TİP 1 KOLLAJENİN OVER KANSERİ HÜCRE HATTINDA HÜCRE PROLİFERASYONU VE HOX GEN EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Azize ERASLAN
211503102

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Disiplinlerarası Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı
Danışman: Dr. Ögr. Üyesi Zeynep AKBULUT

İstanbul
T.C. Maltepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Eylül, 2023

TİP 1 KOLLAJENİN OVER KANSERİ HÜCRE HATTINDA HÜCRE PROLİFERASYONU VE HOX GEN EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Azize ERASLAN
211503102
ORCID: 0009-0007-2842-4103

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Disiplinlerarası Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı
Danışman: Dr. Ögr. Üyesi Zeynep AKBULUT

İstanbul
T.C. Maltepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Eylül, 2023



JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli "Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge" ile bildirilen 6698 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI

Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli "Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge" ile bildirilen 6698 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyuca her adımımda yanımda olan, bana yol gösteren, her danıştığımda bilgisi ve ilgisi ile yanımda olan ve desteğini her zaman hisssetiğim, büyük bir özveri ile çalışmamızı yürüten tez danışmanım kıymetli Dr.Ögr. Üyesi Zeynep AKBULUT'a sabrı ve emeklerinden dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca çok değerli bilgi birikimini bizimle paylaşan, bizi eğiten, bilgileri ışığında yürüdüğüm Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. çok değerli Dr. Mehmet CINCIK'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecimde bilgi ve deneyimi ile her daim yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Ümit ÖZEKİCİ ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yüksek Lisans tez dönemim boyunca çalışmamın deneylerini yürüttüğüm çok değerli Maltepe Üniversitesi Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi (MÜKKAM) bölümüne ve saygıdeğer Prof. Dr. Ranan GÜLHAN AKTAŞ'a teşekkür ederim.

Tezimin oluşmasında verdiği destekten dolayı Doç Dr. Rukiye Nalan TİFTİK' e teşekkür ederim.

Teziminin aşamalarında bilgilerinden yararlandığım, bana rehber olan çok değerli ablalarım Doç.Dr. Selda MURAT ve Dr.Ögr. Üyesi Sevil ÇİÇEK'e eşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan beni yetiştiren çok değerli annem, babam, abim ve desteğiyle her zaman yanımda olan, beni yüreklendiren sevgili eşime ve biricik canımın içi kızım İPEK'ime sevgilerimi sunar hepsine sonsuz teşekkür ederim.

Azize ERASLAN

Eylül, 2023

ÖZET

TİP I KOLLAJENİN OVER KANSERİ HÜCRE HATTINDA HÜCRE PROLİFERASYONU VE HOX GEN EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Azize Eraslan
Yüksek Lisans Tezi
Disiplinlerarası Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı
Danışman: Dr. Ögr. Üyesi Zeynep Akbulut
Maltepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, 2023

Over kanseri, dünya üzerindeki çoğu kadın için ölümcül jinekolojik hastalıklardan biridir. Dünya çapında kadınlar arasında en yaygın yedinci kanserdir ve iyileştirilmiş tedavi stratejilerine rağmen, over kanseri olan hastalarda genel sağkalım oranı, yaklaşık %46 ile devam etmektedir. Over kanserinin ilerlemesine sebep olan faktörler arasında; yaş, aile öyküsü, fertilizasyon sorunları, obezite, hareketsiz yaşam tarzı, hormon replasman tedavisi, tüp bebek tedavisinde kullanılan ilaçlar ve endometriozis yer almaktadır. Over kanseri riski ile infertilite ve menopoz gibi durumlar arasında güçlü bir korelasyon bulunmaktadır. HOX genleri, embriyonik gelişimi düzenleyen transkripsiyonel düzenleyicileri kodlayan evrimsel olarak korunmuş genlerdir. HOX genleri hücre farklılaşması, hayatta kalma, proliferasyon, anjiyogenez, otofaji, inflamasyon ve apoptozise müdahale edebilirler.

Over kanseri hücre hattının tip I kollajen varlığında, kontrol grubuna göre proliferasyon ve HOX genlerinin ekspresyonu (ifadesi) üzerindeki etkisinin araştırıldığı bu çalışmada SKOV-3 hücreleri iki farklı deney grubunda kültüre edilmiştir. Proliferasyon testi ölçümü 24, 48 ve 72. saatlerde yapılmıştır. HOXA10 ve HOXB7 gen ifadeleri, hücrelerin %80 konfluent oldukları kültür süresinde RNA izolasyonları yapılarak RT-PCR ile analiz edilmiştir.

SKOV-3 hücrelerin 72. saatte kollajen grubunun proliferasyon oranı kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış göstermiş ($p<0.0001$), 24. ve 48. saatlerde gruplar arası anlamlı

istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Çalışmada HOXA10 gen ifadesi her iki deney grubunda negatif bulunmuştur. Kollajenli ortamda kültüre edilmiş SKOV-3 hücrelerin HOXB7 gen ifadesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak iki kat artış gösterdiği görülmüştür ($p<0.0001$).

Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, infertil kadınların, endometriozis gibi altta yatan nedenleri göz önünde bulundurularak, tüp bebek uygulamalarında genetik olarak da araştırılmasının, gebe kalma başarısı ve kanser ile ilgili olası risklerinin takibi açısından önemli olacaktır.

Anahtar Sözcükler: Over kanseri, Tip 1 kollajen, HOXA10, HOXB7, SKOV-3

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF TYPE I COLLAGEN ON CELL PROLIFERATION AND HOX GENE EXPRESSION IN OVARIAN CANCER CELL LINE

Azize Eraslan
Master Thesis
Interdisciplinary Clinical Embryology Department
Clinical Embryology Master's Program With Thesis
Thesis Advisor: Assistant Prof. Dr. Zeynep Akbulut
Maltepe University Graduate School, 2023

Ovarian cancer is one of the deadly gynecological diseases for most women in the world. It is the seventh most common cancer among women worldwide, and despite improved treatment strategies, the overall survival rate for patients with ovarian cancer remains approximately 46%. Among the factors that cause the progression of ovarian cancer; age, family history, fertilization problems, obesity, sedentary lifestyle, hormone replacement therapy, IVF and endometriosis. There is a strong correlation between the risk of developing ovarian cancer and conditions such as infertility and menopause. HOX genes are evolutionarily conserved genes that encode transcriptional regulators that regulate embryonic development. HOX genes can interfere with cell differentiation, survival, proliferation, angiogenesis, autophagy, inflammation, and apoptosis.

In this study, in which the effect of ovarian cancer cell line on proliferation and expression of HOX genes in the presence of type I collagen compared to the control group was investigated, SKOV-3 cells were cultured in two different experimental groups. Proliferation test 24.. 48., 72. hours analyzed. Expressions of HOXA10 and HOXB7 genes were analyzed by RT-PCR by RNA isolation during the culture period when the cells were 80% confluent.

The proliferation rate of the collagen group of SKOV-3 cells increased significantly compared to the control group at the 72nd hour ($p<0.0001$), and no statistically

significant difference was observed between the groups at the 24th and 48th hours. In the study, HOXA10 gene expression was found negative in both experimental groups. It was observed that HOXB7 gene expression of SKOV-3 cells cultured in collagenous medium showed a statistically two-fold increase compared to the control group ($p<0.0001$).

According to these data, we have obtained it will be important to investigate genetically in vitro fertilization practices in infertile women, considering the underlying causes such as endometriosis, in terms of pregnancy success and possible cancer related risks.

Keywords: Overian cancer, Type I collagen, HOXA10, HOXB7, SKOV-

İÇİNDEKİLER

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI ii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER ix
TABLOLAR LİSTESİ xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ xiv
KISALTMALAR xv
1. GİRİŞ 1
1.1 Problem 1
1.2 Amaç 2
1.3 Önem 2
1.4 Varsayımlar 3
1.5 Sınırlıklar 3
1.6 Tanımlar 3
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1 Genital Sistem 5
2.1.1 Kadın genital sistem organları 5
2.1.2 Dış genital sistem organları 6
2.1.3 İç genital sistem organları 6
2.1.3.1 Tuba uterina 6
2.1.3.2 Uterus 6

2.1.3.3 Vajina 7

2.1.3.4 Ovaryum 7

2.2 Oogenez 8

2.3 Ovulasyon 8

2.4 Kanser 9

2.4.1 Over kanseri 9

2.4.1.1 Over kanseri sınıflandırılması 10

2.4.1.2 Over kanseri risk faktörleri 11

2.4.1.3 Over kanseri ve infertilite ilişkisi 11

2.5 HOX Geni 12

2.6 HOX Geni ve Over Kanseri İlişkisi 13

2.7 HOXA10 Geni 15

2.8 HOX B7 Geni 16

2.9 Kollajen 17

2.9.1 Tip 1 kollajen 18

2.9.2 Kollajenin kanserdeki rolü 18

3. YÖNTEM 20

3.1 Araştırma Modeli 20

3.2 Evren ve Örneklem 20

3.3 Veriler ve Toplanması 20

3.4 Verilerin Çözümlenmesi ve Yorumlanması 21

3.5 SKOV-3 Hücre Kültürünün Başlatılması 21

3.6 Deney Grupları Oluşturulması 21

3.7 Tip 1 Kollajen Hazirlanmasi 22

3.8 Hücrelerin Mikroskobik Olarak Görüntülenmesi 22

3.9 SKOV-3 Hücrelerinin Proliferasyon (CCK-8) Testi 22

3.10 RNA İzolasyonu 24

3.11 Elde edilen RNA'nın Düzey ve Kalitesinin Tayini 25

3.12 cDNA Sentezi 25

3.13. Ters Transkriptaz Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-real time PCR) 25

3.14 Çalışmada kullanılan sarf malzemeler 28

3.15 Çalışmada kullanılan cihaz ve kullanım amaçları 29

4. BULGULAR VE TARTIŞMA 31

4.1 SKOV-3 Hücrelerinin Mikroskobik Görüntüleri 31

4.2 SKOV-3 Hücrelerinin Proliferasyon (CCK-8) Testi Sonucu 32

4.3 RT-PCR Sonuçları 33

4.3.1 HOXA10 ve HOXB7 gen ifade sonuçları 33

4.4 Tartışma 34

5. SONUÇ ve ÖNERİLER 39

KAYNAKLAR 40

EKLER 53

EK-1 Skov-3 Hücre Hattı CCK-8 460nm OD Sonuçları 53

EK-2 Skov-3 Hücre Hattı Cck-8 Sonuçları İstatistiksel Analiz Raporu 55

EK-3 Skov-3 Hücre Hattı Rna Kantifikasyon Sonuçları 56

EK-4 Skov-3 Hücre Hattı Rt-Qpcr Analiz Sonuçları 57

EK-5 Kontrol Ve Deney Grubu Skov-3 Hücrelerin Hox Genleri Ve Housekeeping Gen Δct Değerleri 58

