



MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

**SERVİKAL KANSER TEDAVİSİNDE POTANSİYEL TERAPÖTİK  
AJAN OLARAK BORİK ASİT'İN YERİNİN SERVİKAL KANSER HÜCRE  
HATTINDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Fatih KURNAZ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Pınar Solmaz HASDEMİR

Manisa, 2023



MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**SERVİKAL KANSER TEDAVİSİNDE POTANSİYEL TERAPÖTİK  
AJAN OLARAK BORİK ASİT'İN YERİNİN SERVİKAL KANSER HÜCRE  
HATTINDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Fatih KURNAZ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Pınar Solmaz HASDEMİR

Manisa, 2023

## ÖNSÖZ

Asistanlığım boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşan, cerrahi tecrübeleriyle her zaman yol gösterici ve yardımcı olan saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Pınar Solmaz HASDEMİR' e ve Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Naci Kemal KUŞÇU' ya;

Asistanlık süresi boyunca tecrübe, beceri ve bilgilerini bizlere aktaran, yardımlarını esirgemeyen, yetişmemde büyük emekleri geçen, bilgi, yetenek ve deneyimleri ile rehberlik eden Sayın Prof. Dr. Semra ORUÇ, Prof. Dr. Tevfik GÜVENAL, Prof. Dr. Hasan Tayfun ÖZÇAKIR, Prof. Dr. Aslı GÖKER, Prof. Dr. Burcu ARTUNÇ ÜLKÜMEN, Doç. Dr. Yıldız UYAR' a ve Dr. Öğretim Görevlisi Kemal SARSMAN' a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanış aşamasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Seda SABAH ÖZCAN' a;

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve çok şey öğrendiğim Op. Dr. Duygu KARTAL, Op. Dr. M. Ayça İBİŞ, Op. Dr. Aygül ALİYEVA ve Op. Dr. Nigar ÇETİNKAYA' ya, desteklerini her zaman hissettiren ve zorlu asistanlık sürecini kolaylaştırarak güzel anılar biriktirmemi sağlayan Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı' nda görevli tüm Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma;

Rotasyonlarım sırasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan tüm hocalarıma, uzman ve asistan meslektaşlarıma;

Uzmanlık eğitimim süresince desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen tüm hemşire arkadaşlarıma, poliklinik ve servisimizdeki tüm tıbbi sekreter ve yardımcı sağlık personellerimize en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca sevgi ve desteklerini daima yanımda hissettiğim, bugünlere gelmemde sonsuz emek, özveri ve fedakârlıkların sahibi canım aileme ve sevgili eşim Ayşe KURNAZ' a tüm içtenliğimle ayrı ayrı teşekkürlerimi sunuyorum.

## TABLO DİZİNİ

|                                               |           |
|-----------------------------------------------|-----------|
| <b>Tablo 1.</b> Genital HPV sınıflaması ..... | <b>10</b> |
| <b>Tablo 2.</b> 2018 FIGO Evrelemesi .....    | <b>18</b> |

## ŞEKİL DİZİNİ

|                                                                                                                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Şekil 1.</b> Servikte orijinal ve yeni SKB ve transformasyon zonunun şematik görünümü.....                                                                          | <b>4</b>  |
| <b>Şekil 2.</b> 2020 yılında Dünya’da serviks kanseri insidansı ve mortalitesi .....                                                                                   | <b>5</b>  |
| <b>Şekil 3.</b> Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanserın Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları .....                                                                      | <b>6</b>  |
| <b>Şekil 4.</b> Erken veya yapısal olmayan genlerin, kapsid genlerinin ve yukarı akış düzenleyici bölgesinin (URR) düzenini gösteren HPV genomunun şematik sunumu..... | <b>10</b> |
| <b>Şekil 5.</b> Papillomavirüs yaşam döngüsünün ana evrelerinin skuamöz epitelindeki yeri. ....                                                                        | <b>11</b> |
| <b>Şekil 7.</b> Servikal lezyonların kansere ilerlemesi.....                                                                                                           | <b>14</b> |
| <b>ŞEKİL 8.</b> PI3K/AKT Sinyal Yolağı.....                                                                                                                            | <b>22</b> |
| <b>ŞEKİL 9.</b> Apoptozis Sinyal İletimi.....                                                                                                                          | <b>23</b> |
| <b>Şekil 10.</b> MRC-5 ve Hela Hücre Hatları İçin MTT Sonuç Verileri.....                                                                                              | <b>30</b> |
| <b>Şekil 11.</b> Hela Hücre Hattı Koloni Formasyon Deney Sonuçları .....                                                                                               | <b>31</b> |
| <b>Şekil 12.</b> Hela Migrasyon Deneyi.....                                                                                                                            | <b>32</b> |
| <b>Şekil 13.</b> Hela flow sitometri analizleri .....                                                                                                                  | <b>33</b> |
| <b>Şekil 14.</b> Apoptoz ile ilgili seçilmiş genlerin mRNA ekspresyon katlı değişim grafiği .....                                                                      | <b>34</b> |
| <b>Şekil 15.</b> Hela TAS, TOS, OSI grafikleri .....                                                                                                                   | <b>36</b> |

## **KISALTMALAR**

**CDK:** Siklin bağımlı kinaz

**DNA:** Deoksiribonükleik asit

**DSÖ:** Dünya Sağlık Örgütü

**SKB:** Skuamokolumnar bileşke

**HPV:** Human papilloma virüs

**OK:** Oral kontraseptif

**BP:** Baz çifti

**ORF:** Open reading frame

**LCR:** Uzun kontrol bölgesi

**URR:** Yukarı akış düzenleyici bölge

**APC:** Antijen sunan hücre

**pRB:** Retinoblastoma

**SIL:** Squamous Intraepitelial Lesions (yassı intraepitelyal lezyon)

**CIN:** Cervical Intraepitelial Neoplasia (servikal intraepitelyal neoplazi)

**ASCUS:** Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (önemi belirlenemeyen anormal yassı epitel hücreleri)

**ASC-H:** Yüksek Dereceli Atipik Yassı Hücreler

**HSIL:** High-grade Squamous Intraepitelial Lesions (yüksek dereceli yassı intraepitelyal lezyon)

**LSIL:** Low-grade Squamous Intraepitelial Lesions (düşük dereceli yassı intraepitelyal lezyon)

**PAP:** Papanicolaou

**PCR:** Polimeraz zincir reaksiyonu

**FIGO:** Uluslararası Obstetrik ve Jinekoloji Federasyonu

**RT:** Radyoterapi

**KT:** Kemoterapi

**EBRT:** Eksternal ışın radyoterapi

**BRT:** İntrakaviter brakiterapi

**BA:** Borik asit

**CaFB:** Kalsiyum fruktoborat

**HCC:** Hepatoselüler karsinom

**PI3K:** Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz

**PI3P:** Fosfatidilinositol 3-fosfat

**AKT:** Protein kinaz B

**cAMP:** Siklik adenosin monofosfat

**TNF:** Tümör nekroz faktör

**FADD:** Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini

**DISC:** Ölümü tetikleyen sinyal kompleksi

**ROS:** Reaktif oksijen türleri

## İÇİNDEKİLER

|                                                  |     |
|--------------------------------------------------|-----|
| ÖNSÖZ .....                                      | i   |
| TABLO DİZİNİ .....                               | ii  |
| ŞEKİL DİZİNİ .....                               | iii |
| KISALTMALAR .....                                | iv  |
| İÇİNDEKİLER .....                                | vi  |
| I. GİRİŞ .....                                   | 1   |
| II. GENEL BİLGİLER .....                         | 3   |
| 2.1. Serviks Kanseri .....                       | 3   |
| 2.1.1. Serviks Anatomisi ve Histolojisi .....    | 3   |
| 2.1.2. Epidemiyoloji .....                       | 4   |
| 2.1.3. Risk Faktörleri .....                     | 6   |
| 2.1.3.1. HPV Enfeksiyonu .....                   | 6   |
| 2.1.3.2. Sigara .....                            | 7   |
| 2.1.3.3. Oral Kontraseptifler .....              | 8   |
| 2.1.3.4. Diğer Faktörler .....                   | 8   |
| 2.1.4. HPV ve Serviks Kanseri İle İlişkisi ..... | 8   |
| 2.1.5. Serviks Kanseri Tarama Yöntemleri .....   | 15  |
| 2.1.5.1. Servikovajinal Sitoloji .....           | 15  |
| 2.1.5.2. HPV Testi .....                         | 15  |
| 2.1.6. Serviks Kanseri Tanı ve Evreleme .....    | 16  |
| 2.1.7. Serviks Kanseri Tedavisi .....            | 18  |
| 2.1.7.1. Cerrahi Tedavi .....                    | 19  |
| 2.1.7.2. Kemoradyoterapi .....                   | 20  |
| 2.2. Kanseri Biyolojisi .....                    | 21  |
| 2.2.1. Apoptozis ve Sinyal Yolları .....         | 21  |
| 2.2.1.1. İntrensek Yolak İle Apoptozis .....     | 22  |
| 2.2.1.2. Ekstrensek Yolak İle Apoptozis .....    | 24  |
| 2.3. Borik Asit ve Hedef Tedavideki Yeri .....   | 24  |



|                                                         |           |
|---------------------------------------------------------|-----------|
| 2.4. Kalsiyum Fruktoborat ve Hedef Tedavideki Yeri..... | 25        |
| <b>III. MATERYAL VE METOT.....</b>                      | <b>26</b> |
| 3.1. Hücre Hatları ve Reaktifler .....                  | 26        |
| 3.2. Hücre Kültürü .....                                | 26        |
| 3.3. Hücre Canlılığı ve Toksisite Testi .....           | 26        |
| 3.4. Koloni Oluşumu Deneyi.....                         | 27        |
| 3.5. Yara İyileşmesi Migrasyon Testi.....               | 27        |
| 3.6. Hücre Apoptoz Testi.....                           | 27        |
| 3.7. DNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı-PCR.....          | 28        |
| 3.8. Oksidan ve Antioksidan Testi .....                 | 28        |
| 3.9. İstatistiksel Analiz .....                         | 29        |
| <b>IV. BULGULAR .....</b>                               | <b>30</b> |
| 4.1. Hücre Canlılığı ve Toksisite Testi Sonuçları ..... | 30        |
| 4.2. Koloni Oluşum Sonuçları .....                      | 31        |
| 4.3. Yara İyileşmesi Migrasyon Testi Sonuçları.....     | 32        |
| 4.4. Hücre Apoptoz Testi Sonuçları .....                | 33        |
| 4.5. mRNA İzolasyonu Ve Gerçek Zamanlı-PCR .....        | 34        |
| 4.6. Oksidan ve Antioksidan Testi Sonuçları .....       | 35        |
| <b>V. TARTIŞMA.....</b>                                 | <b>37</b> |
| <b>VI. SONUÇ.....</b>                                   | <b>44</b> |
| <b>VII. ÖZET .....</b>                                  | <b>45</b> |
| <b>VIII. İZGİLİZCE ÖZET.....</b>                        | <b>47</b> |
| <b>IX. KAYNAKLAR.....</b>                               | <b>49</b> |

## I. GİRİŞ

Kanser, deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz çoğalması veya anormal bir şekilde büyümesidir. Hücre çoğalması, apoptozis (programlı hücre ölümü), farklılaşma, yaşlılık ve bunların kendi iç dengelerinde bozulmasıyla, genetik ve epigenetik değişikliklerle uyarılan çok aşamalı moleküler bir süreçtir.

Serviks kanseri, 2020' de dünya çapında tahmini 604.000 yeni vaka ve 342.000 ölümle kadınlarda en sık teşhis edilen meme, kolorektal, akciğer, kanserinden sonra dördüncü sıklıkta görülen kanserdir [1]. Gelişmekte olan ülkelerde 2. sıklıkta görülür iken, gelişmiş ülkelerde tarama programlarının başarılı uygulamaları nedeniyle 6. hatta bazı ülkelerde 10. sıraya inmiştir. Ölümlerin çoğu gelişmemiş ülkelerde görülmektedir. Bu sayılar serviks kanserinde tarama programlarının bu kanserde görülme sıklığını ve ölüm oranlarını azaltmakta ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı' nın verilerine göre 2003 yılı verilerinde serviks kanseri sayısı 763' e çıkarken tüm kadın kanserleri arasında da 9. sıraya yükselmiştir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı' nın 2020 yılında yaptığı GLOBOCAN çalışmasına göre ise Türkiye' deki serviks kanseri insidansı yüz binde 4.1 dir. 2021 yılında Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Kanser Dairesi' nin 2017 yılına ait olan son verileri yayınlanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda insidans 2017' de yüz binde 4.3 iken, serviks kanseri kadın kanserleri içerisinde 9. sırada yer almaktadır [2].

Serviks kanserinin prognozunu belirleyen en önemli faktör tümörün evresidir. Hastalığın evresi ilerledikçe tedaviye yanıt azalmakta, mortalite oranları artmaktadır. Hastalığın tedavisi cerrahi ve/veya kemoradyoterapidir. Cerrahi tedavi erken evre olan Evre I ve IIA hastalarda bir tedavi seçeneği olup, ileri evre hastalarda genellikle primer tedavi olarak uygulanmamaktadır. Radyoterapi ise hastalığın her evresinde uygulanabilmekte ve etkinliğini artırmak için aynı anda kemoterapi ile birlikte uygulanmaktadır [3, 4].

İleri evre servikal kanser olgularında tedavinin zor ve mortalitenin yüksek olması yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini gerektirmektedir. Bu tedaviler

radoterapinin etkinliğini artırmanın yanında daha etkili ilaç tedavilerinin geliştirilmesi şeklindedir.

1980 yılından beri iz element olarak tanımlanan bor, 1996 yılında epidemiyolojik verilerin de eksikliği dikkate alarak Dünya Sağlık Örgütü'nce (DSÖ) 'insan sağlığı için olası temel elementler' sınıfına alınmıştır. Günlük diyetimizin bir parçası olan borik asit; bor elementinin en sık görülen formlarından bir tanesidir. Bor periyodik tablonun 13. grup elementinde metalik olmayan tek elementtir. Doğada bor elemental halde bulunmaz. Borik asit; kernit, boraks, boratlar, üleksit ve kolemanitin bir bileşeni olarak bulunur.[5]

İnsanlarda uygulanan bor dozunun %90' ı solunum yolu epiteli, gastrointestinal dokuların mukozal membranları, ağız, vajina ve anüs tarafından emilir ve borik asit  $B(OH)_3$  olarak tüm vücuda eşit olarak dağılır [6, 7]. Borun çeşitli enzim ve minerallerin metabolik süreçlerini ve bağışıklık sistemi regülasyonunu değiştirebildiği de gösterilmiştir [8]. Ayrıca, prostat [9], serviks [10], akciğer [11], meme [12, 13] ve malign melanom [14, 15], kolon [16], over kanseri [17] gibi bir çok kanser tiplerinde anti-karsinojenik etkilere sahip olabileceklerini gösteren son yayınlar sayesinde boratlar giderek daha çekici hale gelmektedir.

Türkiye bor kaynakları bakımından dünyanın en büyük rezervlerine sahip ülkesidir. Dünya toplam rezervinin %66' sı Türkiye' de bulunmaktadır. Ege Bölgesi' nde yapılan bir araştırmada borik asitten zengin diyetle beslenen bölgelerdeki kadınlar ile borik asitten fakir diyetle beslenen bölgelerdeki kadınlar karşılaştırıldığında, borik asitten zengin diyetle beslenen kadınlarda serviks kanseri saptanma oranı daha düşük bulunmuştur [18].

Bu çalışmada, apoptotik yollar üzerinden etki edebildiği farklı kanser tiplerinde gösterilmiş olan borik asit ve kalsiyum fruktoborat bileşiğinin, servikal kanser hücre hatlarında benzer etkinlik gösterip göstermeyeceği araştırılacaktır.

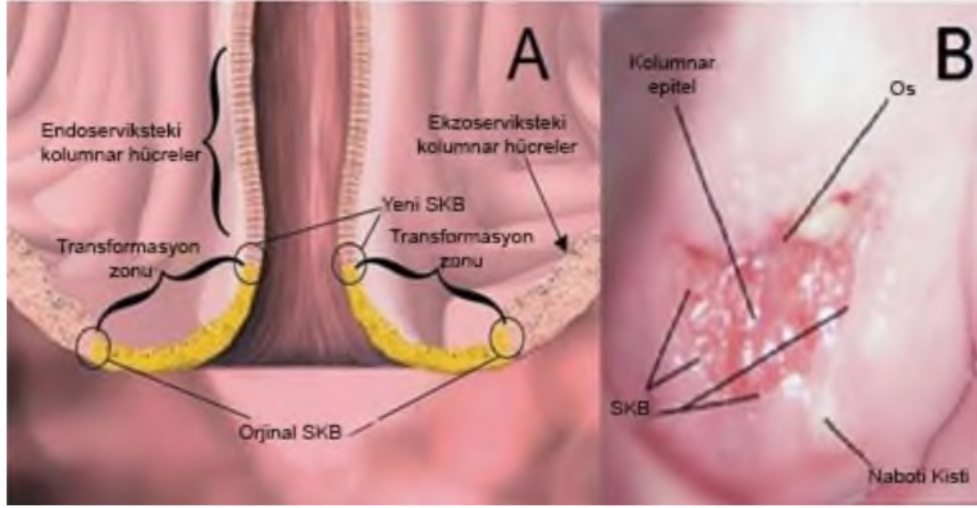
## **II. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Serviks Kanseri**

#### **2.1.1. Serviks Anatomisi ve Histolojisi**

Serviks, istmus uterinin kaudalinden başlayan ve vajinaya açılan yaklaşık 2-3 cm uzunluktaki endoservikal ve ekzoservikal kanaldan oluşan bir parçadır. Serviks duvarı esas olarak, fibröz doku ve küçük bir miktar düz kastan oluşur. Düz kas, servikal duvarın periferinde bulunur. Kardinal ile uterosakral ligamentler ve vajinanın fibromusküler duvarları için birleşim noktası olarak görev yapar.

