

TIBBİ BİYOLOJİDE GÜNCEL KONULAR VE AKADEMİK DEĞERLENDİRMELER

Editör: Prof. Dr. Didem TURGUT COŞAN



yaz
yayınları

Tıbbi Biyolojide Güncel Konular ve Akademik Değerlendirmeler

Editör

Prof. Dr. Didem TURGUT COŞAN

yaz
yayınları

2026

**Tıbbi Biyolojide Güncel Konular ve
Akademik Değerlendirmeler**

Editör: Prof. Dr. Didem TURGUT COŞAN

© YAZ Yayınları

Bu kitabın her türlü yayın hakkı Yaz Yayınları'na aittir, tüm hakları saklıdır. Kitabın tamamı ya da bir kısmı 5846 sayılı Kanun'un hükümlerine göre, kitabı yayınlayan firmanın önceden izni alınmaksızın elektronik, mekanik, fotokopi ya da herhangi bir kayıt sistemiyle çoğaltılamaz, yayınlanamaz, depolanamaz.

E_ISBN 978-625-5450-32-6

Ekim 2026 – Afyonkarahisar

Dizgi/Mizanpaj: YAZ Yayınları

Kapak Tasarım: YAZ Yayınları

YAZ Yayınları. Yayıncı Sertifika No: 73086

M.İhtisas OSB Mah. 4A Cad. No:3/3
İscehisar/AFYONKARAHİSAR

www.yazyayinlari.com

yazyayinlari@gmail.com

İÇİNDEKİLER

Geleneksel Yöntemlerden Dijital PCR'A: Temel İlkeler, Teknolojiler ve Sınırlılıklar.....	1
<i>Didem TURGUT COŞAN, Ylli KRASNIQI</i>	
Protac Teknolojisi ve Tedavide Hedefli Protein Yıkımı Yaklaşımları.....	13
<i>Didem TURGUT COŞAN, Hülyam KURT, Ylli KRASNIQI</i>	
Humoral İmmün Bellek: Bellek B Hücrelerinin İmmünojenotiplendirilmesi, Repertuvar Analizi ve Klinik Yansımaları.....	43
<i>Hande AKALAN</i>	
Tolerans ile Red Arasında Kadın İnfertilitesinde İmmünolojik Dengenin Genetik ve Epigenetik Belirleyicileri.....	56
<i>Muhammed Ali NALBANT</i>	
Pathogenesis of Multiple Sclerosis and the Neuroimmunomodulatory Role of Schisandrin B As A Therapeutic Approach.....	81
<i>Mustafa ÇAKIR, Ahmet EKEN, Hamiyet D. ALTUNTAŞ</i>	
Kimerik Antijen Reseptörlerinin Yapısı, Mekanizması ve Klinik Uygulamaları.....	104
<i>Mustafa SOYÖZ</i>	
Glioblastoma Patogenezinde Mikrorna'ların Rolü ve Terapötik Hedef Olarak Potansiyelleri.....	125
<i>Burcu ÇERÇİ</i>	

Böbrek Transplantasyonu Araştırmalarında Deney Hayvanı Modelleri ve Güncel Yaklaşımlar.....	145
<i>Hatice İlayhan KARAHAN</i>	

Otoimmün Hastalıklarda Mezenkimal Stromal Hücreler: İmmünomodülasyon ve Klinik Tedavi Potansiyeli	160
<i>Aslı ÖZKIZILCIK KOÇYİĞİT</i>	

"Bu kitapta yer alan bölümlerde kullanılan kaynakların, görüşlerin, bulguların, sonuçların, tablo, şekil, resim ve her türlü içeriğin sorumluluğu yazar veya yazarlarına ait olup ulusal ve uluslararası telif haklarına konu olabilecek mali ve hukuki sorumluluk da yazarlara aittir."

GELENEKSEL YÖNTEMLERDEN DİJİTAL PCR'A: TEMEL İLKELER, TEKNOLOJİLER VE SINIRLILIKLAR

Didem TURGUT COŞAN¹

Yİli KRASNIQI²

1. GİRİŞ

Dijital PCR (dPCR), nükleik asit analizinde en önemli gelişmelerden biri olarak kabul edilir ve DNA ile RNA'nın niceliksel belirlenmesinde yeni ve çok daha hassas bir yaklaşım sunar. Klasik PCR'ın temelleri ve gerçek zamanlı PCR'daki ilerlemeler üzerine kurulmuş olan dPCR, moleküler analizi daha ileri bir seviyeye taşır. Bu yöntem, mutlak ölçüm yapabilme ve çok nadir varyantları yüksek duyarlılıkla tespit etme imkanı sağlar. Geleneksel yöntemlerden farklı olarak, dPCR örneği binlerce hatta milyonlarca bağımsız mikrореaksiyona böler. Bu yaklaşım, sonuçların daha doğrudan ve güvenilir şekilde yorumlanmasını sağlar. Aynı zamanda deneysel varyasyonların ve reaksiyonu etkileyebilecek inhibitörlerin etkisini azaltır. Bu özellikleri sayesinde dPCR, hem bilimsel araştırmalarda hem de klinik uygulamalarda giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bu bölümde, dPCR'ın temel prensipleri, başlıca teknolojileri, qPCR ile farkları ve modern laboratuvar ile klinik bağlamdaki uygulamaları ve sınırlılıkları ele alınacaktır.

¹ Prof. Dr., Kurum Bilgileri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye, ORCID: 0000-0002-8488-6405.

² Msc. Bio. Kurum Bilgileri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye, ORCID: 0000-0003-1115-7137.

1.1. PCR dijital (dPCR)-Prensip

PCR, belirli bir DNA segmentinin üstel olarak çoğaltılmasını sağlayan moleküler bir yöntemdir ve 1980'lerde Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir. Daha sonra 1999 yılında Vogelstein ve Kinzler, dijital PCR (dPCR) kavramını ortaya koyarak nükleik asitlerin kantitatif analizinde daha hassas yöntemlerin gelişimine zemin hazırlamıştır (Tan et al., 2021). PCR yöntemi, hedef DNA veya RNA'nın güvenilir şekilde çoğaltılmasını ve tespit edilmesini mümkün kılarak moleküler analizde devrim yaratmıştır. Gerçek zamanlı PCR'ın gelişmesiyle birlikte bu teknoloji klinik uygulamalarda da yaygınlaşmış, kan, beyin-omurilik sıvısı ve doku örneklerinde nükleik asit miktarının ölçülmesi ve patojenlerin belirlenmesi mümkün hale gelmiştir. Bununla birlikte, farklı laboratuvarlar arasında örnek türü, test sistemleri ve deneysel koşullardaki değişiklikler nedeniyle sonuçlarda farklılıklar görülebilir. Patojen yoğunluğu çoğu zaman hastalığın şiddeti ile ilişkilidir ve bu durum daha hassas ve doğru yöntemlere olan ihtiyacı artırmaktadır. Dijital PCR (dPCR) bu noktada önemli avantajlar sunar. Daha doğru tanı ve tedavi etkinliğinin izlenmesini sağlar. Multipleks dPCR yaklaşımları zaman, maliyet ve pipetleme hatalarını azaltırken, tek bir reaksiyonda yüksek miktarda nükleik asidin ölçülmesine imkân tanıyarak gerçek zamanlı PCR'ın bazı sınırlamalarını aşar. Günümüzde dPCR; virüslerin, bakterilerin ve tümör hücrelerinin tespitinde yaygın olarak kullanılmakta, ayrıca epidemiyolojik ve klinik çalışmalarda önemli bir rol oynamaktadır (Kopylova et al., 2023).

Dijital PCR (dPCR), nükleik asitlerin kantitatif ölçümünde yüksek duyarlılık ve doğruluk sağlayan bir yöntemdir. Temel prensibi, reaksiyon karışımının çok sayıda bağımsız mikroyerleşimlere bölünmesine dayanır. Her bir mikroyerleşim genellikle sıfır veya bir hedef molekül içerir. Amplifikasyon sonrasında pozitif birimler floresan sinyal

aracılığıyla belirlenir ve başlangıçtaki örnek konsantrasyonu Poisson istatistikleri kullanılarak hesaplanır. Klasik PCR'dan farklı olarak dPCR, standart eğrilere ihtiyaç duymaz ve mutlak ölçüm sağlar, bu da sonuçların doğruluğunu artırır (Fang et al., 2024). “Dijital” terimi, yöntemin “ya hep ya hiç” prensibinden gelir. Her bir bölme ikili (binary) şekilde değerlendirilir: ya hedef molekül yoktur ya da bir veya daha fazla kopya vardır. Bu yaklaşım ölçümün daha net ve kesin olmasını sağlar (Zhang et al., 2022).

dPCR analizinde örnek, çok sayıda küçük mikroreaktöre bölünür ve her biri çok düşük sayıda nükleik asit kopyası içerir. Bu mikroreaktörler birbirinden izole olduğu için kontaminasyon riski azalır ve sonuçların güvenilirliği artar. Bölme işlemi mikrokuyular, mikroakışkan odacıklar veya damlacıklar aracılığıyla yapılabilir. Mikrokuyular ve çipler bazı sınırlamalara sahip olsa da, mikroakışkan teknolojiler daha fazla sayıda mikroreaksiyonun daha verimli ve düşük maliyetle oluşturulmasını sağlar (Kojabad et al., 2021). dPCR, mikroreaksiyonların oluşturulma şekline göre cdPCR (Kristal Dijital PCR) ve ddPCR (Dijital damlacık PCR) olarak iki ana tipe ayrılır. cdPCR'de reaksiyon, mikroakışkan çip üzerinde çok sayıda küçük bölmeye ayrılır ve her bölme bağımsız bir amplifikasyon ünitesi olarak görev yapar. ddPCR'de ise örnek, mikro veya nanolitre hacminde çok sayıda damlacığa bölünür. Bu damlacıklar genellikle yağ fazı içinde oluşturulur ve her biri bağımsız bir reaksiyon ortamı sağlar. Bu sayede analiz daha hassas ve doğru hale gelir (Hou et al., 2023).

Modern dPCR protokolleri genellikle dört temel adımdan oluşur: i) PCR karışımının binlerce veya milyonlarca mikroreaktöre bölünmesi, ii) hedef içeren her bir birimde amplifikasyonun gerçekleşmesi, iii) reaksiyon sonunda floresans sinyalinin ölçülmesi, iv) pozitif ve negatif bölmelerin oranına dayanarak Poisson istatistikleri ile mutlak konsantrasyonun

hesaplanması. Bu yaklaşım, standart eğrilere ihtiyaç duymadan yüksek duyarlılıkta kantifikasyon sağlar ve tek molekül düzeyinde tespit imkanı sunar (Trouch et al., 2025).

dPCR’de fiziksel bölme, amplifikasyon öncesinde mikroakışkan çipler veya mikroarray sistemleri kullanılarak gerçekleştirilir. Örneğin QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR sistemi, sabit mikrodacıklar kullanarak örneği böler ve aynı platform üzerinde bölme, termal döngü ve veri toplama işlemlerini gerçekleştirir. Son aşamada floresan sinyaller çoklu optik kanallar aracılığıyla görüntülenir ve özel yazılım ile analiz edilir. Bu sistemler yüksek doğruluk, verimlilik ve merkezi veri yönetimi sağlar (Wainman et al., 2024a).

Dijital Damlacık PCR (ddPCR)’de, Bio-Rad gibi platformlarda reaksiyon karışımı yağ ile emulsifikasyon yoluyla bölünerek her biri izole birer reaksiyon birimi olan damlacıklar oluşturulur. Reaksiyonlar, gerçek zamanlı qPCR’de olduğu gibi hazırlanır ve floresan işaretli problemler veya SYBR Green ya da EvaGreen® gibi interkalasyon boyaları kullanılır. Bu sayede her damlacıkta amplifikasyonun izlenmesi mümkün olur (Wainman et al., 2024a). Hazırlanan karışım daha sonra bir damlacık jeneratörüne yerleştirilir ve her reaksiyon nanolitre hacminde binlerce küçük damlacığa ayrılır. Genellikle bir reaksiyon yaklaşık 20.000 damlacığa bölünür. Bu durum, yüksek derecede izolasyon ve analiz için daha iyi kontrol sağlar (Tiwari et al., 2022a). Doğru bir ddPCR analizi için damlacıkların çoğu ya hiç hedef molekül içermemeli ya da yalnızca bir veya birkaç kopya içermelidir. Bu, sinyal doygunluğunu önlemek açısından önemlidir. Amplifikasyon, her örnek için yaklaşık 20.000 damlacık içeren plakalar üzerinde termal siklus cihazında gerçekleştirilir. Amplifikasyon sonrasında plakalar özel bir okuyucu cihazda analiz edilir. Bu cihaz, floresan sinyale göre damlacıkları pozitif ve negatif olarak ayırır ve böylece hedef moleküllerin mutlak sayımı yapılır. Bazı sistemlerde multipleks

analiz sayesinde aynı anda birden fazla hedef farklı floresan kanalları kullanılarak tespit edilebilir. Pozitif damlacıklar daha yüksek floresans gösterir ve veriler genellikle 1 boyutlu veya 2 boyutlu grafikler halinde özel yazılımlar aracılığıyla görselleştirilir (Leonard, 2003).

1.2. qPCR ve dPCR yöntemleri arasındaki farklar

qPCR ve dPCR, nükleik asitlerin tespiti ve ölçümü için kullanılan yöntemlerdir, ancak sonuç verme biçimleri açısından farklılık gösterirler. dPCR, her biri pozitif veya negatif sinyal veren ayrı bölmelere dayanır ve bu sayede herhangi bir standartla karşılaştırma gerektirmeden mutlak ölçüm yapılmasına imkân tanır. Buna karşılık qPCR, konsantrasyonu belirlemek için kalibrasyon eğrilerine veya referans genlere dayanır; bu durum seri dilüsyonlar ve pipetleme hataları nedeniyle varyasyonlara yol açabilir. Bu nedenle dPCR, kalibrasyon ihtiyacını ortadan kaldırdığı ve hata kaynaklarını azalttığı için daha doğru ve daha güvenilir kabul edilir (Campomenosi et al., 2016). dPCR'nin qPCR'ye göre önemli bir diğer avantajı, örneklerde bulunabilecek PCR inhibitörlerine karşı daha dayanıklı olmasıdır. qPCR'de bu inhibitörler floresan sinyali azaltabilir ve hedefin geç tespit edilmesine veya konsantrasyonunun olduğundan düşük hesaplanmasına neden olabilir. dPCR'de ise ikili (binary) yapı sayesinde sinyal zayıflasa bile hedef dizinin varlığı doğru şekilde belirlenebilir. Genel olarak her iki yöntemin duyarlılığı benzer olsa da, dPCR çok nadir varyantların tespitinde avantaj sağlar. DeneySEL koşullara ve bölme sayısına bağlı olarak %0,1 veya daha düşük frekanstaki alleller tespit edilebilir (Wainman et al., 2024b). Bu özellik, dPCR'yi çok düşük miktardaki DNA veya RNA'nın belirlenmesi ve nadir genetik değişimlerin saptanması için uygun hale getirir. Özellikle hücresiz DNA (cfDNA) ve dolaşımdaki tümör DNA'sı (ctDNA) analizlerinde, düşük konsantrasyon ve yüksek doğruluk gereksinimi nedeniyle yaygın olarak kullanılır (Kanagal-Shamanna, 2016). Geleneksel olarak

birçok dPCR platformu multipleks analiz açısından sınırlı olup genellikle yalnızca 2 floresan kanalına sahiptir. Buna karşılık qPCR, 4 ila 6 farklı fluorofor kullanarak daha fazla hedefi aynı anda analiz edebilir. Ancak son yıllardaki teknolojik ve yazılımsal gelişmeler sayesinde dPCR’de de bu kapasite artmış ve 6’ya kadar floresan kanalının kullanılabilirdiği sistemler geliştirilmiştir (Demeke & Dobnik, 2018)

qPCR’de multipleks analiz büyük ölçüde ayırt edilebilen fluorofor sayısına bağlıdır. dPCR’de ise bu sınırlama daha gelişmiş yaklaşımlarla aşılabılır. Aynı fluoroforun farklı kombinasyonları veya konsantrasyonları kullanılarak birden fazla hedef ayırt edilebilir. Bu strateji, aynı floresan sinyal kullanılsa bile birden fazla hedefin eş zamanlı analizine olanak tanır ve dPCR’yi kompleks analizler için daha esnek hale getirir (Wainman et al., 2024a). Genel olarak, floresan kanal sayısı aynı olsa bile bazı dPCR platformları qPCR’ye kıyasla daha fazla hedefi aynı anda analiz edebilir. Bunun nedeni, dPCR’nin daha gelişmiş multipleks stratejileri kullanmasıdır (Whale et al., 2016). qPCR’de olduğu gibi dPCR’de de reaksiyon koşullarının optimize edilmesi gerekir. Özellikle primer ve prob konsantrasyonları önemlidir. dPCR’de genellikle daha yüksek primer konsantrasyonları kullanılır; bu, reaksiyon sonunda floresan sinyalin artırılmasını ve gerçek sinyal ile arka plan floresansı arasındaki farkın daha net olmasını sağlar. Çalışmalar bazı sistemlerde en iyi damlacık ayrımının yaklaşık 500 nM primer konsantrasyonu ile elde edildiğini göstermektedir (Lievens et al., 2016). qPCR, Ct/Cq değerlerine dayanırken, dPCR sinyali reaksiyon sonunda analiz eder. Bu yaklaşım, amplifikasyon sürecindeki varyasyonların etkisini azaltır. Sonuç olarak dPCR daha stabil ve tekrarlanabilir sonuçlar sunar ve hata oranı genellikle %5’in altındadır. Bununla birlikte, hem qPCR hem de dPCR; örnek hazırlama, pipetleme ve diğer deneysel

faktörlerden etkilenebilir ve bu durum nihai sonuçları etkileyebilir (Jacobs et al., 2014).

1.3. dPCR'nin sınırlılıkları

dPCR, klinik ve araştırma laboratuvarlarında giderek daha fazla kullanılmasına rağmen bazı önemli sınırlamalara sahiptir. Öncelikle cihazlar pahalıdır ve her bir örnek için analiz maliyeti yüksek olabilir. Bu nedenle klinik kullanım için uygun platform seçilirken maliyet önemli bir faktördür (Fujioka et al., 2015). Ayrıca dPCR'de kullanılan enzim içeren özel master miksler ve plastik sarf malzemeleri genellikle daha pahalıdır ve çoğu zaman yalnızca yetkili üreticilerden temin edilebilir (Ahmed et al., 2022).

dPCR, qPCR'ye kıyasla daha farklı protokoller ve cihaz kullanımı gerektirdiği için özel eğitim gerektirir. Bir laboratuvar dPCR kullanmayı planladığında sadece cihaz ve reaktif maliyetlerini değil, aynı zamanda sarf malzemeleri ve operatör iş gücünü de hesaba katmalıdır. Bu durum, seçilen platforma bağlı olarak analiz başına maliyeti önemli ölçüde artırabilir (Ahmed et al., 2022). qPCR'de olduğu gibi dPCR'de de reaksiyon koşullarının optimize edilmesi gerekir. Bu; bağlanma (annealing) sıcaklığı, primer ve prob konsantrasyonları, termal döngüler ve tekrar sayısını içerir. Ayrıca bölme işlemi sırasında hacim kaybı yaşanabilir ve bu durum hedef molekülün nihai hesaplamasını etkileyebilir. dPCR yüksek duyarlılığa sahiptir, hatta bazı durumlarda qPCR'den daha hassas olabilir. Ancak dinamik ölçüm aralığı genellikle daha sınırlıdır ve bu durum analizdeki maksimum bölme sayısı ile belirlenir. Eğer bölmeler hedef moleküllerle doymuş hale gelirse, doğru sonuç elde edebilmek için örneğin seyreltilmesi gerekir (Zhu et al., 2015). İş akışı açısından dPCR platformları genellikle düşük veya orta düzeyde verim sunar ve qPCR'ye kıyasla daha az otomasyon içerir. qPCR sistemleri tamamen otomatik hale getirilebilirken, dPCR'de

reaksiyonun bölünmesi aşaması kontaminasyon riskini artırabilir ve bu da sonuçların doğruluğunu etkileyebilir (Wainman et al., 2024a). dPCR’de multipleks analiz de bazı zorluklar içerir. Optik kanallar arasında girişim olabilir ve analiz sırasında bölmelerin doğru şekilde ayrılması ve sınıflandırılması zorlaşabilir. Bu nedenle laboratuvarlar, özellikle ileri düzey multipleks analiz planlanıyorsa, platform seçmeden önce performansı dikkatlice değerlendirmelidir (Tiwari et al., 2022b).

Yeni nesil dizileme (NGS) çoklu hedef analizi ve bilinmeyen dizilerin keşfi için avantaj sağlasa da, dPCR yüksek duyarlılık gerektiren analizlerde ve örnek başına daha düşük maliyetle hâlâ avantajlıdır. NGS yüksek cihaz ve bilişim altyapısı yatırımı gerektirir ve maliyet etkinliği için genellikle örneklerin toplu analiz edilmesi gerekir. Bu durum klinik ortamlarda her zaman mümkün olmayabilir. Bu nedenle, belirli hedeflerin tespiti söz konusu olduğunda dPCR, benzer performansı daha düşük maliyetle sunabilir (Wainman et al., 2024a).

2. SONUÇ

dPCR, örneği binlerce mikroreaksiyona bölerek deneysel varyasyonları minimize eden benzersiz yapısıyla, geleneksel ve gerçek zamanlı PCR yöntemlerinin ulaşamadığı analitik sınırlara yenilikçi çözümler sunmaktadır. Bahsedilen tüm bu teknolojik avantajlar, yöntemi sadece araştırmalarda değil, özellikle onkoloji ve mikrobiyoloji gibi hassas ölçüm gerektiren klinik sahalarda da ön plana çıkarmaktadır. Ele alınacak olan temel ilkeler, teknolojik altyapılar ve qPCR ile karşılaştırmalı analizler, dPCR’ın mevcut potansiyelini ortaya koyarken; yöntemin sınırlılıklarının da doğru kavranması, gelecekte rutin laboratuvar protokollerine entegrasyonu ve standardizasyon süreçleri için akademik ve pratik bir rehber niteliği taşıyacaktır."

KAYNAKÇA

- Ahmed, W., Smith, W. J. M., Metcalfe, S., Jackson, G., Choi, P. M., Morrison, M., Field, D., Gyawali, P., Bivins, A., Bibby, K., & Simpson, S. L. (2022). Comparison of RT-qPCR and RT-dPCR Platforms for the Trace Detection of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater. *ACS ES&T Water*, 2(11), 1871–1880
- Campomenosi, P., Gini, E., Noonan, D. M., Poli, A., D’Antona, P., Rotolo, N., Dominiononi, L., & Imperatori, A. (2016). A comparison between quantitative PCR and droplet digital PCR technologies for circulating microRNA quantification in human lung cancer. *BMC Biotechnology*, 16(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0292-7>
- Demeke, T., & Dobnik, D. (2018). Critical assessment of digital PCR for the detection and quantification of genetically modified organisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(17), 4039–4050. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1010-1>
- Fang, W., Liu, X., Maiga, M., Cao, W., Mu, Y., Yan, Q., & Zhu, Q. (2024). Digital PCR for Single-Cell Analysis. *Biosensors*, 14(2). <https://doi.org/10.3390/bios14020064>
- Fujioka, R. S., Solo-Gabriele, H. M., Byappanahalli, M. N., & Kirs, M. (2015). U.S. Recreational Water Quality Criteria: A Vision for the Future. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(7), 7752–7776. <https://doi.org/10.3390/ijerph120707752>
- Hou, Y., Chen, S., Zheng, Y., Zheng, X., & Lin, J.-M. (2023). Droplet-based digital PCR (ddPCR) and its applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 158, 116897. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116897>

- Jacobs, B. K., Goetghebeur, E., & Clement, L. (2014). Impact of variance components on reliability of absolute quantification using digital PCR. *BMC Bioinformatics*, 15(1), 283. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-283>
- Kanagal-Shamanna, R. (2016). Digital PCR: Principles and Applications. In R. Luthra, R. R. Singh, & K. P. Patel (Eds.), *Clinical Applications of PCR* (pp. 43–50). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3360-0_5
- Kojabad, A. A., Farzanehpour, M., Galeh, H. E. G., Dorostkar, R., Jafarpour, A., Bolandian, M., & Nodooshan, M. M. (2021). Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives. *Journal of Medical Virology*, 93(7), 4182–4197. <https://doi.org/10.1002/jmv.26846>
- Kopylova, K. V., Kasparov, Ed. W., Marchenko, I. V., & Smolnikova, M. V. (2023). Digital PCR as a Highly Sensitive Diagnostic Tool: A Review. *Molecular Biology*, 57(5), 793–801. <https://doi.org/10.1134/S0026893323050059>
- Leonard, D. G. B. (2003). *Diagnostic Molecular Pathology*. W.B. Saunders.
- Lievens, A., Jacchia, S., Kagkli, D., Savini, C., & Querci, M. (2016). Measuring Digital PCR Quality: Performance Parameters and Their Optimization. *PLOS ONE*, 11(5), e0153317. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153317>
- Tan, C., Fan, D., Wang, N., Wang, F., Wang, B., Zhu, L., & Guo, Y. (2021). Applications of digital PCR in COVID-19 pandemic. *VIEW*, 2(2), 20200082. <https://doi.org/10.1002/VIW.20200082>
- Tiwari, A., Ahmed, W., Oikarinen, S., Sherchan, S. P., Heikinheimo, A., Jiang, G., Simpson, S. L., Greaves, J., &

- Bivins, A. (2022a). Application of digital PCR for public health-related water quality monitoring. *Science of The Total Environment*, 837, 155663. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155663>
- Tiwari, A., Ahmed, W., Oikarinen, S., Sherchan, S. P., Heikinheimo, A., Jiang, G., Simpson, S. L., Greaves, J., & Bivins, A. (2022b). Application of digital PCR for public health-related water quality monitoring. *Science of The Total Environment*, 837, 155663. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155663>
- Trouchet, A., Gines, G., Benhaim, L., & Taly, V. (2025). Digital PCR: From early developments to its future application in clinics. *Lab on a Chip*, 25(16), 3921–3961. <https://doi.org/10.1039/D5LC00055F>
- Wainman, L. M., Sathyanarayana, S. H., & Lefferts, J. A. (2024a). *Applications of Digital Polymerase Chain Reaction (dPCR) in Molecular and Clinical Testing*. <https://dx.doi.org/10.1093/jalm/jfad103>
- Wainman, L. M., Sathyanarayana, S. H., & Lefferts, J. A. (2024b). Applications of Digital Polymerase Chain Reaction (dPCR) in Molecular and Clinical Testing. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, 9(1), 124–137. <https://doi.org/10.1093/jalm/jfad103>
- Whale, A. S., Huggett, J. F., & Tzonev, S. (2016). Fundamentals of multiplexing with digital PCR. *Biomolecular Detection and Quantification, Special Issue on dPCR*, 10, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2016.05.002>
- Zhang, L., Parvin, R., Fan, Q., & Ye, F. (2022). Emerging digital PCR technology in precision medicine. *Biosensors and Bioelectronics*, 211, 114344. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114344>

Zhu, G., Ye, X., Dong, Z., Lu, Y. C., Sun, Y., Liu, Y., McCormack, R., Gu, Y., & Liu, X. (2015). Highly Sensitive Droplet Digital PCR Method for Detection of *EGFR*-Activating Mutations in Plasma Cell-Free DNA from Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 17(3), 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.01.004>

PROTAC TEKNOLOJİSİ VE TEDAVİDE HEDEFLİ PROTEİN YIKIMI YAKLAŞIMLARI

Didem TURGUT COŞAN¹

Hülyam KURT²

Ylli KRASNIQI³

1. GİRİŞ

PROTAC teknolojisi ve hedefli protein yıkımı yaklaşımları, hastalıklarla ilişkili proteinlerin seçici olarak ortadan kaldırılmasını amaçlayan yenilikçi biyoteknolojik yöntemlerdir. Geleneksel ilaçların çoğu yalnızca proteinlerin aktivitesini baskımlarken, PROTAC molekülleri hücrenin doğal ubiquitin-proteazom sistemini kullanarak hedef proteinin tamamen parçalanmasını sağlar. Bu yaklaşım özellikle kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve ilaç direnci gelişen durumlarda yeni nesil tedavi stratejileri arasında önemli bir yer edinmiştir.

2. PROTAC TEKNOLOJİSİ

Birçok onkoprotein, geleneksel ilaçlarla kolayca hedeflenemez. Bunun temel nedeni, bu ilaçların hedef proteine

¹ Prof. Dr., Kurum Bilgileri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, ORCID: 0000-0002-8488-6405.

² Prof. Dr., Kurum Bilgileri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, ORCID: 0000-0003-2433-9925.

³ MsC., Kurum Bilgileri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, ORCID: 0000-0003-1115-7137.

son derece özgül bağlanma gerektirmesi ve zamanla gelişen ilaç direnci nedeniyle etkilerini kaybetmeleridir. PROTAC'lar ise farklı bir yaklaşım sunarak, ubikuitin-proteazom sisteminin temel bileşenleri olan ve proteinlerin yıkım için etiketlenmesinde rol oynayan E3 ligazlardan yararlanır. Kanserde E3 ligazlar özel bir öneme sahiptir, çünkü hangi proteinlerin elimine edileceğini ve bu sürecin hangi doku bağlamında gerçekleşeceğini belirlerler. PROTAC'lar, onkoproteini belirli bir E3 ligaz ile kontrollü biçimde yakınlılaştırarak çalışır. Bu etkileşim, hedef proteinin ubikuitinlenmesine ve proteazom tarafından yıkılmasına yol açar. Bu strateji yalnızca fonksiyonunun geçici olarak baskılanmasıyla sınırlı kalmaz aynı zamanda patolojik proteinin hücre içindeki miktarını gerçek anlamda azaltır. Böylece, direnç oluşturan mutasyonlara karşı duyarlılık da azalır. Bu yaklaşımın etkinliği, uygun E3 ligazın seçimi, hedef dokudaki ekspresyon düzeyi ve ternar kompleksin oluşumunu sağlayan bağlayıcının doğru mimarisi gibi temel faktörlere bağlıdır. Hedef-PROTAC-E3 etkileşimlerine yönelik yapısal analizler, bu mekanizmalar hakkında yeni bilgiler sunmakta ve daha seçici ve daha etkili protein yıkıcıların tasarlanmasına katkı sağlamaktadır. Bu bağlamda E3 ligazlar, kanserin moleküler biyolojisi ile hedefe yönelik protein yıkımını birleştiren, umut verici bir terapötik stratejinin merkezinde yer almaktadır (Kelm et al., 2023).

3. PROTAC TEKNOLOJİSİNDE HEDEFLER

Enzimle aktive edilebilen PROTAC'ların modüler tasarımına dair açık ve iyi yapılandırılmış bir çerçeve sunmakta olup, kanser hücrelerinde proteinlerin selektif degradasyonunu ve tümör hedeflemesinde hassasiyetin artırılmasını amaçlamaktadır. Veriler, MAC (modüler bağlanma yapısı) yapısının VHL (Von Hippel-Lindau) ligandını maskelemek için yaygın olarak kullanılan karbonat birimlerine kıyasla belirgin biçimde daha

stabil ve daha etkili bir bağlayıcı olarak işlev gördüğünü göstermektedir. Karbonat temelli yapılar farklı hücresel ortamlarda daha düşük stabilite ve sınırlı performans sergilerken, MAC mimarisi bu açıdan üstünlük sağlamaktadır. Bu özellikler, MAC'ı yeni nesil PROTAC'ların rasyonel tasarımı için daha uygun bir seçenek haline getirmektedir. Bu mimari temel alınarak, enzimlere bağımlı şekilde aktive olan ve VHL'ye bağlı bir PROTAC kütüphanesi geliştirilmiştir. Bu moleküller, spesifik enzim tanıma modülleriyle donatılmış olup, protein degradasyonunun yalnızca ilgili enzimleri eksprese eden hücrelerde gerçekleşmesini sağlar. Böylece hücresel düzeyde selektivite belirgin biçimde artmaktadır. Çalışmanın önemli bir yeniliği, iki farklı enzim tarafından aktive edilebilen PROTAC'ların tanıtılmasıdır. Bu moleküller, her iki sinyal de mevcut olana kadar inaktif kalmakta ve fonksiyonel bir AND (Molekül tek bir sinyal ile aktif olmaz, iki farklı enzimatik sinyalin aynı anda bulunması gerekir) mantığına göre çalışmaktadır. Bu yaklaşım, tümör hücreleri ile normal hücreler arasındaki ayrımı önemli ölçüde güçlendirmektedir. Deneysel sonuçlar, iki enzimle aktive edilen BRD4 degraderinin in vivo koşullarda çok daha elverişli bir güvenlik profiline sahip olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle, konvansiyonel PROTAC'larla sıklıkla gözlenen tümör dışı toksisitenin belirgin biçimde azaldığı gösterilmiştir. Bu bulgular, enzimatik aktivasyonun PROTAC'ların sistemik yan etkilerinin kontrolünde etkili bir araç olarak kullanılabileceğine dair ilk doğrudan kanıtı sunmaktadır. Ayrıca çalışma, MAC bağlayıcı konseptinin yalnızca VHL rekrutmanı ile sınırlı olmadığını, CRBN gibi diğer E3 ligazlara da genişletilebileceğini göstermektedir. Enzimle aktive edilebilen ek PROTAC'ların geliştirilmesi, bu yaklaşımın genel, esnek ve farklı protein hedefleri ile alternatif E3 ligazlara uyarlanabilir olduğunu ortaya koymaktadır. Genel olarak bu çalışma, enzimle aktive edilen kimerik PROTAC'ların modülerliğini, esnekliğini ve geniş

uygulama potansiyelini vurgulamakta; geleneksel PROTAC'ların en önemli sorunlarından biri olan tümör dışı toksisiteyi doğrudan ele almakta ve onkolojide daha güvenli ve daha etkili hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi için yeni perspektifler sunmaktadır (Chen et al., 2024).

Geliştirilen bir PROTAC nanoplatformu, geleneksel PROTAC'ların sınırlamalarını aşan ileri bir sistem sunmaktadır; bunlar arasında tümör heterojenitesi ve sistemik yan etkiler yer alır. ARV771 [BRD4'ü hedefleyen bir PROTAC molekülü (BET degrader)] bazlı bu nanoplatform, tümör mikroçevresine özgü uyarılara yanıt veren aktivasyon mekanizmaları içerir. MMP-2 (Matris metalloproteinaz-2) yüksek bölgelerde, proteolitik enzimler nanopartikülleri PEG (Polietilen glikol) korumasından serbest bırakarak tümörde penetrasyon ve birikimi artırır. Hücre içine alındığında, asidik ortam PGDAT@N nanopartiküllerinin disosiasyonunu tetikler, PROTAC'ın fotoaktivitesini geri kazandırır ve normal dokuları etkilemeden BRD4 (Bromodomain içeren protein 4)'ün selektif degradasyonunu başlatır. Normoksik bölgelerde, lazer ile üretilen ROS (Reaktif oksijen türleri), redoks duyarlı kırılabilir TK (**tiyoketal**) bağlarını kırarak PROTAC'ın serbestleşmesini ve hedef BRD4 degradasyonunu sağlar. Hipoksik bölgelerde ise hipoksiye duyarlı aktivasyon bileşeni degradasyon fonksiyonunu geri kazanır ve konvansiyonel tedavilere dirençli CSC (Kanser kök hücreleri)'leri hedefler (Not: PGDAT@N nanopartikülleri **P**: PEG içeren polimer yapı, **G**: MMP-2 duyarlı GALGLPG peptit dizisi, **D**: DPA (2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate) grupları, **A**: ARV771 adlı BRD4 hedefli PROTAC, **T**: TK (thioketal/tiyoketal) bağları, ROS ile kırılabilir yapı, **@N**: Hipoksiye duyarlı nitrobenzene türevi (ARV771-Nb) yüklenmiş sistemi ifade eder). Bu tasarımın avantajları şunlardır: MMP-2 (Matriks Metalloproteinaz-2) ve FAP (Fibroblast aktivasyon protein) gibi endojen uyarıcılarla tümörde penetrasyon ve birikimin artması, sadece tümör hücreleri

içinde degradasyon ile yan etkilerin azaltılması ve normoksik ile hipoksik bölgelerde PROTAC aktivasyonu sayesinde tümör heterojenitesinin aşılması; CSC ve non-CSC hücreleri kapsar. Sistem ayrıca esnek olup farklı biyomarkerler için modifiye edilebilir, bu da kişiselleştirilmiş yaklaşımlara olanak sağlar. Fare modellerinde yapılan deneyler, PGDAT@N ve lazer kombinasyonu ile tümörlerin tamamen ortadan kalktığını gösterirken, basit nanopartiküllerde etkiler sınırlı kalmıştır. Bu sonuç, nanoplatformun yalnızca PROTAC taşıyıcısı olmadığını, aynı zamanda birden fazla uyarıcıyı entegre eden sofistike bir sistem olduğunu, selektiviteyi, etkinliği ve güvenliğini maksimize ettiğini ortaya koymaktadır. Bu yaklaşım, mikroçevreye duyarlı, kişiselleştirilmiş terapilere doğru önemli bir adımı temsil etmekte ve PROTAC'ların zor ve ilaç direnci gelişmiş kanserlerin tedavisinde kullanım potansiyelini genişletmektedir (Gao et al., 2024).

3.1. STAT3 ve PROTAC

Sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3), kanser terapisi açısından kritik bir hedeftir; birçok tümörde sürekli aktifleşir, hücre proliferasyonunu artırır, ilaç direncini güçlendirir ve bağışıklık yanıtını baskılar. STAT3'ün inhibisyonu, apoptozu teşvik eder ve bağışıklık fonksiyonlarını normal hücreleri etkilemeden yeniden kazanmayı sağlar. Mevcut inhibitörler genellikle STAT3'ün aktivasyonu için gerekli olan SH2 (Src homoloji 2) domainine odaklanır. Ancak STAT1 ile yüksek homoloji, selektiviteyi sağlamayı zorlaştırır. Bu nedenle araştırmalar DBD (DNA bağlanma bölgesi), LD (Ligand bağlanma bölgesi) ve CCD (Sarmal-sarmal bölgesi) gibi diğer domainlere de yönelmiştir. Alternatif bir yaklaşım, STAT3'ün PROTAC aracılığıyla degradasyonudur; bu yöntem protein seviyesini katalitik ve selektif olarak düşürür. Bununla birlikte bazı PROTAC'lar, ZFP91 (Çinko parmak proteini 91) gibi diğer proteinleri de degrade edebilmekte ve selektivite sorununu ortaya

koymaktadır. Monomerik degradasyon ajanları, daha kontrollü bir çözüm sunabilir. Henüz klinik onaylı bir STAT3 inhibitörü olmasa da bazı moleküller klinik denemelere ulaşmıştır. Rasyonel hesaplamalı tasarım, güvenilir analizler ve doğal bileşiklerin model olarak kullanılması, daha etkili moleküllerin geliştirilmesine yardımcı olabilir. Birden fazla STAT3 domainine, ilişkili proteinler olan STAT5'e veya diğer tedavilere eşzamanlı hedefleme, terapötik etkinliği artırabilir. Genel olarak, STAT3 hala çok umut verici bir hedeftir; ancak güvenli ve seçici terapilerin geliştirilmesi, ileri moleküler tasarım, hedefe yönelik degradasyon ve çok fonksiyonlu stratejilerin dikkatli uygulanmasını gerektirir (Dong et al., 2021)

3.2. Reseptörleri ve PROTAC

Klinik uygulamalarda, PROTAC'lar öncelikle AR (Androjen reseptörü), ER (Östrojen reseptörü), BRD9 (Bromodomen içeren protein 9) ve BTK (Bruton's Tirozin Kinaz) proteinlerine karşı test edilmiş ve mCRPC (**Metastatik kastrasyona dirençli prostat kanseri**), ER+/HER- (Östrojen reseptörü pozitif/Human Epidermal büyüme faktör reseptörü 2 negatif), SS (Sinovyal sarkom) ile hematolojik tümörlerde umut verici sonuçlar göstermiştir. PROTAC türevleri, daha önce tedavi edilmesi zor olan çeşitli protein türlerini hedefleme imkânı sağlamıştır. Buna ek olarak, AUTAC (Otofaji hedefleyen kimera), ATTEC (Otofagozoma bağlayan bileşik) ve LYTAC (Lizozom hedefleyen kimera) gibi diğer hedefe yönelik protein degradasyonu (TPD) stratejileri, otofaji ve lizozomal degradasyon yollarını kullanarak seçenekleri genişletmiştir. Bu yaklaşımlar, sitozolik, intramembran ve ekstraselüler proteinler dahil olmak üzere farklı lokasyonlardaki proteinleri hedeflemeye olanak tanır. Sonuç olarak, terapötik hedeflerin yelpazesi ve bu hedeflerin manipülasyon yolları önemli ölçüde artmıştır (J. Li et al., 2023).

