



**SERVİKS KANSERİ HÜCRE HATLARINDA TEK BAŞINA VE BİRLİKTE
EF24/SİSPLATİN UYGULAMASININ BCL-2 İLİŞKİLİ miRNA
EKSPRESYONLARINA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Esra İŞÇİ BOSTANCI

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EYLÜL 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Esra İŞÇİ BOSTANCI

10/09/2024

SERVİKS KANSERİ HÜCRE HATLARINDA TEK BAŞINA VE BİRLİKTE
EF24/SİSPLATİN UYGULAMASININ BCL-2 İLİŞKİLİ miRNA
EKSPRESYONLARINA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ
(Doktora Tezi)

Esra İŞÇİ BOSTANCI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Eylül 2024

ÖZET

Serviks kanseri kadınlarda 4. sıklıkta görülen, mortalite ve morbidite açısından önemli bir jinekolojik kanserdir. Aşılama ve tarama programlarının gelişmesi ile önleme ve erken evrede tanı koyabilmek mümkündür. Ancak sosyoekonomik açıdan geri kalmış ülkelerde; tarama programlarının eksikliği dolayısıyla servikal kanser ileri evrelerde tanı almaktadır. Bu evrelerde ise cerrahi açıdan tedavi seçeneği mümkün olmadığı için kemoradyoterapi tedavisi uygulanır. Standart kemoterapötik ajan sisplatindir. Ancak özellikle kemoterapötik ajanların sebep olduğu toksisiteyi azaltmak ve tedavi başarısını arttırmak amaçlı yeni tedavi yöntemleri, hedefe yönelik tedaviler üzerinde çalışılmaktadır. EF24 sentetik bir kurkumin analogudur; yapısal olarak benzer, fakat biyoyararlanımı daha fazladır. EF24'ün kanser hücrelerine karşı yüksek derecede sitotoksik olduğu ve tümör hücresinin çoğalmasının baskılanmasında, serviks kanserinde yaygın kullanılan sisplatinden daha yüksek bir etki gösterdiği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. EF24'ün Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak apoptoz üzerine etkili olduğunu gösteren yayınlar vardır. Bu doktora tez çalışmasında; EF24'ün tek başına ve sisplatine birlikte, HeLa (HPV pozitif) ve C33A (HPV negatif) hücrelerine uygulanmasının hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR34a-5p, hsa-miR-148-3p miRNA ifade düzeylerine etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. HeLa hücrelerine EF24 tek başına uygulandığında hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-148-3p ifadelerinde anlamlı artış görülmüştür. Sisplatin tek başına uygulandığında hsa-miR-148-3p'de ifade artışı gözlenmiş; EF24/sisplatin birlikte uygulandığında hsa-miR34a-5p ve hsa-miR-146a-5p ifadelerinde anlamlı artış kaydedilmiştir. Literatürde EF24'ün apoptotik etkisinin jinekolojik ve servikal kanserler üzerindeki etkisine yönelik çalışmalar mevcut olup; tez çalışmamızda hedeflediğimiz miRNA ifadelerine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda hedefimiz; EF24'ün miRNA ifadeleri üzerinden servikal kanserli hücrelerde gösterdiği etkiyi analiz etmek ve artmış/azalmış ifadelerindeki farklılıkları sunmaktır. Bu doğrultuda amacımız, yapılacak *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara örnek teşkil ederek, hedefe yönelik tedavide yeni seçeneklerin gelişmesine katkı sağlayıcı olmaktır.

Bilim Kodu : 1055.1
Anahtar Kelimeler : EF24, miRNA, Bcl-2, serviks kanseri
Sayfa adedi : 65
Danışman : Doç. Dr. Hacer İlke ÖNEN

EFFECT OF EF24/CISPLATIN TREATMENT IN CERVICAL CANCER CELL LINES
AND THE ANALYSIS OF BCL-2 RELATED miRNA EXPRESSIONS

(Ph. D. Thesis)

Esra İŞÇİ BOSTANCI

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

September 2024

ABSTRACT

Cervical cancer is the 4th most common gynecological cancer in women and is significant in terms of both mortality and morbidity. With the advancement of vaccination and screening programs, it is possible to prevent and diagnose the disease at an early stage. However, in socioeconomically disadvantaged countries, due to the lack of screening programs, cervical cancer is often diagnosed at advanced stages. In these stages, since surgical treatment options are no longer viable, chemoradiotherapy is applied. The standard chemotherapeutic agent is cisplatin. However, to reduce the toxicity caused by chemotherapeutic agents and improve treatment success, new treatment methods and targeted therapies are being investigated. EF24 is a synthetic curcumin analog; structurally similar, but with higher bioavailability. Studies have shown that EF24 is highly cytotoxic against cancer cells and has a greater inhibitory effect on tumor cell proliferation than cisplatin, which is widely used in cervical cancer. There are also publications indicating that EF24 affects apoptosis by reducing Bcl-2 expression. In this study, our aim was to determine the effect of EF24/cisplatin alone and together, on the expression levels of the miRNAs hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-34a-5p, and hsa-miR-148-3p in HeLa (HPV positive) and C33A (HPV negative) cells. In separate applications of EF24 to HeLa cells, a significant increase is determined in the expression of hsa-miR-146a-5p and hsa-miR-148-3p, whereas a significant expression of hsa-miR-148-3p was detected in the application of cisplatin alone. But in the combined application of EF24 and cisplatin, a significant increase was noticed in the expression of hsa-miR-34a-5p and hsa-miR-146a-5p. Although there are studies in the literature regarding the apoptotic effects of EF24 on gynecological and cervical cancers, no research has been conducted on its reflection in miRNA expressions, which is the focus of our study. According to our results; our goal is to analyze the effect of EF24 on miRNA expression in cervical cancer cells in the context of treatment and to present the expression levels. Our aim is to contribute to the development of new options in targeted therapy by providing a model for future *in vivo* or *in vitro* studies.

Science Code : 1055.1
Key Words : EF24, miRNA, Bcl-2, cervical cancer
Page Number : 65
Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Hacer İlke ÖNEN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca hoşgörüsü, bilgisi, becerisi, tecrübesi ve sabrıyla her daim bana yol gösteren ve yanımda olan, bilime ve insanlığa bakış açısıyla bana ilham veren değerli danışman hocam Doç. Dr. Hacer İlke ÖNEN'e,

Doktora eğitimim boyunca bilgisini ve deneyimlerini esirgemeyen, samimiyeti ve akademisyen kimliği ile beni yönlendiren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ece KONAÇ'a,

Doktora eğitimi konusunda beni teşvik eden, bilgisi ve deneyimi ile hiçbir zaman ilgisini eksik etmeyen sayın hocam Doç. Dr. Asiye UĞRAŞ DİKMEN'e,

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde değerli katkılar sunan; tüm Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı ailesine,

Hayatımın her anında desteklerini hissettiğim, elde ettiğim tüm başarıları borçlu olduğum, sevgili anne-babam, eşim, kardeşim ve çocuklarıma; sevgi ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serviks	3
2.1.1. Embriyoloji.....	3
2.1.2. Anatomi	3
2.1.3. Histoloji	4
2.2. Human Papilloma Virüs.....	4
2.2.1. Epidemiyolojisi	4
2.2.2. HPV ve kanser epidemiyolojisi.....	6
2.3. Servikal Kanser ve Tedavisi	8
2.3.1. Cerrahi tedavi	10
2.3.2. Kemoradyoterapi	11
2.4. Apoptoz.....	12
2.4.1. Apoptozu düzenleyen protein ailesi: Bcl-2	12
2.5. Servikal Kanser ve miRNA İlişkisi	13
2.6. EF24 ve Kanser Tedavisindeki Yeri.....	15
2.6.1. EF24	15

	Sayfa
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Gereç	19
3.1.1. Hücre hatları	19
3.1.2. Kullanılan cihazlar	19
3.1.3. Kullanılan sarf malzemeler	20
3.1.4. Kullanılan kimyasal malzemeler	20
3.1.5. Kullanılan kitler ve antikorlar	21
3.2. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı	21
3.3. Yöntemler	24
3.3.1. Hücre kültürü	24
3.3.2. Bcl-2, Bcl-xL ve GAPDH protein ifade düzeylerinin western blot yöntemi ile belirlenmesi	25
3.3.3. miRNA-mRNA network analizi	26
3.3.4. Bcl-2 ve Bcl-xL ile ilişkili seçilen miRNA'ların (miR-148a-3p, miR-34a-5p, miR-146a-5p ve miR-181a-5p) ifadelerinin belirlenmesi	26
3.3.5. İstatistiksel analiz	28
4. BULGULAR	29
4.1. EF24'ün Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi ..	29
4.1.1. EF24'ün HeLa hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemiyle belirlenmesi	29
4.1.2. EF24'ün C33A hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemiyle belirlenmesi	30
4.2. CDDP'in (Sisplatin) Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi	32
4.2.1. CDDP'in HeLa hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemiyle belirlenmesi	32
4.2.2. CDDP'in C33A hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemiyle belirlenmesi	34
4.3. EF24 ve CDDP'nin Servikal Kanser Hücrelerine Uygulanmasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	35

Sayfa

4.3.1. HeLa hücrelerine ajanların birlikte uygulanmasının hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemi ile değerlendirilmesi.....	35
4.3.2. C33A hücrelerine ajanların birlikte uygulanmasının hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemi ile değerlendirilmesi.....	36
4.4. EF24 ve CDDP'nin Tek Başına veya Birlikte HeLa Hücrelerine Uygulanmasının Bcl2 ve Bcl-xL Protein İfadesi Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi.....	37
4.5. EF24 ve CDDP'nin Tek Başına veya Birlikte C33A Hücrelerine Uygulanmasının Bcl2 ve Bcl-xL Protein İfadesi Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi.....	38
4.6. EF24 ve CDDP'nin Tek Başına veya Birlikte HeLa Hücrelerine Uygulanmasının Seçilen miRNA'ların İfadeleri Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi.....	39
4.7. EF24 ve CDDP'nin Tek Başına veya Birlikte C33A Hücrelerine Uygulanmasının Seçilen miRNA'ların İfadeleri Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi.....	40
5. TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ.....	57

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. HPV risk grupları	5
Çizelge 3.1. miRNA ve qPCR’da kullanılan primer dizileri	28

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Serviksin yapısı	4
Şekil 2.2. CDDP yapısı.....	11
Şekil 2.3. miRNA biyogenez basamakları.....	15
Şekil 2.4. Kurkumin ve EF24'ün kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.5. EF24'ün biyolojik aktivitesi ve mekanizması.....	17
Şekil 4.1. EF24'ün artan konsantrasyonlarının 24 saat HeLa hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları	29
Şekil 4.2. EF24'ün artan konsantrasyonlarının 48 saat HeLa hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları	30
Şekil 4.3. EF24'ün artan konsantrasyonlarının 24 saat C33A hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları	31
Şekil 4.4. EF24'ün artan konsantrasyonlarının 48 saat C33A hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları	32
Şekil 4.5. CDDP'in artan konsantrasyonlarının 24 saat HeLa hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.....	33
Şekil 4.6. CDDP'in artan konsantrasyonlarının 48 saat HeLa hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.....	33
Şekil 4.7. CDDP'in artan konsantrasyonlarının 24 saat C33A hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.....	34
Şekil 4.8. CDDP'in artan konsantrasyonlarının 48 saat C33A hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.....	35
Şekil 4.9. EF24 ve sispaltinin belirlenen konsantrasyonlarının 24 ve 48 saat HeLa hücrelerine birlikte uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları ..	36
Şekil 4.10. EF24 ve sispaltinin belirlenen konsantrasyonlarının 24 ve 48 saat C33A hücrelerine birlikte uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları	37
Şekil 4.11. EF24 ve CDDP'nin tekli veya birlikte uygulanmasının HeLa hücrelerinde Bcl2 ve Bcl-xL protein ifadelerine olan etkisi	38
Şekil 4.12. EF24 ve CDDP'nin tekli veya birlikte uygulanmasının C33A hücrelerinde Bcl2 ve Bcl-xL protein ifadelerine olan etkisi	39

Şekil	Sayfa
Şekil 4.13. EF24 ve CDDP'nin tek başına veya birlikte HeLa hücrelerine uygulanmasının seçilen miRNA'ların ifadeleri üzerine olan etkisinin belirlenmesi	40
Şekil 4.14. EF24 ve CDDP'nin tek başına veya birlikte C33A hücrelerine uygulanmasının seçilen miRNA'ların ifadeleri üzerine olan etkisinin belirlenmesi	41

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Santigrat derece
cm ²	Santimetre kare
dk	Dakika
dl	Desilitre
g	Gram
H ₂ O	Su
IU	Uluslararası birim
kg	Kilogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mm ³	Milimetre küp
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
pmol	Pikomol
rpm	Dakika başına dönme sayısı
sn	Saniye
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar

Kısaltmalar	Açıklamalar
AKT	Protein kinase B (Protein kinaz B)
BAK BCL-2 homologous antagonist killer	Bcl-2 homolog antagonist öldürücü

Kısaltmalar**Açıklamalar****BAX BCL-2-associated X protein**

Bcl-2 ilişkili x proteini

BCL-2 B-cell lymphoma 2

B hücresi lenfoma-2

BCL2L1 BCL2-like 1

BCL2 benzeri 1

BH

BCL-2 homoloji

BSABovine serum albümin
(Sığır serum albümini)**Casp3**

Kaspaz 3

Casp8

Kaspaz 8

Casp9

Kaspaz 9

CCND2

Siklin D2

CD4

Farklılaşma kümesi

CDDP

Sisplatin

cDNA

Complementary deoxyribonucleic acid

CIN

Servikal intraepitelyal neoplazi

DMEM

Dulbecco's modified eagle's medium

DMSO

Dimethyl sulfoxide (Dimetil sülfoksit)

DNADeoxyribonucleic acid
(Deoksiribonükleik asit)**DNaz**

Deoksiribonükleaz

DNTM

Deoksiribonükleik asit metiltransferaz

DNTM1

Deoksiribonükleik asit metiltransferaz 1

DNTM3a

Deoksiribonükleik asit metiltransferaz 3a

DNTM3b

Deoksiribonükleik asit metiltransferaz 3b

dNTP

Deoksiribonükleik asit trifosfat

EF24

Difenil difloroketon

ERK

Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar

FBSFetal bovine serum
(Fetal sığır serumu)**GAPDH**

Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz

HPV

Human papilloma virus

HSV

Herpes simpleks virüs

IC50Inhibitory concentration 50
(İnhibitör konsantrasyon 50)

Kısaltmalar**Açıklamalar****MAPK**

Mitojen aktif protein kinaz

mRNAMessenger ribonucleic acid
(Mesajcı ribonükleik asit)**NF-κB**Nuclear factor kappa B
(Nükleer faktör kappa B)**NK**

Natural killer

P

P-değeri

PBSPhosphate buffered saline
(Fosfat Tamponlu Tuz)**PCR**Polymerase chain reaction
(Polimeraz zincir reaksiyonu)**PI3K**Phosphoinositide 3 kinase
(Fosfoinositid 3 kinaz)**qPCR**Quantitative polymerase chain reaction
(Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu)**REST**Relative expression software tool
(Görelî ifade yazılım aracı)**RNA**

Ribonucleic acid (Ribonükleik asit)

RNaz

Ribonükleaz

1. GİRİŞ

Serviks kanseri dünya genelinde kadınlarda 4. sıklıkta görülen; HPV- servikal kanser ilişkisinin ortaya konulduktan sonra yapılan HPV-DNA bazlı jinekolojik taramalar sonucunda ise insidans ve mortalite açısından dramatik bir gerileme kaydetmiştir. Hiçbir tarama programına dahil olmamak ise; bir kadın için servikal kansere yakalanma açısından en büyük risk faktörüdür. Preinvaziv lezyonlar ve erken evre serviks kanserinde tedavi başarısı yüz güldürücü sonuçlar vermekteyken; ileri evre servikal kanserde sağkalım oldukça azalmaktadır. Standart kemoterapi ve radyoterapi seçeneklerinin yanı sıra güncel tedavi arayışları, hedefe yönelik tedaviler bu anlamda bilim için umut olmuştur.

Çeşitli kanserlerde bazı miRNA'ların onkogen, bazılarının ise tümör baskılayıcı gen gibi işlev görmesi, tümör ilerlemesi, metastazı ve invazyonunda miRNA'ların düzenleyici olduğunu göstermektedir. miRNA'lar endometriyum, over, serviks ve hatta multifaktöriyel ve poligenik bir hastalık olan endometrioziste gen ekspresyonunu belirleyen potent regülatörlerdir.

EF24 ise anti-proliferatif ve anti-anjiyojenik özelliklerinden dolayı kanser tedavi çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. EF24'ün mikrotübül stabilizasyonunu indüklediği ve *in vitro* koşullarda çeşitli kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılayarak apoptozu uyardığı bilinmektedir.

Bu bilgiler doğrultusunda; tez çalışmamızın amacı EF24'ün tek başına ve servikal kanser tedavisinde klasik kemoterapötik olan sisplatinle birlikte, HeLa (HPV pozitif) ve C33A (HPV negatif) hücrelerine uygulanmasının ardından hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR34a-5p, hsa-miR-148-3p miRNA ifade düzeylerine etkisinin araştırılmasıdır. Bir diğer amacımız ise, apoptotik yollarda yer alan molekülleri protein düzeyinde araştırıp bu ajanların birlikte uygulanmalarının terapötik potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesidir. Mevcut çalışmamızın; günümüzde hedefe yönelik tedavide potansiyel seçenekler için ışık tutacağı öngörülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serviks

2.1.1. Embriyoloji

Kadın genital sistemi, konsepsiyondan yaklaşık 4 hafta sonra gelişmeye başlar. Testiküler gelişimin olmaması sonucu antimülleryan hormon yokluğu ile mülleryan sistem gelişir. 7. haftada bu kanal sistemi, mezonefrozun anterior ve medialine doğru dönerler ve orta hatta birleşirler; devam eden kaudal büyüme mülleryan kanalın urogenital sinüs ile birleşmesiyle sonuçlanır. Gestasyonun 11. haftasından itibaren çok katlı skuamöz hücreler, kolumnar hücreler ile yer değiştirmeye başlar ve 16. haftadan itibaren rudimenter bir serviks oluşur. Kolumnar ve skuamöz hücrelerin birleştiği nokta orjinal ya da doğal skuamokolumnar bileşke olarak adlandırılır. Serviks puberte ve reproduktif dönemde östrojen etkisi ile olgunlaşır, uzar ve endoservikal kanala doğru uzar. Bu olay ektropiyon olarak adlandırılır. Servikal dokunun; puberte, gebelik, doğum kontrol hapları gibi daha çok hormonal etmenlerle uyarılmasıyla birlikte skuamöz metaplazi lehine bir oluşum tetiklenir. Bu oluşan yeni skuamokolumnar bileşkeye fizyolojik skuakolumnar bileşke adı verilir. Orijinal skuakolumnar bileşke ile (IU 16. haftada oluşan) fizyolojik skuakolumnar bileşke arasındaki bu bölge transformasyon zonu olarak adlandırılır (Hoffmann ve diğerleri, 2012).

2.1.2. Anatomi

Uterusun inferior uzanımıdır ve iki kısma ayrılır: alt kısım porsiyon vajinalis, üst kısım ise supravajinal serviks olarak adlandırılır. Yaklaşık 3 cm uzunluğunda, 2 cm genişliğindedir.

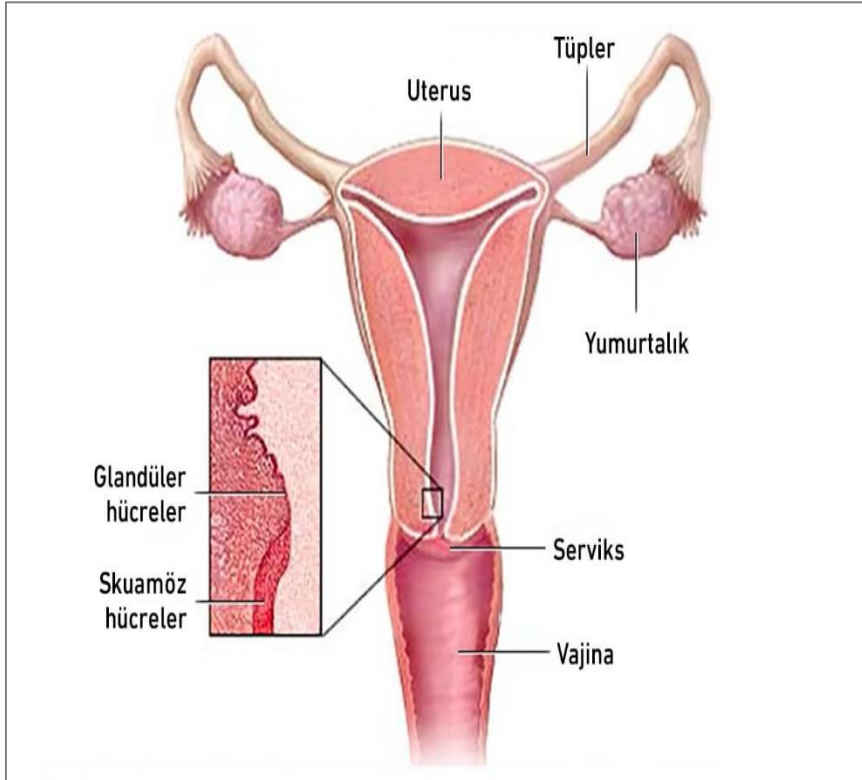
Serviks; parametrial dokular, uterosakral ligamanlar ve kardinal ligaman ile desteklenir. Serviksin kanlanması; uterin arterin servikovajinal dalları ile, venöz drenajı ise uterin venler üzerinden hipogastrik venlere doğru olur. Lenfatik drenajı, yüzeysel stromal boşluktan başlar ve parametrial dokulara dökülür. Bu efferent kanallar, paraservikal, obturator, hipogastrik, iliak ve nihayetinde paraaortik lenf nodlarına doğru devam eder. Serviks ve alt vajinanın duyusal sinirleri endoservikal kanal ve derin stromadan başlar ve uterosakral plexus (Frankenhauser gangliyonu) içinden sakral 2, 3 ve 4. sinir köklerine ulaşırlar (Berek, 2019).

2.1.3. Histoloji

Porsiyo vajinalis kısmı (ektoserviks) skuamöz epitel ile kaplıdır. Bu hücreler 4 farklı tabakaya ayrılırlar; bazal, parabazal, intermediate ve süperfisiyal tabakalar.

Skuamöz hücrelerin matürasyonu östrojen bağımlı, intermediate hücreler progesterone bağımlı, bazal-parabazal tabakalar ise androjen bağımlı ve postmenopozal dönemde baskın görülen tabakadır.

Endoservikal kanal (supravajinal bölüm) ise tek katlı kolumnar epitel hücreler ile döşelidir (Disaia ve Creasman, 2017).