Serviks, portio vaginalis (ektoserviks) ve portio supravaginalis (endoserviks) olmak üzere iki bölüme ayrılır. Servikal mukoza hem ektoserviks karakteristik özelliği olan çok katlı yassı epitel hem de endoservikal kanalın karakteristik özelliği olan mukus salgılayan kolumnar epitel içerir. Bu iki epitelin bulunduğu bileşkeye skuamokolumnar bileşke (SKB) denir ve yerleşim olarak değişken ve hormonal uyarılara bağımlıdır. SKB, yenidoğanda ektoserviks yerleşimlidir. Menarşta östrojen üretimi, vaginal epitelin glikojenle dolmasına neden olur. Laktobasiller glikojenle pH'ı düşürmek için etkileşir ve kolumnar hücrelerin metaplaziye uğramasına neden olur. Metaplazi sonrası yeni bir bileşke oluşur ve bu bileşkeye yeni ya da fizyolojik SKB denir. Orijinal SKB ile yeni SKB arasındaki bölgeye transformasyon zonu denir. Serviksin prekanseröz lezyonlarının büyük bir bölümünün bu bölgeden oluştuğu düşünülmektedir [19, 20]. Şekil 1' de skuamokolumnar bileşke ve transformasyon zonu gösterilmektedir.



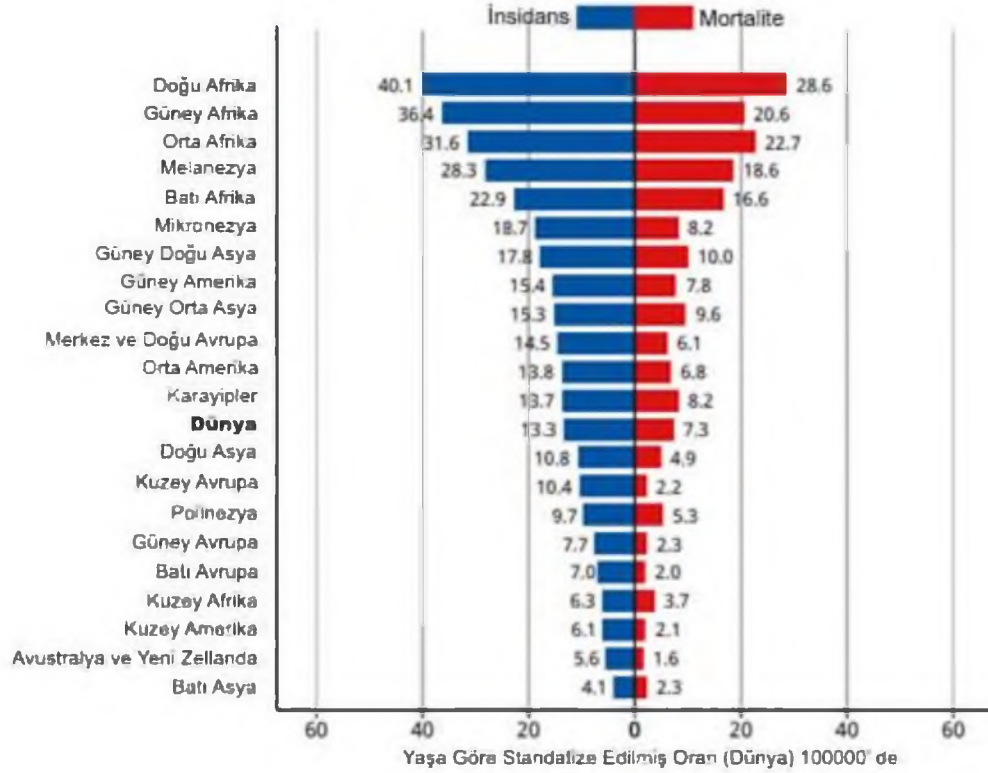
**Şekil 1.** Servikte orijinal ve yeni SKB ve transformasyon zonunun şematik görünümü (A), Normal bir servikte yeni SKB yeri ve transformasyon zonu görünümü (B)

### 2.1.2. Epidemiyoloji

Serviks kanseri, 2020' de dünya çapında tahmini 604.000 yeni vaka ve 342.000 ölümle kadınlarda en sık teşhis edilen meme, kolorektal, akciğer, kanserinden sonra dördüncü sıklıkta görülen kanserdir [1]. Gelişmekte olan ülkelerde daha sık görülmekle birlikte gelişmiş ülkelerde tarama programlarının başarılı uygulamaları nedeniyle görülme sıklığı daha da azalmıştır. Ölümlerin çoğu gelişmemiş ülkelerde görülmektedir. Bu sayılar serviks kanserinde tarama programlarının bu kanserde görülme sıklığını ve ölüm oranlarını azaltmakta ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Serviks kanserinin insidansı coğrafi bölgeler arasında önemli farklılıklar göstermektedir. En yüksek serviks kanseri insidansı Afrika ülkelerinde, Güney Amerika, Güneydoğu Asya ve Doğu Avrupa' da gözlenirken, toplum temelli

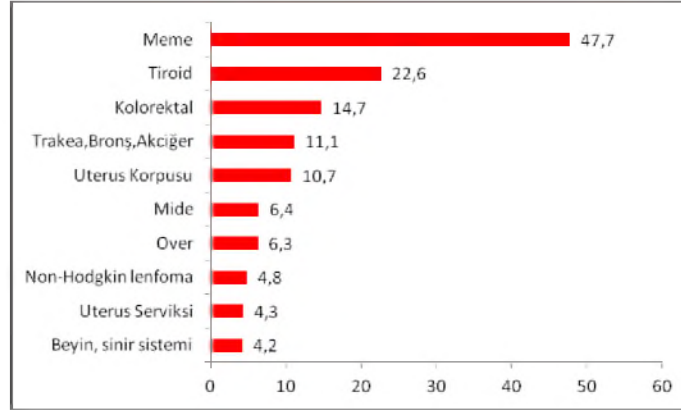
sitolojik tarama programlarının yaygın olarak uygulandığı Kuzey Amerika, Avustralya ve çoğu Avrupa ülkesinde sıklığı daha az görülmektedir [1].



**Şekil 2.** 2020 yılında Dünya’da serviks kanseri insidansı ve mortalitesi

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı’ nın verilerine göre 1996 yılında 623 tane serviks kanseri saptanmış olup tüm kadın kanserleri arasında 7. sırada iken 2002 yılında bu sayı 708’ e çıkmış ancak tüm kadın kanserleri arasında 10. sıraya gerilemiştir. 2003 yılı verilerinde serviks kanseri sayısı 763’ e çıkarken tüm kadın kanserleri arasında da 9. sıraya yükselmiştir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı’ nın 2002 yılında yaptığı GLOBOCAN çalışmasına göre ise Türkiye’ deki serviks kanseri insidansı yüz binde 4.5, 2008 verilerine göre insidans yüz binde 4.2, 2020 verilerine göre ise 1.1 olarak verilmiştir. 2020 verilerine göre yılda 2542 yeni serviks kanseri vakası ve serviks kanserine bağlı 1245 ölüm olması beklenmektedir. 2020 GLOBOCAN verilerine göre insidanda bir düşme varmış gibi görülmekle birlikte bu veriler Türkiye rakamlarını tam olarak yansıtmamaktadır. 2021 yılında Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Kanser Dairesi’ nin 2017 yılına ait olan son verileri yayınlanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda insidans 2015’ te yüz binde

4.5 iken, 2017 yılı rakamlarına göre serviks kanseri kadın kanserleri içerisinde 9. sırada yer alıp insidansı yüz binde 4.3 olarak bulunmuştur. [2]



**Şekil 3.** Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanserın Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2017) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide)

Serviks kanserinin ortalama tanı yaşı 45' tir [21]. Hastalık ilki 35-39 ve ikincisi 60-64 yaşlarında olmak üzere iki dönemde pik yapar [22]. Ayrıca, servikal kanserin mortalitesinin yaşla beraber genel olarak artmaktadır [23]. Gelişmekte olan ülkelerde yapılan taramalarda hastaların yaklaşık %85' inin tanı anında evresi FIGO evrelemesine göre evre III ve IV' tür [24].

### 2.1.3. Risk Faktörleri

#### 2.1.3.1. HPV Enfeksiyonu

Serviks kanserinde en önemli risk faktörü, human papilloma virüs (HPV) enfeksiyonudur. HPV, serviks, orofarenks, penis ve anüs dahil olmak üzere sayısız kanserle ilişkilidir. Servikal HPV enfeksiyonlarının çoğu geçicidir ve 6 ila 24 ay içinde vücuttan temizlenir. Bununla birlikte, neredeyse tüm serviks kanserleri, 16, 18, 31, 33, 45, 52 ve 58 dahil olmak üzere yüksek riskli HPV tiplerinin kalıcı enfeksiyonu ile ilişkilidir [25].

Tanımlanan 200 HPV türünden 12' si, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından kanserojen olarak belirlenmiştir; HPV-16, serviks kanseri vakalarının %50' sini ve HPV-18, %10' unu oluşturmaktadır. Yüksek riskli HPV

genotipleri ile kalıcı viral enfeksiyon nedensel ajandır ve dünya çapında serviks kanseri olan hastaların %99,7' sinde saptanabilir. HPV enfeksiyonu cinsel yolla bulaşır ve kadınların kabaca %80' i hayatlarının bir noktasında, çoğu 45 yaşına kadar enfekte olur. Servikste değişikliklerin ortaya çıkması 10 ila 15 yıl sürer. İlk cinsel ilişki yaşı serviks kanseri riskini artırırken, 13 yaşından küçük yaşta ilk cinsel ilişki veya menarş yakınlığı riski artırmaktadır. 18 yaşından önce cinsel ilişki, 21 yaşından büyük ilk cinsel ilişki yaşı ile karşılaştırıldığında, serviks kanseri gelişme riskinde iki kat artış bulunmuştur [26].

Cinsel partner sayısı altıdan fazla olan kadınların serviks kanserine yakalanma olasılığı, tek seks partneri olanlara göre yaklaşık 3 kat daha fazladır [25].

#### **2.1.3.2. Sigara**

Hem aktif hem de pasif sigara içiciliği serviks kanseri riskini artırmaktadır [27]. Sigara içen erkeklerde genital sekresyonlarında nikotin birikmekte ve cinsel ilişki esnasında bu kimyasal maddelerin kadının serviksine ulaşarak displaziye neden olmaktadır. Bu nedenle HPV' ye bağlı olsun ya da olmasın servikal displazisi olan kadınların kendilerinin sigara içmesi yanı sıra sigara içen partnerle beraber olmaları bile kanser riskini arttırabilmektedir.

Sigara içimi ile birçoğu kanserojen olan yaklaşık 4000 değişik kimyasal madde (benzil prenler, polisiklik aromatik maddeler ve tütüne özgü nitrozaminler gibi) ile vücudun karşılaştığı, sigara içenlerin servikal mukusunda bu maddelere normal popülasyondan çok daha fazla oranlarda rastlandığı belirtilmektedir [28, 29].

Kadınların sigaraya başlama yaşının erken olması ve günde tüketilen sigara sayısının fazla olması, kansere yakalanma ihtimalini arttıran diğer faktörler arasında yer almaktadır [30].



### **2.1.3.3. Oral Kontraseptifler**

Beş yıl veya daha uzun süre oral kontraseptif (OK) kullanan kadınlarda serviks kanseri riskinin yaklaşık olarak 2 kat arttığı gösterilmiştir. OK bırakıldıktan sonra 10 yıl veya daha fazla süre sonra kanser riskinin hiç OK kullanmayanlarla aynı seviyeye gerilediği saptanmıştır [31].

Serviks kanserinin histopatolojik alt tiplerinden en sık skuamoz hücreli kanser (%69.4) ve adenokanser (%24.6) görülmektedir. Her iki histopatolojik alt tip de benzer risk faktörlerine sahiptir [32].

### **2.1.3.4. Diğer Faktörler**

Menarş yaşı, menapoz yaşı veya menstrüel siklusun karakterinin serviks kanseri riskini etkilediğine dair veriler sınırlıdır. Ancak multiparite ile artmış risk arasında ilişki vardır. Parite ile ilişkisi de doğum travması ve gebelikteki hormon düzeyleri ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

İmmün yetmezlik, cinsel yolla bulaşan hastalık öyküsü, HPV ile ilişkili vulvar veya vajinal displazi öyküsü, servikal kanser taramasının yetersiz olması ya da olmaması diğer risk faktörleridir [33].

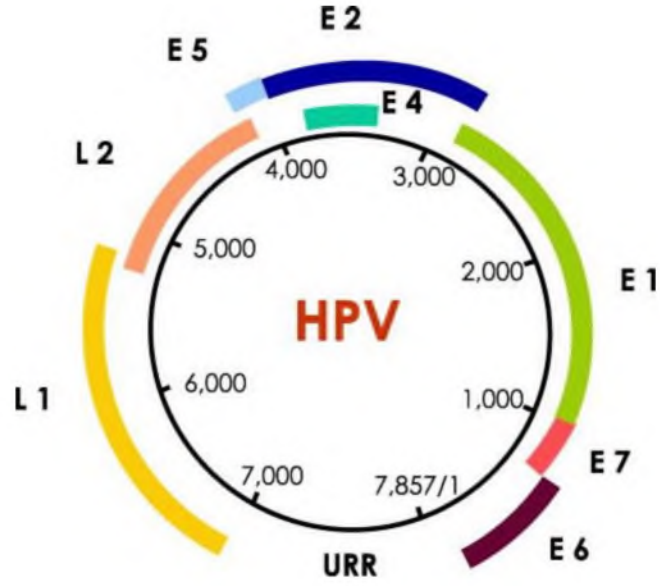
Diyetin HPV kalıcılığı üzerindeki rolünü değerlendiren birkaç çalışmada, meyveler, sebzeler, folat, retinol, C, B12 ve E vitaminleri, beta ve alfa-karoten, likopen, lutein/ zeaksantin ve kriptoksantin açısından zengin diyetlerin servikal neoplazinin olası bir koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir [34].

### **2.1.4. HPV ve Serviks Kanseri İle İlişkisi**

HPV, cinsel yolla bulaşan, çift sarmallı, dairesel, 8000 baz çifti içeren zarfsız bir DNA virüsüdür. Bilinen 100' den fazla HPV genotipi vardır ve bunların en az 15' i serviks ve diğer bölgelerde kansere neden olabilir. En yaygın iki onkogenik tip olan HPV 16 ve 18, dünya çapındaki tüm serviks kanserlerinin yaklaşık %70' ine neden olur [35].

HPV' ler, iyi huylu lezyonlardan invaziv tümörlere kadar geniş bir hastalık yelpazesine neden olur. Bilinen  $\alpha$ -papillomavirüs,  $\beta$ -papillomavirüs,  $\gamma$ -papillomavirüs,  $\mu$ -papillomavirüs ve nu-papillomavirüs olmak üzere beş ana HPV cinsi vardır.  $\alpha$ -papillomavirüs cinsindeki onkojenik mukozal HPV türleri, serviks kanserinin yanı sıra anal, vulvar, penil, vajinal ve orofarinks kanserlerinin başlıca nedenidir.  $\alpha$ -papillomavirus cinsinde genital kondiloma neden olan iyi huylu mukozal HPV tipleri de vardır.

HPV genomu, 6 erken ve 2 geç protein kodlayan 8 okuma bölgesinden (open reading frame - ORF) oluşmaktadır. Erken genleri, E1, E2, E4, E5, E6 ve E7' yi içeren bir kodlama bölgesi ve iki geç geni içeren majör (L1) ve minör (L2) kapsid proteinleri olmak üzere iki fonksiyonel genom bölgesi tanımlanmıştır [36]. ORF' ler, bir proteini kodlayan nükleotid dizisinde “başla” ve “dur” kodonları arasında yer alan bölümdür. E3 ORF protein kodlamaz. Bu yüzden hücre genomunda gösterilmezler. Erken genlerinin kodladığı proteinler yapısal olmayıp, transkripsiyon, replikasyon, regülasyon ve hücresel transformasyonla ilgilidirler. Bu proteinlerin bazıları keratinositlerin yapısı ve fonksiyonu ile doğrudan etkileşirler [37]. Ayrıca HPV genomu, uzun kontrol bölgesi (LCR) olarak adlandırılan, viral DNA replikasyonu ve transkripsiyonunda yer alan, düzenleyici elemanların çoğunu içeren, kodlayıcı olmayan bir bölgeye sahiptir. Her iki gen grubu, proteinleri kodlamayan ancak gen ekspresyonunun düzenlenmesi, genomun replikasyonu ve bunun virüs partiküllerine paketlenmesi için gerekli olan cis-elementleri içeren yaklaşık 1000 bp' lik yukarı akış düzenleyici bölge (URR) ile ayrılır.



**Şekil 4.** Erken (E) veya yapısal olmayan genlerin, kapsid genlerinin (L1 ve L2) ve yukarı akış düzenleyici bölgesinin (URR) düzenini gösteren HPV genomunun şematik sunumu [34].