Androjen reseptörü (AR), prostat kanseri hücrelerinin hayatta kalması için kritik bir rol oynar. İnflamasyon, TNF- α gibi proinflatuvar sitokinler aracılığıyla MAP3K7 (TAK1) ve IKK β kinazını aktive ederek NF- κ B gibi hayatta kalma yollarını güçlendirir. Ancak birçok prostat kanseri hastasında MAP3K7 genellikle bulunmamaktadır. Çalışmalar, tümörün inflamatuvar bölgelerinde AR ekspresyonunun, inflamasyon olmayan dokulara kıyasla daha düşük olduğunu ve Map3k7'nin farelerde yok edilmesinin AR seviyelerini ve aktivitesini artırdığını göstermektedir. Hasta örneklerinde de MAP3K7 ile AR arasında ters bir ilişki gözlenmiştir. Moleküler mekanizma, TNF α 'nın AR'nin ubiquitinlenmesini ve proteazomal degradasyonunu teşvik ettiğini gösterir. TNF α aracılığıyla IKK β (I κ B kinaz beta)'nin aktivasyonu, AR'nin TRCP1/2 (Beta-transdusin tekrar içeren protein 1/2) E3 ligazları tarafından fosforilasyon ve poliubikuitinlenmesini tetikler, bu da proteinin degradasyonuna yol açar. Bu süreç, tümör hücre proliferasyonunu engeller; AR degradasyonu gerçekleşirse bu etki kaybolur. Bu veriler, MAP3K7–IKK β ekseninin tümör baskılayıcı bir fonksiyonunu ortaya koymakta ve MAP3K7 kaybı olan prostat kanserlerinde AR artışının prognostik bir biyobelirteç ve terapötik hedef olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir (Huang et al., 2021).

Bir çalışma, kastrasyona dirençli prostat kanserinde androjen reseptörü sinyalizasyonunun yeniden aktive edilmesinde kilit rol oynayan AR-V7 (Androjen reseptörü varyant 7) varyantı ile doğrudan ilişkili yeni bir terapötik mekanizmayı tanımlamaktadır. Bulgular, doğal bir alkaloid olan Rut'un, androjen reseptörünün tam uzunluktaki formunu belirgin biçimde etkilemeden, AR-V7'nin proteazomal degradasyonunu seçici olarak indüklediğini göstermektedir. Bu etkinin COX-2 (Siklooksijenaz-2) inhibisyonundan bağımsız olduğu, ancak AR-V7'nin K48 [Ubikuitinin 48. lizin (K48) pozisyonu] bağlantılı ubikuitin zincirleri üzerinden ubikuitinlenmesinin artışıyla ilişkili

olduğu ortaya konmuştur. Çalışma, AR-V7'ye güçlü biçimde bağlanan ve E3 ligaz SIAH2 (Seven In Absentia Homolog 2)'nin rekrutmanı için bir platform görevi gören merkezi bir şaperon olarak GRP78'i tanımlamaktadır. Çekirdekte oluşan GRP78–AR-V7–SIAH2 kompleksi, AR-V7'nin ubiquitinlenmesini ve degradasyonunu kolaylaştırmakta; bu süreç Rut varlığında belirgin şekilde güçlenmektedir. Bunun sonucunda AR-V7'nin stabilitesi azalmakta ve onkojenik sinyalizasyonu baskılanmaktadır. Fonksiyonel düzeyde Rut, özellikle AR-V7 eksprese eden prostat kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe etmekte, hücre döngüsü duraksamasına yol açmakta ve hücre döngüsü inhibitörlerinin ekspresyonunu artırmaktadır. Antitümör etkiler hem in vitro hem de in vivo modellerde doğrulanmış; düşük toksisite ile birlikte antiandrojenik tedavilere duyarlılığın arttığı gösterilmiştir. Genel olarak bu bulgular, GRP78–SIAH2 eksenini üzerinden AR-V7'nin selektif olarak hedeflenmesinin, prostat kanserinde terapötik direncin aşılmasına yönelik umut verici bir yaklaşım olduğunu güçlü biçimde desteklemektedir (Liao et al., 2020).

Prostat kanserinde intratümöral androjen sentezinin düzenlenmesini ve androjen reseptörünün anormal aktivasyonunu açıklayan önemli bir moleküler mekanizmayı ortaya koymaktadır. Odak noktası, tümör içi androjen metabolizmasında merkezi rol oynayan 17 β HSD4 (17 beta hidroksisteroid dehidrogenaz tip 4) proteindir. Veriler, E3 ligaz SPOP (Speckle-Tip BTB/POZ Protein)'un 17 β HSD4'e doğrudan bağlandığını ve Ubikuitin moleküllerinin lizinin 27 veya 29. pozisyonları üzerinden bağlanması (K27/K29) tipinde yıkıma yol açmayan poliubikuitinasyonu tetikleyerek bu proteini stabilize ettiğini ve lokal androjen üretimini sınırladığını göstermektedir. Buna karşılık, SGK3 (Serum/glukokortikoid düzenleyici kinaz 3)'ü 17 β HSD4'ü S318 bölgesinden fosforile eder ve bu durum E3 ligaz SKP2'nin bağlanmasını kolaylaştırır. SKP2, K48 bağlantılı

ubikuitinasyon yoluyla 17 β HSD4'ün proteazomal yıkımını başlatır. Prostat kanseriyle ilişkili SPOP mutasyonları bu koruyucu mekanizmayı bozarak 17 β HSD4 düzeylerini düşürür, intratümöral testosteron sentezini artırır ve tümör büyümesini hızlandırır. Benzer şekilde, SKP2 ekspresyonundaki artış 17 β HSD4'ün daha fazla yıkımına ve lokal androjen sentezinin aktivasyonuna yol açar. Sonuç olarak, SPOP ve SKP2 (S-faz kinaz ilişkili protein 2), 17 β HSD4'ün stabilitesini kontrol etmek için antagonistik biçimde çalışır. Bu dengenin bozulması prostat kanserinin progresyonunu destekler. Tanımlanan bu moleküler eksen, yeni bir patojenik mekanizmayı ortaya koymakta ve terapötik müdahale için umut verici bir hedef sunmaktadır (Shi et al., 2021).

3.3. Programlanmış Ölüm Ligandı 1 (PD-L1) Hedefli Protein Degradasyonu

PD-L1 (Programlanmış ölüm ligandı 1) proteininin degradasyonu, özellikle PD-1/PD-L1 blokajı bağlamında kanser immünoterapisinin etkinliğini artıran kilit bir mekanizma olarak giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Güncel veriler, PD-L1'in doğrudan ortadan kaldırılmasının, özellikle diğer terapötik yaklaşımlarla kombine edildiğinde, antitümör bağışıklık yanıtını belirgin biçimde güçlendirebileceğini ve klinik sonuçları iyileştirebileceğini göstermektedir. Buna karşın, PD-L1 degradasyonunu düzenleyen moleküler mekanizmalar hâlen tam olarak aydınlatılamamış olup, literatürde zaman zaman çelişkili bulgular yer almaktadır. Bazı anti-PD-L1 antikörlerinin PD-L1'i lizozomal degradasyona yönlendirdiği gösterilmiş olsa da, klinikte hâlihazırda kullanılan PD-L1 veya PD-1'e karşı geliştirilen antikörlerin aynı etkiyi gösterip göstermediği net değildir. Buna ek olarak, CMTM6 (CKLF-benzeri MARVEL transmembran bölge içeren protein 6) gibi düzenleyici faktörler hakkında bildirilen veriler de tutarsızdır. CMTM6'nın, hem ubikuitinlenmeyi hem de otofajiyi baskılayarak PD-L1'i stabilize

ettiği öne sürülmekte, bu durum ilgili degradasyon yollarının yorumlanmasını daha da karmaşık hâle getirmektedir. PD-L1'in ubiquitinlenmesine ve degradasyonuna yol açabilecek bazı sinyal yolları tanımlanmıştır; bunlar arasında GSK3 β - β -TrCP (Glikojen sentaz kinaz 3 beta - Beta-transdusin tekrar içeren protein) ve AMPK-ERAD (AMP ile aktive olan protein kinaz-Endoplazmik retikulum ilişkili degradasyon) eksenleri yer almaktadır. Ancak, başlangıçta endoplazmik retikulumda işlenen ve esas olarak hücre membranında lokalize olan transmembran bir proteinin bu kinazlar tarafından nasıl düzenlendiğine dair temel sorular henüz yanıtlanmamıştır. PD-L1'in degradasyon için membranadan sitoplazmaya nasıl taşındığı, bu süreçte hangi E3 ligazların veya otofaji reseptörlerinin görev aldığı ve ADAM (Disintegrin ve metalloproteinaz içeren proteinler) proteazları tarafından oluşturulan sitoplazmik PD-L1 fragmanlarının hücre içi ek fonksiyonlara sahip olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır. Genel olarak, bu belirsizlikler PD-L1 degradasyon mekanizmalarının daha derinlemesine incelenmesine olan ihtiyacı açıkça ortaya koymaktadır. Bu süreçlerin daha kapsamlı şekilde anlaşılması, yalnızca mevcut immünoterapilerin optimize edilmesine değil, aynı zamanda kanser hastalarında tümöre bağlı immünsüpresyonun aşılmasına yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesine de katkı sağlayacaktır (Gou et al., 2020).

3.4. G1 Fazından S Fazına Geçiş Düzenleyen Protein 1 (GSPT1) Hedefli Degradasyon

ORM-5029 adlı GSPT1 (G1 fazından S fazına geçiş düzenleyen protein 1) hedefli bir degradasyon ajanını tanımlamaktadır; bu molekül, TPD (Targeted Protein Degradation) yaklaşımının katalitik gücünü antikörlerin hassasiyeti ile birleştirerek HER2+ tümör hücrelerini hedeflemektedir. Yüksek seçiciliği nedeniyle SMol006 seçilmiş ve Val-Cit PABc (Valin-Sistin peptid ve p-aminobenzoat köprüsü ile bağlayıcı sistemi) bağlayıcısı aracılığıyla pertuzumab ile

konjuge edilerek ORM-5029 oluşturulmuştur. In vitro testlerde ORM-5029, SMol006, Kadcyla ve Enhertu'ya kıyasla 10–1000 kat daha yüksek potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. In vivo çalışmalarda, BT474 ve HCC1569 modellerinde tek dozda (3 mg/kg'a kadar) tümör büyümesini kalıcı olarak engellemiş; etkinlik, GSPT1 degradasyonu ve hücrel stres yanıtının aktivasyonu ile korelasyon göstermiştir. Bu yaklaşım, proteinlerin katalitik degradasyonunu antikor aracılı hedeflemeyle birleştirerek hem seçiciliği artırmakta hem de yan etkileri azaltmaktadır. ORM-5029, HER2-pozitif ve tedavisi zor tümörlerin yönetiminde yenilikçi bir terapi potansiyeli sunmaktadır (Palacino et al., 2022).

3.5. Kodlamayan RNA'lar Aracılı Protein Degradasyonu

LINC00963 (uzun intergenic non protein kodlayan RNA 963), FOSB (FosB proto-onkogen, AP-1 transkripsiyon faktör subunit) ile birlikte çalışarak UBE3C (ubikülin protein ligaz E3C)'nin nükleer translokasyonunu ve transkripsiyonel aktivasyonunu güçlendirir. UBE3C, TP73 adlı tümör baskılayıcı proteini ubikuitinleyip degradasyona yönlendirir; bu durum BRCA hücrelerinde radyoterapi direncine katkı sağlar. LINC00963/FOSB/UBE3C ekseninin hedeflenmesi veya TP73 fonksiyonunun geri kazanılması, hücrelerin radyoterapiye duyarlılığını artırabilir. Bu mekanizma, BRCA hücrelerinin ışın tedavisi sonrası hayatta kalmasını açıklamada yeni bir perspektif sunmakta ve radyoterapi direncinin aşılmasına yönelik stratejiler için temel oluşturmaktadır (Y. Wang et al., 2023).

miR-516a'nın meme kanseri metastazını teşvik ettiğini göstermektedir. miR-516a, Akt sinyal yolunu baskılayan bir fosfotaz enzimi olan PHLPP2 (PH domain lözince zengin tekrar protein fosfotaz 2) ekspresyonunu baskılayarak AKT/FOXO3A yolunun aktivasyonuna yol açar. Bu eksenin aktivasyonu

SMURF1 (spesifik E3 ubikülin protein ligaz 1) transkripsiyonunu artırır; SMURF1 ise MMP-9 degradasyonunu azaltarak kanser hücrelerinin göç ve invazyon yeteneğini güçlendirir. PHLPP2, AKT aktivitesini sınırlayarak FOXO3A'nın transkripsiyonel fonksiyonunu düzenleyen kritik bir regülatör olarak görev yapar. Bu PHLPP2/AKT/FOXO3A/SMURF1/MMP9 yolu, metastazla ilişkili yeni bir moleküler mekanizmayı ortaya koymakta ve meme kanserinin tedavisi veya önlenmesi için potansiyel hedefler sunmaktadır (Chang et al., 2020).

3.6. Folat Reseptörü Aracılı Protein Degradasyonu

Moleküler bağlayıcılar ve PROTAC'ların olası toksisitesini azaltmak amacıyla FOLR1 (folat reseptörü α) eksprese eden hücrelere yönelik hedeflenmiş bir yaklaşım geliştirdiğini göstermektedir. Moleküller, folat grubu ile kapatılmış pro-ilaçlar olarak tasarlanmış; folat, hem rehber hem de koruyucu görev görerek ilacın FOLR1-pozitif hücrelere ulaşmasını sağlamaktadır. FA-S2-POMA, folat ile kapatılmış bir pomalidomid pro-ilaç olarak yalnızca FOLR1-pozitif hücrelerde selektif degradasyon sağlamıştır. Benzer şekilde, ALK (Anaplastik lenfoma kinaz)'ye yönelik PROTAC FA-S2-MS4048, yalnızca FOLR1-pozitif kanser hücrelerinde ALK proteinini degradasyona uğratmıştır. Bu strateji, moleküler bağlayıcılar ve PROTAC'ların kullanımını daha kontrollü hâle getirerek terapötik etkinliği tümör hücrelerinde korurken, normal hücrelerdeki yan etkileri minimize etmektedir (H. Chen et al., 2021).

3.7. Membran Proteinleri Degradasyonu

TransTAC (Transmembranı hedefleyen kimera), membran proteinlerinin internalizasyonu ve degradasyonunu teşvik etmek için TfR1 (Transferin Reseptör 1) reseptörünü kullanan yeni bir platformdur. Modüler bağlayıcılar aracılığıyla çeşitli proteinlerde yüksek degradasyon sağlar, bu da esneklik ve

genellenebilirlik gösterir. Ayrıca, TransTAC, yüksek Tfr1 ekspresyonu ve demir bağımlılığı olan kanser hücrelerini hedefleyebilir; zor EGFR (epidermal büyüme faktör reseptörü) varyantlarını akciğer kanserinde etkili şekilde indirirken tümör dışı yan etkileri azaltır. Diğer degradasyon ajanlarından farklı olarak, TransTAC Tfr1'in konstitutif endositoz mekanizmasını kullanarak hızlı internalizasyon gerçekleştirir. Bivalent Tfr1 bağlanması membran proteinlerinin degradasyonunu artırırken, sentetik ligand ve katapsin-duyarlı bağlayıcı kullanımı proteinlerin geri dönüşümünü azaltır. Bu yaklaşım, membran proteinlerinin kontrolü için güçlü ve uyarlanabilir bir platform sunar; kanser tedavisi ve diğer biyolojik uygulamalarda önemli potansiyel taşır (Zhang et al., 2025).

3.8. Translasyonel Olarak Kontrol Edilen Tümör Protein Degradasyonu

Akciğer kanseri hücrelerinde tümör gelişimi ve direnç mekanizmalarıyla ilişkili TCTP (**Translasyonel Olarak Kontrol Edilen Tümör Proteini**)'nin mTORC1/S6K/Akt/PLK1 yolu ile detaylı bir şekilde düzenlendiğini göstermektedir. mTORC1 aktivasyonu, TCTP'nin ubiquitin-proteazom sistemiyle degradasyonunu engelleyerek stabilitesini artırır; tersine, mTORC1 inhibisyonu TCTP degradasyonunu artırır ve PLK1 tarafından fosforilasyonunu düşürür. PLK1, TCTP'yi Ser46'dan fosforile ederek degradasyonu başlatır ve bu süreç Akt aracılığıyla S6K tarafından aktive edilir. mTORC1'in inhibisyonuyla TCTP düzeylerinin düşmesi, hücreleri DNA hasarı yapan ajanlara (sisplatin ve doksorubisin gibi) daha duyarlı hâle getirir, p53 aktivasyonunu tetikler ve apoptozu artırır. Bu durum, TCTP'nin DNA stresine karşı koruyucu rol oynadığını gösterir. Yüksek TCTP ekspresyonu, tümör hücrelerinde büyüme ve hayatta kalmayı destekler, p53 fonksiyonunu baskılar ve antikanser tedavilere direnç oluşturur. Bulgular, mTORC1 inhibitörlerinin DNA hasarı yapan ajanlarla kombinasyonunun

tedavi etkinliğini artırabileceğini ve yan etkileri azaltabileceğini göstererek, yüksek TCTP ekspresyonlu kanser hastaları için yeni bir terapötik strateji sunmaktadır (Jeong et al., 2021).

3.9. Ral GTPaz nükleotid ayrışma uyarıcısı benzeri 2 (RGL 2) Protein Degradasyonu

RGL2 (Ral GTPaz nükleotid ayrışma uyarıcısı benzeri 2)'nin kolorektal kanserde arttığını ve kötü prognoz ile metastatik hücre davranışıyla ilişkili olduğunu göstermektedir. RGL2, Wnt/ β -katenin yolunu aktive eder, epitel-mezenkimal geçişi (EMT) teşvik eder ve KRAS ile β -katenini stabilize ederek degradasyonlarını engeller; bu da hücre proliferasyonunu ve invazivliğini artırır. RGL2 seviyesinin düşürülmesi, hücre göçünü ve metastatik koloni oluşumunu azaltırken, aşırı ekspresyonu bu süreçleri artırır. Böylece RGL2, metastaz için kritik bir faktör ve kolorektal kanserde olumsuz prognostik bir biyobelirteç olarak öne çıkmaktadır (Sun et al., 2021).

3.10. Çeşitli Kanser Türlerinde Protein Degradasyonu ve Tedavi Yaklaşımları

Bir çalışmanın proteomik analizleri, klinik örneklerde ASF1B (Anti-susturma fonksiyon 1B histon şaperonu)'yi gastrik kanserin hepatik metastazlarıyla güçlü şekilde ilişkili merkezi bir faktör olarak tanımlamış ve bu bulgu hücrel deneyler ile in vivo modellerde doğrulanmıştır. ASF1B'nin baskılanması, SLC7A11 (Çözücü taşıyıcı ailesi 7 üye 11)'e bağlı ferroptoz baskılanmasının metastatik ilerleme için kritik olduğunu göstermiştir. Moleküler düzeyde, ASF1B adlı histon şaperonu, HOXB3 (Homeobox B3) adlı transkripsiyon faktörünü çekerek ZDHHC9 (Zinc Finger DHHC-Type Palmitoyltransferase 9) geninin ifadesini artırır. ZDHHC9, bir palmitoil transferaz enzimidir ve PCBP1 adlı RNA bağlayıcı proteine C109 amino asidi üzerinden palmitoil grubu eklemektedir. Bu modifikasyon, PCBP1'in ubikuitinlenmesini engeller. Böylece PCBP1 daha

stabil hale gelir ve hücre içinde daha uzun süre kalır. Stabil hale gelen PCBP1, SLC7A11 mRNA'sını korur ve parçalanmasını engeller. Bu da SLC7A11 protein seviyesini artırır. SLC7A11, hücrelerin antioksidan savunmasında önemli olan sistin taşınmasını sağlar ve böylece demir bağımlı hücre ölümü olan ferroptoz baskılanır. Bu mekanizma sonucunda kanser hücreleri ölümden kaçınır ve karaciğer (hepatik) metastazları, karın zarı (periton) metastazları ve akciğer (pulmoner) metastazları artış gösterir. Klinik veriler ayrıca ASF1B, ZDHHC9, PCBP1 ve SLC7A11 arasında güçlü bir ilişki olduğunu ve bu yolun bağışıklık kontrol noktası proteini PD-L1 ile de bağlantılı olabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, ASF1B–ZDHHC9–PCBP1–SLC7A11 eksenini, ferroptozu baskılayarak gastrik kanserde metastazı artıran önemli bir sinyal yolu olarak öne çıkmaktadır ve özellikle immünoterapi tedavileriyle birlikte hedeflenebilecek potansiyel bir tedavi yolu sunmaktadır (M. Wang et al., 2026).

Bir çalışma, gastrik kanserde hepatik metastazın ferroptozu baskılayan bir moleküler ağ üzerinden desteklendiğini göstermektedir. ASF1B, HOXB3'ü kullanarak ZDHHC9 genini daha aktif hale getirir ve böylece hücrede ZDHHC9 proteininin üretimi artar. ZDHHC9, bir palmitoiltransferaz olarak PCBP1'i modifiye ederek ubiquitinizasyondan korur ve protein stabilitesini yükseltir. Stabilize olmuş PCBP1, SLC7A11 mRNA'sının stabilitesini artırarak ferroptozu baskılayarak tümör hücrelerinin hayatta kalmasını desteklemektedir. Bu eksenin aktivasyonu, karaciğer metastazlarının artışıyla ve PD-L1 ekspresyonu ile sıkı bir bağlantı göstermektedir. Böylece protein degradasyonu, hücre ölümü kaçışı ve bağışıklık yanıtının modülasyonu arasında doğrudan bir ilişki ortaya koyulmuştur (Jian et al., 2026).

Bir başka çalışma, serviks kanserinde ECT2 (Epithelial hücre değiştirici dizi 2)'nin glikolizi teşvik ederek tümör

hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve invazyonunu artırdığını göstermiştir. Deubikuitinaz USP13 (Ubikitin spesifik peptidaz 13), ECT2'yi stabilize ederek degradasyonunu engelleyerek malign aktivitelerini güçlendirmektedir. USP13 seviyeleri düştüğünde ECT2 stabilitesi azalır ve tümör ilerlemesi durur; ECT2 ekspresyonu geri getirildiğinde bu etki ortadan kalkmaktadır. Bu veriler, USP13–ECT2 eksenini ubikuitin düzenlemesi üzerinden malign davranışları kontrol eden potansiyel bir terapötik hedef olarak ortaya koymaktadır (T. Li et al., 2026).

Bu çalışmalar kanser hücrelerinde SLC7A11'i seçici olarak hedef alan ve ferroptozu tetikleyen yenilikçi bir PROTAC yaklaşımı göstermektedir. Sülfasalazin'in aktif kısmı, optimize edilmiş bir bağlayıcı aracılığıyla 4-fluoro-talidomid ile birleştirilmiş ve dSLC7A11'i oluşturmuştur; bu molekül proteinin doğrudan yıkımını sağlamaktadır. In vitro ve in vivo testler, dSLC7A11'in geleneksel sülfasalazine göre ferroptozu daha etkili indüklediğini, hücre ölümünü artırdığını ve hücre yayılımını sınırladığını göstermiştir. Bu etki, SLC7A11'in gerçek yıkımı sayesinde ortaya çıkmakta olup klasik tedavilerde görülen kompensatuvar mekanizmaları önler. Ayrıca, PROTAC'lar hücre içinde tekrar kullanılabilir, böylece tekrarlayan dozlara gerek kalmadan birden fazla yıkım döngüsü sağlanır. Bu yaklaşım, ferroptozun temel düzenleyicilerini hedeflemek için sürdürülebilir ve seçici bir strateji sunar. Genel olarak, dSLC7A11, protein yıkıcılarının, geleneksel tedavilere dirençli tümörlere karşı yenilikçi stratejiler geliştirmede potansiyel taşıdığını göstermektedir (S. Lin et al., 2025).

Yapılan bir çalışma, TRIM55 (Üçlü motif içeren protein 55)'in akciğer adenokarsinoma (LUAD)'sında tümör baskılayıcı bir rol oynadığını göstermektedir. Yüksek TRIM55 seviyeleri, malign davranışların azalması ve hastalar için daha iyi bir prognoz ile ilişkilidir. TRIM55, ALDH1 (aldehit dehidrogenaz 1)

ve CD133 (Prominin 1) gibi kanser kök hücresi belirteçlerini baskılayarak tümör büyümesini ve ilaç direncini sınırlar ve CSC'lere yönelik hedeflenmiş müdahaleler için potansiyel sunar. Ana mekanizma, Snail1 (Snail ailesi transkripsiyonel represör 1)'in ubikuitin yolağı aracılığıyla yıkımıdır. Snail1 düzeylerini düşürerek TRIM55, EMT sürecini ve CSC fenotipinin korunmasını engeller, böylece tümör hücrelerinin yayılımını, göçünü ve invazyonunu azaltır. Bununla birlikte, çalışma sınırlamalara sahiptir: tek bir kohort ve in vitro hücre hattına dayanmıştır; bu nedenle ek hayvan modellerinde testler ve çok merkezli doğrulamalar gereklidir. TRIM55'in diğer sinyal yollarını etkileyip etkilemediği hâlâ belirsizdir ve daha derin analizler gerekmektedir. Özetle, TRIM55, LUAD'da tümör baskılayıcı bir faktör olarak öne çıkmakta, Snail1 yıkımını teşvik etmekte ve hedefe yönelik moleküler terapilerin geliştirilmesi için fırsatlar sunmaktadır (Guo et al., 2022).

Araştırmalar, CDK4/6 kinazlarının hücre döngüsünün kilit düzenleyicileri olarak terapide önemli hedefler olduğunu göstermektedir, ancak bu kinazların inhibitörlerine karşı gelişen direnç hâlâ büyük bir sorundur. Bu direnç, ilaçlara duyarsız INK4-CDK6 kompleksleri ve CDK6 ekspresyonunu artıran genetik değişikliklerle ilişkilidir. Protein yıkımına dayalı stratejiler, PROTAC'lar ve moleküler yapııştırıcılar gibi, CDK4/6'yı ubikuitin aracılığıyla işaretleyip degradasyona yönlendirerek klasik inhibitörlere karşı direnci aşar. Bu moleküller kanser hücrelerinin duyarlılığını geri kazandırır ve kinazları yüksek verimlilikle ortadan kaldırır. WO 2023/039081 ve WO 2023/288305 patentleri, CDK4/6 ve Helios (IKZF2; Ikaros ailesi çinko parmak protein 2)'un E3 ligaz Cereblon (CRBN) aracılığıyla rekrütmanı yoluyla yıkım yöntemlerini tarif ederek antitümör yanıtı ve efektör T hücresi fonksiyonunu artırmayı öngörmektedir (Kargbo, 2023).

Kimerik degradasyon hedefleyici kimera (CDTAC)'ların Programlanmış Hücre ölümü ligandı-1 (PD-L1) membran proteinlerini ubiquitin-proteazom sistemi aracılığıyla degradasyon için geliştirdiğini göstermektedir. CDTAC'lar PD-L1'e bağlanır ve CRBN ligazını rekrüte ederek hızlı ve seçici degradasyonu sağlar; lizozomal yıkım ise minimal düzeydedir. Açlığı Taklit Eden Diyet (FMD) ile tedavi, hücre alımını ve proteazom aktivitesini artırarak PD-L1'in %90'dan fazlasının bir saat içinde yıkılmasını ve en az 36 saat boyunca düşük seviyelerde tutulmasını sağlar. CDTAC'lar, stimülatör of interferon gen (STING) yolunu aktive eder, dendritik hücrelerin olgunlaşmasını ve T hücresi hazırlığını destekler, böylece tümöre karşı bağışıklık yanıtını güçlendirir. Bu yaklaşım, fare kolon karsinomu hücre hattı CT26 ve fare melanoma hücre hattı B16-F10 tümörlerinde tümör büyümesini sisteme toksisite oluşturmadan engeller. Konvansiyonel PROTAC'larla kıyaslandığında, CDTAC'lar membran proteinlerinin degradasyonunu, tümörde daha iyi birikimi, immün aktivasyonu ve in vivo floresan takibi olanağını sunarak kanser immünoterapisi için umut verici bir strateji ortaya koymaktadır (Su et al., 2023).

Enzalutamid ve Abirateron asetat gibi androjen reseptör (AR) antagonistlerinin, mitokondriyal protein, mitokondri dış zar translokazı 20 (TOMM20)'yi otofaji-lizozom yoluyla degradasyona uğrattığını göstermektedir. Bu degradasyon mitokondriyal potansiyeli düşürür ve oksidatif stresi (ROS) artırır; bu da PI3K/AKT yolunu aktive eder ve prostat kanserinde (t-NEPC) kök hücre özelliklerinin kazanımını ve nöroendokrin geçişi destekler. TOMM20 azalması pluripotent faktörler dört pluripotensi faktörü OSM (OCT4, SOX2, KLF4 ve c-MYC) ve **nöroendokrin prostat kanseri (NEPC)** belirteçleri nöral hücre adezyon molekül 1 (NCAM1)'in ekspresyonunu artırırken, TOMM20'nin korunması AR antagonistlerine duyarlılığı geri

getirir. Azalma etkileri AKT inhibitörleri ile hassastır, bu da TOMM20 degradasyonu ile PI3K/AKT yolunun yakın ilişkisini gösterir. Bu veriler, TOMM20 degradasyonunun prostat kanseri hücrelerinin AR terapilerine direnç geliştirmesine izin verdiğini göstermektedir. Düşük TOMM20 seviyeleri tedaviye duyarlılık göstergesi olarak kullanılabilir ve t-NEPC geçişinin önlenmesi için terapötik bir hedef olarak değerlendirilebilir (Yin et al., 2023).

Yapılan çalışmalar ITRI-148 (Endüstriyel Teknoloji Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilen 148 numaralı deneysel bileşik)'in AR'nin N-terminal domenini hedefleyen bir PROTAC olduğunu göstermektedir. Piperidin-alkin bağlayıcı ve talidomid E3 ligandı kullanarak AR (Androjen Reseptörü)'yi ubiquitin-proteazom sistemi üzerinden degradasyona yönlendirir. ITRI-148, tam boy AR, AR-V7 (Androjen Reseptörü splice varyantı 7) ve L702H [AR L702H mutasyonu (lösin → histidin değişimi)] ile H875Y [AR H875Y mutasyonu (histidin → tirozin değişimi)] mutantları dahil tüm aktif AR formlarını etkin biçimde ortadan kaldırarak ikinci nesil anti-androjenlere karşı direnç sorununu aşar. Sertleştirilmiş bağlayıcı, farmakokinetik stabiliteyi ve oral emilimi artırır ve kastrasyonlu ve kastrasyonsuz modellerde belirgin tümör küçülmesi sağlar. Analizler, ITRI-148'in AR sinyalini bozduğunu, hücre döngüsü transkriptlerini baskıladığını ve mitotik ilerlemeyi durdurduğunu gösterirken AR-V7 veya PSA (Prostat spesifik antijen)'de kompensatuvar artışa yol açmadığını ortaya koymuştur. Etki, CRBN'ye rekrute edilen AR'nin hızlı poliubikuitinlenmesi ve proteazomal degradasyonuna dayanır. Bu özellikleriyle ITRI-148, kastrasyon dirençli prostat kanseri (CRPC) tedavisi ve mevcut terapilere karşı dirençle başa çıkmak için umut verici bir yaklaşım sunmaktadır (Hung et al., 2026).

3.11. PROTAC Teknolojisinde Son Dönem Araştırmalar

Son dönemlerde yapılan çalışmalar, lncRNA FOXP4-AS1'in kolorektal kanserde yüksek seviyelerde ifade edildiğini ve tümör ilerlemesini hızlandırdığını göstermektedir. FOXP4-AS1'in azaltılması, hücrelerin göçünü, invazyonunu ve EMT (Epitelyal-Mezenkimal Geçiş) sürecini engellemiş, ayrıca in vivo modellerde tümör büyümesini yavaşlatmıştır. Mekanik olarak, FOXP4-AS1 FOXP4 [antisens RNA 1 (uzun kodlamayan RNA, lncRNA)] bir iskele gibi davranarak USP7 (Ubikuitin Spesifik Peptidaz 7)'yi ZEB1 (Çinko parmak E-box bağlayıcı homeobox 1) ile birleştirir ve ZEB1'in ubikuitinlenmesini düzenleyerek onun stabilitesini artırır. USP7'in P005091 [USP7 inhibitörü (P005091)] ile inhibe edilmesi, FOXP4-AS1'in metastatik etkisini keserken, ZEB1'in aşırı ifade edilmesi göç ve invazyonu geri getirmiştir. Bu FOXP4-AS1-USP7-ZEB1 eksen, kolorektal kanserde metastaz için kritik bir moleküler yolak olarak öne çıkmaktadır (Yang et al., 2026).

E3 ligazı KLHL6 (Kelch benzeri aile üyesi 6)'nın tümör mikroçevresinde T hücrelerini çift yönlü olarak düzenlediğini göstermektedir. KLHL6, TOX [timosit seçimi ile ilişkili yüksek hareketli grup kutu (HMG-box) protein]'un Lys48 (lizin 48. pozisyonundan bağlanan ubikuitin zinciri) ubikuitinlenmesini ve degradasyonunu teşvik ederek Tpex [T hücre progenitör tükenmiş (eksahst) fenotipi] hücrelerinin terminal diferansiyasyonunu engeller ve anti-tümör fonksiyonunu korur. Aynı zamanda PGAM5-Drp1 (Fosfogliserat mutaz ailesi üyesi 5-Dinamine ilişkili protein 1) eksenini kullanarak mitokondriyal dinamiği dengede tutar; KLHL6 eksikliği anormal mitokondri bölünmesine ve hücresel yorgunluğa yol açar. TOX ve PGAM5'in hedeflenmesi anti-tümör fonksiyonu geri getirir ve sinerjik etki gösterir. Buna ek olarak, KLHL6 CDK2, Roquin2 ve NOTCH2'nin degradasyonunu teşvik ederek tümörü baskılar.

KLHL6 ekspresyonunu veya aktivitesini artıran ya da birden fazla substratı eş zamanlı hedefleyen stratejiler, immünoterapinin ve anti-tümör etkinin güçlendirilmesine olanak tanır. Özetle, KLHL6 protein degradasyonu ve mitokondriyal dinamiği koordine ederek T hücrelerinde yorgunluğu önler ve anti-tümör immüniteyi geliştirir, bu da kanser immünoterapisi için umut verici bir yaklaşım sunar (Cheng et al., 2026).

SPP1 [salgılanan fosfoprotein 1 (Osteopontin)]'in kolorektal kanserde karaciğer metastazında kritik bir rol oynadığını ve immün baskılayıcı bir mikroçevre oluşturduğunu göstermektedir. SPP1, CAF (kanser ilişkili fibroblast)'ları CXCL12 [C-X-C motif kemokin ligandı 12 (SDF-1)] üretmeye teşvik ederek CD8+ T [CD8 (T hücre yüzey belirteci / sitotoksik T hücresi belirteci)] hücrelerinin infiltrasyonunu ve aktivasyonunu engeller, böylece tümörü korur. Bu SPP1–CAF–CXCL12 eksenini, tümör hücreleri ile CAF'lar arasında pozitif bir geri besleme oluşturarak tümör büyümesini ve hayatta kalmayı artırır. Yüksek SPP1 ekspresyonu kötü prognoz ve sınırlı immünoterapi yanıtıyla ilişkilidir. Ubikuitinleme burada önemli bir rol oynar; proteinlerin, özellikle CXCL12 ve TME (tümör mikroçevresi) bileşenlerinin, degradasyonunu ve fonksiyonunu düzenleyerek metastazı ve tedavi direncini etkiler. Bu mekanizma, SPP1–CAF–CXCL12 yolunun hedeflenmesi ve protein ubiquitinlemesinin kontrolünün, metastatik kolorektal kanser için hem terapötik bir yaklaşım hem de prognostik bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir (Liu et al., 2026).

SCF E3 ubiquitin ligaz kompleksi (SKP1–Cullin1–F-box E3 ubiquitin ligaz kompleksi)'nin bir parçası olan siklin F'nin, substrat tanıma ve protein degradasyonunu düzenleyerek proteostazı ve genomik stabiliteyi koruduğunu göstermektedir. Son çalışmalar, siklin F'nin deubikuitilaz USP7 (Ubiquitin Specific Peptidase 7) ile etkileşerek ER α ve PHF8 (Bitki homeodomain parmak protein 8) gibi proteinleri stabilize ettiğini

ve bunun meme kanserinin gelişimine katkı sağladığını ortaya koymuştur. Analizler, siklin F ve USP7 transkriptleri arasında luminal A tümörlerde ve hücre hatlarında pozitif korelasyon olduğunu göstermiştir. Her ikisinin yüksek ekspresyonu, endokrin tedavi gören hastalarda daha düşük sağkalımla ilişkilidir ve bu durum tedaviye dirençte rollerini işaret eder. Moleküler ağlar, siklin F'in RBL2 (Retinoblastoma benzeri protein 2) ve PLK4 (Polo-benzeri kinaz 4) aracılığıyla CDK4 (Sikline bağımlı kinaz 4)-RB (Retinoblastoma Protein) yolunu etkileyebileceğini, USP7'nin ise HUWE1 (HECT, UBA ve WWE bölgesi içeren E3 ubikuitin protein ligaz 1) üzerinden ESR1 (Östrojen reseptörü 1)-CDK4 ağını modüle edebileceğini göstermektedir. Proteomik analizler, oksidatif fosforilasyon ve hücre döngüsü aktivitesinde artış, immün yolların ise azalmasıyla sonuçlanmış, bu da ubikuitinleme ve protein degradasyonu arasındaki dengenin meme kanseri progresyonunda kritik olduğunu ortaya koymaktadır (Sharma et al., 2026).

Bir çalışma, iki ana E3 (E3 ubikuitin ligazı) olan CRL5 (Cullin-RING Ligaz 5) ve APC/C (Anafazı Başlatan Kompleks/Siklozom) arasında yeni bir mekanizmayı ortaya koymaktadır; bu mekanizma, CUL5 (Cullin 5) ile APC11 (Anafazı Başlatan Kompleks Alt Birim 11) arasındaki doğrudan etkileşim üzerinden işler. APC11, CUL5 ile kanonik olmayan bir şekilde bağlanarak E2 enzimi (Ubikuitini E3 ligaza taşıyan ara enzim) UBE2F (Ubikuitin Bağlayıcı Enzim E2 F) ile etkileşimi engeller ve CRL5'in aktivasyonunu sınırlar. APC11 susturulduğunda CUL5 birikir ve CRL5 hedefleri, örneğin SOCS3 (Sitokin Sinyallemesini Baskılayıcı Protein 3), destabilize olur; bu da integrin $\beta 1$ 'in birikmesine ve tümör hücrelerinin göç ve metastazının artmasına yol açar. Öte yandan, CUL5, E3 ligazı ITCH (Itchy E3 Ubikuitin Protein Ligaz)'i kullanarak APC11'i stabilize eder; ITCH, Ubikuitin moleküllerinin 27., 29. veya 33. lizin kalıntıları üzerinden

bağlanmasıyla oluşan klasik olmayan ubiquitin zincirleri olan K27/K29/K33 tip atipik poliubikuitin zincirlerini katalize eder ve APC/C aktivitesini korur. CUL5 kaybı APC11 seviyesini düşürür, mitotik çıkışı geciktirir ve paklitaksele duyarlılığı artırır. Bu bulgular, CUL5 ve APC11 arasındaki dengenin E3 ligaz fonksiyonu, hücre döngüsü, genomik stabilite ve kemorezistans için kritik olduğunu ve tümör oluşumu ile metastazın terapötik olarak modüle edilebileceğini göstermektedir (D. Cui et al., 2026).