Şekil 2.1. Serviksin yapısı

2.2. Human Papilloma Virüs

2.2.1. Epidemiyolojisi

Papillomavirüsler; Papillomaviridae familyasından zarflı, iki yapısal protein; L1 ve L2 olmak üzere sekiz geni kodlayan sekiz kilobaz dairesel genoma sahip küçük, çift iplikli DNA

virüsleridir (Gultekin ve diğerleri, 2020). Hücre kültüründe rekombinant olarak üretilen L1 proteini, virüs benzeri bir parçacık (VBP) oluşturmak üzere viral genomun yokluğunda kendi kendini toplar. L1 VBP, Human papilloma virüs (HPV) aşılarında kullanılan immünojendir. L1 ile birlikte L2 HPV enfektivitesine aracılık eden küçük kapsid proteindir (Bruni ve diğerleri, 2023). Yüksek riskli HPV tiplerinin onkogenik potansiyeli onkoproteinler olan E6 ve E7'nin devamlı ifadenmesine maruziyet ile ilişkilendirilmiştir. Karsinogenezin tetiklenmesi için HPV'nin insan genomuna entegrasyonu gereklidir. Entegrasyonun gerçekleşmesi sonucunda E2'nin sağladığı regülasyonla; E6 p53'ün ve apoptotik bax proteininin inhibisyonu ile telomeraz aktivasyonunu sağlarken, E7 ise RB (retinoblastoma- tümör baskılayıcı gen) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörlerini (p21, p27, p16) hedef aldığı bilinmektedir (Balasubramaniam ve diğerleri, 2019). Bu sayede, hücre döngüsünün kontrol kaybı gerçekleşir, enfekte hücreler çoğalarak malign transformasyon tetiklenir (Boulet ve diğerleri, 2007). Bunlara ek olarak, önemli genomik değişikliklerin de kanser öncülü lezyonlardan invaziv kansere dönüşüm sürecinde rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca, HPV'nin insan genomuna katıldığı DNA bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar da kanser gelişimini etkilemektedir (Oyervides-Muñoz ve diğerleri, 2018).

Günümüzde DNA sekanslaması ile tarif edilmiş 200'ün üzerinde HPV tipi belirlenmiştir. Bunların yaklaşık 35 adedi anogenital mukozayı etkilemektedir. Anogenital mukozayı tutan ve malign veya premalign lezyonlarla görülen HPV tipleri düşük riskli, muhtemel yüksek riskli ve yüksek riskli olarak üç ana kategoriye ayrılır (Guler ve diğerleri, 2013).

Çizelge 2.1. HPV risk grupları

Risk Grubu	HPV Tipleri
Düşük Risk Grubu	6, 11, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 64, 71, 72, 81, 83, 84, 87, 89, 90, 74
Muhtemel Yüksek Risk	26, 53, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82
Yüksek Risk Grubu	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59

HPV'nin kutanöz tipi cilt siğillerine neden olabilirken; mukozal tipi vulva, vajina, serviks, rektum, anüs, penis veya skrotumu infekte eder. Bu HPV tipleri vajinal, anal ve oral seks, cilt-cilt genital temas ile veya doğum kanalından geçiş sırasında bulaşır.

Her HPV enfeksiyonu kanser ya da persistan enfeksiyon ile sonuçlanmaz. Çoğunlukla HPV ile enfekte olan bir kişide humoral ve hücrel immünite gelişir ve virüs temizlenir. Aynı HPV tipi ile reenfeksiyon nadirdir. Fakat bir kişi HPV'nin diğer tipleri ile enfekte olabilir (Demarco ve diğerleri, 2020).

2.2.2. HPV ve kanser epidemiyolojisi

HPV, servikal kanser haricinde de birçok farklı dokuda da kanser gelişimine neden olabilmektedir (Plummer ve diğerleri, 2016). Servikal kanser en sık 35- 39 ve 60-64 yaş aralığında görülerek bimodal dağılımın izlendiği bir jinekolojik kanser türüdür. HPV ile serviks kanseri gelişimi arasındaki ilişki çok kuvvetlidir, hatta sigara ile akciğer kanseri arasındaki sinerjistik etkiden bile daha baskın olduğu bilinmektedir (Baseman ve Koutsky, 2005).

HPV enfeksiyonunun gelişmesinde servikal intraepitelyal neoplaziler, çok sayıda partner birlikteliği ve erken yaşta ilk koit öyküsü başta olmak üzere ileri yaş, multipartite (>5 doğum yapmış olmak), immün supresyon yaratacak durumların olması, düşük sosyoekonomik durum, Dietilstilbestrol (DES) kullanımı, sigara kullanımı ve oral kontraseptif kullanımı sayılabilir (Castellsagué ve Munoz, 2003). Ayrıca; Herpes Simpleks Virüs (HSV-2) ve Chlamidya Trachomatis gibi cinsel yolla bulaşan hastalıkların da HPV için kofaktör olması servikal kanser gelişimi riskini artırmaktadır (Smith ve diğerleri, 2002).

HPV ilişkili servikal kanser gelişimi ile ülkelerin sosyoekonomik ve sosyokültürel düzeyleri arasında ters orantılı bir ilişki bulunmaktadır. Bu farklılığın oluşmasında kanser tarama programlarının yetersiz kalması başlıca etken olmakla birlikte, coğrafi bölgedeki HPV prevalansı da servikal kanser insidansında artışa sebep olmaktadır (Vaccarella ve diğerleri, 2014). Bu ülkelerde görülme sıklığı açısından meme kanserinden sonra ikinci sırada yer alır (yılda 445000 kadın) (Ervik ve diğerleri, 2016). Ülkemizde ise gelişmiş bir tarama programının olması dolayısıyla halk sağlığı kanser istatistikleri 2018 verilerine göre serviks kanserinin görülme sıklığı yüz binde 4.2'dir. Oranın az gelişmiş ülkelerde yüksek olmasının sebebi sosyoekonomik seviyedeki düşüklük ve kadınların önleyici sağlık hizmetleriyle ilgili bilgilerinin ve bu hizmetlere ulaşımının yetersiz olması dolayısıyla taramaların yetersiz yapılması, beslenme şekillerinin de sağlıksız olması yatmaktadır (Silva ve diğerleri, 1997). Gelişmiş ülkelerde ise toplumun bilinç düzeyi, sağlık hizmetlerine ulaşımın kolaylığı ve

aşılama programlarının sağlıklı işleyişiyle birlikte serviks kanseri sıklık sıralamasında alt basamaklara gerilemektedir.

HPV enfeksiyonlarının %90'ına yakını bağışıklık sistemi vasıtasıyla 24-36 ay içerisinde elimine olmaktadır. HPV maruziyeti her koşulda enfeksiyon ile sonuçlanmaz, bunların ancak %10'unda enfeksiyon gelişebilir, kronikleşmesinde ve persiste etmesinde, immun sistem önemli bir rol oynar. Bunun yanında, persistans ve progresyonda viral yük, maruziyet süresi ve HPV tipi de en önemli etkenlerdendir (Rock ve diğerleri, 2008). Farklı risk faktörleri olduğu gibi kişide immünsupresyon yaratacak bir durumun olması enfeksiyonun seyrini değiştirebilir. Buna örnek olarak transplantasyon hastaları, HIV ile enfekte kişiler (CD4 sayısı düşük) yüksek riske sahip kişilerdir.

HPV enfeksiyonlarının latent kalması ile vücuttan tam olarak elimine olması arasındaki ayrımı net yapabilmek mümkün değildir. Latent enfeksiyonun tekrar ortaya çıkma ihtimalinin yaşla birlikte arttığı tahmin edilmektedir. Bunun nedeni; ileri yaştaki olgularda yeni cinsel partner sayısı olasılığının azalması ve kişinin immün sisteminin daha zayıf hale gelmesidir. Latent enfeksiyonların re-aktive olmasının servikal kanser gelişimiyle ilişkisinin kuvvetli olmadığı düşünülmektedir (De Vuyst ve diğerleri, 2009).

2.2.3. HPV onkojenitesi

Temel onkoproteinleri olan E6 ve E7'nin düzensiz ifadenmesi ile tetiklenen moleküler yollar; p53 ve RB gibi tümör baskılayıcı genlerin işlevlerinin bozulmasına neden olur. Bunların sonucunda ise hücre döngüsü bozulur ve apoptozun bozulmasına yol açar (Vats ve diğerleri, 2021). Öncelikli olarak E7; siklin 1, Ki67 ve p21'in üretimini sağlayan E2F proteininin ifadenmesini artırarak RB'un işlev kaybına neden olur. E6 ise ubiquitin ligaz ile bir kompleks oluşturarak hücre döngüsünü hasarlar ve dolayısıyla p53 baskılanması ile apoptozun bozulmasına neden olur (Doorbar, 2013).

E1 ve E2 proteinleri ise temel düzenleyici viral proteinler olup; E1 replikasyonda, E2 ise virüsün ana kromozomlarına bağlanmasında rol alır (Sakakibara ve diğerleri, 2013).

En önemli kapsid proteinleri olan L1 ve L2 ise virüsün konak hücreye bağlanmasından ve girişinden sorumludur. Proflaktik aşılarda L1 proteini üzerinden etki göstererek bağışıklığı

sağladığı bilinmektedir. L2 ise minör kapsid proteinidir ve virüsün mukozayı enfekte etmesinden sonra viral genomların nukleusa taşınımından sorumludur.

Hannahan ve arkadaşları (2022); kanser gelişiminde esas yolları tanımlamışlardır. Aynı ya da birlikte bulunarak tümör gelişimine sebep olan bu 14 mekanizma: sürekli proliferatif sinyalleme, hücre ölümüne direnç, metastazın aktive olması, replikatif ölümsüzlük, anjiyogenezin uyarılması, hücresel yaşlanma, genomik dengesizlik, hücresel metabolizmada bozulma, fenotipik plastisite kaybı, epigenetik programlama, immun yanıtta kaçış, polimorfik mikrobiyomlar, büyüme baskılayıcı genlere direnç ve inflamasyondur.

Bahsedilen bu maddeler ile ilgili olan kanser belirteçlerinin HPV'le olan ilişkisine baktığımızda, 2018 yılında Roden ve arkadaşlarının da belirttiği gibi; inflamasyon, immunitenin bozulması, büyüme baskılayıcı genlere karşı direnç, metastaz ve invazyon, vasküler yapı harabiyeti, genomik instabilite, hücresel metabolizmada bozulma, apoptoza direnç ve telomerazi inhibe ederek replikatif immortaliteye sebep olduğu görülmüştür (Roden ve diğerleri, 2018).

2.3. Servikal Kanser ve Tedavisi

İnvaziv serviks kanseri önlenebilir bir hastalıktır çünkü uzun ve tedavisi mümkün bir preinvaziv dönemi vardır. Servikal sitoloji ve HPV DNA testi ile tarama, erken tanı açısından çok önemlidir.

En sık semptom kötü kokulu seroanjinoz akıntı ve postkoital kanamadır. Özellikle ektoservikal yerleşimli ülser ve nekroz alanları barındıran fragil tümöral kitlenin koitus sırasında travmaya bağlı olarak postkoital kanamaya sebebiyet vermesi, süreç içerisinde gittikçe artarak ileri evre tümörlerde koitustan ve menstrual döngüden bağımsız anormal vajinal kanamaya dönüşür.

Tümörün parametriumuna invaze olması sonucu sakral ve hipogastrik plexus başta olmak üzere nöral tutulumun gerçekleşmesi gluteal bölgeye yayılan nöropatik ağrıya neden olabilir. Parametrial invazyon sonucunda üreter tutulumunun gerçekleşmesi halinde ise

pelvikalisiyel sistemin artmış geri basınç nedeniyle dilatasyonu lumbosakral ağrıyla seyredebilir. Bölgesel lenf nodu metastazları sonucu sırt ağrısı ve bacakta ödem gelişebilir.

Fizik muayenede; vajinal inspeksiyonda ektoservikal yerleşimli fragil, nekrotik tümör görülebileceği gibi endoservikal yerleşimli tümör olgularında mukozası intakt bir ektoservikse karşın fiçi şeklinde kalınlaşmış (barrel-shaped serviks) bir endoserviks ile de karşılaşılabilir. Jinekolojik muayenede vajinal tutulum, rektovajinal muayene ile de parametrial tutulum, pelvik yan duvar ve uterosakral ligament tutulumu açısından olgu değerlendirilmelidir.

Histopatolojik tanı açısından alınacak doku biyopsisi, tümörün nekrotik olmayan bir bölgesinden ve tercihan tümörün sağlam dokuyla olan sınır bölgesinden patolojik incelemeye yeterli olacak derinlikte doku alacak şekilde uygulanmalıdır (Berek & Hacker, 2020).

Servikal kanser evrelemesi klinik (radyolojik) ve histopatolojik olarak yapılabilmekte ve FIGO 2018 klasifikasyonuna göre evrelendirilmektedir.

Evre 1: Servikse sınırlı tümör (uterin korpus uzanımı bağımsız)

- 1a: Yalnızca mikroskopik kanser; Stromal invazyon < 5 mm
 - 1a1: Stromal invazyon < 3 mm derinlikte
 - 1a2: Stromal invazyon ≥ 3 mm ve < 5 mm derinlikte
- 1b: Servikse sınırlı invaziv karsinom, en derin invazyonu ≥ 5 mm
 - 1b1: ≥ 5 mm derinlikte stromal invazyon, tümör çapı < 2 cm
 - 1b2: Tümör çapı ≥ 2 cm ve < 4 cm
 - 1 b3: Tümör çapı ≥ 4 cm

Evre 2: Serviksi aşmış ancak pelvik yan duvara veya vajen alt 1/3'e kadar uzanmayan tümör

- Evre 2a: parametrial tutulum yok. Üst 2/3 vajene kadar tutulum olabilir
 - Evre 2a1: Tümör çapı < 4 cm
 - Evre 2a2: Tümör çapı ≥ 4 cm
- Evre 2b: pelvik duvar tutulumu olmaksızın parametrial tutulum var

Evre 3: Pelvik yan duvara ve/veya vajen alt 1/3'e kadar uzanan tümör (hidronefroz veya fonksiyon kaybı olan böbrek varlığı bu evreye girer)

- Evre 3a: Vajen alt 1/3 tutulum var pelvik yan duvar tutulumu yok.
- Evre 3b: pelvik yan duvar tutulumu ve/veya hidronefroz veya fonksiyonunu kaybetmiş böbrek
- Evre 3c: pelvik/paraaortik lenf nodlarında tutulum (radyolojik ya da patolojik değerlendirme)
 - Evre 3c1: pelvik lenf nodu metastazı
 - Evre 3c2: paraaortik lenf nodu metastazı

Evre 4: Gerçek pelvisi aşmış tümör yada klinik olarak rektum/mesane invazyonu

- Evre 4a: Komşu pelvik organ yayılımı (mesane/rektum mukozası)
- Evre 4b: uzak organ metastaz

2.3.1. Cerrahi tedavi

Küçük, erken evre kanseri olan hastalar histerektomi (rahim ve rahim ağzının çıkarılması) ile cerrahi olarak tedavi edilebilir. Serviks kanserinin yayılımına bağlı olarak farklı histerektomi tipleri tercih edilebilir. Serviks kanserinin cerrahi tedavisinde uterus ve çevre dokular ve 2-3 cm üst vajen ile birlikte çıkartılır. Buna radikal histerektomi denir. Ayrıca hastalığın ilk yayılım bölgeleri olan pelvik lenfadenektomi de uygulanır. Cerrahi operasyon, klasik açık ameliyat ya da laparoskopi veya robotik cerrahi gibi en az invaziv yöntemler kullanılarak yapılabilir. Ancak son yıllarda yapılan araştırmalar kapalı ameliyatlara sadece seçilmiş bazı olgulara uygulanabilceğini göstermiştir. Bu genellikle hastalığı çok erken safhada tespit edilmiş hastaları içermektedir.

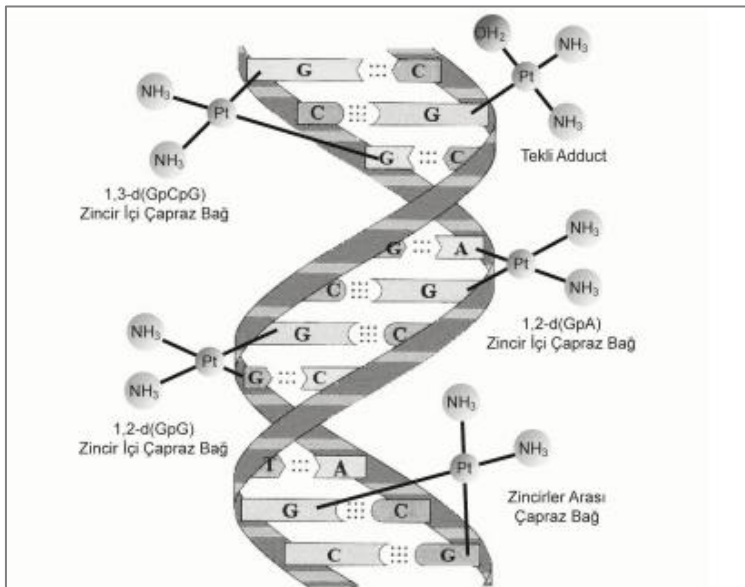
- Fertilite Koruyucu Cerrahi Seçenekler: Erken evre serviks kanserlerinde tümör 2 cm altında ve çevre dokulara yayılmamış ise tümörlü kısmı çevre dokularla çıkarıp uterusun büyük kısmını koruyarak ve onkolojik sonuçları kötüleştirmeden hastalara gebe kalma şansı verilebilmektedir. Burada temel amaç hastayı kanser açısından riskini artırmadan gebelik şansını korumaktır. Serviks üzerindeki herhangi bir cerrahi, gelecekteki gebelikler için risk taşımaktadır. Bu riskler erken doğum ve düşük şeklinde olur. Her

hasta için bireysel durumları değerlendirilerek onun için doğru olan cerrahi prosedürün seçiminde karar vermek için hasta ile hekim arasında ayrıntılı görüşme gerekmektedir ((Berek & Hacker, 2020).

2.3.2. Kemoradyoterapi

İleri evre (Evre 2B ve üzeri) servikal kanserinde kullanılan standart tedavi protokolüdür. Servikal kanserde etkinliği kanıtlanmış, en aktif ve en sık kullanılan kemoterapötik ajan sisplatindir ve en nefrotoksik ajanlardan biridir. Tek başına yanıt oranı %23'tür. Kreatin klirensine göre doz azaltılarak tek ajan olarak kullanılabilir. Tek olarak kullanılabilecek diğer ajanlar; siklofosfamid, ifosfamid, karboplatin, doksorubisin, 5-Fluorourasil, metotreksat, paklitaksel olup yanıt oranları %15-20 arasındadır. Yapılan çalışmalarda karboplatin ile sisplatin etkinliği karşılaştırıldığında eşit etkinlikte olduğu bulunmuş ve karboplatinin daha iyi tolere edilebildiği saptanmıştır.

Sisplatin (CDDP); içerdiği bileşenlerden dolayı inorganik ağır metal olup sitotoksik özelliği ön plandadır. DNA zincirinde, pürin bazları arasında çapraz bağlanmalar oluşturularak sentez inhibisyonuna neden olur. Ayrıca transkripsiyon ve translasyonu da baskılar. CDDP ile oluşturulan hasarlar; DNA onarım mekanizmalarından, nükleotid eksizyon onarımı ile düzeltilmektedir. Ancak tümör hücrelerinde DNA onarımı istenmeyen bir durumdur ve olması halinde kemoterapiye direnç gelişebilir (Çetintaş ve Eroğlu, 2013).



Şekil 2.2. CDDP yapısı (Çetintaş ve Eroğlu, 2013)

Tekli ajanların tedaviye yanıt oranındaki düşüklükler kombine tedavilerin uygulanmasına neden olmuştur. Özellikle nüks, persistan veya metastatik servikal kanserde paklitaksel+platin kombinasyonuna bir angiogenez inhibisyonu sağlayan monoklonal VEGF (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü) antikoru olan bevacizumab eklemek median sağ kalımı artırmaktadır. Ancak hipertansiyon, tromboembolik ve gastrointestinal fistül gibi komplikasyonlardaki artış göz önünde bulundurulmalıdır.

Hedeflenmiş tedavi (targeted terapi) ajanları olan erlotinib, gefitinib, lapatinib, pazopanib, sunitinib, malate, imatinib ile yapılan çalışmalarda çok anlamlı sağ kalım avantajı saptanmamıştır. Ancak daha büyük çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Berek & Hacker, 2020).

2.4. Apoptoz

Çok hücreli organizmaların gelişimi sırasında görülen hızlı hücre çoğalmasının yanında birçok hücre de ölmektedir. Programlı hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptoz ile yaşlanmış, işlevini yitirmiş, düzensiz gelişmiş veya hasarlı, çeşitli nedenlerle organizmada artık gereksinme duyulmayan hücreler ortadan kaldırılmaktadır (Wyllie, 2010; Wong, 2011).

2.4.1. Apoptozu düzenleyen protein ailesi: Bcl-2

Bcl-2 ailesi apoptozun asıl düzenleyici unsurlarıdır. Diğer bir deyişle, hücrelerin apoptoza eğimli olup olmaması Bcl-2 ailesine bağlıdır. Bcl-2 ailesi, genlerinin heterodimer ya da homodimer dizilimine bağlı olarak proapoptotik üyeler ve antiapoptotik üyeler olarak davranış gösterirler (Güneş, 2022).

Bcl-2 ailesindeki bu zıtlık sonucu proapoptotik proteinlerin baskın olduğu hücrelerde apoptoz gerçekleşirken, bu denge antiapoptotik proteinler lehine olduğunda apoptoz baskılanmış olur (Inada ve diğerleri, 1998). Proapoptotik özellikteki üyeler; BIK, BIM, PUMA NOXA, Bad, Bax ve Bak proteinleridir. Antiapoptotik özellikteki üyeler ise Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w ve Mcl-1' dir. Proapoptotik proteinler sitozolde yerleşimlidir ve bunlar, sitokrom-c ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör)' in salınımını düzenli olarak artırarak apoptozu indükleyici mekanizmaya neden olur. Antiapoptotik üyelerin yerleşimi ise mitokondrinin dış zarında, endoplazmik retikulumda ve nukleus zarındadır. İyon taşınımını

por oluşturmak suretiyle gerçekleştirirler. Hücrelerde bulunan Ca^{++} miktarını kontrol ederler ve kaspazlar için öncül form olan AIF ve sitokrom-c salınımını durdurarak apoptozu inhibe ederler (Youle ve Strasser, 2008). Bcl-2 ailesi proteinleri genelde küçük kDa ağırlığına sahiptir ve α heliksleri olan bir ya da daha çok sayıda homoloji domainin (BH domains) içeriğine göre ifade edilirler (Frenzel ve diğerleri, 2009). Bax gibi multi domain içeren proapoptotik üyeler sitoplazmada monomerler şeklinde bulunur. BH3 içeren domainin proteinleri apoptozu indüklemek için multi domainli Bax ya da Bak'a ihtiyaç duyarlar (Jiang ve diğerleri, 2010). BH3 proteinleri; Bax ve Bak'ı aktive ederek, antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerini nötralize eder ve bu sayede apoptozu teşvik eder (Janumyan ve diğerleri, 2008).

2.5. Servikal Kanser ve miRNA İlişkisi

MikroRNA'lar (miRNA'lar), endojen küçük RNA'ların (small RNA) bir sınıfını oluşturan, protein kodlamayan RNA molekülleridir. Yaklaşık 20- 23 nükleotit uzunluğunda tek iplikçikli miRNA'ların sayısı insanlarda bini geçmektedir (Calin ve Croce, 2006). Bu moleküllerin çeşitli biyolojik olaylarda ve patolojik durumlarda önemli düzenleyici roller aldığı gösterilmiştir. miRNA'ların hücresel gen ekspresyonunu transkripsiyonel ve post transkripsiyonel seviyede düzenlediği düşünülmektedir (Graves ve Zeng, 2012). mRNA'lara hedef genin düşük özgüllükte bağlanmasına, mRNA yıkımına ve translasyonel inhibisyona neden olabileceği için miRNA'lar gen ifadesinin kontrolünde önemli rollere sahiptir (Ravegnini ve diğerleri, 2022). miRNA'lar özellikle hücre tipinin belirlenmesi ve hücre farklılaşması olmak üzere pek çok fizyolojik yolda rol alır. Çeşitli kanserlerde bazı miRNA'ların onkogen, bazılarının ise tümör baskılayıcı gen gibi işlev görmesi, tümör ilerlemesi, metastazı ve invazyonunda miRNA'ların düzenleyici olduğunu göstermektedir (Garzon ve diğerleri, 2009).

miRNA'ların sentezi miRNA genlerinden RNA polimeraz II (RNA pol II) enzimi aracılığıyla öncü miRNA (pri-miRNA) sentezlenmesiyle başlar. Saç tokası şeklinde oluşan pri-miRNA nükleusta bulunan bir RNaz olan Drosha ve RNA bağlanma noktası bulunan bir protein DGCR8/Pasha'dan oluşan mikroişlemci komplekse bağlanır ve 60 ile 70 nükleotidlik parçalar haline getirilerek pre-miRNA haline dönüştürülür.