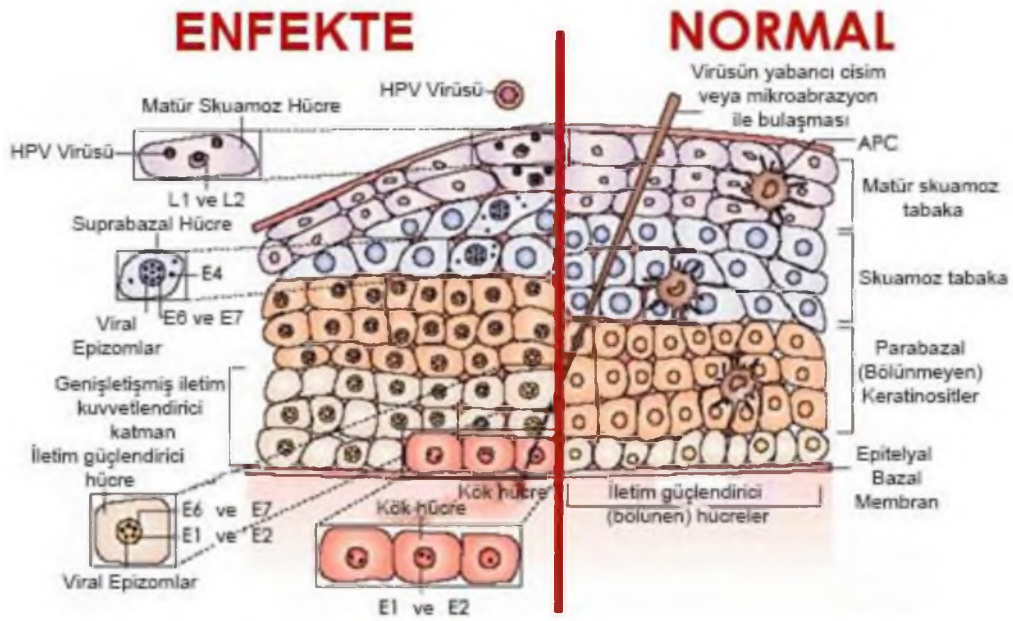
HPV' lerin sınıflandırılması, kapsid proteini L1' i kodlayan ORF' nin nükleotid dizisine dayanır. Farklı cinslere ait HPV tipleri, genomun L1 kısmı içinde %60' tan daha az benzerliğe sahiptir. Bir cins içindeki farklı viral türler, %60 ila %70 arasında benzerlik paylaşır. Yeni bir HPV tipi, diğer herhangi bir HPV tipine %90' dan daha az benzerliğe sahiptir [38]. Tablo 1' de genital HPV' lerin sınıflaması verilmiştir.

| SINIFLAMA                       | HPV TİPLERİ                                       |
|---------------------------------|---------------------------------------------------|
| Yüksek riskli veya karsinojenik | 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59    |
| Olası karsinojenik              | 26, 53, 66, 68, 73, 82                            |
| Düşük riskli                    | 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108 |

**Tablo 1.** Genital HPV sınıflaması [34]

Papilloma virüsler, doğal konakçı dokularına, deri veya mukozanın farklılaşan epitel hücrelerine mükemmel şekilde adapte olmuşlardır ve hücrel mekanizmayı kendi amaçları için kullanırlar. Döngü, enfeksiyöz

partiküllerin küçük kırılmalar yoluyla bağlandıkları ve hücrelere girdikleri epitelyumun bazal tabakasına ulaştığında başlar. Enfeksiyonun devam etmesi için virüsün bir epitelyal kök hücreyi enfekte etmesi gerekir. Epitel içindeki replikasyon döngüsü iki bölüme ayrılır. İlk olarak viral genom, yaklaşık 100' lük bir kopya sayısına kopyalanır. Başlangıçta enfekte olan ancak yine de kopyalanan viral genom, yetkin hücreler içinde bu düşük kopya sayısında değişken sürelerde tutulur. Viral proteinler E1 ve E2, bu bazal DNA replikasyonu için gereklidir. Viral kalıcılık sırasında, bağışıklık sisteminin enfeksiyonu bu durumda tuttuğu tahmin edilmektedir. İkincisi, bazal hücreler suprabazal bölme itildiğinde, bölünme yeteneklerini kaybederler ve bunun yerine terminal farklılaşma programını başlatırlar. Papilloma virüsler bu bölümde çoğalırlar ve çevreye salınmaları için, yüzeysel katmanlardaki doğal dönüşlerinin bir sonucu olarak ortaya çıkan epitel hücrelerinin parçalanmasından yararlanırlar (Şekil 5).



**Şekil 5.** Papillomavirüs yaşam döngüsünün ana evrelerinin skuamöz epitelindeki yeri. Servikal tabakalı skuamöz epitel hücre mimarisi ve enfeksiyondan sonra HPV proteinlerinin ekspresyonu. Epitelyal kök hücrelerin yavru hücreleri, bazal membran boyunca bölünür ve daha sonra daha fazla bölünme olmaksızın (sağ taraf) epitel boyunca dikey olarak olgunlaşır. HPV' nin epitelin bazal tabakasındaki kök hücrelere girmesinden sonra viral yapısal olmayan proteinlerin ekspresyonu meydana gelir. Bu proteinlerin

düzenlenmesi altında, bölünen hücre popülasyonu dikey olarak genişler ve epitel hücre farklılaşması gecikir. Olgun virionlar, yalnızca epitelyumun en yüzeysel katmanlarında üretilir. İntraepitelyal antijen sunan hücreler (APC' ler), HPV ile enfekte olmuş epitelde tükenir [34].

HPV DNA' sının konakçı hücre genomuna entegrasyonu, anormal proliferasyona ve malign progresyona yol açan HPV aracılı karsinogeneizde anahtar bir olaydır. Entegrasyon, onkogenlerin amplifikasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin bozulmasının yanı sıra kromozomlar arası ve kromozomlar arası yeniden düzenlemeleri yönlendirerek konak genomunu etkiler.

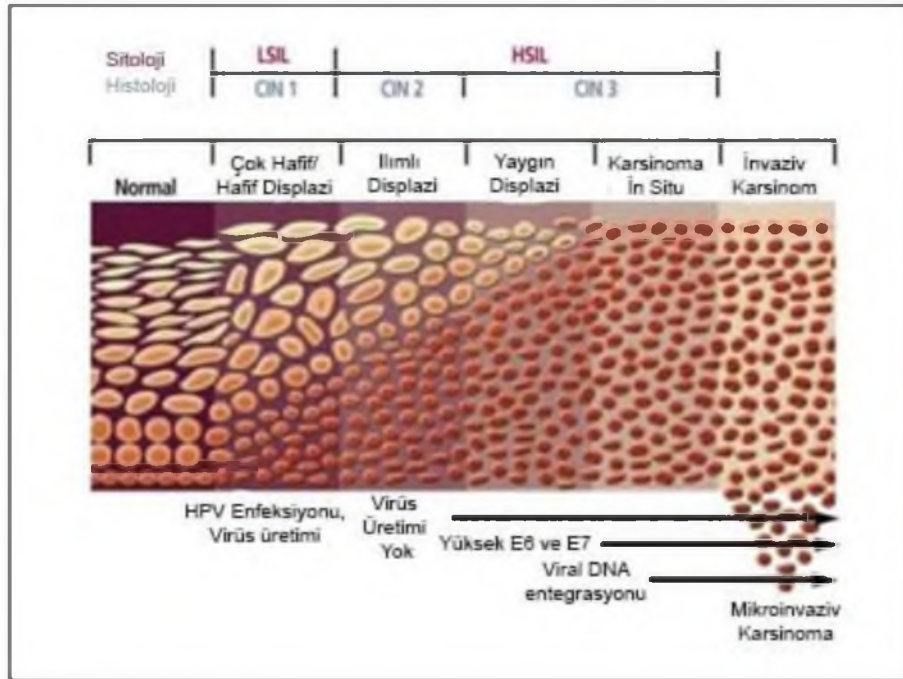
Virüs replikasyonu sürecindeki kritik moleküller, bir dizi hücre proteinle etkileşime giren viral proteinler E6 ve E7'dir. Erken genler E6 ve E7, normal hücre proliferasyonu düzenleyen iki temel tümör baskılayıcı gen p53 ve pRb' ye müdahale ederek HPV' nin neden olduğu karsinogeneizde önemli bir rol oynar.

E7' nin pRB' ye bağlanması, DNA replikasyonu için gerekli proteinlerin ekspresyonunu tetikleyen E2F transkripsiyon faktörünü aktive eder. E7 ayrıca histon deasetilazları AP1 transkripsiyon faktörünü aktive eder. Programlanmamış S- fazı normalde p53' ün etkisiyle apoptoza yol açar. p53 hücre döngüsü, metabolizma ve apoptoz düzenleyicilerini kodlayan genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktördür. HPV ile enfekte olmuş hücrelerde bu süreç, proteolitik bozunma için p53' ü hedefleyen viral E6 proteini tarafından etkisiz hale getirilir. Sonuç olarak, hücre döngüsü kontrolüne bağımlılık kalkar ve normal keratinosit farklılaşması geciktirilir (Şekil 6).



prekanseröz lezyonlar gelişir. Onkogenik ilerleme sırasında, çoğalan hücrelerin oranı, epitelyumun tüm kalınlığını kaplayana kadar sürekli olarak artar; bu aşamalar CIN1–CIN3 olarak tanımlanır. 10-20 yıl içinde, CIN3 enfeksiyonlarının yaklaşık üçte biri invaziv karsinoma ilerler [40].

Güncel servikal sitoloji terminolojisi 2014 yılında Bethesda sınıflandırması olarak tanımlanmıştır [41]. Bethesda Sistemi'nde, premalign skuamöz lezyonlar, önemi belirsiz atipik yassı hücreler (ASCUS), yüksek dereceli lezyonların dışlanamadığı atipik yassı hücreler (ASC-H), düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar (LSIL) ve yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar (HSIL) olmak üzere dört kategoriye ayrılmaktadır. CIN I' deki histolojik değişiklikler LSIL olarak isimlendirilirken CIN II ve CIN III' deki histolojik değişiklikler HSIL olarak adlandırılır.



**Şekil 7.** Servikal lezyonların kansere ilerlemesi

## **2.1.5. Serviks Kanseri Tarama Yöntemleri**

### **2.1.5.1. Servikovajinal Sitoloji**

İlk ortaya konulduğu yıllarda daha çok invaziv kanserleri belirleyebilen servikal yaymanın sitolojik incelemesi, günümüzde sıklıkla asemptomatik olan preinvaziv lezyonların ortaya çıkarılmasında, erken ve etkili tedavinin gerçekleştirilmesinde çok önemli rol oynamaktadır. Servikal yayma, bu yöntemi ilk ortaya koyan Dr. Papanicolaou' nun adının kısaltılması "Pap test" olarak anılmaktadır. Bu testin klinik uygulaması 60 yılı aşan bir süre olup serviks kanserinin insidansında ve mortalitesinde önemli bir azalma saplanmıştır. Kolay uygulanabilen, hastayı zedelemeyen, tekrarlanabilen, güvenilir ve ekonomik bir yöntem olması nedeni ile ideal bir tarama yönteminin tüm özelliklerine sahiptir.

Serviks kanseri taramasına yönelik öneriler, hastalığın doğal seyrinin daha iyi anlaşılması, yüksek riskli HPV tipleri ile enfeksiyonun nedensel rolü ve değişen tarama testi teknolojisinin etkisiyle yıllar içinde gelişmiştir.

Amerikan Kanseri Derneği, serviksi olan bireylerin 25 yaşında serviks kanseri taramasına başlamasını ve 65 yaşına kadar her 5 yılda bir primer HPV testinden geçmesini önerir. Primer HPV testi mevcut değilse, 25-65 yaşındaki bireyler her 5 yılda bir cotesting (sitoloji ile birlikte HPV testi) veya her 3 yılda bir tek başına sitoloji ile taranmalıdır [42].

### **2.1.5.2. HPV Testi**

HPV DNA testleri, doğrudan genomik saptama, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak bir viral DNA fragmanının amplifikasyonu yoluyla bir prob kokteyli kullanarak hedeflenen yüksek riskli HPV tiplerinin DNA' sını saptayan multipleks deneylerdir. HPV genotipleme, belirli viral türleri (genellikle HPV 16 ve 18) tanımlar, böylece kalıcılık ve ilerleme açısından en büyük riske sahip olanları tanımlar. HPV mRNA testleri, viral entegrasyonun bir belirteci olan E6 ve E7 onko-proteinlerinin ekspresyonunu tespit eder [43].

HPV pozitif olan olgularda refleks sitoloji yapılır. Amaç sitoloji ile birlikte yapılarak yanlış negatiflik oranını azaltıp taramanın etkinliğini artırmaktır.



Anormal sitoloji ve HPV pozitif olan hastalarda CIN III ve servikal kanser gelişme riski artar. HPV negatif gelen hastalarda ise tarama 5 yıl sonra yapılabilir.

#### **2.1.6. Serviks Kanserinde Tanı ve Evreleme**

Serviks kanserinde tanı, pozitif taraması olan hastaların değerlendirilmesi sonucu yapılan kolposkopik biyopsiler veya eksizyonel işlemler (konizasyon, LEEP gibi) sonucu konulmaktadır.

Serviks karsinomunun evrelemesi büyük ölçüde klinik bir değerlendirmedir. Cerrahi evreleme klinik evrelemeye göre daha doğru olmasına rağmen, cerrahi evreleme genellikle düşük kaynaklı ülkelerde gerçekleştirilemez. Muayene esnasında tümör büyüklüğü, vajinal mukozaya yayılım ve parametriumlar değerlendirilir. Muayeneye ek olarak, kolposkopi, sistoskopi, rektoskopi, intravenöz piyelografi, ultrasonografi, pelvik magnetik rezonans görüntüleme (MRG), akciğerlerin ve iskelet kemiklerinin grafileri yaygın olarak erişilebilen tanı araçlarıdır ve tümör yayılımını değerlendirmek için kullanılabilir [44]. Lenf nodu tutulumu serviks kanseri için önemli bir prognostik faktördür. Tanı alan hastaların hem TNM kalsifikasyonuna hem de FIGO (Uluslararası Obstetrik ve Jinekoloji Federasyonu) evreleme sistemine göre evrelemesi önerilmiştir [45]. TNM fizik muayene, görüntüleme ve patolojik sonuç gibi farklı modalitelerin değerlendirilmesine dayanan bir evreleme sistemidir. Tümör boyutu (T), lenf nodu durumu (N) ve sistemik durum (M); klinik (c), görüntüleme (i) ve/veya patoloji (p) sonuçlara göre değerlendirilmelidir.

| FIGO EVRESİ | TANIM                                                                                                                                                                                   |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I           | Tümör serviks ile sınırlıdır                                                                                                                                                            |
| IA          | Sadece mikroskopik olarak görülebilen serviks ile sınırlı mikroinvaziv karsinom. Maksimum invazyon derinliği < 5 mm                                                                     |
| IA1         | Stromal invazyon derinliği <3 mm                                                                                                                                                        |
| IA2         | Stromal invazyon $\geq 3$ mm' den fazla $\leq 5$ mm' den az                                                                                                                             |
| IB          | $\geq 5$ mm stromal invazyon veya klinik olarak görünür bir tümör ile serviks ile sınırlı invaziv karsinom. Bu aşamadan başlayarak, lokal evreleme için MRG yapılabilir.                |
| IB1         | Klinik olarak görünür tümör < 2 cm veya invazyon derinliği $\geq 5$ mm olan mikroskopik olarak görünür lezyon                                                                           |
| IB2         | Çapı $\geq 2$ cm ve $\leq 4$ cm olan invaziv karsinom                                                                                                                                   |
| IB3         | $\geq 4$ cm çapında invaziv karsinom                                                                                                                                                    |
| II          | Tümör serviks ile sınırlı değildir ve vajinanın üst 2/3' ünü veya parametriumu infiltre eder                                                                                            |
| IIA         | Vajen üst 2/3' ünün tümöral tutulumu, parametrial invazyon yok                                                                                                                          |
| IIA1        | Maksimum çap < 4 cm                                                                                                                                                                     |
| IIA2        | Maksimum çap $\geq 4$ cm                                                                                                                                                                |
| IIB         | Parametrial invazyon mevcut ancak pelvik duvar tutulumu yok                                                                                                                             |
| III         | Tümör pelvik yan duvara uzanıyor ve/veya vajen alt 1/3 tutulumu mevcut ve/veya hidronefroz veya non fonksiyone böbreğe yol açıyor ve/veya pelvik ve/veya para-aortik lenf nodu tutulumu |
| IIIA        | Tümör vajen alt 1/3' üne kadar uzanır ancak pelvik duvara ulaşmaz                                                                                                                       |
| IIIB        | Tümör vajen alt 1/3' ünü tutuyor fakat pelvik yan duvara uzanmıyor                                                                                                                      |

|                                                                                                          |                                                                                                                                                                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IIIC                                                                                                     | Pelvik ve/veya para-aortik lenf nodu tutulumu, tümör boyutu ve yayılımından bağımsız (r veya p belirtilmeli*)                                                                     |
| IIIC1                                                                                                    | Pelvik lenf nodu metastazları                                                                                                                                                     |
| IIIC2                                                                                                    | Retroperitoneal lenf nodu metastazı                                                                                                                                               |
| IV                                                                                                       | Tümör gerçek pelvisin dışına uzanıyor ve/veya rektum veya mesane mukozasını invaze ediyor (biyopsi ile kanıtlanmış) (evre 4 olarak sınıflayabilmek için bülöz ödem yeterli değil) |
| IVA                                                                                                      | Mesane ve/veya rektumun mukozaya infiltrasyonu                                                                                                                                    |
| IVB                                                                                                      | Uzak metastazların varlığı                                                                                                                                                        |
| *Evre IIIC' de tanıyı koymada kullanılan yöntem r (görüntüleme) ve p (patolojik) olarak belirtilmelidir. |                                                                                                                                                                                   |

**Tablo 2.** 2018 FIGO Evrelemesi [46]

### 2.1.7. Serviks Kanseri Tedavisi

Tedavi seçenekleri arasında cerrahi tedavi, radyoterapi (RT) ve kemoterapi (KT) yer almaktadır. Uluslararası kabul görmüş erken evre serviks kanseri tanımı olmamasına rağmen birçok kaynakta 4 cm ve daha küçük tümörler erken evre olarak tanımlamıştır. 2018 FIGO evreleme sisteminde ise evre IA, IB1, IB2 ve IIA1 tümörleri tanımlamaktadır.