Bir çalışma, SMARCA4 [SWI (Switch)/SNF (Geçiş/Sükroz Fermente Edemeyen) ilişkili, matriks bağlantılı, aktine bağımlı kromatin düzenleyici protein, alt aile A üyesi 4] eksikliği bulunan non-small cell akciğer kanseri (küçük hücreli dışı akciğer kanseri) hücrelerinde, SMARCA2 [SWI (Switch)/SNF (Geçiş/Sükroz Fermente Edemeyen) ilişkili, matriks bağlantılı, aktine bağımlı kromatin düzenleyici protein, alt aile A üyesi 2] proteininin hücrelerin hayatta kalması için kritik olduğunu göstermiştir. Seçici bir protein yıkım ajanı olan PRT3789, VHL (Von Hippel–Lindau tümör baskılayıcı E3 ubiquitin ligaz) aracılığıyla SMARCA2'nin poliubikuitinlenmesini ve ardından proteazom tarafından yıkılmasını tetiklerken, SMARCA4 proteinini korumaktadır. SMARCA4 eksikliği bulunan hücrelerde bu durum, kromatin yeniden düzenleme kompleksi olan SWI/SNF kompleksinin yapısının bozulmasına ve gen ifade programlarının yeniden düzenlenmesine yol açarak tümör büyümesini durdurmuş ve tümör gerilemesine neden olmuştur. Buna karşılık, SMARCA4 proteini korunmuş hücrelerde tedavinin etkisi oldukça sınırlı kalmıştır. Hastalarda yapılan gözlemlerde ise PRT3789'un SMARCA2 düzeylerini azalttığı ve erken dönem antitümör etkinlik belirtileri gösterdiği saptanmıştır. Bu bulgular, SMARCA4 kaybı bulunan tümörler için seçici ve hedefe yönelik

yeni bir tedavi yaklaşımı potansiyeline işaret etmektedir (Hulse et al., 2026).

4. SONUÇ

Sonuç olarak, PROTAC teknolojisi hedef proteinlerin doğrudan yıkımını sağlayarak klasik tedavi yöntemlerine alternatif güçlü bir yaklaşım sunmaktadır. Yüksek seçicilik, düşük doz gereksinimi ve “ilaçlanamaz” kabul edilen proteinleri hedefleyebilme potansiyeli, bu teknolojiyi geleceğin hassas tıp uygulamalarında önemli bir konuma taşımaktadır. Devam eden araştırmalarla birlikte hedefli protein yıkımı stratejilerinin klinik kullanım alanlarının giderek genişlemesi beklenmektedir.

KAYNAKÇA

- Chang, Y., Jin, H., Li, H., Ma, J., Zheng, Z., Sun, B., Lyu, Y., Lin, M., Zhao, H., Shen, L., Zhang, R., Wu, S., Lin, W., Lu, Y., Xie, Q., Zhang, G., Huang, X., & Huang, H. (2020). MiRNA-516a promotes bladder cancer metastasis by inhibiting MMP9 protein degradation via the AKT/FOXO3A/SMURF1 axis. *Clinical and Translational Medicine*, 10(8), e263. <https://doi.org/10.1002/ctm2.263>
- Chen, H., Liu, J., Kaniskan, H. Ü., Wei, W., & Jin, J. (2021). Folate-Guided Protein Degradation by Immunomodulatory Imide Drug-Based Molecular Glues and Proteolysis Targeting Chimeras. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(16), 12273–12285.
- Chen, Y., Zhang, L., Fang, L., Chen, C., Zhang, D., & Peng, T. (2024). Modular Development of Enzyme-Activatable Proteolysis Targeting Chimeras for Selective Protein Degradation and Cancer Targeting. *JACS Au*, 4(7), 2564–2577. <https://doi.org/10.1021/jacsau.4c00298>
- Cui, D., Qu, R., Li, T., Wang, L., Chen, X., Shao, S., Liang, X., Xu, J., Sun, Y., Xiong, X., & Zhao, Y. (2026). The Crosstalk Between CRL5 and APC/C E3 Ligases Regulates Metastasis and Chemosensitivity of Cancer Cells. *Advanced Science*, 13(3), e12652. <https://doi.org/10.1002/advs.202512652>
- Dong, J., Cheng, X.-D., Zhang, W.-D., & Qin, J.-J. (2021). Recent Update on Development of Small-Molecule STAT3 Inhibitors for Cancer Therapy: From Phosphorylation Inhibition to Protein Degradation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(13), 8884–8915. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00629>

- Gao, J., Jiang, X., Lei, S., Cheng, W., Lai, Y., Li, M., Yang, L., Liu, P., Chen, X., Huang, M., Yu, H., Xu, H., & Xu, Z. (2024). A region-confined PROTAC nanoplatfor for spatiotemporally tunable protein degradation and enhanced cancer therapy. *Nature Communications*, 15(1), 6608. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50735-w>
- Gou, Q., Dong, C., Xu, H., Khan, B., Jin, J., Liu, Q., Shi, J., & Hou, Y. (2020). PD-L1 degradation pathway and immunotherapy for cancer. *Cell Death & Disease*, 11(11), 955. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03140-2>
- Guo, T., Zhang, Z., Zhu, L., Chen, W., Ding, Y., Li, W., Huang, Y., Huang, J., & Pan, X. (2022). TRIM55 suppresses malignant biological behavior of lung adenocarcinoma cells by increasing protein degradation of Snail1. *Cancer Biology & Therapy*, 23(1), 17–26. <https://doi.org/10.1080/15384047.2021.2004835>
- Huang, Z., Tang, B., Yang, Y., Yang, Z., Shi, L., Bai, Y., Yan, B., Karnes, R. J., Zhang, J., Jimenez, R., Wang, L., Wei, Q., Yang, J., Xu, W., Jia, Z., & Huang, H. (2021). MAP3K7-IKK Inflammatory Signaling Modulates AR Protein Degradation and Prostate Cancer Progression. *Cancer Research*, 81(17), 4471–4484. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-4194>
- Hulse, M., Wang, M., Xu, C., Carter, J., Agarwal, A., Lu, L., Pitis, P., Bhagwat, N., Rager, J., Kurian, J., Basch, C., Sivakumar, M., Burtell, J., Mondal, A., Grego, A., Moore, A., Bachner, C., Vykuntam, K., Reichelderfer, A., ... Ito, K. (2026). PRT3789 Is a First-in-Human SMARCA2-Selective Degradar That Induces Synthetic Lethality in SMARCA4-Mutated Cancers. *Cancer Research*, 86(1), 213–235. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-25-1141>

- Hung, C.-L., Hsu, W.-N., Wang, T.-C., Chen, W.-R., Chen, Y.-T., Kuo, Z.-K., Hu, T.-L., Lin, Y.-C., Yeh, H.-H., Lin, H.-C., Yu, C.-J., Fu, C.-W., Liu, H.-H., Hsu, H.-C., Lin, P.-H., Pang, S.-T., Lai, C.-H., & Wang, L.-Y. (2026). Oral bioavailable ITRI-148 degrades androgen receptor variants and overcomes antiandrogen resistance in advanced prostate cancer. *Neoplasia*, 71, 101253. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2025.101253>
- Jeong, M., Jeong, M. H., Kim, J. E., Cho, S., Lee, K. J., Park, S., Sohn, J., & Park, Y. G. (2021). TCTP protein degradation by targeting mTORC1 and signaling through S6K, Akt, and Plk1 sensitizes lung cancer cells to DNA-damaging drugs. *Scientific Reports*, 11(1), 20812. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00247-0>
- Jian, J., Xu, H., Shi, X., Zhang, J., Wang, H., Xu, Y., Huang, Y., Hou, J., Wei, X., & Lin, Y. (2026). Imperatorin induces ferroptosis via mediating lipid peroxidation and SLC7A11/ACSL4/GPX4 signaling for inhibition and therapeutics of prostate cancer. *Biochemical Pharmacology*, 245, 117683. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2026.117683>
- Kargbo, R. B. (2023). Targeted Degradation of CDK4/6: An Innovative Approach to Overcoming Cancer Drug Resistance. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 14(9), 1162–1164. <https://doi.org/10.1021/acsmmedchemlett.3c00356>
- Kelm, J. M., Pandey, D. S., Malin, E., Kansou, H., Arora, S., Kumar, R., & Gavande, N. S. (2023). PROTAC'ing oncoproteins: Targeted protein degradation for cancer therapy. *Molecular Cancer*, 22(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01707-5>

- Li, J., Chen, X., Lu, A., & Liang, C. (2023). Targeted protein degradation in cancers: Orthodox PROTACs and beyond. *The Innovation*, 4(3). <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2023.100413>
- Li, T., Xiong, X., Xie, T., Liu, W., Feng, X., Chen, S., Hu, X., Li, R., & Fu, K. (2026). USP13 exacerbates the malignant progression of cervical cancer by inhibiting ECT2 ubiquitination and degradation. *Reproductive Biology*, 26(1), 101095. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2025.101095>
- Liao, Y., Liu, Y., Xia, X., Shao, Z., Huang, C., He, J., Jiang, L., Tang, D., Liu, J., & Huang, H. (2020). Targeting GRP78-dependent AR-V7 protein degradation overcomes castration-resistance in prostate cancer therapy. *Theranostics*, 10(8), 3366–3381. <https://doi.org/10.7150/thno.41849>
- Lin, S., Wang, L., Dong, X., Wang, Z., Cao, J., Qi, X., Wu, L., Zhang, J., & Shen, S. (2025.). Precision Ferroptosis Amplification via SLC7A11-Directed Proteasomal Degradation for Enhanced Cancer Therapy. *Advanced Healthcare Materials*, n/a(n/a), e04602. <https://doi.org/10.1002/adhm.202504602>
- Liu, S., Zhang, Z., Wang, Z., Liu, C., Liang, G., Xu, T., Li, Z., Duan, X., Xu, G., Feng, X., Feng, Q., Wang, Q., Han, D., Zhang, C., Li, J., & Shen, L. (2026). SPP1 Drives Colorectal Cancer Liver Metastasis and Immunotherapy Resistance by Stimulating CXCL12 Production in Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Research*, 86(1), 58–79. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-24-4916>
- Palacino, J., Bai, C., Yi, Y., Skaletskaya, A., Takrouiri, K., Wong, W., Kim, M.-S., Choi, D.-K., Kim, D.-Y., Yang, Y., Kook, J., Lee, P., Jeong, H., Jee, S.-M., Park, J., Chang,

- K.-H., Fishkin, N., & Park, P. U. (2022). Abstract 3933: ORM-5029: A first-in-class targeted protein degradation therapy using antibody neodegrader conjugate (AnDC) for HER2-expressing breast cancer. *Cancer Research*, 82(12_Supplement), 3933. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2022-3933>
- Sharma, S. S., Hari, P. S., & Nivedhitha, R. (2026). *Enhanced co-expression of cyclin F and USP7 in luminal A breast cancer correlates with endocrine resistance, high oxidative phosphorylation, and low inflammatory signatures* (p. 2026.01.08.698348). bioRxiv. <https://doi.org/10.64898/2026.01.08.698348>
- Shi, L., Yan, Y., He, Y., Yan, B., Pan, Y., Orme, J. J., Zhang, J., Xu, W., Pang, J., & Huang, H. (2021). Mutated SPOP E3 Ligase Promotes 17 β HSD4 Protein Degradation to Drive Androgenesis and Prostate Cancer Progression. *Cancer Research*, 81(13), 3593–3606. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-3258>
- Su, W., Tan, M., Wang, Z., Zhang, J., Huang, W., Song, H., Wang, X., Ran, H., Gao, Y., Nie, G., & Wang, H. (2023). Targeted Degradation of PD-L1 and Activation of the STING Pathway by Carbon-Dot-Based PROTACs for Cancer Immunotherapy. *Angewandte Chemie*, 135(11), e202218128. <https://doi.org/10.1002/ange.202218128>
- Sun, M.-S., Yuan, L.-T., Kuei, C.-H., Lin, H.-Y., Chen, Y.-L., Chiu, H.-W., & Lin, Y.-F. (2021). RGL2 Drives the Metastatic Progression of Colorectal Cancer via Preventing the Protein Degradation of β -Catenin and KRAS. *Cancers*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/cancers13081763>
- Wang, M., Yu, K., Ma, M., Li, J., Zhang, Y., Ke, Z., Wang, H., & Li, Y. (2026). ASF1B promotes gastric cancer liver

metastasis through inhibiting ZDHHC9/PCBP1/SLC7A11 signaling axis mediated ferroptosis. *Npj Precision Oncology*. <https://doi.org/10.1038/s41698-026-01272-w>

Wang, Y., Liu, M., Liu, X., & Guo, X. (2023). LINC00963-FOSB-mediated transcription activation of UBE3C enhances radioresistance of breast cancer cells by inducing ubiquitination-dependent protein degradation of TP73. *Journal of Translational Medicine*, 21(1), 321. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04153-z>

Yang, X., Shen, C., Yuan, Y., Shao, J., Liu, H., Li, Y., Zhou, G., & Shi, Z. (2026). LncRNA FOXP4-AS1 facilitates colorectal cancer invasion and migration by enhancing USP7 interaction with ZEB1. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-34903-6>

Yin, L., Ye, Y., Zou, L., Lin, J., Dai, Y., Fu, Y., Liu, Y., Peng, Y., Gao, Y., Fu, Y., Qi, X., Deng, T., Zhang, S., & Li, X. (2023). AR antagonists develop drug resistance through TOMM20 autophagic degradation-promoted transformation to neuroendocrine prostate cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 42(1), 204. <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02776-0>

Zhang, D., Duque-Jimenez, J., Facchinetti, F., Bixi, G., Rhee, K., Feng, W. W., Jänne, P. A., & Zhou, X. (2025). Transferrin receptor targeting chimeras for membrane protein degradation. *Nature*, 638(8051), 787–795. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07947-3>

HUMORAL İMMÜN BELLEK: BELLEK B HÜCRELERİNİN İMMÜNOFENOTİPLENDİRİLMESİ, REPERTUVAR ANALİZİ VE KLİNİK YANSIMALARI

Hande AKALAN¹

1. GİRİŞ

Humoral immün bellek, adaptif bağışıklık sisteminin aynı veya benzer bir antijenle yeniden karşılaşmaya verdiği ikincil yanıtın temelidir. Primer yanıt sırasında aktive olan B hücrelerinin bir bölümü germinal merkezlerde seçilerek bellek B hücrelerine veya uzun ömürlü plazma hücrelerine farklılaşır. Uzun ömürlü plazma hücreleri kemik iliği ve diğer nişlerde sürekli antikor salgılamak, bellek B hücreleri çoğunlukla antijen uyarısı olmadan uzun süre canlı kalır ve yeniden uyarıldığında hızla çoğalabilir veya antikor salgılayan hücrelere dönüşebilir (Inoue ve ark., 2024; Sanz ve ark., 2008).

Güncel kavrayış, belleği yalnızca “yüksek afiniteli, sınıf değiştirmiş B hücresi” olarak tanımlamanın yetersiz olduğunu göstermektedir. Germinal merkezden bağımsız yollarla oluşabilen IgM⁺ bellek hücreleri, sınıf değiştirmemiş fakat mutasyona uğramış hücreler ve kronik inflamasyonda ortaya çıkan atipik bellek hücreleri bu basit sınıflandırmanın dışındadır (Sanz ve ark., 2008; Weisel & Shlomchik, 2017). Bu nedenle bellek B hücrelerinin tanımı; yüzey fenotipi, immünoglobulin

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Yalova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, ORCID: 0000-0002-5922-2498.

genlerinin geçmişi, doku yerleşimi, antijene özgüllük, yeniden yanıt verme kapasitesi ve yaşam süresi gibi birden fazla boyutun birlikte değerlendirilmesini gerektirir.

2. HUMORAL İMMÜN BELLEĞİN BİYOLOJİK TEMELLERİ

Naif B hücrelerinin BCR aracılığıyla antijeni tanınması, yardımcı T hücrelerinden gelen sinyaller ve doğuştan bağışıklık uyarılarıyla birleştiğinde B hücre aktivasyonunu başlatır. Aktive B hücreleri ekstre foliküler odaklarda kısa sürede plazmablast oluşturabilir. Bir bölümü ise foliküler dendritik hücreler ve foliküler yardımcı T hücreleriyle etkileşerek germinal merkez reaksiyonuna girer. Germinal merkezde aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz (AID), immüoglobulin değişken bölgelerinde somatik hipermutasyonu ve sabit bölge genlerinde sınıf değişimini başlatır (Chen ve ark., 2023; Inoue ve ark., 2021; Inoue ve ark., 2024; Kruetzmann ve ark., 2003; Toboso-Navasa ve ark., 2020).

Somatik hipermutasyon, antikor bağlanma bölgesinin dizisini değiştirir. Antijene daha yüksek afiniteli BCR taşıyan hücrelerin seçilmesi, afinitenin zaman içinde artmasına yol açar. Bununla birlikte bellek B hücrelerinin tümü aynı düzeyde mutasyon veya afinitasyon taşımaz. Bazı bellek hücreleri daha düşük mutasyon yüküyle geniş çapraz reaktivite sağlayabilir; bazıları ise yüksek afiniteli ve dar özgüllüklü yanıt üretir. Bu farklılık, özellikle varyant virüslere karşı koruyucu bağışıklığın anlaşılmasında önemlidir (Chen ve ark., 2023; Inoue ve ark., 2021; Inoue ve ark., 2024).

Bellek B hücrelerinin yeniden aktivasyonu, yalnızca antijenin tekrar tanınmasına bağlı değildir. BCR sinyali, Toll-benzeri reseptör uyarıları, sitokinler, yardımcı T hücreleri ve mevcut antikorların antijen erişilebilirliğini değiştirmesi yanıtın

yönünü etkiler. Antikor geri-bildirimi bazı koşullarda yeni B hücrelerinin seçilimini baskımlarken, bazı koşullarda bağışıklık yanıtını güçlendirebilir (Chen ve ark., 2023; Inoue ve ark., 2024). Bu nedenle ikincil yanıt, primer yanıtta hücrelerin pasif biçimde yeniden çoğalmasından ibaret değildir; seçim ve rekabet süreçleri yeniden şekillenir.

3. BELLEK B HÜCRESİ ALT GRUPLARI VE İMMÜNOFENOTİPLENDİRME

3.1. Temel fenotipik yaklaşım

İnsan periferik kanında B hücreleri genellikle CD19 veya CD20 pozitifliği üzerinden tanımlanır. Bellek B hücrelerini naif B hücrelerden ayırmada CD27 uzun süre temel belirteç olarak kullanılmıştır. CD19⁺CD20⁺CD27⁺ hücreler klasik bellek B hücresi fraksiyonunu temsil eder; ancak CD27 ekspresyonu tüm bellek hücrelerinde bulunmaz. Özellikle sistemik lupus eritematozus ve bazı kronik enfeksiyonlarda CD27⁻ bellek benzeri hücreler belirginleşebilir (Anderson ve ark., 2007; Sanz ve ark., 2008; Sanz ve ark., 2019; Weisel & Shlomchik, 2017). Bu bulgu, CD27-negatif hücrelerin doğrudan “naif” kabul edilmemesi gerektiğini gösterir.

IgM ve IgD ekspresyonu, bellek B hücrelerinin işlevsel ayırımında ikinci bir eksendir. IgM⁺IgD⁺CD27⁺ hücreler çoğu zaman marjinal zon benzeri veya “IgM bellek” hücreleri olarak incelenir. Bu hücreler özellikle kapsüllü bakterilere karşı yüksek afiniteli IgM yanıtlarına katkıda bulunabilir. IgM⁺IgD⁻ hücreler ise daha önce antijenle karşılaşmış ve sıklıkla germinal merkezle ilişkili özellikler taşıyan bir alt grubu temsil eder. IgG⁺ veya IgA⁺ hücreler sınıf değiştirmiş bellek B hücreleri olarak değerlendirilir; ancak izotip, hücrenin anatomik kökenini tek başına belirlemez (Kruetzmann ve ark., 2003; Ma ve ark., 2006; Sanz ve ark., 2008; Weisel & Shlomchik, 2017; Weller ve ark., 2004).

CD21, CD11c ve T-bet gibi belirteçler, özellikle kronik enfeksiyon ve otoimmünite bağlamında önem kazanır. CD21-düşük, CD11c⁺ ve T-bet⁺ hücreler sıklıkla atipik bellek B hücreleri veya yaşlanma/otoimmünite ile ilişkili B hücreleri olarak adlandırılır. Bu hücrelerde inhibitör reseptörler, farklı metabolik özellikler ve azalmış klasik bellek işlevi görülebilir. Bununla birlikte “atipik” fenotipin tek bir biyolojik hücre tipine karşılık gelmediği, bağlama göre farklı alt kümeleri kapsayabileceği vurgulanmalıdır (Inoue ve ark., 2024; Rubtsov ve ark., 2017; Sanz ve ark., 2019).

3.2. Önerilen akım sitometrisi paneli

Pratik bir panelde ilk kapılama canlı tek hücreler üzerinde yapılmalıdır. Ardından CD45⁺ lenfositler, singletler ve CD19⁺CD20⁺ B hücreleri seçilir. CD27 ile IgD veya IgM birlikte kullanılarak naif, klasik bellek ve IgM bellek fraksiyonları ayrılabilir. IgG, IgA ve IgM boyaması sınıf değiştirmiş alt kümeleri gösterir. CD21, CD11c ve T-bet eklenmesi atipik veya inflamasyonla ilişkili fenotiplerin incelenmesini sağlar. CD38 ve CD24, plazmablastlara yakın hücrelerin ve geçiş popülasyonlarının ayrımında yardımcıdır.

Panel tasarımında floresan yayılımı, antikor titrasyonu, floresans-minus-bir kontrolü, biyolojik negatif ve pozitif kontroller ile örnek işleme süresi dikkate alınmalıdır. Özellikle CD27⁻CD21-düşük hücrelerin bellek olarak yorumlanması, yalnızca tek bir belirtece değil, immünoglobulin izotipi, aktivasyon profili ve mümkünse BCR dizisi gibi ek kanıtlara dayandırılmalıdır. Akım sitometrisi hücrelerin yüzey görünümünü verir; antijen özgüllüğünü veya klonal geçmişini doğrudan göstermez.

4. BCR REPERTUVAR ANALİZİNİN TASARIMI

BCR repertuarı, bir bireydeki B hücrelerin taşıdığı immünoglobulin ağır ve hafif zincir dizilerinin toplamıdır. Repertuar analizi için en kritik ön karar, sorunun hücre düzeyinde mi yoksa popülasyon düzeyinde mi sorulacağıdır. Bulk DNA veya RNA dizilemesi milyonlarca hücrenin toplam sinyalini vererek klonalite ve kullanım sıklığını ölçebilir. Buna karşılık tek hücreli V(D)J dizileme, aynı hücredeki ağır ve hafif zincir eşleşmesini, transkripsiyonel durumu ve fenotipi ilişkilendirebilir (Imkeller & Wardemann, 2018; Zheng ve ark., 2022).

Bulk yaklaşımda örnek kaynağı, hücre saflaştırma yöntemi ve DNA/RNA seçimi sonuçları belirler. DNA temelli dizileme hücre başına genetik kopya sayısını daha doğrudan temsil eder. RNA temelli yaklaşım ise aktif olarak transkripsiyon yapan klonları, özellikle plazmablastları, olduğundan fazla gösterebilir. Primer tasarımı V, D ve J gen segmentleri arasındaki çeşitliliği kapsamalı; Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yanlışlığını azaltmak için mümkün olduğunda benzersiz moleküler tanımlayıcılar kullanılmalıdır (Hoehn ve ark., 2016; Zheng ve ark., 2022).

Tek hücreli dizileme, ağır ve hafif zincir eşleşmesi sayesinde klonların gerçek reseptör yapısına daha yakın bir görünüm sunar. Buna fenotipik indeksleme ve tek hücreli RNA dizilemesi eklendiğinde, aynı klonun naif, bellek veya plazmablast durumundaki transkripsiyonel programı incelenebilir. Uzun okuma teknolojileri tam uzunlukta V(D)J transkriptlerini ve izoformları yakalama avantajına sahiptir; ancak maliyet, hata profili ve veri analizinin karmaşıklığı göz önünde tutulmalıdır (Zheng ve ark., 2022). Antijenle işaretlenmiş hücrelerin tek hücreli BCR dizilemesi, reseptör dizisini antijen özgüllüğüyle ilişkilendirebilir; LIBRA-seq gibi yaklaşımlar bu

amaçla geliştirilmiştir (Jin ve ark., 2021; Shah ve ark., 2018; Zheng ve ark., 2022).

5. BİYİNFORMATİK İŞLEM VE REPERTUVAR METRİKLERİNİN YORUMU

Ham diziler kalite kontrolünden geçirildikten sonra adaptör ve düşük kaliteli bazlar temizlenir. V(D)J ataması, germ hattı gen veri tabanına göre yapılır. Diziler daha sonra klonal gruplara ayrılır. Klon tanımı yalnızca CDR3 amino asit dizisine göre yapılırsa farklı genetik kökenli hücreler aynı klona yanlışlıkla dahil edilebilir; V ve J kullanımı, CDR3 uzunluğu ve nükleotid benzerliği birlikte değerlendirilmelidir.

Çeşitlilik, eşitlik, klonal genişleme ve yakınsama birbirinden farklı kavramlardır. Shannon entropisi, klonların hem sayısını hem de dağılımını dikkate alır. Simpson temelli ölçütler baskın klonlara daha fazla ağırlık verir. Klonluk veya Gini katsayısı, repertuvarın birkaç büyük klon tarafından ne ölçüde domine edildiğini gösterir. Klonal paylaşım analizleri, iki örnekte aynı veya benzer klonların bulunmasını değerlendirir; ancak ortak klonların antijen özgüllüğünü kanıtlamaz (Hoehn ve ark., 2016; Imkeller & Wardemann, 2018; Zheng ve ark., 2022).

Somatik hipermutasyon oranı, dizilerin germ hattı V genlerinden uzaklığını yansıtır. Sınıf değişimi, sabit bölge transkriptlerinin veya izotip-spesifik dizilerin incelenmesiyle belirlenir. Ağ analizleri, tek bir klondan türeyen ve farklı mutasyon yollarından geçen dizileri görselleştirebilir. Bu analizler, bellek B hücrelerinin zaman içinde olgunlaşmasını ve aynı klonun farklı dokularda izlenmesini kolaylaştırır (Hoehn ve ark., 2016; Imkeller & Wardemann, 2018; Shah ve ark., 2018).

Yorumda örnekleme derinliği belirleyicidir. Daha fazla okuma sayısı, nadir klonların bulunma olasılığını artırır; ancak

aynı hücrenin PCR kopyalarını yeni klonlar gibi sayma riski de vardır. Bu nedenle teknik tekrarlar, biyolojik tekrarlar, benzersiz moleküler tanımlayıcılar, hücre sayısı ve kullanılan germ hattı veri tabanı raporlanmalıdır. Repertuvarlar arasında karşılaştırma yapılırken yaş, aşılama zamanı, enfeksiyonun evresi, immünsüpresif tedavi ve örnek türü gibi karıştırıcılar dikkate alınmalıdır (Hoehn ve ark., 2016; Zheng ve ark., 2022).

6. KLİNİK YANSIMALAR

6.1. Aşı ve enfeksiyon bağışıklığı

Aşıların başarısı yalnızca serum antikor titresine değil, bellek B hücrelerinin kalıcılığına, klonal çeşitliliğine ve varyant antijenleri tanıma kapasitesine de bağlıdır. Özellikle viral enfeksiyonlarda, geniş çapraz reaktif bellek B hücreleri yeni varyantlara karşı hızlı antikor yanıtının kaynağı olabilir (Inoue ve ark., 2024; Jin ve ark., 2021; Shah ve ark., 2018). SARS-CoV-2 çalışmaları, enfeksiyon ve aşı sonrasında bellek B hücresi klonlarının zaman içinde mutasyon ve seçim geçirebildiğini, antikor kapsamının yalnızca başlangıç titresinden çıkarılamayacağını göstermiştir.

Bu nedenle aşı çalışmalarında ideal değerlendirme; antikor titresinin yanı sıra antijen-spesifik bellek B hücrelerinin akım sitometrisiyle sayılması, tek hücreli BCR dizilemesiyle klonal yapıların belirlenmesi ve nötralizasyon gibi işlevsel testlerin birlikte kullanılmasıdır. Repertuvar genişlemesi tek başına koruyuculuk anlamına gelmez; işlevsel antikor üretimiyle doğrulanmalıdır.

6.2. Otoimmünite ve kronik enfeksiyon

Sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit ve diğer otoimmün hastalıklarda CD21-düşük, CD11c⁺ veya T-bet⁺ bellek benzeri popülasyonlar artabilir. Bu hücreler otoantijenlere yanıt,

antijen sunumu ve inflamatuvar sitokin üretimiyle ilişkili olabilir. Ancak fenotipik artışın hastalık nedeni mi yoksa kronik bağışıklık aktivasyonunun sonucu mu olduğu her durumda belirlenmiş değildir. Bu nedenle klinik biyobelirteç olarak kullanımları, hastalık alt tipi ve tedavi durumuna göre doğrulanmalıdır (Konishi ve ark., 2019; Rubtsov ve ark., 2017; Sanz ve ark., 2019).

Kronik enfeksiyonlarda bellek B hücreleri sürekli antijen ve inflamatuvar sinyallere maruz kalır. Bu ortam, klasik bellek hücrelerinden farklı atipik popülasyonların oluşmasına ve bazı hücrelerde yeniden yanıt verme kapasitesinin azalmasına yol açabilir. Buna karşılık aynı fenotipik grup içinde etkili nötralizan antikor üretebilen hücreler de bulunabilir. Fonksiyonel heterojenlik, tek bir “atipik bellek” kategorisinin klinik yorum için yetersiz olduğunu gösterir.

6.3. İmmün yetmezlik ve tedavi izlemi

Yaygın değişken immün yetmezlikte IgM bellek B hücrelerinin azalması, dalak işlev bozukluğu ve bakteriyel enfeksiyon eğilimiyle ilişkilendirilmiştir (Carsetti ve ark., 2005; Weisel & Shlomchik, 2017; Weller ve ark., 2004). Bu hücrelerin sayısı, tek başına tanı koydurmaz; immünoglobulin düzeyleri, aşı yanıtları ve klinik öyküyle birlikte değerlendirilmelidir. B-hücresi tüketici tedavilerden sonra bellek B hücrelerinin yeniden yapılanma kinetiği de tedavi yanıtı ve enfeksiyon riskinin izlenmesine katkı sağlayabilir. Bununla birlikte hücre sayısındaki düzelme, antikor kalitesinin veya repertuarın tamamen normale döndüğünü garanti etmez.

6.4. Hematolojik neoplaziler ve minimal rezidüel hastalık

BCR dizilemesi, lösemi ve lenfoma gibi klonal B-hücre hastalıklarında baskın klonun izlenmesi ve minimal rezidüel hastalığın saptanması için kullanılabilir (Konishi ve ark., 2019;

Zheng ve ark., 2022). Bu uygulamada reseptör dizisinin klonal özgü olması avantaj sağlar. Ancak örnekleme hatası, tümör heterojenliği ve teknik duyarlılık sonuçların yorumunu sınırlar. Klinik kullanım için laboratuvarlar arası standardizasyon ve doğrulanmış eşik değerleri gereklidir.

7. YÖNTEMSEL SINIRLILIKLAR VE GELECEK PERSPEKTİFİ

Bellek B hücrelerinin evrensel bir fenotipik tanımı yoktur. CD27, CD21 veya IgM gibi belirteçler biyolojik süreklilik üzerinde keskin sınırlar oluşturmaz. Periferik kan, lenf düğümü, dalak, kemik iliği ve mukozal dokulardaki bellek havuzlarının yalnızca bir bölümünü temsil eder. Ayrıca kriyoprezervasyon, hücre canlılığı, antikor klonları ve cihazlar arası farklar akım sitometrisi sonuçlarını etkileyebilir (Sanz ve ark., 2008; Sanz ve ark., 2019; Weisel & Shlomchik, 2017).

BCR dizilemesinde PCR yanlılığı, eksik ağır-hafif zincir eşleşmesi, örnekleme derinliği, germ hattı veri tabanının yetersizliği ve klon tanımındaki farklılıklar temel sorunlardır. Repertuar dizisi antijen özgüllüğünü doğrudan göstermez; özgüllük için antijen bağlanması, rekombinant antikor üretimi veya fonksiyonel test gerekir. Bu nedenle geleceğin güçlü tasarımları, fenotipik akım sitometrisini tek hücreli V(D)J dizilemesi, transkriptomik profil, antijen özgüllüğü ve fonksiyonel nötralizasyonla birleştirecektir (Hoehn ve ark., 2016; Kiyotani ve ark., 2018; Zheng ve ark., 2022).

Yapay zekâ ve makine öğrenmesi repertuar örüntülerini hastalık sınıflarıyla ilişkilendirmede yararlı olabilir; ancak modellerin bağımsız kohortlarda doğrulanması, veri sızıntısının önlenmesi ve klinik açıklanabilirlik zorunludur (Konishi ve ark., 2019). Gelecekte longitudinal örnekleme, doku örnekleri ve standartlaştırılmış biyoinformatik iş akışları bellek B hücrelerinin

gerçek yaşam dinamiklerini daha iyi ortaya koyacaktır (Imkeller & Wardemann, 2018).

8. SONUÇ

Humoral immün bellek, uzun ömürlü antikor salgılayan hücreler ile yeniden uyarılabilir ve heterojen bellek B hücrelerinin birlikte oluşturduğu çok katmanlı bir sistemdir. Bellek B hücrelerinin doğru anlaşılması, tek bir yüzey belirteciye dayalı sınıflandırmadan çok; fenotip, immünoglobulin gen geçmişi, klonal yapı, antijen özgüllüğü ve işlevin birlikte incelenmesini gerektirir. Akım sitometrisi hücresel alt kümeleri tanımlarken, BCR repertuar dizilemesi klonal evrim ve çeşitlilik hakkında tamamlayıcı bilgi sağlar. Bu iki yaklaşımın klinik ve fonksiyonel testlerle birleştirilmesi, aşı tasarımı ve immün yetmezlik izlemesine ve hematolojik neoplazilerde minimal rezidüel hastalık değerlendirmesine kadar geniş bir alanda bilgi sağlayacaktır. Bununla birlikte, araştırma bulgularının klinik karara dönüştürülmesi için standardizasyon, uygun biyolojik kontroller ve bağımsız doğrulama gereklidir.

KAYNAKÇA

- Anderson, S. M., Tomayko, M. M., Ahuja, A., Haberman, A. M., & Shlomchik, M. J. (2007). New markers for murine memory B cells that define mutated and unmutated subsets. *Journal of Experimental Medicine*, 204(9), 2103–2114. doi:10.1084/jem.20062571
- Carsetti, R., Rosado, M. M., Donnanno, S., Guazzi, V., Soresina, A., Meini, A., et al. (2005). The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(2), 412–417. doi:10.1016/j.jaci.2004.10.048
- Chen, S. T., Oliveira, T. Y., Gazumyan, A., Cipolla, M., & Nussenzweig, M. C. (2023). B cell receptor signaling in germinal centers prolongs survival and primes B cells for selection. *Immunity*, 56(3), 547–561.e7. doi:10.1016/j.immuni.2023.02.003
- Hoehn, K. B., Fowler, A., Lunter, G., & Pybus, O. G. (2016). The diversity and molecular evolution of B-cell receptors during infection. *Molecular Biology and Evolution*, 33(5), 1147–1157. doi:10.1093/molbev/msw015
- Imkeller, K., & Wardemann, H. (2018). Assessing human B cell repertoire diversity and convergence. *Immunological Reviews*, 284(1), 51–66. doi:10.1111/imr.12670
- Inoue, T., Shinnakasu, R., & Kurosaki, T. (2021). Generation of high quality memory B cells. *Frontiers in Immunology*, 12, 825813. doi:10.3389/fimmu.2021.825813
- Inoue, T., Shinnakasu, R., & Kurosaki, T. (2024). Memory B cells. *Nature Reviews Immunology*, 24, 5–17. doi:10.1038/s41577-023-00897-3

- Jin, X., Zhou, W., Luo, M., Wang, P., Xu, Z., Ma, K., et al. (2021). Global characterization of B cell receptor repertoire in COVID-19 patients by single-cell V(D)J sequencing. *Briefings in Bioinformatics*, 22(6), bbab192. doi:10.1093/bib/bbab192
- Kiyotani, K., Mai, T. H., Yamaguchi, R., Kulis, M., Orgel, K., Imoto, S., et al. (2018). Characterization of the B-cell receptor repertoires in peanut allergic subjects undergoing oral immunotherapy. *Journal of Human Genetics*, 63, 239–248. doi:10.1038/s10038-017-0364-0
- Konishi, H., Komura, D., Katoh, H., Atsumi, S., Koda, H., Yamamoto, A., et al. (2019). Capturing the differences between humoral immunity in the normal and tumor environments from repertoire-seq of B-cell receptors using supervised machine learning. *BMC Bioinformatics*, 20, 267. doi:10.1186/s12859-019-2853-y
- Kruetzmann, S., Rosado, M. M., Weber, H., Germing, U., Tournilhac, O., Peter, H. H., et al. (2003). Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *Journal of Experimental Medicine*, 197(7), 939–945. doi:10.1084/jem.20022020
- Ma, C. S., Pittaluga, S., Avery, D. T., Hare, N. J., Maric, I., Klion, A. D., et al. (2006). Selective generation of functional somatically mutated IgM+CD27+, but not Ig isotype-switched, memory B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *Journal of Clinical Investigation*, 116(2), 322–333. doi:10.1172/JCI25720
- Rubtsov, A. V., Rubtsova, K., Kappler, J. W., Marrack, P., & Hansen, T. H. (2017). T-bet-positive B cells are critical for anti-viral antibody responses. *Immunity*, 47(5), 861–871.e5. doi:10.1016/j.immuni.2017.08.029

- Sanz, I., Wei, C., Lee, F. E.-H., & Anolik, J. (2008). Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Seminars in Immunology*, 20(1), 67–82. doi:10.1016/j.smim.2007.12.006
- Sanz, I., Wei, C., Jenks, S. A., Cashman, K. S., Tipton, C., Woodruff, M. C., et al. (2019). Challenges and opportunities for consistent classification of human B cell and plasma cell populations. *Frontiers in Immunology*, 10, 2458. doi:10.3389/fimmu.2019.02458
- Shah, H. B., Hsieh, Y. H., et al. (2018). Insights from analysis of human antigen-specific memory B cell repertoires. *Frontiers in Immunology*, 9, 3064. doi:10.3389/fimmu.2018.03064
- Toboso-Navasa, A., et al. (2020). Restriction of memory B cell differentiation at the germinal center B cell positive selection stage. *Journal of Experimental Medicine*, 217(7), e20191933. doi:10.1084/jem.20191933
- Weisel, F., & Shlomchik, M. (2017). Memory B cells of mice and humans. *Annual Review of Immunology*, 35, 255–284. doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055531
- Weller, S., Braun, M. C., Tan, B. K., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, M. E., et al. (2004). Human blood IgM memory B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a pre-diversified immunoglobulin repertoire. *Blood*, 104(12), 3647–3654. doi:10.1182/blood-2004-01-0346
- Zheng, B., et al. (2022). B-cell receptor repertoire sequencing: Deeper digging into the mechanisms and clinical aspects of immune-mediated diseases. *iScience*, 25(9), 104497. doi:10.1016/j.isci.2022.104497

TOLERANS İLE RED ARASINDA: KADIN İNFERTİLİTESİNDE İMMÜNOLOJİK DENGENİN GENETİK VE EPIGENETİK BELİRLEYİCİLERİ

Muhammed Ali NALBANT¹

1. GİRİŞ

1.1. Kadın İnfertilitesinde İmmünolojik Boyutun Yeri

İnfertilite, düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen 12 ay içinde gebelik elde edilememesi olarak tanımlanır ve dünya genelinde üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %8–12’sini etkileyen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Güncel tahminler, 186 milyonu aşkın bireyin infertiliteden etkilendiğini göstermektedir (Vander Borgh & Wyns, 2018). Kadın kaynaklı infertilitenin klasik nedenleri arasında ovulatuvar bozukluklar, tubal hasar, uterin patolojiler ve endometriozis yer alır; ancak ayrıntılı değerlendirmeye rağmen olguların önemli bir bölümü “açıklanamayan infertilite” olarak sınıflandırılmaktadır. Bu grubun bir kısmında, implantasyon ve erken gebeliğin sürdürülmesini düzenleyen immün mekanizmalardaki bozulmaların rol oynadığı düşünülmektedir.

Üreme immünolojisinin temel sorusu, babadan kalıtılan antijenleri taşıyan yarı-allojenik embriyonun maternal bağışıklık sistemi tarafından neden reddedilmediğidir. Bugün maternal-fetal arayüzün pasif bir tolerans alanı değil, doğal ve edinsel bağışıklık hücrelerinin trofoblastla aktif ve karşılıklı etkileşime girdiği, sıkı

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Bandırma Onyedi Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, ORCID: 0000-0002-4713-1492.

biçimde düzenlenen bir immünolojik organ olduğu kabul edilmektedir (Erlebacher, 2013; Moffett & Shreeve, 2023).

Nitekim implantasyon, kontrollü bir inflamatuvar süreç olarak başlar; gebeliğin ortasında anti-inflamatuvar bir ortam hâkim olur ve doğum eylemi yeniden inflamatuvar bir süreçle gerçekleşir (Mor, Aldo, & Alvero, 2017). Bu dengeli immün programın herhangi bir basamağında ortaya çıkan sapmalar; implantasyon başarısızlığı, tekrarlayan gebelik kaybı, erken over yetmezliği ve endometriozis ilişkili infertilite gibi klinik tablolara zemin hazırlayabilir. Otoimmün mekanizmaların over ve testis işlevinden implantasyona ve gebeliğin sürdürülmesine kadar üremenin tüm evrelerini etkileyebileceği, buna karşın klinik pratikte sıklıkla gözden kaçtığı vurgulanmaktadır (Carp, Selmi, & Shoenfeld, 2012).