EK-6 Skov-3 Hücre Hattı Rt-Qpcr Sonuçlarına Göre Gen İfadesi Analizi 59

EK-7 Skov-3 Hücre Hattı Rt-Qpcr Sonuçlarına Göre Gen İfadesi Analizi 2^Deltadelta Ct Hesaplama 60

EK-8 HOXB7 Geni Deney Grubu Ct Değerinin Housekeeping Gen Beta-Aktin Ct Değerine Göre Normalize Edilmesi..... 61

EK-9 HOXB7 Geni Deney Grubu Delta CT Değerinden Kontrol Grubu Delta CT Farkını Bularak Deltadeltact'yi Hesaplama..... 62

EK-10 HOXB7 Geni İfadesinin Deney Grubunda Kontrol Grubuna Göre Karşılaştırmalı Sonucu 2^(-Deltadeltact) Değerinin Hesaplama..... 63

EK-11 SKOV-3 RT-Qpcr (Roche 96 Light Cycler) Kontrol Ve Deney Grubuna Ait Amplikasyon Ölçüm Ekranı 64

EK-12 SKOV-3 RT-Qpcr (Roche 96 Light Cycler) Kontrol Ve Deney Grubuna Ait Melting Analiz Ekranı 65

ÖZGEÇMİŞ 66

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. RT-qPCR Reaksiyon Protokolü 27
Tablo 2. RT-qPCR Şartları 27
Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler 28
Tablo 4. Kullanılan Cihazlar 29
Tablo 5. SKOV-3 Hücrelerinin Proliferasyon Test Sonucu 32
Tablo 6. HOXA10 ve HOXB7 Genlerinin Deney Grupları İfade Karşılaştırılması 33

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kadın Üreme Sistemi Anatomisi 5
Şekil 2. Ovaryumun yapısı 8
Şekil 3. Paralog Homebox Genleri 13
Şekil 4. Müller Sisteminin HOX Genleri 14
Şekil 5. Over kanserinde HOX genlerinin rolü 15
Şekil 6. Kollajenin kanser hücrelerine etkisi. 19
Şekil 7. Deney Gruplarının Oluşturulmasının Şematik görüntüsü 22
Şekil 8. Hücre Proliferasyon Test Prosedürü..... 23

KISALTMALAR

CCK-8 : Cell Counting Kit-8

ECM : Ekstraselluler Matriks

FBS : Fetal Sığır Serumu

FSH : Folikül Stimüle Edici Hormon

HCC : Hepatısellüler Kanser

HOX : Homeobox

HOXA10 : HomeoboxA10

HOXB7 : HomeoboxB10

IVF : İn Vitro Fertilizasyon

LH : Luteinleştirici Hormon

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SKOV-3 : Over Kanseri Hücre Hattı

SRY : Sex-Determinin Region on Y

TGFB2 : Transforming Growth Factor Beta

1. GİRİŞ

1.1 Problem

Over kanseri, dünya üzerindeki çoğu kadını etkileyen ölümcül jinekolojik hastalıklardan biridir. Dünya Sağlık Örgütünün 2018 raporuna göre, 2040 yılına kadar over kanseri insidansı ve ölüm oranının 150.000 vakaya kadar çıkabileceği öngürülmektedir (Zhang, Qazi ve Raza, 2021). Dünya çapında, kadınlar arasında en yaygın yedinci kanserdir ve gelişen tedavi seçeneklerine rağmen, over kanseri olan hastalarda genel sağkalım oranı, yaklaşık %46'dır (Peng, Yu, Chen, 2020). Over kanserinin risk faktörleri arasında; yaş, aile öyküsü, fertilizasyon sorunları, obezite, hareketsiz yaşam tarzı, hormon replasman tedavisi, in-vitro fertilizasyon (IVF) ve endometriozis yer almaktadır. Bu faktörler genetik ve çevresel faktörler olarak iki kategoride toplanmaktadır (Bowen vd., 2009).

Infertilite, sağlıklı bir partnerle 12 aylık düzenli korunmasız cinsel ilişkiye rağmen klinik gebelik elde edilememesi olarak ifade edilir. Üreme sisteminde meydana gelebilecek genetik ve fizyolojik bozukluklar kadının gebe kalması ve çocuk dünyaya getirmesini engelleyebilir (Sarwar, Sykes, Chitcholtan, ve Evans, 2022).

HOX genleri, embriyonik gelişimi düzenleyen transkripsiyonel düzenleyicileri kodlayan evrimsel olarak korunmuş genlerdi (Borghese vd., 2008). HOX genleri, orijinal olarak Drosophila melanogaster meyve sineğinde embriyogenezdeki rolleriyle tanınan transkripsiyon faktörlerini kodlayan "homeotik" veya "HOX" genleri ile homeobox süper ailesinin bir üyesidir (Idaikkadar, Morgan, ve Michael, 2019). HOX-A genleri, yetişkin siklik endometrial gelişim ve endometrial reseptivite için gerekli görünmektedir. Son zamanlarda, HOX genlerinin over kanserinde artış gösterildiği bildirilmiştir. Endometriozis, lezyonların pelvis başta olmak üzere vücudun her yerine yayıldığı, ağrı ve infertilite ile karakterize yaygın bir jinekolojik hastalıktır. Gen profilinin güncellemesini amaçlayarak transkritomik düzeyde yapılan çalışmada, ilk kez endometriozisdeki tüm HOX gen kümelerinin yarı-sistematik bir değişimi tanımlanmıştır (Borghese vd., 2008).

Temel bir matrisomal protein olarak kollajen, ekstraselluler matriks (ECM) yapısal çerçevesinin düzenlenmesinde yer alır ve bu nedenle ECM'nin biyofiziksel karakterini belirlemede potansiyel olarak çok önemlidir. Kollajen mimarisinin, normal ve kanserli over dokusunda kollajen morfolojisini incelenmesine yol açan over kanseri gelişimi, ilerlemesi ve terapötik yanıtlarda rol oynadığı öne sürülmüştür (Sarwar vd., 2022).

Hücreler ve ECM arasındaki dinamik etkileşim, normal hücre ve tümör hücrelerinde farklılaşmayı, çoğalmayı ve göçü etkiler (Alkmin vd., 2020). Normal yumurtalık stromasının çoğunluğu, spesifik olmayan lif oryantasyonu/hizalaması, diğer minör matriks proteinleri ve stromal hücreler (örn., fibroblastlar ve miyofibroblastlar) ile kollajen tip I içerir (Ricciardelli ve Rodgers, 2006). İlk olarak 1992 yılında Kenney tarafından ortaya atılan bir terim olan endometriozis, infertilitenin nedenlerinden biridir. Endometriumda patolojik kollajen birikimi (endometroz) infertiliteden sorumludur (Alpoim-Moreira vd., 2022). Somaiah ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada kollajenin, mezankimal kök hücrelerde adhezyon, proliferasyonu arttırıcı etki gösterdiğini, Zheng ve ark. (2017), hepatosellüler karsinomada hücrelerin proliferasyonunu arttığını göstermişlerdir.

1.2 Amaç

Bu çalışmanın amacı pek çok tümör ve kanser hücrelerinde etkinliği gösterilen tip 1 kollajenin over kanseri hücre hattı üzerindeki proliferatif ve genetik etkisinin belirlenmesidir. Planlanan proliferasyon ve gen eskpresyon deneyleri ile tip 1 kollajenin over kanseri hücre hattında over kanseri prognozu ve kadın infertilitesi ile ilişkili HOX gen ailesinde yer alan HOXA10 ve HOXB7 genlerin ifadesinde etkisinin olup olmadığını göstermektir.

1.3 Önem

Over kanseri ve kadın infertilitesi ile ilişkilendirilmiş pek çok araştırma bulunmaktadır. Tip 1 kollajenin sağlıklı ve kanserli hücrelerde olan etkisi halen araştırılmaya devam etmektedir. Bu çalışmada tümör mikroçevrede oldukça önemli olan ekstrasellüler matriks proteini tip 1 kollajenin, over kanseri hücre hattında tip 1 kollajen bulunmayan hücreler ile karşılaştırılarak kanser hücrelerindeki hücre proliferasyonu üzerine arttırıcı

etkisi olup olmadığı ve aynı zamanda over kanseri prognozu ve infertilite ile ilişkilendirilmiş HOXA10 ve HOXB7 genlerinin ifadesinde nasıl bir etki göstereceği araştırılmıştır. Böylece ECM proteini olan tip 1 kollajenin in-vitro şartlarda kanser ve infertilite üzerindeki etkisi moleküler olarak araştırılmıştır.

1.4 Varsayımlar

SKOV-3 over kanseri hücre hattında; tip 1 kollajenli ortamın kontrol grubuna göre proliferasyon oranında artış olacağı varsayılmaktadır. Kanser hücrelerinde artışı gözlenen HOXB7 gen ailesinin kollajenli ortamda kültüre edilen SKOV-3 hücrelerinde kontrol grubuna göre daha yüksek olacağı varsayılmaktadır. İnfertilite ile ilişkilendirilmiş ve buna paralel artışı gözlenen HOXA10 gen ifadesinin kollajenli ortamda kültüre edilen SKOV-3 hücrelerinde kontrol grubuna göre daha yüksek olacağı varsayılmaktadır.