Erken evre serviks kanserinde 5 yıllık genel sağ kalım %90' dan fazladır [47]. Erken evre hastalıkta altın standart cerrahi tedavidir. Cerrahi tedavi, primer radyoterapiye göre daha iyi sağkalım ve daha iyi yaşam kalitesi sunabilir. Fertilitesi tamamlamış hastalar için definitif cerrahi, tamamlamamış olanlar için ise fertilitite koruyucu cerrahi seçenekleri düşünülebilir.

Cerrahiye uygun olmayan adaylar için ise birincil tedavi tek başına veya kemoterapi ile birlikte radyoterapidir. Seçilecek tedavi tümörün ve hastanın belirleyici özelliklerine göre planlanır.

### **2.1.7.1. Cerrahi Tedavi**

Cerrahi tipik olarak erken evre hastalık, fertilitenin korunması ve evre IA, IB1 ve seçilmiş IIA1 vakaları gibi daha küçük lezyonların olması durumunda yapılır.

Evre IA1 serviks kanserleri, son derece düşük bir lenfatik metastaz insidansı ile ilişkilidir. Bu yüzden tedavi sonrası prognozları iyidir. Evre IA1 hastalığı olan hastalar için konizasyon, basit/ekstrafasyal histerektomi ve modifiye radikal histerektomi seçeneklerdir.

Bilateral pelvik lenf nodu diseksiyonu (sentinal lenf nodu haritalamalı veya haritalamasız) ile radikal histerektomi, FIGO Evre IA2 ila IIA1 servikal kanserli hastalar için tercih edilen tedavi yaklaşımıdır. Radikal histerektomi, kardinal ve uterosakral ligamanları, üst vajinayı, pelvik düğümleri ve bazen para-aortik düğümleri de içeren daha geniş paraserviks rezeksiyon sınırı nedeniyle basit histerektomiye tercih edilir.

Evre IA2 veya IB1 serviks kanseri olan seçilmiş hastalar, özellikle tümörleri 2 cm' den küçük olanlar, konservatif cerrahi için uygun olabilir. Radikal trakelektomi, çapı 2 cm' den küçük veya eşit olan lezyonları olan evre IA2 veya IB1 serviks kanseri olan hastalar için infertilite koruyucu cerrahi olarak tedavi seçenekleri arasında sunulabilir. Radikal trakelektomide serviks, vajinal sınırlar ve destekleyici bağlar çıkarılırken uterusun ana gövdesi ve fundusu sağlam bırakılır. Radikal trakelektomi yapılan kadınlarda düşük ve erken doğum oranları yüksektir. Bu yüzden servikal yetmezliği engellemek amacıyla servikal serklaj konulabilir.

Amerika Birleşik Devletleri' nde, hacimli evre IB2 lezyonları ve evre IIA2 veya daha büyük servikal kanserlerin büyük çoğunluğu olan seçilmiş hastalarda radikal cerrahiye göre kesin kemoradyoterapi tipik olarak tercih edilir. Evre ve hastalık yoğunluğuna bağlı olarak, evre IB veya IIA tümörlü hastalar cerrahi, RT veya eş zamanlı kemoradyoterapi ile tedavi edilebilir. Fertilite koruyucu cerrahi sadece evre IB1 hastalığı olan seçilmiş hastalar için önerilir.

Evre IB1 ve IIA1 hastalığı için primer cerrahi, radikal histerektomi ile birlikte para-aortik lenf nodu diseksiyonu ile (veya olmadan) bilateral pelvik lenf nodu diseksiyonundan oluşur.

Kesin radyasyonla tedavi edilen klinik evre IB2 veya IIA2 tümörleri olan hastalar için eş zamanlı sisplatin içeren kemoterapinin hasta sağkalımını önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir.

Evre IVA gibi uzak metastazı olmaksızın mesane ve bağırsaklara yayılımı olana durumlarda ise pelvik ekzantrasyon yapılabilir [48].

#### **2.1.7.2. Kemoradyoterapi**

RT, serviks kanserinde tüm evrelerde kullanılabilecek primer tedavi yöntemi olup ileri evre kanser tedavisinin temelini oluşturmaktadır.

Geleneksel olarak, lokal ileri serviks kanserinin RT yönetimi, eksternal ışın RT (EBRT) ve intrakaviter brakiterapinin (BRT) planlı bir kombinasyonunu içerir [49].

Radyoterapiye eş zamanlı sisplatin bazlı kemoterapinin kullanımının sadece radyoterapiyle karşılaştırılmasını değerlendiren çalışmalarda radyoterapiye eş zamanlı sisplatin bazlı kemoterapi eklenmesinin daha iyi lokal kontrol ve yüksek sağkalım oranı sağladığı ortaya konulmuştur [49].

Kemoradyoterapiye eş zamanlı biyolojik ajanların araştırıldığı çalışmalarda erlotinib [50], imatinib [51], gefitinib [52] kullanımının uygun olabileceğine dair bulgular vardır.

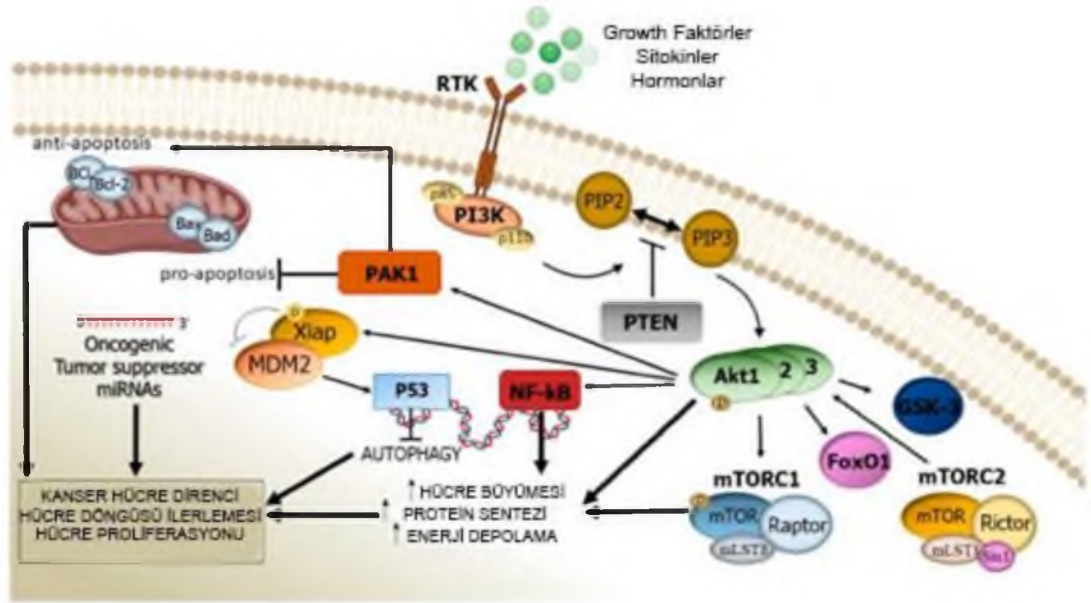
Radyasyona duyarlılığı arttırıcı ajan araştırmaları devam etmekle beraber sisplatin ile eş zamanlı radyoterapi ileri evre serviks kanserinde standart tedavidir.

## **2.2. Kanser Biyolojisi**

### **2.2.1. Apoptozis ve Sinyal Yolakları**

Hücreler doğaları gereği işlevlerini tamamladıktan sonra ölürler. Hücrelerin ölümleri iki şekilde gerçekleşmektedir. Bunlardan birisi olan apoptozis, hücrelerin karakteristik morfolojik ve biyokimyasal değişiklikleriyle bağlantılı bir tür programlanmış hücre ölümü olarak bilinmektedir [53]. Birçok patolojik ve fizyolojik sürecin patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. Nekrozis ise genel olarak hücrenin kontrolsüz ölümü olarak bilinir. Nekrozis fizyolojik şartlar altında meydana gelirken, apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelmektedir [54].

Hücre bölünmesi ve metabolizması sırasında görev alan birçok büyüme faktörü ve sinyal yolağı bulunmaktadır. Büyüme faktörleri hücre membran reseptörlerine bağlanarak hücre içi biyokimyasal sinyalleri tetikler. Bu reseptörler genellikle hücre dışı sinyalleri hücre içi sinyallere dönüştüren protein kinazlardır. Aktive olan reseptörler sitoplazma içerisindeki substratları fosforile eder ve hücre içi sinyal transdüksiyonu tetiklenir. Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz (PI3K) / Protein kinaz B (AKT) sinyal yolağı kanser gelişiminde rol alan önemli yollardan biridir ve bu yolak insan kanserlerinin çoğunda kontrolsüz olarak aktivite göstermektedir. PI3K aktivasyonu, hücresel membranda lokalize olan AKT'yi fosforile eder ve ayrıca aktive eder. Aktive edilmiş AKT, cAMP-yanıt elemanı bağlayıcı proteinin aktive edilmesi, p27' nin inhibe edilmesi, FOXO' nun sitoplazmada lokalize edilmesi, fosfatidilinositol 3-fosfatın (PI3P) aktive edilmesi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik fonksiyonları yerine getirir. AKT, glukoz metabolizması, apoptoz, hücre çoğalması, transkripsiyon ve hücre göçü dahil olmak üzere çok sayıda hücresel süreçte anahtar rol oynayan PI3K yolunun merkezi aracısı olan bir serin/treonin kinazdır. PI3K/AKT sinyal yolu, aşağı yönlü proteinlerin aktivasyonu veya inhibisyonu yoluyla hücre proliferasyonunu, migrasyonunu, farklılaşmasını ve apoptozisini düzenler. PTEN aktivitesi inhibe edildiğinde AKT ve aşağı yönlü sinyal yolu aktive olur [55]. AKT, proapoptik proteinleri inhibe ederek apoptozisi engeller ve hücrenin sağ kalımını sağlar. PTEN ise AKT' nin negatif regülatörüdür. Şekil 8' de PI3K/AKT sinyal yolağı gösterilmiştir.



**ŞEKİL 8.** PI3K/AKT Sinyal Yolağı [56]

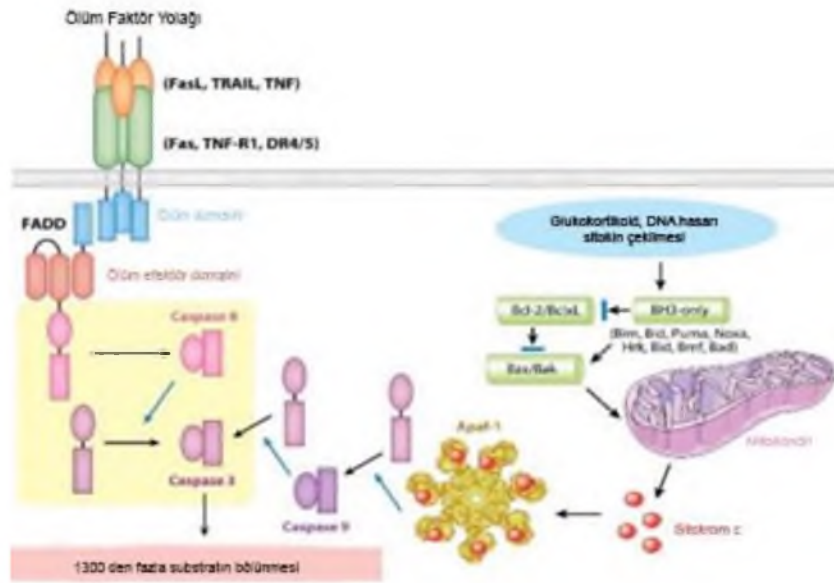
Ölen hücreler başlangıçta nükleer ve sitoplazmik yoğunlaşma gösterir, ardından plazma zarında kabarcıklanma meydana gelir ve bu da apoptotik cisimler olarak bilinen küçük zarla kaplı parçacıkların salınmasına neden olur [57]. Apoptotik hücrelerde normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin, erken evrede membranın dış yüzüne transloke olur. Bu mekanizma makrofajların ve komşu hücrelerin apoptotik hücreler tarafından tanınmasını sağlar.

Moleküler düzeyde apoptozis, aspartata özgü sistein proteaz (kaspaz) kaskadının aktivasyonu ile düzenlenir. Kaspazların aktivasyonuna yol açan iki ana yol vardır. Bunlardan ilki mitokondrinin katılımına bağlı olan hücre içi sinyaller ile kaspazların ve BCL-2' nin görev aldığı mitokondriyal yoldur. İkincisi ise hücre dışı sinyaller aracılığı ile FAS ve TNF gibi sinyal proteinlerinin ölüm reseptörünün ligandıyla etkileşimini içeren sitoplazmik yoldur [58].

### 2.2.1.1. İntrensek Yolak İle Apoptozis

Mitokondriyal yol olarak da adlandırılan intrensek yolak, BCL-2 ailesi üyeleri tarafından düzenlenir. BCL-2 ailesi üç alt aileden oluşur: Proapoptotik

BH3 üyeleri (BIM, BID, PUMA, NOXA, HRK, BMF ve BAD), proapoptotik efektör moleküller (BAX ve BAK) ve antiapoptotik BCL-2 ailesi proteinleri (BCL-2, BCL-XL, MCL1, A1 ve BCL-B). Sağlıklı hücrelerde BAX/BAK, antiapoptotik BCL-2 ailesi üyeleri tarafından durdurulur. Apoptotik bir uyarıya yanıt olarak (gelişimsel işaret, büyüme veya hayatta kalma faktörünün eksikliği veya genotoksik ajan), yalnızca BH3 üyeleri transkripsiyonel veya posttranskripsiyonel olarak düzenlenir. Aktifleştirilmiş BH3 proteinleri, BAK ve BAX üzerinde etki gösterir veya antiapoptotik BCL-2 ailesi üyelerini antagonize eder. BAX ve BAK daha sonra mitokondriden sitokrom c salınımını uyarır. Sitokrom c, APAF-1 ile birlikte dATP/ATP'ye bağımlı bir şekilde apoptozom adı verilen heptametrik bir kompleks oluşturur. Bu kompleks, monomerik prokaspaz 9' u görevlendirir ve bunun bir dimer oluşturmaya yardımcı olur. Bu daha sonra aktif bir heterotetramerik kompleks oluşturmak üzere otokatalitik bölünmeye uğrayarak aktive kaspaz 9 oluşur. Aktive edilmiş kaspaz 9 daha sonra kaspaz 3'ü aktive eder [59]. Şekil 9 de intrinsek yolak gösterilmiştir.



**ŞEKİL 9.** Apoptozis Sinyal İletimi [59]



### 2.2.1.2. Ekstresek Yolak İle Apoptozis

Ekstresek yolak ile apoptozis, ligandların TNF ailesine ait ölüm reseptörleri olarak bilinen spesifik transmembran reseptörlerine bağlanmasıyla sonuçlanan hücre dışı sinyaller tarafından indüklenen bir ölüm biçimidir [57]. Bu ölüm biçiminin prototipi olarak kullanılabilen FAS (CD95) sinyal kompleksinde, FAS' ın liganda bağlanması üzerine apoptotik işlem başlar.

FAS' ın sitoplazmik bölgesi TNF reseptörü 1 (TNF-R1), TRAIL-R1 (DR4) ve TRAIL-R2' nin (DR5) sitoplazmik bölgesi, gerekli olan ölüm alanı (death domain) adı verilen yaklaşık 80 amino asitlik bir bölge içerir. FAS ölüm alanı, FADD (Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini), prokaspaz 8 ve c-FLIP adı verilen prokaspaz 8 benzeri bir protein ile birleşir. FADD, bir ölüm alanı ve bir ölüm efektör alanı taşıırken prokaspaz 8 ve c-FLIP, N terminallerinde FADD ile ilişkilendirildikleri iki ölüm efektör alanı içerir. FAS, FADD, prokaspaz 8 ve c-FLIP' ten oluşan komplekse DISC (ölümü tetikleyen sinyal kompleksi) adı verilir [59].

FADD, kaspaz 8' deki ölüm efektör alanına bağlanarak kaspaz 8' i aktive eder. Aktive kaspaz 8, kaspaz 3 gibi kaspazları da aktive ederek hücreyi apoptozise götürür. Şekil 9' de ekstresek yolak gösterilmiştir.

### 2.3. Borik Asit ve Hedef Tedavideki Yeri

Bor, periyodik tablonun 2. periyod 13. grubunda bulunan metalik olmayan tek elementtir. Doğada bor elemental halde bulunmaz. Borik asit (BA); kernit, boraks, boratlar, üleksit ve kolemanitin bir bileşeni olarak bulunur.[5]

İnsanlarda uygulanan bor dozunun %90' ı solunum yolu epiteli, gastrointestinal dokuların mukozal membranları, ağız, vajina ve anüs tarafından emilir ve borik asit  $B(OH)_3$  olarak tüm vücuda eşit olarak dağılır [6, 7]. Ayrıca borun çeşitli enzim ve minerallerin metabolik süreçlerini ve bağışıklık sistemi regülasyonunu değiştirebildiği de gösterilmiştir [8]. Ayrıca, prostat [9], serviks [10], akciğer [11], meme [12, 13] ve malign melanom [14, 15], kolon [16], over kanseri [17] gibi bir çok kanser tiplerinde anti-karsinojenik etkilere

sahip olabileceklerini gösteren son yayınlar sayesinde boratlar giderek daha çekici hale gelmektedir.