Son yıllarda immünolojik infertilitenin yalnızca edinsel otoimmün süreçlerle değil, aynı zamanda kalıtsal genetik varyasyonlar ve çevresel etkilere duyarlı epigenetik düzenleyicilerle şekillendiği anlaşılmıştır. Bu bölümde, maternal-fetal arayüzün immünolojik organizasyonundan başlayarak kadın infertilitesinde immün mekanizmaların klinik karşılıkları, bu mekanizmaları etkileyen genetik ve epigenetik faktörler ile tanı ve tedavide kanıta dayalı yaklaşımlar bütüncül bir çerçevede ele alınmaktadır.

2. MATERNAL-FETAL ARAYÜZÜN İMMÜNOLOJİSİ

Maternal-fetal arayüz, fetal kökenli ekstrasvillöz trofoblast hücrelerinin maternal desiduaya invaze olduğu ve maternal immün hücrelerle doğrudan temas kurduğu bölgedir. Desiduanın özelleşmiş stroması, bu bölgedeki immün hücrelerin bileşimini ve işlevini yerel düzeyde belirleyerek bazı hücre gruplarını bölgede yoğunlaştırırken bazılarının erişimini kısıtlar (Erlebacher, 2013).

2.1. Uterin Doğal Öldürücü (uNK) Hücreler

Gebeliğin ilk trimesterinde desidual lökositlerin yaklaşık %70'ini doğal öldürücü (NK) hücreler oluşturur. Uterin NK (uNK) hücreleri, periferik kandaki NK hücrelerinden fenotipik ve işlevsel olarak belirgin biçimde farklıdır: CD56 ekspresyonu yüksek, CD16 ekspresyonu düşüktür ve sitotoksik kapasiteleri sınırlıdır. Bu hücrelerin temel işlevi hedef hücreleri öldürmek değil; sitokin, kemokin ve anjiyojenik faktörler salgılayarak trofoblast invazyonunu ve spiral arterlerin yeniden şekillenmesini düzenlemektir (Moffett & Colucci, 2014).

Tek hücreli transkriptom analizleri, erken gebelik desiduasında farklı immünomodülatuar ve kemokin profillerine sahip üç ana desidual NK hücre alt grubunun bulunduğunu ortaya koymuştur (Vento-Tormo et al., 2018). Bu bulgu, uNK hücrelerinin homojen bir popülasyon olmadığını ve farklı alt grupların plasantasyonun farklı basamaklarında özelleşmiş görevler üstlendiğini göstermektedir. Bu farklılık, periferik kan NK testlerinin neden desidual ortamı yansıtmadığını da açıklamaktadır.

2.2. Makrofajlar, Dendritik Hücreler ve T Hücre Alt Grupları

Desidual makrofajlar, uNK hücrelerinden sonra ikinci büyük lökosit grubunu oluşturur. Apoptotik trofoblast artıklarının temizlenmesi, doku yeniden yapılanması ve anjiyogenezin desteklenmesi gibi görevler üstlenirler. Desidual dendritik hücreler ise görece az sayıdadır ve fetal antijenlerin maternal T hücrelerine sunumunda sınırlı ve düzenlenmiş bir rol oynar (Erlebacher, 2013).

Gebelik immünolojisinde uzun süre belirleyici olan kavramsal model, başarılı gebeliğin T yardımcı 2 (Th2) yanıtının baskın olduğu bir durum olduğunu ileri süren Th1/Th2 paradigmasıdır (Wegmann, Lin, Guilbert, & Mosmann, 1993).

Bu model daha sonra Th17 hücreleri ve regülatuvar T (Treg) hücrelerini de kapsayacak şekilde genişletilmiştir. Güncel yaklaşıma göre gebeliğin sürdürülmesi, tek bir yanıtın baskınlığından çok Th1, Th2, Th17 ve Treg hücreleri arasındaki dinamik dengeye bağlıdır ve Th17/Treg dengesinin bozulması gebelik kaybı ile ilişkilendirilmektedir (Saito, Nakashima, Shima, & Ito, 2010).

T hücre yanıtlarının yerel düzeyde sınırlandırılmasında metabolik mekanizmalar da önemlidir. Triptofanı yıkan indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) enziminin farmakolojik olarak inhibe edilmesinin allojenik fare gebeliklerinde T hücre aracılı fetal rejeksiyona yol açtığının gösterilmesi, maternal-fetal toleransın aktif biyokimyasal süreçlerle korunduğunu ortaya koyan öncü bulgulardan biri olmuştur (Munn et al., 1998).

2.3. Regülatuvar T Hücreleri ve Fetal Antijenlere Tolerans

FOXP3 transkripsiyon faktörünü eksprese eden Treg hücreleri, fetal antijenlere karşı maternal toleransın merkezinde yer alır. Aluvihare, Kallikourdis ve Betz (2004), gebelik sırasında maternal Treg hücrelerinin genişlediğini ve bu hücrelerin yokluğunda allojenik fetüslerin immünolojik olarak reddedildiğini deneysel olarak göstermiştir. Daha sonraki çalışmalar, gebeliğin fetal antijene özgü Treg hücrelerinde kalıcı bir “regülatuvar bellek” oluşturduğunu ve bu hafızanın sonraki gebeliklerde toleransın daha hızlı kurulmasını sağladığını ortaya koymuştur (Rowe, Ertelt, Xin, & Way, 2012).

Treg hücreleri yalnızca gebeliğin sürdürülmesinde değil, embriyonun implantasyonu için gerekli endometriyal ortamın hazırlanmasında da görev alır. Seminal sıvıya maruziyetin paternal antijenlere özgü Treg yanıtını başlattığı, Treg hücrelerinin spiral arter yeniden yapılanmasını ve desidual damar gelişimini desteklediği bilinmektedir. Treg sayısı ya da

işlevindeki yetersizlik; implantasyon başarısızlığı, tekrarlayan gebelik kaybı ve preeklampsi ile ilişkilendirilmektedir (Robertson, Care, & Moldenhauer, 2018).

2.4. Trofoblastta HLA Ekspresyonu

Ekstravillöz trofoblast hücreleri, klasik polimorfik HLA-A ve HLA-B moleküllerini ve HLA sınıf II moleküllerini eksprese etmez; buna karşın polimorfik HLA-C ile polimorfizmi sınırlı olan HLA-E ve HLA-G moleküllerini eksprese eder. Bu özgün HLA profili, trofoblastın T hücreleri tarafından klasik alloreaktif yolla tanınmasını sınırlarken NK hücreleriyle özgül reseptör-ligand etkileşimlerine olanak tanır (Moffett & Shreeve, 2023).

HLA-G, bu bağlamda en ayrıntılı incelenen moleküldür. Rouas-Freiss, Gonçalves, Menier, Dausset ve Carosella (1997), HLA-G ekspresyonunun trofoblast hücrelerini maternal uNK hücrelerinin sitolitik etkisinden koruduğunu doğrudan göstermiştir. HLA-G'nin membran bağlı ve çözünür izoformları; NK hücreleri, T hücreleri ve antijen sunan hücreler üzerindeki inhibitör reseptörlerle etkileşerek maternal-fetal arayüzde immünomodülatuar bir ortam oluşturur (Hviid, 2006).

2.5. Desidualizasyon ve İmplantasyonda Kontrollü İnflamasyon

Desidualizasyon, endometriyal stromal hücrelerin progesteron ve siklik AMP etkisiyle özelleşmiş salgı hücrelerine dönüştüğü süreçtir. İnsanda desidualizasyon, gebelikten bağımsız olarak her menstrüel siklusun geç sekretuar fazında başlar. Desidualize stromal hücreler, embriyonun kalitesini algılayarak seçici bir “biyosensör” gibi davranır; gelişim potansiyeli düşük embriyoların implantasyonunu sınırlarken uygun embriyoları destekler. Bu sürecin bozulması hem implantasyon başarısızlığına hem de düşük kaliteli embriyoların implante

olmasına bağlı gebelik kayıplarına yol açabilir (Gellersen & Brosens, 2014).

Tekrarlayan gebelik kaybı yaşayan kadınların endometriyumunda desidual öncül hücrelerin azaldığı ve stromal hücrelerde erken yaşlanma (senesens) belirteçlerinin arttığı gösterilmiştir. Bu “endometriyal plastisite kaybı”, desidual yanıtın ve uNK hücreleri ile stromal hücreler arasındaki etkileşimin bozulmasıyla ilişkilidir (Lucas et al., 2016).

3. KADIN İNFERTİLİTESİNDE İMMÜNOLOJİK MEKANİZMALAR VE KLİNİK TABLOLAR

3.1. Antifosfolipid Sendromu

Antifosfolipid sendromu (APS), fosfolipid bağlayıcı proteinlere karşı gelişen kalıcı antikorların varlığında tromboz ve/veya gebelik morbiditesi ile karakterize edinsel bir otoimmün hastalıktır. Uzun süre klinik ve araştırma amaçlı referans olarak kullanılan revize Sapporo (Sidney) kriterleri; lupus antikoagülanı, antikardiyolipin antikorları ve anti- $\beta 2$ glikoprotein I antikorlarından en az birinin en az 12 hafta arayla iki kez pozitif saptanmasını gerektirir. Obstetrik klinik kriterler ise 10. gebelik haftasından önce ardışık üç ya da daha fazla açıklanamayan düşük, 10. haftadan sonra morfolojik olarak normal fetüsün ölümü veya ağır preeklampsi ya da plasental yetmezlik nedeniyle 34. haftadan önce erken doğumu kapsar (Miyakis et al., 2006).

2023 yılında yayımlanan ACR/EULAR sınıflandırma kriterleri, klinik ve laboratuvar alanlarının ağırlıklandırılarak puanlandığı yeni bir sistem getirmiş ve 2006 kriterlerine kıyasla özgülüğü %86'dan %99'a yükseltmiştir; ancak bu artış duyarlılıkta bir miktar azalma pahasına sağlanmıştır (Barbhaiya et al., 2023). Bu kriterlerin öncelikle araştırmalarda homojen

hasta gruplarının tanımlanması amacıyla geliştirildiği ve bireysel hastada klinik tanının yerini almadığı unutulmamalıdır.

Antifosfolipid antikorlarının gebelik kaybına yol açma mekanizmaları yalnızca plasental tromboz ile sınırlı değildir. Bu antikorlar trofoblast yüzeyindeki $\beta 2$ glikoprotein I'e bağlanarak trofoblast proliferasyonunu ve invazyonunu bozar, kompleman aktivasyonunu tetikler ve desidual inflamasyonu artırır. APS tanısı alan ve tekrarlayan düşük öyküsü bulunan kadınlarda düşük doz aspirine heparin eklenmesinin canlı doğum oranını %42'den %71'e yükselttiği gösterilmiştir (Rai, Cohen, Dave, & Regan, 1997). Günümüzde düşük doz aspirin ve heparin kombinasyonu, obstetrik APS'nin tedavisinde temel yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Bender Atik et al., 2023).

3.2. Tiroid Otoimmünitesi

Tiroid peroksidaz (TPO) antikorlarının varlığı ile karakterize tiroid otoimmünitesi, üreme çağındaki kadınlarda en sık görülen otoimmün bozukluktur. Thangaratnam ve arkadaşlarının (2011) meta-analizi, ötiroid kadınlarda tiroid otoantikorlarının varlığının düşük riskinde belirgin, erken doğum riskinde ise yaklaşık iki katlık artışla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

Ancak bu ilişkinin nedensel olduğu ve tedaviyle düzeltilebildiği gösterilememiştir. İn vitro fertilizasyon (IVF) uygulanan, tiroid işlevleri normal olan ve TPO antikoru pozitif 600 kadını kapsayan randomize kontrollü çalışmada levotiroksin tedavisi düşük oranını (%10,3'e karşı %10,6) ve canlı doğum oranını (%31,7'ye karşı %32,3) değiştirmemiştir (Wang et al., 2017). Gebelik öncesinde TPO antikoru pozitif kadınlarda yürütülen çok merkezli TABLET çalışmasında da düşük doz levotiroksin canlı doğum oranında anlamlı iyileşme sağlamamıştır (Dhillon-Smith et al., 2019). Bu kanıtlar doğrultusunda Avrupa İnsan Üremesi ve Embriyoloji Derneği

(ESHRE), tiroid antikoru pozitif ötiroid kadınların tekrarlayan gebelik kaybı nedeniyle levotiroksin ile tedavi edilmemesini güçlü öneri olarak benimsemiştir (Bender Atik et al., 2023).

3.3. Kadında Antisperm Antikorları

Antisperm antikorları, kadında serum, servikal mukus ve foliküler sıvıda saptanabilir ve IgG, IgA ya da IgM sınıfında olabilir. Bu antikorlar spermin servikal mukustan geçişini engelleyebilir, kapasitasyon sürecini bozabilir, zona pellusidaya bağlanmayı ve penetrasyonu inhibe edebilir ve kompleman aracılı sperm hasarına yol açabilir. Antikoron etkisi, bağlandığı sperm bölgesine ve izotipine göre değişkenlik gösterir. Antisperm antikorlarının varlığında doğal konsepsiyon olasılığı azalırken, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu gibi yardımcı üreme teknikleri bu immünolojik engeli büyük ölçüde aşabilmektedir (Chamley & Clarke, 2007).

3.4. Endometriozis ve İmmün Disregülasyon

Endometriozis, endometriyuma benzer dokunun uterin kavite dışında yerleşmesiyle karakterize, östrojen bağımlı kronik inflamatuvar bir hastalıktır ve üreme çağındaki kadınların yaklaşık %10'unu etkiler. Retrograd menstrüasyon hastalığının başlangıcında önemli bir mekanizma olarak kabul edilse de retrograd menstrüasyon kadınların büyük çoğunluğunda görüldüğü hâlde yalnızca bir kısmında endometriozis gelişmesi, ektopik dokunun temizlenmesini engelleyen ek faktörlerin varlığına işaret etmektedir (Zondervan, Becker, & Missmer, 2020).

Bu faktörlerin başında immün disregülasyon gelir. Endometriozisli kadınlarda peritoneal makrofajların fagositik kapasitesi azalmış, anjiyogenezi ve doku onarımını destekleyen alternatif (M2) fenotipe kayma artmıştır. Peritoneal NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesi azalmış, peritoneal sıvıda interlökin (IL)-1 β , IL-6 ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi

proinflamatuar sitokinlerin düzeyleri yükselmiştir (Symons et al., 2018). Bu inflamatuvar mikroçevre; oosit kalitesini, tubal işlevi, sperm-oosit etkileşimini ve endometriyal reseptiviteyi olumsuz etkileyerek endometriozis ilişkili infertiliteye katkıda bulunur.

3.5. Kronik Endometrit

Kronik endometrit, endometriyal stromada plazma hücresi infiltrasyonu ile tanımlanan, çoğunlukla asemptomatik seyreden lokal bir inflamatuvar durumdur. Tanıda CD138 immünohistokimyasal boyaması ile stromal plazma hücrelerinin gösterilmesi ve histeroskopik bulgular kullanılır. Kronik endometrit, endometriyumdaki lökosit bileşimini ve sitokin ortamını değiştirerek desidualizasyonu ve implantasyonu bozabilir; açıklanamayan infertilite, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan gebelik kaybı yaşayan kadınlarda daha sık saptanmaktadır (Kitaya et al., 2016).

Açıklanamayan tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan kadınları içeren bir çalışmada kronik endometrit sık olarak saptanmış ve uygun antibiyotik tedavisiyle histolojik iyileşme sağlanan hastalarda sonraki IVF sikluslarında gebelik ve canlı doğum oranlarının belirgin biçimde arttığı bildirilmiştir (Cicinelli et al., 2015).

3.6. Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı ve Tekrarlayan Gebelik Kaybında İmmün Faktörler

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (TİB) ve tekrarlayan gebelik kaybı (TGK), immünolojik mekanizmaların en sık sorgulandığı klinik tablolardır. Bu hastalarda periferik veya uterin NK hücre sayısı ve aktivitesinin ölçülmesi yaygın olarak uygulanmış olsa da sistematik derlemeler, NK hücre parametrelerinin gebelik sonucunu öngörmedeki değerinin belirsiz olduğunu göstermiştir (Tang, Alfirevic, & Quenby, 2011). Bir başka meta-analiz de mevcut kanıtların NK hücre

değerlendirmesinin kadın infertilitesi veya tekrarlayan düşükte tanı aracı olarak kullanılmasını desteklemediğini ve immün tedavilerin yalnızca klinik araştırma kapsamında sunulması gerektiğini vurgulamıştır (Seshadri & Sunkara, 2014).

ESHRE'nin tekrarlayan implantasyon başarısızlığına ilişkin iyi uygulama önerileri, TİB'i hastanın beklenen kümülatif başarı şansına göre tanımlamakta ve kanıt düzeyi yetersiz olan immünolojik testlerin ve tedavilerin rutin klinik uygulamada kullanılmamasını önermektedir (Cimadomo et al., 2023). Benzer şekilde TGK kılavuzu da antifosfolipid antikolları ve tiroid değerlendirmesi dışında kalan immünolojik testlerin çoğunu rutin kullanım için önermemektedir (Bender Atik et al., 2023).

3.7. Otoimmün Primer Over Yetmezliği

Primer (erken) over yetmezliği (POY), 40 yaşından önce over işlevinin kaybı olarak tanımlanır ve olguların bir bölümünde otoimmün mekanizmalar sorumludur. Otoimmün POY; serumda over, adrenal korteks veya steroidogenik hücrelere karşı otoantikolların varlığı ve over dokusunda özellikle teka hücrelerini hedefleyen lenfositik ooforit ile karakterizedir. Otoimmün POY olgularının %60–80'inde adrenal otoimmünite eşlik etmektedir (Silva et al., 2014).

Otoimmün poliendokrin sendromlar, bu ilişkinin en belirgin örneğidir. Otoimmün regülatör (AIRE) genindeki mutasyonlardan kaynaklanan otoimmün poliendokrin sendrom tip 1'de timik toleransın bozulması sonucu birçok endokrin organa karşı otoimmünite gelişir ve kadın hastalarda over yetmezliği sık görülen bileşenlerden biridir (Husebye, Anderson, & Kämpe, 2018). 2024 tarihli uluslararası POY kılavuzu, nedeni bilinmeyen POY olgularında 21-hidroksilaz otoantikollarının taranmasını güçlü öneri olarak benimserken, anti-over otoantikollarının otoimmün POY tanısında kullanılmamasını önermektedir (Panay et al., 2024).

4. İMMÜNOLOJİK İNFERTİLİTEDE GENETİK FAKTÖRLER

Maternal-fetal arayüzdeki immün etkileşimler, hem anneden hem de fetüsten kaynaklanan genetik varyasyonlardan etkilenir. Bu bölümde, immünolojik infertilite ile ilişkisi en çok incelenen genetik sistemler ele alınmaktadır.

4.1. KIR–HLA-C Etkileşimi

Uterin NK hücreleri, trofoblast üzerindeki HLA-C moleküllerini öldürücü hücre immünoglobulin benzeri reseptörler (killer-cell immunoglobulin-like receptors, KIR) aracılığıyla tanır. KIR genleri yüksek derecede polimorfiktir ve iki ana haplotip grubunda toplanır: çoğunlukla inhibitör reseptörleri kodlayan A haplotipi ve değişken sayıda aktive edici reseptör içeren B haplotipi. HLA-C molekülleri ise KIR ile etkileşen epitoplarına göre HLA-C1 ve HLA-C2 olarak iki gruba ayrılır. Maternal KIR genotipi ile fetal HLA-C genotipinin kombinasyonu, uNK hücrelerinin trofoblasta verdiği yanıtın niteliğini belirler (Moffett & Shreeve, 2023).

Hiby ve arkadaşları (2004), KIR AA genotipine sahip annelerde fetüsün HLA-C2 taşıması durumunda preeklampsi riskinin arttığını göstermiştir. Aynı grup, tekrarlayan düşük yaşayan kadınlarda KIR ve ebeveyn HLA-C genotipleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymuş (Hiby et al., 2008), daha sonra ise aktive edici KIR2DS1 reseptörünün, fetal HLA-C2 aracılı üreme başarısızlıklarına karşı koruyucu olduğunu bildirmiştir (Hiby et al., 2010). Bu bulgular, uNK hücrelerinin güçlü inhibisyonunun trofoblast invazyonunu ve spiral arter dönüşümünü yetersiz bırakabileceğini, dolayısıyla “fazla tolerans”ın da “yetersiz tolerans” kadar sorunlu olabileceğini göstermektedir.

KIR–HLA-C modeli, genetik yatkınlığın iki bireyin genomları arasındaki etkileşimden kaynaklanabileceğini gösteren

en güçlü örnektir; ancak bu genotiplerin rutin klinik kullanımını destekleyen prospektif kanıtlar henüz yeterli değildir.

4.2. HLA-G ve Diğer HLA Polimorfizmleri

HLA-G geni, klasik HLA genlerine kıyasla sınırlı polimorfizm göstermekle birlikte, özellikle 3' çevrilmeyen bölgesindeki (3'UTR) varyantlar mRNA stabilitesini ve çözünür HLA-G düzeylerini etkileyebilmektedir. En çok incelenen varyant 14 baz çiftlik insersiyon/delesyon (ins/del) polimorfizmidir (Hviid, 2006). Fan, Li, Huang ve Chen (2014) tarafından yapılan meta-analizde bu polimorfizm ile tekrarlayan düşük arasında genel bir ilişki saptanmamış; ancak üç ve daha fazla düşük öyküsü olan alt grupta insersiyon alelinin riski artırdığı (OR = 1,27) bildirilmiştir.

Ebeveyn HLA alelleri ve partnerler arasındaki HLA paylaşımı da uzun süre tekrarlayan gebelik kaybının olası nedenleri arasında tartışılmıştır. Meuleman ve arkadaşlarının (2015) sistematik derleme ve meta-analizi, bazı HLA alelleri ve HLA paylaşımı ile tekrarlayan düşük arasında ilişki olabileceğine işaret etmekle birlikte, çalışmalar arasındaki heterojenitenin ve metodolojik sınırlılıkların kesin sonuca ulaşmayı engellediğini göstermiştir. Bu nedenle HLA tiplendirmesi, tekrarlayan gebelik kaybında rutin klinik uygulama için önerilmemektedir (Bender Atik et al., 2023).

4.3. Sitokin ve İmmünoregülatuar Gen Polimorfizmleri

Th1/Th2/Th17/Treg dengesinin gebelik başarısı üzerindeki belirleyici rolü (Saito et al., 2010), sitokin genlerindeki işlevsel polimorfizmlerin immünolojik infertiliteye yatkınlık oluşturabileceği hipotezini gündeme getirmiştir. TNF- α , IL-10, IL-6 ve interferon- γ genlerinin promotor bölgelerindeki, transkripsiyon düzeyini etkileyen tek nükleotid varyantları bu amaçla en sık incelenen varyantlardır. Ancak farklı etnik

gruplarda yürütülen çalışmalar tutarsız sonuçlar vermiş, bildirilen etki büyüklükleri çoğunlukla küçük kalmıştır. Bu nedenle sitokin polimorfizmi analizleri, tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda rutin olarak önerilmemektedir (Bender Atik et al., 2023).

4.4. Monogenik Otoimmünite ve Over İşlevi

Genetik faktörlerin immünolojik infertiliteye en belirgin katkısı, monogenik otoimmün sendromlarda görülür. AIRE geni, timusta periferik doku antijenlerinin eksprese edilmesini sağlayarak otoreaktif T hücrelerinin elenmesinde merkezi rol oynar. AIRE mutasyonlarında bu mekanizmanın bozulması, overdeki steroidogenik hücrelere karşı gelişen otoimmüniteye ve POY'a yol açar (Husebye et al., 2018).

5. İMMÜNOLOJİK İNFERTİLİTEDE EPIGENETİK FAKTÖRLER

Epigenetik mekanizmalar, DNA dizisinde değişiklik olmaksızın gen ekspresyonunu düzenleyen ve kalıtılabilir özellikler taşıyan süreçlerdir. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'lar; endometriyumun siklik yeniden yapılanmasında, desidualizasyonda ve immün hücrelerin farklılaşmasında merkezi roller üstlenir. Epigenetik düzenleme hormonal, metabolik ve çevresel uyaranlara duyarlı olduğundan, genetik yatkınlık ile çevresel etkiler arasında bir köprü işlevi görür (Liu, Huang, Mor, & Liao, 2020).

5.1. DNA Metilasyonu

Treg hücrelerinin kararlılığı, epigenetik düzenlemenin immünolojik tolerans üzerindeki etkisinin en iyi bilinen örneğidir. FOXP3 lokusundaki Treg'e özgü demetile bölge (Treg-specific demethylated region, TSDR) yalnızca kalıcı Treg hücrelerinde demetile durumdadır ve bu demetilasyon FOXP3 ekspresyonunun kararlı biçimde sürdürülmesi için gereklidir

(Floess et al., 2007). TSDR metilasyon durumu, gerçek Treg hücrelerini geçici olarak FOXP3 eksprese eden aktive konvansiyonel T hücrelerinden ayırt etmede kullanılabilen bir belirteçtir (Huehn, Polansky, & Hamann, 2009). Gebelikte Treg hücrelerinin sayısal artışı kadar işlevsel kararlılığının da önemli olduğu dikkate alındığında, bu epigenetik belirteçlerin immünolojik infertilitede potansiyel biyobelirteç değeri taşıdığı düşünülmektedir.

Endometriyal reseptivitede kritik rol oynayan HOXA10 geni, epigenetik düzenlemenin endometriyum üzerindeki etkisini gösteren bir diğer önemli örnektir. Endometriozisli kadınların endometriyumunda HOXA10 promotor bölgesinde anormal hipermetilasyon saptanmış ve bu değişikliğin gen ekspresyonundaki azalmadan sorumlu olabileceği gösterilmiştir (Wu et al., 2005). Endometriozisin kronik inflamatuvar mikroçevresi ile ötopik endometriyumdaki epigenetik değişiklikler arasındaki bu ilişki, endometriozis ilişkili infertilitede implantasyon başarısızlığını açıklayan mekanizmalardan biri olarak kabul edilmektedir.

5.2. Histon Modifikasyonları

Desidualizasyon, stromal hücrelerde binlerce genin ekspresyonunun yeniden programlandığı kapsamlı bir transkripsiyonel dönüşümdür (Gellersen & Brosens, 2014). Bu dönüşümde histon modifikasyonları belirleyici rol oynar. Desidualizasyon sırasında histon metiltransferaz EZH2'nin ekspresyonu azalır ve desidualizasyonla ilişkili genlerin promotor bölgelerinde baskılayıcı H3K27me3 ile aktive edici H3K27ac işaretleri arasında karşılıklı değişimler meydana gelir. Histon deasetilaz (HDAC) aktivitesinin değiştirilmesi ise hücre dışı matriks yeniden yapılanmasını ve embriyo invazyonunu etkiler (Liu et al., 2020). Tekrarlayan gebelik kaybında gözlenen endometriyal plastisite kaybı ve stromal senesens (Lucas et al.,

2016), bu yeniden programlama kapasitesinin azalmasıyla uyumludur.

5.3. Kodlamayan RNA'lar

Mikro RNA'lar (miRNA), hedef mRNA'ların translasyonunu baskılayarak veya yıkımını hızlandırarak gen ekspresyonunu transkripsiyon sonrası düzeyde düzenleyen küçük kodlamayan RNA'lardır. Reseptif ve reseptif olmayan endometriumun karşılaştırıldığı çalışmada reseptif fazda miR-30b ve miR-30d düzeylerinin arttığı, miR-494 ve miR-923 düzeylerinin ise azaldığı gösterilmiş; bu miRNA'ların hedef genlerinin transkripsiyon, hücre proliferasyonu ve apoptoz ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Altmäe et al., 2013).

miRNA'lar aynı zamanda immün hücrelerin farklılaşmasını, sitokin üretimini ve inflamatuvar sinyal yollarını düzenleyen önemli moleküllerdir. Uzun kodlamayan RNA'lar da desidualizasyon ve endometrial reseptivitenin düzenlenmesinde rol oynayan epigenetik düzenleyiciler arasında tanımlanmaktadır (Liu et al., 2020).

5.4. Genetik, Epigenetik ve İmmün Etkileşimlere Bütüncül Bakış

İmmünolojik infertilite tek bir nedene bağlanamaz: maternal ve fetal genotipler (örneğin KIR ve HLA-C kombinasyonları) arayüzdeki immün yanıtın başlangıç koşullarını belirlerken, epigenetik düzenleme bu yanıtı hormonal, inflamatuvar ve çevresel uyaranlara göre şekillendirir; endometriozis, kronik endometrit veya sistemik otoimmünite gibi edinsel durumlar ise dengeyi ikincil olarak bozar. Bu bütüncül model, aynı immünolojik bulgunun farklı hastalarda neden farklı klinik sonuçlara yol açtığını açıklamaya yardımcı olmaktadır.

6. TANI VE TEDAVİDE KANITA DAYALI YAKLAŞIM

6.1. Tanısal Değerlendirme

İmmünolojik infertilitenin değerlendirilmesinde temel ilke, kanıta dayalı olarak klinik önemi gösterilmiş testlerin seçici biçimde kullanılmasıdır. Güncel kılavuzlar doğrultusunda klinik uygulamada öne çıkan değerlendirmeler şunlardır:

- Tekrarlayan gebelik kaybında antifosfolipid antikorlarının (lupus antikoagülanı, antikardiyolipin ve anti- $\beta 2$ glikoprotein I antikorları) araştırılması (Bender Atik et al., 2023; Miyakis et al., 2006),
- Tiroid işlevlerinin ve TPO antikorlarının değerlendirilmesi (Bender Atik et al., 2023),
- Açıklanamayan tekrarlayan implantasyon başarısızlığında kronik endometritin histolojik ve histeroskopik olarak araştırılması (Cicinelli et al., 2015; Kitaya et al., 2016),
- Nedeni bilinmeyen POY olgularında 21-hidroksilaz otoantikorlarının taranması (Panay et al., 2024).

Buna karşılık periferik kan NK hücre sayısı ve aktivitesi, sitokin düzeyleri veya polimorfizmleri ve HLA tiplendirmesi gibi testlerin rutin klinik değerlendirmede kullanımı güncel kanıtlarla desteklenmemektedir (Bender Atik et al., 2023; Cimadomo et al., 2023; Seshadri & Sunkara, 2014). KIR–HLA-C genotipleme ve epigenetik belirteçler ise biyolojik açıdan umut verici olmakla birlikte, şu an için araştırma kapsamındaki araçlar olarak değerlendirilmelidir.

6.2. Tedavi Yaklaşımları

Obstetrik APS’de düşük doz aspirin ve heparin kombinasyonu, etkinliği randomize çalışmalarla gösterilmiş temel tedavidir (Rai et al., 1997). Ötiroid tiroid otoimmünitesinde

levotiroksin tedavisinin gebelik sonuçlarını iyileştirmedeği randomize kontrollü çalışmalarla gösterilmiştir (Dhillon-Smith et al., 2019; Wang et al., 2017). Kronik endometrit saptanan hastalarda antibiyotik tedavisi ile histolojik iyileşmenin sağlanması, sonraki IVF sikluslarında başarıyı artırabilmektedir (Cicinelli et al., 2015).

İntravenöz immünoglobulin (IVIG), intralipid, kortikosteroidler, granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ve TNF- α inhibitörleri gibi immünomodülatuar tedaviler, IVF ve tekrarlayan gebelik kaybında yaygın olarak kullanılmış olsa da sistematik değerlendirmeler bu tedavilerin canlı doğum oranını tutarlı biçimde artırdığını göstermemiştir. Achilli, Duran-Retamal, Saab, Serhal ve Seshadri (2018), immünoterapinin yalnızca araştırma kapsamında kullanılması ve rutin klinik uygulamada üreme sonuçlarını iyileştirmek amacıyla kullanılmaması gerektiği sonucuna varmıştır. ESHRE'nin 2022 güncellemesinde G-CSF'nin açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybında önerilmediği vurgulanmış; dört veya daha fazla açıklanamayan kaybı olan kadınlarda gebeliğin çok erken döneminde uygulanan tekrarlı ve yüksek doz IVIG'nin canlı doğum oranını artırabileceği ise düşük kanıt düzeyinde koşullu bir değerlendirme olarak yer almıştır (Bender Atik et al., 2023).

7. SONUÇ

Kadın infertilitesinde immünolojik faktörler, implantasyondan gebeliğin sürdürülmesine ve over işlevine kadar üremenin birçok basamağını etkileyen önemli, ancak karmaşık bir etiyolojik alanı temsil etmektedir. Maternal-fetal arayüz; uNK hücreleri, makrofajlar, Treg hücreleri ve desidual stromal hücrelerin trofoblastla dinamik etkileşimine dayanan aktif bir immünolojik organdır. Bu dengenin bozulması; antifosfolipid sendromu, tiroid otoimmünitesi, endometriozis, kronik

endometrit, otoimmün over yetmezliği ile tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ve gebelik kaybı gibi klinik tablolara yol açabilmektedir.

Genetik düzeyde KIR–HLA-C etkileşimi, HLA-G polimorfizmleri ve AIRE gibi merkezi tolerans genleri, immünolojik infertiliteye yatkınlığın kalıtsal temelini oluşturan başlıca sistemlerdir. Epigenetik düzeyde ise FOXP3 lokusunun metilasyon durumu, HOXA10 hipermetilasyonu, desidualizasyona eşlik eden histon modifikasyonları ve endometriyal miRNA profilleri, genetik yatkınlık ile çevresel ve hormonal etkiler arasındaki köprüyü oluşturmaktadır.

Klinik açıdan, antifosfolipid sendromu, kronik endometrit ve otoimmün over yetmezliği gibi tanımlanmış tablolarda kanıta dayalı tanı ve tedavi yaklaşımları mevcuttur. Buna karşın NK hücre testleri, sitokin ve HLA analizleri ile ampirik immünomodülatuar tedaviler, güncel kılavuzlarda rutin kullanım için önerilmemektedir. Gelecekte genetik ve epigenetik biyobelirteçlerin klinik verilerle bütünleştirilmesi, immünolojik infertilitesi olan kadınların daha doğru tanımlanmasını ve kişiselleştirilmiş, kanıta dayalı tedavi stratejilerinin geliştirilmesini mümkün kılacaktır.

KAYNAKÇA

- Achilli, C., Duran-Retamal, M., Saab, W., Serhal, P., & Seshadri, S. (2018). The role of immunotherapy in in vitro fertilization and recurrent pregnancy loss: A systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 110(6), 1089–1100.
- Altmäe, S., Martinez-Conejero, J. A., Esteban, F. J., Ruiz-Alonso, M., Stavreus-Evers, A., Horcajadas, J. A., & Salumets, A. (2013). MicroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 regulate human endometrial receptivity. *Reproductive Sciences*, 20(3), 308–317.
- Aluvihare, V. R., Kallikourdis, M., & Betz, A. G. (2004). Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature Immunology*, 5(3), 266–271.
- Barbhaiya, M., Zuily, S., Naden, R., Hendry, A., Manneville, F., Amigo, M. C., . . . Erkan, D. (2023). The 2023 ACR/EULAR antiphospholipid syndrome classification criteria. *Arthritis & Rheumatology*, 75(10), 1687–1702.
- Bender Atik, R., Christiansen, O. B., Elson, J., Kolte, A. M., Lewis, S., Middeldorp, S., . . . Goddijn, M. (2023). ESHRE guideline: Recurrent pregnancy loss: An update in 2022. *Human Reproduction Open*, 2023(1), hoad002.
- Carp, H. J. A., Selmi, C., & Shoenfeld, Y. (2012). The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *Journal of Autoimmunity*, 38(2–3), J266–J274.
- Chamley, L. W., & Clarke, G. N. (2007). Antisperm antibodies and conception. *Seminars in Immunopathology*, 29(2), 169–184.
- Cicinelli, E., Matteo, M., Tinelli, R., Lepera, A., Alfonso, R., Indraccolo, U., . . . Resta, L. (2015). Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure

and the IVF success rate after antibiotic therapy. *Human Reproduction*, 30(2), 323–330.

Cimadomo, D., de los Santos, M. J., Griesinger, G., Lainas, G., Le Clef, N., McLernon, D. J., . . . Macklon, N. (2023). ESHRE good practice recommendations on recurrent implantation failure. *Human Reproduction Open*, 2023(3), hoad023.

Dhillon-Smith, R. K., Middleton, L. J., Sunner, K. K., Cheed, V., Baker, K., Farrell-Carver, S., . . . Coomarasamy, A. (2019). Levothyroxine in women with thyroid peroxidase antibodies before conception. *New England Journal of Medicine*, 380(14), 1316–1325.

Erlebacher, A. (2013). Immunology of the maternal-fetal interface. *Annual Review of Immunology*, 31, 387–411.

Fan, W., Li, S., Huang, Z., & Chen, Q. (2014). Relationship between HLA-G polymorphism and susceptibility to recurrent miscarriage: A meta-analysis of non-family-based studies. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(2), 173–184.

Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., . . . Huehn, J. (2007). Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biology*, 5(2), e38.

Gellersen, B., & Brosens, J. J. (2014). Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocrine Reviews*, 35(6), 851–905.

Hiby, S. E., Apps, R., Sharkey, A. M., Farrell, L. E., Gardner, L., Mulder, A., . . . Moffett, A. (2010). Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 4102–4110.

- Hiby, S. E., Regan, L., Lo, W., Farrell, L., Carrington, M., & Moffett, A. (2008). Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Human Reproduction*, 23(4), 972–976.
- Hiby, S. E., Walker, J. J., O’Shaughnessy, K. M., Redman, C. W. G., Carrington, M., Trowsdale, J., & Moffett, A. (2004). Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *Journal of Experimental Medicine*, 200(8), 957–965.
- Huehn, J., Polansky, J. K., & Hamann, A. (2009). Epigenetic control of FOXP3 expression: The key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nature Reviews Immunology*, 9(2), 83–89.
- Husebye, E. S., Anderson, M. S., & Kämpe, O. (2018). Autoimmune polyendocrine syndromes. *New England Journal of Medicine*, 378(12), 1132–1141.
- Hviid, T. V. F. (2006). HLA-G in human reproduction: Aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Human Reproduction Update*, 12(3), 209–232.
- Kitaya, K., Matsubayashi, H., Yamaguchi, K., Nishiyama, R., Takaya, Y., Ishikawa, T., . . . Yamada, H. (2016). Chronic endometritis: Potential cause of infertility and obstetric and neonatal complications. *American Journal of Reproductive Immunology*, 75(1), 13–22.
- Liu, H., Huang, X., Mor, G., & Liao, A. (2020). Epigenetic modifications working in the decidualization and endometrial receptivity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(11), 2091–2101.

- Lucas, E. S., Dyer, N. P., Murakami, K., Lee, Y. H., Chan, Y.-W., Grimaldi, G., . . . Brosens, J. J. (2016). Loss of endometrial plasticity in recurrent pregnancy loss. *Stem Cells*, 34(2), 346–356.
- Meuleman, T., Lashley, L. E. E. L. O., Dekkers, O. M., van Lith, J. M. M., Claas, F. H. J., & Bloemenkamp, K. W. M. (2015). HLA associations and HLA sharing in recurrent miscarriage: A systematic review and meta-analysis. *Human Immunology*, 76(5), 362–373.
- Miyakis, S., Lockshin, M. D., Atsumi, T., Branch, D. W., Brey, R. L., Cervera, R., . . . Krilis, S. A. (2006). International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(2), 295–306.
- Moffett, A., & Colucci, F. (2014). Uterine NK cells: Active regulators at the maternal-fetal interface. *Journal of Clinical Investigation*, 124(5), 1872–1879.
- Moffett, A., & Shreeve, N. (2023). Local immune recognition of trophoblast in early human pregnancy: Controversies and questions. *Nature Reviews Immunology*, 23(4), 222–235.
- Mor, G., Aldo, P., & Alvero, A. B. (2017). The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nature Reviews Immunology*, 17(8), 469–482.
- Munn, D. H., Zhou, M., Attwood, J. T., Bondarev, I., Conway, S. J., Marshall, B., . . . Mellor, A. L. (1998). Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*, 281(5380), 1191–1193.
- Panay, N., Anderson, R. A., Bennie, A., Cedars, M., Davies, M., Ee, C., . . . Vincent, A. J. (2024). Evidence-based guideline: Premature ovarian insufficiency. *Human Reproduction Open*, 2024(4), hoae065.