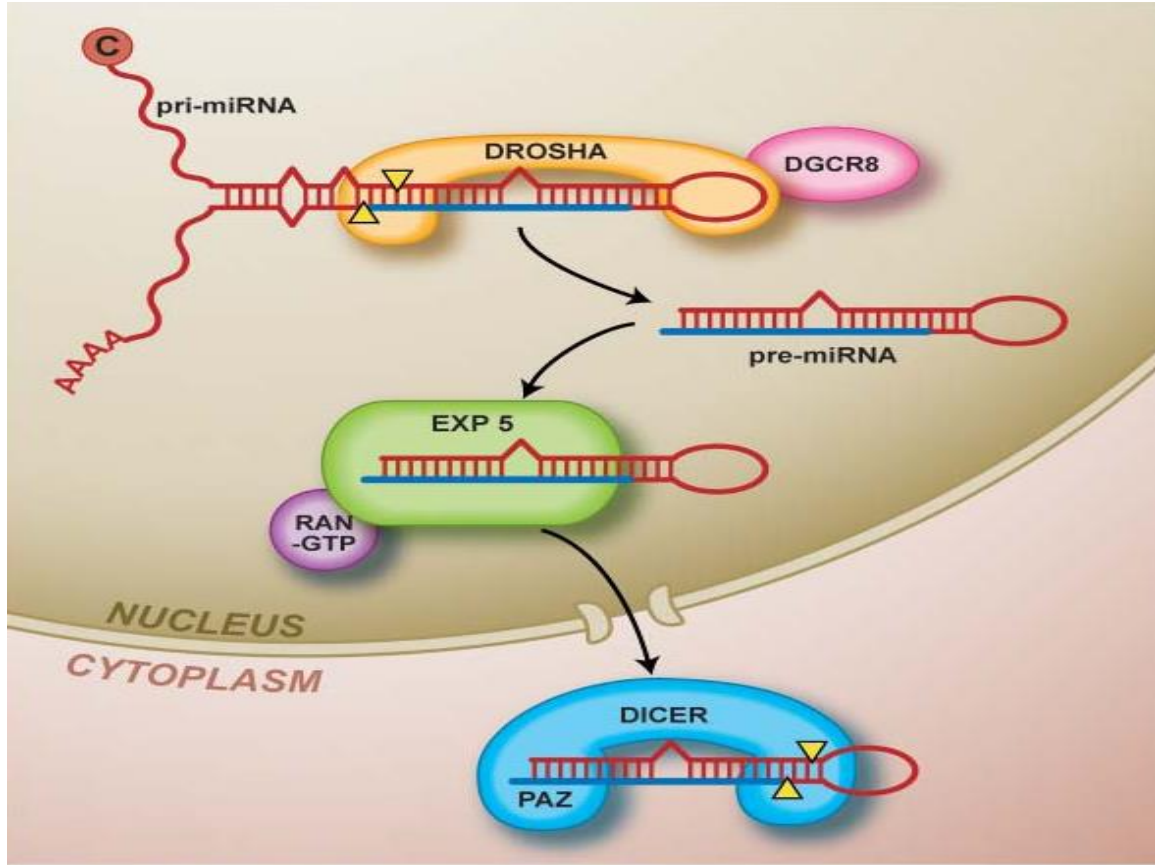
miRNA'lar hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre onkogenik veya tümör baskılayıcı özellik kazanabilir. Çeşitli kanser vakalarında, ifadeleri artan

miRNA'lar onkogen miRNA olarak adlandırılmaktadır. Onkomir olarak tanımlanan miRNA'lar tümör baskılayıcı genleri ya da hücre farklılaşmasını kontrol eden genleri etkileyerek tümör gelişimine neden olabilirler (He ve diğerleri, 2004). Tümör baskılayıcı miRNA'lar ise tümör oluşumunu onkogenleri baskılayarak engellerler. miRNA – kanser ilişkisini ortaya koyan ilk çalışmada kronik lenfositik lösemi'de miR-15 ve miR-16 genlerinin delesyona uğradıkları gösterilmiştir (Calin ve diğerleri, 2002).

miRNA'lar endometriyum, over, serviks ve hatta multifaktöriyel ve poligenik bir hastalık olan endometrioizde gen ekspresyonunu belirleyen potent regülatörlerdir (Srivastava ve diğerleri, 2017).

Chen ve diğerleri (2013) serviks kanseri ile ilgili yapmış oldukları çalışmada; serum ve doku örneklerinde olmak üzere 89 miRNA ekspresyonu göstermiştir. Ayrıca prekanseröz lezyonlarda bile normal servikal dokuya göre farklı ekspresyon gösteren miRNA türleri tespit edilmiştir.

miRNA'lar; servikal kanserde yalnızca biyomarker değil, tedaviye dirençten sorumlu ve buna bağlı olarak yeni kombinasyon terapilerinde ve hedeflenmiş tedavide umut vadetmektedir (Endale ve diğerleri, 2024).



Şekil 2.3. miRNA biyogenez basamakları (Causin ve diğerleri, 2021)

2.6. EF24 ve Kanser Tedavisindeki Yeri

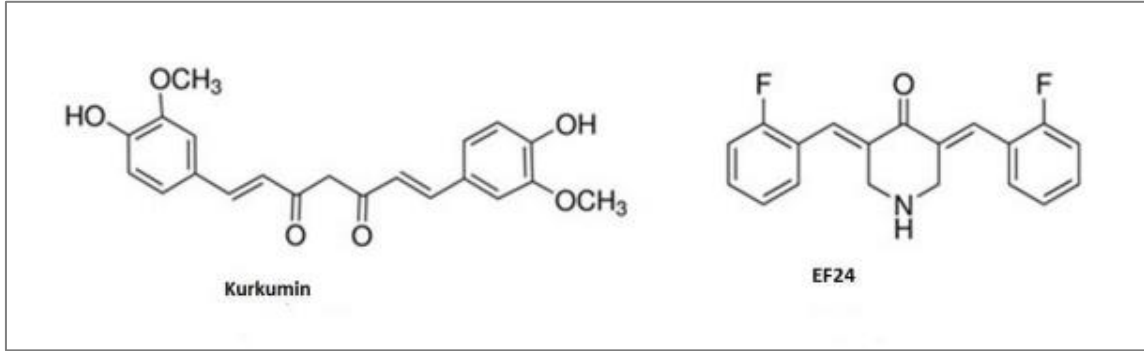
2.6.1. EF24

Curcuma longa bitkisinin köklerinden izole edilen kurkumin, zencefil ailesine ait çok yıllık otsu bir bitkidir ve yaygın olarak güney tropical Asya’da (Hindistan-Çin) yetiştirilmektedir. Genellikle gıda ürünlerinde renklendirici ve tatlandırıcı baharat olarak kullanılmaktadır (Perkins ve diğerleri, 2002).

Kurkuminin çeşitli çalışmalarda anti-oksidan, anti-inflamatuar, immün sistem düzenleyici ve anti-tümöral etkinliği gösterilmiştir. Ayrıca farklı tümörler üzerinde çok çeşitli mekanizmalarla anti-karsinojenik etki gösterdiği de bildirilmiştir. İnflamasyonu, hücre proliferasyonunu, bazı onkogenleri, tümör implantasyonunu ve karsinojenlerin biyotransformasyonunu, transkripsiyon faktörü NF-KB (Nükleer faktör kappa B) ve COX2 (siklooksijenaz) enzimini baskıladığı, buna karşılık; glutatyon-s-transferaz enzimini aktive ettiği çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur. Literatür doğrultusunda doğal kurkuminin

kimyasal koruyucu, anti-oksidan ve benzeri etkilerinin kanıtlanması ile araştırmacılar benzer yapıda ancak farklı içerikte olan sentetik kurkumin analoglarına yönelmişlerdir.

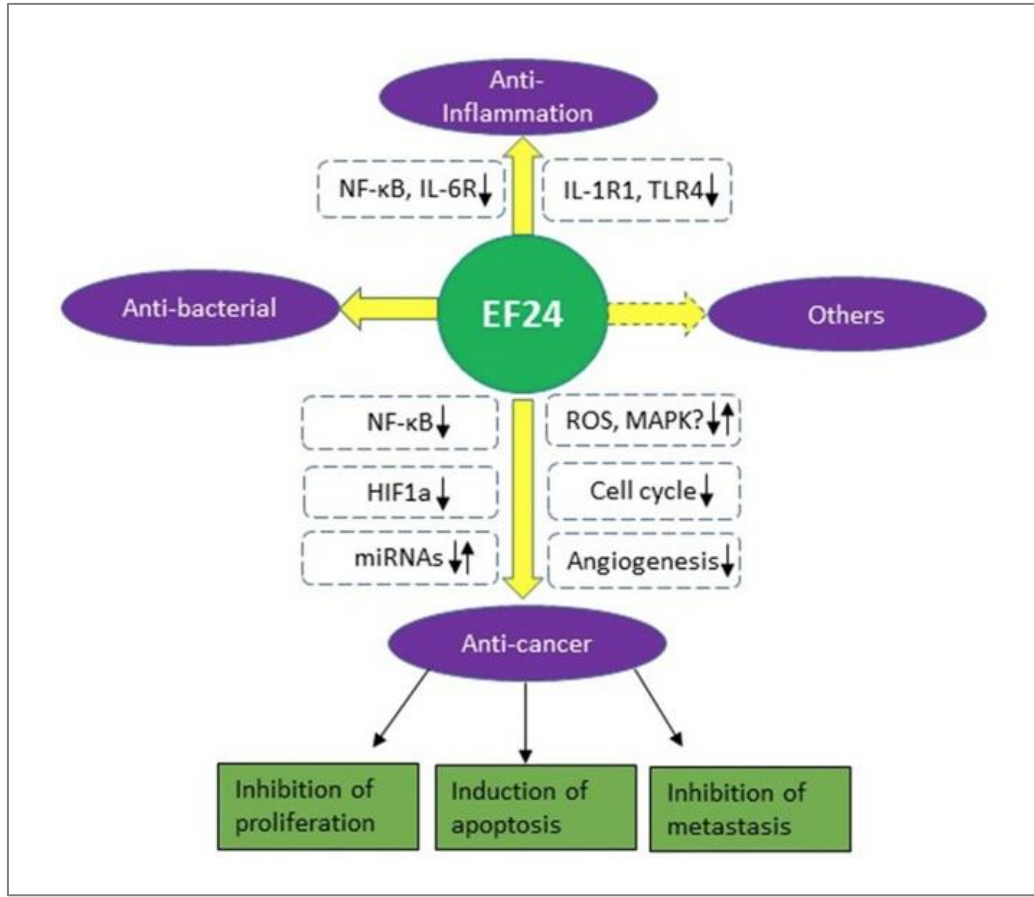
EF24 sentetik bir curcumin analogudur; yapısal olarak benzer fakat biyoyararlanımı daha fazladır (Thomas ve diğerleri, 2008).



Şekil 2.4. Kurkumin ve EF24'ün kimyasal yapısı (He ve diğerleri, 2018)

İlk olarak Adams ve diğerleri (2005) tarafından tasarlanmış ve sentezlemiştir. EF24'ün kanser hücrelerine karşı yüksek derecede sitotoksik olduğu ve tümör hücresinin çoğalmasının baskılanmasında, serviks kanserinde yaygın kullanılan sisplatinden daha yüksek bir etki gösterdiği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Adams ve diğerleri, 2005). Aynı zamanda, sisplatinden daha az toksisiteye sahiptir. EF24'ün kanser hücrelerinde, hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptotik yolları aktifleştirdiği gösterilmiştir (Kasinski ve diğerleri, 2008).

In vitro koşullarda çeşitli kanser hücrelerinin proliferasyonunun G2/M fazında bloke olmasına neden olur ve bunu takiben apoptozu uyarır. G2/M kontrol nokta proteinlerinin (pp53, p53, p21) seviyelerinde artışa neden olur. Ayrıca tümör supresor geni PTEN ekspresyonunu arttırdığı ve PTEN'in aşırı ekspresyonunun da G2/M fazında hücre döngüsünün durdurulmasını ve apoptozu indüklediğine dair çalışmalar mevcuttur. *In vivo* deneylerde ise, EF24'ün fare meme kanseri ve kolon kanseri ksenograft modellerinde tümör çoğalmasını engellediği gösterilmiştir. Ayrıca, fare meme kanseri ksenograft modelinde, EF24'ün toksisite düzeyinin düşük olduğu gözlenmiştir (Adams ve diğerleri, 2005). EF24, tek başına veya diğer ajanlarla kombinasyon halinde, bir anti-kanser terapötik ajan olarak büyük bir potansiyel göstermektedir.



Şekil 2.5. EF24'ün biyolojik aktivitesi ve mekanizması (He ve diğerleri, 2018)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hücre hatları

Bu tez çalışmasında HPV (+) HeLa ve HPV (-) C33A hücre hatları kullanıldı. Hücre hatları önceki projelerden satın alınmıştır.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

- Biyogüvenlik kabini (DanLaf)
- Cedex XS otomatik hücre sayım cihazı (Roche)
- Çalkalayıcı (Biosan)
- Derin dondurucu -86°C (Sanyo)
- Derin dondurucu -30°C (Sanyo)
- Dikey elektroforez sistemi (BioRad)
- Islak protein transfer cihazı (BioRad)
- Elektroforez güç kaynağı (Thermo)
- Hassas terazi (Precisa)
- Invert mikroskop (Zeiss)
- Jel ve membran görüntüleme cihazı (Carestream)
- Karbondioksitli Etüv (Sanyo)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan)
- Mikropipetler, 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Omnipette)
- Mikroplaka okuyucu (Molecular Devices)
- pH metre (Mettler Toledo)
- Soğutmasız santrifüj (Heraeus)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich)
- Spin vorteks (Biosan)
- Otomatik ısı döngü cihazı (ThermoFisher)
- Gerçek zamanlı PCR (BioRAD)
- Mikro-Hacim Spektrofotometre (Colibri)

3.1.3. Kullanılan sarf malzemeler

- Hücre dondurma tüpleri (Nest Scientific)
- Hücre kültür flaskları, 75 cm² (Nest Scientific)
- Hücre sayımı için tek kullanımlık slayt (Ibidi)
- 0.2, 0.6, 1.5 ve 2 mL mikrosantrifüj tüpleri (Nest Scientific)
- 96 ve 6 kuyulu hücre plakası (Nest Scientific)
- Polivinildenflorit membran (GVS)
- 15 ve 50 mL Santrifüj tüpleri (Nest Scientific)
- 10, 100, 1000 µL steril pipet uçları (Kırgen)
- 1 mL steril insülin enjektörü (Genject)

3.1.4. Kullanılan kimyasal malzemeler

- 4X Örnek Yükleme Çözeltisi (BioRad)
- β-Merkaptoetanol (Merck)
- %30 Akrilamid/ Bisakrilamid çözeltisi (Serva)
- Sığır serum albümini (Capricorn)
- Amonyum persülfat (Sigma)
- EF24 (AmBeed)
- Sisplatin (Cayman)
- Dimetil sülfoksit (Merck)
- İzopropanol (Merck)
- Metanol (İsolab)
- Fetal sığır serumu (Gibco)
- Tetrametiletildiamin (Bioshop)
- Elektrokemolimunisans Ajan (ELabScience)
- L-Glutamin içeren DMEM Besiyeri (Gibco)
- L-Glutamin içeren DMEM/F12 Besiyeri (Gibco)
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (BioShop)
- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Capricorn)
- Penisilin/Streptomisin (Sartorius)
- Protein Standartı (Applied Biological Materials)

- Sodyum dodesil sülfat (Sigma)
- Tetrametiletilediamin (Sigma)
- Tripan mavisi (Sigma)
- Tripsin (Cytiva)
- Tris (Sigma)
- Tween 20 (BioShop)
- Tris-Glisin Çözeltisi (Biorad)
- Tris-Glisin-SDS Çözeltisi (Biorad)
- RIPA Lizis çözeltisi (ChemCruz)
- 20XTBS çözeltisi (ChemCruz)

3.1.5. Kullanılan kitler ve antikorlar

- Anti-Bcl-2 primer antikor (Santa Cruz)
- Anti-Bcl-xL primer antikor (Santa Cruz)
- BCA Protein Tayin Kiti (Takara)
- Anti-GAPDH primer antikor (Santa Cruz)
- HRP konjuge antimouse sekonder antikor (Santa Cruz)

3.2. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı

a) %1 FBS içeren DMEM ve DMEM/F12 besiyerlerinin hazırlanışı;

Besiyerleri içerisine 5 mL Fetal Sığır Serum (FBS), penisilin (100 IU/mL) ve streptomisin (100 µg/mL) olacak şekilde eklendi. FBS oranı %1, penisilin-streptomisin oranı %1 olan DMEM ve DMEM/F12 besiyerleri hazırlandı.

b) %10 FBS içeren DMEM ve DMEM/F12 besiyerlerinin hazırlanışı;

Besiyerleri içerisine 50 mL FBS, penisilin (100 IU/ml) ve streptomisin (100 µg/ml) olacak şekilde eklendi. FBS oranı %10, penisilin-streptomisin oranı %1 olan DMEM ve DMEM/F12 besiyerleri hazırlandı.

c) 5 mg/mL MTT karışımının hazırlanması;

MTT çözeltisini hazırlamak için toz halinde bulunan 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde tartılıp, üzerine fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) eklendi. Hazırlanan çözelti, por çapı 0,22 µm olan filtreden geçirildi. Çözelti kullanım öncesi taze hazırlandı.

d) 32 mM EF24 stok çözeltisinin hazırlanması

5 mg EF24 tartılıp 803 µl DMSO içerisinde çözüldü. Kullanılincaya kadar -20°C'de saklandı. Hazırlanan stok çözelti seyreltilip çeşitli konsantrasyonlarda hücrelere uygulandı.

e) 1 mM Sisplatin stok çözeltisinin hazırlanması

0,5 mg sisplatin tartılıp 605,3 µL PBS içerisinde çözüldü. Stok çözelti kullanılincaya kadar -20°C'de saklandı. Hazırlanan stok çözelti seyreltilip çeşitli konsantrasyonlarda hücrelere uygulandı.

f) %10'luk SDS hazırlanması

10 g sodyum dodesil sülfat tartıldı. Üzerine 100 mL distile su eklendi ve oda sıcaklığında saklandı.

g) 1,5 M Tris çözeltisi hazırlanması

18.15 gr Tris bazı tartılıp 80 mL distile suda çözdürüldü. HCl kullanılarak pH 8.8'e ayarlandı. Son hacim distile su ile 100 mL'e tamamlandı. Hazırlanan stok çözelti +4°C'de saklandı.

h) 0,5 M Tris çözeltisi hazırlanması

6 gr Tris bazı tartılıp 80 mL distile suda çözdürüldü. HCl kullanılarak pH 6.8'e ayarlandı. Son hacim distile su ile 100 mL'e tamamlandı. Hazırlanan stok çözelti +4°C'de saklandı.

i) 1X Yürütme çözeltisinin hazırlanması

10X konsantrasyondaki Tris-Glisin-SDS stok çözeltisinden 100 mL alındı. Toplam hacim distile su ile 1000 mL'e tamamlandı.

j) 1X Tris-Glisin transfer çözeltisinin hazırlanması

10X konsantrasyondaki Tris-Glisin stok çözeltisinden 100 mL alındı. Üzerine 200 mL metanol eklendi. Toplam hacim distile su ile 1000 mL'e tamamlandı.

k) %10'luk Amonyum persülfat (APS) çözeltisinin hazırlanması

0.5 mL suda 50 mg APS çözüldü. Her çalışma öncesi taze olarak hazırlandı.

l) 1X TBS-Tween 20 çözeltisinin hazırlanması

20X TBS stok çözeltisinden 50 mL alındı, üzerine 950 mL distile su eklendi. 0,22 μ M por çaplı enjektör filtresinden geçirildi. Hazırlanan çözeltiye %0,1 oranında olacak şekilde 1 mL Tween-20 eklenerek iyice karıştırıldı. Hazırlanan çözelti +4 °C'de saklandı.

m) Primer ve sekonder antikorların hazırlanması

%1 Sığır serum albümin (BSA) içeren 10 mL TBS-T çözeltisine uygun konsantrasyonlarda sekonder antikor eklenerek hazırlandı.

n) Membran bloklama çözeltisinin hazırlanması

0,3 gr BSA tartıldı ve %3 BSA konsantrasyonda olacak şekilde 10 mL TBS-T içinde çözdürülerek hazırlandı.

o) SDS-PAGE için Jel Hazırlanması

Yükleme jeli toplamda 5 mL olacak şekilde; Distile su (3.2 mL), %30 Akrilamid/Bisakrilamid (0.5 mL), 1 M Tris (pH 6.8 1.25 mL), %10 SDS (0.05 mL), %10 APS (0.05 mL) ve TEMED (0.005 mL) karıştırılarak hazırlandı.

Toplamda 10 mL % 10'luk ayırma jeli için; Distile su (4,8 mL), %30 Akrilamid/Bisakrilamid (2.5 mL), 1,5 M Tris (pH 8.8 2.5 mL), %10 SDS (0.1 mL), %10 APS (0.1 mL) ve TEMED (0,01 mL) karıştırılarak hazırlandı.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Hücre kültürü

HPV (-) C33A ve HPV (+) HeLa servikal kanser hücreleri tez çalışmasına dâhil edildi. %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren; DMEM/F12 besiyerinde C33A hücreleri ve DMEM besiyerinde ise HeLa hücreleri %5 CO₂'li ve nemli etüvde 37°C'de çoğaltıldı.

Hücre canlılığının belirlenmesi

Hücre canlılığının belirlenmesinde MTT yöntemi kullanıldı. EF24'ün (0.5-32 µM) ve sisplatinin (5-100 µM) çeşitli konsantrasyonları tek başlarına ve birlikte 24 ve 48 saat süresince her iki hücreye de uygulandı. C33A ve HeLa hücreleri çoğaltıldıktan sonra otomatik hücre sayım cihazı ile sayıları belirlendi.