1.5 Sınırlıklar

SKOV-3 hücre hattında kollajen etkisinin araştırılmasında HOX gen ailesinde yer alan ve kanser ile ilişkilendirilmiş genlerin ifadeleri maddi sınırlılıklar nedeni ile araştırılamamıştır. Çalışmamızda kanser prognozu ve endometriozis ile ilişkilendirilmiş belli başlı iki gen seçilerek tip 1 kollajen etkisi araştırılmıştır.

1.6 Tanımlar

İnfertilite: İnfertilite, sağlıklı bir çiftin 12 ay boyunca korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmamasıdır.

Hücre Kültürü: Bitki ve hayvanlardan ekstrakte edilen hücrelerin daha sonrasında yapay bir ortamda büyütülmesidir.

Tip 1 Kollajen: ECM olup dokularda destek görevi gören organizmada en çok sentezi yapılan proteindir.

Endometriozis: Endometrium dokusunun uterin kavite dışına yerleştiği, inflamatuar süreçlere neden olan ilerleyici bir hastalıktır.

HOX Geni: Organizmalarda embriyonun normal gelişimini tamamlamasında gerekli bilgiyi kodlayan, organ oluşumu ve bunların vücut içerisindeki yerlerini belirleyen, düzenleyici görevi olan bir gen ailesidir.

İn Vitro Fertilizasyon: Kadın overlerinden oositlerin toplanarak, erkekden alınan spermin vüvut dışında, laboratuvarda oosit ve spermin birleştiği süreçtir.

2. GENEL BİLGİLER

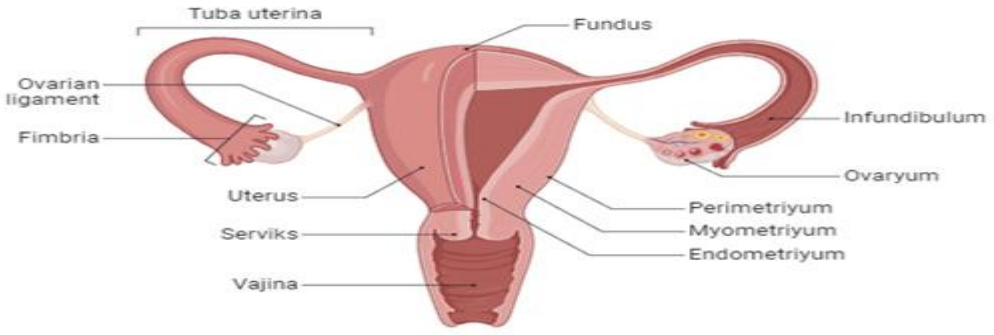
2.1 Genital Sistem

Cinsiyet belirlenmesi birden fazla genin görev aldığı bir süreçtir. Cinsiyet belirlenmesinde görevli SRY geni (sex-determining region on Y) Y kromozomunun kısa kolunda bulunur. Bu nedenle cinsiyetin ortaya çıkmasında SRY proteini önemlidir. SRY geni varlığında erkek yönde gelişim olur (Sadler, 2004).

SRY geni olmadığı zaman yumurtalıklar 2. ve 6. aylar arası overe dönüşür. Fetustaki genital tüberkül varlığında erkek yönde gelişim gösterip penis ve skrotum oluşurken androjen yokluğunda dişi yönde gelişip klitoris, vajen ve labiumlar oluşur (Dansuk, 2011).

2.1.1 Kadın genital sistem organları

Kadın genital organları dış ve iç genital organlar olarak gruplandırılır. Tuba uterina, uterus, vajen ve ovaryum iç genital sistemi oluştururken; klitoris, mons pubis, labium minus, labium majus, bulbus vesstibulu, hymen ve glandula vestibularis majör ise dış genital organları oluşturmaktadır (Arıncı ve Elhan, 2006). Şekil 1'de kadın üreme sistemi anatomisi şematize edilmiştir.



Şekil 1. Kadın Üreme Sistemi Anatomisi (bio RENDER programında çizildi).

2.1.2 Dış genital sistem organları

Kadın dış genital organlarından labium majusun iki tarafta birleşmesiyle oluşan yapıya vajina denir. Vajina ile vajinanın giriş deliği arasında ince zar yapısında olan perde şeklindeki yapıya hymen denir.

Labium majus dudaklarının biraz daha gerisinde vestibulum vagina aralığında her iki yanda labium minus bulunur. Labium minus, birleşme yerlerinde çıkıntılı yapıda klitorisi oluştururlar.

2.1.3 İç genital sistem organları

Kadın iç genital organları, vajina ile başlar. Vajina, spermin depolandığı serviks ve bebeğin büyüyerek geliştiği uterus ile devam eder. Uterus sağ ve sol tarafta bulunan fallop tüpleri ile bağlantılıdır. Fallop tüplerinin uçları saçak şeklinde yapıları vasıtasıyla overler ile temas ederler (Kavak, 2018).

2.1.3.1 Tuba uterina

Uterusun iki yan yüzünden başlayan ve dışa doğru uzanan boru şeklinde iki tane yapıdan oluşur. Tuba uterina her biri yaklaşık 10-15 cm kadar uzunluğunda ve yarım santim kalınlığında kas yapısında anatomik yapılardır (Kavak, 2018).

Tuba uterina döllenmenin gerçekleştiği yerdir. Tuba uterina hormonal uyarılara son derece duyarlıdır. Östrojen etkisi ile hareketleri artış gösterir. Ovulasyon sırasında tuba uterina'nın fimbriya'larındaki kan akımı arttar. Bu bölge giderek kalınlaşır, tuba uterinaların ovaryuma yaklaşmasını sağlar (Gartner ve Hiatt, 2006).

Histolojik olarak tuba uterinalar tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika seroza olmak üzere 3 tabakadan oluşur (Kurnaz, 2019).

2.1.3.2 Uterus

Fetal gelişim sürecinde uterus, yaklaşık olarak 40. günde paramezonefrik kanalların kaudalde birleşmesi sonucunda ortaya çıkan uterovajinal primordiumdan gelişir (Kayalı ,Satıroğlu ve Tasyürekli, 1992).

Döllenmiş yumurtanın yerleşmesinden sonra fetus uterusta gelişir ve gelişim evresinde fetusun ihtiyaçları uterus tarafından sağlanır. Gelişen ve büyüyen zigota yer sağlamak için uterusun hacminde ve duvarlarında büyüme oluşur. Uterusun büyüme anında uterusun duvar yapısı içinde bulunan damar ve sinirler bu büyümeye uyum sağlamış olurlar (Kavak, 2019). Uterus yapısal olarak 3 tabakadan oluşur. İçte bulunan endometriumun fonksiyonel tabakası menstrüel siklus boyunca değişimlere uğrayarak zigot implantasyonu için ortam oluşturur. Gebelik oluşmaz ise hormanlara bağlı olarak menstrüasyon kanaması ile dökülür ve her yeni siklus ile tekrar gelişir. Myometrium endometriumdan sonra gelir ve düz kas lifleri bu tabakadadır. Perimetrium ise uterusu saran peritondur (Tatar, 2023).

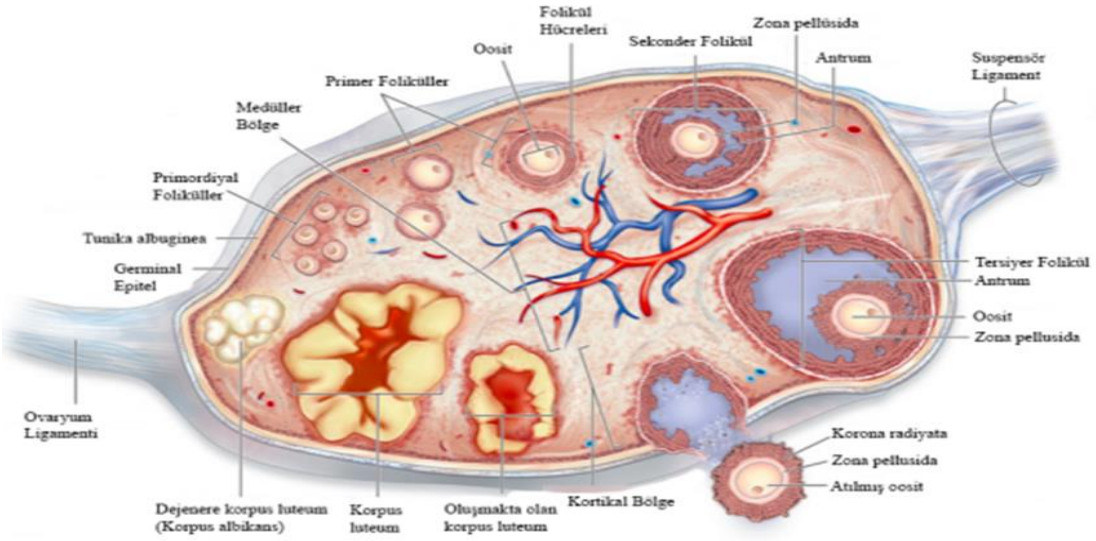
2.1.3.3 Vajina

Vajina, dış genital organlar ile uterus arasında bağlantı kuran yapıdır. Vajina duvarı 3 katmandan oluşur. En içte aglandüler mukoz membran epiteli, orta kısımda muskuler tabaka ve en dışta adventisyal destek dokusundan oluşur (Song, Kim ve Han, 2009).

2.1.3.4 Ovaryum

Overler fetal yaşamın erken döneminde böbreklere yakın olarak lumbal 1-2 seviyesinde olmasına rağmen fetusun gelişimi ile normal yerine gelirler. Overler nulliparlar da küçük pelvisin dış yan duvarındaki fossa overikada yerleşirler (Yıldırım, 2013). Overlerin yüzeyi puberte öncesinde yüzeyi düz bir yapıdadır. Reproduktif dönemde tekrarlayan ovulasyonlar sebebiyle skarlı ve düzensiz bir şekil alır. Postmenapozal kadınlarda ise over boyutu küçülerek dörtte bir büyüklüğe iner (Michael ve Ross, 2011).