- Rai, R., Cohen, H., Dave, M., & Regan, L. (1997). Randomised controlled trial of aspirin and aspirin plus heparin in pregnant women with recurrent miscarriage associated with phospholipid antibodies (or antiphospholipid antibodies). *BMJ*, 314(7076), 253–257.
- Robertson, S. A., Care, A. S., & Moldenhauer, L. M. (2018). Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. *Journal of Clinical Investigation*, 128(10), 4224–4235.
- Rouas-Freiss, N., Gonçalves, R. M.-B., Menier, C., Dausset, J., & Carosella, E. D. (1997). Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21), 11520–11525.
- Rowe, J. H., Ertelt, J. M., Xin, L., & Way, S. S. (2012). Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature*, 490(7418), 102–106.
- Saito, S., Nakashima, A., Shima, T., & Ito, M. (2010). Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63(6), 601–610.
- Seshadri, S., & Sunkara, S. K. (2014). Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 20(3), 429–438.
- Silva, C. A., Yamakami, L. Y. S., Aikawa, N. E., Araujo, D. B., Carvalho, J. F., & Bonfá, E. (2014). Autoimmune primary ovarian insufficiency. *Autoimmunity Reviews*, 13(4–5), 427–430.

- Symons, L. K., Miller, J. E., Kay, V. R., Marks, R. M., Liblik, K., Koti, M., & Tayade, C. (2018). The immunopathophysiology of endometriosis. *Trends in Molecular Medicine*, 24(9), 748–762.
- Tang, A. W., Alfirevic, Z., & Quenby, S. (2011). Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with recurrent miscarriage and infertility: A systematic review. *Human Reproduction*, 26(8), 1971–1980.
- Thangaratinam, S., Tan, A., Knox, E., Kilby, M. D., Franklyn, J., & Coomarasamy, A. (2011). Association between thyroid autoantibodies and miscarriage and preterm birth: Meta-analysis of evidence. *BMJ*, 342, d2616.
- Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*, 62, 2–10.
- Vento-Tormo, R., Efremova, M., Botting, R. A., Turco, M. Y., Vento-Tormo, M., Meyer, K. B., . . . Teichmann, S. A. (2018). Single-cell reconstruction of the early maternal–fetal interface in humans. *Nature*, 563(7731), 347–353.
- Wang, H., Gao, H., Chi, H., Zeng, L., Xiao, W., Wang, Y., . . . Qiao, J. (2017). Effect of levothyroxine on miscarriage among women with normal thyroid function and thyroid autoimmunity undergoing in vitro fertilization and embryo transfer: A randomized clinical trial. *JAMA*, 318(22), 2190–2198.
- Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L., & Mosmann, T. R. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: Is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology Today*, 14(7), 353–356.
- Wu, Y., Halverson, G., Basir, Z., Strawn, E., Yan, P., & Guo, S.-W. (2005). Aberrant methylation at HOXA10 may be

responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 193(2), 371–380.

Zondervan, K. T., Becker, C. M., & Missmer, S. A. (2020). Endometriosis. *New England Journal of Medicine*, 382(13), 1244–1256.

PATHOGENESIS OF MULTIPLE SCLEROSIS AND THE NEUROIMMUNOMODULATORY ROLE OF SCHISANDRIN B AS A THERAPEUTIC APPROACH¹

Mustafa ÇAKIR²

Ahmet EKEN³

Hamiyet D. ALTUNTAŞ⁴

1. INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, neuroinflammatory autoimmune disease of the central nervous system (CNS) characterized by demyelination and progressive neuroaxonal damage (Compston & Coles, 2008; Lassmann, 2018). Pathologically, MS is driven by an imbalance between pathogenic effector T cells (Th1/Th17) and regulatory T (Treg) cells, which disrupts immune self-tolerance and promotes CNS tissue injury (Korn et al., 2009; Fletcher et al., 2010). Although disease-modifying therapies reduce relapse rates, their potential adverse effects prompt the search for safer immunomodulatory compounds (Hauser & Cree, 2020). Schisandrin B (Sch-B), a dibenzocyclooctadiene lignan isolated from Schisandra

¹ Kitap bölümü 'Deneyisel multipl skleroz fare modelinde schisandrin b ve alantolakton'un İmmünomodülatör etkilerinin araştırılması' isimli doktora tezinden üretilmiştir.

² Dr. Öğr. Üyesi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, ORCID: 0000-0002-8861-5485

³ Doç. Dr., Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, ORCID: 0000-0002-5816-0686

⁴ Prof. Dr., Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, ORCID: 0000-0001-6473-5813

chinensis, has emerged as a promising candidate due to its antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective properties (Chun et al., 2014; Giridharan et al., 2015). Sch-B modulates T-cell polarization by suppressing Th1/Th17 effector responses while supporting Treg cell function, positioning it as a potential therapeutic agent in experimental autoimmune encephalomyelitis (Leong et al., 2016; Chen et al., 2017).

2. MULTIPLE SCLEROSIS: ETIOPATHOGENESIS, CLINICAL FEATURES, EPIDEMIOLOGY, AND THERAPEUTIC LANDSCAPE

MS is a chronic, unpredictable neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS), first identified in the 19th century (Murray, 2009). The etiopathogenesis of MS involves autoimmune-mediated neuroinflammation affecting both adaptive and innate immunity, leading to focal demyelination, reactive microglial and astrocyte activation, oxidative stress, and progressive axonal loss (Compston & Coles, 2008; Lassmann, 2014). MS represents one of the primary causes of non-traumatic neurological disability in young adults, with a substantial proportion of patients developing severe motor or cognitive impairments over time (Hauser, 2008).

Epidemiologically, MS affects millions of individuals globally, showing a marked female predominance and peak onset between 20 and 50 years of age (Pugliatti et al., 2002; Milo & Miller, 2014). The geographical distribution and prevalence of MS vary significantly by latitude and ethnicity, with higher rates observed in northern high-latitude regions (Simpson et al., 2011). Local epidemiological studies in Türkiye similarly demonstrate regional variations in prevalence across different provinces, including Istanbul, Edirne, and Karabük

(Alp & Boru, 2012; Boru et al., 2018). While numerous disease-modifying therapies (DMTs) have been developed to manage relapsing forms of MS, substantial challenges remain regarding their long-term safety, comparative efficacy, and ability to halt disease progression in progressive MS subtypes (Hauser et al., 2013; Ontaneda et al., 2015).

3. PATHOGENESIS AND IMMUNOPATHOGENESIS OF MULTIPLE SCLEROSIS

MS is an inflammatory and clinically and pathologically heterogeneous disease of the CNS characterized by axonal injury, myelin loss, and neurodegeneration (Trapp & Stys, 2009; Lucchinetti et al., 2000). Both adaptive and innate immune response components play important roles in its pathogenesis (Frohman et al., 2006; McFarland & Martin, 2007). During the pathological process, peripherally activated autoreactive Th1 and Th17 cells may affect BBB integrity and migrate into the CNS by secreting pro-inflammatory cytokines, including interleukin-2 (IL-2), interferon-gamma (IFN- γ), and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), as well as matrix metalloproteinases (MMPs). Once inside the CNS, autoreactive T cells are reactivated by antigen-presenting cells (APCs), including dendritic cells. This activation may promote the recruitment of B cells, myeloid cells, and natural killer (NK) cells to lesion sites, induce astrocyte and microglial activation, and trigger the release of neurotoxic mediators. In addition, CD8⁺ cytotoxic T cells, which recognize antigens presented by major histocompatibility complex class I (MHC-I) molecules, may directly contribute to damage affecting myelin, oligodendrocytes, and axons in perivascular regions and at lesion borders (Milo & Miller, 2014).

In addition to antibody production, B cells regulate T-cell responses through cytokine secretion and antigen presentation. Conversely, functionally impaired Treg cells may be insufficient to suppress inflammatory responses. Th2-polarized cells that secrete growth factors and anti-inflammatory cytokines, together with M2-polarized macrophages, may contribute to tissue repair and neuroprotection (Milo & Miller, 2014).

4. T HELPER (TH) CELL SUBSETS AND THEIR CHARACTERISTICS

CD4⁺ T helper (Th) cells coordinate immune responses by lineage differentiation driven by specific microenvironmental cytokines and master transcription factors (Annunziato et al., 2010; Zhu et al., 2010). Beyond classical subsets, distinct lineage-specific profiles mediate specialized physiological and pathogenic roles. Th2 cells, regulated by IL-4/STAT6 signaling and GATA3, produce IL-4, IL-5, and IL-13 to mediate anti-helminth immunity and allergic responses (Mosmann et al., 1986; Zhang et al., 1997). In contrast, Th9 cells differentiate under IL-4 and TGF- β via PU.1 and IRF4, secreting IL-9 to promote pro-inflammatory pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Dardalhon et al., 2008; Veldhoen et al., 2008). Th22 cells, induced by IL-6 and TNF- α via the aryl hydrocarbon receptor (AhR), secrete IL-22 independently of IL-17/IFN- γ to regulate tissue inflammation and skin homeostasis (Duhon et al., 2009; Trifari et al., 2009). Specialized regulatory CD4⁺ subsets also fine-tune immune responses without Foxp3 expression: Type 1 regulatory T (Tr1) cells produce IL-10 to suppress Th17-driven autoimmunity, while induced IL-35-producing regulatory T (iT₃₅) cells exert Foxp3-independent immunosuppression via IL-35 secretion in

models of EAE and chronic inflammation (Awasthi et al., 2007; Collison et al., 2010).

4.1. T Helper 1 (Th1) Cells and Their Pathogenic Roles

Th1 cells are pro-inflammatory lymphocytes crucial for host defense against intracellular pathogens but are implicated in autoimmune pathology when excessively activated. Their differentiation is driven by IL-12 signaling and governed by the master transcription factor T-bet (T-box expressed in T cells) (Hsieh et al., 1993; Szabo et al., 2000). T-bet promotes the expression of IFNG and IL12RB2, establishing a positive feed-forward loop via STAT1 and STAT4 pathways, while GATA3 acts as a reciprocal suppressor (Mullen et al., 2001; Usui et al., 2003). Th1 cells characteristically secrete interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and lymphotoxin. In multiple sclerosis (MS) and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), Th1 cells contribute to neuroinflammation by promoting blood-brain barrier disruption and microglial activation (Panitch et al., 1987; Merrill, 1992). Genetic ablation models targeting T-bet or STAT4 demonstrate attenuated EAE severity, underscoring the pathogenic contribution of Th1 signaling (Chitnis et al., 2001). However, the therapeutic impact of IFN- γ remains context-dependent, as it can exert homeostatic or anti-inflammatory effects under specific local microenvironmental conditions (Bettelli et al., 2004).

4.2. Regulatory T (Treg) Cells and Their Roles in EAE/MS

Regulatory T (Treg) cells, predominantly defined by the CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ phenotype, play a paramount role in maintaining peripheral self-tolerance and limiting autoimmune tissue damage (Sakaguchi et al., 1995; Fontenot et al., 2003).

They comprise thymic-derived natural Tregs (nTregs) and peripheral induced Tregs (iTregs) generated under TGF- β signaling (Chen et al., 2003). Loss-of-function mutations in FOXP3 lead to severe fatal systemic autoimmunity, such as IPEX syndrome in humans (Bennett et al., 2001). Tregs exert immunosuppression by suppressing antigen-presenting cells in draining lymph nodes and dampening effector T-cell responses in target tissues (Vignali et al., 2008). Furthermore, Tregs exhibit functional plasticity, co-opting lineage-specifying transcription factors like T-bet, IRF4, or STAT3 to selectively suppress Th1, Th2, or Th17 responses, respectively (Chaudhry et al., 2009; Koch et al., 2009). In EAE models, adoptive transfer of Tregs suppresses autoreactive T-cell expansion and mitigates clinical disease (Kohm et al., 2002). In MS patients, while peripheral Treg frequencies remain relatively stable, qualitative impairments in their suppressive capacity contribute to ongoing autoimmune neuroinflammation (Viglietta et al., 2004).

4.3. Developmental and Functional Balance Between Th17 and Treg Cells

Th17 cells, characterized by the production of IL-17A, IL-17F, and IL-22, drive tissue inflammation and autoimmune demyelination (Harrington et al., 2006; Liang et al., 2006). Naive CD4⁺ T-cell commitment to the Th17 lineage requires combined TGF- β and IL-6 signaling, which activates STAT3 to induce master transcription factors ROR γ t and ROR α (Bettelli et al., 2006a; Ivanov et al., 2006). Subsequent exposure to IL-23 stabilizes the Th17 phenotype, granting pathogenic potential in EAE (Langrish et al., 2005; McGeachy et al., 2009). A reciprocal developmental axis exists between Th17 and Treg lineages, dictated by the inflammatory cytokine milieu. High TGF- β concentrations favor Foxp3⁺ Treg differentiation, whereas the addition of pro-inflammatory IL-6 suppresses

Foxp3, driving cells toward the Th17 fate through direct physical and functional interactions between Foxp3 and ROR γ t (Zhou et al., 2008). Environmental factors such as all-trans retinoic acid (ATRA) enhance TGF- β -driven Foxp3 expression while suppressing ROR γ t, shifting the immunological balance away from pro-inflammatory Th17 responses toward protective Treg-mediated immune tolerance (Elias et al., 2008).

5. SCHISANDRIN B AND ITS NEUROINFLAMMATORY PROPERTIES

Schisandra chinensis, a member of the Magnoliaceae family widely used in traditional East Asian medicine and commonly known as schisandra or the five-flavor fruit, contains bioactive compounds with potential therapeutic applications ranging from neurological disorders to age-related functional decline (Liu, 1985). Schisandrin B (Sch-B; γ -schisandrin), a dibenzocyclooctadiene lignan, is one of the major constituents contributing to the pharmacological activities of this plant. Lignans of this structural class account for approximately 2% of the fruit's weight (Hikino et al., 1984). Experimental studies have reported anti-inflammatory, antioxidant, neuroprotective, and immunomodulatory effects of Sch-B (Fujihashi et al., 1995; Wang et al., 1994).

5.1. Antioxidant Mechanisms and Oxidative Stress Regulation

Sch-B preserves cellular redox homeostasis by augmenting glutathione (GSH) antioxidant systems and heat shock proteins (HSPs), while enhancing mitochondrial capacity to attenuate neurodegenerative oxidative damage (Lam & Ko, 2012; Leong et al., 2012). In acute oxidative stress models, Sch-B reduces lipid peroxidation markers such as malondialdehyde (MDA) and restores superoxide dismutase (SOD) activity (Jia et

al., 2017; Zhu et al., 2017). At the molecular level, Sch-B activates the Nrf2/HO-1 pathway while suppressing NF- κ B transcription (Jia et al., 2017). Furthermore, it attenuates reactive oxygen species (ROS) production by inhibiting NADPH oxidase (NOX4) activity and modulating downstream TGF- β 1/Smad signaling, thereby protecting tissues from inflammatory damage (Chiu et al., 2006; Zhang et al., 2017).

5.2. Neuroprotective Effects in the Central Nervous System

Owing to its low molecular weight and lipophilic structure, Sch-B readily crosses the blood–brain barrier (BBB) to exert direct actions within the central nervous system (Lee et al., 2012). In cognitive deficit models, Sch-B improves memory by inhibiting acetylcholinesterase (AChE) and protecting neurons against β -amyloid toxicity (Wang & Wang, 2009; Giridharan et al., 2011). In neuroinflammatory states, Sch-B suppresses TLR4 and IKK α / β –I κ B– α –NF- κ B signaling, resulting in reduced microglial release of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-6 (Zeng et al., 2012). Additionally, in middle cerebral artery occlusion (MCAO) rodent models, Sch-B reduces infarct volume by over 50%, downregulates MMP-2/9 expression, and mitigates microglial-mediated ischemic injury (Lee et al., 2012).

5.3. Immunomodulation and Regulatory Action on T-Cell Subsets

Sch-B functions as a potent immunomodulatory agent impacting both innate and adaptive immune responses. It inhibits mitogen- and anti-CD3/CD28-induced T-cell activation and proliferation by attenuating ERK, JNK, and p38 MAPK phosphorylation, thereby downregulating activation markers including CD25, CD69, CD54, and CD71 (Checker et al., 2012). Crucially, Sch-B rebalances lineage-specifying transcription

factors by downregulating T-bet (Th1) and ROR γ t (Th17) while upregulating Foxp3 (Treg) expression—an effect directly mediated via Nrf2/HO-1 activation and abrogated by HO-1 inhibitors SnPP/ZnPP (Chen et al., 2016). In systemic inflammatory models, such as DSS-induced colitis and endothelial activation assays, Sch-B limits clinical disease by inhibiting pro-inflammatory cytokine production (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-6) and vascular adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 (Liu et al., 2015; Lin et al., 2017).

5.4. Effects Of Schisandrin B On Multiple Sclerosis and Immune Cells

To investigate the effects of Sch-B during the early phase of immunization (the priming phase) in a mouse model of MS, leukocyte populations isolated from the inguinal lymph nodes (LNs) and spleen on day 7 after immunization were analyzed by flow cytometry. Analyses of the inguinal lymph nodes revealed that Sch-B treatment exerted a marked suppressive effect on the pathogenic Th17 response. Specifically, compared with the control group, Sch-B treatment significantly reduced the proportions of CD4⁺IL-17⁺GM-CSF⁻ T cells (0.27% versus 0.43%; $p = 0.007$) and CD4⁺IL-17⁺IFN- γ ⁻ T cells (0.22% versus 0.33%; $p = 0.016$) in the lymph nodes. Analysis of intracellular signaling pathways further revealed a significant reduction in the mean fluorescence intensity (MFI) of p-AKT1/2 in the Sch-B group compared with the control group ($p = 0.039$). In contrast, no significant between-group differences were observed in the proportions of CD4⁺IL-6⁺ or CD4⁺Foxp3⁺ T cells or in the MFI values of p-STAT3, p-Smad2/3, p-p38, or p-ERK1/2.

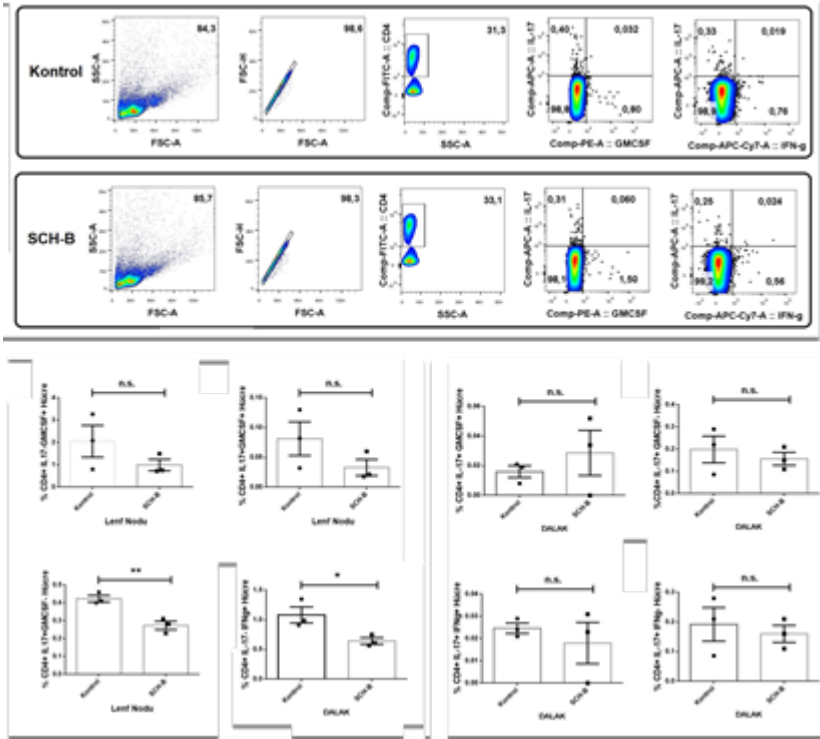


Figure 1. Characterization of T-cell subsets in the inguinal lymph nodes and spleen during the priming phase of the mouse model of MS. Flow cytometry analysis showing the gating strategy and representative dot plots of CD4⁺ T cells expressing IL-17, GM-CSF, and IFN- γ in the control and Sch-B-treated groups. Bar graphs show the percentages of helper T-cell subsets isolated from inguinal lymph nodes and spleen tissue samples. Compared with the control group, Sch-B treatment reduced the frequencies of CD4⁺IL-17⁺GM-CSF⁻ cells in the inguinal lymph nodes and CD4⁺IL-17⁺IFN- γ ⁺ cells in the spleen.

Analyses of the spleen, a secondary lymphoid organ, indicated that Sch-B also modulated effector T-cell responses. Assessment of splenic leukocytes showed that Sch-B treatment significantly reduced the proportion of CD4⁺IL-17⁺IFN- γ ⁺ (Th1) cells compared with the control group (0.64% versus 1.09%; $p = 0.039$). In addition, the MFI of p-ERK1/2 was significantly

higher in the Sch-B group than in the control group ($p = 0.005$). However, no significant changes were observed in the expression of other cytokines in $CD4^+$ T cells (IL-17, GM-CSF, IL-10, and IL-22), the proportion of $Foxp3^+$ regulatory T (Treg) cells, or the MFI values of the signaling molecules p-STAT3, p-Smad2/3, p-p38, and p-AKT1/2. Taken together, these findings suggest that Sch-B may modulate immunopathogenesis during the early phase of immunization in the MS model, primarily by suppressing the Th17 response in the draining lymph nodes and the Th1 response in the spleen.

6. CONCLUSION

In conclusion, Sch-B has the potential to influence mechanisms involved in the pathogenesis of multiple sclerosis through its antioxidant, anti-inflammatory, and immunomodulatory properties. Experimental findings suggest that Sch-B may modulate neuroinflammation by suppressing Th17 and Th1 cell responses. However, the available evidence is largely based on experimental studies, and safety data in humans remain limited. Therefore, further preclinical and clinical studies are needed to determine the potential role of Sch-B in MS treatment.

REFERENCE

- Alp, R., & Boru, U. T. (2012). The prevalence of multiple sclerosis in the North Caucasus region of Turkey: Door-to-door epidemiological field study. *Nöropsikiyatri Arşivi*, 49(4), 272–275. doi:10.4274/npa.y6300
- Annunziato, F., Cosmi, L., & Romagnani, S. (2010). Human and murine Th17. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(2), 114–119. doi:10.1097/COH.0b013e32833647c2
- Aasthi, A., Carrier, Y., Peron, J. P. S., Bettelli, E., Kamanaka, M., Flavell, R. A., ... Weiner, H. L. (2007). A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nature Immunology*, 8(12), 1380–1389. doi:10.1038/ni1541
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., ... Ochs, H. D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics*, 27(1), 20–21. doi:10.1038/83713
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., ... Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090), 235–238. doi:10.1038/nature04753
- Bettelli, E., Sullivan, B., Szabo, S. J., Sobel, R. A., Glimcher, L. H., & Kuchroo, V. K. (2004). Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine*, 200(1), 79–87. doi:10.1084/jem.20031819
- Boru, U. T., Bilgic, A. B., Koseoglu Toksoy, C., Yilmaz, A. Y., Tasdemir, M., Sensoz, N. P., ... Boluk, C. (2018).

- Prevalence of multiple sclerosis in a Turkish city bordering an iron and steel factory. *Journal of Clinical Neurology*, 14(2), 234–241. doi:10.3988/jcn.2018.14.2.234
- Çelik, Y., Birgili, Ö., & Kıyat, A. (2011). Prevalence of multiple sclerosis in the metropolitan area of Edirne city, Turkey. *Balkan Medical Journal*, 28(2), 193–196. doi:10.5174/tutfd.2010.04089.0
- Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R. M., Liang, Y., Kas, A., & Rudensky, A. Y. (2009). CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science*, 326(5955), 986–991. doi:10.1126/science.1172702
- Checker, R., Patwardhan, R. S., Sharma, D., Menon, J., Thoh, M., Bhilwade, H. N., ... Sandur, S. K. (2012). Schisandrin B exhibits anti-inflammatory activity through modulation of the redox-sensitive transcription factors Nrf2 and NF-kappaB. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(7), 1421–1430. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.006
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., ... Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine*, 198(12), 1875–1886. doi:10.1084/jem.20030152
- Chen, Z., Guo, M., Song, G., Gao, J., Zhang, Y., Jing, Z., ... Dong, C. (2016). Schisandrin B inhibits Th1/Th17 differentiation and promotes regulatory T cell expansion in mouse lymphocytes. *International Immunopharmacology*, 35, 257–264. doi:10.1016/j.intimp.2016.03.037

- Chitnis, T., Najafian, N., Benou, C., Salama, A. D., Grusby, M. J., Sayegh, M. H., & Khoury, S. J. (2001). Effect of targeted disruption of STAT4 and STAT6 on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(5), 739–747. doi:10.1172/JCI12563
- Chiu, P. Y., Leung, H. Y., Poon, M. K., Mak, D. H., & Ko, K. M. (2006). Effects of schisandrin B enantiomers on cellular glutathione and menadione toxicity in AML12 hepatocytes. *Pharmacology*, 77(2), 63–70. doi:10.1159/000092773
- Collison, L. W., Chaturvedi, V., Henderson, A. L., Giacomini, P. R., Guy, C., Bankoti, J., ... Vignali, D. A. A. (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nature Immunology*, 11(12), 1093–1101. doi:10.1038/ni.1952
- Compston, A., & Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *The Lancet*, 372(9648), 1502–1517. doi:10.1016/S0140-6736(08)61620-7
- Drdalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R. A., ... Kuchroo, V. K. (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nature Immunology*, 9(12), 1347–1355. doi:10.1038/ni.1677
- Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*, 15(9), 545–558. doi:10.1038/nri3871
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing

- memory T cells. *Nature Immunology*, 10(8), 857–863.
doi:10.1038/ni.1767
- Elias, K. M., Laurence, A., Davidson, T. S., Stephens, G., Kanno, Y., Shevach, E. M., & O'Shea, J. J. (2008). Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. *Blood*, 111(3), 1013–1020.
doi:10.1182/blood-2007-06-096438
- Fletcher, J. M., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Tubridy, N., & Mills, K. H. (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical & Experimental Immunology*, 162(1), 1–11.
doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04143.x
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 4(4), 330–336.
doi:10.1038/ni904
- Frohman, E. M., Racke, M. K., & Raine, C. S. (2006). Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *The New England Journal of Medicine*, 354(9), 942–955.
doi:10.1056/NEJMra052130
- Fujihashi, T., Hara, H., Sakata, T., Mori, K., Higuchi, H., Tanaka, A., ... Kaji, A. (1995). Anti-human immunodeficiency virus (HIV) activities of halogenated gomisins J derivatives, new nonnucleoside inhibitors of HIV type 1 reverse transcriptase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(9), 2000–2007.
doi:10.1128/aac.39.9.2000
- Giridharan, V. V., Thandavarayan, R. A., Sato, S., Ko, K. M., & Konishi, T. (2011). Prevention of scopolamine-induced memory deficits by schisandrin B, an antioxidant lignan

- from Schisandra chinensis in mice. Free Radical Research, 45(8), 950–958. doi:10.3109/10715762.2011.571682
- Harrington, L. E., Mangan, P. R., & Weaver, C. T. (2006). Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. Current Opinion in Immunology, 18(3), 349–356. doi:10.1016/j.coi.2006.03.017
- Hauser, S. L., & Cree, B. A. C. (2020). Treatment of multiple sclerosis: A review. The American Journal of Medicine, 133(12), 1380–1390. doi:10.1016/j.amjmed.2020.05.049
- Hikino, H., Kiso, Y., Taguchi, H., & Ikeya, Y. (1984). Antihepatotoxic actions of lignoids from Schizandra chinensis fruits. Planta Medica, 50(3), 213–218. doi:10.1055/s-2007-969689
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., & Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. Science, 260(5107), 547–549. doi:10.1126/science.8097338
- Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., ... Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. Cell, 126(6), 1121–1133. doi:10.1016/j.cell.2006.07.035
- Jia, R., Zhang, H., Yang, Z., Zhao, H., Liu, F., Wang, H., & Liu, Y. (2017). Protective effects of Schisandrin B on cigarette smoke-induced airway injury in mice through Nrf2 pathway. International Immunopharmacology, 53, 11–16. doi:10.1016/j.intimp.2017.09.030

- Kingwell, E., Marriott, J. J., Jette, N., Pringsheim, T., Makhani, N., Morrow, S. A., ... Marrie, R. A. (2013). Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurology*, 13, 128. doi:10.1186/1471-2377-13-128
- Koch, M. A., Tucker-Heard, G., Perdue, N. R., Killebrew, J. R., Urdahl, K. B., & Campbell, D. J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nature Immunology*, 10(6), 595–602. doi:10.1038/ni.1731
- Kohm, A. P., Carpentier, P. A., Anger, H. A., & Miller, S. D. (2002). Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 169(9), 4712–4716. doi:10.4049/jimmunol.169.9.4712
- Lam, P. Y., & Ko, K. M. (2012). Schisandrin B as a hormetic agent for preventing age-related neurodegenerative diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 250825. doi:10.1155/2012/250825
- Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., ... Cua, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 201(2), 233–240. doi:10.1084/jem.20041257
- Lassmann, H. (2018). Pathogenic mechanisms associated with different clinical forms of multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 14(11), 671–680. doi:10.1038/s41582-018-0087-z

- Lee, T. H., Jung, C. H., & Lee, D. H. (2012). Neuroprotective effects of Schisandrin B against transient focal cerebral ischemia in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*, 50(12), 4239–4245. doi:10.1016/j.fct.2012.08.047
- Leong, P. K., Chen, N., & Ko, K. M. (2012). Mitochondrial decay in ageing: 'Qi-invigorating' schisandrin B as a hormetic agent for mitigating age-related diseases. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 39(3), 256–264. doi:10.1111/j.1440-1681.2011.05600.x
- Liang, S. C., Tan, X. Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., & Fouser, L. A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *Journal of Experimental Medicine*, 203(10), 2271–2279. doi:10.1084/jem.20061308
- Liu, G. T. (1985). Hepato-pharmacology of Fructus schisandrae. In H. M. Chang (Ed.), *Advances in Chinese Medicinal Materials Research* (pp. 257–268). World Scientific Publishing Co.
- Liu, W., Liu, Y., Wang, Z., Yu, T., Lu, Q., & Chen, H. (2015). Suppression of MAPK and NF-kappa B pathways by schisandrin B contributes to attenuation of DSS-induced mice model of inflammatory bowel disease. *Die Pharmazie*, 70(9), 598–603.
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., & Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of Neurology*, 47(6), 707–717.

- Luk, K. F., Ko, K. M., & Ng, K. M. (2008). Separation and purification of schisandrin B from Fructus schisandrae. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47(12), 4193–4201. doi:10.1021/ie071317b
- McGeachy, M. J., Chen, Y., Tato, C. M., Laurence, A., Joyce-Shaikh, B., Blumenschein, W. M., ... Cua, D. J. (2009). The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nature Immunology*, 10(3), 314–324. doi:10.1038/ni.1698
- Merrill, J. E. (1992). Proinflammatory and antiinflammatory cytokines in multiple sclerosis and central nervous system acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of Immunotherapy*, 12(3), 167–170. doi:10.1097/00002371-199210000-00004
- Mosmann, T. R., Schumacher, J. H., Street, N. F., Budd, R., O'Garra, A., Fong, T. A., ... Fiorentino, D. F. (1991). Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4⁺ T cells. *Immunological Reviews*, 123, 209–229. doi:10.1111/j.1600-065x.1991.tb00612.x
- Mullen, A. C., High, F. A., Hutchins, A. S., Lee, H. W., Villarino, A. V., Livingston, D. M., & Reiner, S. L. (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science*, 292(5523), 1907–1910. doi:10.1126/science.1059835
- Panitch, H. S., Hirsch, R. L., Haley, A. S., & Johnson, K. P. (1987). Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *The Lancet*, 329(8538), 893–895. doi:10.1016/s0140-6736(87)92863-7
- Pugliatti, M., Sotgiu, S., & Rosati, G. (2002). The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clinical Neurology and*

- Neurosurgery, 104(3), 182–191. doi:10.1016/s0303-8467(02)00036-Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology*, 155(3), 1151–1164.
- Simpson, S., Jr., Blizzard, L., Otahal, P., Van der Mei, I., & Taylor, B. (2011). Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 82(10), 1132–1141. doi:10.1136/jnnp.2011.240432
- Song, M. Y., Wang, J. H., Eom, T., & Kim, H. (2015). Schisandra chinensis fruit modulates the gut microbiota composition in association with metabolic markers in obese women: a randomized, double-blind placebo-controlled study. *Nutrition Research*, 35(8), 655–663. doi:10.1016/j.nutres.2015.05.001
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X. K., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100(6), 655–669. doi:10.1016/s0092-8674(00)80702-3
- Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K., & Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T-H-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature Immunology*, 10(8), 864–871. doi:10.1038/ni.1770
- Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A., & Strober, W. (2003). GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-

- 12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity*, 18(3), 415–428. doi:10.1016/s1074-7613(03)00057-8
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., ... Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature Immunology*, 9(12), 1341–1346. doi:10.1038/ni.1659
- Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L., & Hafler, D. A. (2004). Loss of functional suppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*, 199(7), 971–979. doi:10.1084/jem.20031579
- Vignali, D. A., Collison, L. W., & Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology*, 8(7), 523–532. doi:10.1038/nri2343
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., ... Baneke, P. (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Multiple Sclerosis Journal*, 26(14), 1816–1821. doi:10.1177/1352458520970841
- Wang, B., & Wang, X. M. (2009). Schisandrin B protects rat cortical neurons against Abeta1-42-induced neurotoxicity. *Die Pharmazie*, 64(7), 450–454.
- Wang, J. P., Raung, S. L., Hsu, M. F., & Chen, C. C. (1994). Inhibition by gomisins C (a lignan from *Schizandra chinensis*) of the respiratory burst of rat neutrophils. *British Journal of Pharmacology*, 113(3), 945–953. doi:10.1111/j.1476-5381.1994.tb17084.x
- Wu, Y. F., Cao, M. F., Gao, Y. P., Chen, F., Wang, T., Zumbika, E. P., & Qian, K. X. (2004). Down-modulation of heat

- shock protein 70 and up-modulation of Caspase-3 during schisandrin B-induced apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells. *World Journal of Gastroenterology*, 10(20), 2944–2948. doi:10.3748/wjg.v10.i20.2944
- Zeng, K. W., Zhang, T., Fu, H., Liu, G. X., & Wang, X. M. (2012). Schisandrin B exerts anti-neuroinflammatory activity by inhibiting the Toll-like receptor 4-dependent MyD88/IKK/NF-kappaB signaling pathway in lipopolysaccharide-induced microglia. *European Journal of Pharmacology*, 692(1-3), 29–37. doi:10.1016/j.ejphar.2012.05.030
- Zhang, D., Liu, B., Cao, B., Wei, F., Yu, X., Li, G. F., & Wang, P. L. (2017). Synergistic protection of Schizandrin B and Glycyrrhizic acid against bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting TGF-beta 1/Smad2 pathways and overexpression of NOX4. *International Immunopharmacology*, 48, 67–75. doi:10.1016/j.intimp.2017.04.024
- Zhang, D. H., Cohn, L., Ray, P., Bottomly, K., & Ray, A. (1997). Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *Journal of Biological Chemistry*, 272(34), 21597–21603. doi:10.1074/jbc.272.34.21597
- Zhang, Y., Zhao, J., Zhou, S. F., Yu, Z. L., Wang, X. Y., Zhu, P. L., & Ko, K. M. (2017). Biochemical mechanism underlying hypertriglyceridemia and hepatic steatosis/hepatomegaly induced by acute schisandrin B treatment in mice. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), 8. doi:10.1186/s12944-017-0406-9
- Zhou, L., Lopes, J E., Chong, M. M., Ivanov, I. I., Min, R., Victora, G. D., ... Littman, D. R. (2008). TGF-beta-

induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ function. *Nature*, 453(7192), 236–240. doi:10.1038/nature06878

Zhu, J., & Paul, W. E. (2010). Peripheral CD4⁺ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunological Reviews*, 238(1), 247–262. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00951.x

Zhu, N., Cai, C., Zhou, A., Zhao, X., Xiang, Y., & Zeng, C. (2017). Schisandrin B prevents hind limb from ischemia-reperfusion-induced oxidative stress and inflammation via MAPK/NF-kappaB pathways in rats. *BioMed Research International*, 2017, 4237973. doi:10.1155/2017/4237973

KİMERİK ANTİJEN RESEPTÖRLERİNİN YAPISI MEKANİZMASI VE KLİNİK UYGULAMALARI

Mustafa SOYÖZ¹

1. GİRİŞ

Kimerik antijen reseptörleri (chimeric antigen receptor, CAR), bağışıklık hücrelerine belirli bir hedef antijeni tanıma yeteneği kazandıran sentetik reseptörlerdir. Klinik uygulamada en yaygın kullanılan platform CAR-T hücreleridir; NK hücreleri ve makrofajlar gibi diğer efektör hücreler de araştırılmaktadır. Klasik CAR-T tasarımında antijen bağlayan hücre dışı bölge, T hücresini aktive eden hücre içi sinyal bölgeleriyle birleştirilir. Böylece hedef hücre yüzeyindeki antijen, majör doku uyumluluk kompleksi (MHC) aracılı peptit sunumu gerekmez. Bu özellik, CAR aracılı tanımayı klasik T hücre reseptörü (TCR) aracılı tanımadan ayırır (Lee ve ark., 2025; Kong ve ark., 2025).

CAR-T hücreleri infüzyondan sonra çoğalabildikleri ve bazı hastalarda uzun süre varlıklarını koruyabildikleri için “canlı ilaç” olarak tanımlanır. Ancak hücresel kalıcılık ve tedavi yanıtının süresi; reseptör tasarımına, hücre ürününün özelliklerine, hastalık yüküne ve konak koşullarına bağlıdır. Bu nedenle antijenin varlığı tek başına sürekli etkinlik veya nüksün önlenmesini garanti etmez (Lee ve ark., 2025).

¹ Prof. Dr., İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, ORCID: 0000-0001-5159-6463.

CAR yaklaşımının temeli, Gross, Waks ve Eshhar'ın antikor kaynaklı tanıma bölgelerini TCR bileşenleriyle birleştirdiği öncü çalışmaya dayanır (Gross ve ark., 1989). Tisagenlecleucel ve axicabtagene ciloleucel'in 2017 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanması, CAR-T tedavisinin klinik kullanımında önemli bir aşama olmuştur. İzleyen çalışmalar, seçilmiş hematolojik malignitelerde uzun süreli remisyon elde edilebildiğini göstermiştir. Solid tümörler ve kanser dışı hastalıklardaki uygulamalar ise farklı düzeylerde deneysel ve klinik araştırma aşamasındadır (Thirumalaisamy ve ark., 2025; Wu ve ark., 2025).

Bu bölümde CAR moleküllerinin yapısı ve sinyal mekanizmaları, hücre mühendisliği ve üretim süreçleri, onaylı klinik kullanım alanları ve tedavinin sınırlılıkları ele alınmaktadır. Klinik örnekler üzerinden etkinliğe ilişkin kanıtlar değerlendirilmekte ve araştırılmakta olan yeni platformlar tartışılmaktadır.

2. TEMEL MEKANİZMA VE YAPI

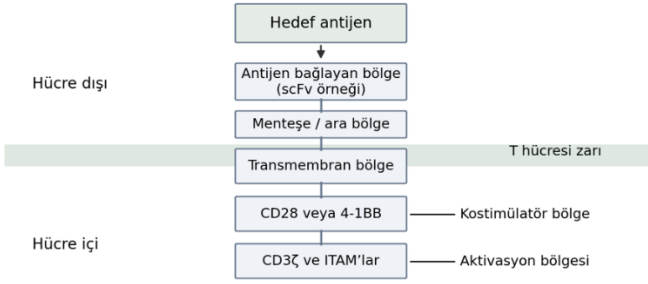
2.1. Moleküler Yapı

Klasik bir CAR-T reseptörü dört temel bileşenden oluşur: antijen bağlayan hücre dışı bölge, menteşe veya ara bölge, transmembran bölge ve hücre içi sinyal bölgesi. Antijen bağlayan bölüm sıklıkla bir monoklonal antikordan türetilen tek zincirli değişken parçadır (single-chain variable fragment, scFv). Bu yapı, antikoron ağır ve hafif zincir değişken bölgelerinin esnek bir bağlantı peptidiyle birleştirilmesiyle oluşturulur. Bununla birlikte, tüm CAR tasarımları scFv içermez; farklı bağlanma modülleri de kullanılabilir (Lee ve ark., 2025).

Menteşe bölgesinin uzunluğu ve bileşimi, hedef epitopa erişimi ve hücreler arası temasın geometrisini etkiler. CD8α veya

CD28 gibi moleküllerden türetilen transmembran bölge reseptörü hücre zarına sabitler. Hücre içi bölümdeki CD3 ζ , immünoresseptör tirozin temelli aktivasyon motifleri (ITAM) aracılığıyla aktivasyon sinyalini iletir. Kostimülatör bölgeler ise bu sinyalin gücünü ve hücrenin işlevsel özelliklerini düzenler (Akilandeswari ve Pradeep, 2026).