96 kuyulu hücre kültür plakalarına her kuyuya 7.500/100 µl hücre gelecek şekilde C33A hücreleri %1 FBS içeren DMEM/F12, HeLa hücreleri ise %1 FBS içeren DMEM besiyeri ile ekildi. Hücrelerin kültür plaka tabanına tutunması için ortalama 16 saat beklendi. EF24 ve sisplatinin stok çözeltileri, her hücreye özgü %10 FBS içeren besiyerleri ile seyreltildi. Kullanılan ajanların belirlenen konsantrasyonları tek başlarına ve birlikte hücrelere 24 ve 48 saat sürelerinde uygulandı. DMSO'da çözdürülen EF24'ün en yüksek konsantrasyonunda DMSO miktarı %0.1'in altındaydı. Belirtilen sürelerin sonunda ajanları içeren besiyerleri uzaklaştırıldı. Her hücreye özgü %10 FBS içeren besiyerlerinden 90 µL alınarak hücreler üzerine uygulandı. Taze hazırlanan stok MTT çözeltisinden ise 10 µL besiyerlerine eklendi. Hücreler %5 CO₂'li ve nemli etüvde 37°C'de 3 saat bekletildi. Süre sonunda MTT içeren besiyerleri uzaklaştırıldı. Bu sürede oluşan formazan kristallerinin çözülmesi için her kuyuya 100 µl DMSO eklendi. Her kuyunun 570 nm'deki absorbans değerinin belirlenmesi için, 96 kuyulu hücre kültür plakası mikroparka okuyucusuna (Spectramax M3 plate reader, Molecular Devices) yerleştirildi. Hücrelere uygulanan her konsantrasyon 6 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. Her ajanın belirlenmiş konsantrasyonuna ait ortalama absorbans değerleri hesaplandı. EF24 uygulanmayan kontrol hücrelerinin canlılığı (DMSO kontrol) hücre

canlılık oranı %100 olarak kabul edildi. Benzer şekilde, sisplatin uygulanmayan hücrelerin canlılığı (PBS kontrol) da %100 olarak hesaplandı. Ajanlara ait ortalama absorbans değerlerinin, kontrol hücrelerinin absorbans değerine oranlanması ile % canlılık oranları belirlendi.

3.3.2. Bcl-2, Bcl-xL ve GAPDH protein ifade düzeylerinin western blot yöntemi ile belirlenmesi

Protein izolasyonu

C33A ve HeLa hücreleri her kuyuda 10^6 hücre olacak şekilde %1 FBS içeren besiyerleri ile 6 kuyulu hücre kültür plakasına ekildi. 16 saat sonra hücrelerin kültür plakasına yapışıp yapışmadığı invert mikroskop altında kontrol edildikten sonra, MTT analizi sonucu seçilen sisplatin (10 μ M) ve EF24 (4 μ M) konsantrasyonları hücrelere tek başlarına ve birlikte 48 saat uygulandı. Süre bitiminde besiyeri çekilerek, soğuk 1X PBS tamponu ile hücreler bir defa yıkandı. Hücreler üzerine proteaz inhibitörlerinin bulunduğu RIPA lizis çözeltisi eklenerek, hücre kazıyıcı yardımı ile kültür plakasından ayrılması sağlandı. Mikrosantrifüj tüpüne alınan hücre lizatları +4°C’de 13.500 rpm’de 10dk santrifüj edildi ve üst kısımdaki sıvı fazda kalan proteinler yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Elde edilen proteinlerin konsantrasyonları bikinkoninik asit (BCA) protein değerlendirme kiti ile belirlendi. Proteinler 0,5 mL’lik mikrosantrifüj tüplerine eşit hacimlerde bölünerek -80 °C’de derin dondurucuda saklandı.

Western blot yöntemi ile protein ifade düzeylerinin belirlenmesi

Proteinler sodium dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıldı. Yükleme ve ayırma jeli döküldü. Örnekler her kuyuya 30 μ g protein gelecek şekilde örnek hazırlama solüsyonu ile dilüe edildi. 95 °C de 5 dakika denatüre edildi. Oda sıcaklığına gelince ilk kuyuya marker protein çözeltisi ve diğer kuyulara örnekler yüklendi. Jel 1X running buffer içerisinde 40 mA’de 1 saat yürütüldü.

Jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinlerin gözle takibi marker aracılığı ile yapıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra jel üzerinde bulunan proteinler PVDF membrana transfer edildi. Transfer kasetine sünger, kurutma kağıdı, jel ve PVDF membran yerleştirildi. Transfer tamponu içerisinde 1 saat 300 mA’de transfer işlemi gerçekleştirildi.

Membranlar %3 BSA içeren TBS çözeltisi içinde bloklandı. 5 kez TBS-T çözeltisi ile 5 dk yıkandı. Bcl-2, Bcl-xl ve GAPDH primer antikorları eklenip, bir gece boyunca +4°C de çalkalayıcı üzerinde bekletildi. 5 kez TBS-T çözeltisi ile 5 dk yıkandı. Sekonder antikorlar eklenip, oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat beklettikten sonra 5 kez TBS-T çözeltisi ile 5 dk yıkandı. Membranlar CL Chemiluminescent HRP Western substrat solüsyonu ile karanlıkta 5 dakika karıştırıcı üzerinde bekletilip, Gel Logic 2200 Pro cihazında Carestream programı kullanılarak görüntülendi. Bant kalınlıkları ImageJ programı kullanılarak değerlendirildi.

3.3.3. miRNA-mRNA network analizi

miRTargetLink 2.0 veri tabanı kullanılarak Bcl2 ve Bcl-xL geni ile ilişkili miRNA'lar belirlenmiştir. Ayrıca, "CircNet" veri tabanında kullanılarak, miRTargetLink veri tabanında belirlenmiş olan miRNA'ların, Bcl2 ve Bcl-xL mRNA'sı ile ilişkili olup olmadığı da kontrol edilmiştir. Kanserler, özellikle de jinekolojik kanserler ve servikal kanserle ilişkili miRNA'lar araştırılmıştır. Veri tabanlarına göre, Bcl2 mRNA'sı ile ilişkili olduğu belirlenen hsa-mir-148a-3p, mir-34a-5p, mir-181a-5p ve mir-146a-5p miRNA'ları çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca, mir-34a-5p'nin Bcl-xL mRNA'sı ile de ilişkili olduğu belirlenmiştir.

3.3.4. Bcl-2 ve Bcl-xL ile ilişkili seçilen miRNA'ların (miR-148a-3p, miR-34a-5p, miR-146a-5p ve miR-181a-5p) ifadelerinin belirlenmesi

miRNA izolasyonu

Kültür örneklerinden DiaRex® Total RNA Ekstraksiyon Kit (Kat No: TR-0877 Diagen, Türkiye) kullanılarak total RNA elde edildi. Kısaca pellet üzerine 600 µL Lizis (LBD) solüsyonu eklendi. Kısa bir vorteks yapıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon yapıldı. Inkübasyon sonunda içerik maksimum hızda 15 saniye spin atıldı ve pellete temas etmeden tüm içerik yeni tüpe aktarıldı. Üzerine LBD solüsyon miktarı kadar (350/600 µL) mutlak etanol eklenip, pipetle karıştırıldı. RNA kolonun ortasına yüklendi, 1 dk, 10.000 rpm' de santrifüj edildi. Kolon yeni bir 2 mL mikrosantrifüj tüpüne alınarak, 500 µL Yıkama Solüsyonu-1 (WBD-1) eklendi. 1 dk, 8000 x g (10,000 rpm) de santrifüj edildi. Kolon yeni bir 2 mL tüpe alındı, 500 µL Yıkama Solüsyonu-2 (WBD-2) eklendi, 1 dk, 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Tekrar 500 µL Yıkama Solüsyonu-2 (WBD-2) eklendi, 3 dk maksimum hızda 14.000 rpm'de santrifüj edilir. Etanolün tamamen uzaklaştırılması için, kolon yeni bir

2 mL tüpe alınıp, 1 dk maksimum hızda 14,000 rpm’de santrifüj edildi. RNA kolonu yeni tüpe aktarıldı, 30-50 µL RNaz içermeyen -H₂O kolonun ortasına gelecek şekilde eklendi, 1 dk 10,000 rpm’de santrifüj edildi.

cDNA sentezi

Muhafaza edilen numuneler buz üzerinde çözdürüldü. cDNA işlemi öncesinde RNA saflığı ve konsantrasyonları (Colibri Titertek Berthold, Almanya) cihazında belirlendi. RNA ölçümününün sonra numuneler cDNA sentez reaksiyonunda 1 µg olacak şekilde steril distile su ile seyreltildi. Ardından SOLIScript® RT cDNA synthesis KIT (SolisBIODYNE, Estonya) kullanılarak cDNA sentez işlemine geçildi. Kısaca cDNA aşaması total hacim 20 µL olacak şekilde 2 µL 10x RT reaction buffer, 1 µL reverse transkripsiyon enzimi, 1 µL oligo (dT) primer (ya da stem-loop primer), 0.5 µL dNTP mix, 0.1 µL RNase inhibitor ve değişken miktarlarda distile su ile numune kullanıldı. Tüm içerik hazırlandıktan sonra konvensiyonel PCR cihazına (ThermoFisher Veriti, Amerika) yüklendi. 50°C’de 55 dk reverse transkripsiyon işlemi gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda enzim, 85 °C’de 5 dk ’da inaktive edildi. İnaktivasyonun ardından cDNA ürünleri -20 °C’de muhafaza edildi.

miR-148a-3p, miR-34a-5p, miR-146a-5p ve miR-181a-5p miRNA’ların ifade düzeylerinin kantitatif olarak belirlenmesi

miR-148a-3p, miR-34a-5p, miR-146a-5p ve miR-181a-5p miRNA’larının ifade düzeyi, kantitatif RT-PCR (qPCR) yöntemi ile analiz edildi. Çalışmada housekeeping gen olan RNU6A (U6) kullanıldı. miRNA’ların çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri Tablo 1’de yer almaktadır.

Gene özgü primer tasarımı Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) ile yapıldı. Seçilen forward ve reverse primerleri Biomers (Almanya) tarafından sentez edildi. Liyofilize haldeki primerler 100 mM olacak şekilde nükleaz free dH₂O ile çözdürüldü. Gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için SolisFAST® SolisGreen® qPCR Mix (no ROX), 5X (SolisBIODYNE, Estonya) kullanıldı. 1X PCR reaksiyonu için total hacim 20 µL olacak şekilde; 4 µL master mix, 5 µL mix B (0.3 mM forward ve reverse primerleri içerir), 6 µL dH₂O ve 5 µL cDNA’dan oluştu. Realtime PCR cihazında (BioRAD CFX-96, Almanya) 0,1 mL mikrosantrifüj tüpleri kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirildi. Deney programı; ilk denatürasyon 95 °C’de 5 dk 1 tekrar; 95 °C

5 sn, 55 °C’de (miR-34a-5p/miR-146a-5p/miR-181a-5p) 57 °C’de (U6/miR-148a-3p) 30 sn (bağlanma), 45 tekrar; 72 °C’de 5 sn olarak gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucu miRNA’ların ifade düzeyini gösteren cycle threshold (Ct) değerleri belirlendi. miRNA’ların ifade düzeyleri U6’a göre normalize edildi.

Çizelge 3.1. miRNA ve qPCR’da kullanılan primer dizileri

miRNA	Primer	Tm	Melting Tm
miR-148a-3p-F	CACGCATCAGTGCCTACAG	57°C	71-75°C
miR-148a-3p-Stem-loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGCCGAGGTATTCGCACT GGATACGACACAAAG		
miR-34a-5p-F	CACGCATGGCAGTGTCTTAG	55°C	70-72°C
miR-34a-5p-Stem-loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGCCGAGGTATTCGCACT GGATACGACACAACC		
miR-146a-5p-F	CACGCATGAGAAGTGAATTCC	55°C	71-73°C
miR-146a-5p-Stem-loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGCCGAGGTATTCGCACT GGATACGACAACCCA		
miR-181a-5p-F	CACGCAAACATTCAACGCTG	55°C	70-74°C
miR-181a-5p-Stem-loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGCCGAGGTATTCGCACT GGATACGACACTCAC		
Universal-R	CCAGTGCAGGGCCGAGGTA	57°C	71-73°C
U6_F	GCAAATTCGTGAAGCGTTC		
U6_R	AGAAGCCATTAGTGTCCAAG		
U6-Stem-loop	GCTACCAGAAGCCATTAGTGTCCAAGTACTGCAA TGAGAAGTTCGTCTGCGGGTAGCTTTTTTTTTT AAAAATAT		

3.3.5. İstatistiksel analiz

Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel analizinde “SPSS 23.0” programı kullanıldı. P değerinin <0.05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hücre canlılığı deney sonuçlarının istatistiksel analizinde Student’s t-testi kullanıldı. Western blot yönteminden elde edilen bant görüntüleri Image J programı kullanılarak kantitatif olarak analiz edildi. miRNA’ların ifade farklılıklarının anlamlılığı REST (2009) programı ile karşılaştırıldı (Pfaffl ve diğerleri, 2002).

4. BULGULAR

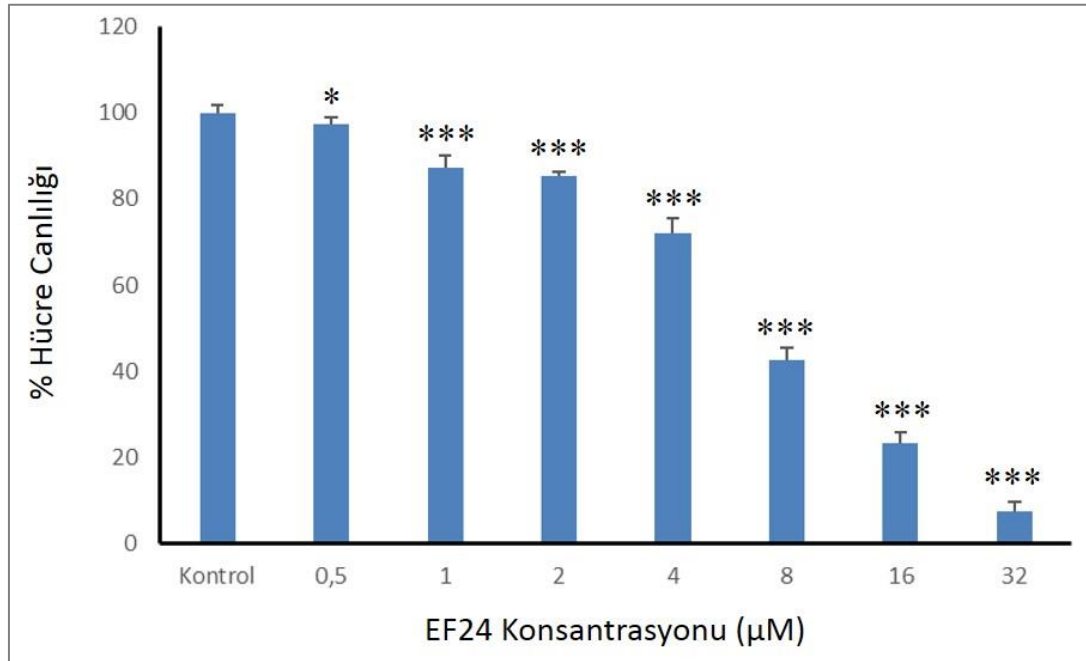
4.1. EF24'ün Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi

EF24 değişen süre ve konsantrasyonlarda tek başlarına HeLa ve C33A hücrelerine uygulanmasının hücre canlılığına olan etkileri değerlendirildi ve istatistiksel analizleri yapıldı.

4.1.1. EF24'ün HeLa hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemiyle belirlenmesi

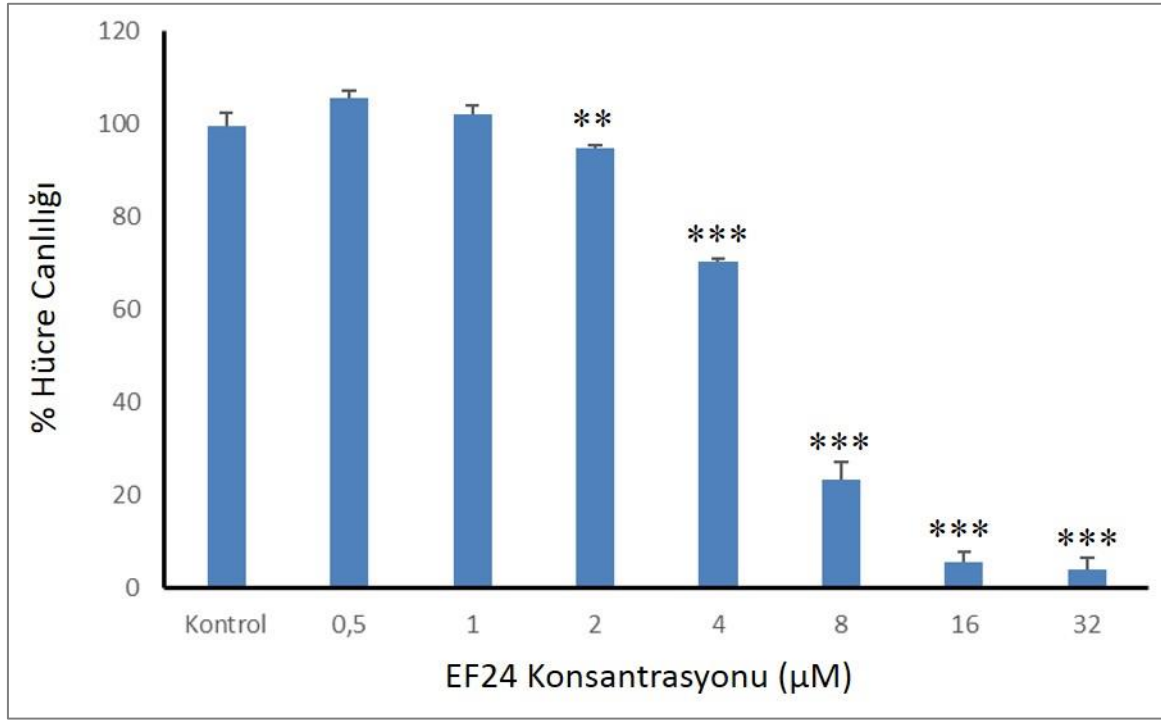
EF24'ün değişen süre ve konsantrasyon aralığında HeLa hücrelerine uygulanmasının hücre canlılığına olan etkileri değerlendirildi ve istatistiksel analizleri yapıldı.

EF24 artan konsantrasyonlarda 24 saat HeLa hücrelerine uygulandı. Kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında, artan EF24 konsantrasyonlarıyla birlikte hücre canlılığının azaldığı ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. Hücre canlılığının 0,5 μ M'da %97, 1 μ M'da %87, 2 μ M'da %85, 4 μ M'da %72, 8 μ M'da %43, 16 μ M'da %23, 32 μ M'da %7 olduğu belirlendi (Grafik 1).



Şekil 4.1. EF24'ün artan konsantrasyonlarının 24 saat HeLa hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. Kontrol grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri. *:p<0.05; ***:p<0.001

EF24 artan konsantrasyonlarda HeLa hücrelerine 48 saat uygulandı. 2 μM ve üstü konsantrasyonlarda hücre canlılığında belirlenen azalma istatistiksel olarak anlamlıydı. Hücre canlılığının 2 μM 'da %95, 4 μM 'da %70, 8 μM 'da %23, 16 μM 'da %6, 32 μM 'da %4 olduğu saptandı (Grafik 2).

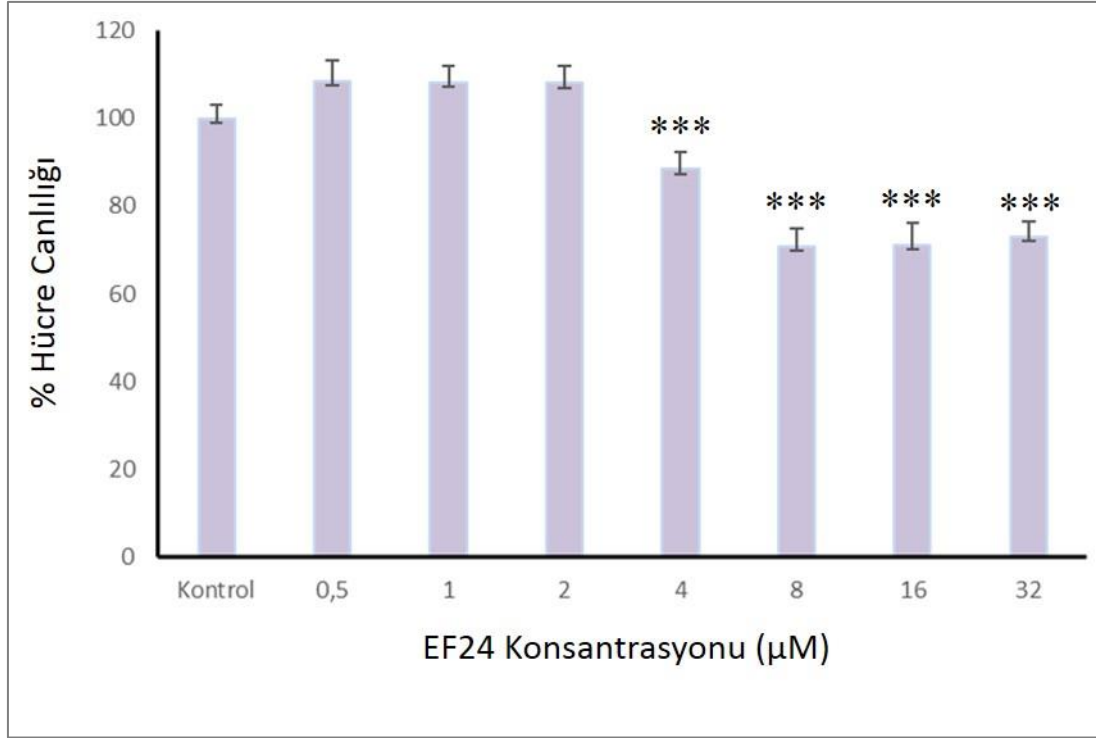


Şekil 4.2. EF24'ün artan konsantrasyonlarının 48 saat HeLa hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. Kontrol grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri. *:p<0.001; ***:p<0.0001

4.1.2. EF24'ün C33A hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemiyle belirlenmesi

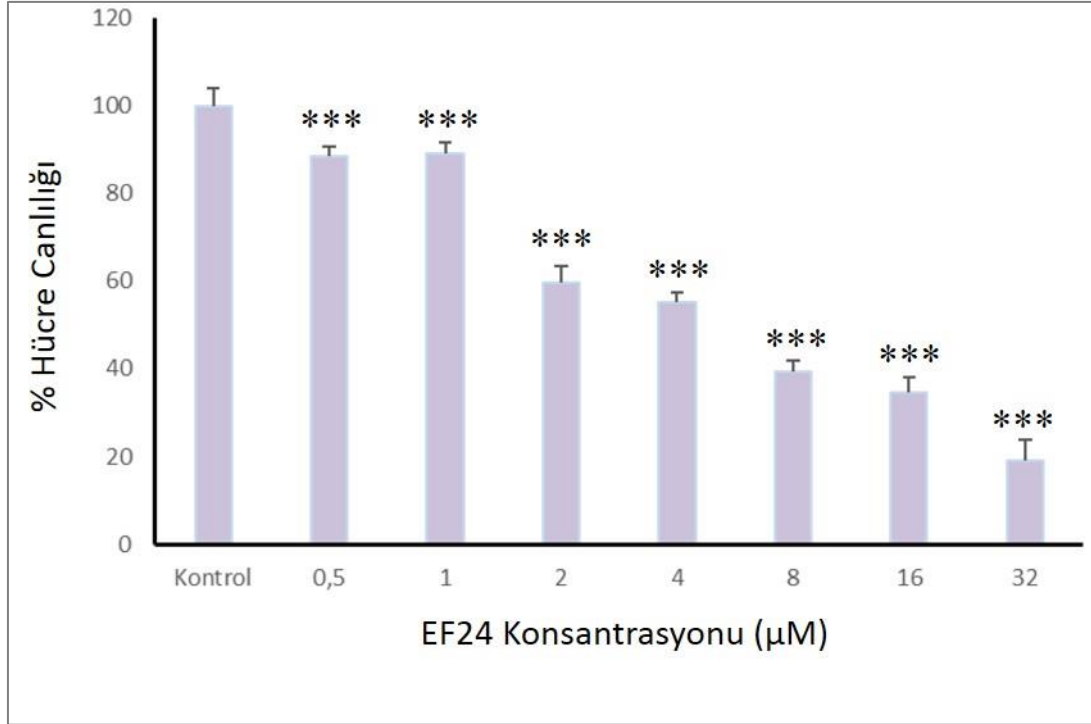
EF24'ün değişen süre ve konsantrasyon aralıklarında C33A hücrelerine uygulanmasının hücre canlılığına olan etkileri değerlendirildi ve istatistiksel analizleri yapıldı.