Türkiye bor kaynakları bakımından dünyanın en büyük rezervlerine sahip ülkesidir. Dünya toplam rezervinin %66' sı Türkiye' de bulunmaktadır. Ege Bölgesi' nde yapılan bir araştırmada BA' dan zengin diyetle beslenen bölgelerdeki kadınlar ile BA' dan fakir diyetle beslenen bölgelerdeki kadınlar karşılaştırıldığında, BA' dan zengin diyetle beslenen kadınlarda serviks kanseri saptanma oranı daha düşük bulunmuştur [18].

#### **2.4. Kalsiyum Fruktoborat ve Hedef Tedavideki Yeri**

Bor bileşiklerinin kanser üzerindeki önleyici ve tedavi edici etkilerine dair kanıtlar son yıllarda artmaktadır. Kalsiyum fruktoborat (CaFB) besin takviyesi olarak kullanılmasına rağmen neoplastik transformasyonları önleyici ve tedavi edici etkilerine ilişkin veriler sınırlıdır.

CaFB, kalsiyum, fruktoz ve bor kompleksidir ve doğal olarak taze ve kuru meyveler, sebzeler ve otlar, fındık ve şarapta bulunur [60].

Bor bileşiklerinin kemik sağlığı, inflamasyon, kardiyovasküler sistem, beyin ve psikolojik fonksiyonlar, endokrin ve bağışıklık sistemi üzerinde yararlı etkileri mevcuttur. Antioksidan etkiye sahiptir ve lipit profilini iyileştirir [13]. Hem BA' nın hem de CaFB' nin meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği, ancak sadece CaFB' nin apoptozu indüklediği gözlenmiştir [12].

Apoptoz, kansere karşı en güçlü savunmalardan biridir, çünkü bu süreç potansiyel olarak zararlı mutasyona uğramış hücreleri ortadan kaldırır. Biriken kanıtlar, antitümör ajanların etkinliğinin, tümör hedef hücrelerinin bu ajanlara apoptoz yoluyla yanıt verme içsel özelliğine bağlı olduğunu göstermektedir [12]. Kaspazlar, programlanmış hücre ölümü, proliferasyonu ve enflamasyonu ileten hücre içi proteazlardır [42]. Bu nedenle, CaFB ve BA' nın antikanserojenik ve antianjiyojenik özelliklerini araştırarak serviks kanseri tedavisinde alternatif bir tedavi yöntemi olup olmayacağını incelemeye karar verdik.

### III. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada kullanılan malzemeler Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2022/035 proje numarası ile desteklenmiştir. Etik kurulu izni 24/11/2021 tarihinde alınmıştır.

#### 3.1. Hücre Hatları ve Reaktifler

Servikal adenokarsinomundan Hela hücre hattı (insan serviks kanseri hücre hattı) ve kontrol grubu için MRC-5 (akciğer fibroblast hücre hattı) hücre hattı elde edildi. Hücre kültürü için MEM with Earle's Salts (EMEM) with L-Glutamine (Capricorn Scientific, Almanya), RPMI 1640 with L-Glutamine (NutriCulture, UK) penisilin Streptomisin (Gibco by life Technologies, ABD), %0,25 Trypsin-EDTA (Gibco, ABD), Fetal Bovin Serum (FBS) ısı ile inaktive edilmiş (Biosera, Fransa), RNA izolasyonu için Total RNA izolasyon kiti (Norgen, Amerika) kullanıldı. Fosfat Tamponlu Salin (PBS, Grips, Portekiz), 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5Difeniltetrazolyum Bromide (MTT, Calbiochem, Almanya), FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI (Biolegend, ABD), Transcriptor First Strand cDNA Sentez kiti (Roche, Almanya), Faststart Essential DNA Green Master kitleri (Roche, Almanya), çalışmada kullanılmıştır. Borik asit ve kalsiyum fruktoborat Türkiye Ulusal Bor Araştırma Kurumu tarafından temin edilmiştir.

#### 3.2. Hücre Kültürü

Hela hücreleri %5 CO<sub>2</sub> içeren nemli bir atmosferde (%90) 37°C'de tutulan %10 FBS ve %1 penisilin-Streptomisin içeren EMEM' de kültürlendi. Hücre ortamı, ileri testler için yeterli hücre sayısına ulaşana kadar iki günde bir değiştirildi.

#### 3.3. Hücre Canlılığı ve Toksisite Testi

Hücre canlılığı ve toksisitesi MTT yöntemi ile belirlendi. Bu testte kontrol olarak MRC-5 hücre dizisi kullanıldı. Hücreler (MRC-5 ve Hela hücreleri),

kuyucuk başına 10000 hücre içeren 96 kuyucuklu bir plakaya yayıldı ve gece boyunca kuyucuğa bağlanmasına izin verildi ve ardından BA ve CaFB ile 24 saat, 48 saat, 72 saat boyunca (5000  $\mu$ M, 2500  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 0  $\mu$ M) tedavi etkinliği takip edildi. Bor bileşenleri ortamına maruz bırakıldıktan sonra, 3-4 saat boyunca hücreleri etiketlemek için 5 mg/mL MTT çözeltisi kullanıldı ve daha sonra elde edilen fumarolik boya, DMSO (100  $\mu$ L) ile çözündürüldü. Absorbans, bir plaka okuyucuda 570 nm’de ölçülmüştür. Veriler excelde depolandı ve IC<sub>50</sub> değerleri GraphPad Prisme 9’ da hesaplandı. Daha ileri deneyler için BA ve CaFB’ nin IC<sub>50</sub> değerleri kullanıldı.

### **3.4. Koloni Oluşumu Deneyi**

Koloni oluşumu deneyi için hücreler, 1000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekildi ve gece boyunca bağlanmak üzere bırakıldı. Taze besiyeri bulunan hücrelere IC<sub>50</sub> dozlarında BA ve CaFB uygulanmış ve besiyeri on gün boyunca iki günde bir yenilenmiştir. On gün sonra plakalar kristal viyole solüsyonu ile boyandı ve oluşan koloniler Imagej programı ile sayıldı.

### **3.5. Yara İyileşmesi Migrasyon Testi**

BA ve CaFB’ nin Hela hücre hattı üzerindeki göç önleyici etkileri, yara iyileşme deneyi ile belirlendi. Yara iyileşme deneyi 6 kuyucuklu plakalarda yapıldı. Hücreler,  $3 \times 10^5$  hücre/kuyucuk yoğunlukta ekilmiştir. Hücreler, %85 hücre birleşimine ulaşana kadar kültürlendi. Bu optimal hücre yoğunluğunda hücreler, 10  $\mu$ l steril pipet ucu ile çizilen bir çizgi ile ayrıldı. Hücrelerin görüntüleri 0. saat, 16. saat ve 24. saatte çekildi. Hücre migrasyon koşulları Imagej programı ile değerlendirilmiş, elde edilen veriler daha sonra analiz edilmiştir. Deneyler üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

### **3.6. Hücre Apoptoz Testi**

Hücre apoptozu FITC Annexin V Apoptosis Detection Assay ile test edildi. Hücreler, 6 kuyucuklu plakalara  $5 \times 10^5$  hücre/kuyucuk yoğunlukta ekildi.

24 saatlik inkübasyondan sonra BA ve CaFB, IC<sub>50</sub> dozlarında uygulandı ve MTT sonuçlarına göre inkübe edildi. TAS/TOS analizi için süpernatant toplandı, hücre toplandı ve hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımından sonra hücreler 10000 g' da 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Hücre pelletleri iki kez boyama tamponu ile yıkandı. Annexin V tamponu ile 1x 10<sup>5</sup> hücre/100 µl olarak yeniden süspansiyon edildi. Daha sonra üreticinin yapılarına göre boyandı. Boyanmış hücre süspansiyonu BD Accuri akım sitometresi ile analiz edildi.

### 3.7. mRNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı-PCR

BA ve CaFB' nin Hela servikal kanser hücre hattında *KASPAZ-3*, *KASPAZ-8*, *KASPAZ-9*, *BAX*, *BCL-2*, *BID*, *BCL-XL*, *P53*, *P21*, *P16*, *PUMA*, *NOXA*, *FADD*, *TRADD*, *DR-4*, *DR-5*, *PARP*, *APAF*, *AKT*, *PTEN*, *MMP-2*, *MMP-9*, *TIMP-1*, *TIMP-2*' nin apoptoz ile ilişkili genler üzerindeki etkilerini belirlemek için genler gerçek zamanlı PCR ile analiz edildi. Hela hücreleri 3x10<sup>5</sup> hücre/kuyucuklu 6 kuyucuklu plakalara ekildi ve gece inkübasyonundan sonra IC<sub>50</sub> dozlarında BA ve CaFB' ye maruz bırakıldı. 72 saat sonra hücreler toplandı. Hücrelerden ticari kit yardımıyla total RNA izolasyonu yapıldı. Genlerin ekspresyon profili, referans olarak Beta-aktin (housekeeping geni) kullanılarak hesaplandı. İzolasyon işlemi üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildi. Nandrop ile RNA miktarı ölçüldü cDNA Sentez kiti kullanılarak cDNA elde edildi. Elde edilen cDNA, ayrıca gerçek zamanlı PCR' de hedeflenen genleri tespit etmek için kullanıldı. Örnekler FastStart essential DNA Green Master kiti (Roche, Almanya) kullanılarak hazırlandı ve Bio-Red Real Time-PCR cihazında analiz edildi.

### 3.8. Oksidan ve Antioksidan Testi

BA ve CaFB' nin Hela kanser hücre hattı üzerindeki etkilerini test etmek için Total Antioksidan Seviyesi ve Total Oksidan Seviyesi (TAS/TOS) kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanıldı. Hücre kültürü süpernatantı 72 saat sonra toplandı ve TAS/TOS testinde kullanıldı. TAS/TOS testi, üreticinin

protokolü takip edilerek 96 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirilmiştir. TAS testi ve TOS testi, bir plaka okuyucuda sırasıyla 660 nm ve 530 nm dalga boyunda ölçüldü. Sonuçlar, daha fazla veri analizi için bir excel dosyasına aktarıldı. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)' ni belirlemek için, TAS' ın mmol birimi ve TOS' un µmol birimi çapraz dönüştürüldü. Daha önce bildirildiği gibi, oksidatif stres indeksi değerinin hesaplanmasında "OSI (arbitrary unit) = TOS (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Eq/L)/TAS (mmol Trolox Eq /L) × 100" formülü kullanılmıştır (Alp ve ark., 2010; Karkucak ve ark., 2010).

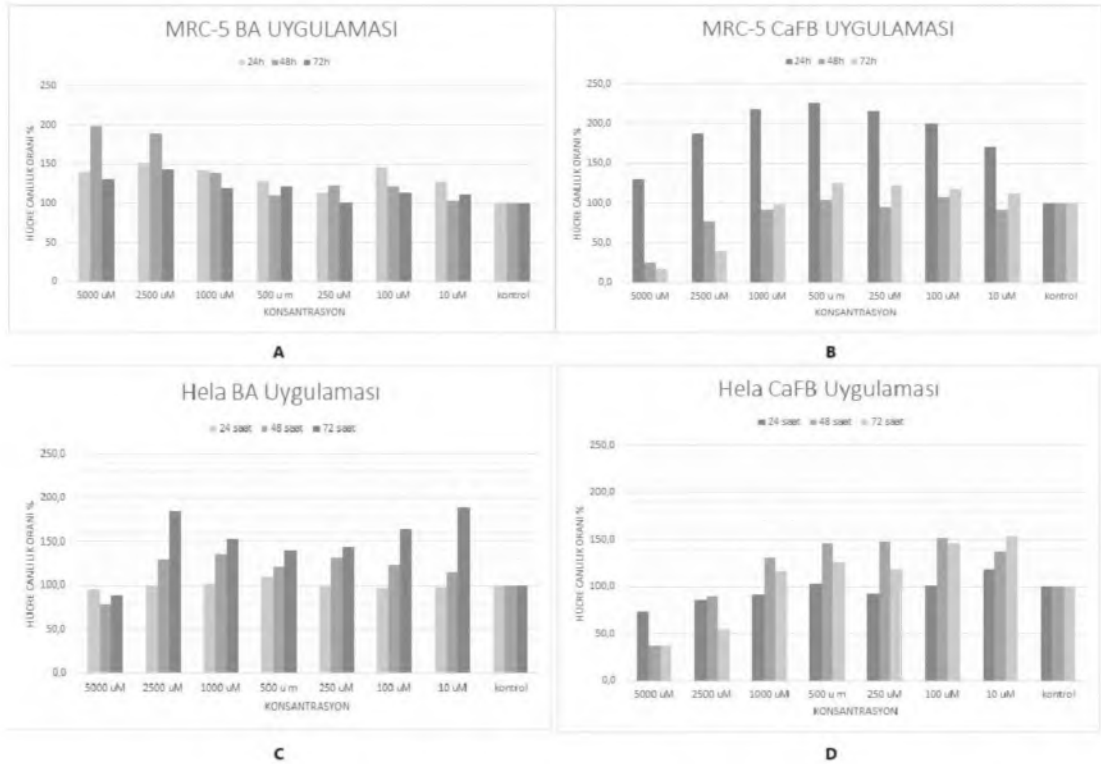
### **3.9. İstatistiksel Analiz**

Toplanan veriler istatistiksel olarak GraphPad Prism (versiyon 9) ANOVA testi ile analiz edildi. Çubuk grafikler ortalama ± standart sapma olarak sunuldu. Farklı hücre hatlarının IC<sub>50</sub> değerleri GraphPad Prism logaritmik kür oluşum yöntemi kullanılarak hesaplandı. İstatistiksel olarak anlamlı değerler p<0,05 olarak belirlendi.

## IV. BULGULAR

### 4.1. Hücre Canlılığı ve Toksisite Testi Sonuçları

BA ve CaFB' nin hücre canlılığına olan etkisini ölçmek için MTT metodu kullanılmıştır. Kontrol hücre hattı olarak MRC-5, kanser hücre hattı olarak Hela hücre hattı kullanılmıştır. MRC-5 hücre hattı fetal akciğer fibroblastlarından, Hela hücre hattı insan epitelyal servikal adenokarsinomundan köken almaktadır. Hücreler kuyucuk başına 10000 hücre içeren 96 kuyucuklu plakalara ekilerek BA ve CaFB için 0  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M, 2500  $\mu$ M, 5000  $\mu$ M olmak üzere 8 farklı doz uygulanarak 24, 48 ve 72. saatlerdeki proliferatif veya sitotoksik etkileri araştırılmıştır. BA tüm zaman dilimlerinde ve tüm dozlarda MRC-5 hücre hattına sitotoksik etki göstermemiştir. CaFB, 24 saatte tüm dozlarda MRC-5 hücre hattında sitotoksik etki göstermemiştir. 48 ve 72. Saatlerde ise yüksek dozlarda (2500  $\mu$ M ve 5000  $\mu$ M) MRC-5 hücre hattına sitotoksik etki göstermiştir.



Şekil 10. MRC-5 ve Hela Hücre Hatları İçin MTT Sonuç Verileri

Hela hattı için MTT sonuç verileri,

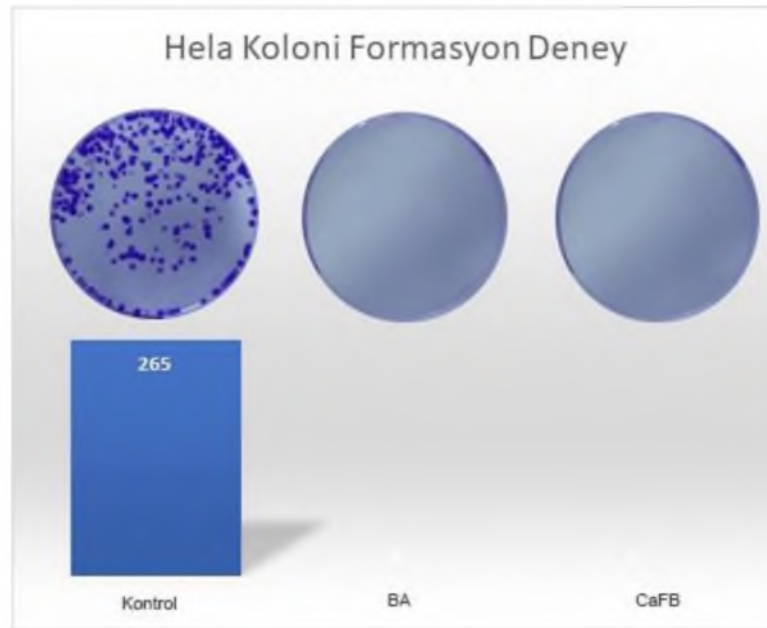
% Radical Scavenging activity= [Absorbance of control-Absorbance of sample)/Absorbance of control]\*100

formülü kullanılarak IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır.

72. Saatte Hela için BA IC<sub>50</sub> değeri 5000 µM, CaFB için 2500 µM olarak belirlenmiştir. Sonraki deneylerde bu dozlar kullanılmıştır (şekil c-d).

#### 4.2. Koloni Oluşum Sonuçları

BA ve CaFB'nin Hela hücrelerinin koloni oluşturmaya olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 6 kuyucuklu plakalara her kuyucuk başına 1000 hücre olacak şekilde hücre ekilmiştir. 72 saat boyunca belirlenen IC<sub>50</sub> dozlarında BA ve CaFB uygulanmıştır. Ardından 21 gün boyunca 2 gün aralıklarla medyum değiştirilerek koloni formasyonu sağlanmıştır. Deney sonunda koloniler kristal viyole ile boyanmıştır.