Klasik ikinci nesil bir CAR-T reseptörünün bileşenleri Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. İkinci nesil bir CAR-T reseptörünün moleküler organizasyonu. Hücre içi sinyal bölgesi bir kostimülatör bölge ile CD3 ζ içerir; şema ölçekli değildir (Lee ve ark., 2025).

2.2. CAR Nesilleri

CAR-T tasarımları, hücre içi sinyal bileşenleri ve ek işlevleri açısından nesiller halinde sınıflandırılır. Birinci nesil tasarımlarda genellikle yalnızca CD3 ζ sinyal bölgesi bulunur. Bu hücrelerin çoğalma ve kalıcılık kapasitesinin sınırlı olması, kostimülasyon içeren tasarımların geliştirilmesini sağlamıştır. İkinci nesil CAR’lar CD3 ζ ’ya ek olarak tek bir kostimülatör bölge, çoğunlukla CD28 veya 4-1BB (CD137), içerir. Üçüncü nesil tasarımlarda iki kostimülatör bölge birlikte kullanılır; ancak daha fazla sinyal bileşeni eklenmesi klinik üstünlüğün otomatik olarak sağlandığı anlamına gelmez (Akilandeswari ve Pradeep, 2026; Lee ve ark., 2025).

CD28 ve 4-1BB tabanlı tasarımlar aktivasyon kinetiği, metabolizma ve kalıcılık açısından farklı özellikler gösterebilir. CD28 daha hızlı efektör yanıtla, 4-1BB ise bazı modellerde daha uzun kalıcılıkla ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, farklı ürünler arasındaki klinik sonuçlar yalnızca kostimülatör bölgeye bağlanamaz; ürün bileşimi ve hasta özellikleri de dikkate alınmalıdır (Lee ve ark., 2025).

Dördüncü nesil tasarımlar, ek işlev kazandırılmış CAR-T hücrelerini kapsayan bir terimdir. TRUCK (T cells redirected for universal cytokine-mediated killing) yaklaşımı, özellikle CAR aktivasyonuna bağlı sitokin üretimiyle tümör mikroçevresini etkilemeyi amaçlar. Kemokin reseptörü eklenmesi gibi her mühendislik değişikliği doğrudan TRUCK olarak adlandırılmamalıdır (Yang ve ark., 2025). Beşinci nesil olarak tanımlanan bazı tasarımlarda ise IL-2 reseptörü β zincirinden türetilen hücre içi bölüm ve STAT3 bağlanmasını sağlayan YXXQ motifi gibi bileşenlerle, antijen uyarısına bağlı JAK–STAT sinyali eklenmiştir. Bunlar DNA düzeyindeki transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri değil, reseptörün hücre içi protein motifleridir (Kagoya ve ark., 2018) (Tablo 1).

Tablo 1. CAR-T nesillerinin temel sinyal bileşenleri ve amaçlanan işlevleri. (Akilandeswari ve Pradeep, 2026; Kagoya ve ark., 2018; Yang ve ark., 2025).

Nesil	Hücre içi bileşenler ve ek işlev	Temel amaç veya özellik
1	Genellikle yalnızca CD3 ζ	Sınırlı çoğalma ve kalıcılık
2	CD3 ζ + tek kostimülatör bölge	Onaylı klasik CAR-T tasarımlarının temeli
3	CD3 ζ + iki kostimülatör bölge	Kostimülasyonu artırma; üstünlük tasarımı bağlı
4	Ek işlev kazandırılmış CAR-T; TRUCK örneğinde uyarıya bağlı sitokin üretimi	Mikroçevreyi etkileme ve efektör işlevi destekleme
5	CD3 ζ ve kostimülasyona ek IL-2R β bölümü ve STAT bağlanma motifleri	Antijene bağlı JAK–STAT sinyalini ekleme

2.3. Antijen Tanıma ve Efektör İşlevler

CAR-T hücresinin hedef antijenle etkileşimi, hücreler arası immünolojik sinaps oluşumunu ve reseptörün kümelenmesini destekler. Lck gibi Src ailesi kinazları CD3ζ üzerindeki ITAM'ları fosforile eder; ardından ZAP-70 aracılı sinyal iletimi, aşağı akım kinazları ve transkripsiyon faktörlerini etkinleştirir. PI3K–AKT ve MAPK–ERK yolları ile NF-κB ve NFAT gibi transkripsiyon faktörleri çoğalma, sitokin üretimi ve efektör işlevlerin düzenlenmesine katkıda bulunur. Hedef hücre ölümü perforin ve granzimlerin salınmasıyla veya ölüm reseptörü yollarıyla gerçekleşebilir. Bu açıklama klasik CAR-T sinyalleşmesini temel alır; diğer CAR efektör hücrelerinde kullanılan sinyal bileşenleri farklılaşabilir (Lee ve ark., 2025; Jassaud ve ark., 2026).

3. CAR HÜCRELERİNİN MÜHENDİSLİĞİ VE ÜRETİMİ

3.1. Otolog Üretim Süreci

ABD’de FDA onaylı CAR-T ürünleri otolog T hücrelerinden üretilir. Süreç, hastadan lökaferez yoluyla hücre toplanmasıyla başlar. T hücreleri ayrıştırılır, anti-CD3/anti-CD28 temelli yöntemlerle veya ürüne özgü diğer uyaranlarla aktive edilir ve CAR’ı kodlayan gen hücrelere aktarılır. Modifiye edilmiş hücreler kontrollü koşullarda çoğaltılır; kimlik, saflık, canlılık, sterilité ve biyolojik etkinlik gibi ürün özellikleri test edilir. Uygun ürün, infüzyona kadar genellikle kriyoprezervasyonla saklanır (Diorio ve ark., 2025; FDA, 2026).

İnfüzyon öncesinde sıklıkla fludarabin ve siklofosfamid içeren lenfodeplezyon uygulanır. Lökaferéz ile infüzyon arasındaki toplam süre, hücre kültürünün süresinden daha uzundur; taşıma, kalite kontrol ve klinik hazırlık basamaklarını da

içerir. Bu aralıkta hastalık kontrolü için köprüleme tedavisi gerekebilir. Otolog üretimde gecikme, üretim başarısızlığı, önceden alınan tedavilerin T hücre kalitesini etkilemesi ve her hastaya ayrı ürün hazırlanması başlıca sınırlılıklardır (Lee ve ark., 2025; Thirumalaisamy ve ark., 2025).

3.2. Gen Aktarım Teknolojileri

CAR geninin aktarımında lentiviral ve gamaretroviral vektörler klinik deneyimi en geniş yöntemler arasındadır. Bu sistemler genoma entegrasyon yoluyla uzun süreli ekspresyon sağlayabilir. Ancak entegrasyonun yeri, olası genotoksisite ve üretim maliyeti dikkate alınmalıdır. Viral olmayan yöntemler de risksiz değildir: Sleeping Beauty ve piggyBac gibi transpozon sistemleri genomik entegrasyon gerçekleştirir; bu nedenle entegrasyon bölgesi ve klonal davranışın izlenmesi gerekir (Xiao ve ark., 2025).

CRISPR/Cas9 aracılı hedefli yerleştirme, CAR geninin TRAC gibi belirli bir lokusa aktarılmasını sağlayabilir. Bu yaklaşımda gen düzenleme ve donör DNA'nın hücreye taşınması ayrı basamaklardır; viral veya viral olmayan taşıma araçları kullanılabildiği için CRISPR/Cas9 başlı başına bir aktarım vektörü olarak görülmemelidir. mRNA elektroporasyonu geçici CAR ekspresyonu sağlar ve aktarılan mRNA genomla bütünleşmez. Lipid nanopartiküller (LNP) ve virüs benzeri partiküller (VLP) ise farklı nükleik asit veya protein yüklerinin taşınmasına yönelik platformlardır. Bunların etkinliği, ekspresyon süresi ve güvenliği taşıdıkları yüke ve tasarımlarına bağlıdır. Özellikle in vivo hücre mühendisliği için hedef hücre seçiciliği ve dağılımın kontrolü araştırılmaktadır (Xiao ve ark., 2025).

Tablo 2. CAR mühendisliğinde gen aktarımı ve hedefli gen düzenleme platformlarının karşılaştırılması (Xiao ve ark., 2025).

Platform	Yaklaşım	Başlıca avantaj	Başlıca sınırlılık
Lentiviral vektör	Viral aktarım	Uzun süreli ekspresyon; geniş klinik deneyim	Entegrasyonla ilişkili genotoksisite; üretim maliyeti
Gamaretroviral vektör	Viral aktarım	Kalıcı ekspresyon; klinik deneyim	Aktif hücre bölünmesine bağımlılık; entegrasyon riski
Sleeping Beauty / piggyBac	Transpozon aracılı aktarım	Büyük gen yükleri; viral vektör üretimi gerektirmemesi	Genomik entegrasyon ve klonal davranışın izlenmesi
CRISPR/Cas9 ile knock-in	Hedefli gen düzenleme	Belirli lokusa yerleştirme ve daha kontrollü ekspresyon	Ayrı bir taşıma aracı gerekir; hedef dışı değişiklik ve yeniden düzenlenme riski
mRNA elektroporasyonu	Viral olmayan aktarım	Geçici ekspresyon; aktarılan mRNA genomla bütünleşmez	Kısa ekspresyon süresi; yeniden uygulama gerekebilir
Lipid nanopartiküller	Nükleik asit taşıma platformu	In vivo mühendisliğe elverişlilik; ölçeklenme potansiyeli	Hücre seçiciliği, dağılım ve güvenilirlik optimizasyonu
Virüs benzeri partiküller	Viral yapı temelli taşıma platformu	Replikasyon yapmadan protein veya nükleik asit taşıma	Yük ve tasarıma bağlı etkinlik; standardizasyon ve immünojenite

3.3. Allojeneik ve Evrensel CAR-T Platformları

Allojeneik platformlar, sağlıklı vericilerden elde edilen hücrelerle önceden üretilen ve birden fazla hastada kullanılabilecek ürünler geliştirmeyi amaçlar. Başlıca immünolojik engeller, verici T hücrelerinin endojen TCR aracılığıyla konak dokularına saldırması sonucu gelişen graft-versus-host hastalığı (GvHD) ve alıcının bağışıklık sisteminin verici hücrelerini reddetmesidir (Diorio ve ark., 2025).

TRAC gibi TCR genlerinin devre dışı bırakılması GvHD riskini azaltmayı hedefler. B2M veya CIITA gibi genlerin düzenlenmesi ise HLA aracılı tanınmayı azaltılabilir; ancak HLA sınıf I kaybı, NK hücrelerinin “missing-self” yanıtını artırabileceğinden tek başına rejeksiyonu çözmez. Bu nedenle ilave bağışıklıktan kaçınma stratejileri ve farklı hücre kaynakları araştırılmaktadır. CRISPR/Cas9 ve TALEN gibi araçlarla geliştirilen ürünler klinik çalışmalarda değerlendirilirken, baz düzenleme ve diğer yeni yöntemlerin olgunluk düzeyi platforma göre değişmektedir. UCART19 ve UCART123 gibi erken klinik örneklerin sonuçları, allojeneik ürünlerin tümü için kanıtlanmış etkinlik olarak genellenmemelidir (Jiang ve ark., 2025; Diorio ve ark., 2025).

4. KLİNİK KULLANIM VE GÜVENLİLİK

4.1. Onaylı Hematolojik Kullanım Alanları

CD19 hedefli CAR-T ürünleri, ürüne özgü yaş ve önceki tedavi koşulları altında B hücreli akut lenfoblastik lösemi (B-ALL), büyük B hücreli lenfoma, foliküler lenfoma, mantle hücreli lenfoma ve bazı diğer B hücreli malignitelerde kullanılmaktadır. B hücre olgunlaşma antijenini (BCMA) hedefleyen idecabtagene vicleucel ve ciltacabtagene autoleucel ise nüks veya refrakter multipl miyelomda onaylıdır (Tablo 3). Bu hastalıkların her biri, listelenen bütün ürünler için ortak bir endikasyon değildir (Thirumalaisamy ve ark., 2025; FDA, 2026).

Tablo 3. FDA onaylı CAR-T ürünleri ve kullanım alanlarının özeti. (FDA, 2026; FDA, 2024a).

İlk onay	Ürün	Hedef	Onaylı kullanım alanlarının özeti
2017	Tisagenlecleucel (Kymriah)	CD19	≤25 yaş B-ALL; erişkin büyük B hücreli ve foliküler lenfoma
2017	Axicabtagene ciloleucel (Yescarta)	CD19	Erişkin büyük B hücreli ve foliküler lenfoma
2020	Brexucabtagene autoleucel (Tecartus)	CD19	Erişkin mantle hücreli lenfoma ve B-ALL
2021	Lisocabtagene maraleucel (Breyanzi)	CD19	Erişkin büyük B hücreli, foliküler, mantle ve marjinal zon lenfoma; KLL/SLL
2021	Idecabtagene vicleucel (Abecma)	BCMA	Nüks/refrakter erişkin multipl miyelom; en az iki önceki basamak sonrası
2022	Ciltacabtagene autoleucel (Carvykti)	BCMA	Lenalidomide refrakter erişkin multipl miyelom; en az bir önceki basamak sonrası
2024	Obecabtagene autoleucel (Aucatzyl)	CD19	Nüks/refrakter erişkin B hücre öncüllü ALL

KLL: kronik lenfositik lösemi; SLL: küçük lenfositik lenfoma.

4.2. Toksisiteler ve Yönetim İlkeleri

Sitokin salınım sendromu (cytokine release syndrome, CRS), ateşle başlayan ve ağır olgularda hipotansiyon ile hipoksiye ilerleyebilen sistemik bir inflamatuvar tablodur. Başlama zamanı ve görülme sıklığı ürüne, hastalığa ve tümör yüküne göre değiştiği için bütün CAR-T tedavileri için tek bir oran veya sabit zaman aralığı verilmesi uygun değildir. İmmün efektör hücre ilişkili nörotoksisite sendromu (ICANS) ise dikkat ve dil bozukluğu, bilinç değişikliği, nöbet veya ağır nörolojik bulgularla ortaya çıkabilir; CRS ile veya ayrı olarak gelişebilir. Enfeksiyon ve sepsis gibi alternatif nedenlerin değerlendirilmesi gerekir (Dimitrov ve ark., 2026).

CRS ve ICANS'ın yönetimi birbirinden ayrılmalıdır. CRS'de destek tedavisine ek olarak şiddete ve ürünün yönetim algoritmasına göre IL-6 reseptörünü bloke eden tosilizumab ve gerektiğinde kortikosteroidler kullanılır. İzole ICANS'ta tosilizumabın etkinliği gösterilmemiştir; tedavi gerektiren olgularda kortikosteroidler ve nörolojik destek ön plandadır. ICANS'a CRS eşlik ediyorsa tosilizumab CRS için uygulanabilir (Santomasso ve ark., 2021). Daha nadir görülen immün efektör hücre ilişkili hemofagositik lenfositik sendrom (IEC-HS), ağır CRS'den ayrı değerlendirilmesi gereken bir hiperinflamasyon tablosudur. Yönetiminde kortikosteroidler ve anakinra gibi yaklaşımlar uzman değerlendirmesiyle kullanılabilir (Hines ve ark., 2023).

Güvenlilik değerlendirmesi erken inflamatuvar toksisitelerle sınırlı değildir. Uzamış sitopeniler, enfeksiyonlar, B hücre aplazisi ve hipogammaglobulinemi de izlenmelidir (Santomasso ve ark., 2021). Ayrıca CAR-T tedavisi sonrasında bildirilen ikincil T hücreli maligniteler nedeniyle uzun dönem izlem gereklidir; bu olayların tümü doğrudan vektör entegrasyonuna bağlanamaz (FDA, 2024b). Ciltacabtagene autoleucel için immün efektör hücre ilişkili enterokolit de güncel ürün uyarıları arasında yer almaktadır (FDA, 2026).

4.3. Solid Tümörler ve Akut Miyeloid Lösemide Araştırmalar

Solid tümörlerde CAR-T etkinliğini sınırlayan başlıca etkenler, hedef antijenin heterojen dağılımı, hücrelerin tümöre yeterince ulaşamaması ve immün baskılayıcı mikroçevredir. Hedef antijenin sağlıklı dokularda da bulunması, hedefe bağlı tümör dışı toksisite riskini artırır. HER2 hedefli yaklaşımlar ile gastrointestinal tümörlerdeki hücresel tedavi çalışmaları bu sorunları aşmayı amaçlamaktadır; ancak farklı kanser türleri ve

ürünler için elde edilen sonuçlar birbirine genellenmemelidir (Zhu ve ark., 2025; Sayed ve ark., 2025).

Akut miyeloid lösemi (AML), solid tümör değil hematolojik bir malignitedir. AML’de önemli bir güçlük, hedef antijenlerin normal hematopoietik hücrelerde de bulunabilmesi ve bunun miyelotoksisiteye yol açabilmesidir. Bu nedenle antijen seçimi, tedavinin kontrol edilebilirliği ve hematopoietik kök hücre nakliyle ilişkisi birlikte ele alınmaktadır (Liu ve ark., 2025).

5. KLİNİK ÇALIŞMA ÖRNEKLERİ

5.1. Tisagenlecleucel ve ELIANA

CD19 hedefli, 4-1BB kostimülasyonu içeren tisagenlecleucel, pediatrik ve genç erişkin B-ALL tedavisinde kullanılan ikinci nesil bir CAR-T ürünüdür. Faz II ELIANA çalışmasının üç yıllık güncellemesinde, infüzyon uygulanan 79 hasta medyan 38,8 ay izlenmiştir. İlk üç ay içindeki genel remisyon oranı %82; üç yıllık genel sağkalım %63 ve olaysız sağkalım %44 olarak bildirilmiştir. Bu bulgular, bazı hastalarda uzun süreli hastalık kontrolünü destekler; başlangıç remisyon oranı kalıcı kür oranı olarak yorumlanmamalıdır (Laetsch ve ark., 2023).

5.2. Axicabtagene Ciloleucel ve ZUMA Çalışmaları

CD19 hedefli, CD28 kostimülasyonu içeren axicabtagene ciloleucel’in ZUMA-1 güvenlik yönetimi kohortu 6’da profilaktik kortikosteroid ve erken toksisite müdahalesiyle birlikte kullanımı değerlendirilmiştir. Kırk hastalık bu kohortun medyan 26,9 aylık izleminde objektif yanıt oranı %95 ve tam yanıt oranı %80 bulunmuş; veri kesiminde hastaların %45’inde yanıt sürmüştür. Bunlar ZUMA-1’in bütün kohortlarına ait ortak sonuçlar değildir ve randomize bir kortikosteroid karşılaştırması olarak yorumlanamaz (Oluwole ve ark., 2024).

Faz I/II ZUMA-6 çalışmasında axicabtagene ciloleucel ile atezolizumab kombinasyonu incelenmiştir. Medyan 56,9 aylık izlemde değerlendirilen popülasyonda tam yanıt oranı %54'tür. Çalışma, atezolizumab eklenmesinin CAR-T hücre genişlemesini veya etkinliğini belirgin biçimde artırdığını göstermemiştir. (Jacobson ve ark., 2026).

5.3. Ciltacabtagene Autoleucel ve CARTITUDE Çalışmaları

BCMA hedefli ciltacabtagene autoleucel, lenalidomide refrakter ve daha önce bir ile üç basamak tedavi almış hastalarda randomize faz III CARTITUDE-4 çalışmasında standart tedaviyle karşılaştırılmıştır. İlk analizde progresyon veya ölüm riski cilta-cel kolunda daha düşük bulunmuş (tehlike oranı 0,26); 12 aylık progresyonsuz sağkalım %75,9'a karşı %48,6 olarak bildirilmiştir. Bu veriler, uygun hastalarda tedavinin daha erken basamaklarda kullanılmasını desteklemiştir (San-Miguel ve ark., 2023).

Alman kayıt sistemine dayanan ayrı bir gerçek yaşam analizinde 606 hasta değerlendirilmiştir. Bir ile üç önceki tedavi basamağı alan grupta genel yanıt %91 ve tam yanıt %63; üçten fazla basamak alan grupta ise sırasıyla %88 ve %54 bulunmuştur. On iki aylık progresyonsuz sağkalım oranları %79 ve %70'tir. Bu gözlemsel bulgular randomize CARTITUDE-4 sonuçlarından ayrı ele alınmalıdır; tedavi grupları arasındaki farklar doğrudan erken tedavinin nedensel üstünlüğü olarak yorumlanamaz (Gagelmann ve ark., 2026).

5.4. Idecabtagene Vicleucel ve Erken Basamak Araştırmaları

BCMA hedefli ideoabtagene vicleucel, iki ile dört önceki tedavi basamağı almış nüks veya refrakter multipl miyelom hastalarında randomize faz III KarMMa-3 çalışmasında standart rejimlerle karşılaştırılmıştır. Medyan 18,6 aylık izlemde

progresyonsuz sağkalım ide-cel kolunda 13,3 ay, standart tedavi kolunda 4,4 ay; genel yanıt oranları ise sırasıyla %71 ve %42 bulunmuştur (Rodriguez-Otero ve ark., 2023).

ASH 2025 toplantısındaki bulguları özetleyen güncel bir yazı, ileri yaş alt grupları ve yeni tanı multipl miyelomda araştırılan CAR-T platformlarına ilişkin sonuçları bir araya getirmektedir (Geng ve ark., 2026). Ancak farklı ürün, hasta grubu ve analiz popülasyonlarından elde edilen yüksek yanıt oranları birlikte değerlendirilerek tek bir tedavinin etkinliği gibi sunulmamalıdır. Yeni tanı hastalardaki erken faz bulguları, birinci basamak kullanımın bütün hastalar için standart olduğu anlamına gelmez. Bu çalışmaların karşılaştırılmasında hastalık türü, önceki tedaviler, çalışma tasarımı, analiz popülasyonu ve izlem süresi dikkate alınmalıdır.

6. GELECEK YÖNELİMLERİ

Solid tümörlerde hücrelerin işlevini artırmak için sitokin üreten “zırhlanmış” CAR-T hücreleri, inhibitör sinyallere direnç kazandıran reseptörler ve tümöre göçü destekleyen kemokin reseptörleri geliştirilmektedir. Sentetik Notch (synNotch) gibi düzenekler, belirli bir antijenin tanınmasını başka bir reseptörün veya efektör programın ekspresyonuna bağlayabilir. Metabolik mühendislik ise hipoksi ve besin kısıtlılığı altında hücresel işlevi korumayı amaçlar. Bu stratejilerin çoğu önklilik veya erken klinik aşamadır ve artmış etkinlik kadar kontrolsüz inflamasyon ile sağlıklı doku hasarı riski de değerlendirilmelidir (Yang ve ark., 2025).

NK hücreleri ve makrofajlar, T hücrelerinden farklı biyolojik özellikleri nedeniyle CAR mühendisliği için alternatif kaynaklardır. İnvariant NKT ve $\gamma\delta$ T hücreleri ise doğuştan bağışıklık benzeri özellikler taşıyan T hücre alt gruplarıdır; bütün

bu hücrelerin doğrudan aynı “doğuştan bağışıklık hücresi” sınıfına yerleştirilmesi uygun değildir (Jassaud ve ark., 2026).

CAR-NK platformları, allojenik kullanıma elverişlilik ve bazı erken çalışmalarda görülen düşük inflamatuvar toksisite nedeniyle ilgi çekmektedir. Kord kanından üretilen CD19 hedefli CAR-NK hücrelerinin değerlendirildiği 11 hastalık faz I/II çalışmada sekiz hasta yanıt vermiş; CRS, nörotoksisite ve GvHD gözlenmemiştir (Liu ve ark., 2020). Bununla birlikte, bu küçük kohort bütün CAR-NK ürünlerinin toksisitesiz veya eşit ölçüde etkin olduğunu göstermez. Kord kanı ve indüklenmiş pluripotent kök hücre (iPSC) kaynaklı ürünlerde kalıcılık, tekrarlanan doz gereksinimi ve üretim standardizasyonu araştırılmaktadır (Cochran ve ark., 2025).

Allojeneik ve in vivo üretim yaklaşımlarının klinik değerinin belirlenmesi, hızlı erişimin yanında hücre kalıcılığı, rejeksiyon, ürün tutarlılığı ve uzun dönem güvenliliğin gösterilmesini gerektirir (Diorio ve ark., 2025; Xiao ve ark., 2025). Kemoterapiyle kombinasyonlar, lenfodeplezyon ve köprüleme tedavilerinden farklı olarak doğrudan antitümör etkileşimi güçlendirmek amacıyla da araştırılmaktadır. Ancak kombinasyonun zamanlaması ve T hücreleri üzerindeki olası baskılayıcı etkileri dikkate alınmalıdır (Ward ve ark., 2025). İmmün kontrol noktası inhibitörlerinin eklenmesinin yararı da ürün ve hastalık özelinde gösterilmelidir (Jacobson ve ark., 2026).

CD19 hedefli CAR-T hücreleri, sistemik lupus eritematozus, inflamatuvar miyozit ve sistemik skleroz gibi dirençli otoimmün hastalıklarda erken klinik çalışmalarda değerlendirilmiştir. On beş hastalık bir seride klinik iyileşme ve immünosupresif tedavilerin kesilebilmesi bildirilmiştir; ancak uzun dönem güvenlilik ve karşılaştırmalı etkinlik için daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır (Müller ve ark., 2024; Caël ve ark., 2025).

CAR-Treg hücreleri antijene yönelik immün baskılama ve tolerans oluşturmaya, kimerik otoantikor reseptörlü T hücreleri (chimeric autoantibody receptor T cells, CAAR-T) ise yüzeylerinde hastalıkla ilişkili otoantijenleri tanıyan B hücre reseptörlerini taşıyan hücreleri seçici olarak hedeflemeyi amaçlar. (Wu ve ark., 2025; Kong ve ark., 2025).

7. SONUÇ

CAR-T hücre tedavileri, belirli hematolojik malignitelerde klinik etkinliği gösterilmiş bir tedavi seçeneğidir. Bununla birlikte, maliyet ve üretim süreci erişimi sınırlar; antijen kaçışı, hücresel işlev kaybı ve toksisiteler kalıcı hastalık kontrolünü etkiler. Solid tümörler ile kanser dışı hastalıklara genişleme, yeni mühendislik yaklaşımlarının ve uygun klinik çalışma tasarımlarının birlikte geliştirilmesini gerektirir. Alanın geleceği, daha karmaşık reseptörlerin üretilmesinden çok, etkinlik, güvenlik ve erişilebilirliğin klinik olarak birlikte gösterilmesine bağlıdır (Stewart ve ark., 2025).

KAYNAKÇA

- Akilandeswari P, Pradeep BV. (2026). Prospect of chimeric antigen receptor T-cell therapy for cancer. *Mol Biol Rep*, 53, 141. <https://doi.org/10.1007/s11033-025-11316-2>
- Caël B, Bôle-Richard E, Garnache Ottou F, Aubin F. (2025). Chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy: Recent updates and challenges in autoimmune diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 155(3), 688–700. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2024.12.1066>
- Cochran HC, Ghobadi KA, Ghobadi A. (2025). Chimeric antigen receptor natural killer (CAR-NK) cells: from preclinical promise to clinical reality in cancer immunotherapy. *Immunotherapy*.17(15):1115-1127. <https://doi.org/10.1080/1750743X.2025.2582464>
- Dimitrov K, Merkle F, Dimitrov M, Merkle S, Hoover A, Bachanova V. (2026). Major Adverse Events With Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: Presentation, Diagnosis, and Resuscitation. *Ann Emerg Med*, 87(2), 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2025.07.005>
- Diorio C, Teachey DT, Grupp SA. (2025). Allogeneic chimeric antigen receptor cell therapies for cancer: progress made and remaining roadblocks. *Nat Rev Clin Oncol*. 22(1):10-27. <https://doi.org/10.1038/s41571-024-00959-y>
- FDA. (2024a). FDA approves obecabtagene autoleucel for adults with relapsed or refractory B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. 8 Kasım 2024. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-obecabtagene-autoleucel-adults-relapsed-or-refractory-b-cell-precursor-acute>

- FDA. (2024b). FDA Requires Boxed Warning for T cell Malignancies Following Treatment with BCMA-Directed or CD19-Directed Autologous Chimeric Antigen Receptor (CAR) T cell Immunotherapies. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/fda-requires-boxed-warning-t-cell-malignancies-following-treatment-bcma-directed-or-cd19-directed>
- FDA. (2026). Approved Cellular and Gene Therapy Products ve ilgili CAR-T ürün bilgileri. Erişim tarihi: 5 Ekim 2026. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products>
- Gagelmann N, Einsele H, Flossdorf S, ve ark. (2026). Standard-of-care ciltacabtagene autoleucel in earlier versus later lines of therapy for relapsed or refractory multiple myeloma: a nationwide registry analysis. J Hematol Oncol, 19, 46. <https://doi.org/10.1186/s13045-026-01806-6>
- Geng C, Chen W, Zhu HH. (2026). CAR-T therapy moving to first-line in multiple myeloma: latest updates from the 2025 ASH annual meeting. J Hematol Oncol, 19, 25. <https://doi.org/10.1186/s13045-026-01793-8>
- Gross G, Waks T, Eshhar Z. (1989). Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. Proc Natl Acad Sci USA, 86(24), 10024–10028. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.10024>
- Hines MR, Knight TE, McNerney KO, ve ark. (2023). Immune Effector Cell-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis-Like Syndrome. Transplant Cell

Ther, 29(7), 438.e1–438.e16.
<https://doi.org/10.1016/j.jtct.2023.03.006>

Jacobson CA, Westin JR, Miklos DB, ve ark. (2026). Axicabtagene Ciloleucel in Combination with Atezolizumab in Patients with Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma: The Phase 1/2 ZUMA-6 Trial. Clin Cancer Res. 32(5):894-904. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-25-0602>

Jassaud M, Ziane-Chaouche L, Duhamel M, Salzet M. (2026). Innate immune cells in chimeric antigen receptor therapy. Mol Ther, 34(1), 97–116.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2025.10.003>

Jiang N, Yang Z, Miao H, Xing S, Wang S, Li N. (2025). Recent advances in universal chimeric antigen receptor T cell therapy. J Hematol Oncol. 18(1):82.
<https://doi.org/10.1186/s13045-025-01737-8>

Kagoya Y, Tanaka S, Guo T, ve ark. (2018). A novel chimeric antigen receptor containing a JAK–STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. Nat Med, 24, 352–359. <https://doi.org/10.1038/nm.4478>

Kong Y, Li J, Zhao X, Wu Y, Chen L. (2025). CAR-T cell therapy: developments, challenges and expanded applications from cancer to autoimmunity. Front Immunol. 15:1519671.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1519671>

Laetsch TW, Maude SL, Rives S, ve ark. (2023). Three-Year Update of Tisagenlecleucel in Pediatric and Young Adult Patients With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia in the ELIANA Trial. J Clin Oncol, 41(9), 1664–1669. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.00642>

- Lee MJ, Cichocki F, Miller JS. (2025). Chimeric antigen receptor therapies: Development, design, and implementation. *J Allergy Clin Immunol.* 156(1):70-80. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2025.04.005>
- Liu E, Marin D, Banerjee P, ve ark. (2020). Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med*, 382(6), 545–553. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910607>
- Liu Y, Wang W, Wang C, Deng J, Hu Y, Mei H, Luo S. (2025). Recent advances of chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute myeloid leukemia. *Front Immunol.* 16:1572407. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1572407>
- Müller F, Taubmann J, Bucci L, ve ark. (2024). CD19 CAR T-Cell Therapy in Autoimmune Disease—A Case Series with Follow-up. *N Engl J Med*, 390(8), 687–700. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2308917>
- Oluwole OO, Forcade E, Muñoz J, ve ark. (2024). Long-term outcomes of patients with large B-cell lymphoma treated with axicabtagene ciloleucel and prophylactic corticosteroids. *Bone Marrow Transplant.* 59(3):366-372. <https://doi.org/10.1038/s41409-023-02169-z>
- Rodriguez-Otero P, Ailawadhi S, Arnulf B, ve ark. (2023). Idecel or Standard Regimens in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 388(11), 1002–1014. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2213614>
- San-Miguel J, Dhakal B, Yong K, ve ark. (2023). Cilta-cel or Standard Care in Lenalidomide-Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 389(4), 335–347. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2303379>

- Santomasso BD, Nastoupil LJ, Adkins S, ve ark. (2021). Management of Immune-Related Adverse Events in Patients Treated With Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: ASCO Guideline. *J Clin Oncol*, 39(35), 3978–3992. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.01992>
- Sayed MS, Gadelmawla AF, Abouelenin O, Moubarak ES, Jibril NS, Kandeel M, Abdulazeem H. (2025). Chimeric antigen receptor T-cell (CAR T-cell) and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) therapies in gastrointestinal malignancies: review of literature for clinical applications. *Med Oncol*. 42(11):481. <https://doi.org/10.1007/s12032-025-03040-5>
- Stewart CM, Siegler EL, Kenderian SS. (2025). The road ahead for chimeric antigen receptor T cells. *J Immunol*, 214(7), 1457–1467. <https://doi.org/10.1093/jimmun/vkaf047>
- Thirumalaisamy R, Vasuki S, Sindhu SM, Mothilal TM, Srimathi V, Poornima B, Bhuvaneshwari M, Hariharan M. (2025). FDA-Approved Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T Cell Therapy for Different Cancers-A Recent Perspective. *Mol Biotechnol*. 67(2):469-483. <https://doi.org/10.1007/s12033-024-01090-0>
- Ward MB, Jones AB, Krenciute G. (2025). Therapeutic advantage of combinatorial chimeric antigen receptor T cell and chemotherapies. *Pharmacol Rev*. 77(1):100011. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.124.001070>
- Wu L, Zhu L, Chen J. (2025). Diverse potential of chimeric antigen receptor-engineered cell therapy: Beyond cancer. *Clin Transl Med*. 15(4):e70306. <https://doi.org/10.1002/ctm2.70306>
- Xiao Y, Wu B, Zhou Q, Wu F, Li N, Xu C, Han X. (2025). Technologies for chimeric antigen receptor transgene

delivery. Trends Mol Med, 31(11), 1047–1064.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2025.05.011>

Yang DD, Macmorland W, Arnold JN. (2025). Current strategies for armoring chimeric antigen receptor T-cells to overcome barriers of the solid tumor microenvironment. Front Immunol. 16:1643941.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1643941>

Zhu L, Liu J, Li J, Wang N, Zhao Y, Su H. (2025). Research progress on HER2-specific chimeric antigen receptor T cells for immunotherapy of solid tumors. Front Immunol. 16:1514994.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1514994>

GLİOBLASTOMA PATOGENEZİNDE MİKRORNA'LARIN ROLÜ VE TERAPÖTİK HEDEF OLARAK POTANSİYELLERİ

Burcu ÇERÇİ¹

1. GİRİŞ

Glioblastoma, erişkinlerde görülen, infiltratif büyümesi ve agresif klinik seyriyle karakterize bir merkezi sinir sistemi tümörüdür. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2021 sınıflandırmasında erişkin tipi diffüz gliomalar içerisinde “glioblastoma, IDH-yabanıl tip” olarak tanımlanmakta ve merkezi sinir sistemi WHO derece 4 olarak sınıflandırılmaktadır. Önceki sınıflandırmalarda kullanılan “IDH-mutant glioblastoma” terimi ise “astrositoma, IDH-mutant, derece 4” olarak değiştirilmiştir. Bu ayrım, glioblastomanın yalnızca histopatolojik bulgularla değil, moleküler özellikleriyle birlikte değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (Louis ve ark., 2021).

Glioblastomanın tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve temozolomid temelli kemoterapi kullanılmasına rağmen, tedavi direnci hastalığın kontrolünü güçleştirmektedir. Direncin gelişiminde DNA hasarının onarılması gibi hücresel mekanizmalar önemli rol oynar. Bu nedenle, tümör hücrelerinin tedaviye yanıtını belirleyen düzenleyici ağların anlaşılması, mevcut tedavilerin etkinliğini artırabilecek yeni hedeflerin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Güncel çalışmalar, bu

¹ Araş. Gör. Dr., İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, , ORCID: 0000-0002-7477-1073.

ağların düzenlenmesinde mikroRNA'ların da işlevsel katkısı bulunduğunu göstermektedir (Wei ve ark., 2025).

MikroRNA'lar (miRNA'lar), yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, protein kodlamayan ve hedef haberci RNA'larla etkileşerek gen ekspresyonunu düzenleyen küçük RNA molekülleridir. İşlevlerini, Argonaute proteinlerini içeren susturma kompleksleri aracılığıyla gerçekleştirirler. Hedef transkriptlerin translasyonunun baskılanması veya yıkımının hızlandırılması, miRNA aracılı düzenlemenin başlıca sonuçlarıdır. Bununla birlikte, bu moleküllerin etkisi yalnızca ekspresyon düzeyleriyle açıklanamaz; susturma kompleksinin bileşimi ve hücre içindeki konumu da düzenleyici etkinliği etkileyebilir (Johnson ve ark., 2024).

Glioblastomada miRNA'ların terapötik önemini gösteren güncel örneklerden biri, miR-124 ile DNA onarım proteini RAD51 arasındaki ilişkidir. Wei ve arkadaşları, miR-124'ün RAD51'i doğrudan hedefleyerek glioblastoma hücrelerinin temozolomide duyarlılığını artırdığını göstermiştir. Aynı çalışmada miR-124 ekspresyonunun artırılması, ortotopik glioblastoma fare modelinde temozolomidin antitümör etkisini güçlendirmiştir. Bu bulgular, miRNA'ların tümör biyolojisine eşlik eden ekspresyon belirteçleri olmanın yanında, tedavi yanıtını değiştirebilen işlevsel düzenleyiciler olduğunu desteklemektedir (Wei ve ark., 2025).

MiRNA temelli müdahalelerin geliştirilmesinde, seçilen RNA moleküllerinin tümör hücrelerine ulaştırılması da araştırılması gereken temel konulardan biridir. Abate ve arkadaşları, miR-603 ve miR-221'in glioblastoma hücrelerine taşınması amacıyla kendiliğinden birleşen nanopartiküller geliştirmiş ve bu yaklaşımı temozolomid direncinin aşılması bağlamında incelemiştir. Bu tür çalışmalar, miRNA'nın moleküler etkisi ile taşıma sisteminin birlikte değerlendirilmesi

gerektiğini göstermektedir. Ancak deneysel modellerde elde edilen bulgular, hastalarda klinik etkinlik ve güvenliliğin kanıtlandığı anlamına gelmemektedir (Abate ve ark., 2025).

Bu bölümde, glioblastoma patogeneğinde miRNA'ların rolü; hücre proliferasyonu, apoptoz, invazyon, kök hücre özellikleri ve tümör mikroçevresi çerçevesinde ele alınacaktır. Ayrıca tedavi direnciyle ilişkileri ve biyobelirteç potansiyelleri değerlendirilecek; miRNA temelli terapötik stratejiler, taşıma sistemleri ve klinik uygulamaya geçişte karşılaşılan sınırlılıklar tartışılacaktır.

2. MİKRORNA BİYOGENEZİ VE ETKİ MEKANİZMALARI

MikroRNA biyogenezi, birincil RNA transkriptinin oluşumundan olgun miRNA'nın susturma kompleksine katılmasına kadar uzanan çok basamaklı bir süreçtir. Kanonik yolda miRNA genlerinin transkripsiyonu sonucunda birincil miRNA transkriptleri (pri-miRNA) oluşur. Çekirdekte DROSHA ve DGCR8'den oluşan Mikroişlemci (Microprocessor) kompleksi, bu transkriptlerdeki sap-ilmek yapılarını işleyerek öncül miRNA'ları (pre-miRNA) meydana getirir. Pre-miRNA'nın sitoplazmaya taşınmasının ardından DICER aracılı işleme gerçekleşir ve olgunlaşma süreci Argonaute proteinleriyle etkileşim üzerinden devam eder. Biyogenez ve işlev basamaklarında görev alan proteinlerin deneysel olarak azaltılması, hücrede saptanan miRNA düzeylerini de etkileyebilmektedir (Johnson ve ark., 2023).

Sitoplazmik işlenmenin temel bileşeni olan DICER, pre-miRNA'nın yapısal ve dizi özelliklerini tanıyarak kesim gerçekleştirir. Lee ve arkadaşlarının kriyoelektron mikroskopisi çalışması, insan DICER'inin pre-miRNA'yı işlerken belirgin konformasyonel değişiklikler geçirdiğini ortaya koymuştur.