Overlerde fetal yaşam boyunca, aktif mitoz sebebiyle oogoniumlarda primordial folikül oluşur fakat doğumdan önce bu foliküllerin büyük bir kısmı dejenere olur. Doğumdan sonra yeni oogonium oluşmaz bu süreçte overlerde iki milyon civarında primer oosit bulunur. Doğumdan sonra overin yüzey epiteli düzleşir ve tek tabakalı hale gelen hücreler over hilumunda periton mezoteli ile devamlılık gösterir. Bu şekilde oluşan overin yüzey epiteline germinal epitel denilmektedir. (Sadler, 2004). Şekil 2'de ovaryum yapısı şematize edilmiştir.



Şekil 2. Ovaryumun yapısı (Mescher, 2018).

*Şekil orijinal halinden türkçeleştirilmiştir.

2.2 Oogenez

Oogenez; dişi primitif germ hücrelerinin (oogonium) olgun oositlere dönüşme sürecidir. Oogenez ovaryum korteksinde gerçekleşir. Oogenetik (folikülogenetik) süreç, embriyonik süreç embriyonik hayatta başlar, pubertede aktifleşir, menopoz ile sona erer (Tunalı, 2019). Yenidoğanın overinde 700.000-2.000.000 civarında primodial folikül bulunmaktadır. Bu sayı pubertede atrezinin devam etmesi nedeni ile 400.000 e kadar düşme gerçekleşir. Puberteyle birlikte hipofizden salgılanan gonodotropinlerin etkisiyle her menstruel siklusda 5-15 folikül gelişmeye başlar. Bu 5-15 folikülden ancak bir veya iki tanesi dominant folikül olmayı başarabilir ve ovulasyon aşamasına gelir. Diğerleri ise atreziye uğrar. Bu şekilde folikül sayısı azalarak tamamen bittiğinde menapoz dönemi başlar. Puberteden menapoz dönemine kadar bir kadında bulunan foliküllerin ancak yüzde biri ovulasyona katılmış olur (Gedikli, Özbek ve Demirci, 2013; Öktem ve Urman, 2011).

2.3 Ovulasyon

Ovulasyon sekonder oositin, graff folikülden karın boşluğuna atıldığı süreçtir. Normal bir kadında ovulasyon, menstruasyonun başlamasından sonra ki yaklaşık 14. günde gerçekleşir. Her döngü başında folikül uyarıcı hormon ile uyarılan yaklaşık 20 adet

primer follikülden sadece bir veya ikisi gelişimini tamamlar ve bu olgun hale gelen bir veya iki adet oosit karın boşluğuna atılır. Atılan bu hücre sekonder oosit olup, sonrasında tuba uterinalara ait fimbriyalar sayesinde buradan alınarak uterusa taşınır. Ovaryum yüzeyinden ayrılması ile birlikte 24 saat canlılık özelliklerini koruyan oosit, fertilizasyona uğramaz ise dejenere olarak kaybolur (Eşrefoğlu, 2016).

Ovulasyon, hormonların etkisi ile gerçekleşen ritmik bir süreçtir ve her siklusta ovulasyon öncesinde ve sonrasında hormonlar etkilidir. Folikül stimüle edici hormon, spermin kolay geçişini sağlayabilmek amacı ile servikal mukusun içeriğini değiştirir. Endometrium proliferatif döneme geçer. Ayrıca ovulasyonun olması için gerekli luteinleştirici hormon piki FSH salgılanması ile gerçekleşir. LH, oositin 1. mayoz bölünmesini sonlandırıp 2. mayoza girmesine ve sonuçta follikülün çatlayarak ovulasyonun gerçekleşmesi sağlanır (Eşrefoğlu, 2016; Ross ve Pawlina, 2018).

2.4 Kanser

Canlıların temel yapı taşı olan hücreler, enzimler, hormonlar ve diğer uyaranlar altında, büyür, bölünür, yaşlanır ve ölürler (Gedikli, 2013). Hücrelerde ortaya çıkan büyüme, gelişme ve ölüm gibi fonksiyonlar biyolojik kontrol altındadır. Bu kontrolden kaçan bazı hücreler anormal şekilde artış göstererek kanser hücresi haline gelmektedirler (Kaplan, 2014). Artış gösteren hücreler kan, lenf ya da vücut boşlukları aracılığı ile primer yerleşim yeri dışındaki lokalizasyonlara sıçrayarak (metastaz) oralarda büyümeye devam ederler ve metastaz sebebi ile morbidite ve mortalite artmaya başlar (Gedikli, 2013).

2.4.1 Over kanseri

Over kanseri, dünya üzerindeki çoğu kadını etkileyen jinekolojik hastalıklarından biridir. 2018 Dünya Sağlık Örgütünün raporuna göre 2040 yılına kadar over kanseri insidansı ve ölüm oranının 150.000 vakaya kadar çıkabileceğini öngörülmektedir (Zhang Qazi ve Raza, 2021).

Dünya çapında kadınlar arasında en yaygın yedinci kanserdir ve gelişmiş tedavi seçeneklerine rağmen, over kanseri olan hastalarda genel sağkalım oranı, yaklaşık %46'dır (Peng, Yu ve Chen, 2020).

Over kanseri, periton sıvısı yoluyla dolaşan tek bir hücre veya birçok hücreden köken alarak metastaz yapma eğilimindedir. Over kanserinin ilerlemesine sebep olan faktörler arasında; yaş, aile öyküsü, fertilizasyon sorunları, obezite, hareketsiz yaşam tarzı, hormon replasman tedavisi, IVF ve endometriozis yer almaktadır. Bu faktörler genel anlamda genetik ve çevresel faktörler olarak iki kategoride toplanmaktadır (Bowen vd., 2009).

Over kanseri her yaştan kadın grubunda ortaya çıkabilir. Etkilenen kadınların yarısından fazlasına ileri evrede teşhis konulabilmektedir. Erken evre hastalık genellikle semptom göstermeyebilir ve geç evre hastalığın semptomları daha belirgin durumdadır. En önemli risk faktörleri arasında; ileri yaş, ailede over ve meme kanseri geçmişi yer almaktadır. Over kanseri ile ilgili semptomları olan kadınlarda, fiziki muayene ve transvajinal ultrasonografi yapılması, kanser antijeni 125 (Ca-125) gibi biyobelirteçlerin ölçümü önemlidir (Doubeni, Doubeni ve Myers, 2016).

2.4.1.1 Over kanseri sınıflandırılması

Overler üç farklı hücre tipinden oluşmaktadır. Bu farklı hücre tiplerinden farklı tümörler gelişebilir. Bunlar;

Epitelyal tümörler: Over tümörlerinin çoğu epitelyal tümördür. Epitelyal tümörler overin dış epital hücrelerinden kaynaklanır.

Germ hücreli tümörler: Ovumu oluşturan hücreler eğer tümör yönünde gelişim gösterirse germ hücreli tümör oluşur.

Stromal tümörler: Overin yapısal dokusunu oluşturan hücrelerden gelişen tümördür. Ayrıca bu doku östrojen ve progesteron hormonları üretir (Amerikan Kanser Birliği Bildirgesi, 2018).

Bu tümörlerin bazıları iyi huyludur ve yumurtalığın ilerisine yayılmazlar. Kötü huylu veya sınırda yumurtalık tümörleri metastaz yapabilir ve ölümcül olabilirler (Amerikan Kanser Birliği Bildirgesi, 2018). Yumurtalığın dış yüzeyindeki hücrelerden gelişen epitelyal over kanserleri daha yaygındır ve tüm yumurtalık kanserlerinin %85-90'ını oluşturmaktadır (Romero ve Bast, 2012).

2.4.1.2 Over kanseri risk faktörleri

Over kanserine neden olabilecek pek çok olasılık bulunmaktadır. Bu olasılıklar arasında; yaş, infertilite tedavisi görmüş olmak, nulliparite, genital bölge için kullanılan hijyenik spreyler veya talk pudrası, pelvik inflamatuar hastalık, gonodotropin hormon düzeyinin düşük olması, ailede over ve meme kanseri öyküsü, beslenme şekli, vücut kitle indeksinin yüksek olması, meme, mesane kolon kanseri tanısı almış olmak, erken menarş, geç menapoz, ileri yaşda çocuk doğurmak, endometriozis öyküsü yer almaktadır. Bunlar arasında en önemli risk faktörü yaştır (Yetimalar ve ark. 2007; Roett ve Ivans 2009; Beji ve Bilgiç 2015).

Over kanseri riskini azaltan faktörler ise geç menarş, erken menapoz, histerektomi operasyonu geçirmek, bir buçuk yılın üzerinde emzirme, oral kontraseptif kullanımı, tüp ligasyonu ve diyettir (Roett ve Ivans 2009).

2.4.1.3 Over kanseri ve infertilite ilişkisi

Sağlıklı bir çiftte 12 aylık düzenli korunmasız cinsel ilişkiye rağmen klinik gebelik elde edilememesi olarak tanımlanır. Üreme sisteminin genetik, endokrin, fizyolojik, anatomik ve immünolojik anormallikleri, bir kadının hamile kalma ve canlı bir çocuk doğurma olasılığını etkilemektedir (Sarwar vd., 2022).

1963 ile 1998 yılları arasında Danimarka'da infertilite kliniklerine sevk edilen infertil 54.362 kadından oluşan geniş bir kohort çalışması sonucunda elde edilen veriler, infertil kadınlar arasında meme ve over kanseri riskinin daha yüksek olduğunu göstermektedir (Jensen, Sharif, Olsen ve Kjaer, 2008).