EF24 artan konsantrasyonlarda C33A hücrelerine 24 saat uygulandı. 4 μM ve üstü konsantrasyonlarda hücre canlılığında azalma olduğu belirlendi. Bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Hücre canlılığının 4 μM 'da %88, 8 μM ve 16 μM 'da %71, 32 μM 'da %73 olduğu tespit edildi (Grafik 3).



Şekil 4.3. EF24'ün artan konsantrasyonlarının 24 saat C33A hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. Kontrol grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri. ***:p<0.001

EF24 artan konsantrasyonlarda 48 saat C33A hücrelerine uygulandı. Uygulanan tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığının azaldığı ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. Hücre canlılığının 0,5µM ve 1µM'da %89, 2µM'da %60, 4µM'da %55, 8µM'da %39, 16µM'da %35, 32µM'da %19 olduğu belirlendi (Grafik 4).



Şekil 4.4. EF24'ün artan konsantrasyonlarının 48 saat C33A hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. Kontrol grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri. ***:p<0.001

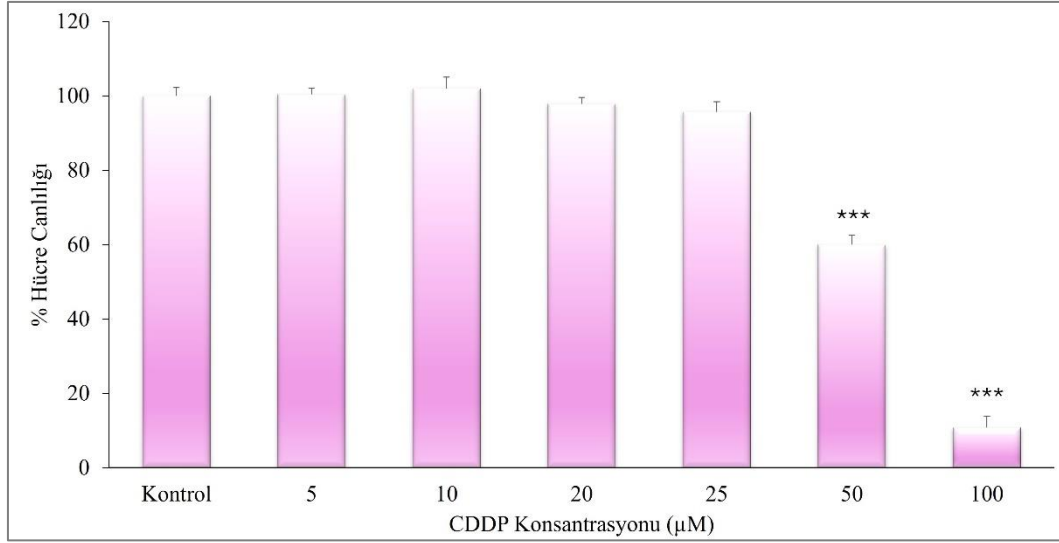
4.2. CDDP'in (Sisplatin) Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi

CDDP değişen süre ve konsantrasyonlarda tek başlarına HeLa ve C33A hücrelerine uygulanmasının hücre canlılığına olan etkileri değerlendirildi ve istatistiksel analizleri yapıldı.

4.2.1. CDDP'in HeLa hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemiyle belirlenmesi

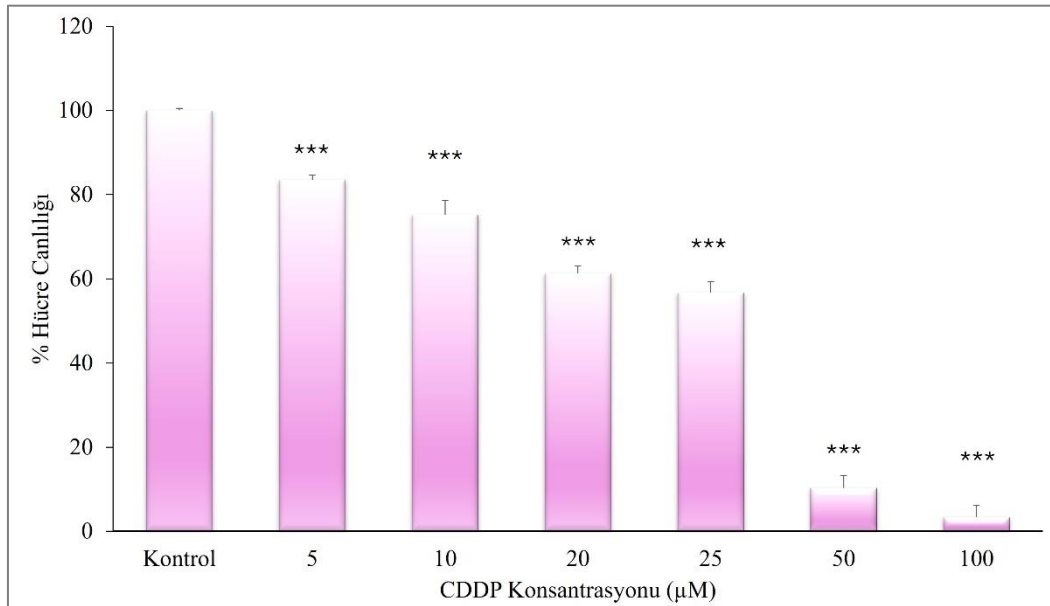
CDDP'in değişen süre ve konsantrasyon aralığında HeLa hücrelerine uygulanmasının hücre canlılığına olan etkileri değerlendirildi ve istatistiksel analizleri yapıldı.

CDDP artan konsantrasyonlarda 24 saat HeLa hücrelerine uygulandı. Kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında, 5-25 µM CDDP konsantrasyonlarında canlılığın %96-100 aralığında olduğu belirlendi. Hücre canlılık yüzdelерinin 50µM ve 100µM konsantrasyonlarda sırasıyla %60 ve %11 olduğu görüldü ve bu azalmaların istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (Grafik 5).



Şekil 4.5. CDDP'in artan konsantrasyonlarının 24 saat HeLa hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. Kontrol grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri ***:p<0.001

CDDP artan konsantrasyonlarda 48 saat HeLa hücrelerine uygulandı. Kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında, artan CDDP konsantrasyonlarıyla birlikte hücre canlılığının azaldığı ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. Hücre canlılığının 5µM'da %84, 10µM'da %75, 20µM'da %61, 25µM'da %57, 50µM'da %10, 100µM'da %3 olduğu belirlendi (Grafik 6).

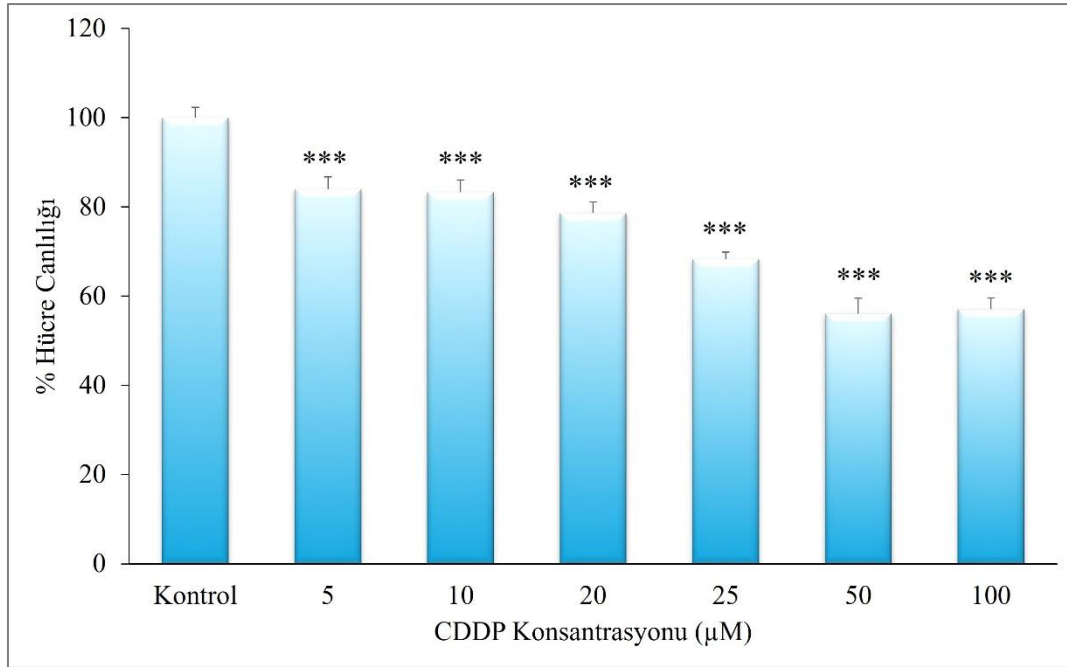


Şekil 4.6. CDDP'in artan konsantrasyonlarının 48 saat HeLa hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. Kontrol grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri ***:p<0.001

4.2.2. CDDP'in C33A hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemiyle belirlenmesi

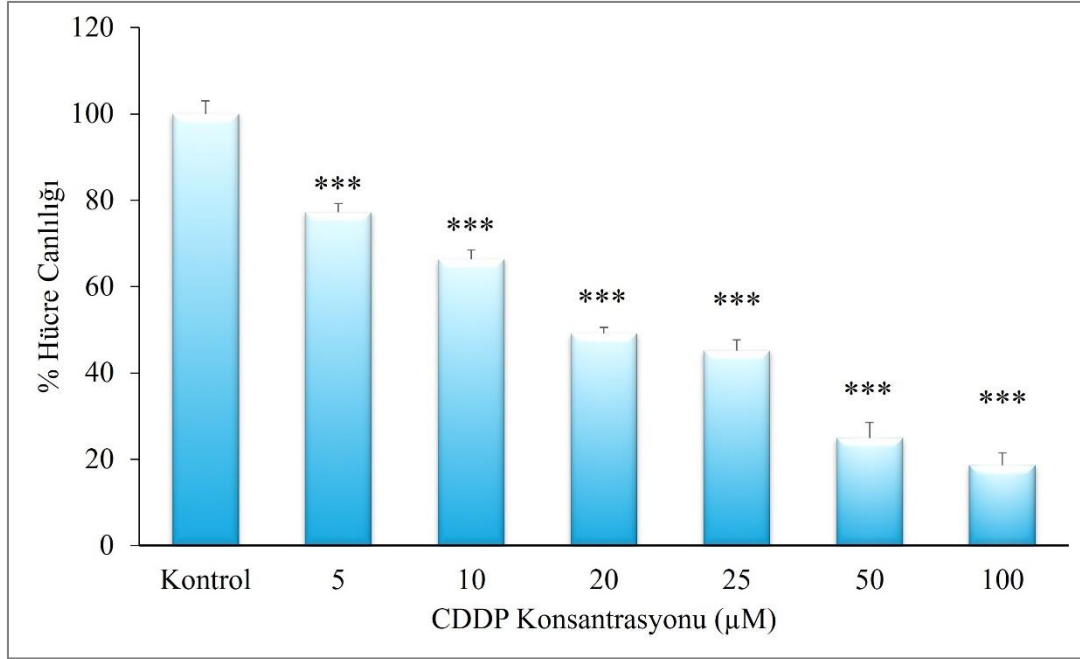
CDDP'in değişen süre ve konsantrasyon aralıklarında C33A hücrelerine uygulanmasının hücre canlılığına olan etkileri değerlendirildi ve istatistiksel analizleri yapıldı.

CDDP artan konsantrasyonlarda 24 saat C33A hücrelerine uygulandı. Kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında, CDDP'in tüm konsantrasyonlarında hücre canlılığındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. Hücre canlılığının 5 ve 10 μ M'da %84, 20 μ M'da %79, 25 μ M'da %68, 50 ve 100 μ M'da %56 olduğu belirlendi (Grafik 7).



Şekil 4.7. CDDP'in artan konsantrasyonlarının 24 saat C33A hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. Kontrol grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri ***:p<0.001

CDDP artan konsantrasyonlarda 48 saat C33A hücrelerine uygulandı. Kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında, artan CDDP konsantrasyonlarıyla birlikte hücre canlılığının azaldığı ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. Hücre canlılığının 5 μ M'da %77, 10 μ M'da %66, 20 μ M'da %49, 25 μ M'da %45, 50 μ M'da %25, 100 μ M'da %19 olduğu belirlendi (Grafik 8).



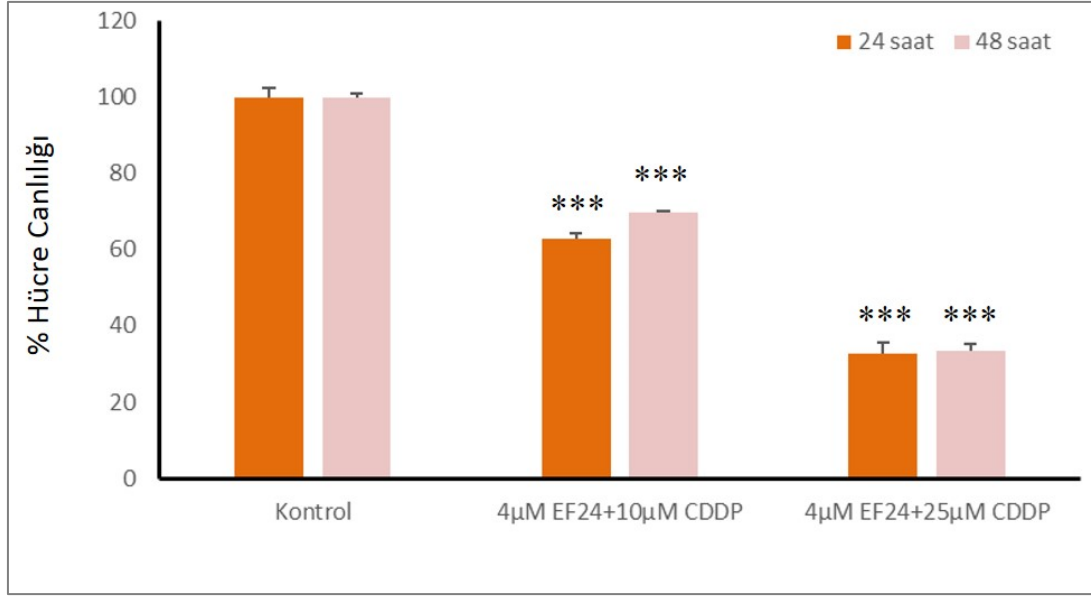
Şekil 4.8. CDDP'in artan konsantrasyonlarının 48 saat C33A hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. Kontrol grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri ***:p<0.001

4.3. EF24 ve CDDP'nin Servikal Kanser Hücrelerine Uygulanmasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

Ajanların tek başına HeLa ve C33A hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen hücre canlılık oranlarına göre, EF24'ün 4µM, CDDP'in ise 10 µM ve 25 µM konsantrasyonları birlikte uygulama deneyleri için seçildi.

4.3.1. HeLa hücrelerine ajanların birlikte uygulanmasının hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemi ile değerlendirilmesi

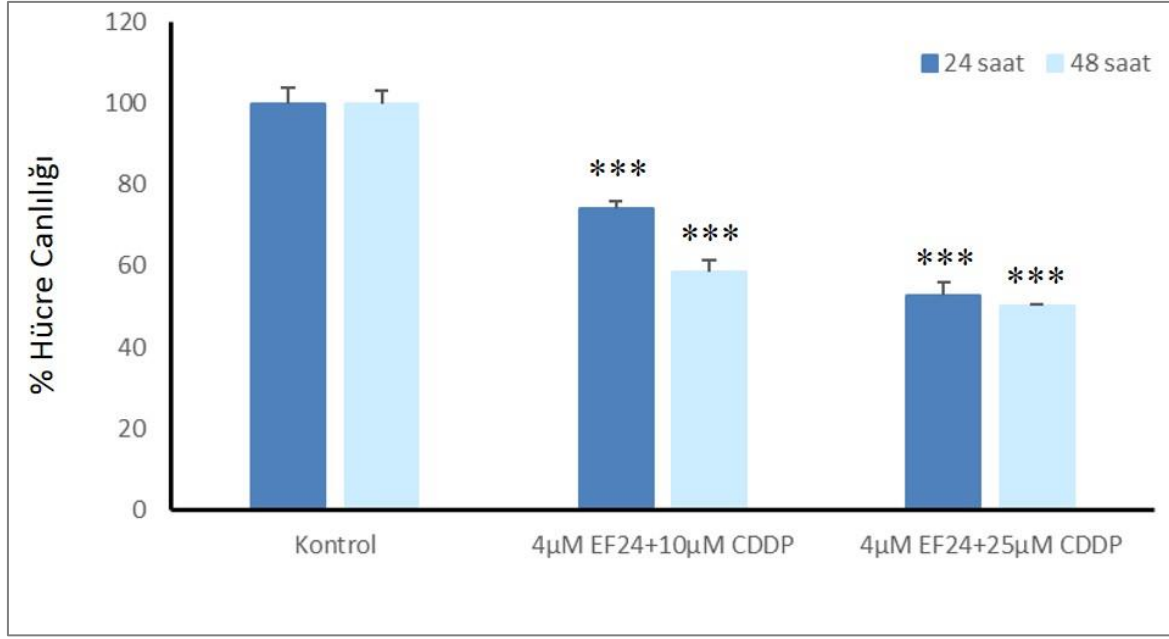
4µM EF24+10µM CDDP birlikte 24 saat HeLa hücrelerine uygulandığında, hücre canlılığının %63, 4µM EF24+25µM CDDP uygulamasında ise hücre canlılığının %33 olduğu belirlendi. 4µM EF24+10µM CDDP birlikte 48 saat HeLa hücrelerine uygulandığında, hücre canlılığının %70, 4µM EF24+25µM CDDP uygulamasında ise hücre canlılığının %33 olduğu saptanmıştır (Grafik 9). Hücre canlılığındaki bu azalmaların istatistiksel olarak da anlamlı olduğu bulundu.



Şekil 4.9. EF24 ve sispaltinin belirlenen konsantrasyonlarının 24 ve 48 saat HeLa hücrelerine birlikte uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. Kontroller ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri ***:p <0.001

4.3.2. C33A hücrelerine ajanların birlikte uygulanmasının hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemi ile değerlendirilmesi

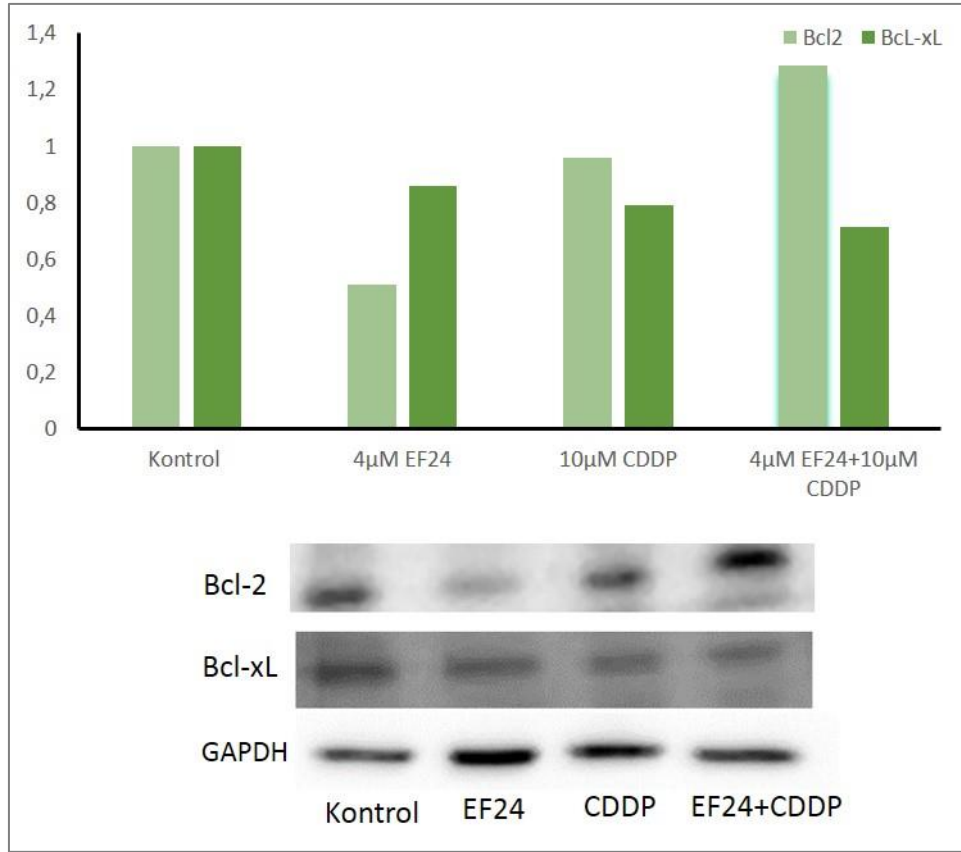
4µM EF24+10µM CDDP birlikte 24 saat C33A hücrelerine uygulandığında, hücre canlılığının %74, 4µM EF24+25µM CDDP uygulamasında ise hücre canlılığının %53 olduğu saptandı. 4µM EF24+10µM CDDP birlikte 48 saat C33A hücrelerine uygulandığında, hücre canlılığının %59, 4µM EF24+25µM CDDP uygulamasında ise hücre canlılığının %50 olduğu bulundu (Grafik 10). Hücre canlılığındaki bu azalışlar istatistiksel olarak da anlamlıydı.