Enzimin farklı bölgelerinin yeniden konumlanması, öncül RNA'nın katalitik bölgeye uygun biçimde yerleşmesini sağlar. Bu çalışma ayrıca pre-miRNA'nın uç özelliklerinin ve belirli dizi motiflerinin tanınmasının kesim özgüllüğüne katkıda bulunduğunu göstermiştir. Dolayısıyla DICER aracılı olgunlaşma, RNA'nın yalnızca uzunluğuna bağlı bir kesim işlemi olarak değerlendirilmemelidir (Lee ve ark., 2023). DICER tarafından oluşturulan kısa çift zincirli RNA'dan seçilen rehber zincir, Argonaute proteinine yüklenerek miRNA aracılı RNA ile indüklenen susturma kompleksinin (miRISC) hedef tanıyan bileşenini oluşturur. MiRNA, hedef RNA'ya yönelik dizi özgüllüğünü sağlarken Argonaute ve ilişkili proteinler gen susturulmasının yürütülmesine katkıda bulunur. İnsan hücrelerinde AGO1, AGO2, AGO3 ve AGO4 olmak üzere dört Argonaute proteini bulunmaktadır. MiRNA aracılı düzenleme, bu proteinlerin ve TNRC6 ailesi gibi yardımcı bileşenlerin oluşturduğu işlevsel kompleks üzerinden gerçekleşir (Johnson ve ark., 2023, 2024).

Hedef tanınması, miRNA ile mRNA arasındaki dizi eşleşmesine dayanır. Kanonik etkileşimlerde miRNA'nın 5' ucuna yakın “çekirdek” (seed) bölgesi ile hedef transkript üzerindeki bağlanma bölgesi arasındaki tamamlayıcılık önem taşır. Bununla birlikte, bir hedef etkileşiminin hücrede gerçekleşip gerçekleşmediği yalnızca dizi tahminleriyle belirlenemez. Sekar ve arkadaşları, Argonaute2 ile RNA düzenleme enzimi ADAR2'nin bir bölgesini birleştiren agoTRIBE yöntemiyle miRNA hedeflerini tek hücre düzeyinde incelemiştir. Çalışmada hedef etkileşimlerinin hücre döngüsüne göre değişebildiğinin gösterilmesi, miRNA işlevinin hücresel durumla birlikte değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur (Sekar ve ark., 2024). MiRNA–hedef etkileşimi çoğunlukla translasyonun baskılanması ve hedef mRNA'nın yıkımının hızlandırılmasıyla sonuçlanır. TNRC6 proteinleri, mRNA'nın

poli(A) kuyruğunun kısaltılmasında ve yıkıma yönlendirilmesinde görev alan faktörlerin susturma kompleksine katılmasını destekler. Bu nedenle miRNA etkisinin değerlendirilmesinde mRNA ve protein düzeyleri birbirini tamamlayan ölçümler olarak ele alınmalıdır. Ayrıca Argonaute'un hücre içindeki dağılımı, sitoplazmik hedefler üzerindeki baskılamanın derecesini değiştirebilir (Johnson ve ark., 2024).

Bu düzenleyici sistemin dinamik niteliği, Johnson ve arkadaşlarının hücre yoğunluğu ve AGO2 yerleşimini incelediği çalışmada da gösterilmiştir. Kolorektal kanser kökenli HCT116 hücrelerinde yüksek hücre yoğunluğu ve üç boyutlu kültür koşulları, AGO2'nin çekirdekte birikmesiyle ilişkilendirilmiş; bu değişime bazı sitoplazmik hedefler üzerindeki baskılamanın azalması eşlik etmiştir. Glioblastomaya özgü olmayan bu bulgu, genel miRNA mekanizmaları açısından, aynı miRNA düzeyinin farklı hücresel koşullarda aynı işlevsel sonucu oluşturmayabileceğini göstermektedir (Johnson ve ark., 2024). Glioblastomada terapötik hedeflerin belirlenmesi açısından bu mekanizmalar, miRNA ekspresyon analizlerinin işlevsel deneylerle tamamlanmasını gerekli kılar. Bir miRNA'nın artması veya azalması, tek başına doğrudan hedef ilişkisini ya da terapötik yararı kanıtlamaz. Wei ve arkadaşlarının miR-124–RAD51 eksenini hedef doğrulama ve kurtarma deneyleriyle incelemesi, ekspresyon değişikliğinden mekanistik sonuca ulaşan bu yaklaşımın güncel bir örneğidir. Böylece miRNA'nın hangi hedef üzerinden etkili olduğu ve bu etkinin tedavi yanıtına nasıl yansıdığı daha güvenilir biçimde değerlendirilebilir (Wei ve ark., 2025).

3. GLİOBLASTOMADA ONKOJENİK VE TÜMÖR BASKILAYICI MİKRORNA'LAR

Glioblastomada miRNA'lar, düzenledikleri hedef genlere ve bu düzenlemenin hücresel sonuçlarına göre onkojenik veya tümör baskılayıcı işlevler gösterebilir. Onkojenik miRNA'lar, tümör hücrelerinin çoğalmasını, yaşamını sürdürmesini veya tedaviye direnç geliştirmesini desteklerken; tümör baskılayıcı miRNA'lar bu süreçleri sınırlandırabilir. Bununla birlikte, bu sınıflandırma her miRNA için değişmez bir özellik olarak değerlendirilmemelidir. Özellikle aynı öncül miRNA'dan oluşan 3p ve 5p zincirlerinin farklı hedefleri düzenleyerek karşıt etkiler oluşturabilmesi, işlevsel değerlendirmede olgun miRNA dizisinin açıkça belirtilmesini gerekli kılmaktadır (Shen ve ark., 2025).

MiR-21, glioblastomada onkojenik işlevleri araştırılan miRNA'ların başında gelmektedir. Güncel bir çalışmada Bayat ve arkadaşları, glioblastoma veri setlerinde ve deneysel hücre modellerinde miR-21 ekspresyonunun arttığını göstermiştir. Araştırmacılar, miR-21'i bağlayarak etkisini azaltmak amacıyla dairesel bir RNA yapısı geliştirmiş ve bu yapıyı doğrusal eşdeğeriyle karşılaştırmıştır. Dairesel miR-21 tuzağı, U87 ve C6 hücre modellerinde proliferasyon ve migrasyonu azaltmış, apoptozu artırmış ve miR-21 tarafından baskılanan hedeflerin ekspresyonunun geri kazanılmasını sağlamıştır. İntrakraniyal C6 sıçan modelinde de tümör büyümesini baskılamıştır. Bu bulgular, miR-21'in tümör hücrelerinin malign özelliklerini sürdürmesine katkıda bulunduğunu ve işlevinin engellenmesinin deneysel bir tedavi yaklaşımı olarak araştırılabileceğini desteklemektedir (Bayat ve ark., 2023).

MiR-10b de glioblastomada terapötik açıdan araştırılan onkojenik miRNA'lardan biridir. Kim ve arkadaşlarının çalışmasında, miR-10b'yi hedefleyen antisens oligonükleotidlerin nanopartiküller aracılığıyla taşınması,

glioblastoma hücrelerinde hedef baskılanması ve hücre canlılığının azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Çalışma, geleneksel hücre hatlarının yanında hasta kökenli modelleri de kapsamış; ortotopik glioblastoma modellerinde antitümör etki ve sağkalım yararı bildirilmiştir. Bu yaklaşım, bir onkojenik miRNA'nın inhibisyonu ile uygun taşıma sisteminin birlikte geliştirilmesine örnek oluşturmaktadır. Bununla birlikte, söz konusu sonuçlar klinik öncesi kanıtlardır ve glioblastoma hastalarında etkinliği kanıtlanmış bir tedaviyi temsil etmemektedir (Kim ve ark., 2026).

Tümör baskılayıcı miRNA'ların terapötik kullanımında temel yaklaşım, azalmış düzenleyici işlevlerinin yeniden kazandırılmasıdır. Bu gruptaki miRNA'lar, tümörün devamlılığı için gerekli proteinleri baskılayarak hücrel yaşamı, metabolizmayı veya tedavi yanıtını değiştirebilir. MiR-124, glioblastomada bu yaklaşımın güncel örneklerinden biridir. Wei ve arkadaşları, miR-124'ün DNA onarımında görev alan RAD51'i doğrudan hedeflediğini ve ekspresyonunun artırılmasının temozolomid kaynaklı hücre ölümünü güçlendirdiğini göstermiştir. RAD51 üzerinden yürütülen kurtarma deneyleri, bu hedefin miR-124 aracılı ilaç duyarlılığındaki işlevsel katkısını desteklemiştir. Dolayısıyla miR-124'ün tümör baskılayıcı etkisi, bu çalışmada yalnızca ekspresyon ve sağkalım ilişkisine değil, doğrulanmış bir hedef üzerinden ortaya konan mekanizmaya da dayanmaktadır (Wei ve ark., 2025).

MiR-7'nin tümör baskılayıcı etkileri ise otofaji, enerji metabolizması ve hücre dışı matriksin düzenlenmesiyle ilişkilendirilmiştir. Torrecilla-Parra ve arkadaşları, glioblastoma modellerinde miR-7 düzeylerinin yeniden artırılmasının tümör büyümesini baskıladığını bildirmiştir. Araştırmada bu etkiye otofajik sürecin tamamlanmasındaki bozulma, enerji metabolizmasındaki değişiklikler ve hücre dışı matriksin yeniden yapılanması eşlik etmiştir. Bu bulgular, tümör baskılayıcı bir

miRNA'nın etkisinin tek bir büyüme sinyalinin engellenmesiyle sınırlı kalmayabileceğini; tümörün metabolik ve yapısal özelliklerini birlikte etkileyebileceğini göstermektedir (Torrecilla-Parra ve ark., 2025).

MiRNA'ların onkogenik veya tümör baskılayıcı olarak sınıflandırılmasında dikkate alınması gereken bir diğer özellik, aynı öncülden oluşan iki olgun zincirin birbirinden farklı etkileridir. Shen ve arkadaşları, temozolomide dirençli glioblastoma modellerinde miR-92b-3p düzeyinin arttığını, miR-92b-5p düzeyinin ise azaldığını göstermiştir. MiR-92b-3p, HDAC9'u hedefleyerek direnç gelişimini desteklerken; miR-92b-5p, FOXP3'ü hedefleyerek direnci sınırlandırmıştır. Çalışmada miR-92b-3p'nin baskılanması veya miR-92b-5p'nin artırılması, temozolomid duyarlılığının yeniden kazanılmasına katkıda bulunmuştur. Bu nedenle yalnızca "miR-92b" ifadesinin kullanılması, aynı öncülden kaynaklanan karşıt işlevleri gözden kaçırabilir (Shen ve ark., 2025).

Bu örnekler birlikte değerlendirildiğinde, glioblastomada miRNA seçiminin yalnızca ekspresyon artışı veya azalışına dayandırılmaması gerektiği görülmektedir. Terapötik adayların değerlendirilmesinde olgun zincirin kimliği, doğrudan hedefleri, müdahale sonrasında ortaya çıkan hücresel etkiler ve bulguların farklı modellerde doğrulanması önem taşımaktadır. Bu yaklaşım, onkogenik miRNA'ların inhibisyonu ile tümör baskılayıcı miRNA'ların yeniden kazandırılması arasında biyolojik temele dayalı bir seçim yapılmasını sağlar.

4. GLİOBLASTOMA PATOGENEZİNDE MİKRORNA'LARIN İŞLEVLERİ

4.1. Hücre Proliferasyonu ve Apoptoz

Glioblastomada miRNA aracılı düzenleme, hücre çoğalması ile hücre ölümü arasındaki dengenin değişmesine katkıda bulunur. Bu etkiler, hücre döngüsünün kontrolü, apoptotik yanıt ve hücrel stresle ilişkili hedeflerin düzenlenmesi üzerinden gerçekleşebilir. Bayat ve arkadaşlarının miR-21'i işlevsel olarak baskıladığı çalışmada, proliferasyonun azalmasına apoptotik hücre oranındaki artış ve hücre döngüsü dağılımındaki değişiklikler eşlik etmiştir. Bulgular, bir miRNA'ya yönelik müdahalenin birden fazla hücrel çıktıyı birlikte etkileyebildiğini göstermektedir (Bayat ve ark., 2023). Bununla birlikte, proliferasyonun azalması ile apoptozun artması birbirinden ayrı değerlendirilmelidir. Metabolik aktiviteye dayanan canlılık ölçümlerindeki düşüş, tek başına apoptotik ölümün kanıtı değildir. Bu nedenle miRNA müdahalelerinin etkileri yorumlanırken hücre sayımı, hücre döngüsü analizi, Annexin V boyaması ve kaspaz aktivasyonu gibi birbirini tamamlayan ölçümler önem taşır. Wei ve arkadaşlarının miR-124 çalışmasında, temozolomid duyarlılığındaki artışın hücre ölümü ve DNA hasarı ölçümleriyle desteklenmesi, bu tür bütünleşik değerlendirmeye örnek oluşturmaktadır (Wei ve ark., 2025).

4.2. İnvazyon ve Hücre Dışı Matriksin Düzenlenmesi

Glioblastomanın çevre beyin dokusuna yayılması, hücre hareketliliğinin yanı sıra hücre dışı matriksle kurulan etkileşimlere de bağlıdır. MiRNA'lar bu etkileşimlerin düzenlenmesine katkıda bulunabilir. Torrecilla-Parra ve arkadaşları, miR-7 düzeylerinin artırılmasının glioblastoma modellerinde matriks bileşimi ve yeniden yapılanmasıyla ilişkili değişiklikler oluşturduğunu göstermiştir. Çalışma, miRNA etkilerinin hücre içi sinyal yollarının ötesinde tümörün yapısal

çevresine de yansıyabileceğini desteklemektedir (Torrecilla-Parra ve ark., 2025). Rancati ve arkadaşlarının hasta kökenli glioblastoma kültürlerinde gerçekleştirdiği çalışmada ise bir miRNA kombinasyonu, incelenen iki modelde hücre büyümesini azaltmış; invazyon üzerindeki etki modeller arasında farklılık göstermiştir. Ayrıca migrasyonda anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Bu sonuçlar, migrasyon ve invazyonun birbirinin yerine kullanılmaması gerektiğini ve aynı miRNA müdahalesinin farklı tümör modellerinde aynı yanıtı oluşturmayabileceğini göstermektedir (Rancati ve ark., 2025).

4.3. Glioblastoma Kök Hücre Özellikleri

Glioblastoma kök hücre özelliklerinin sürdürülmesi, tümör hücrelerinin kendi düzenleyici programlarının yanında mikroçevreden gelen sinyallerle de ilişkilidir. Zhao ve arkadaşları, M2 benzeri tümörle ilişkili makrofajlardan salınan eksozomların miR-27b-3p taşıyarak glioblastoma kök hücre özelliklerini desteklediğini bildirmiştir. Araştırmada miR-27b-3p/MLL4/PRDM1 eksenini, bu etkinin moleküler bileşenlerinden biri olarak değerlendirilmiştir. Böylece miRNA'ların kök hücre özelliklerini yalnızca tümör hücresi içinde değil, hücreler arası iletişim yoluyla da etkileyebildiği gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2022).

Bu bulgu, kök hücre özelliklerini hedefleyen yaklaşımlarda tümör hücresi ile destekleyici mikroçevrenin birlikte ele alınmasını gerektirir. Bununla birlikte, küre oluşumu veya kök hücre belirteçlerindeki değişiklikler tek başına tümör başlatma kapasitesinin ortadan kaldırıldığını göstermez. Bu kapasitenin değerlendirilmesi, uzun dönem kendini yenileme ve uygun in vivo deneylerle desteklenmelidir.

4.4. Anjiyogenez ve Tümör Mikroçevresi

MiRNA'lar, glioblastomada damar oluşumunu hücreler arası iletişim üzerinden etkileyebilir. Huang ve arkadaşları,

glioblastoma kök hücrelerinden salınan eksozomal miR-374b-3p'nin makrofajlarda PTEN'i hedefleyerek M2 benzeri polarizasyonu desteklediğini göstermiştir. Bu değişime, endotel hücrelerinin anjiyojenik kapasitesindeki artış eşlik etmiştir. Çalışma, tümör hücresi kaynaklı bir miRNA'nın önce bağışıklık hücresini, ardından damar oluşumunu etkileyebildiği dolaylı bir mekanizma ortaya koymaktadır (Huang ve ark., 2024).

Bağışıklık yanıtının baskılanmasında hipoksiyle ilişkili miRNA taşınması da önem taşıyabilir. Tankov ve arkadaşları, hipoksik glioblastoma hücrelerinden salınan hücre dışı veziküllerin miR-25/93 yükünü makrofajlara aktararak cGAS–STING yolunun aktivasyonunu ve tip I interferon yanıtını azalttığını bildirmiştir. Bu mekanizma, hipoksinin etkilerinin veziküller aracılığıyla komşu hücrelere taşınabileceğini göstermektedir (Tankov ve ark., 2024).

Makrofaj kaynaklı miRNA taşınması her zaman tümörü destekleyen bir sonuç oluşturmaz. Yan ve arkadaşları, M1 polarizasyonu oluşturulmuş makrofajlardan elde edilen eksozomlardaki miR-150'nin MMP16'yı hedefleyerek glioma ilerlemesini baskıladığını göstermiştir. Bu karşıt örnekler, vezikülün kaynağı ve miRNA yükünün biyolojik sonucu belirlediğini ortaya koymaktadır. Ayrıca deneysel çalışmalardaki M1/M2 ayrımı, insan tümörlerinde bulunan daha karmaşık makrofaj durumlarının sadeleştirilmiş bir modeli olarak değerlendirilmelidir (Yan ve ark., 2023).

5. TEDAVİ DİRENCİNDE MİKRORNA'LARIN ROLÜ

Glioblastomada miRNA'ların tedavi direncine katkısı, DNA onarımı ve epigenetik düzenleme gibi farklı mekanizmaları kapsar. MiR-124–RAD51 ilişkisi, DNA onarım kapasitesinin miRNA aracılığıyla değiştirilmesine örnektir. RAD51'in

baskılanması, temozolomid uygulaması sonrasında DNA hasarının birikmesini ve hücre ölümünü artırmıştır. Bu sonuç, tedavi duyarlılığını değerlendiren çalışmalarda yalnızca miRNA düzeyinin değil, ilgili hedefin işlevsel katkısının da araştırılması gerektiğini göstermektedir (Wei ve ark., 2025).

Direnç, miRNA biyogenezindeki değişikliklerle de bağlantılı olabilir. Shen ve arkadaşları, TUT4 aracılı üridilasyonun miR-92b'nin olgun zincir dengesini değiştirerek miR-92b-3p lehine bir artış oluşturduğunu göstermiştir. HDAC9 ve FOXP3 üzerinden yürüyen düzenleme, histon asetilasyonu ve COL7A1 ekspresyonuyla ilişkilendirilmiştir. Bu bulgular, biyogenezdeki bir değişikliğin epigenetik düzenleme ve matriks birikimi üzerinden ilaç direncine yansıyabileceğini ortaya koymaktadır (Shen ve ark., 2025). Bu çalışmalar, miRNA müdahalelerinin mevcut tedavilere duyarlılığı artırmak amacıyla araştırılmasına dayanak sağlamaktadır. Ancak temozolomidle elde edilen sonuçlar doğrudan radyoterapi direncine genellenmemelidir. Her tedavi için ilgili hasar mekanizması, deneysel dozlar ve yanıt ölçütleri ayrı değerlendirilmelidir.

6. MİKRORNA'LARIN TANISAL VE PROGNOSTİK BİYOBELİRTEÇ POTANSİYELİ

Dolaşımdaki miRNA'ların ölçülmesi, glioblastomanın tanısı ve izleminde araştırılan sıvı biyopsi yaklaşımlarından biridir. Donofrio ve arkadaşları, plazmada miR-21-5p, miR-23b-3p ve miR-34a-5p düzeylerini damlacık dijital PCR ile tanı sırasında ve cerrahi sonrası farklı zaman noktalarında incelemiştir. MiRNA düzeylerinde zaman içinde değişiklikler ve bazı sağkalım ilişkileri saptanmıştır. Bununla birlikte miR-34a-5p'nin tanısal ayırt etme performansı sınırlı kalmış; küçük

örneklem nedeniyle daha geniş doğrulama çalışmalarının gerekliliği belirtilmiştir (Donofrio ve ark., 2025).

Bu çalışmanın yorumlanmasında iki sınırlılık dikkat çekmektedir: kohortta IDH-yabanıl tip glioblastomanın yanında IDH-mutant derece 4 astrositomalar da kabul edilmiş ve takip boyunca örnek sayısı azalmıştır. Dolayısıyla sonuçların yalnızca güncel glioblastoma tanımına özgü kabul edilmesi uygun değildir. Ayrıca plazma düzeyleri, tümör dokusundaki işlevsel etkilerin doğrudan karşılığı olarak yorumlanmamalıdır (Donofrio ve ark., 2025).

Tanısal, prognostik ve tedavi yanıtını öngören biyobelirteçler de birbirinden ayrılmalıdır. Hastaları sağlıklı bireylerden ayıran bir miRNA, belirli bir tedaviden yarar görecektir hastaları mutlaka belirleyemez. Klinik kullanıma geçiş için örnek toplama, RNA izolasyonu, normalizasyon ve analiz yöntemlerinin standardizasyonu; bağımsız kohortlarda doğrulama ve ilgili hastalık kontrol gruplarıyla karşılaştırma gereklidir.

7. MİKRORNA TEMELLİ TERAPÖTİK YAKLAŞIMLAR

MiRNA temelli tedavilerde iki temel strateji kullanılmaktadır. MiRNA mimikleri, tümör baskılayıcı miRNA'nın düzenleyici etkisini yeniden oluşturmayı; antisens inhibitörler veya miRNA tuzakları ise onkogenik miRNA'nın işlevini azaltmayı amaçlar. MiR-21'i bağlayan dairesel RNA yapıları ve miR-10b'yi hedefleyen antisens nanopartiküller, inhibisyon stratejisinin güncel deneysel örnekleridir (Bayat ve ark., 2023; Kim ve ark., 2026). Birden fazla miRNA'nın birlikte kullanılması da araştırılmaktadır. Rancati ve arkadaşları, 11 miRNA'dan oluşan kombinasyonu hasta kökenli glioblastoma modellerinde değerlendirmiş ve lipid nanopartiküllerle lokal

uygulama sonrasında ortotopik modelde antitümör etki bildirmiştir. Bununla birlikte, tümör büyümesindeki baskılanmanın süresi sınırlı kalmıştır. Bu sonuç, kombinasyonun biyolojik etkinliği kadar etkinin devamlılığı ve uygulama sıklığının da araştırılması gerektiğini göstermektedir (Rancati ve ark., 2025).

Taşıma sistemleri, miRNA müdahalesinin tümör hücresinde işlevsel etki oluşturmalarını sağlamayı amaçlar. Abate ve arkadaşlarının miR-603 ve miR-221'i taşıyan kendiliğinden birleşen nanopartikülleri ve Kim ve arkadaşlarının miR-10b inhibitörünü taşıyan demir oksit temelli sistemleri, farklı RNA yükleri için geliştirilen yaklaşımlardır (Abate ve ark., 2025; Kim ve ark., 2026). Biyomimetik sistemler de bu alanda araştırılmaktadır. Yin ve arkadaşları, mikrogliya hücre membranıyla kaplanmış bir miRNA nanosüngerini glioblastoma modellerinde değerlendirmiştir. Çalışma, birden fazla miRNA'nın hedeflenmesini hücre membranı kaplamasıyla birleştiren bir taşıma yaklaşımı sunmaktadır. Böyle bir sistemin başarısı, yalnızca hücre alımıyla değil, hedef miRNA işlevinin azalması ve antitümör etkinin gösterilmesiyle değerlendirilmelidir (Yin ve ark., 2024). Hücre dışı veziküller de doğal RNA taşıma kapasitesi nedeniyle ilgi görmektedir. Ancak tümör kaynaklı veziküllerin bağışıklık baskılanması ve anjiyogenezi destekleyebildiğine ilişkin bulgular, taşıyıcı olarak kullanılacak veziküllerin kaynağının ve içeriklerinin dikkatle tanımlanmasını gerektirir (Huang ve ark., 2024; Tankov ve ark., 2024).

Sistemik ve lokal uygulamalar, farklı taşıma gereksinimleri oluşturur. Sistemik uygulamada beyne ulaşım, tümör dokusunda dağılım ve hücre içine giriş birlikte değerlendirilmelidir. Lokal uygulama ise kan-beyin bariyerini geçme gereksinimini azaltabilir; ancak çevre dokudaki infiltratif hücrelere yeterli dağılımı kendiliğinden garanti etmez. Bu

nedenle lokal enjeksiyonla elde edilen etkinlik, aynı formülasyonun intravenöz uygulamayla da etkili olacağını kanıtlamaz. Rancati ve arkadaşlarının çalışmasında lipid nanopartiküllerin tümör içine uygulanmış olması, bulgunun yorumlanmasında önemlidir. Benzer biçimde, taşıyıcının beyinde saptanması ile RNA yükünün tümör hücresinde işlev göstermesi farklı kanıt düzeyleridir. Hedef miRNA veya protein değişikliklerinin gösterilmesi, dağılım ölçümlerini tamamlamalıdır (Rancati ve ark., 2025; Kim ve ark., 2026).

8. KLİNİK UYGULAMAYA GEÇİŞTE SINIRLILIKLAR VE GELECEK PERSPEKTİFLERİ

Glioblastomada miRNA temelli yaklaşımların başlıca güçlüklerinden biri, modeller arasında değişen yanıttır. Hasta kökenli kültürlerde aynı miRNA kombinasyonunun invazyon üzerinde farklı etkiler oluşturması, tümörün moleküler özelliklerinin aday seçiminde dikkate alınması gerektiğini göstermektedir. Bu nedenle tek bir hücre hattındaki etkinlik, bütün glioblastomalar için yeterli kanıt oluşturmaz (Rancati ve ark., 2025).

MiRNA'ların çok sayıda hedefi düzenleyebilmesi terapötik açıdan avantaj sağlayabilir; ancak istenmeyen etkilerin değerlendirilmesini de gerektirir. Gelecek çalışmalar, tümör hücrelerindeki etkinliğin yanında normal nöral ve bağışıklık hücreleri üzerindeki etkileri, doz bağımlılığını ve uzun dönem güvenliliği incelemelidir. Taşıma sistemleri açısından üretim tekrarlanabilirliği, RNA yükleme verimi, depolama kararlılığı ve uygulamalar arasındaki tutarlılık da değerlendirilmelidir.

Klinik öncesi araştırmalarda hasta kökenli üç boyutlu modellerin, bağışıklık hücreleriyle ortak kültürlerin ve uygun ortotopik modellerin birlikte kullanılması, farklı mekanizmaların

değerlendirilmesini kolaylaştırabilir. Özellikle miRNA'nın tümör hücresindeki etkisi ile mikroçevrede oluşturduğu değişikliklerin birlikte incelenmesi, biyolojik olarak daha uygun adayların seçilmesine katkıda bulunacaktır.

9. SONUÇ

MikroRNA'lar, glioblastomada hücre çoğalması, apoptoz, invazyon, kök hücre özellikleri, anjiyogenez ve bağışıklık yanıtını birbirine bağlayan düzenleyici moleküllerdir. Güncel araştırmalar, miRNA müdahalelerinin doğrudan hedef genler üzerinden tedavi duyarlılığını değiştirebildiğini ve hücre dışı veziküller aracılığıyla mikroçevreye etki edebildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, terapötik potansiyelin klinik yarara dönüşmesi; uygun miRNA ve olgun zincir seçimine, güvenilir taşıma sistemlerine, farklı modellerde doğrulamaya ve güvenilirlik değerlendirmesine bağlıdır. MiRNA temelli yaklaşımlar, mevcut tedavilerle birlikte araştırılabilecek aday stratejiler sunmakta; rutin klinik kullanıma geçiş için ek kanıt gerektirmektedir.

KAYNAKÇA

- Abate, M., Porru, M., Campani, V., Leonetti, C., Nele, V., Di Paola, R., et al. (2025). Self-assembling nanoparticles for delivery of miR-603 and miR-221 in glioblastoma as a new strategy to overcome resistance to temozolomide. *Journal of Controlled Release*, 377, 458–469. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.11.039>
pubmed.ncbi.nlm.nih.gov
- Bayat, H., Pourgholami, M. H., Rahmani, S., Pournajaf, S., & Mowla, S. J. (2023). Synthetic miR-21 decoy circularized by tRNA splicing mechanism inhibited tumorigenesis in glioblastoma in vitro and in vivo models. *Molecular Therapy–Nucleic Acids*, 32, 432–444. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.04.001>
- Donofrio, C. A., Fioravanti, A., Riccio, L., Cominetti, M., Cappelletti, M. R., Longo, G., et al. (2025). Determination of longitudinal circulating levels of miR-21-5p, miR-23b-3p and miR-34a-5p in plasma of patients with glioblastoma using droplet digital PCR. *Neurosurgical Review*, 48, 592. <https://doi.org/10.1007/s10143-025-03747-z>
- Huang, S., Zhang, P., Yin, N., Xu, Z., Liu, X., Wu, A., et al. (2024). Glioblastoma stem cell-derived exosomal miR-374b-3p promotes tumor angiogenesis and progression through inducing M2 macrophages polarization. *iScience*, 27(3), 109270. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109270>
- Johnson, K. C., Johnson, S. T., Liu, J., Chu, Y., Arana, C., Han, Y., et al. (2023). Consequences of depleting TNRC6, AGO, and DROSHA proteins on expression of microRNAs. *RNA*, 29(8), 1166–1184. <https://doi.org/10.1261/rna.079647.123> PubMed

- Johnson, K. C., Kilikevicius, A., Hofman, C., Hu, J., Liu, Y., Aguilar, S., et al. (2024). Nuclear localization of Argonaute 2 is affected by cell density and may relieve repression by microRNAs. *Nucleic Acids Research*, 52(4), 1930–1952. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1155> pubmed.ncbi.nlm.nih.gov
- Kim, B. D., Chen, M., Mondal, S. K., Kenyon, E., Mallett, C. L., deCarvalho, A., et al. (2026). Nanotherapy targeting miR-10b improves survival in orthotopic glioblastoma models. *Journal of Functional Biomaterials*, 17(1), 15. <https://doi.org/10.3390/jfb17010015>
- Lee, Y.-Y., Lee, H., Kim, H., Kim, V. N., & Roh, S.-H. (2023). Structure of the human DICER–pre-miRNA complex in a dicing state. *Nature*, 615, 331–338. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05723-3> www.nature.com
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., et al. (2021). The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106> PubMed
- Rancati, S., Pereira, R. C., Schlich, M., Sgroi, S., Beatini, S., La Rosa, L., et al. (2025). Synergic microRNAs suppress human glioblastoma progression by modulating clinically relevant targets. *Molecular Therapy–Nucleic Acids*, 36(4), 102763. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2025.102763>
- Sekar, V., Mármol-Sánchez, E., Kalogeropoulos, P., Stanicek, L., Sagredo, E. A., Widmark, A., et al. (2024). Detection of transcriptome-wide microRNA–target interactions in single cells with agoTRIBE. *Nature Biotechnology*, 42,

1296–1302. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01951-0>
www.nature.com

Shen, F., Wu, P., Li, Z., Yang, M., Li, Z., Nan, Y., et al. (2025). MicroRNA strand ratio disarray promotes temozolomide resistance in glioblastoma. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 30, 130. <https://doi.org/10.1186/s11658-025-00806-7>

Tankov, S., Petrovic, M., Lecoultre, M., Espinoza, F., El-Harane, N., Bes, V., et al. (2024). Hypoxic glioblastoma-cell-derived extracellular vesicles impair cGAS-STING activity in macrophages. *Cell Communication and Signaling*, 22, 144. <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01523-y>

Torrecilla-Parra, M., Pardo-Marqués, V., Fuentes-Fayos, A. C., G-García, M. E., Fernández-de Frutos, M., López-Aceituno, J. L., et al. (2025). MiR-7 inhibits progression of glioblastoma by impairing autophagy resolution, energy metabolism and ECM remodeling. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 44, 237. <https://doi.org/10.1186/s13046-025-03504-6>

Wei, Y., Wang, P., Zhao, J., Fan, X., Jiang, J., Mu, X., et al. (2025). Overexpression of miR-124 enhances the therapeutic benefit of TMZ treatment in the orthotopic GBM mice model by inhibition of DNA damage repair. *Cell Death & Disease*, 16, Article 47. <https://doi.org/10.1038/s41419-025-07363-z>
www.nature.com

Yan, P., Wang, J., Liu, H., Liu, X., Fu, R., & Feng, J. (2023). M1 macrophage-derived exosomes containing miR-150 inhibit glioma progression by targeting MMP16. *Cellular Signalling*, 108, 110731. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2023.110731>

- Yin, Y., Tian, N., Deng, Z., Wang, J., Kuang, L., Tang, Y., et al. (2024). Targeted microglial membrane-coated microRNA nanosponge mediates inhibition of glioblastoma. *ACS Nano*, 18(42), 29089–29105. <https://doi.org/10.1021/acsnano.4c10509>
- Zhao, G., Ding, L., Yu, H., Wang, W., Wang, H., Hu, Y., et al. (2022). M2-like tumor-associated macrophages transmit exosomal miR-27b-3p and maintain glioblastoma stem-like cell properties. *Cell Death Discovery*, 8, 350. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01081-7>

BÖBREK TRANSPLANTASYONU ARAŞTIRMALARINDA DENEY HAYVANI MODELLERİ VE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR

Hatice İlayhan KARAHAN¹

1. GİRİŞ

Böbrek transplantasyonu, son dönem böbrek hastalığında organ işlevinin yeniden sağlanmasını amaçlayan bir tedavi yaklaşımıdır. Bununla birlikte greftin korunması yalnızca cerrahi başarının sonucu değildir. Donör özellikleri, organın çıkarılması ve saklanması sırasında gelişen hasar, alıcının bağışıklık geçmişi ve uygulanan immünsüpresyon birlikte değerlendirilmelidir. Deney hayvanı modelleri, bu etkenlerin kontrollü koşullarda araştırılmasına olanak sağlar. Özellikle böbrek ototransplantasyonu organ koruma stratejilerini, allotransplantasyon ise verici ile alıcı arasındaki immün etkileşimi incelemek için farklı araştırma sorularına yanıt verir (Kaths et al., 2016).

Transplantasyon araştırmalarında modelin değeri, insan hastalığının bütün özelliklerini yeniden üretmesinden çok, tanımlanmış bir mekanizmayı sınavabilmesine bağlıdır. Aynı tür içinde farklı suşlar, farklı bağışıklık geçmişleri veya farklı organ koruma süreleri kullanıldığında birbirinden oldukça farklı sonuçlar ortaya çıkabilir. Örneğin bazı fare verici-alıcı eşleşmelerinde böbrek allogreftleri kendiliğinden uzun süre kabul edilirken, önceden duyarlılaşmış alıcılarda hızlı antikor aracılı ret gelişebilir. Bu nedenle “fare böbrek nakli modeli” ifadesi tek

¹ Araş. Gör. Dr., İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye. ORCID: 0000-0002-3371-7345.

başına deneyin immünolojik özelliklerini açıklamaz (Gorbacheva, Fan, Fairchild, Baldwin, & Valujskikh, 2016; Yokose et al., 2024).

Bu bölümde böbrek transplantasyonu çalışmalarında kullanılan kemirgen, domuz ve insan dışı primat modelleri; model seçimi, deneysel tasarım, immün yanıt ve greft değerlendirme açısından ele alınmaktadır. Geleneksel yaklaşımlar, doku yerleşik bağışıklık hücreleri, normotermik makine perfüzyonu, hücresel müdahaleler ve genetik olarak değiştirilmiş donörlerle ksenotransplantasyon alanındaki yeni çalışmalarla birlikte tartışılmaktadır. Amaç, belirli bir modeli bütün araştırmalar için üstün ilan etmek değil, araştırma sorusu ile modelin sağlayabildiği kanıtı eşleştirmektir.

2. MODEL SEÇİMİNDE BİYOLOJİK VE DENEYSEL TEMELLER

Ototransplantasyonda bir hayvandan çıkarılan böbrek aynı hayvana yeniden nakledilir. Böylece alloantijen farklılığının etkisi büyük ölçüde dışlanarak organ çıkarılması, iskemi, saklama ve reperfüzyonun sonuçları incelenebilir. Singeneik transplantasyonda genetik olarak eşdeğer verici ve alıcılar kullanılır; bu yaklaşım, nakil işleminin kendisi ile alloimmün hasarın ayrılmasına yardımcı olur. Allotransplantasyonda aynı türün genetik olarak farklı bireyleri arasında nakil yapılır. Donör–alıcı eşleşmesi ve immünsüpresif yaklaşım, ret veya kabul yönündeki sonucu belirleyen temel değişkenlerdir (Gorbacheva et al., 2016; Kathis et al., 2016).

İskemi–reperfüzyon hasarı araştırmasında yalnızca renal damarların geçici olarak kapatılması, böbrek transplantasyonu ile aynı deneysel durumu oluşturmaz. Nakil; organın çıkarılması, soğuk veya dinamik korunması, damar bağlantılarının yeniden kurulması ve alıcı ortamına yerleştirilmesini içerir. Bu nedenle

damar klemp modeli ile elde edilen bir sonuç, transplantasyon modelinde ayrıca sınanmalıdır. Benzer biçimde ototransplantasyon sırasında gelişen inflamasyonun azaltılması, allogreftte antikor aracılı reddin önlendiğini göstermez. Deneyin başında araştırılan hasarın cerrahi, metabolik veya alloimmün niteliği açıkça tanımlanmalıdır.

Fare modelleri genetik müdahalelerin ve bağışıklık hücrelerine özgü işlevlerin incelenmesine elverişlidir. Bunun karşılığında küçük damar çapı ve üriner sistem bağlantıları, deneyimli bir mikrocerrahi ekip gerektirir. Sıçan modelleri, böbrek çıkarılması ve perfüzyon sistemlerine bağlanması gibi işlemler için daha geniş bir çalışma alanı sağlar. Sıçan böbreklerinde normotermik perfüzyonun nakille birleştirilmesi, küçük hayvan modellerinin yalnızca immünolojik araştırmalarla sınırlı olmadığını göstermiştir (Chen et al., 2026; Czogalla, Grahammer, Puelles, & Huber, 2021).

Domuz böbrekleri, organ boyutu ve klinikte kullanılan cihazlara uyarlanabilirlik bakımından organ koruma ve cerrahi araştırmalarında önemlidir. İnsan dışı primatlar ise seçilmiş allotransplantasyon ve ksenotransplantasyon sorularında kullanılır; ancak maliyet, refah gereksinimleri ve türler arası biyolojik farklılıklar nedeniyle otomatik bir son doğrulama basamağı olarak görülmemelidir. Model seçimi, daha büyük hayvanın her zaman daha yüksek kanıt düzeyi sağladığı varsayımına değil, test edilen müdahalenin mekanizmasına dayanmalıdır (Anand et al., 2023; Kathis et al., 2016; Kwun et al., 2019).

3. ETİK YAKLAŞIM VE ARAŞTIRMA KALİTESİ

Hayvan kullanımının gerekçelendirilmesi, araştırmanın bilimsel sorusuyla başlamalıdır. Üç R yaklaşımı (replacement, reduction, refinement); uygun olduğunda hayvan dışı yöntemlerin

tercih edilmesini, geçerli sonuç için gerekli hayvan sayısının doğru belirlenmesini ve hayvanların ağrı, stres ve sıkıntısını azaltacak iyileştirmeleri kapsar. Azaltma ilkesi, istatistiksel gücü yetersiz bir deney tasarlamak anlamına gelmez. Ön çalışmalar, eğitim ve teknik standardizasyon, hem gereksiz hayvan kaybını hem de sonuçların cerrahi değişkenlerle karışmasını azaltabilir (Smith, Clutton, Lilley, Hansen, & Brattelid, 2018).

PREPARE kılavuzu deney öncesi hazırlığı; araştırma sorusu, araştırmacılar ile hayvan ünitesi arasındaki iş birliği ve çalışmanın bileşenlerinin kalite kontrolü üzerinden ele alır. Transplantasyon araştırmalarında bu yaklaşım, cerrahi deneyim, anestezi ve analjezi, bakım koşulları, izlem sıklığı ve insancıl sonlandırma ölçütlerinin birlikte planlanmasını gerektirir. Etik kurul onayı, deney yürütülmeden önce alınmalı; beklenmeyen komplikasyonlara yaklaşım önceden tanımlanmalıdır. Kılavuz kullanılması, etik kurul değerlendirmesinin yerini almaz (Smith et al., 2018).