İnfertilite, over kanseri için risk faktörleri arasındadır (Tomao vd., 2014). İnfertilite tedavisinde kullanılan ilaçlar over kanseri gelişme riskini arttırabilir. Over yüzeyindeki ovulasyon sürecinde oluşan hasar ve oluşan hasarın tamir süreci DNA hasarına yol açabilir. Hipofizden salgılanan gonadotropin seviyesinin normal düzeyden fazla olması over kanseri gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Gonadotropinlerin seviyesini artırarak ovülasyonu destekleyen ilaçların kullanımı da over kanseri gelişme riskini artırabileceği öne sürülmektedir (Asante vd., 2013). Over kanserinin ortaya çıkma riski

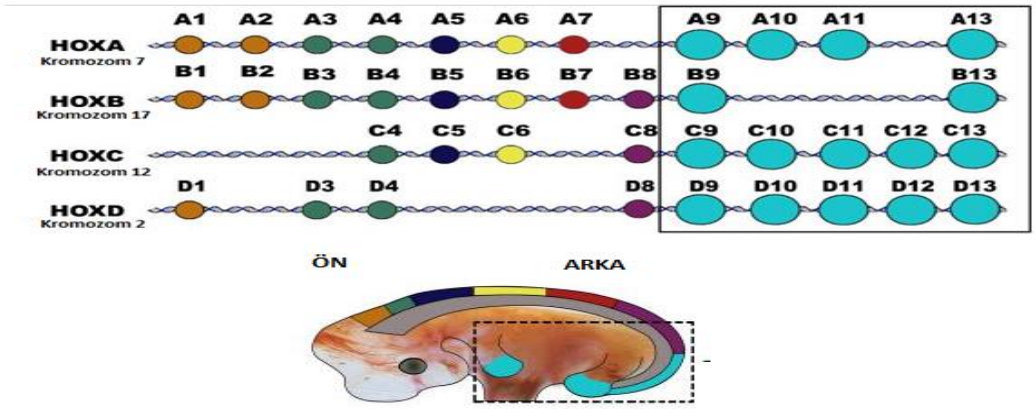
ile infertilite ve menopoz gibi durumlar arasında yüksek korelasyon olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Cui, Miner ve Eldredge, 2011).

2.5 HOX Geni

HOX genleri 1983'te keşfedilen Homeobox gen ailesine ait bir gruptur. Bazı türler arasında yapısal ve işlevsel bakımından benzerlik görülmeleri nedeniyle, türler arasında korunmuş genler olarak bilinmektedir. İlk kez Drosophila'da keşfedilmiş olan HOX genleri, farklı kromozomlar üzerinde yer almaktadırlar (Sanes, Reh ve Harris, 2006). HOX genleri, embriyonik gelişimde, özellikle arka beyin seviyesinden omurganın sonuna kadar, önden arkaya eksenin modellenmesinde anahtar rol oynayan bir transkripsiyon faktörleri ailesini oluşturur. Hedef genleri transkripsiyonel olarak aktive etmek veya baskılamak için HOX proteinlerinin DNA'nın belirli bölgelerine bağlanmasını sağlayan 61 amino asitlik bir motiften oluşur (McGinnis ve Krumlauf, 1992).

Memelilerde 39 HOX geni tanımlanmış olup, 4 farklı kromozom üzerinde yer alan 4 paralog küme (A, B, C ve D) halinde sıralanmıştır (Garcia-Fernàndez, 2005 ; Zanatta vd., 2010). Her HOX kümesinin 1-4 arası geni, beyin bölgesinin gelişiminde, 4-13 arasındakiler omurilik gelişiminde etki gösterirler (Sanes vd., 2006). Yetişkin dokusunda HOX genleri, homeostaz, hücre farklılaşması ve organ işlevinin sürdürülmesi gibi pek çok biyolojik yolaklarda yer almıştır (Veraksa, Del Campo, ve McGinnis 2000).

HOX gen kümeleri, içerdikleri genler ve eksprese oldukları bölgeler aşağıdaki şekilde görülmektedir.



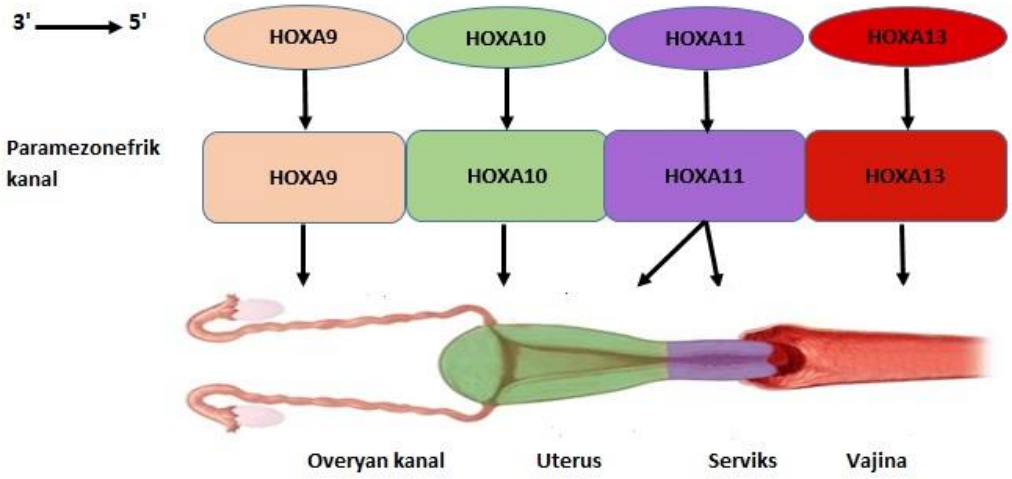
Şekil 3. Paralog Homebox Genleri (Zanatta vd., 2010)

Her küme, 13 paralog grupta hizalanan 9-11 gen içermektedir. Homeobox dizisi benzerliğine ve bir küme içindeki konuma bağlıdır. Embriyonik gelişimde, her bir HOX geni, bir HOX kümesi içindeki HOX geninin pozisyonunun, anteriordan posteriora eksen boyunca ifade sırasına karşılık gelen bir modelde ifade edilir (Abate-Schen, 2002).

2.6 HOX Geni ve Over Kanseri İlişkisi

HOX gen ifadesindeki değişiklikler, farklı kanser türlerinde etki göstererek kanserin başlaması ve ilerlemesinde rol alır. Hücre farklılaşması, hayatta kalma, proliferasyon, anjiyogenez, otofaji, inflamasyon ve apoptozise müdahale edebilirler. Ayrıca hücre hareketini, göçünü, invazyonunu, etkiler. HOX genleri bu süreçleri aktive edebilir veya inhibe edebilir farklı dokularda antagonistik davranışlar sergileyebilir (Paço, Aparecida de Bessa Garcia, Leitão Castro, Costa-Pinto ve Freitas, 2009)

Dişi üreme sisteminin gelişimi sırasında dört HOX geni, HOXA9, HOXA10, HOXA11 ve HOXA13, müller kanalı boyunca uniform olarak eksprese edilir. HOXA9 fallop tüplerinde, HOXA10 gelişmekte olan uterusta, HOXA11 alt uterin segmentte ve servikste, HOXA13 vajinanın üst kısmında eksprese edilir (Taylor, Vanden Heuvel ve Igarashi, 1997). Bu genlerin ifadelerindeki artışın, anormal epitelyal farklılaşmaya neden olduklarından, epitelyal over neoplazisinde erken bir adım olduğu düşünülmektedir (Kelly, Michael, Butler-Manuel, Pveha ve Morgan, 2011).

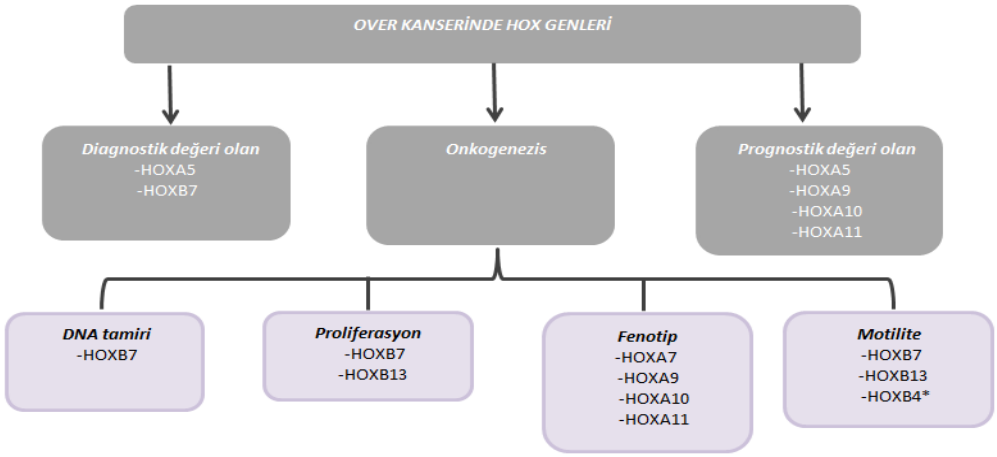


Şekil 4. Müller Sisteminin HOX Genleri (Zanatta vd., 2010)

Over kanseri ve HOX genleri arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma; müllerian kanal farklılaşmasını düzenleyen HOX genlerinin normal over yüzey epitelinde eksprese olmadığını; ancak epitelyal over kanserlerinde eksprese olduğunu immünohistokimyasal yöntemlerle ortaya koymuştur. Bu çalışmada; seröz papiller, endometriod ve müsinöz tümörlerde sırasıyla HOXA9, HOXA10 ve HOXA11'in aşırı ifadeleri gösterilerek epitelyal over kanseri histolojik tipleri ile HOX geni ilişkisi gösterilmiştir (Cheng, Liu, Yoshida, Rosen ve Naora, 2005). Başka bir HOX geni olan HOXA7'nin, müllerian benzeri özellikler gösteren over kanserinde hem RNA seviyesinde hem de protein seviyesinde anormal şekilde eksprese edildiği bildirilmiştir ancak undiferansiye over karsinomlarında ve normal over yüzey epitelinde HOXA7'nin ifadesi gösterilememiştir. Bu sonuçlar HOXA7'nin over epitelyal kanserlerinde over yüzey epitelinin farklılaşmasında bir rol oynadığını düşündürmektedir (Naora, Montz, Chai, ve Roden 2001). Bununla birlikte başka bir çalışma undiferansiye over kanserleri de dahil olmak üzere tüm over karsinomlarında aşırı HOXA7 ifadesi bulmuştur (Ota, Gilks, Longacre, Leung ve Auersperg, 2007). Kısaca HOXA7'nin müllerian farklılaşma ile ilişkili olduğu, ancak bu konuda ortaya konulan bilgilerin yeterli olmadığı söylenebilir.