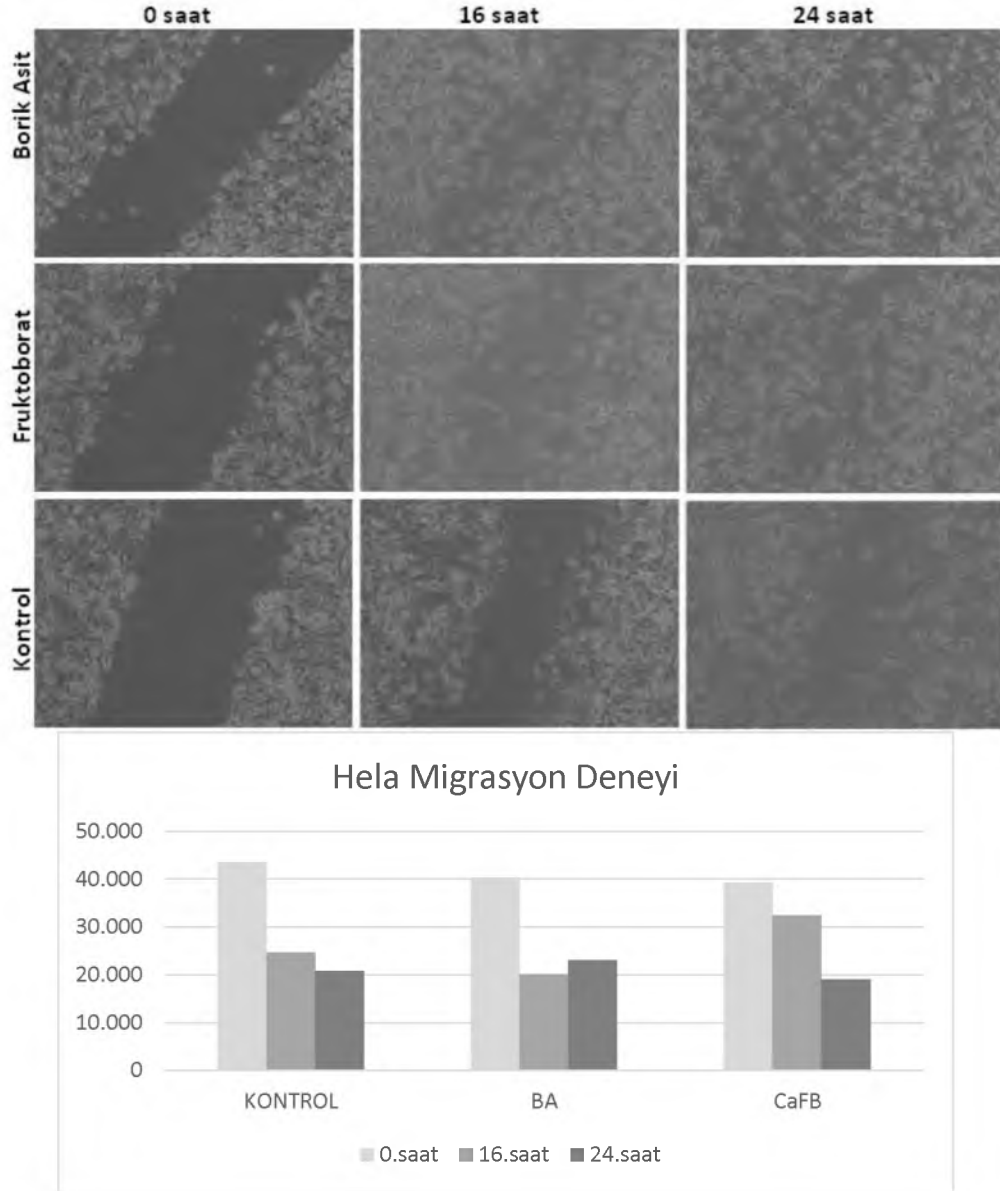
**Şekil 11.** Hela Hücre Hattı Koloni Formasyon Deneyi Sonuçları

Hem BA hem de CaFB Hela hücre hattında koloni oluşumunu anlamlı bir şekilde inhibe etmiştir.



#### 4.3. Yara İyileşmesi Migrasyon Testi Sonuçları

BA ve CaFB' nin Hela hücre hattı üzerindeki migrasyon etkilerini belirlemek için ilgili hücreler 6 kuyucuklu plakalara  $3 \times 10^5$  hücre/kuyucuk yoğunlukta ekilmiştir. Hücreler, %85 hücre birleşimine ulaşana kadar kültürlendi. Bu optimal hücre yoğunluğunda hücreler, 10 µl steril pipet ucu ile çizilen bir çizgi ile ayrıldı. Hücrelerin görüntüleri 0. saat, 16.saat ve 24.saatte çekildi.



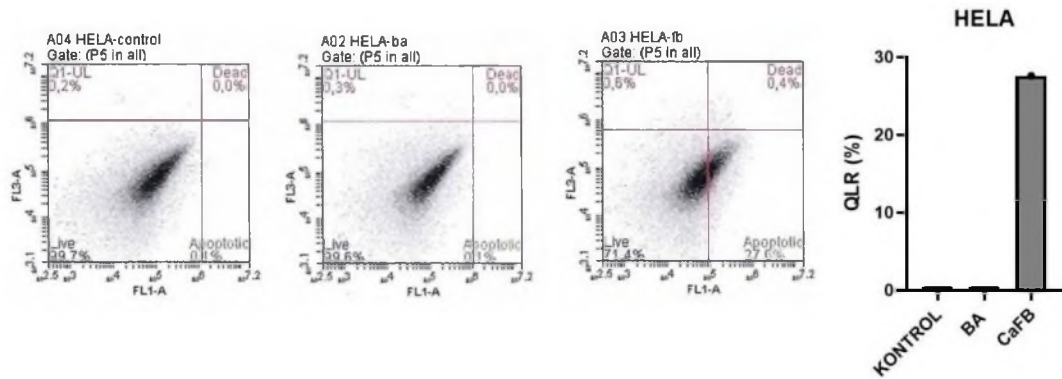
**Şekil 12.** Hela Migrasyon Deneyi

Hela hücre migrasyon deneyinde 0. saatte kontrol BA ve CaFB uygulanan kuyucuklarda çizilen yüzey alan yüzdesi sırasıyla %43.561, %40.322, %39.234 olarak hesaplandı. BA, madde uygulanmayan kontrole göre Hela hücre migrasyonuna belirgin bir inhibe edici etki göstermemiştir. Hela migrasyon deneyi 16 ve 24. Saatlerde oluşturulan yara yüzey alan yüzdesi kontrol grubunda sırasıyla %24.624 ve %20.847, BA grubunda sırasıyla %20.064 ve %23.006 olarak bulunmuştur (p=0.861, p=0.741) (Şekil 12).

0. Saatte CaFB uygulanan grupta yara yüzey alan yüzdesi %39.234 iken 16. Saatte %32.386 olarak bulunmuştur (p=0.301) (Şekil 12). 24. saatte Hela hücrelerine CaFB uygulanan grupta yara yüzey alan yüzdesi %19.032 olarak bulunmuştur. Hücre migrasyonunu istatistiksel olarak anlamlı olmasa da inhibe etmiştir.

#### 4.4. Hücre Apoptoz Testi Sonuçları

Hücre apoptozu FITC Annexin V Apoptosis Detection Assay ile test edilmiştir. Hücreler, 6 kuyucuklu plakalara  $5 \times 10^5$  hücre/kuyucuk yoğunlukta ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra BA ve CaFB, IC<sub>50</sub> dozlarında uygulandı ve MTT sonuçlarına göre inkübe edildi. Ardından Annexin V kiti ile boyanarak flow sitometri ile analiz edildi.

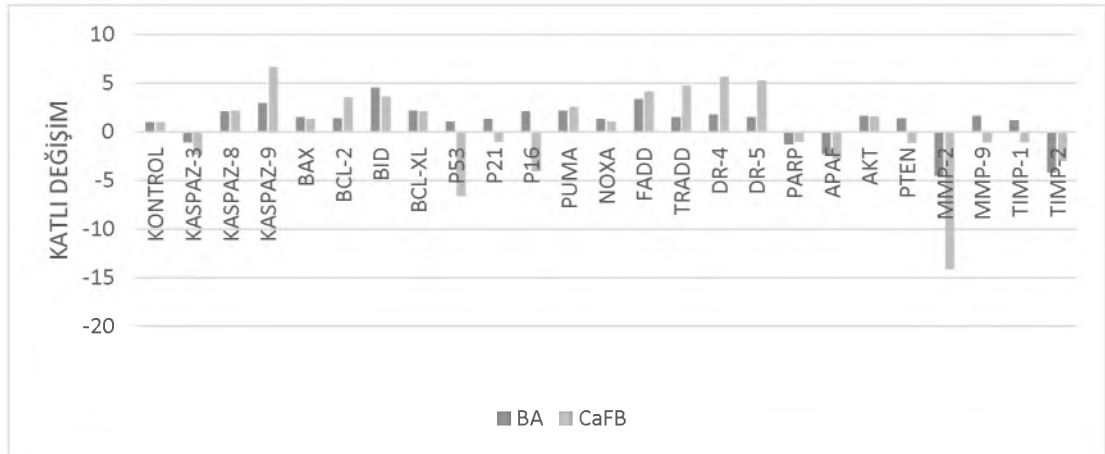


Şekil 13. Hela flow sitometri analizleri

Flow sitometri sonucu Hela hücre hattında kontrol ve BA gruplarında apoptoza uğrayan hücre yüzdesi %0,1 olarak bulunmuştur. CaFB uygulanan grupta ise apoptoza uğrayan hücreler %27.6 olarak bulunmuştur. CaFB belirgin bir şekilde Hela hücrelerini apoptoza uğratmıştır.

#### 4.5. mRNA İzolasyonu Ve Gerçek Zamanlı-PCR

Çalışmaya dahil edilen Hela hücrelerinin BA ve CaFB muamelesi sonucu elde edilen örneklerinden *KASPAZ-3*, *KASPAZ-8*, *KASPAZ-9*, *BAX*, *BCL-2*, *BID*, *BCL-XL*, *P53*, *P21*, *P16*, *PUMA*, *NOXA*, *FADD*, *TRADD*, *DR-4*, *DR-5*, *PARP*, *APAF*, *AKT*, *PTEN*, *MMP-2*, *MMP-9*, *TIMP-1*, *TIMP-2* genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri kantitatif olarak belirlendi. Gruplara ait hücre örneklerinde ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri GAPDH geni düzeyine göre relatif olarak belirlendi. Şekil 14' de hücre örneklerinde relatif kantitasyon sonrası tüm genlerin mRNA düzeyinde katlı değişim grafiği yer almaktadır.



**Şekil 14.** Apoptoz ile ilgili seçilmiş genlerin mRNA ekspresyon katlı değişim grafiği

Serviks adenokarsinom Hela hücre hattında BA verilen gruptaki hücre örneklerinde seçili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri Şekil 14' te verilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan Hela hücrelerine göre BA muamelesi sonucu 72 saat sonra elde edilen Hela hücrelerinde *KASPAZ-8*, *KASPAZ-9*, *BAX*, *BCL-*

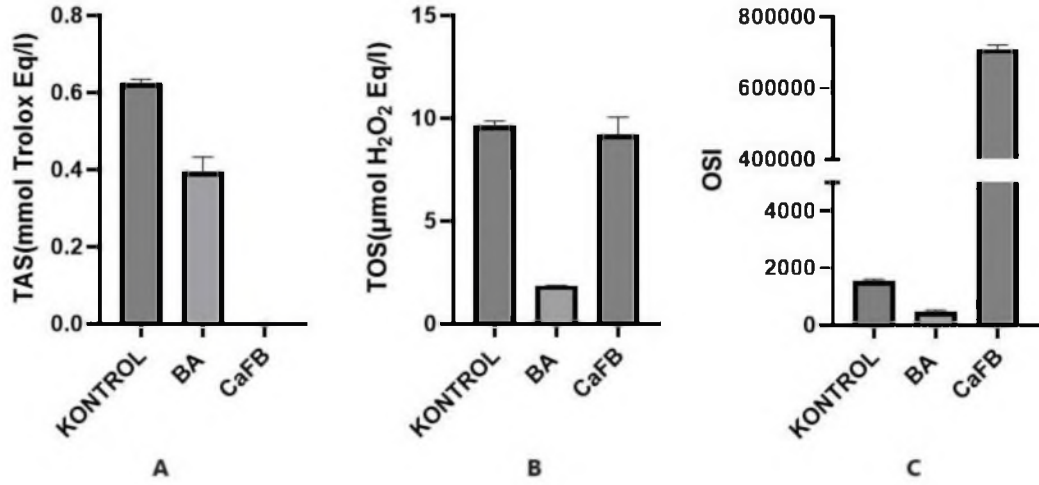
2, *BCL-XL*, *P21*, *P16*, *NOXA*, *FADD*, *TRADD*, *DR-4*, *DR-5*, *AKT*, *PTEN*, *MMP-9*, *TIMP-2* gen ekspresyonları anlamlı olarak artmıştır. (p değerleri sırasıyla 0.002209, 0.000061, 0.001751, 0.019126, 0.00062, 0.002714, 0.00211, 0.002839, 0.000024, 0.000335, 0.003219, 0.000512, 0.000075, 0.000858, 0.002732, 0.004525). *PARP*, *APAF*, *MMP-2*, *TIMP-2* genlerinin de ekspresyonlarında anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. (p değerleri sırasıyla 0.000318, 0.00169, 0.00012, 0.004525). *BID*, *P53*, *PUMA*, *TIMP-1* genlerinde anlamlı olmasa da gen ekspresyonlarında artış gözlenmiştir ( $p>0.05$ ). *KASPAZ-3* geninde de anlamlı olmasa da gen ekspresyonlarında azalma gözlenmiştir ( $p>0.05$ ).

Serviks adenokarsinom Hela hücre hattında CaFB verilen gruptaki hücre örneklerinde seçili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri Şekil 14' te verilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan Hela hücrelerine göre CaFB muamelesi sonucu 72 saat sonra elde edilen Hela hücrelerinde *KASPAZ-9*, *BCL-2*, *FADD*, *TRADD*, *DR-4*, *DR-5* gen ekspresyonları anlamlı olarak artmıştır. (p değerleri sırasıyla 0.017902, 0.048536, 0.022099, 0.022771, 0.0086, 0.023025). *P53*, *APAF*, *MMP-2*, *TIMP-2* genlerinin de ekspresyonlarında anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. (p değerleri sırasıyla 0.020374, 0.004508, 0.000006, 0.000466). *KASPAZ-8*, *BAX*, *BID*, *BCL-XL*, *PUMA*, *NOXA*, *AKT* genlerinde anlamlı olmasa da gen ekspresyonlarında artış gözlenmiştir ( $p>0.05$ ). *KASPAZ-3*, *P21*, *P16*, *PARP*, *PTEN*, *MMP-9*, *TIMP-1* genlerinde de anlamlı olmasa da gen ekspresyonlarında azalma gözlenmiştir ( $p>0.05$ ). Bu sonuçlar doğrultusunda hem BA hem de CaFB, servikal adenokarsinom Hela hücre hattında apoptotik yollar üzerinden etkili olduğu gösterilmiştir.

#### 4.6. Oksidan ve Antioksidan Testi Sonuçları

Toplam Antioksidan Seviyesi ve Total Oksidan Seviyesi (TAS / TOS) kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) ile BA ve CaFB' nin Hela kanser hücre hattı üzerindeki etkilerini ve bu etkiler sonucu ortaya çıkan oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplanmıştır. OSI' yi belirlemek için, TAS' ın mmol birimi ve TOS' un  $\mu\text{mol}$  birimi çapraz dönüştürülmüştür. Daha önce bildirildiği gibi, oksidatif stres indeksi değerinin hesaplanmasında "OSI (arbitrary unit) = TOS ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$

Eq/L)/TAS (mmol Trolox Eq /L) × 100" formülü kullanılmıştır (Alp ve ark., 2010; Karkucak ve ark., 2010).



**Şekil 15.** Hela TAS, TOS, OSI grafikleri

Hela hücre hattında kontrol, BA ve CaFB gruplarında total antioksidan seviyeleri sırasıyla 0.625 mmol/L, 0.393 mmol/L, 0.001 mmol/L olarak bulunmuştur. Bunlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da CaFB de daha çok olmak üzere her iki bor bileşeninde de total antioksidan seviyelerinde azalma gözlenmiştir (p=0.102).

Hela hücre hattında kontrol, BA ve CaFB gruplarında total oksidan seviyeleri sırasıyla 9.653 μmol/L, 1.856 μmol/L, 9.205 μmol/L olarak bulunmuştur. Gruplar arası karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da BA da daha fazla olmak üzere her iki bor bileşeninde de total oksidan seviyeleri kontrole göre azalma olmuştur (p=0.165).

Hela hücre hattında kontrol, BA ve CaFB gruplarında oksidatif stres indeksi sırasıyla 1545.05, 474.079, 708800 olarak bulunmuştur. Bunlar karşılaştırıldığında her iki bor bileşeninin Hela hücre ortamındaki OSI düzeyi kontrol grubuna göre BA da daha düşük CaFB de daha yüksek bulunmuştur (p=0.102).

## V. TARTIŞMA

Serviks kanseri, kadınlarda en sık teşhis edilen meme, kolorektal, akciğer kanserinden sonra dördüncü sıklıkta görülen kanserdir [1]. Düzenli Pap smear taramaları ile erken evrede tanısı konulabilen serviks kanserinin tedavisinde verilen kemoradyoterapinin yararının yanı sıra birçok yan etkisi de bulunmaktadır. Bu da serviks kanseri ve diğer birçok kanser türü için de araştırmacıları alternatif tedavilere yönlendirmektedir. Günümüzde ölümlerin önemli bir kısmını oluşturan kanserlerin mekanizmaları aydınlatılması ile birlikte kilit molekülleri hedefleyen hedefe yönelik tedaviler kanser tedavisinde önemli gelişmelere neden olmaktadır. Kanser görülme oranlarının günümüzde artmasıyla birlikte hedefe yönelik tedavide kullanılan BA ve bileşenleri çeşitli kanser tedavileri üzerindeki etkileri ile araştırmacıların dikkatini çekmektedir.