ARRIVE 2.0, hayvan araştırmalarının değerlendirilebilir biçimde raporlanması için deney tasarımı, örneklem büyüklüğü, dışlama ölçütleri, randomizasyon, körleme ve sonuç ölçütleri gibi temel bilgileri öne çıkarır. Gruplara atama yöntemi ve histopatolojik değerlendirmeyi yapan kişinin grup bilgisini bilip bilmediği açıklanmalıdır. Cerrahi başarısızlıklar ile biyolojik greft kayıplarının aynı başlık altında toplanması tedavi etkisini çarpıtabilir; dışlamaların gerekçesi ve hangi aşamada belirlendiği raporlanmalıdır (Percie du Sert et al., 2020).

Deney birimi ile teknik ölçüm birbirinden ayrılmalıdır. Aynı hayvana ait birden çok biyopsi, akım sitometrisi tüpü veya görüntü alanı bağımsız hayvan sayısını artırmaz. Aynı donörden alınan iki böbreğin karşılaştırılması, eşleştirilmiş bir tasarım sağlayabilir; ancak istatistiksel model bu bağımlılığı dikkate almalıdır. Randomizasyonun cerrahi güne, operatöre veya

perfüzyon cihazına göre dengelenmesi de biyolojik etkilerin teknik değişkenlerle karışmasını azaltır. Sonuçlar yalnızca anlamlılık değerleriyle değil, etki büyüklüğü, belirsizlik ve biyolojik tekrar sayısı ile sunulmalıdır (Percie du Sert et al., 2020).

4. ALLOİMMÜN YANIT VE REJEKSİYON MODELLERİ

Gorbacheva ve arkadaşlarının fare böbrek allogreft çalışması, alıcının bağışıklık geçmişinin model sonucunu değiştirdiğini göstermiştir. Donöre reaktif hafıza CD4 T hücreleri bulunan alıcılarda greft işlevi hızla kaybolmuş; donöre özgü antikor artışı ve greftte C4d birikimi gözlenmiştir. B hücrelerinin azaltılması antikor oluşumunu baskılayarak greft sağkalımını uzatmıştır. Bu bulgular, yardımcı T hücrelerinin humoral ret yanıtını başlatabildiğini ve yalnızca T hücre sayısına bakılarak ret mekanizmasının belirlenemeyeceğini ortaya koymaktadır (Gorbacheva et al., 2016).

Humoral yanıtın deneysel olarak azaltılması da tek başına kalıcı tolerans anlamına gelmez. Kwun ve arkadaşları duyarlılaştırılmış insan dışı primatlarda daratumumab temelli müdahaleyi araştırmış ve donöre özgü antikor düzeylerinde azalma göstermiştir. Ancak yanıtın kalıcılığı ve hücresel bağışıklığın eş zamanlı kontrolü ayrı sorunlar olarak kalmıştır. Bu nedenle bir duyarsızlaştırma çalışmasında antikor değişiminin yanında greft histolojisi, yeniden antikor oluşumu ve hücresel ret de değerlendirilmelidir. Primat bulgusunun insanlardaki uzun dönem yararı doğrudan kanıtlamadığı unutulmamalıdır (Kwun et al., 2019).

Tieu ve arkadaşları böbrek allogreftinde doku yerleşik hafıza T hücrelerinin sürdürülmesi için hem ilgili antijenin hem de IL-15 sinyalinin gerekli olduğunu göstermiştir. Antijen

sunumunun veya IL-15 yolunun kesintiye uğratılması, bu hücrelerin devamlılığını ve allogreft patolojisini etkilemiştir. Çalışma, rejeksiyon araştırmalarında periferik kanın greft içindeki hücresel durumun yerine kullanılamayacağını vurgular. Dolaşımda azalmış bir hücre sayısı, dokuda yerleşmiş hücrelerin ortadan kalktığını göstermeyebilir (Tieu et al., 2023).

Zhang ve arkadaşlarının 2025 tarihli çalışmasında foliküler düzenleyici T hücrelerinin kaldırılması, fare böbrek allogreftlerinde donöre özgü B hücre yanıtlarını ve reddi artırmıştır. Tfr kaybıyla ilişkili IL-15 artışının nötralizasyonu, bu özel deneysel koşullarda sağkalımı uzatmıştır. Bu bulgu, aynı sitokinin farklı hücresel ağlarda işlev görebildiğini ve T hücresi-B hücresi ilişkisinin yalnızca toplam lenfosit sayılarıyla açıklanamayacağını gösterir. Müdahalenin insanlar için etkili bir tedavi olduğu sonucuna varmak ise mevcut preklinik kanıtı aşar (Zhang et al., 2025).

5. TOLERANS VE GREFT İÇİ İMMÜN DÜZENLEME

Kimerizm, aynı organizmada genetik kökenleri farklı hücre popülasyonlarının birlikte bulunmasını ifade eder. Bununla birlikte hematopoietik kimerizm, greftin alıcı hücreleriyle yeniden yapılanması ve geçici hücre geçişi eş anlamlı değildir. Hu ve arkadaşları, kök hücre mobilizasyonu ile düşük doz takrolimus birleştiren sıçan çalışmasında tekrarlanan uygulama sonrasında uzun süreli greft kabulü bildirmiştir. Bu sonuç, hücresel yeniden yapılanma ile greft kabulü arasındaki ilişkinin araştırılmasına katkı sağlar; her kimerizm bulgusunun aynı tolerans mekanizmasını temsil ettiğini göstermez (Hu et al., 2016).

Tolerans araştırmasında temel soru, immünsüpresyon kesildiğinde greftin ne kadar süre işlev gördüğüdür. Antijene

özgü yanıtsızlık ile genel immün baskılanma da ayrılmalıdır. Normal kreatinin veya tek bir zaman noktasında iyi histoloji, donöre özgü toleransı tek başına kanıtlamaz. Tolerans iddiası; uzunlamasına greft işlevi, doku değerlendirmesi ve gerektiğinde donör ile üçüncü taraf antijenlerine karşı yanıtların karşılaştırılmasıyla desteklenmelidir. Bu ölçütler, belirli bir çalışmanın sonucunu geniş bir tedavi ilkesine dönüştürmeden önce kullanılabilecek bir değerlendirme çerçevesidir (Hu et al., 2016).

Yokose ve arkadaşları, kendiliğinden kabul edilen fare böbrek allogreftlerinde infiltratif CD8 T hücrelerinin zaman içinde sitotoksik durumdan tükenmiş/düzenleyici benzeri bir duruma geçebildiğini göstermiştir. Tek hücre RNA dizilemesi, hücre transferi ve genetik modellerle desteklenen bu çalışma, greft infiltrasyonunun her koşulda yıkıcı bir yanıt anlamına gelmediğini ortaya koyar. Ancak düzenleyici özellikteki CD8 hücrelerinin bulunması, bu hücrelerin toleransın kurulması ve sürdürülmesi için vazgeçilmez olduğu anlamına gelmemiştir; CD8 eksik alıcılarda da greft kabulü görülmüştür (Yokose et al., 2024).

Bu yaklaşımın yöntemsel değeri, hücre sayısı ile hücre işlevini ayırabilmesidir. Transkriptomik bir kümenin “düzenleyici” olarak adlandırılması, baskılayıcı etkinin otomatik kanıtı değildir. Hücre uzaklaştırma, genetik kayıp veya işlevsel transfer deneyleri nedensel yorum için gereklidir. Aynı şekilde tek hücre verilerinin yalnızca tolere edilen greftlerden elde edilmesi yeterli değildir; ret gelişen greftler ve uygun zaman noktalarıyla karşılaştırma yapılmalıdır. Böbreğe özgü bu sonuçların kalp veya başka organ allogreftlerine doğrudan aktarılması da uygun değildir (Yokose et al., 2024).

6. ORGAN KORUMA VE MAKİNE PERFÜZYONUNDA GÜNCEL YAKLAŞIMLAR

Normotermik makine perfüzyonu, böbreğin vücut dışında oksijenlenmiş bir dolaşım altında değerlendirilmesini ve müdahaleye açık tutulmasını amaçlar. Czogalla ve arkadaşlarının sıçan perfüzyonu ile sonraki transplantasyonu birleştiren protokolü, bu yaklaşımın küçük hayvanlarda araştırılmasına olanak sağlamıştır. Böyle bir sistemde yalnızca perfüzyon sırasında iyi görünen organın değil, nakilden sonraki işlevin değerlendirilmesi önemlidir. Devre basıncı, perfüzat bileşimi ve koruma süresi, karşılaştırılabilirlik için açıkça bildirilmelidir (Czogalla et al., 2021).

Chen ve arkadaşlarının 2026 tarihli sıçan protokolü, böbreğin çıkarılması, normotermik perfüzyonla korunması ve nakledilmesini standartlaştırılmış bir akışta sunmuştur. Çalışmada yedinci gün sağkalımı ve greft histolojisi açısından statik soğuk saklamaya göre anlamlı fark gösterilmemiştir. Dolayısıyla bu yayın, yöntemin uygulanabilirliğini desteklemektedir; bütün koşullarda daha üstün bir koruma yöntemi olduğunu kanıtlamamaktadır. Model, sonraki terapötik ve görüntüleme çalışmalarının yürütülebileceği bir platform olarak değerlendirilmelidir (Chen et al., 2026).

Kawamura ve arkadaşları domuz ototransplantasyon modelinde normotermik perfüzyon sırasında mitokondri işlevini ve ATP düzeylerini incelemiştir. Mitokondriyi hedefleyen hidrojen sülfür vericisi AP39'un perfüzata eklenmesi, mitokondriyal metabolizma ve nakil sonrası greft işlevinde iyileşmeyle ilişkili bulunmuştur. Bu çalışma, organ korumada yalnızca dolaşım sağlanmasının değil, enerji metabolizmasının sürdürülmesinin de araştırılması gerektiğini göstermektedir. Bununla birlikte ototransplantasyon modeli, müdahalenin

alloimmün reddi kontrol edip etmediğini yanıtlanmaz (Kawamura et al., 2024).

Navez ve arkadaşlarının 2026 tarihli çalışması, domuz böbreklerinin normotermik perfüzyonu sırasında insan mezenkimal stromal hücrelerinin uygulanmasını değerlendirmiştir. Uygulama teknik açıdan yapılabilir ve hemodinamik olarak tolere edilebilir bulunmasına karşın, perfüzyon parametreleri, idrar üretimi ve kreatinin/iyohexsol klirensinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Bu sonuç, hücre verilmesinin doğrudan işlevsel yarar anlamına gelmediğini gösterir. Hücrelerin organla etkileşimi, kalıcılığı ve uygulama koşulları ayrıca değerlendirilmelidir (Navez et al., 2026).

Preklinik organ koruma bulgularının klinikte doğrulanması gerekir. Hosgood ve arkadaşlarının dolaşım ölümü sonrası bağışlanan insan böbreklerini inceleyen randomize çalışmasında, statik soğuk saklama sonuna eklenen bir saatlik normotermik perfüzyon gecikmiş greft fonksiyonu oranını azaltmamıştır. Bu klinik sonuç, normotermik perfüzyonun bütün biçimlerinin etkisiz olduğunu değil, kullanılan süre ve uygulama düzeninin beklenen birincil sonlanımı iyileştirmediğini gösterir. Hayvan çalışmalarında ileri sürülen mekanizma ile klinik araştırmanın sonlanım noktası arasındaki uyum bu nedenle önemlidir (Hosgood et al., 2023).

7. KSENOTRANSPLANTASYONDA GENETİK OLARAK DEĞİŞTİRİLMİŞ DONÖRLER

Ksenotransplantasyon, organın farklı türler arasında nakledilmesidir. Böbrek için araştırılan domuz donörleri, yalnızca organ boyutunun uygunluğu nedeniyle değil, hedeflenmiş genetik değişikliklerin uygulanabilmesi nedeniyle de önem taşır. Anand ve arkadaşları 69 genomik düzenleme

içeren bir domuz donör platformu geliştirmiştir. Düzenlemeler, üç glikan antijeninin kaldırılmasını, yedi insan transgeninin eklenmesini ve domuz endojen retrovirüs dizilerinin inaktivasyonunu kapsamaktadır (Anand et al., 2023).

Aynı çalışmada seçilmiş domuz–sinomolgus maymunu eşleşmelerinde yaşamı destekleyen böbrek greft işlevi 758 güne kadar sürmüştür. Bu süre bütün alıcıların ortak sonucu veya beklenen standart sağkalım değildir. Donör genotipi, alıcı seçimi, immünsüpresyon ve izlem koşullarıyla birlikte değerlendirilmelidir (Anand et al., 2023).

Kawai ve arkadaşlarının 2025 tarihli klinik bildirisi, genetik olarak düzenlenmiş domuz böbreğinin yaşayan bir insana naklini tanımlamıştır. Bu yayın, hayvan modellerinden klinik araştırmaya geçişin somut bir örneğidir; ancak tek bir alıcıya ait deneyim, uzun dönem güvenilirlik ve etkinliğin yerleştiğini göstermez. İnsan dışı primatlarda sağkalım, yaşayan insan alıcılarda izlem ve beyin ölümü gerçekleşmiş insan modelleri farklı kanıt türleri olarak değerlendirilmelidir (Kawai et al., 2025).

8. GREFT DEĞERLENDİRMESİ VE KLİNİĞE AKTARILABİLİRLİK

Greftin değerlendirilmesinde tek bir ölçüme dayanılması, hasarın niteliğini belirsiz bırakır. Kreatinin ve üre gibi işlevsel göstergeler; histopatoloji, immün hücre analizi ve araştırma sorusuna özgü moleküler ölçümlerle birlikte yorumlanmalıdır. Alıcının doğal böbreklerinin korunup korunmadığı özellikle önemlidir: doğal böbreklerin çalışması, transplantın katkısı sınırlı olsa bile toplam böbrek işlevini sürdürebilir. Bu nedenle yaşamı destekleyen greft modeli ile doğal böbreklerin korunduğu modelin sonuçları aynı anlamı taşımaz (Kaths et al., 2016).

Ret araştırmalarında donöre özgü antikorların düzeyi, komplemanla ilişkili boyamalar, vasküler hasar ve hücreyel infiltrasyon tamamlayıcı bilgiler sağlar. İleri doku hasarı olmadan antikor saptanması ile işlev kaybına eşlik eden antikor aracılı hasar aynı durum değildir. Benzer şekilde greftte lenfosit bulunması, hücrelerin zararlı veya düzenleyici işlevini tek başına belirlemez. Gorbacheva ve arkadaşlarının humoral ret modeli ile Yokose ve arkadaşlarının tolerans modeli, görünürde benzer hücreyel göstergelerin bağlama göre farklı anlam taşıyabileceğini göstermektedir (Gorbacheva et al., 2016; Yokose et al., 2024).

Klinik aktarılabirirliği artırmak için araştırılan klinik durum model tasarımına yansıtılmalıdır. Genç ve sağlıklı bir alıcının yanıtı, önceden duyarlılaşmış veya eşlik eden hastalıkları bulunan bir alıcının yanıtıyla eş tutulamaz. Benzer biçimde kısa süreli perfüzyon verisi, uzun dönem greft sağkalımının yerine kullanılamaz. Fare, sıçan, domuz ve primat çalışmalarının birlikte okunması yararlıdır; ancak farklı deneysel koşullarda elde edilen olumlu sonuçlar tek bir birikimli etkinlik kanıtı gibi birleştirilmemelidir (Gorbacheva et al., 2016; Hosgood et al., 2023; Kawai et al., 2025).

Gelecek çalışmaların değeri, yeni bir müdahalenin yalnızca istatistiksel fark oluşturmasına değil, hangi mekanizmayı hangi koşullarda değiştirdiğinin açıklanmasına bağlıdır. Genetik ve hücreyel müdahaleler nedenselliği sınamak; tek hücre analizleri hedef hücreleri belirlemek; perfüzyon sistemleri ise organa yönelik uygulamaları değerlendirmek için birbirini tamamlayabilir. Buna karşılık uygulanabilirlik, kısa dönem biyolojik etki ve klinik yarar ayrı sonuçlar olarak raporlanmalıdır. Bu ayırım, hem olumlu hem de fark göstermeyen bulguların bilimsel değerini korur.

9. SONUÇ

Böbrek transplantasyonu araştırmalarında deney hayvanı modelleri, organ korunması, alloimmün yanıt, tolerans ve alternatif donör kaynaklarının araştırılmasında farklı görevler üstlenmektedir. Başarılı model seçimi, türün yaygınlığına veya teknik kolaylığa göre değil, araştırma sorusu ile ölçülebilir sonuçları arasındaki uyuma göre yapılmalıdır. Ototransplantasyon, singeneik transplantasyon, allotransplantasyon ve ksenotransplantasyon birbirinin yerine geçebilen sistemler değildir.

Güncel çalışmalar, greft içi bağışıklık hücrelerinin işlevsel çeşitliliğini ve organın vücut dışında müdahaleye açık bir platform olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Genetik olarak değiştirilmiş domuz donörleri de yeni klinik araştırma olanakları yaratmaktadır. Bu ilerlemelerin güvenilir biçimde değerlendirilmesi; etik planlama, uygun kontrol grupları, randomizasyon, körleme ve işlevsel doğrulama gerektirir. Hayvan bulgusunun insanda yarar anlamına gelmediği açık tutulduğunda, deneysel modeller klinik araştırmalar için daha sağlam ve sınanabilir gerekçeler sağlayabilir.

KAYNAKÇA

- Anand, R. P., Layer, J. V., Heja, D., Hirose, T., Lassiter, G., Firl, D. J., . . . Qin, W. (2023). Design and testing of a humanized porcine donor for xenotransplantation. *Nature*, 622(7982), 393–401. doi:10.1038/s41586-023-06594-4
- Chen, T., Lan, K., Chen, H., Lin, L., Xie, Y., Yu, S., . . . Qiu, J. (2026). Normothermic machine perfusion of rat kidneys for transplantation. *Journal of Visualized Experiments*(227), e68251. doi:10.3791/68251
- Czogalla, J., Grahammer, F., Puelles, V. G., & Huber, T. B. (2021). A protocol for rat kidney normothermic machine perfusion and subsequent transplantation. *Artificial Organs*, 45(2), 168–174. doi:10.1111/aor.13799
- Gorbacheva, V., Fan, R., Fairchild, R. L., Baldwin, W. M., III, & Valujskikh, A. (2016). Memory CD4 T cells induce antibody-mediated rejection of renal allografts. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(11), 3299–3307. doi:10.1681/ASN.2015080848
- Hosgood, S. A., Callaghan, C. J., Wilson, C. H., Smith, L., Mullings, J., Mehew, J., . . . Nicholson, M. L. (2023). Normothermic machine perfusion versus static cold storage in donation after circulatory death kidney transplantation: A randomized controlled trial. *Nature Medicine*, 29(6), 1511–1519. doi:10.1038/s41591-023-02376-7

- Hu, X., Okabayashi, T., Cameron, A. M., Wang, Y., Hisada, M., Li, J., . . . Sun, Z. (2016). Chimeric allografts induced by short-term treatment with stem cell-mobilizing agents result in long-term kidney transplant survival without immunosuppression: A study in rats. *American Journal of Transplantation*, 16(7), 2055–2065. doi:10.1111/ajt.13706
- Kaths, J. M., Echeverri, J., Goldaracena, N., Louis, K. S., Yip, P., John, R., . . . Robinson, L. A. (2016). Heterotopic renal autotransplantation in a porcine model: A step-by-step protocol. *Journal of Visualized Experiments*(108), e53765. doi:10.3791/53765
- Kawai, T., Williams, W. W., Elias, N., Fishman, J. A., Crisalli, K., Longchamp, A., . . . Riella, L. V. (2025). Xenotransplantation of a porcine kidney for end-stage kidney disease. *The New England Journal of Medicine*, 392(19), 1933–1940. doi:10.1056/NEJMoa2412747
- Kawamura, M., Parmentier, C., Ray, S., Clotet-Freixas, S., Leung, S., John, R., . . . Robinson, L. A. (2024). Normothermic ex vivo kidney perfusion preserves mitochondrial and graft function after warm ischemia and is further enhanced by AP39. *Nature Communications*, 15, 8086. doi:10.1038/s41467-024-52140-9
- Kwun, J., Matignon, M., Manook, M., Guendouz, S., Audard, V., Kheav, D., . . . Grimberty, P. (2019). Daratumumab in sensitized kidney transplantation: Potentials and limitations of experimental and clinical use. *Journal of the American Society of Nephrology*, 30(7), 1206–1219. doi:10.1681/ASN.2018121254

- Navez, M., Gilbo, N., Vandermeulen, M., Erpicum, P., Lagny, M. G., Malisoux, C., . . . Detry, O. (2026). Infusion of human mesenchymal stromal cells during normothermic machine perfusion of porcine kidneys: A randomized, blinded, preclinical study. *Scientific Reports*. Advance online publication. doi:10.1038/s41598-026-61509-3
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., . . . Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLOS Biology*, 18(7), e3000410. doi:10.1371/journal.pbio.3000410
- Smith, A. J., Clutton, R. E., Lilley, E., Hansen, K. E. A., & Brattelid, T. (2018). PREPARE: Guidelines for planning animal research and testing. *Laboratory Animals*, 52(2), 135–141. doi:10.1177/0023677217724823
- Tieu, R., Zeng, Q., Zhao, D., Zhang, G., Feizi, N., Manandhar, P., . . . Lakkis, F. G. (2023). Tissue-resident memory T cell maintenance during antigen persistence requires both cognate antigen and interleukin-15. *Science Immunology*, 8(82), eadd8454. doi:10.1126/sciimmunol.add8454
- Yokose, T., Szuter, E. S., Rosales, I., Guinn, M. T., Liss, A. S., Baba, T., . . . Alessandrini, A. (2024). Dysfunction of infiltrating cytotoxic CD8⁺ T cells within the graft promotes murine kidney allotransplant tolerance. *The Journal of Clinical Investigation*, 134(16), e179709. doi:10.1172/JCI179709
- Zhang, H., Podestà, M. A., Cavazzoni, C. B., Wu, Y., Lee, J.-M., Li, X., . . . Sage, P. T. (2025). Follicular regulatory T cells restrain kidney allograft rejection in mice by suppressing alloreactive B cells. *Nature Communications*, 16, 2151. doi:10.1038/s41467-025-57468-4

OTOİMMÜN HASTALIKLARDA MEZENKİMAL STROMAL HÜCRELER: İMMÜNOMODÜLASYON VE KLİNİK TEDAVİ POTANSİYELİ

Ash ÖZKIZILCIK KOÇYİĞİT¹

1. GİRİŞ

Otoimmün hastalıklarda mezenkimal stromal hücrelere (MKH) yönelik ilgi, immün yanıtı düzenleme kapasitelerinin hücrel tedaviye dönüştürülmesine dayanmaktadır. Bununla birlikte biyolojik gerekçe, klinik etkinlik anlamına gelmez. Sistemik lupus eritematozus (SLE), romatoid artrit (RA), multipl skleroz (MS), sistemik skleroz ve tip 1 diyabette sonuçlar, araştırılan ürün ve hasta grubuna göre değişmektedir. Erken faz bulguların, kontrollü çalışmalarla birlikte değerlendirilmesi gerekir (Deng ve ark., 2017; Tang ve ark., 2026; Uccelli ve ark., 2021).

Bu bölüm, MKH tanımı, immünomodülasyon ve seçilmiş otoimmün hastalıklardaki klinik kanıtlara odaklanan bir literatür değerlendirmesidir. Mekanistik bulgular ile klinik yarar birbirinden ayrılarak incelenmektedir.

¹ Araş. Gör. Dr., İzmir Katip Çelebi Üniversitesi tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji A.D., ORCID: 0000-0002-0015-7070.

2. MKH TANIMI VE HÜCRESEL ÜRÜNÜN NİTELİĞİ

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneğinin önerdiği asgari ölçütler; standart hücre kültüründe plastiğe tutunma, CD73/CD90/CD105 ekspresyonu, hematopoetik belirteçler ile insan lökosit antijeni (HLA)-DR'nin bulunmaması ve in vitro osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmadır. Negatif panel CD45, CD34, CD14 veya CD11b ve CD79 α veya CD19'u kapsamaktadır (Dominici ve ark., 2006). Bu ölçütler hücre kimliğinin karşılaştırılmasını kolaylaştırırsa da tek başına immünomodülatör etkinliği göstermez.

ISCT, doku kaynağının belirtilmesini, köklülük yeterince gösterilmediğinde “stromal hücre” teriminin kullanılmasını ve amaçlanan etki mekanizmasına uygun fonksiyonel testleri önermektedir (Viswanathan ve ark., 2019). Bu nedenle farklı dokulardan elde edilen ürünler, ortak yüzey belirteçleri nedeniyle eşdeğer kabul edilmemelidir.

3. İMMÜNOMODÜLATÖR ETKİ MEKANİZMALARI

3.1. T Hücreleri ve Düzenleyici Yanıtlar

MKH'lerin immün düzenleyici özellikleri inflamatuvar uyarılara bağlı olarak değişebilir. İnsan kemik iliği kökenli MKH'lerde interferon gama ile ön uyarımın, T hücrelerinin sitokin üretimi ve degranülasyonunun baskılanmasını güçlendirdiği gösterilmiştir. Bu çalışmada proliferasyonun baskılanmasıyla efektör fonksiyonların baskılanmasının aynı mekanizmaya indirgenemeyeceği; PD-L1/PD-L2 aracılı PD-1 etkileşimlerinin, indolamin 2,3-dioksijenazdan (IDO) bağımsız efektör baskılanmasına katkısı ortaya konmuştur (Chinnadurai ve ark., 2014).

English ve arkadaşları (2009), insan MKH'leriyle birlikte kültürlenmiş CD4⁺ T hücrelerinde CD25/FOXP3 ekspresyonu ve baskılayıcı fonksiyon gelişimini göstermiştir. Saflaştırılmış T hücreleriyle yapılan deneylerde hücrelerarası temasın, prostaglandin E2'nin ve dönüştürücü büyüme faktörü beta 1'in katkıları belirlenmiştir. Ancak bu in vitro bulgu, hastalarda kalıcı ve antijene özgü tolerans sağlandığını kanıtlamaz.

3.2. B Hücreleri ve İnflamatuvar Mikroçevre

MKH'lerin B hücreleri üzerindeki etkisi de koşullara bağlıdır. Luk ve arkadaşları (2017), adipoz doku kökenli MKH'lerin düzenleyici B hücreleri (Breg hücreleri) ve interleukin-10 (IL-10) üretimini destekleyebildiğini; interferon gama (IFN- γ) ile ön uyarılmış MKH'lerin ise B hücre proliferasyonu ve immünoglobulin G (IgG) üretimini daha güçlü baskıladığını göstermiştir. Buna karşılık ön uyarım, aynı modelde düzenleyici B hücresi oluşturma kapasitesini azaltmıştır.IDO aracılı triptofan tüketimi bu değişimde rol oynamıştır. Bu nedenle farklı immünolojik sonuçların birlikte incelenmesi, tek bir sitokin veya hücre yüzdesine dayalı değerlendirmeden daha açıklayıcıdır.

3.3. Apoptoz ve Konak Fagositlerinin Katkısı

MKH etkileri yalnızca canlı hücrelerin salgılarıyla açıklanamamaktadır. Pang ve arkadaşları (2021), intravenöz verilen MKH'lerin akciğerde apoptozunu ve makrofajlar tarafından temizlenmesini immün baskılayıcı yanıtla ilişkilendirmiştir. BAK/BAX silinmesiyle apoptozun engellenmesi, preklinal modellerde baskılayıcı etkiyi azaltmıştır. Bu bulgu konak hücre yanıtının önemini gösterse de bütün otoimmün hastalıklara genellenemez.

4. OTOİMMÜN HASTALIKLARDA KLİNİK KANITLAR

4.1. Sistemik Lupus Eritematozus (SLE)

SLE’de MKH tedavisi araştırma aşamasındadır; standart tedavilerin yerine geçtiği veya etkinliğinin kesinleştiği söylenemez. Çalışmaların çoğu standart tedaviye dirençli, ağır hastalığı olan kişilerde damar içi hücre infüzyonunu değerlendirmiştir.

Lupus nefritinde Deng ve arkadaşlarının (2017) çift kör, plasebo kontrollü çalışması 18 hastayı kapsamıştır. Standart immünosupresyona eklenen allojenik umbilikal kord kökenli MKH ile remisyon 12 hastanın dokuzunda, plaseboyla altı hastanın beşinde görülmüştür. Gruplar arasında ek klinik yarar gösterilememiştir. MKH kolunda ağır enfeksiyonlar ve ağır pnömونيye bağlı bir ölüm bildirilmesi, eşlik eden tedaviler ve hastalık şiddeti bağlamında dikkatli güvenlik değerlendirilmesi gerekmektedir; bu olaylar tek başına hücresel tedaviye nedensel olarak bağlanamaz.

Erken faz, küçük bir çalışmada göbek kordonu kaynaklı MKH alan 6 kişinin 5’i 20. haftada belirlenen klinik yanıt ölçütünü karşıladı; ancak örneklem çok küçüktü ve kontrol grubu yoktu (Kamen ve ark., 2022). 2025 yılında yayımlanan başka bir faz 1 çalışmada yalnızca 8 kişi tedavi alabildi; ciddi tedaviye bağlı yan etki görülmedi, fakat araştırmacılar etkinliği doğrulamak için plasebo kontrollü çalışma gerektiğini belirtti (Farge ve ark., 2025). Bu nedenle MKH tedavisini bugün için kanıtlanmış lupus tedavisi değil, klinik araştırma kapsamında değerlendirilen deneysel bir yaklaşım olarak görmek uygun olacaktır.

4.2. Romatoid Artrit

Romatoid artritte mezenkimal stromal hücrelerin (MKH) olası etkileri, T-hücre yanıtının ve sinovyal fibroblastların

inflamatuvar özelliklerinin baskılanması ve düzenleyici T hücrelerinin desteklenmesiyle ilişkilendirilmiştir; ancak bu mekanizmalar ağırlıklı olarak hücre ve hayvan modeli çalışmalarına dayanır (Liu ve ark., 2010).

Erken faz klinik çalışmalarda göbek kordonu kaynaklı MKH'lerin damar içi uygulanmasından sonra bazı hastalarda hastalık aktivitesi ve eklem ölçütlerinde iyileşmeler bildirilmiş, ciddi kısa dönem güvenlik sinyali gözlenmemiştir (Wang ve ark., 2013). Bununla birlikte, çalışmaların çoğu küçük örneklemli veya kontrolsüzdür; hücre kaynağı, doz ve uygulama şemaları da farklılık gösterir. MKH'ler bu nedenle romatoid artritte yerleşik standart tedavi olarak değil, klinik etkinliği ve uzun dönem güvenliliği kontrollü çalışmalarla doğrulanması gereken deneysel bir yaklaşım olarak değerlendirilmelidir.

4.3. Multipl Skleroz

Multipl sklerozda mezenkimal stromal hücreler (MKH), bağışıklık yanıtını düzenleme ve sinir dokusunu destekleme potansiyelleri nedeniyle araştırılmaktadır. MESEMS, 144 hastada intravenöz otolog kemik iliği kökenli MKH'leri değerlendiren randomize, çift kör, çapraz tasarımlı faz 2 çalışmadır. İlk 24 haftadaki gadolinyum tutan lezyon sayısı açısından birincil etkinlik sonlanımı karşılanmamıştır (hız oranı 0,94; %95 güven aralığı 0,58–1,50; p=0,78). Uygulama iyi tolere edilse de bulgular araştırılan rejimin aktif MS'te inflamatuvar aktiviteyi azaltmak için kullanılmasını desteklememektedir (Uccelli ve ark., 2021). Bu nedenle MKH tedavisi MS için deneysel bir yaklaşım olup standart hastalık-modifiye edici tedavilerin yerini almamalıdır.

4.4. Sistemik Skleroz

Sistemik sklerozda mezenkimal stromal hücreler (MKH), bağışıklık düzenleyici, damar oluşumunu destekleyici ve antifibrotik özellikleri nedeniyle araştırılmaktadır. Farge ve

arkadaşları (2022), ağır diffüz sistemik sklerozlu 20 hastada aile içi allojenik kemik iliği kökenli MKH'lerin tek intravenöz infüzyonunu incelemiştir. Açık etiketli faz 1/2 çalışmada ilk on günde infüzyonla ilişkili ağır advers olay saptanmamıştır. Bununla birlikte izlemde tedaviyle ilişkilendirilmeyen ağır olaylar görülmüştür. Bulgular uygulamanın yapılabilirliğini desteklemekte; kontrol kolunun bulunmaması ise hastalık seyri üzerindeki etkinliğin belirlenmesini engellemektedir.

4.5. Tip 1 Diyabet

Eylül 2026'da yayımlanan, 18 hastanın tamamladığı çift kör faz 1 çalışmada gingiva kökenli MKH'ler değerlendirilmiştir. On ikinci haftada C-peptid ve insülin gereksiniminde olumlu bulgular bildirilmiş; periferik tükenmiş CD8+ T hücre oranındaki artış olası mekanizmayla ilişkilendirilmiştir. Bu sonuçlar erken faz ve kısa süreli olup insülin tedavisinin genel olarak bırakılabileceğini göstermez (Tang ve ark., 2026). Seçilmiş klinik çalışmalar Tablo 1'de karşılaştırılmıştır.

Tablo 1. Seçilmiş MKH klinik araştırmalarının karşılaştırılması

Hastalık	Örneklem ve tasarım	Kaynak / tür	Temel bulgu ve sınır
SLE / lupus nefriti	18; randomize, çift kör	Kord / allojenik	Standart tedaviye ek yarar gösterilmedi (Deng ve ark., 2017).
SLE	6; açık etiketli faz 1	Kord / allojenik	20. haftada 5/6 klinik yanıt; kontrol yok (Kamen ve ark., 2022).
SLE	8; açık etiketli faz 1	Kord / allojenik	Tedaviyle ilişkili ağır advers olay yok; etkinlik doğrulanmadı (Farge ve ark., 2025).
RA	172; kontrollü kohort	Kord / allojenik	Klinik iyileşme bildirildi; randomize tasarım yok (Wang ve ark., 2013).
MS	144; randomize faz 2	İlik / otolog	MRG birincil sonlanımı karşılanmadı (Uccelli ve ark., 2021).
Sistemik skleroz	20; açık etiketli faz 1/2	İlik / allojenik	Erken infüzyon güvenliliği; kontrol yok (Farge ve ark., 2022).
Tip 1 diyabet	18; randomize faz 1	Gingiva / allojenik	12 haftalık olumlu ön bulgular (Tang ve ark., 2026).

Not: MKH = mezenkimal stromal hücre; SLE = sistemik lupus eritematozus; RA = romatoid artrit; MS = multipl skleroz; MRG = manyetik rezonans görüntüleme; ilik = kemik iliği; kord = umbilikal kord. Tüm uygulamalar intravenözdür. Bulgular araştırılan ürün ve hasta grubuyla sınırlıdır. Tablo, belirtilen çalışmalar temelinde hazırlanmıştır.

5. GÜVENLİLİK VE KLİNİK UYGULAMANIN SINIRLILIKLARI

İntravasküler MKH uygulamalarını inceleyen 55 randomize çalışmada toplam 2696 hastayı kapsayan meta-analizde ateş riski artmış; enfeksiyon, tromboembolik olay ve malignite açısından anlamlı risk artışı saptanmamıştır (Thompson ve ark., 2020). Ancak farklı endikasyonlardan elde edilen bu toplu sonuç, her otoimmün hastalık ve ürün için güvenlik garantisi oluşturmaz. Küçük örneklem nadir olayları, sınırlı izlem ise geç komplikasyonları dışlayamaz.

Hücre kaynağı, otolog veya allojenik kullanım, doz, uygulama sayısı ve eşlik eden tedaviler klinik yorumda dikkate alınmalıdır. İmmünolojik değişimler organ fonksiyonu ve hastalık aktivitesiyle ilişkilendirilmelidir. Gelecekteki araştırmalar için öncelik, etki mekanizmasına uygun ürün karakterizasyonu, yeterli büyüklükte kontrollü tasarım ve uzun dönem izlem olmalıdır (Uccelli ve ark., 2021; Viswanathan ve ark., 2019).

6. SONUÇ

MKH'ler, T ve B hücreleri ile konak fagositlerini etkileyebilen hücresel ürünlerdir. Erken faz bulgular tedavi potansiyelini desteklese de deneysel immünomodülasyon klinik başarıyla eş tutulamaz. Klinik konumun belirlenmesi, hastalığa ve ürüne özgü yararın kontrollü araştırmalarda gösterilmesine bağlıdır.

KAYNAKÇA

- Chinnadurai, R., Copland, I. B., Patel, S. R., & Galipeau, J. (2014). IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN- γ -licensed human mesenchymal stromal cells. *The Journal of Immunology*, 192(4), 1491–1501. doi: 10.4049/jimmunol.1301828
- Deng, D., Zhang, P., Guo, Y., & Lim, T. O. (2017). A randomised double-blind, placebo-controlled trial of allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cell for lupus nephritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(8), 1436–1439. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-211073
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905
- English, K., Ryan, J. M., Tobin, L., Murphy, M. J., Barry, F. P., & Mahon, B. P. (2009). Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 156(1), 149–160. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03874.x
- Farge, D., Biard, L., Weil, B., Girault, V., Lansiaux, P., Munia, I., ... Tarte, K. (2025). Allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells as treatment for systemic lupus erythematosus: A single-centre, open-label, dose-escalation, phase 1 study. *The Lancet Rheumatology*, 7(4), e261–e273. doi: 10.1016/S2665-9913(24)00298-4

- Farge, D., Loisel, S., Resche-Rigon, M., Lansiaux, P., Colmegna, I., Langlais, D., ... Tarte, K. (2022). Safety and preliminary efficacy of allogeneic bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells for systemic sclerosis: A single-centre, open-label, dose-escalation, proof-of-concept, phase 1/2 study. *The Lancet Rheumatology*, 4(2), e91–e104. doi: 10.1016/S2665-9913(21)00326-X
- Kamen, D. L., Wallace, C., Li, Z., Wyatt, M., Paulos, C., Wei, C., ... Gilkeson, G. (2022). Safety, immunological effects and clinical response in a phase I trial of umbilical cord mesenchymal stromal cells in patients with treatment refractory SLE. *Lupus Science & Medicine*, 9(1), e000704. doi: 10.1136/lupus-2022-000704
- Liu, Y., Mu, R., Wang, S., Long, L., Liu, X., Li, R., ... Li, Z. (2010). Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 12(6), R210. doi: 10.1186/ar3187
- Luk, F., Carreras-Planella, L., Korevaar, S. S., de Witte, S. F. H., Borràs, F. E., Betjes, M. G. H., ... Franquesa, M. (2017). Inflammatory conditions dictate the effect of mesenchymal stem or stromal cells on B cell function. *Frontiers in Immunology*, 8, 1042. doi: 10.3389/fimmu.2017.01042
- Pang, S. H. M., D'Rozario, J., Mendonca, S., Bhuvan, T., Payne, N. L., Zheng, D., ... Heng, T. S. P. (2021). Mesenchymal stromal cell apoptosis is required for their therapeutic function. *Nature Communications*, 12(1), 6495. doi: 10.1038/s41467-021-26834-3
- Tang, Q., Zhou, L., Fan, L., Zhang, W., Tang, X., Zeng, D., ... Chen, Y. (2026). Safety and efficacy of human gingiva-

derived mesenchymal stem cells in patients with type 1 diabetes: A double-blind, randomized, placebo-controlled, phase 1 trial. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 11(1), 434. doi: 10.1038/s41392-026-03021-8

Thompson, M., Mei, S. H. J., Wolfe, D., Champagne, J., Fergusson, D., Stewart, D. J., ... McIntyre, L. (2020). Cell therapy with intravascular administration of mesenchymal stromal cells continues to appear safe: An updated systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*, 19, 100249. doi: 10.1016/j.eclinm.2019.100249

Uccelli, A., Laroni, A., Ali, R., Battaglia, M. A., Blinkenberg, M., Brundin, L., ... Freedman, M. S. (2021). Safety, tolerability, and activity of mesenchymal stem cells versus placebo in multiple sclerosis (MESEMS): A phase 2, randomised, double-blind crossover trial. *The Lancet Neurology*, 20(11), 917–929. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00301-X

Viswanathan, S., Shi, Y., Galipeau, J., Krampera, M., Le Blanc, K., Martin, I., ... Sensebé, L. (2019). Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy*, 21(10), 1019–1024. doi: 10.1016/j.jcyt.2019.08.002

Wang, L., Wang, L., Cong, X., Liu, G., Zhou, J., Bai, B., ... Liu, Y. (2013). Human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for patients with active rheumatoid arthritis: Safety and efficacy. *Stem Cells and Development*, 22(24), 3192–3202. doi: 10.1089/scd.2013.002

**TIBBİ BİYOLOJİDE GÜNCEL KONULAR VE AKADEMİK
DEĞERLENDİRMELER**

yaz
yayınları

YAZ Yayınları
M.İhtisas OSB Mah. 4A Cad. No:3/3
İscehisar / AFYONKARAHİSAR
Tel : (0 531) 880 92 99
yazyayinlari@gmail.com • www.yazyayinlari.com