Over kanserinde HOX genleri ile yapılan çalışmalara yer verilen bir derlemede, HOX genlerin, over kanserinin onkogenezi, apoptozun inhibisyonunda, DNA onarımında ve hücre hareketliliğinin artmasında işlev gördüğü belirlenmiştir. Bu gen ailesinden

HOXB7, HOXB13 proliferasyonda, prognozunda ise HOXA5, HOXA9, HOXA10 gibi HOXA ve HOXB genlere ait alt grupların yer aldığı gösterilmiştir (Kelly vd., 2011). Over kanserinde HOX genlerinin rolü şematik olarak aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 5. Over kanserinde HOX genlerinin rolü şematik olarak gösterilmiştir. (Kelly vd.,2011).

Not: *:Down-regüle edilen geni göstermektedir.

2.7 HOXA10 Geni

Homeobox A10 (HOXA10), embriyonik gelişim için etkin bir role sahip HOX gen ailesine aittir (Song ve Zhou, 2021). Hedef promotörlerdeki ve gen transkripsiyonunu düzenleyen, DNA öğelerini tanıyabilen, organ gelişimi sırasında ön-arka eksen konumlandırma ve doku farklılaşmasının ana düzenleyicilerinden biridir (Mark, Rijli ve Chambon, 1997).

HOX genleri endometriyal gelişimin temel düzenleyicileridir. HOXA10 ifadesi, endometriyal alıcılık için gereklidir (Du ve Taylor, 2015). HOXA10, embriyogenez sırasında uterusun gelişimi ve modellenmesi için çok önemli olan bir transkripsiyon faktörüdür. Erişkin endometriyumunda HOXA10 adet döngüsüne bağlı bir şekilde eksprese edilir ve yumurtalık steroid hormonları ve embriyonik sinyaller tarafından düzenlenir. HOXA10 uterus alıcılığı ve implantasyonu için gereklidir ve karar vermenin ana düzenleyicisidir (Modi ve Godbole, 2009).

Endometriozis, endometriyal bezlerin ve stromanın uterus dışında bulunması ile tanımlanan yaygın bir jinekolojik hastalıktır. Genetik arka plan, çevresel faktörler, immün ve endokrin fonksiyonlardaki değişikliklerin endometriozisin oluşumunda ve sürdürülmesinde önemli bileşenlerdir. Endometriozis sıklıkla kadınlarda pelvik ağrı, enfeksiyon ve infertiliteye neden olabilir. Üreme çağındaki kadınların yaklaşık %10'unu etkiler ve endometriozisli hastaların %30 ila 50'si infertildir (Szczepańska, Wirstlein, Luczak, Jagodziński ve Skrzypczak, 2010).

Endometriozis ile ilişkili infertil olan kadınlarda ötopik orta salgılayıcı endometriyumda HOXA10 gen ifadesinde bir azalma bulunmuştur. HOXA10'un promoter hipermetilasyonunun, endometriozisli hastalarda epigenetik gen regülasyonu için önde gelen mekanizma olduğu düşünülmektedir (Fambrini, Sorbi, Bussani, Cioni, Sisti ve Veersson, 2013).
Araştırmalar HOXA10 genindeki mutasyonların veya bozulmaların dişi üreme sisteminde anormalliklere yol açabileceğini ve potansiyel olarak doğurganlık sorunlarına veya diğer üreme komplikasyonlarına yol açabileceğini göstermiştir.

2.8 HOX B7 Geni

Bu gen, homeobox ailesinin bir üyesidir ve homeobox DNA bağlama alanına sahip bir proteini kodlar. 17. kromozom üzerinde bulunan bir homeobox B genleri kümesine dahildir. Kodlanmış nükleer protein, hücre çoğalması ve farklılaşmasında yer alan diziye özgü bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. Bu genin artan ifadesi, bazı melanom ve over kanseri vakalarıyla ilişkilidir (Zhou vd., 2020).

HOXB7, normal over epiteli ile karşılaştırıldığında over kanseri hücre dizilerinde belirgin bir şekilde daha yüksek ifade gösteren ve over epitel hücrelerinde büyümeyi destekleyen HOX genlerinden biridir, ancak aynı zamanda DNA çift sarmal kırılma onarımında yeni bir rol oynar.

Yapılan bir çalışmada; HOXB7 geni 39 over kanseri hastasının 13'ünde ve 1 sağlıklı kadında HOXB7'ye karşı önemli serolojik reaktiviteye rastlanılmış, bu durumun anti-HOXB7 antikorlarının saptanmasının olası bir tanı aracı olarak işlev görebileceği sonucu ile ilişkilendirilmiştir (Kelly vd., 2011).

Normal overlere kıyasla over kanseri hücre hatlarında ve kanser dokusu örneklerinde belirgin şekilde HOXB7 geninin daha yüksek ifade gösterdiği saptanmıştır (Rubin vd., 2007). HOXB7'nin çeşitli kanser türlerinde düzensiz olduğu ve kanserin ilerlemesi ile ilişkili olduğu genel olarak kabul edilmektedir (Ericco, Jin, Skumar ve Carè, 2016).

2.9 Kollajen

Kollajen moleküllerinin ana görevi omurgalılara yapısal ve işlevsel özellikler sağlamaktır (Ferraro vd., 2017). Kollajen, kıkırdak, deri, kemik ve tendon gibi farklı bağ dokularında bulunan bir proteindir. Doku ve organlarda etkili işleve sahip olan kollajen, ağsı veya lifsi yapı göstermektedir (Yang ve Shu, 2014).

Kollajen, hayvan bağ dokusunun ekstraselluler matriksinin birincil bileşenidir. Omurgalılarda ve daha yüksek omurgasızlarda yaklaşık 28 farklı kollajen tipi tanımlanmıştır. Bu kollajen tipleri arasında tip 1, omurgalılarda en bol bulunanıdır. Vücuttaki kollajenlerin büyük çoğunluğu tip 1 , tip 2 ve tip 3 grubuna aittir.

Diğer kollajen tipleri eser miktarlarda, özellikle kalp kası, akciğer gibi hayati organlarda bulunur (Schmidt vd., 2016).

Tip 1 kollajen insan vücudunda fazla miktarda bulunan ve dayanıklılığı yüksek olan kollajen tipidir. Deride, bağ dokusunda, kemik ve tendonlarda bulunur (Krishnamoorthi, Ramasamy, Shanmugam, ve Shanmugam, 2017).

Tip 2 kollajen, kıkırdak dokusunun başlıca kollajenidir. Kıkırdaktaki toplam protein içeriğinin %90-95'ini oluşturan tip 2 kollajen, osteoartrit, romatoid artrit gibi eklem hastalıklarının tedavisinde etkin olarak yer almaktadır (Jeevithan, Zhang, Hong ve Wu, 2015).

Tip 3 kollajen de ağ yapılı liflerden oluşmakta ve ECM'nin temel bileşeni olarak bulunmaktadır. Tip 1 kollajen ile birlikte bulunmakta ve cildin elastikiyetini sağlamakla görevlidir (Liu, Lin ve Chen, 2001).

Kollajen birikimindeki düzensizlik veya bozulma, over kanseri ilerlemesinde rol alır. Normal yumurtalık dokusu, epitel sınırına paralel ince,uzun dalgalı fibriller ile karakterize spesifik bir kollajen iken, kanser ilerlemesi sırasında kollajen kalın ve kısa

fibrillerden oluşan bir ağ oluşturarak kanser hücresi göçünü kolaylaştırır (Adur vd., 2014; Cho vd., 2015).

2.9.1 Tip 1 kollajen

Tip 1 kollajen, omurgalılarda ECM de yaygındır. Kollajen bağ dokularına yapısal destek ve bütünlük kazandırır (Tang, Li, Gvehi, Burrage ve Gu, 2017). Hücre iskelet yüzey etkileşimi, hücre bağlanması, çoğalması ve doku yenilenmesinde ana rol oynar (Naomi, Ridzuan ve Bahari, 2021).

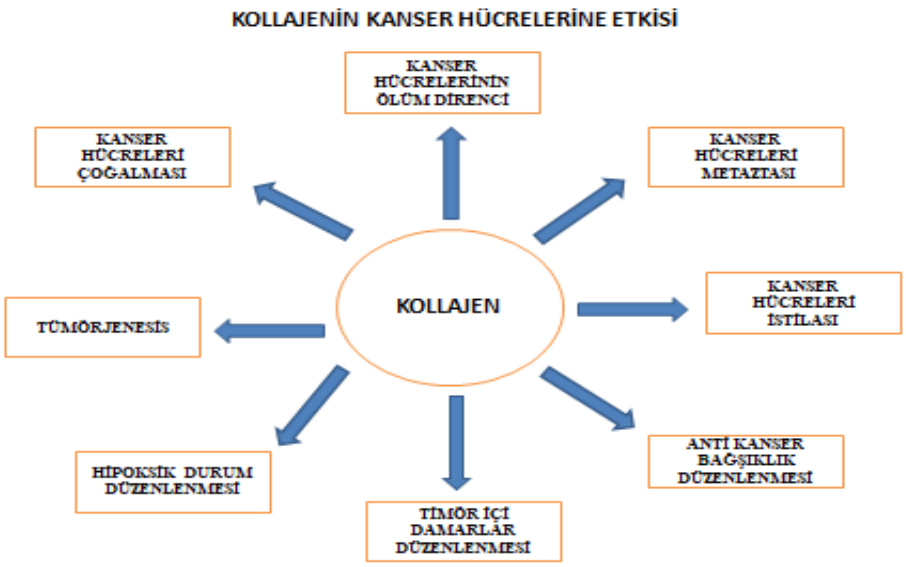
Homotrimerik izoform kollajenazlar tarafından bölünmeye karşı daha dirençlidir, bu da onun tümörlerde ve fibrotik lezyonlarda birikmesini ve fonksiyonel rolünü açıklayabilir. Tip 1 kollajen, bir N-terminal propeptit, merkezi kollajen alanı ve C-terminal propeptitten oluşan bir prokollajen öncüsü olarak sentezlenir. Prokollajen zincirleri, pürüzlü endoplazmik retikulumun (ER) lümenine kotranslasyonel olarak yer değiştirir (Makareeva ve Leikin, 2014).