Şekil 4.10. EF24 ve sisplatinin belirlenen konsantrasyonlarının 24 ve 48 saat C33A hücrelerine birlikte uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. Kontrollerle ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri ***:p <0.001

4.4. EF24 ve CDDP'nin Tek Başına veya Birlikte HeLa Hücrelerine Uygulanmasının Bcl2 ve Bcl-xL Protein İfadesi Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

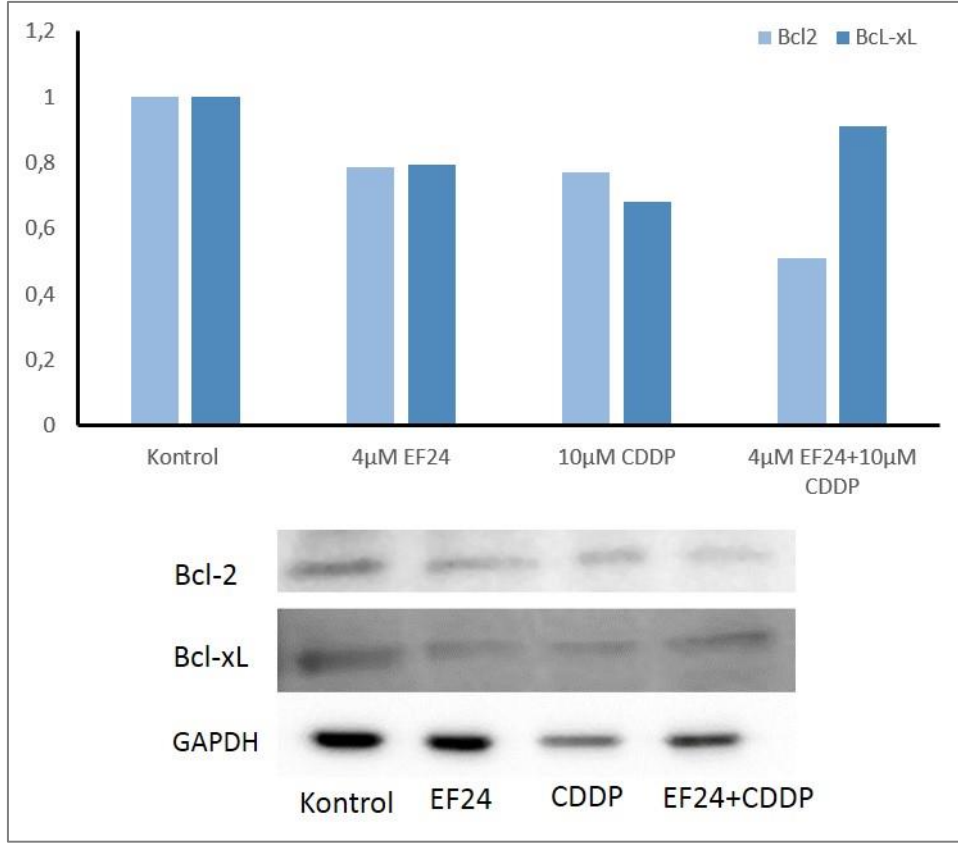
EF24 ve sisplatinin seçilen konsantrasyonlarının HeLa hücrelerinde Bcl2 ve Bcl-xL protein ifadesi üzerine olan etkisi western blot yöntemi ile belirlendi. Elde edilen protein bantlarının görüntüleri Şekil 4.1'de yer almaktadır. Normalizasyon için GAPDH proteini kullanıldı.



Şekil 4.11. EF24 ve CDDP'nin tekli veya birlikte uygulanmasının HeLa hücrelerinde Bcl2 ve Bcl-xL protein ifadelerine olan etkisi

4.5. EF24 ve CDDP'nin Tek Başına veya Birlikte C33A Hücrelerine Uygulanmasının Bcl2 ve Bcl-xL Protein İfadesi Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

EF24 ve sispaltinin seçilen konsantrasyonlarının C33A hücrelerinde Bcl2 ve Bcl-xL protein ifadesi üzerine olan etkisi western blot yöntemi ile belirlendi. Elde edilen protein bantlarının görüntüleri Şekil 4.2'de yer almaktadır. Normalizasyon için GAPDH proteini kullanıldı.



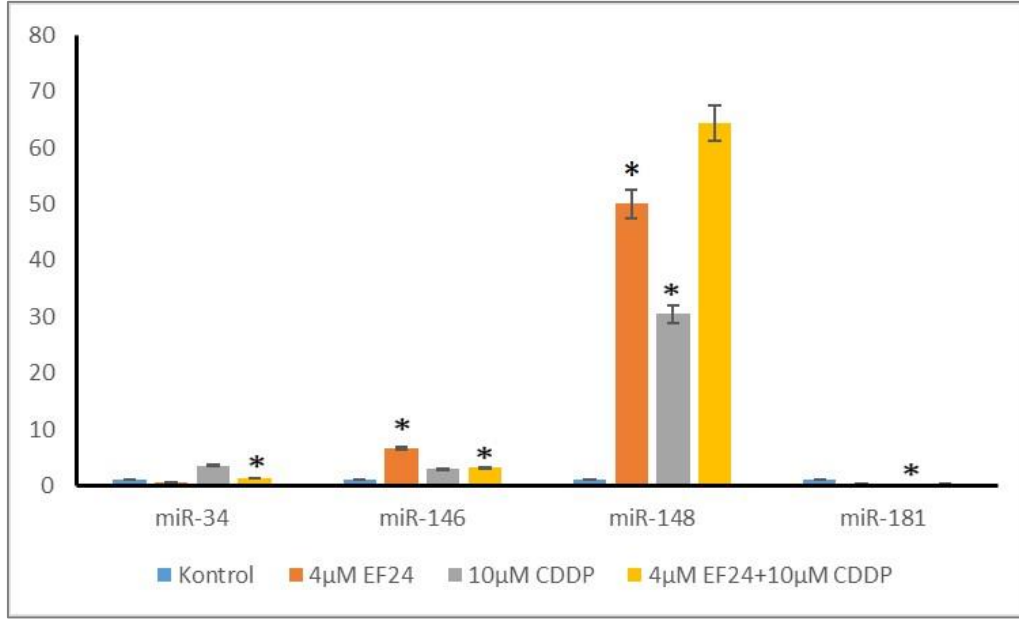
Şekil 4.12. EF24 ve CDDP'nin tekli veya birlikte uygulanmasının C33A hücrelerinde Bcl2 ve Bcl-xL protein ifadelerine olan etkisi

4.6. EF24 ve CDDP'nin Tek Başına veya Birlikte HeLa Hücrelerine Uygulanmasının Seçilen miRNA'ların İfadeleri Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

4 µM EF24 tek başına 48 saat HeLa hücrelerine uygulanıp kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında ise, miR-146a-5p ifadesinin 6.64 kat ve miR-148a-3p ifadesinin 49.9 kat artışı istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.0001$). Ancak, miR-34a-5p ve miR-181a-5p ifadelerindeki azalışların ise anlamlı olmadığı saptandı ($p > 0.05$).

Kontrol ile karşılaştırıldığında, HeLa hücrelerine aynı sürede uygulanan 10 µM CDDP'nin miR-181a-5p ifadesinin 6.5 kat azaldığı, miR-148a-3p ifadesini ise 30.4 arttırdığı ve bu ifade değişimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.0001$). Ancak, miR-34a-5p ve miR-146a-5p ifadelerindeki artışların ise anlamlı olmadığı saptandı ($p > 0.05$).

HeLa hücrelerine EF24 ve CDDP birlikte 48 saat uygulandığında ise, miR-34a-5p ifadesinin 1.2 kat ve miR-146a-5p ifadesinin 3.2 kat artması anlamlıyken ($p < 0.0001$), ve miR-148a-3p ve miR-181a-5p ifade değişimleri anlamsızdı ($p > 0.05$) (Grafik 11).



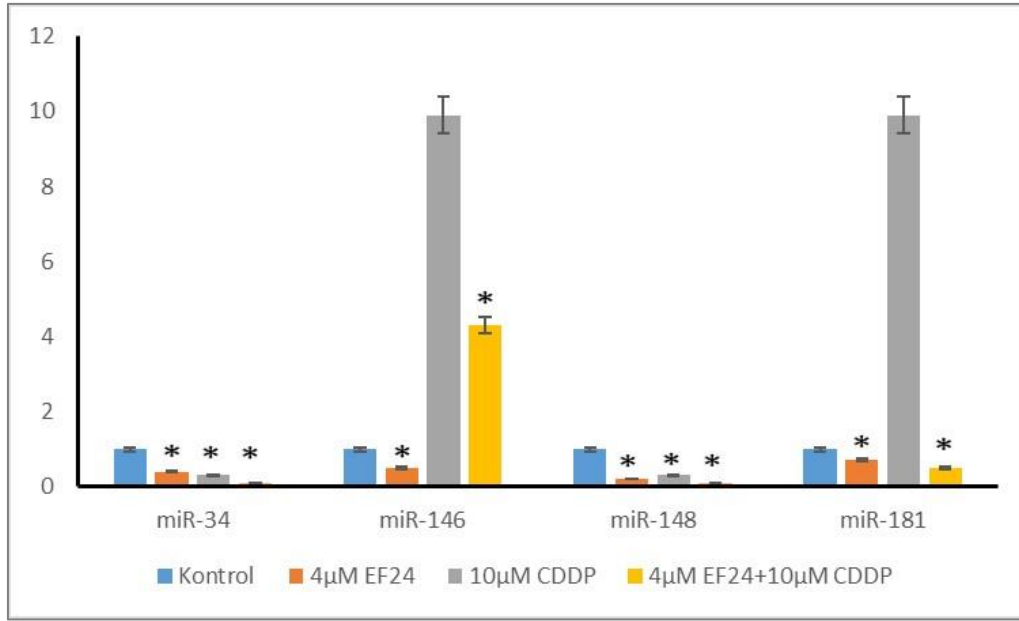
Şekil 4.13. EF24 ve CDDP'nin tek başına veya birlikte HeLa hücrelerine uygulanmasının seçilen miRNA'ların ifadeleri üzerine olan etkisinin belirlenmesi

4.7. EF24 ve CDDP'nin Tek Başına veya Birlikte C33A Hücrelerine Uygulanmasının Seçilen miRNA'ların İfadeleri Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

4 µM EF24 tek başına 48 saat C33A hücrelerine uygulanıp kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, miR-34a-5p ifadesinin 2.6 kat, miR-146a-5p ifadesinin 1.96 kat, miR-148a-3p ifadesinin 6.95 kat ve miR-181a-5p ifadesinin ise 1.44 kat azalması istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.0001$).

Kontrol ile karşılaştırıldığında, C33A hücrelerine aynı sürede uygulanan 10 µM CDDP'nin miR-34a-5p ifadesinin 1.3 kat artırdığı, miR-148a-3p ifadesini ise 3.6 azalttığı ve bu ifade değişimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.0001$). Ancak, miR-146a-5p ve miR-181a-5p ifadelerindeki 9'ar kat artışın anlamlı olmadığı saptandı ($p > 0.05$).

C33A hücrelerine EF24 ve CDDP birlikte 48 saat uygulandığında ise, miR-34a-5p ifadesinin 9.5 kat, miR-148a-3p ifadesinin 15.2 kat ve miR-181a-5p ifadesinin ise 1.87 kat azalması ve miR-146a-5p ifadesinin 4.3 kat artışı, istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.0001$) (Grafik 12).



Şekil 4.14. EF24 ve CDDP'nin tek başına veya birlikte C33A hücrelerine uygulanmasının seçilen miRNA'ların ifadeleri üzerine olan etkisinin belirlenmesi

5. TARTIŞMA

Serviks kanseri jinekolojik kanser türleri arasında mortalite ve morbiditesi yüksek bir kanserdir. Erken evrelerde saptandığında cerrahi tedavi uygulanarak yüksek sağkalım oranlarının elde edilmesine karşın, ileri evrelerde cerrahi uygunluk olmayıp düşük sağkalım ve yüksek nüks oranları ile birliktelik görülmektedir. Kemoradyoterapi ileri evrelerde uygulanan standart tedavi yöntemidir. Ancak, özellikle kemoterapötik ajanların sebep olduğu toksisiteyi azaltmak ve tedavi başarısını arttırmak amaçlı yeni tedavi yöntemleri, özellikle de hedefe yönelik tedaviler üzerinde çalışılmaktadır.

Bitkisel tedavinin ve kemoterapinin kombine edildiği yöntemler tek başına kemoterapiye göre daha az yan etki profiline sahiptir ve literatürde bununla ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu ajanların, özellikle EF24'ün Bcl-2 üzerinden apoptozu indükleyerek karsinogenezi baskılayabileceği *in vitro/in vivo* olarak gösterilmiştir.

Apoptotik sürece mitokondri veya endoplazmik retikulum aracılık edebilir. Bcl-2 protein ailesi bu olayları kontrol eder. Mitokondriyal membranın geçirgenliği yoluyla sitokrom c salınımının düzenlenmesinde rol oynayan proapoptotik proteinler (Bak, Bcl-10, Bax, Bad, Bid, Bim, Bik, Hrk) ve antiapoptotik proteinler (Bcl-2, Bcl-w, Bf-1, Bcl-xL, Bag) apoptoz gelişiminde önemlidir. Ayrıca, p53'ün Bcl-2 protein ailesinin üyelerini düzenlediği gösterilmiştir. p53, proapoptotik bir protein olan Bax'ın transkripsiyonunu doğrudan uyarak apoptoz gelişiminde rol aldığı bildirilmiştir (Kang ve diğerleri, 2009).

Apoptoza direnç, genel olarak kanserin önemli bir özelliğidir ve çoklu ilaç direncinde de etkilidir. Bu nedenle, kullanılan kemoterapötik ajana karşı gelişen direncin azalmasına katkıda bulunabilecek moleküllerin ve hedefe yönelik yeni ajanların tanımlanmasına yönelik araştırmalar hız kazanmıştır. Kemoterapötik ajanlar tarafından apoptozun uyarılması, kanser tedavisi için en etkili yöntemlerden biri olmuştur. Sitotoksik ajanlara yanıt olarak gelişen apoptoz, hedeflenen kanser tedavisinde yararlı bir araç haline gelmiştir. Doğal bileşikler düşük yan etki profili ve daha az kemoterapi direnci geliştirmesi nedeniyle, farklı mekanizmalarla apoptozu indükleyerek kanser tedavisinde kullanılabilir (Şahin ve diğerleri, 2022).

Bcl-2 antiapoptotik proteinlerin hedeflenerek uygulanan tedavi seçeneklerine örnek olarak BH3 mimetiklerin kullanımı, kanser tedavisinde umut vadetmektedir. Bundan yola çıkılarak yapılan çalışmalardan birinde, servikal kanser hücre hatlarında Bcl-xL ve Mcl-1' e özgü BH3 mimetik ajanlar çalışılmıştır ve apoptotik hücre ölümünün uyarıldığı tespit edilmiştir (Abdul Rahman ve diğerleri, 2020).

EF24, kurkumin analogu olan sentetik bir bileşiktir. EF24'ün, farklı insan kanser hücrelerinde anjiyogenezi ve metastazı baskıladığı, hücre döngüsünü durdurduğu, apoptotik yolları aktive ettiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir (Yang ve diğerleri, 2013; He ve diğerleri, 2018).

Yang ve diğerleri tarafından yapılan osteosarkom hücre hattında yapılan çalışmada; EF24 ve kurkuminin kaspaz -3/-7 aktivitesini arttırdığı gösterilmiş, bunun yanında 10 μ M EF24 uygulanan hücrelerde apoptozun %64,1 arttığı gözlenmiş olup, 30 μ M kurkumin maruziyeti sonucunda ise, bu oranının %43,9 olduğu rapor edilmiştir. Apoptoz ilişkili sinyal yollarına bakıldığında; her ikisinde de Bid ve Bcl-2 protein ifadelerinin azaldığı, buna karşın Bax ve p53 protein ifadelerinin ise, arttığı gözlenmiştir (Yang ve diğerleri, 2014).

Bu doktora tez çalışmasında; EF24'ün tek başına ve CDDP birlikte, HeLa (HPV pozitif) ve C33A (HPV negatif) hücrelerine uygulanmasının Bcl-2 ve Bcl-xL ilişkili hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR34a-5p, hsa-miR-148-3p miRNA ifade düzeylerine etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. EF24, HeLa hücrelerine tek başına uygulandığında hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-148-3p ifadelerinde anlamlı artış görülmüştür. Bu hücrelere, CDDP tek başına uygulandığında ise çalışılan miRNA'ların hiçbirinde anlamlı bir ifade artışı gözlenmezken; EF24+CDDP birlikte uygulandığında hsa-miR34a-5p ve hsa-miR-146a-5p ifadelerinde anlamlı artış kaydedilmiştir. C33A hücrelerinde EF24+CDDP birlikte uygulanması sonucu Bcl-2 düzeyinde belirgin bir azalma ve buna bağlı olduğunu düşündüğümüz miR-146a-5p ifadesinde anlamlı bir artış belirlenmiştir. Literatürde EF24'ün jinekolojik ve servikal kanserler üzerindeki antikanser etkisine yönelik çalışmalar mevcut olup; tez çalışmamızda hedeflediğimiz miRNA ifadelerinin düzeylerinin belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Liu ve diğerleri (2012) EF24'ün apoptoz ve hücre döngüsü üzerine olan etkisini Hepa1-6 fare karaciğer hücrelerinde araştırmıştır. Ayrıca, deneysel Hepa1-6 fare kanser modeli

oluşturarak, *in vivo* şartlarda EF24'ün hücre çoğalması ve apoptoz üzerine olan etkilerini belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda, EF24'ün *in vitro* şartlarda anjiyogenezi engellediği, içsel yolak aracılıklı apoptozu uyardığı ve hücre döngüsünü durdurduğunu; *in vivo* şartlarda ise apoptozu uyardığını göstermişlerdir.

2013 yılında yapılan bir çalışmada EF24'ün prostat kanser (DU145) ve melanom (B16) modelinde hücre çoğalması ve metastaz üzerindeki etkileri araştırılmıştır. EF24'ün prostat kanser hücrelerinde *in vitro* olarak, NF- κ B sinyal yolağını baskıladığını ve apoptozu uyardığını, *in vivo* olarak ise hücre çoğalmasını baskıladığını belirlemişlerdir (Yang ve diğerleri, 2013).

Yapılan literatür taramasında, EF24'ün servikal kanser hücreleri üzerine olan etkisini belirlemeye yönelik tek çalışmaya rastlanmıştır. Kasinski ve diğerlerinin, HeLa hücre hattının kullanıldığı ve EF24'ün moleküler etki mekanizmasını belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada, HeLa hücrelerinde IC50 konsantrasyonuna, 48 saatte 26,9 μ M kurkumin ile; EF24'le ise 1,23 μ M'da ulaşıldığını belirlemişlerdir. Bu da göstermektedir ki; EF24'ün kurkumine göre 20 kat daha düşük konsantrasyonlarında bile sitotoksik aktivitesi mevcuttur (Kasinski ve diğerleri, 2008). Bizim çalışmamızda ise, 48 saat sonunda HeLa'da ≥ 2 μ M, C33A'da ≥ 4 μ M üzerindeki konsantrasyonlarda hücre canlılığında anlamlı azalma tespit edilmiştir.

Liang ve diğerleri çalışmalarında, EF24'ün 4 μ M konsantrasyonda, NF- κ B (nükleer faktör-kappa B) aracılı Bcl-2 protein ifadesini baskıladığını göstermişlerdir (Liang ve diğerleri, 2011). Benzer olarak, Tan ve diğerlerinin (2010) over kanseri hücre hatlarında yaptıkları çalışmada (CDDP dirençli SK-OV-3 ve CDDP duyarlı IGROV1); yine aynı EF24 konsantrasyonunda, Bcl-2 ifadesini azalttığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda ise EF24'ün aynı konsantrasyonda HeLa'da daha belirgin olmak üzere her iki hücre hattında da Bcl-2'yi baskıladığını tespit ettik.

Yapılan bir çalışmada, servikal kanser etyolojisinde; miR-9, miR-25, miR-16, miR-106a, miR-10a, miR-185, miR-20b, miR-31, miR-92a, miR-155, miR-185, and miR-196a, miR92b, miR-93, miR-146a, miR-378, miR-200a ve miR-27a'nın ifadelerinin arttığı belirlenmiştir (Gocze ve diğerleri, 2015). Düşük ifadelenen miRNA'lar ise, miR-375, miR-99a, miR-203, miR-125b, miR-34a, miR-23b, miR-100, miR-145, miR-424, miR-193b ve

miR-497'dir (Cheung ve diğerkleri, 2012). Ayrıca literatürde, ilginç olarak HPV negatif hücre hatları ile karşılaştırıldığında, HPV-pozitif servikal kanser hücre hatlarında miRNA biyogenezinde görevli enzimlerin (Drosha ve Dicer) ifade seviyelerinin anlamlı düzeyde arttığı da gösterilmiştir (Thomas ve diğerkleri, 2014; He ve diğerkleri, 2014).

Literatürde, EF24 ve miRNA ilişkisini inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Toksik olmayan konsantrasyonlarda melanom hücrelerine uygulanan EF24'ün ($<2 \mu\text{M}$); proliferasyonu ve migrasyonu baskıladığı ve miR-33b ifadesini arttırdığı belirlenmiştir. Bu ifade artışının, melanom hücrelerinin metastaz ve invazyonunun azalmasında önemli bir faktör olduğu vurgulanmıştır (Zhang ve diğerkleri, 2015).

Literatürde EF24'ün miR34a'nın ifadesine olan etkilerini belirlemeye yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, kurkuminin ilgili miRNA'nın ifadesine olan etkilerini inceleyen çalışmalar bulunmaktadır ve sonuçlar farklılık göstermektedir. Subramaniam ve diğerklerinin (2012) özefagus hücre hatlarında yapmış olduğu çalışmada, kurkuminin miR-34a ifadesini azalttığı belirlenmiştir. Ancak, Sun ve diğerklerinin (2019) gastrik kanserler üzerine yaptığı *in vitro* çalışmada ise, kurkuminin miR-34a ifadesini arttırdığı rapor edilmiştir. Doktora tez çalışmamızda ise, EF24'ün C33A hücrelerine uygulanması sonucu miR-34a ifadesinin azaldığını belirledik. Bulgularımız, Subramaniam ve diğerklerinin çalışması ile benzerlik göstermektedir.

Xu ve diğerkleri (2016), dokuz servikal kanser hücre hattında miR181a ifade düzeyini belirlemiştir. İnsan transforme servikal epitel hücreleri (End1/E6E7) ile karşılaştırıldığında, kanser hücrelerinin hepsinde miR181a ifadesinin artmış olduğunu göstermişlerdir. Yang ve diğerklerinin (2013) yapmış olduğu çalışmada ise, prostat kanser hücrelerinde EF24'ün 24 saat ve $5 \mu\text{M}$ konsantrasyonda uygulandığında, miR-21 ifadesini baskıladığı; ancak, miR-181a ifadesini değiştirmediği gösterilmiştir. Çalışmamızda ise C33A hücrelerinde, tek başına EF24 sonrası ve CDDP+EF24 sonrası miR-181a-5p ifadesinde anlamlı azalma izlenmiştir. HeLa hücrelerinde ise yalnızca CDDP uygulaması sonrası ilgili miRNA'da anlamlı azalma izlenmiştir. Bu durumun nedeninin; kullanılan hücre tipi farklılığının yanı sıra, hücre özelliklerinde p53 mutasyonu varlığının söz konusu olabileceği düşünülmüştür. Yine literatürdeki diğerk çalışmaları karşılaştırıldığında bu durumun nedeninin; kullanılan hücre tipi farklılığının yanı sıra, hücreler uygulanan EF24 konsantrasyonu ve süresinin farklı oluşuna dayalı olabileceğini düşünmekteyiz.

2010 yılında over kanserli hücre hatlarında (platin sensitif/IGROV1 ve platin dirençli/SK-OV-3) EF24 etkinliği değerlendirilmiştir. Dirençli hücrelerde (SK-OV-3), duyarlı hücrelere (IGROV1) göre yaklaşık iki kat fazla EF24 konsantrasyonunda (2,4 μ M /1,6 μ M); kaspaz 3'ün artmış ve Bcl-2'nin azalmış düzeyleri saptanmış ve apoptozun uyarıldığı gösterilmiştir. Çalışmada ayrıca, EF24 ön uygulaması sonucu SK-OV-3 hücrelerinde apoptozun arttığı belirlenmiştir (Tan ve diğerleri, 2010). Benzer olarak, literatürde EF24'ün kemosensitizasyon özelliği ile ilgili araştırmalar incelendiğinde ilaç direnci açısından da olumlu etkileri olduğu rapor edilmiştir (Sazdova ve diğerleri, 2023).

Huang ve arkadaşları, HeLa servikal kanser hücreleri ile yaptıkları çalışmada, miR-34a-5p inhibitörü kullandıklarında Bcl-2 ifadesinin mRNA düzeyinde arttığını, miR-34a-5p ifadesini arttırdıklarında (mimik) ise, Bcl-2 ifadesinin azaldığını belirlemiş, Bcl-2 mRNA'sının miR-34a-5p'in hedefi olduğunu doğrulamışlardır (Huang ve diğerleri, 2022).