Günlük diyetimizin de bir parçası olan BA; bor elementinin en sık görülen formlarından bir tanesidir. Doğada bor elemental halde bulunmamakla birlikte BA; kernit, boraks, boratlar, üleksit ve kolemanitin bir bileşeni olarak bulunur [5]. Türkiye bor kaynakları bakımından dünyanın en büyük rezervlerine sahip ülkesidir. Dünya toplam rezervinin %66' sını Türkiye' de bulunmaktadır. Yapılan bir araştırmada borik asitten zengin diyetle beslenen bölgelerdeki kadınlar ile borik asitten fakir diyetle beslenen bölgelerdeki kadınlar karşılaştırıldığında, borik asitten zengin diyetle beslenen kadınlarda serviks kanseri saptanma oranı daha düşük bulunmuştur [18].

İnsanlarda uygulanan bor dozunun %90' ını solunum yolu epiteli, gastrointestinal dokuların mukozal membranları, ağız, vajina ve anüs tarafından emilir ve borik asit  $B(OH)_3$  olarak tüm vücuda eşit olarak dağılır [6]. Araştırmalar sonucu borun çeşitli enzim ve minerallerin metabolik süreçlerini ve bağışıklık sistemi regülasyonunu değiştirebildiği, bor verilen hayvanlarda oksidatif stresin azaltıldığı gösterilmiştir [8].

Bor bileşiklerinin kanseri önleyici ve tedavi edici etkilerine ilişkin kanıtlar son yıllarda giderek artmaktadır. CaFB besin takviyesi olarak kullanılsa da neoplastik dönüşümler üzerindeki önleyici ve tedavi edici etkilerine ilişkin veriler sınırlıdır. Bor bileşiklerinin kemik sağlığı, inflamasyon, kardiyovasküler sistem, beyin ve psikolojik işlevler, endokrin ve bağışıklık işlevleri üzerindeki

yararlı etkilerini açıklayan çalışmalar vardır. Ayrıca borun prostat, serviks, meme ve multipl miyelom gibi çeşitli kanser türlerinde önleyici ve tedavi edici değerleri belirlenmiştir. CaFB, kalsiyum, fruktoz ve bor kompleksidir ve taze ve kurutulmuş meyvelerde, sebzelerde, kuruyemişlerde ve şarapta doğal olarak bulunur. Antioksidan aktiviteye sahiptir ve lipid profilini iyileştirir [13].

BA' nın kanser tedavisindeki rolünün araştırıldığı çalışmalardan biri olarak 2020 yılında Hacıoğlu ve arkadaşlarının yapmış olduğu insan prostat kanseri hücreleri üzerinde yapılan çalışma gösterilebilir. Bu çalışmada BA' nın prostat kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlenmiş olup prostat kanseri hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak oksidatif strese, hücre büyümesinin inhibisyonuna, apoptoza ve morfolojik değişikliklere neden olduğu sonucuna varılmıştır [61]. Bizim çalışmamızda da BA ve CaFB' nin serviks kanseri hücreleri üzerine sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlenmiş olup serviks kanseri hücreleri üzerinde belirgin sitotoksik etki göstermiştir.

Çalışmamızda 72. Saatte Hela için BA IC<sub>50</sub> değeri 5000 µM, CaFB için 2500 µM olarak belirlenmiştir. BA tüm zaman dilimlerinde ve tüm dozlarda kontrol grubu olan MRC-5 hücre hattına sitotoksik etki göstermemiş olup CaFB, 48 ve 72. saatlerde yüksek dozlarda (2500 µM ve 5000 µM) MRC-5 hücre hattına sitotoksik etki göstermiştir. Yüksek dozlarda verilen BA ve CaFB koloni oluşumunu anlamlı bir şekilde inhibe etmiş olup her iki grupta da belirgin olarak sitotoksik etki göstermiştir. Bayram ve arkadaşları iki farklı (MCF-7 ve MDA-MB-231 ) meme adenokarsinomu hücre dizisi kullandığı çalışmada BA' nın 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 50 mM ve 75 mM konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstererek hücre sayılarında anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir [62]. Bu değerler, bizim elde ettiğimiz değerlerden yaklaşık 10 kat daha yüksektir. Bir başka çalışmada ise Hacıoğlu ve arkadaşlarının yapmış olduğu DU-145 insan prostat kanseri hücre hattında 24 saatlik BA uygulamasında 10,77 mM IC<sub>50</sub> değerinde MTT testi sonucunda hücre canlılığında ve sitotoksitesinde anlamlı bir düşüş bulunmuştur [61]. Bu değerler ise bizim elde ettiğimiz değerlerden yaklaşık 2 kat daha yüksektir. CaFB' nin kanser tedavisindeki rolünün araştırıldığı literatürde bulunan çalışmalardan birisi 2022 yılında yapılan Kısaçam ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada kolon kanseri hücrelerine (Caco-2) 10mM

konsantrasyonunda IC<sub>50</sub> dozunda CaFB verilmiş olup kolon kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etki gösterdiği ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur [63]. Bizim çalışmamızda ise çok daha düşük doz olan 2500 µM CaFB dozu verildiğinde hücrelerde sitotoksik etki ve proliferasyonun inhibe edildiği görülmüştür.

Tümör metastazının ilk aşaması, kanser hücrelerinin çevre dokuya invazyonunu içerir, bu da kanser hücrelerinin hareketini ve çevre dokuya göçünü gerektirir. Bu nedenle, bu kanser hücresi göçünü baskılayan ilaçlar ve bileşikler, aynı zamanda tümör metastazının başlamasını da önleyebilir. Çalışmamızda BA ve CaFB' nin Hela hücre hattı üzerindeki etkileri araştırılmış olup BA ve CaFB Hela hücre migrasyonunda anlamlı olmasa da inhibe edici etki göstermiştir. 2021 yılında Çabuş ve arkadaşlarının over kanseri hücre hattına BA vererek yaptığı çalışmada kanser hücrelerinin çoğalmasını, migrasyonunu inhibe etmiş, apoptozis ve oksidatif stresi indükleyerek over kanserinin tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir [17]. Bu çalışmanın sonuçları ile bizim çalışmamızın sonuçları benzer özellik göstermektedir.

Apoptoz yolaklarındaki değişiklikler kanser gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Hem intrensek hem de ekstresek sinyal yollarında yer alan birçok gen apoptozun indüklenmesinde ya da inhibisyonunda görev almaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz önemli bir bulgu ise flow sitometri analizi sonucunda CaFB' nin BA' ya göre belirgin bir şekilde Hela hücrelerini apoptoza uğratmasıdır. BA ve CaFB' nin Hela servikal kanser hücre hattında apoptoz ile ilişkili genler üzerindeki etkilerini belirlemek için mRNA izolasyonu yapılarak *KASPAZ-3*, *KASPAZ-8*, *KASPAZ-9*, *BAX*, *BCL-2*, *BID*, *BCL-XL*, *P53*, *P21*, *P16*, *PUMA*, *NOXA*, *FADD*, *TRADD*, *DR-4*, *DR-5*, *PARP*, *APAF*, *AKT*, *PTEN*, *MMP-2*, *MMP-9*, *TIMP-1*, *TIMP-2* genleri gerçek zamanlı PCR ile analiz edilmiştir. *KASPAZ-3*, *KASPAZ-8*, *KASPAZ-9*, *BAX*, *BID*, *BAD*, *BAK*, *NOXA*, *P16*, *P53*, *P21*, *PUMA*, *FADD*, *TRADD*, *DR-4*, *DR-5*, *APAF* genleri apoptozisi indüklerken, *BCL-2*, *BCL-XL* genleri apoptozisi engeller. *AKT* proapoptik proteinleri inhibe ederek apoptozisi engeller, hücrenin sağ kalımını sağlar. *PTEN*, *AKT* nin negatif regülatörüdür. Bu sonuçlar doğrultusunda hem BA' nın hem de CaFB' nin, servikal adenokarsinom Hela hücre hattında çeşitli apoptotik yollar üzerinden etkili olduğu gösterilmiştir. Hefny ve



arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı bir çalışmada insan hepatoselüler karsinom (HCC) HepG2 hücre hattına BA verilmiş ve flow sitometri ile analiz edildiğinde *p53* ekspresyonunu artırıp *BCL-2* ekspresyonlarını azaltarak hücreleri apoptoza uğratmıştır [64]. Bizim çalışmamızda ise hem *p53* hem de *BCL-2* gen ekspresyonunda artış izlenmiş olup *p53* ekspresyonu üzerinden apoptozisi indüklemesi benzer bulunmuştur.

2022 yılında Kahraman ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise HCC hücre hattında (Mahlavu hücre hattı) yaptıkları çalışmada BA verildiğinde *KASPAZ-3* protein seviyelerinde artma ve *AKT* fosforilasyonunda azalma saptanmış olup BA' nın, koloni oluşturma ve migrasyonu inhibe ederek HCC hücre hatlarında apoptozu indüklediği sonucuna varılmıştır [65]. Bizim çalışmamızda hem BA hem de CaFB, *KASPAZ-3'* ü azaltmış *AKT* ı artırmıştır.

CaFB' nin kanser tedavisindeki rolünün araştırıldığı literatürde bulunan çalışmalardan birisi 2022 yılında yapılan Kısaçam ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada kolon kanseri hücrelerine (Caco-2) 10mM konsantrasyonunda IC<sub>50</sub> dozunda CaFB verilmiş olup 24 saat boyunca kolon kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. 10 mM' de azalan *BCL-2* seviyeleri ve artan *BAX* seviyeleri CaFB' nin apoptotik etkilerinin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir [63]. Bizim çalışmamızda ise çok daha düşük doz olan 2500 µM CaFB dozunda, hem *BAX* hem de *BCL-2* seviyelerinde artma görülmüştür. Her iki çalışma karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda çok daha düşük dozlarda *BAX* üzerinden hücreleri apoptoza götürmektedir.

2019 yılında Kısaçam ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise Balb-c farelerinde CaFB' nin cilt kanseri üzerindeki etkileri araştırılmış olup araştırma sonucunda *HRAS*, *HIF1α*, *AKT* ve *PTEN* in protein seviyelerini, immün reaktivitesini ve mRNA ekspresyonlarını azaltarak cilt kanserini önleyici etkiye sahip olabileceği gösterildi [15]. Bizim çalışmamızda ise CaFB verilen hücrelerde *AKT* protein seviyesinde artış görülmüş olup *PTEN* protein seviyesinde azalma görülmüştür. Her iki çalışma karşılaştırıldığında *PTEN* proteini azalmış olup apoptozis üzerinde etkilidir sonucuna varılmıştır.

2023 yılında yapılan bir çalışmada BA' nın insan endometrial Ishikawa hücrelerinde apoptozu tetikleyerek antikanser etki gösterdiği bulunmuştur. Bu etkiyi *sitokrom-c* ve *KASPAZ-3* seviyelerini artırarak yaptığı saptanmıştır [66]. Bizim çalışmamızda ise hem BA hem de CaFB, *KASPAZ-3* düzeyini azaltmıştır. Sonuç olarak çalışmamızda *KASPAZ-3* üzerinden hücreleri apoptoza götüremediği görülmektedir.

BA' nın medüller tiroid kanseri hücreleri üzerinde apoptotik etkilerinin incelendiği bir çalışmada BA' nın *BCL-2* ve *BCL-XL*' i inhibe ederek ve *BAX*, *KASPAZ-9*, *KASPAZ-3*, *NOXA*, *APAF-1* gen ekspresyonlarını aktive ederek apoptozu indüklediği bulunmuştur [67]. Bizim çalışmamızda ise *BCL-2*, *BCL-XL*, *KASPAZ-9*, *NOXA* gen ekspresyonlarında artış gözlenirken, *APAF-1* gen ekspresyonlarında azalma gözlenmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda *KASPAZ-9* ve *NOXA* genleri üzerinden anlamlı olmasa da apoptozis indüklenmektedir.

Yapılan başka bir çalışmada ise over kanseri MDAH-2774 hücre hattında BA' nın apoptotik yollar üzerinden etkisi incelenmiş olup, BA' nın apoptozu indükleyen *BAX*, *BID*, *KASPAZ-3* ve *KASPAZ-9*' un apoptozla ilişkili gen ifadelerinde anlamlı artışlara neden olduğu; tersine, apoptozun negatif düzenleyicisi olan apoptozla ilişkili proteinler olan *BCL-2* ve *BCL-XL*' nin ekspresyonunda önemli azalmalar olduğu bulunmuştur [17]. Bizim çalışmamızda da benzer durum görülmekte olup *BAX*, *BID*, *KASPAZ-9* gen ekspresyonlarında artış gözlenmiştir.

En dış orbitallerinde eşleşmemiş elektrona sahip radikal, iyon veya moleküllere reaktif oksijen türleri (ROS) adı verilir. Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjili oldukları için ROS' u reaktif duruma getirmektedir. Hücrelerde ROS' un üretimine kaynak oluşturabilecek pek çok faktör vardır. Artan metabolik aktivite, mitokondriyal disfonksiyon, peroksizom aktivitesi, pek çok enzimin artan ve azalan aktivitesi, kanserli bir hücrede onkogen aktivitesi, reseptör sinyal artışı bunlardan bazılarıdır. ROS' un düşük/orta konsantrasyonlardaki miktarı hücrelerde enfeksiyöz ajanlara karşı korumada, sinyal iletim yollarını biçimlendirmede ve mitojenik uyarılara karşı yanıtın başlatılmasında etkilidir. ROS' un aşırı üretilmesi sonucunda hücreler bu

aşırılikları yeterince yok edememekte ve oksidatif stres adı verilen durum ortaya çıkmaktadır. Nötralize edilemeyen ROS ile başlayıp, kontrol edilemeyen hücresel ve moleküler değişikliklere kadar ilerleyen süreç kanser gibi ciddi hastalıkların gelişiminde büyük rol oynar. Yüksek seviyedeki ROS protein, lipid ve DNA' ya saldırarak, protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu ve DNA hasarı üzerinden hücreye zarar verir. Hasarlı DNA, kanserin oluşumunu tetikleyecek mutasyonlara neden olur. Hücrelerin zarar görmesini önlemek için ROS düzeylerinin devamlı korunması gerekmektedir. Bu dengenin korunmadığı zaman vücut antioksidan savunma sistemini devreye sokar. ROS' un detoksifikasyonu için antioksidan enzimler veya enzimatik olmayan moleküller devreye girer. Antioksidanlar sayesinde ROS' un vereceği olası hasarlar engellenebildiği gibi oluşan hasarın onarılması da sağlanabilir. Antioksidan takviyeler kanseri önlediği veya azalttığı düşüncesiyle yaygın olarak kullanılmaktadır [68]. BA' nın antioksidan sistemi uyardığını gösteren yayınlar olmasına rağmen CaFB ile ilgili çok fazla yayın bulunmamaktadır. Çalışmamızda CaFB de daha çok olmak üzere her iki bor bileşeninde de total antioksidan durumunda azalma göstermiştir. 2022 yılında Çalışkan ve arkadaşlarının sıçan böbrek dokusunda etanolün akut toksisitesi ve BA' nın oksidatif stresi azaltarak koruyucu etkisini incelemiş olup etanolün böbrek tübüllerine zarar verdiği; etanolün kronik kullanımı böbreklerde oksidatif strese neden olduğu bulunmuştur. Oksidatif stresin neden olduğu lipid oksidasyonu nedeniyle hücre zarlarında bozulma meydana gelir .BA antioksidan etkisi ile oksidatif hasarı azalttığı tespit edilmiştir Çalışmada verilen BA dozları TOS ve OSI seviyesini düşürdüğü için, sıçanlarda oksidatif stresi ve etanolün neden olduğu hasarı azaltmada etkili bulunmuştur [69]. Bizim çalışmamızda da BA, TOS ve OSI seviyelerini düşürmektedir.

Yapılan bir çalışmada BA' nın insan endometrial Ishikawa hücrelerinde antikanser etkilerine ve oksidatif stres üzerine etkilerini araştırmak için TAS, TOS, OSI seviyeleri incelenmiştir. Buna göre BA, Ishikawa endometrial hücrelerinde TOS seviyesi arttı, TAS seviyesi azaldı, OSI önemli ölçüde yükseldiği görüldü [66]. Bizim çalışmamızda ise CaFB' de BA' ya göre daha fazla olmak üzere TAS seviyesi azalmaktadır. TOS seviyesi BA' da CaFB' ye göre daha fazla olmak üzere azalma göstermektedir. OSI, CaFB' de BA' ya göre daha fazla olmak üzere artış göstermektedir.

Yapılan başka bir çalışmada ise over kanseri MDAH-2774 hücre hattında BA' nın oksidatif strese olan etkisi incelenmiştir. BA uygulanan MDAH-2774 hücrelerinde TOS seviyeleri azalırken, TAS seviyeleri artmıştır. BA ile tedavi edilen grupta OSI artmış olarak bulunmuştur [17]. Bizim çalışmamızda ise BA verilen grupta kontrol grubuna göre TAS, TOS ve OSI seviyelerinde anlamlı olmasa da azalma izlenmiştir. CaFB verilen grupta ise TAS ve TOS seviyelerinde anlamlı olmasa da azalma izlenirken, OSI değerlerinde artış izlenmektedir.

Çalışmamızın en büyük kısıtlamalarından birisi tek hücre hattı üzerinde çalışılmasıdır. Bunun nedeni çalışmanın yüksek maliyetlere neden olacak olması ve bütçe kısıtlılığıdır. Çalışmamızda CaFB' nin BA' ya göre daha etkin olduğu gösterilmiş olup diğer kısıtlamalardan birisi de CaFB' nin servikal adenokarsinom ve diğer kanser türlerinde çok fazla çalışılmamış olması ve literatürde çok fazla verinin olmamasıdır.