Tip 1 kollajenin yapı taşı, birbirinin etrafına sarılmış üç paralel polipeptit zincirinden oluşan 300 nm uzunluğundaki üçlü sarmaldır. Bu üçlü sarmallar birleşerek fibriller oluşturur (Varma, Orgel ve Schieber, 2016). Tip 1 kollajen; filmler, süngerler, membranlar, nanolifler, levhalar, boncuklar, ağlar, hidrojel, jel, mikroküreler ve kompozit yapı iskelesi gibi farklı 3B tasarım formlarında üretilebilir. Tip 1 kollajen yüksek oranda biyouyumludur ve düşük immünojenisite sergiler. Ticari olarak veya hayvanlar, insanlar, böcekler, bakteriler ve bitkiler gibi çeşitli kaynaklardan ekstrakte edilerek yaygın olarak bulunur. Bu nedenle tip 1 kollajen, çok çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna doku mühendisliği, tıbbi cihazlar, ilaç endüstrisi ve biyomedikal alanı dahildir (Naomi vd., 2021).

2.9.2 Kollajenin kanserdeki rolü

En çok bulunan matriks protein polimerleri, tümör dokusu sertliğini artıran, tümör bağışıklığını düzenleyen ve metastaz teşvik eden kollajenlerdir. Ek olarak, yoğun kollajen birikimi yeterli terapötik uygulamaların eksik olduğu bazı kanserlerin ana patolojik özelliği, hastaların hayatta kalma sonuçlarının kötü olmasına neden olur. ECM'nin bir bileşeni olan kollajen, kanser hücresi davranışını etkilemektedir. Kollajen

ve kanser hücreleri arasındaki adezyon, kanserin ilerlemesini etkiler, aynı zamanda kanser hücreleri, kollajeni ters yönde yeniden şekillendirerek güçlendirici bir hücre-kollajen döngüsü oluşturur ve bu da kanserin yavaş yavaş ilerlemesini destekler (Xu, Xu, Wang, Li, Li ve Li 2019). Kollajenin kanser hücrelerine etkisi aşağıda şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 6. Kollajenin kanser hücrelerine etkisi şematik olarak gösterilmiştir (Xu vd., 2019). Türkçeleştirilmiştir.

3. YÖNTEM

3.1 Araştırma Modeli

Çalışmamızda ilk kez 1973'te ovaryum tümörü olan 64 yaşındaki bir kadının asit sıvısından elde edilen epiteyal ovaryum adenokarsinomu olan SKOV-3 hücre hattı kullanıldı. SKOV-3 hücre hattı Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmokoloji Anabilim Dalı, Doç Dr. Rukiye Nalan TİFTİK' den temin edildi. İn-vitro çalışmalar Maltepe Üniversitesi Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezinde yürütüldü.

Çalışmamız in-vitro deneysel model olarak gerçekleştirilmiş olup, hücre kültüründe kullanacağımız over kanseri hücrelerin (SKOV-3), CCK-8 testi (proliferasyon analizi) ve HOX genlerin eskpresyonları (RT-real time PCR) araştırılmıştır.

3.2 Evren ve Örneklem

Bu deneyin evreni over kanseri tanısı almış hastadan elde edilen hücre hattının tip 1 kollajen ile kültüre edilerek over kanseri hücrelerinin proliferasyon ve HOX genlerinin ifadesi üzerinde tip 1 kollajenin etkisini incelemektir.

Örneklem ise SKOV-3 isimli over kanser hücre hattının in-vitro ortamda büyütülerek tip 1 kollajen üzerinde kültüre etmektir. CCK-8 ile SKOV-3 over kanseri hücre hattının proliferasyonuna ve RT-PCR ile HOXB7 ve HOXA10 gen ifadesi üzerinde tip 1 kollajenin etkisini incelemektir.

3.3 Veriler ve Toplanması

Maltepe Üniversitesi Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezinde bulunan hücre kültürü laboratuvarında, temin edilen SKOV-3 over kanser hücre hattı kontrol ve deney grupları şeklinde uygun koşullar altında kültüre edildikten sonra; CCK-8 proliferasyon testi ve RT-real time polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testine alınarak elde edilen veriler ile tip 1 kollajenin kontrol grubundaki hücrelere göre etkisi karşılaştırıldı. CCK-8 deneyi ile tip 1 kollajenin proliferatif etkisi, RT-real Time PCR deneyi ile HOX genlerinin ifadesi üzerindeki etkisi hakkında veriler elde edildi.

3.4 Verilerin Çözümlenmesi ve Yorumlanması

SKOV-3 hücrelerin, kültüre edildiği klasik ve kollajenli ortamlarda gösterdikleri proliferasyon oranları ve HOX genlerinin ifadeleri arasında istatistiksel ilişki olup olmadığı GraphPad Prism 8.0.2 paket programları kullanılarak analiz edildi. Kontrol grubu ve deney grupları arasındaki proliferasyon oranı Anova çift yönlü varyans analizi ile çalıştırılmış olup Sidak's çoklu karşılaştırılmalı test ile gösterilmiştir. Deney grubunda HOXA10 ve HOXB7 gen ifadelerinin kontrol grubuna göre karşılaştırılması Student's t-test ile gösterilmiştir.

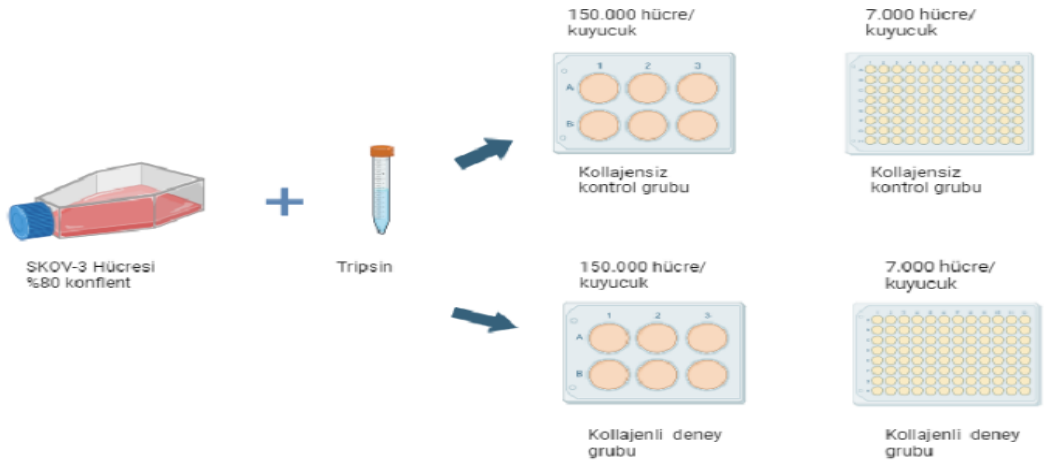
Sonuçlar, ortalama (mean) ± standart sapma (SD) ve üç bağımsız deney olarak değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık $p<0.05$ olarak kabul edildi.

3.5 SKOV-3 Hücre Kültürünün Başlatılması

SKOV-3 hücre hattı %10 Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum, FBS) ve %1 penisilin-streptomisin antibiyotik eklenmiş RPMI-1640 besiyerinde, 37°C'de ve %5 CO_2 koşulları sunan inkübatörde 25 cm^2'lik flasklarda büyütüldü ve deney grupları oluşturmak üzere takibi yapıldı.

3.6 Deney Grupları Oluşturulması

Flask yüzeyi yaklaşık olarak %80 oranında hücreler tarafından kapladığı zaman hücreler yüzeyden tripsin enzimi kullanılarak kaldırıldı. Hücreler kontrol ve deney grubu (kollajenli ortam) olacak şekilde farklı kültür kaplarına pasajlandı. Kontrol grubu olan SKOV-3 hücreler; 6 ve 96'lı kuyucuklu plakalara kuyucuk başına sırası ile 150.000 ve 7.000 hücre olacak şekilde pasajlandı. Deney grubu SKOV-3 hücreler ise aşağıda hazırlanışı belirtilen tip 1 kollajen ile muamele edilmiş 6 ve 96 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına sırası ile 150.000 ve 7.0000 hücre olacak şekilde pasajlandı.



Şekil 7. Deney Gruplarının Oluşturulmasının Şematik görüntüsü (BiorRender programı ile çizilmiştir)

3.7 Tip 1 Kollajen Hazirlanmasi

Ticari olarak temin edilen tip 1 kollajen 11 kat dilue olacak şekilde steril distile su ile hazırlandı. Süspanse tip 1 kollajen deneyde kullanılacak 6 ve 96'lı kuyucuklu plakalara yüzeyi kaplayacak şekilde konuldu. En az 4 saat 37 ºC ve %5 CO_2'li steril inkübatörde bekletildi. Hücreler pasajlanmadan önce kültür kaplarındaki kollajen çekildi, kuyucuklar steril phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı.

3.8 Hücrelerin Mikroskobik Olarak Görüntülenmesi

SKOV-3 hücreleri kültür süresi boyunca inverted mikroskop altında incelenerek farklı büyütmeli objektiflerde görüntüleri fotoğraflandı.

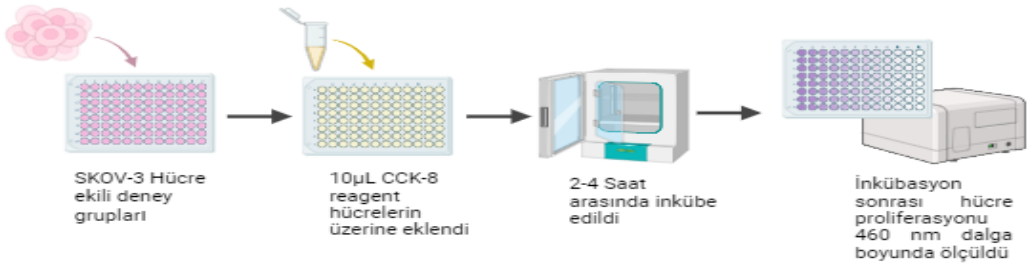
3.9 SKOV-3 Hücrelerinin Proliferasyon (CCK-8) Testi

Çalışmada kullanılan CCK-8 kiti çalışma esası, suda çözünen tetrazolium tuzu WST-8 kullanılarak, indirgeme ile suda çözünür turuncu bir formazan boyasına dönüştürülme mekanizmasına dayanmaktadır. CCK-8 düşük toksisitedir ve hücre proliferasyonu ve sitotoksisite deneylerindeki canlı hücre sayısının belirlenmesi için hassas kolorimetrik ölçümler gerçekleşir. Hücrelerde dehidrojenazların ürettiği formazan boya miktarı, canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır (Çınar, Küçüksezer ve Deniz, 2014).

