, 1: 1.
10. Sacks D, Sher A: Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nat Immunol 2002, 3: 1041-1047.
11. Rivas L, Moreno J, Canavate C, Alvar J: Virulence and disease in leishmaniasis: What is relevant for the patient? Trends Parasitol 2004, 20: 297-301.
12. Spath GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM: The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. Proc Natl Acad Sci USA 2003, 100: 9536-9541.
13. Bogdan C, Rollinghoff M: The immune response to *Leishmania*: Mechanisms of parasite control and evasion. Int J Parasitol 1998, 28: 121-134.

14. Bogdan C, Gessner A, Solbach W, Rollinghoff M: Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol* 1996, 8: 517-525.
15. Requena JM, Alonso C, Soto M: Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol Today* 2000, 16: 246-250.
16. Sacks D, Noben-Trauth N: The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2002, 2: 845-858.
17. von Stebut E, Udey MC: Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect* 2004, 6: 1102-1109.
18. Trinchieri G: Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003, 3: 133-146.
19. Korb DS, Finney OC, Riley EM: Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *Int J Parasitol* 2004, 34: 1517-1528.
20. Brandonisio O, Spinelli R, Pepe M: Dendritic cells in *Leishmania* infection. *Microbes Infect* 2004, 6: 1402-1409.
21. Sher A, Pearce E, Kaye PM: Shaping the immune response to parasites: Role of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2003, 15: 421-429.
22. Moll H: Dendritic cells and host resistance to infection. *Cell Microbiol* 2003, 5: 493-500.
23. Engwerda CR, Ato M, Kaye PM: Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2004, 20: 524-530.
24. Kaye PM, Svennson M, Ato M, et al: The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev* 2004, 201: 239-253.
25. Wilson ME, Jeronimo SM, Pearson RD: Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog* 2005, 38: 147-160.
26. Gorak PM, Engwerda CR, Kaye PM: Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *L.donovani* infection. *Eur J Immunol* 1998, 28: 687-695.
27. Engwerda CR, Murphy ML, Cotterell SE, Smelt SC, Kaye PM: Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of *Leishmania donovani*. *Eur J Immunol* 1998, 28: 669-680.
28. Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA, Farrell JP: IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol* 2001, 31: 2848-2856.
29. Svennson M, Maroof A, Ato M, Kaye PM: Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells. *Immunity* 2004, 21: 805-816.
30. Engwerda CR, Ato M, Stager S, Alexander CE, Stanley AC, Kaye PM: Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in the control of *Leishmania donovani* infection. *Am J Pathol* 2004, 165: 2123-2133.
31. Engwerda CR, Ato M, Cotterell SE, et al: The role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. *Am J Pathol* 2002, 161: 429-437.
32. Ato M, Nakano H, Kakiuchi T, Kaye PM: Localization of marginal zone macrophages is regulated by C-C chemokine ligands 21/19. *J Immunol* 2004, 173: 4815-4820.
33. Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM: Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 2000, 68: 1840-1848.
34. Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S: Leishmaniasis: New approaches to disease control. *BMJ* 2003, 326: 377-382.
35. Melby PC: Recent developments in leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2002, 15: 485-490.
36. Sinha PK, Pandey K, Bhattacharya SK: Diagnosis and management of *Leishmania*/HIV co-infection. *Indian J Med Res* 2005, 121: 407-414.

37. Vanloubbeeck Y, Jones DE: The immunology of *Leishmania* infection and the implications for vaccine development. Ann N Y Acad Sci 2004, 1026: 267-272.
38. Kubar J, Fragaki K: Recombinant DNA-derived *Leishmania* proteins: From the laboratory to the field. Lancet 2005, 5: 107-114.
39. Zubairi S, Sanos SL, Hill S, Kaye PM: Immunotherapy with OX40L-Fc or anti-CTLA-4 enhances local tissue responses and killing of *Leishmania donovani*. Eur J Immunol 2004, 34: 1433-1440.