Jiang ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise; CDDP tedavisi alan akciğer kanserli olgularda Bcl-2 ifadesinde azalmaya bağlı, miR146a'nın yüksek ifadelerinin görülmesinin kemoterapi direncine neden olduğu tespit edilmiştir (Jiang ve diğerleri, 2017). Bizim çalışmamızda ise HeLa hücre hattında yapılan CDDP uygulamasından sonra Bcl-2 ifadesinde artış, Bcl-xl de azalma izlenmiş; Bcl-2'de beklenen azalmanın olmamasını p53 mutant hücrelerde CDDP direnci ile ilgili olabileceği bilgisine dayalı olabileceği düşünülmüştür. Önemli olarak elde edilen sonuç ise CDDP'ye EF24 eklendikten sonra elde edilen miR-146a-5p ifadelerindeki anlamlı artıştır. CDDP direncini kırmaya yönelik bir etki olabileceğini araştırmak için güçlü bir hipotezdir.

Bcl-2' nin aşırı ifadesi ile antikanser ilaçlara karşı oluşan direnç arasında ilişki olduğu belirtilmiştir. (Yip ve Reed, 2008). Yapılan bir çalışmada insan mesane kanseri hücre hattı (T24) ile CDDP dirençli alt klonunun karşılaştırıldığında Bcl-2'nin ifadesinin artışının CDDP direncinin gelişimi ile ilgili olduğu görülmüştür (Cho ve diğerleri, 2006). Ayrıca, A549 akciğer kanseri hücre hattı ile yapılan gen sessizleştirme çalışmasında Bcl-2'nin ifadesindeki azalışın CDDP olan duyarlılığı arttırdığı belirtilmiştir (Losert ve diğerleri, 2007).

Mevcut çalışmamızda; C33A hücrelerinde tek başına CDDP uygulandığında, EF24 ile birlikteliğine göre Bcl-xl artarken, Bcl-2 ifadesinin anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.

Buna karşın HeLa hücre hatlarında ise birlikte uygulama sonucunda Bcl-2 düzeylerinde artış gözlenirken; Bcl-xl düzeylerinde belirgin bir azalma tespit ettik.

Mevcut bilgiler ışığında literatürde henüz örneğine rastlanmayan bu çalışmada; HPV pozitif (HeLa) ve HPV negatif (C33A) servikal kanser hücre hatlarında; ileri evre servikal kanser tedavisinde standart bir kemoterapötik ajan olan CDDP, EF24 ile birlikte uygulanarak, Bcl-2 ilişkili seçilen miRNA'ların ifade değişimleri incelenmiştir. Çalışmamızın farklılığı, EF24' ün miRNA ifadeleri üzerinden servikal kanserli hücrelerde tedavi kapsamında gösterdiği etkiyi analiz etmek ve artmış/azalmış ifadelerdeki farklılıkları sunmaktır. Ayrıca artmış Bcl-2 ifadesi nedeniyle gelişen apoptotik dirençte, CDDP tedavisine EF24' ün eklenerek sensitizasyonun geri kazanılmasında potansiyel rolü araştırıldı. Amacımız; bu doğrultuda yapılacak *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara örnek teşkil ederek, hedefe yönelik tedavide yeni seçeneklerin gelişmesine katkı sağlayıcı olmaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Serviks kanseri kadınlarda mortalite ve morbidite açısından önemli bir jinekolojik kanserdir. Gelişmiş ülkelerde en sık görülen jinekolojik kanser endometriyum kanseri iken; az gelişmiş ya da gelişmekte olan ülkelerde en sık görülen jinekolojik kanser serviks kanseridir. Son yıllarda yaygın aşı uygulamaları ve düzenli yapılan tarama programları sonucunda önleme ve erken teşhiste ilerleme kaydedilmiştir. HPV ve sebep olduğu servikal intraepitelyal neoplaziler ise etyolojide rol alan en önemli risk faktörüdür.

EF24 bir kurkumin analogudur. Yapılan çalışmalarda antikanser etkisi gösterilen kurkuminin biyoyararlanımı düşük olması nedeniyle çeşitli analogları üretilmiştir. Bu analoglardan biyoyararlanımı ve etkinliği en yüksek olanlardan biri de EF24'tür. EF24'ün kanser hücreleri üzerindeki anti-tümör etkisinden biri NF- κ B yolağını baskılamakla olmaktadır. Yine EF24'ün kanser hücrelerinde, hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptotik yolları aktive ettiği gösterilmiştir.

miRNA'ların çeşitli biyolojik olaylarda ve patolojik durumlarda önemli düzenleyiciler olarak rol aldığı gösterilmiştir. Çalışmalarda; çeşitli kanserlerde olduğu gibi jinekolojik kanserler ve servikal kanserlerde de yüksek ve düşük ifadeleri gösterilmiştir. Bunun yanı sıra bu küçük moleküller; tedavi aşamasında dirençten de sorumlu tutulmaktadırlar.

Bu doktora tez çalışmasında; EF24'ün Bcl-2 üzerinden apoptozu indükleyerek karsinogenezi baskılayabileceği bilgisinden yola çıkarak, çalışma sonuçlarımıza göre EF24'ün HeLa hücrelerinde Bcl-2 ifadesini azaltırken, miR-148a-3p ve miR-146-5p ifadelerinde anlamlı artış saptanmıştır. Bu bulgular bize; Bcl-2 ifadesindeki düşüşün, miR-148a-3p ve miR-146-5p ifadelerindeki anlamlı artışlar ile ilintili olduğunu düşündürmektedir. Ancak, EF24+CDDP uygulamasından sonra Bcl-2 ifadesinde artış izlenirken, Bcl-xl ifadesinde düşüş ve bununla birlikte miR-34a-5p ve miR-146-5p ifadelerinde anlamlı artış saptanmıştır. Özellikle, tek başına CDDP sonrası miR-146-5p'de artış görülmeyip, birlikte uygulanmaları sonrasında artan miR-146-5p'nin artması, bu bağlamda sisplatin direnci üzerinde EF24'ün etkili olabileceğini düşündürmektedir. C33A hücrelerinde ise kombine uygulamada Bcl-2 ifadesi düşerken, bu düşüşün miR-146-5p'deki artış ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür. Literatürde, EF24'ün apoptotik etkisinin jinekolojik ve servikal kanserler üzerindeki etkisine yönelik çalışmalar mevcut olup; tez

Çalışmamızda hedeflediğimiz miRNA ifadelerine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda; EF24' ün miRNA ifadeleri üzerinden servikal kanserli hücrelerdeki etkinlikleri *in vivo* alışmalarla da doğrulanırsa terapötik seçenek potansiyeli taşıyabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abdul Rahman, S. F., Xiang Lian, B. S., and Mohana-Kumaran, N. (2020). Targeting the B-cell lymphoma 2 anti-apoptotic proteins for cervical cancer treatment. *Future Oncology*, 16(28), 2235-2249.
- Adams, B. K., Cai, J., Armstrong, J., Herold, M., Lu, Y. J., Sun, A., and Shoji, M. (2005). EF24, a novel synthetic curcumin analog, induces apoptosis in cancer cells via a redox-dependent mechanism. *Anti-Cancer Drugs*, 16(3), 263-275.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell*, 5th ed., New York: Garland Science, 1021-1034.
- Balasubramaniam, S. D., Balakrishnan, V., Oon, C. E., and Kaur, G. (2019). Key molecular events in cervical cancer development. *Medicina*, 55(7), 384.
- Baseman, J. G., and Koutsky, L. A. (2005). The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology*, 32, 16-24.
- Berek, J. S., and Hacker, N. F. (Eds.). (2010). *Berek and Hacker's gynecologic oncology*. 6th ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 23-35.
- Berek, J. S. (2019). *Berek & Novak's gynecology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Boulet, G., Horvath, C., Broeck, D. V., Sahebali, S., and Bogers, J. (2007). Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(11), 2006-2011.
- Bruni, L., Albero, G., Serrano, B., Mena, M., Collado, J., Gómez, D. (2023, 10 March). *ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and related diseases in the World*. Summary Report. Barcelona, Spain.
- Calin, G. A., and Croce, C. M. (2006). MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Research*, 66(15), 7390-7394.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., and Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15524-15529.
- Castellsagué, X., and Munoz, N. (2003). Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis—role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *JNCI Monographs*, 2003(31), 20-28.
- Causin, R. L., Freitas, A. J. A. D., Trovo Hidalgo Filho, C. M., Reis, R. D., Reis, R. M., and Marques, M. M. C. (2021). A systematic review of microRNAs involved in Cervical cancer progression. *Cells*, 10(3), 668.

- Chen, J., Yao, D., Li, Y., Chen, H., He, C., Ding, N., and Long, F. (2013). Serum microRNA expression levels can predict lymph node metastasis in patients with early-stage cervical squamous cell carcinoma. *International Journal of Molecular Medicine*, 32(3), 557-567.
- Cheung, T. H., Man, K. N. M., Yu, M. Y., Yim, S. F., Siu, N. S., Lo, K. W., and Wong, Y. F. (2012). Dysregulated microRNAs in the pathogenesis and progression of cervical neoplasm. *Cell Cycle*, 11(15), 2876-2884.
- Cho, H. J., Kim, J. K., Kim, K. D., Yoon, H. K., Cho, M. Y., Park, Y. P., and Choe, Y. K. (2006). Upregulation of Bcl-2 is associated with cisplatin-resistance via inhibition of Bax translocation in human bladder cancer cells. *Cancer Letters*, 237(1), 56-66.
- Çetintaş, V. B., ve Eroğlu, Z. (2013). Cisplatin direncinde etkili moleküler mekanizmalar. *Medical Journal of Süleyman Demirel University*, 20(2), 72-79.
- De Vuyst, H., Clifford, G. M., Nascimento, M. C., Madeleine, M. M., and Franceschi, S. (2009). Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 124(7), 1626-1636.
- Demarco, M., Hyun, N., Carter-Pokras, O., Raine-Bennett, T. R., Cheung, L., Chen, X., and Schiffman, M. (2020). A study of type-specific HPV natural history and implications for contemporary cervical cancer screening programs. *EClinicalMedicine*, 22, 100293.
- DiSaia, P. J., Creasman, W. T., Mannel, R. S., McMeekin, D. S., and Mutch, D. G. (2017). *Clinical gynecologic oncology*. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 1-19.
- Doorbar, J. (2013). The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*, 445(1-2), 80-98.
- dos Santos Silva, I., and Beral, V. (1997). Socioeconomic differences in reproductive behaviour. *IARC Scientific Publications*, (138), 285-308.
- Endale, H. T., Mariye, Y. F., Negash, H. K., Hassen, F. S., Asrat, W. B., Mengstie, T. A., and Tesfaye, W. (2024). MiRNA in cervical cancer: Diagnosis to therapy: Systematic review. *Heliyon*. 10(3), e24398.
- Ervik, M., Lam, F., Ferlay, J., Mery, L., Soerjomataram, I., and Bray, F. (2016). Cancer Today. Lyon, France: International agency for research on cancer. *Cancer Today*, 3, 235-248.
- Frenzel, A., Grespi, F., Chmielewski, W., and Villunger, A. (2009). Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis*, 14(4), 584-596.
- Garzon, R., Calin, G. A., and Croce, C. M. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Medicine*, 60(1), 167-179.
- Graves, P., and Zeng, Y. (2012). Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 10(5), 239-245.

- Guler, T., Uygur, D., Uncu, M., Yayci, E., Atacag, T., Bas, K., and Yakicier, C. (2013). Coexisting anal human papilloma virus infection in heterosexual women with cervical HPV infection. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 288, 667-672.
- Gultekin, M., Dundar, S., Keskinilic, B., Turkyilmaz, M., Ozgul, N., Yuce, K., and Kara, F. (2020). How to triage HPV positive cases: Results of four million females. *Gynecologic Oncology*, 158(1), 105-111.
- Güneş, H. V. (2022). *Moleküler hücre biyolojisi*. 6th ed., İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi, 285-319.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46.
- He, L., Wang, H. Y., Zhang, L., Huang, L., Li, J. D., Xiong, Y., and Zheng, M. (2014). Prognostic significance of low DICER expression regulated by miR-130a in cervical cancer. *Cell Death & Disease*, 5(5), e1205-e1205.
- He, L., and Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 522-531.
- He, Y., Li, W., Hu, G., Sun, H., and Kong, Q. (2018). Bioactivities of EF24, a novel curcumin analog: a review. *Frontiers in Oncology*, 8, 614.
- Hoffman, B. L., Schorge, J. O., Bradshaw, K. D., Halvorson, L. M., Schaffer, J. I., and Corton, M. M. (2012). *Williams Gynecology*. Chapter 10. Endometriosis. New York: McGraw-Hill Education.
- Huang, X., Yan, P., Ding, W., Zhou, C., Xu, Q., Li, M., and Chen, W. (2022). α -Pinene inhibits the growth of cervical cancer cells through its proapoptotic activity by regulating the miR-34a-5p/Bcl-2 signaling axis. *Drug Development Research*, 83(8), 1766-1776.
- Inada, T., Kikuyama, S., Ichikawa, A., Igarashi, S., and Ogata, Y. (1998). Bcl-2 expression as a prognostic factor of survival of gastric carcinoma. *Anticancer Research*, 18(3B), 2003-2010.
- Janumyan, Y., Cui, Q., Yan, L., Sansam, C. G., Valentin, M., and Yang, E. (2008). G0 function of BCL2 and BCL-xL requires BAX, BAK, and p27 phosphorylation by Mirk, revealing a novel role of BAX and BAK in quiescence regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(49), 34108-34120.
- Jiang, B., Liang, P., Deng, G., Tu, Z., Liu, M., and Xiao, X. (2011). Increased stability of Bcl-2 in HSP70-mediated protection against apoptosis induced by oxidative stress. *Cell Stress and Chaperones*, 16(2), 143-152.
- Gocze, K., Gombos, K., Kovacs, K., Juhasz, K., Gocze, P., and Kiss, I. (2015). MicroRNA expressions in HPV-induced cervical dysplasia and cancer. *Anticancer Research*, 35(1), 523-530.
- Kang, M. H., and Reynolds, C. P. (2009). Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 15(4), 1126-1132.

- Kasinski, A. L., Du, Y., Thomas, S. L., Zhao, J., Sun, S. Y., Khuri, F. R., and Fu, H. (2008). Inhibition of I κ B kinase-nuclear factor- κ B signaling pathway by 3, 5-bis (2-fluorobenzylidene) piperidin-4-one (EF24), a novel monoketone analog of curcumin. *Molecular Pharmacology*, 74(3), 654-661.
- Liang, Y., Yin, D., Hou, L., Zheng, T., Wang, J., Meng, X., and Liu, L. (2011). Diphenyl difluoroketone: a potent chemotherapy candidate for human hepatocellular carcinoma. *PloS One*, 6(8), e23908.
- Losert, D., Pratscher, B., Soutschek, J., Geick, A., Vornlocher, H. P., Müller, M., and Wacheck, V. (2007). Bcl-2 downregulation sensitizes nonsmall cell lung cancer cells to cisplatin, but not to docetaxel. *Anti-Cancer Drugs*, 18(7), 755-761.
- Oyervides-Muñoz, M. A., Pérez-Maya, A. A., Rodríguez-Gutiérrez, H. F., Gómez-Macias, G. S., Fajardo-Ramírez, O. R., Treviño, V., and Garza-Rodríguez, M. L. (2018). Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. *Infection, Genetics and Evolution*, 61, 134-144.
- Jiang, P., Jia, W., Wei, X., Zhang, X., Wang, C., Li, B., and Meng, Y. (2017). MicroRNA-146a regulates cisplatin-resistance of non-small cell lung cancer cells by targeting NF- κ B pathway. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10(12), 11545-11553.
- Perkins, S., Verschoyle, R. D., Hill, K., Parveen, I., Threadgill, M. D., Sharma, R. A., and Gescher, A. J. (2002). Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics of curcumin in the min/+ mouse, a model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 11(6), 535-540.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36-e36.
- Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., and Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet Global Health*, 4(9), e609-e616.
- Zhang, P., Bai, H., Liu, G., Wang, H., Chen, F., Zhang, B., and Song, E. (2015). MicroRNA-33b, upregulated by EF24, a curcumin analog, suppresses the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and migratory potential of melanoma cells by targeting HMGA2. *Toxicology Letters*, 234(3), 151-161.
- Ravegnini, G., Gorini, F., Dondi, G., Tesei, M., De Crescenzo, E., Morganti, A. G., and Perrone, A. M. (2022). Emerging Role of MicroRNAs in the therapeutic response in cervical cancer: A systematic review. *Frontiers in Oncology*, 12, 847974.
- Rock, J. A., Jones, H. W., and Te Linde, R. W. (2008). *Te Linde's operative gynecology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins,
- Roden, R., and Stern, P. L. (2018). Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(4), 240-254.

- Sakakibara, N., Chen, D., and McBride, A. A. (2013). Papillomaviruses use recombination-dependent replication to vegetatively amplify their genomes in differentiated cells. *PLoS Pathogens*, 9(7), e1003321.
- Sazdova, I., Keremidarska-Markova, M., Dimitrova, D., Mitrokhin, V., Kamkin, A., Hadzi-Petrushev, N., and Mladenov, M. (2023). Anticarcinogenic potency of EF24: an overview of its pharmacokinetics, efficacy, mechanism of action, and nanoformulation for drug delivery. *Cancers*, 15(22), 5478.
- Shen, S., Zhang, S., Liu, P., Wang, J., and Du, H. (2020). Potential role of microRNAs in the treatment and diagnosis of cervical cancer. *Cancer Genetics*, 248, 25-30.
- Kasinski, A. L., Du, Y., Thomas, S. L., Zhao, J., Sun, S. Y., Khuri, F. R., and Fu, H. (2008). Inhibition of I κ B kinase-nuclear factor- κ B signaling pathway by 3, 5-bis (2-fluorobenzylidene) piperidin-4-one (EF24), a novel monoketone analog of curcumin. *Molecular Pharmacology*, 74(3), 654-661.
- Smith, J. S., Herrero, R., Bosetti, C., Munoz, N., Bosch, F. X., Eluf-Neto, J., and Ashley, R. (2002). Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(21), 1604-1613.
- Srivastava, A., Nikamo, P., Lohcharoenkal, W., Li, D., Meisgen, F., Landén, N. X., and Sonkoly, E. (2017). MicroRNA-146a suppresses IL-17-mediated skin inflammation and is genetically associated with psoriasis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(2), 550-561.
- Şahin, G., Duran, T., Küçüktürk, S., Kocak, N., Bayramoğlu, D., Kebapçılar, A., and Çelik, Ç. (2022). Neferinin servikal kanser hücreleri (HeLa) üzerinde apoptotik etkisi. *Van Tıp Dergisi*, 29(4), 401-406.
- Tan, X., Sidell, N., Mancini, A., Huang, R. P., Wang, S., Horowitz, I. R., and Wieser, F. (2010). Multiple anticancer activities of EF24, a novel curcumin analog, on human ovarian carcinoma cells. *Reproductive Sciences*, 17(10), 931-940.
- Thomas, L. K., Bermejo, J. L., Vinokurova, S., Jensen, K., Bierkens, M., Steenbergen, R., and Reuschenbach, M. (2014). Chromosomal gains and losses in human papillomavirus-associated neoplasia of the lower genital tract—a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer*, 50(1), 85-98.
- Thomas, S. L., Zhong, D., Zhou, W., Malik, S., Liotta, D., Snyder, J. P., and Giannakakou, P. (2008). EF24, a novel curcumin analog, disrupts the microtubule cytoskeleton and inhibits HIF-1. *Cell Cycle*, 7(15), 2409-2417.
- Vaccarella, S., Franceschi, S., Engholm, G., Lönnberg, S., Khan, S., and Bray, F. (2014). 50 years of screening in the Nordic countries: quantifying the effects on cervical cancer incidence. *British Journal of Cancer*, 111(5), 965-969.
- Vats, A., Trejo-Cerro, O., Thomas, M., and Banks, L. (2021). Human papillomavirus E6 and E7: What remains?. *Tumour Virus Research*, 11, 200213.
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 87-101.

- Wyllie, A. H. (2010). "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Molecular Neurobiology*, 42(1), 4-9.
- Xu, H., Zhu, J., Hu, C., Song, H., and Li, Y. (2016). Inhibition of microRNA-181a may suppress proliferation and invasion and promote apoptosis of cervical cancer cells through the PTEN/Akt/FOXO1 pathway. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 72, 721-732.
- Yang, C. H., Yue, J., Sims, M., and Pfeffer, L. M. (2013). The curcumin analog EF24 targets NF- κ B and miRNA-21, and has potent anticancer activity *in vitro* and *in vivo*. *PloS One*, 8(8), e71130.
- Yang, S. J., Lee, S. A., Park, M. G., Kim, J. S., Yu, S. K., Kim, C. S., and Kim, D. K. (2014). Induction of apoptosis by diphenyldifluoroketone in osteogenic sarcoma cells is associated with activation of caspases. *Oncology Reports*, 31(5), 2286-2292.
- Yip, K. W., and Reed, J. C. (2008). Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, 27(50), 6398-6406.
- Youle, R. J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 47-59.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : İŞÇİ BOSTANCI, Esra
 Uyruğu : T.C.

Eğitim Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi / Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Yan Dal Uzmanlık	Gazi Üniversitesi / Jinekolojik Onkoloji Anabilim Dalı	2018
Tıpta Uzmanlık	Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	2013
Lisans	Gazi Üniversitesi / Tıp Fakültesi	2006
Lise	Trabzon Kanuni Anadolu Lisesi	2000

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2022-halen	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	Doçent Doktor
2020-2021	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	Öğretim Görevlisi
2018- 2020	Sağlık Bilimleri Üniversitesi Etlik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	Yan Dal Uzman Dr.
2015-2018	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Jinekolojik Onkoloji Bilim Dalı	Yan Dal Eğitimi
2014-2015	Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi	Uzm. Dr.
2013-2014	Akçaabat Haçkalı Baba Devlet Hastanesi	Uzm. Dr.
2007-2013	Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi	Arş.Gör. Dr.