Sonuç olarak bulgularımız umut verici olup daha geniş bütçe oluşturularak daha fazla hücre hattında ayrıntılı çalışılmalar için zemin hazırlamaktadır.

## VI. SONUÇ

1. MTT analizi sonucunda BA ve CaFB' nin serviks kanseri Hela hücre hattında sitotoksik etki gösterdiği gözlemlendi ve önemli bir anti-karsinojenik ajan olarak rol oynayabilecekleri sonucuna varıldı.
2. Hem BA hem de CaFB Hela hücre hattında koloni oluşumunu anlamlı bir şekilde inhibe ettiği sonucuna varıldı.
3. CaFB' nin Hela hücrelerini migrasyona uğratmada BA' ya göre üstün olduğu sonucuna varıldı.
4. CaFB' nin belirgin bir şekilde Hela hücrelerini apoptoza uğratarak BA' ya göre daha üstün olduğu sonucuna varıldı.
5. CaFB de daha çok olmak üzere her iki bor bileşeninde de total antioksidan seviyesinde azaldığı sonucuna varılmıştır.
6. BA da daha fazla olmak üzere her iki bor bileşeninde de total oksidan seviyesinde azaldığı sonucuna varılmıştır.
7. CaFB de daha çok olmak üzere oksidatif stres indeksi artmıştır.

## VII. ÖZET

### ‘SERVİKAL KANSER TEDAVİSİNDE POTANSİYEL TERAPÖTİK AJAN OLARAK BORİK ASİT’İN YERİNİN SERVİKAL KANSER HÜCRE HATTINDA DEĞERLENDİRİLMESİ’

**AMAÇ:** Serviks kanseri hücre hattında borik asit ve kalsiyum fruktoboratin etkisinin incelenmesi

**GEREÇ VE YÖNTEM:** Hela insan serviks kanseri hücre hattı, uygun koşullarda optimize edilerek Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji bölümünde üretilerek hücre kültür çalışmaları yapılmıştır. Gerekli üreme koşulları sağlandıktan sonra bu hücre hatlarına borik asit ve kalsiyum fruktoboratin farklı konsantrasyonları verilmiştir.

MTT sitotoksikite testleri ile sitotoksik etkinin izlendiği optimum konsantrasyon değerleri (IC<sub>50</sub> değerleri) belirlenmiş olup bu IC<sub>50</sub> dozları hücrelere verilerek hücre migrasyon koşulları değerlendirilmiştir. Annexin-5 ile hücre apoptoz miktarı ölçülmüştür. BA ve CaFB’ nin Hela kanser hücre hattı üzerindeki etkilerini incelemek için Total Antioksidan Seviyesi ve Total Oksidan Seviyesi testleri uygulandı. BA ve CaFB’ nin Hela servikal kanser hücre hattında apoptoz ile ilişkili genler üzerindeki etkilerini belirlemek için genler gerçek zamanlı PCR ile analiz edildi.

Toplanan veriler istatistiksel olarak GraphPad Prism (versiyon 9) ve Microsoft Excel programı aracılığı ile grafiksel olarak Image J programı aracılığı ile histogram grafikleri ile değerlendirildi.

**BULGULAR:** BA ve CaFB, servikal adenokarsinom Hela hücre hattında sitotoksik etki göstererek ve apoptozisi tetikleyerek anti-proliferatif etki gösterdiği görülmüştür.

**SONUÇ:** BA ve CaFB’ nin Hela serviks kanseri hücre hatlarında sitotoksik etki göstererek çeşitli apoptotik yollar üzerinden etki gösterdiği, apoptozisi indüklediği görüldü. BA ve CaFB’ nin serviks kanseri tedavisinde etkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu sonuç ilerde yapılacak hayvan ve insan çalışmaları ile doğrulanması gerekmektedir.

**ANAHTAR KELİMELEER:** Servikal kanser, Hedef tedavi, Borik asit, Kalsiyum fruktoborat, Apopitozis,

## VIII. İZGİLİZCE ÖZET

### 'EVALUATION OF THE PLACE OF BORIC ACID AS A POTENTIAL THERAPEUTIC AGENT IN CERVICAL CANCER TREATMENT IN THE CERVICAL CANCER CELL LINE'

**PURPOSE:** Examining the effect of boric acid and calcium fructoborate on cervical cancer cell line.

**MATERIALS AND METHODS:** Hela human cervical cancer cell line was optimized under appropriate conditions and produced in the Medical Biology Department of Celal Bayar University School of Medicine and cell culture studies were carried out. After the necessary growth conditions were met, these cell lines were given different concentrations of boric acid and calcium fructoborate.

Optimum concentration values ( $IC_{50}$  values) at which the cytotoxic effect was monitored were determined by MTT cytotoxicity tests, and these  $IC_{50}$  doses were administered to the cells and cell migration conditions were evaluated. The amount of cell apoptosis was measured with Annexin-5. BA and CaFB 's Total Antioxidant Status and Total Oxidant Status tests were performed to examine the effects on the Hela cancer cell line. BA and CaFB 's Genes were analyzed by real-time PCR to determine their effects on apoptosis-related genes in the Hela cervical cancer cell line.

The collected data were statistically analyzed using GraphPad. It was evaluated graphically using Prism (version 9) and Microsoft Excel programs, and with histogram graphics using Image J program.

**RESULTS:** BA and CaFB were observed to have anti-proliferative effects by exerting cytotoxic effects and triggering apoptosis on the cervical adenocarcinoma Hela cell line.

**CONCLUSION:** BA and CaFB had cytotoxic effects on Hela cervical cancer cell lines, by affecting through various apoptotic pathways, and induced apoptosis. BA and CaFB were concluded to be effective option in cervical cancer treatment. This result needs to be confirmed by animal and human studies.



**KEYWORDS:** Cervical cancer, Target treatment, Boric acid, Calcium fructoborate, Apoptosis

## IX. KAYNAKLAR

1. Sung, H., et al., *Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: a cancer journal for clinicians, 2021. **71**(3): p. 209-249.
2. Şencan, İ. and B. Keskinçilic, *Türkiye kanser istatistikleri*. TC Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2017: p. 19-44.
3. World Health, O., *Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice*. 2nd ed. 2014, Geneva: World Health Organization.
4. Cancer, I.A.f.R.o., *Planning and implementing cervical cancer prevention and control programs: a manual for managers*. 2004.
5. Kot, F.S., *Boron sources, speciation and its potential impact on health*. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2009. **8**: p. 3-28.
6. Hunt, C.D., *Regulation of enzymatic activity: one possible role of dietary boron in higher animals and humans*. Biol Trace Elem Res, 1998. **66**(1-3): p. 205-25.
7. Bakirdere, S., S. Orenay-Boyacioglu, and M. Korkmaz, *Effect of Boron on Human Health*. The Open Mineral Processing Journal, 2010. **3**: p. 54-59.
8. Khaliq, H., Z. Juming, and P. Ke-Mei, *The Physiological Role of Boron on Health*. Biol Trace Elem Res, 2018. **186**(1): p. 31-51.
9. Cui, Y., et al., *Dietary boron intake and prostate cancer risk*. Oncol Rep, 2004. **11**(4): p. 887-92.
10. Korkmaz, M., et al., *Effects of dietary boron on cervical cytopathology and on micronucleus frequency in exfoliated buccal cells*. Environ Toxicol, 2007. **22**(1): p. 17-25.
11. Mahabir, S., et al., *Dietary boron and hormone replacement therapy as risk factors for lung cancer in women*. Am J Epidemiol, 2008. **167**(9): p. 1070-80.
12. Scorei, R., et al., *Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells*. Biol Trace Elem Res, 2008. **122**(3): p. 197-205.
13. Tepedelen, B.E., et al., *A Study on the Anticarcinogenic Effects of Calcium Fructoborate*. Biol Trace Elem Res, 2017. **178**(2): p. 210-217.
14. Acerbo, A.S. and L.M. Miller, *Assessment of the chemical changes induced in human melanoma cells by boric acid treatment using infrared imaging*. Analyst, 2009. **134**(8): p. 1669-74.
15. Kisacam, M.A., et al., *Calcium Fructoborate Prevents Skin Cancer Development in Balb-c Mice*. Biol Trace Elem Res, 2020. **196**(1): p. 131-144.
16. Özyarım Ş, C. and F. Karabağ Çoban, *Investigation of The Apoptotic and Antiproliferative Effects of Boron on CCL-233 Human Colon Cancer Cells*. Cell J, 2021. **23**(4): p. 429-434.
17. Cabus, U., et al., *Boric acid as a promising agent in the treatment of ovarian cancer: Molecular mechanisms*. Gene, 2021. **796-797**: p. 145799.
18. Yıldırım, H., et al., *A Comparative Study for Selectivity of Micronuclei in Cervical Exfoliated Cells on Chronic Boron Effects*. J Cytol, 2019. **36**(2): p. 75-78.
19. Ostör, A.G., *Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review*. Int J Gynecol Pathol, 1993. **12**(2): p. 186-92.
20. Koss, L.G., *The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy*. Jama, 1989. **261**(5): p. 737-43.
21. Cronjé, H.S., *Screening for cervical cancer in the developing world*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2005. **19**(4): p. 517-29.

22. Nazlıcan, E., et al., *Hatay ili Kisecik bölgesinde 35–40 yaş arası kadınlarda serviks kanseri taraması*. 2010.
23. Olorunfemi, G., et al., *Temporal trends in the epidemiology of cervical cancer in South Africa (1994-2012)*. Int J Cancer, 2018. **143**(9): p. 2238-2249.
24. Cronjé, H.S., *Screening for cervical cancer in developing countries*. Int J Gynaecol Obstet, 2004. **84**(2): p. 101-8.
25. Stumbar, S.E., M. Stevens, and Z. Feld, *Cervical Cancer and Its Precursors: A Preventative Approach to Screening, Diagnosis, and Management*. Prim Care, 2019. **46**(1): p. 117-134.
26. Johnson, C.A., et al., *Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management*. Semin Oncol Nurs, 2019. **35**(2): p. 166-174.
27. Su, B., et al., *The relation of passive smoking with cervical cancer: A systematic review and meta-analysis*. Medicine (Baltimore), 2018. **97**(46): p. e13061.
28. Sobti, R.C., et al., *Interaction of passive smoking with GST (GSTM1, GSTT1, and GSTP1) genotypes in the risk of cervical cancer in India*. Cancer Genet Cytogenet, 2006. **166**(2): p. 117-23.
29. Prokopczyk, B., et al., *Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(12): p. 868-73.
30. Türkmen, A.S., N. Canbulat Şahiner, and S. Sevim, *Adolesan dönem cinselliğiyle öne çıkan serviks kanseri ve risk faktörleri*. Bakirkoy Tıp Dergisi / Medical Journal of Bakirkoy, 2013: p. 59-63.
31. Appleby, P., et al., *Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies*. Lancet, 2007. **370**(9599): p. 1609-21.
32. Ries, L., et al., *SEER cancer statistics review, 1975–2005*. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2008. **2999**.
33. Cohen, P.A., et al., *Cervical cancer*. Lancet, 2019. **393**(10167): p. 169-182.
34. Muñoz, N., et al., *Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer*. Vaccine, 2006. **24 Suppl 3**: p. S3/1-10.
35. Castellsagué, X., *Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer*. Gynecol Oncol, 2008. **110**(3 Suppl 2): p. S4-7.
36. Gupta, S.M. and J. Mania-Pramanik, *Molecular mechanisms in progression of HPV-associated cervical carcinogenesis*. J Biomed Sci, 2019. **26**(1): p. 28.
37. Dillner, J., *Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the E1, E2, E4, E5, E6 and E7 open reading frames*. Int J Cancer, 1990. **46**(4): p. 703-11.
38. Bzhalava, D., C. Eklund, and J. Dillner, *International standardization and classification of human papillomavirus types*. Virology, 2015. **476**: p. 341-344.
39. Wang, X., X. Huang, and Y. Zhang, *Involvement of Human Papillomaviruses in Cervical Cancer*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2896.
40. McBride, A.A., *Human papillomaviruses: diversity, infection and host interactions*. Nat Rev Microbiol, 2022. **20**(2): p. 95-108.
41. Nayar, R. and D.C. Wilbur, *The Pap test and Bethesda 2014*. Cancer Cytopathol, 2015. **123**(5): p. 271-81.
42. Fontham, E.T.H., et al., *Cervical cancer screening for individuals at average risk: 2020 guideline update from the American Cancer Society*. CA Cancer J Clin, 2020. **70**(5): p. 321-346.

43. Bhatla, N. and S. Singhal, *Primary HPV screening for cervical cancer*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2020. **65**: p. 98-108.
44. Bermudez, A., N. Bhatla, and E. Leung, *Cancer of the cervix uteri*. Int J Gynaecol Obstet, 2015. **131 Suppl 2**: p. S88-95.
45. Cibula, D., et al., *The European Society of Gynaecological Oncology/European Society for Radiotherapy and Oncology/European Society of Pathology Guidelines for the Management of Patients With Cervical Cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2018. **28**(4): p. 641-655.
46. Merz, J., et al., *Revised FIGO Staging for Cervical Cancer - A New Role for MRI*. Rofo, 2020. **192**(10): p. 937-944.
47. Quinn, M.A., et al., *Carcinoma of the cervix uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer*. Int J Gynaecol Obstet, 2006. **95 Suppl 1**: p. S43-103.
48. Koh, W.J., et al., *Cervical Cancer, Version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. J Natl Compr Canc Netw, 2019. **17**(1): p. 64-84.
49. Datta, N.R., et al., *Concurrent chemoradiotherapy vs. radiotherapy alone in locally advanced cervix cancer: A systematic review and meta-analysis*. Gynecol Oncol, 2017. **145**(2): p. 374-385.
50. Nogueira-Rodrigues, A., et al., *Phase 2 trial of erlotinib combined with cisplatin and radiotherapy in patients with locally advanced cervical cancer*. Cancer, 2014. **120**(8): p. 1187-93.
51. Goncalves, A., et al., *A phase II trial to evaluate gefitinib as second- or third-line treatment in patients with recurring locoregionally advanced or metastatic cervical cancer*. Gynecol Oncol, 2008. **108**(1): p. 42-6.
52. Kumar, P., et al., *Gefitinib: An Updated Review of its Role in the Cancer Management, its Nanotechnological Interventions, Recent Patents and Clinical Trials*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2023. **18**(4): p. 448-469.
53. Majtnerová, P. and T. Roušar, *An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation*. Molecular Biology Reports, 2018. **45**(5): p. 1469-1478.
54. D'Arcy, M.S., *Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy*. Cell Biol Int, 2019. **43**(6): p. 582-592.
55. Xie, Y., et al., *PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review)*. Mol Med Rep, 2019. **19**(2): p. 783-791.
56. Rascio, F., et al., *The Pathogenic Role of PI3K/AKT Pathway in Cancer Onset and Drug Resistance: An Updated Review*. Cancers, 2021. **13**(16): p. 3949.
57. Favalaro, B., et al., *Role of apoptosis in disease*. Aging (Albany NY), 2012. **4**(5): p. 330-49.
58. Zimmermann, K.C., C. Bonzon, and D.R. Green, *The machinery of programmed cell death*. Pharmacol Ther, 2001. **92**(1): p. 57-70.
59. Nagata, S., *Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells*. Annual Review of Immunology, 2018. **36**(1): p. 489-517.
60. Scorei, I.D. and R.I. Scorei, *Calcium fructoborate helps control inflammation associated with diminished bone health*. Biol Trace Elem Res, 2013. **155**(3): p. 315-21.
61. Hacioglu, C., et al., *High Concentrations of Boric Acid Trigger Concentration-Dependent Oxidative Stress, Apoptotic Pathways and Morphological Alterations in DU-145 Human Prostate Cancer Cell Line*. Biol Trace Elem Res, 2020. **193**(2): p. 400-409.

62. Bayram, D., et al., *Does Boric Acid Inhibit Cell Proliferation on MCF-7 and MDA-MB-231 Cells in Monolayer and Spheroid Cultures by Using Apoptosis Pathways?* Biol Trace Elem Res, 2023.
63. Kisacam, M.A., P. Ambarcioglu, and A. Yakan, *Calcium fructoborate regulate colon cancer (Caco-2) cytotoxicity through modulation of apoptosis.* J Biochem Mol Toxicol, 2022. **36**(5): p. e23021.
64. El-Hefny, I.M., et al., *Evaluation of the Cytotoxicity and Apoptotic Induction in Human Liver Cell Lines Exposed to Three Food Additives.* Recent Pat Food Nutr Agric, 2020. **11**(3): p. 193-201.
65. Kahraman, E. and E. Göker, *Boric acid exert anti-cancer effect in poorly differentiated hepatocellular carcinoma cells via inhibition of AKT signaling pathway.* J Trace Elem Med Biol, 2022. **73**: p. 127043.
66. Çakır Gündoğdu, A., et al., *Boric Acid Exhibits Anticancer Properties in Human Endometrial Cancer Ishikawa Cells.* Cureus, 2023. **15**(8): p. e44277.
67. Yıldırım, O., *Borik asitin medüller tiroid kanseri hücrelerinde invazyon, migrasyon, proliferasyon, apoptoz, hücre döngüsü ve miRNA'lar üzerine etkileri.* 2019.
68. Çiftçi, N., *Oksidatif stresin kanserdeki rolü: Antioksidanlar kanser progresyonunun yakıtı olabilir mi.* Ahi Evran Tıp Dergisi, 2017. **1**: p. 8-13.
69. ÇALIŞKAN, A., et al., *Acute toxicity of ethanol and protective role of boric acid in rat kidney tissue.* 2022.