Yayınlar

A. SSCI/SCI-Expanded Tarafından Taranan Uluslar Arası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Özgün Makaleler:

- A1. Ozler S, Oztas E, Tokmak A, Ergin M, Isci E, Eren F, Pehlivan S, Neselioglu S, Yilmaz N. The association of thiol/disulphide homeostasis and lipid accumulation index with cardiovascular risk factors in overweight adolescents with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016 Apr;84(4):516-23. doi: 10.1111/cen.12965. Epub 2015 Nov 25.
- A2. Yumusak OH, Kahyaoglu S, Pekcan MK, Isci E, Cinar M, Tasci Y. Does intrauterine insemination timing matter for achieving pregnancy during ovulation induction using gonadotropins? A retrospective cohort study. *J Chin Med Assoc*. 2017 Jun;80(6):366-370. doi: 10.1016/j.jcma.2016.06.005. Epub 2016 Sep 27.
- A3. Seckin B, Pekcan MK, Bostancı EI, Inal HA, Cicek MN. Comparison of Pregnancy Rates in PCOS Patients Undergoing Clomiphene Citrate and IUI Treatment With Different Leading Follicular Sizes. *Arch Gynecol Obstet* 2016 Apr;293(4):901-6. doi: 10.1007/s00404-015-3953-1. Epub 2015 Nov 13.
- A4. Seckin B, Cicek MN, Dikmen AU, Bostancı EI, Muftuoglu KH. Diagnostic Value of Sonography for Detecting Endometrial Pathologies in Postmenopausal Women With and Without Bleeding. *J Clin Ultrasound* 2016 Jul 8;44(6):339-46. doi:10.1002/jcu.22329. Epub 2016 Feb 9.
- A5. Isci Bostancı E, Ugras Dikmen A, Girgin G, Gungor T, Baydar T, Nuri Danisman A. A New Diagnostic and Prognostic Marker in Endometrial Cancer: Neopterin. *Int J Gynecol Cancer* 2017 May;27(4):754-758. doi: 10.1097/IGC.0000000000000952.
- A6. Bostancı EI, Ozler S, Yilmaz NK, Yesilyurt H. Serum 25-Hydroxy Vitamin D Levels in Turkish Adolescent Girls With Polycystic Ovary Syndrome and the Correlation With Clinical/Biochemical Parameters. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2018 Jun;31(3):270-273. doi: 10.1016/j.jpag.2017.07.008. Epub 2017 Aug 4.
- A7. Isci Bostancı E, Guler I, Erdem O, Taskiran C, Onan MA. A Rare Case of Ovarian Cancer in a Pregnant Woman With Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *J Obstet Gynaecol* 2018 Apr; 38(3):425-426. doi: 10.1080/01443615.2017.1343292. Epub 2017 Sep 14.
- A8. Ozler S, Isci Bostancı E, Oztas E, Kuru Pekcan M, Gumus Guler B, Yilmaz N. The Role of ADAMTS4 and ADAMTS9 in Cardiovascular Disease in Premature Ovarian Insufficiency and Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism. *J Endocrinol Invest* 2018 Dec;41(12):1477-1483. doi: 10.1007/s40618-018-0948-3. Epub 2018 Sep 5.
- A9. Boyraz G, Durmus Y, Cicin I, Kuru O, Bostancı E, Comert GK, Sahin H, Ayık H, Ureyen I, Karalok A, Meydanli MM, Salman MC, Ozgul N, Onan A, Simsek T, Yuce K, Turan T. Prognostic Factors and Oncological Outcomes of Ovarian Yolk Sac Tumors: A Retrospective Multicentric Analysis of 99 Cases. *Arch Gynecol Obstet* 2019 Jul;300(1):175-182. doi: 10.1007/s00404-019-05160-6. Epub 2019 Apr 13.

- A10. Durmuş Y, İşçi Bostancı E, Duru Çöteli AS, Kayıkçıoğlu F, Boran N. Metastasis Patterns of the Spleen and Association With Survival Outcomes in Advanced Ovarian-Tubal-Peritoneal Epithelial Cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2019 Nov;300(5):1367-1375. doi: 10.1007/s00404-019-05300-y. Epub 2019 Sep 23.
- A11. Isci Bostanci E, Guler I, Dikmen AU, Erdem O, Guner H, Onan MA, Taskiran C. Prognostic Role of Maspin Expression in Patients With Cervical Dysplasia and Cervical Cancer. *J Obstet Gynaecol Res* 2020 Feb 20. doi:10.1111/jog.14225.
- A12. Durmus Y, Isci Bostanci E, Duru Çöteli AS, Kayıkçıoğlu F, Boran N, Köse MF. Complementary Surgery for Cervical Cancer Patients Inadequately Treated with Extrafacial Hysterectomy. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction* 2020. Doi: 10.1016/j.jogoh.2020.101800.
- A13. Durmus Y, Isci Bostanci E, Duru Çöteli AS, Unsal M, Kayıkçıoğlu F, Boran N. Patterns of Diaphragm Involvement In Stage 3B/3C Epithelial Ovarian-Tubal-Peritoneal Cancer Patients and Survival Outcomes. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2020. Doi: 0.1007/s00404-020-05802-0.
- A14. Esra İŞÇİ BOSTANCI, Yasin DURMUŞ, A.Sinem DURU ÇÖTELİ, Fulya KAYIKÇIOĞLU, Nurettin BORAN. Outcomes of the conservative management of the patients with endometrial intraepithelial neoplasia/endometrial cancer: Wait or treat! *Turk J Med Sci* (2021) 51: 2066-2072. Doi: 10.3906/sag-2012-207.
- A15. Response to the letter Esra İŞÇİ BOSTANCI, Yasin DURMUŞ, A.Sinem DURU ÇÖTELİ, Fulya KAYIKÇIOĞLU, Nurettin BORAN. Outcomes of the conservative management of the patients with endometrial intraepithelial neoplasia/endometrial cancer: Wait or treat! *Turk J Med Sci* (2022)
- A16. Letter to the Editor Funda CEVHER AKDULUM, Nuray CAMGOZ ERYILMAZ, Berrin GUNAYDIN, Ayse BORKLUCE, Esra BOSTANCI, Ahmet ERDEM. Surgical and Anesthetic Management of Postpartum Hemorrhage Forty-Five Days After Cesarean Section. *JARSS* 2022;30(1):71-73.

B. SSCI/ SCI-Expanded Dışı Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Özgün Makaleler:

- B1. Yumusak OH, Kahyaoglu S, Pekcan MK, Isci E, Ozyer Ş, Cicek MN, Tasci Y, Erkaya S. Which is the best intrauterine insemination timing choice following exogenous hCG administration during ovulation induction by using clomiphene citrate treatment? A retrospective study. *Springerplus*. 2016 Aug 9;5(1):1307. doi: 10.1186/s40064-016-2992-9. eCollection 2016.
- B2. Esra Isci Bostanci, Meryem Kuru Pekcan, Ümit Yasemin Sert, Hüseyin Yesilyurt, Dilek Uygur Sahin. A Single Center Experience on Reproductive Outcome Following Hysteroscopic Treatment of Patients with Septate Uterus. *Gazi Medical Journal*. Doi: 10.12996/gmj.2020.140.
- B3. MK Pekcan, Eİ Bostancı, A Tokmak, DŞ Uygur, Y Taşçı. İnfertil Kadınlarda Miyomektomi Sonrası Klinik Gebelik Oranlarını Etkileyen Faktörler: Tek Merkezli Retrospektif Bir Çalışma. 2018 *Med Bull Haseki* 4165 (56), 222-7.

- B4. Esra Isci Bostanci, Yasin Durmus, Fulya Kayikcioglu, Secil Gunes, Nurettin Boran. A Single Center Surgical Experience in Total Laparoscopic Hysterectomy And The Effect Of Variables On Operation Time: Do The Uterine Volume and The Suture Type Influence The Operation Time?.Annals of Medical Research. DOI: 10.5455/annalsmedres.2020.07.695.

C. Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler:

- C1. G Güney, A Tokmak, Aİ Güzel, T Var, E İşçi, AS Batıoğlu. Does IVF-ET Procedure Increase the Pregnancy Rates in Women Underwent Laparoscopic Endometriosis Surgery?. Gynecology Obstetrics & Reproductive Medicine 21 (2), 75-80
- C2. EI Bostanci, I Guler, FC Akdulum, MA Onan. Electrocautery Versus Scalpel in Women Undergoing Primary Cesarean Section and Neonatal Outcomes 2019 Gynecology Obstetrics & Reproductive Medicine, 1-4.
- C3. Esra Isci Bostanci, Meryem Kuru Pekcan, Ümit Yasemin Sert, Ayse Seval Özgü-Erdinç, Hüseyin Yesilyurt, Yaprak Engin-Üstün. Infertil Olgulara Minimal Invaziv Yaklaşım ve Histerosalpingogramın Tanısal Değeri: Tek Merkez Deneyimleri. 2019 Jinekoloji-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi 16 (4), 211-213.
- C4. Bahadır ERTÜRK, Recai PABUÇCU, Nafiye YILMAZ, Esra İŞÇİ BOSTANCI, Hakan TİMUR, Emre Göksan PABUÇCU, Tufan ARSLANCA, Müge KESKİN Farklı Fenotiplere Sahip Polikistik Over Sendromlu Hastaların Klinik ve Laboratuvar Parametreleri Yönünden Değerlendirilmesi. Türk Üreme Tıbbı ve Cerrahisi Dergisi, 2021;5(2):47-54.

D. Uluslar Arası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler:

- D1. E.Isci Bostanci, A.Ugras Dikmen, G.Girgin, T.Gungor, T.Baydar, A.N. Danisman. P0250- A new prognostic marker in endometrial cancer: Neopterin. 19th International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology (ESGO 2015), October 24-27 2015, Nice, France.
- D2. B. Seçkin, M.N. Cicek, A.Ugras Dikmen, E.Isci Bostanci, K.H.Muftuoglu. P781- Diagnostic accuracy of ultrasonography for diagnosing endometrial pathologies in postmenopausal women with bleeding or asymptomatic thickened endometrium. ESHRE 2015, 14-17 June, Lisbon, Portugal.
- D3. E.Isci Bostanci, Sibel Ozler, Meryem Kuru Pekcan, Nafiye Yilmaz Karakas, Huseyin Yesilyurt. P127- Vitamin D levels in Turkish adolescent girls with polycystic ovary syndrome and correlation with clinical and biochemical parameters. ISGE Gynecological Endocrinology 17th World Congress, 2-5 March 2016, Firenze, Italy.
- D4. Emel Rodoplu Unal, Esra Isci Bostanci, Yasemin Sert, Ismail Guler, Haldun Guner, Ozlem Erdem. P054- Endometrial stromal nodüle of vagina: An extremely rare case. XXXI International Congress of the International Academy of Pathology and 28th Congress of the European Society of Pathology, 25-29 September 2016, Cologne, Germany.

- D5. S. Misirlioglu, C.Taskiran, A.Onan, F.Karatas, S.Yildiz Oguz, I.Guler, E.Bostanci, A.Bedirli, M.Kerem, E.Balik, M.Arvas, H.Guner. P0673- The role of protective ileostomy and the validity of bowel resection as a part of cytoreductive surgery for advanced stage epithelial ovarian cancer. IGCS16th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, October 28-31, 2016, Lisbon, Portugal.
- D6. C.Taskiran, A.Onan, S.Yildiz Oguz, S.Misirlioglu, E.Bostanci, F.Karatas, H.Bostanci, A.Bedirli, M.Kerem, H.Guner. P0687- Feasibility and long term survival effect of total abdominal colectomy at the time of primary cytoreduction for advanced stage epithelial ovarian cancer. IGCS16th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, October 28-31, 2016, Lisbon, Portugal.
- D7. C.Taskiran, S.Misirlioglu, A.Onan, S.Yildiz Oguz, F.Karatas, E.Bostanci, M.Kerem, E.Balik, A.Alper, M.Arvas, H.Guner. P0690- How can optimal cytoreduction rates increased over ninety percent with a minimal usage of neoadjuvant chemotherapy?. IGCS16th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, October 28-31, 2016, Lisbon, Portugal.
- D8. C.Taskiran, S.Misirlioglu, S.Yildiz Oguz, F.Karatas, E.Bostanci, M.Kerem, E.Balik, M.Arvas, H.Guner. P0677- Does scoring systems really predict resectability or should we define new algorithm for advanced stage epithelial ovarian cancer?. IGCS16th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, October 28-31, 2016, Lisbon, Portugal.
- D9. A.S. Ozgu Erdinc, N. Yilmaz, E.Isci Bostanci, C.Gulerman, Y.Ustun. P379- Effects of Anthropometric Indices of Central Obesity and Metabolic Syndrome on IVF/ICSI Outcome. Fertility&Sterility, ASRM 2017, October 28- November 1, 2017, San Antonio, Texas.
- D10. Gizem Isik, Esra Bostanci, Ozlem Erdem, Mehmet Anil Onan. Sozlu Sunu 144 - Laparoscopic sentinel lymph node mapping in early stage endometrial carcinoma: Preliminary results. XII. Turkish German Gynecologic Congresss, April 27-May 1, 2018, Kyrenia, TRNC.
- D11. Umit Yasemin Sert, Esra Isci Bostanci, Ozlem Erdem, Mehmet Anil Onan. Sozlu Sunu 58- Benign metastatic leiomyomatosis after uterine artery embolization. XII. Turkish German Gynecologic Congresss, April 27-May 1, 2018, Kyrenia, TRNC.
- D12. Esra Isci Bostanci, Asiye Ugras Dikmen, Mehmet Anil Onan. Sozlu Sunu 24- Endometrium kanserine minimal invaziv yaklasim ve sonuclarin vücut kitle indeksi ile ilişkisi: Tek merkez deneyim sonuclari. 1st International & XVIth National Gynecologic Oncology Congress, 21-25 November 2018, Antalya, Turkey.
- D13. Yagmur Soykan, Esra Isci Bostanci, Mehmet Anil Onan. Sozlu Sunu 31- Predictability of lower uterine segment to angiolymphatic invasion, survival and lymph node involvement for early stage endometrioid endometrial cancer. 1st International & XVIth National Gynecologic Oncology Congress, 21-25 November 2018, Antalya, Turkey.

- D14. Ayse Sinem Duru Cotelı, Esra İsci Bostancı. Sözlü Sunu 62- Conservative Management without Operation of a Patient with Surgicel. Mimicking Tumor Recurrence. SBÜ Uluslararası Kadın Doğum ve Yenidogan Günleri, 18-21 Mart 2021, Ankara, Türkiye.
- D15. E-POSTER 156. Pelin Hobek, Esra İsci Bostancı, Mehmet Anil Onan. Primary peritoneal mesothelioma; two case report and review of the literature. ESGO 2023 Istanbul. International Journal of Gynecological Cancer (Q1).
- D16. POSTER Bozdayı G., Çalışkan E., Yiğit S., İşçi Bostancı E. İnsan Papillomavirus (HPV) Tanısında Kullanılan Laboratuvar Teknolojilerindeki Gelişmeler ve Tanısal Performans Açısından İki Moleküler Tanı Platformunun Değerlendirilmesi. 7. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı), Muğla, Türkiye, 1 - 05 Kasım 2023, ss.102

E. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler:

- E1. Berna Seçkin, Meryem Kuru Pekcan, Esra İsci Bostancı, Hasan Ali Inal, Mahmut Nedim Çiçek. P069- Comparison of pregnancy rates in PCOS patients undergoing clomiphene citrate and IUI treatment with different leading follicular size. V. Üreme Tıbbi ve Cerrahisi Derneği Kongresi, 28-31 Ekim 2015, Antalya.
- E2. Ömer Hamid Yumusak, Serkan Kahyaoglu, Meryem Kuru Pekcan, Esra İsci, Sebnem Ozyer, Mahmut Nedim Cicek, Yasemin Tasci, Salim Erkaya. P055- Klonifen sitrat tedavisi verilen infertil hastalarda intrauterin inseminasyon zamanlamasına göre siklus sonuclari: retrospektif bir calisma. 12. Zekai Tahir Burak Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi, 12-14 Kasım 2015, Ankara.
- E3. A.Seval Ozgu Erdinc, Nafiye Yılmaz, Esra İsci, Aytekin Tokmak, A.Irfan Guzel, Yesim Bardakci, Yasemin Yuksel, Salim Erkaya. Sozlu Sunu- Metabolik sendromun IVF sonuclari üzerinde etkisi var mi?. TSRM 2016, 7.Ulusal Ureme Endokrinolojisi ve Infertilite Kongresi, 17-20 Kasım 2016, Antalya.
- E4. Umit Yasemin Sert, Esra İsci Bostancı, Ozlem Erdem, Haldun Guner, Mehmet Anil Onan. P105- Leiomyom zemininde Uterin Angiosarkom. 15. Ulusal Jinekolojik Onkoloji Kongresi, 30 Kasım- 4 Aralık 2016, Antalya.
- E5. M. Kerem, S.Yildiz Oguz, E.Bostancı, S. Misirlioglu, F. Karatas, K. Dikmen, A. Alper, M. Arvas, H.Guner, A.Onan, C.Taskiran. Sozlu Sunu OP12- The value of liver resection at primary, secondary or tertiary cytoreductive surgery for ovarian cancer. 15. Ulusal Jinekolojik Onkoloji Kongresi, 30 Kasım- 4 Aralık 2016, Antalya.
- E6. Esra İsci Bostancı, Mehmet Anil Onan. Sozlu Sunu 60- Postmenopozal Donemde Uterin Arteriovenoz Malformasyon: Nadir görülen bir olgu. 7. Palandoken Kadın Doğum Kongresi, 2-4 Mart 2018, Erzurum.
- E7. Esra İsci Bostancı, Umit Yasemin Sert, Mehmet Anil Onan. Sozlu Sunu 23- Inguinal lenf nodu metastazli erişkin tip granuloza hücreli tumor:olgu sunumu. Karadeniz Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi, 12-15 Nisan 2018, Samsun.

- E8. Bilge Pinar Keskinsoy, Esra Isci Bostanci, Mehmet Anil Onan. Sozlu Sunu 22- Metastases of breast invasive ductal carcinoma to all genital tract: a case report. 16.Ulusal Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi, 9-13 Mayıs 2018, Antalya.
- E9. Esra Isci Bostanci. Sozlu Sunu- Neoadjuvan kemoterapinin uzun donem sag kalima olumlu etkisi var mi?. Turk Jinekolojik Onkoloji Dernegi Genc Jinekolog Onkologlar Platformu Over Kanseri Calistayi, 10 Haziran 2018, Ankara.
- E10. Umit Yasemin Sert, Esra Isci Bostanci, Serkan Kahyaoglu. Sozlu Sunu 14-Predicting postterm pregnancies by using first and second trimester screening and fetomaternal factors. Kardiyovaskuler Akademi Dernegi Gebelik ve Kardiyovaskuler Hastaliklar Sempozyumu, 26 Temmuz 2018, Ankara.
- E11. Esra Isci Bostanci, Ayse Sinem Duru Coteli, Yasin Durmus, Nurettin Boran. Sozlu Sunu 33- Uterine didelphys with bilateral cervical cancer involvement in a woman and review of the literature. Obstetrik ve Jinekoloji Zirvesi “Tartismali Konular”, 2-6 Ekim 2019, Antalya.
- E12. Sefanur Gamze Karaca, Sinem Ayse Duru Coteli, Esra Isci Bostanci, Fulya Kayikcioglu. P08- Port-site metastasis of granulosa cell tumor of the ovary. Obstetrik ve Jinekoloji Zirvesi “Tartismali Konular”, 2-6 Ekim 2019, Antalya.
- E13. Esra Ozyoruk Kaya, Ayse Sinem Duru Coteli, Yasin Durmus, Esra Isci Bostanci. P18- Endometrial cancer metastasis to the frontal lobe; a rare presentation of a gynaecologic tumor. Obstetrik ve Jinekoloji Zirvesi “Tartismali Konular”, 2-6 Ekim 2019, Antalya.
- E14. Esra Isci Bostanci. Sozlu Sunu- Serviks Kanseri Evrelemesi FIGO 2018. TJOD Ankara Subesi Serviks Kanseri Taramasi ve Preinvaziv Servikal Lezyonlar. 6 Ocak 2019, Ankara.
- E15. Sinem Ayse Duru Coteli, Esra Isci Bostanci, Yasin Durmus, Fulya Kayikcioglu, Nurettin Boran. Sozlu Sunu 39- Port-site metastases seen after 17 years of initial diagnosis in a borderline serous ovarian tumor. 3.Minimal Invaziv Jinekolojik Cerrahi Kongresi, 19-22 Subat 2020, Istanbul.
- E16. Funda CEVHER AKDULUM, Nuray CAMGOZ ERYILMAZ, Berrin GUNAYDIN, Ayse BORKLUCE, Esra BOSTANCI, Ahmet ERDEM. Sözlü Sunu 68 Surgical and anesthetic management of postpartum hemorrhage 45 days after cesarean section. BALKAN STATES ANESTHESIA DAYS – VII, 30 Nisan- 2 Mayıs 2021.
- E17. Sözlü sunu 25. Adölesan Yaşta Görülen Krukenberg Tümör Rüptürü Olgu Sunumu ve Literatür Taraması. Yağmur Soykan¹, Aydın Yavuz², Esra İşçi Bostancı³. Ulusal Jinekolojik Onkoloji Kongresi & Ulusal Servikal Patolojiler ve Kolposkopi Kongresi. 20-22 Ocak 2023.
- E18. Sözlü sunu 26. Anti-N-metil-d-aspartat (NMDA) reseptör ensefalitine neden olan immatür teratom; olgu sunumu Pelin Höbek, Esra İşçi Bostancı, Mehmet Anıl Onan. Ulusal Jinekolojik Onkoloji Kongresi & Ulusal Servikal Patolojiler ve Kolposkopi Kongresi. 20-22 Ocak 2023.

F. Kitap Bölümü:

- F1. Ömer Hamid Yumusak, Esra Isci Bostancı. Anatomi-Fizyoloji-Embriyoloji-Menstrual Siklus Fizyolojisi. Kadın Hastalıkları ve Doğum TUS-Yandal ve Basasistanlık Sınavına Hazırlık Soru Bankası. Edi. Nedim Çiçek, Salim Erkaya, Pelikan Yayınları, 2015. ISBN: 6059029384.
- F2. Esra Isci Bostancı. Bölüm 21- Vulvanın Preinvaziv ve Nonneoplastik Hastalıkları. Her Yönüyle Jinekoloji ve Obstetrik, Ders Kitabı, Edi. Rahmi Sinan Karadeniz, A. Akın Sivaslıoğlu, 2021, ISBN: 978 605 4477 43 2.
- F3. Esra Isci Bostancı. Bölüm 22- Vulva Kanseri. Her Yönüyle Jinekoloji ve Obstetrik, Ders Kitabı, Edi. Rahmi Sinan Karadeniz, A. Akın Sivaslıoğlu, 2021, ISBN: 978 605 4477 43 2.
- F4. Esra Isci Bostancı, Ayse Hande Arpacı. Bölüm 13- Uterus (Torsiyon/Detorsiyon) Iskemi Reperfüzyon. Deneysel Iskemi Reperfüzyon Modelleri, Bilimsel Kitap, Edi. Aysegül Küçük, Mustafa Arslan, 2021, ISBN: 978-625-7451-88-8.
- F5. Gülay Kip, Esra Isci Bostancı. Bölüm 14- Over Torsiyon/Detorsiyon) Iskemi Reperfüzyon. Deneysel Iskemi Reperfüzyon Modelleri, Bilimsel Kitap, Edi. Aysegül Küçük, Mustafa Arslan, 2021, ISBN: 978-625-7451-88-8.

G. Sertifikalar:

- G1. T.C. Sağlık Bakanlığı SBÜ Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı EAH, Kolposkopi Kursu, 2016, Ankara.
- G2. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu XX; Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi, 2017, Ankara.

H. Katıldığı Kurslar:

- H1. Kadın Hastalıkları ve Doğum Alanında Karşılaşılan Adli Problemlerde Yaklaşımlar, 13 Kasım 2009, Ankara.
- H2. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı ve EAH Kolposkopi Kursu, 20-21 Ocak 2012, Ankara.
- H3. Gynecology Cadaver School, Pelvik Anatomi Kadavra Kursu, 5-6 Eylül 2015, Ankara.
- H4. Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Laparoskopik Çalıştayı; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2015, Ankara.
- H5. Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Laparoskopik Sütür Kursu; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2015, Ankara.
- H6. Gynecology Cadaver School, 2. Pelvik Anatomi ve Cerrahi Kadavra Kursu, 28-29 Mayıs 2016, Ankara.
- H7. Jinekolojik Kanselerde Sentinel Lenf Nodu Konsepti Kursu, 2019, Ankara.

I. Ödüller

- I1. ESGO 19 International Meeting of The European Society of Gynaecological Oncology Kongresi'nde ENYGO Quiz Winner. 24-27 Ekim 2015, Nice, France.

J. Yurtdışı Deneyimler

- J1. Clinical and Research Fellowship: New York University School of Medicine Department of Obstetrical and Gynecological Ultrasound Unit (March 4,2013 -May 1, 2013).



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..