SKOV-3 hücrelerinin proliferasyon ölçümü CCK-8 kiti kullanılarak yapıldı. Deney düzeneğine göre 96'lık kuyucuklu plaka çoklu tekrarı olacak şekilde her kuyucuğa 100 µL süspanse edilmiş kollajen konuldu. Tip 1 kollajen eklenmeyen kuyucuklar ise kontrol grubu olarak kullanıldı. Daha sonra her bir kuyucukta 7.000 hücre olacak şekilde deney düzeneği başlatıldı.

Hücreler 24, 48 ve 72. saatlerde ölçüm alabilmek için 3 ayrı 96'lı kuyucuklu plakalara pasajlandı. 24 saat sonra bir 96'lı kuyucuklu plakadan medium uzaklaştırıldı. 37 ºC sıcaklığa getirilmiş taze kompleks medium her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde pipetlendi. Daha sonra her bir kuyucuğa 10 µL CCK-8 proliferasyon kit solüsyonundan pipetaj yapılarak ilave edildi. Plaka inkübe edilmek üzere inkübatöre kaldırıldı.

Üç saatlik inkübasyon sonunda plaka absorbans ölçümü alınmak üzere mikroplate reader cihazında (Biotek synergy H1) 460 nm dalga boyunda okutuldu. 48 ve 72. saatlerde diğer plakalara kit prosedürüne göre aynı işlemler uygulandı. Proliferasyon oranları her saat diliminde deney grupları arası karşılaştırmalı olarak istatistiksel olarak analiz edildi. Hücre proliferasyon test prosedürü şekil 8'de şematize edilmiştir.



Şekil 8. Hücre Proliferasyon Test Prosedürü (BioRender programı ile çizilmiştir).

3.10 RNA İzolasyonu

HOX gen ifadelerinin analizi öncesi SKOV-3 hücrelerinin RNA'ları elde edildi. Hücre RNA örnekleri ticari kit prosedürüne göre aşağıda belirtilen sıralama ile izole edildi. Öncelikle 6'lı kuyucuklu plaka pasajlanmış SKOV-3 hücreleri tripsin ile kaldırıldı. Hücreler tripsinden uzaklaştırıldıktan sonra 2 defa PBS ile yıkanarak 4 dakika santrifüj edildi. Hücre peletin üzerinden PBS uzaklaştırıldı sonra hücre peletine RNA izolasyon kit prosedürüne göre devam edildi.

Peletlerin üzerine 400 µL liziz solüsyonu eklendi. 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Yukarı ve aşağı pipetleme yapılarak hücre peleti tamamen yeniden süspanse edildi. Örnekler 3 dakika daha oda sıcaklığında inkübe edildi. Boş alıcı tüpe bir spin filtresi D yerleştirildi. Tüpte yer alan hücre süspansiyonu spin filtre D'ye aktarıldı.11000 rpm de 2 dakika santfijüj yapıldı. Spin filtre D atıldı.

Daha sonra yeni bir boş alıcı tüpüne spin filtre R yerleştirildi. Yukarıda belirtilen liziz solüsyonuna eşit hacim kadar (400 µL) %70 etanol eklendi. Süspansiyonu birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırıldı. Yeni bir alıcı tüpün üstüne yerleştirilen spin filtre R ye tüm hacim aktarıldı. 11.000 rpm de 2 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası spin filter R yeni bir alıcı tüp üzerine konuldu ve 500 µL yıkama solüsyonu HS eklendi kapak kapatıldı ve 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası spin filter R yeni bir alıcı tüp üzerine konuldu ve 700 µL yıkama solüsyonu LS eklendi kapak kapatıldı ve 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası tüpte toplanan sıvı atılıp hiç bir şey ilave etmeden 1 dakika daha santrifüj yapıldı. Daha sonra spin filtre R etiketlemesi yapılmış elüsyon tüpüne yerleştirildi. Spin filtre R'nin kapağı dikkatlice açıldı ve 50 µL RNaz içermeyen su eklendi. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 11.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası elde edilen RNA örneklerin saflık ve konsatrasyon ölçümü biotek synergy H1 cihazında take 3 nükleik asit plakasında okutuldu. Örnekler alikodlanarak cDNA sentezi için -80 ^{o}C'de muhafaza edildi.

3.11 Elde edilen RNA'nın Düzey ve Kalitesinin Tayini

SKOV-3 hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyonu BioTek Synergy H1 biotek marka cihazda çalışılmıştır. Ticari kit ile izolasyonu yapılan kontrol ve deney grubu SKOV-3 hücrelerin RNA örnekleri take 3 plakada ölçümü yapıldı. Take 3 plaka ölçüm öncesi distile su ile silindi ve kurulandı. Bir kuyucuğa körleme yapılmak üzere RNaz içermeyen sudan 2 µL konularak cihazda okutuldu. Blank değeri uygun referans arasında alındıktan sonra RNA örnekleri pipetlenerek ölçüm yapıldı. 260/280nm dalga boylarında elde edilen ölçüm sonuçları uygun olan RNA örnekleri komplementer DNA (cDNA) sentez işlemine kadar -80 ºC dondurucuda muhafaza edildi.

3.12 cDNA Sentezi

SKOV-3 hücrelerinden iki farklı deney grubundan izole edilen RNA örneklerinden kit prosedüründe belirtildiği gibi cDNA sentezi gerçekleştirildi. Buna göre öncelikle kit içerisindeki komponentler oda ısında çözdürülüp santrifüj edildi. Steril nüklease free PCR tüpleri etiketleme yapılarak buz üzerine alındı. cDNA sentezinde standart konsantrasyonda RNA örneği kullanılması gerektiğinden, 2,5µg konsantrasyon olacak şekilde hesaplanarak RNA örnekleri belirlenen hacimlerde alınarak tüplere pipetlendi. Sonra kit içerisinde yer alan oligo (dT) primer, belirtilen miktarda pipetlendi. Total hacim 12 µL olacak şekilde nüklease free su ile tamamlandı. Tüpler 65 ºC de 5 dakika termal cycle da inkübe edildikten sonra buz üzerine alındı. Daha sonra her bir örnek tüpüne total hacim 20 µL 'ye tamamlanacak şekilde kit içeriğinde yer alan kompanentler belirtilen hacimlerde pipetlendi. Tüpler çok yavaş hızda santrifüj edildikten sonra 42 ºC 1 saat 70 ºC 5 dakika olmak üzere termal cycle da inkübe edildi. cDNA sentezi gerçekleşen örnekler -80 ºC de RT-Real Time PCR çalışması için muhafaza edildi.

3.13. Ters Transkriptaz Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-real time PCR)

Genetik kodun yer aldığı DNA'nın belirli gen bölgelerini milyonlarca kopya ile çoğaltılması PCR tekniği ile mümkün olmaktadır. Çift sarmal yapıdaki kaynak

DNA'nın açılarak hedeflenen gen bölgenin ulaşılır hale gelmesi bu yöntem ile mümkün olmaktadır. Üç temel basamaktan meydana gelen bu teknikte denatürasyon ilk aşamadır. Bu basamakta, yüksek ısı (90- 97°C) ile çift sarmal yapının açılması sağlalanır, sıcaklık ikinci basamakta (annealing) düşürülerek (50- 60°C), reaksiyon ortamına eklenen primerler ile tek zincir üzerinden ilgili bazlar ile eşleşme yapılır ve son basamak olan extension adımında ise sıcaklık yükseltilerek (72 °C), ortamda bulunan ısıya dayanıklı polimeraz enzim ile primerlerin bağlandığı hedef zincir uzatılarak, başlanğıçta tek olan çift zincirli hedef gen bölgesi iki katına çıkartılmış olur. Bu ard arda meydana gelen üç basamak bir göngü olarak kabul edilir. PCR döngü sayısı arttıkça, istenilen gen bölgesi üssü sayıda artış göstererek çoğaltılmış olmaktadır. Reaksiyon ortamına eklenmiş florsans boyalar, artan kopya sayısını, eş zamanlı PCR cihazında moniterize edilerek tespit edilebilir hale getirmektedir (Livak ve Schmmitgen, 2001).

Çalışmamızda HOXB7 ve HOXA10 genlerinin SKOV-3 hücrelerinde farklı ortamlardaki ifadelerinin araştırılması için elde edilen cDNA'lar ile RT-qPCR aşağıda belirtilen protokole göre çalışıldı. Çalışmada kullanılan HOXB7 ve HOXA10 primerlerin dizaynı BLAST analizi ile http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/ yazılımı üzerinden doğrulanarak ticari olarak sentezlendi. Roche 96 Light cycler gerçek zamanlı PCR cihazında RT-qPCR çalıştırıldı. Çalışmada beta-aktin housekeeping gen olarak kullanıldı. Her iki deney grubuna ait cDNA örnekleri housekeeping gen primerleri ile belirlenen reaksiyon hacim ve PCR şartlarında HOXB7 ve HOXA10 primerler ile eş zamanlı çalışıldı. Kontrol grubuna göre, tip 1 kollajen bulunan ortamdaki SKOV-3 hücrelerin eşik değer döngü (cycle treshold-Ct) değeri göreceli olarak deltadelta Ct ($\Delta\Delta$Ct) formülüne yerleştirilerek HOXB7 ve HOXA10 genlerindeki artan veya azalan değişimleri tespit edildi. (Stahllberg vd.2005; Livak ve Schmittgen, 2001). Ayrıca RT-qPCR çalışma protokolüne göre eş zamanlı olarak PCR'da kullanılan housekeeping beta-aktin genine ait Ct değerleri ile normalize edilerek, gen ifadesindeki değişimlerin deney düzeneğine bağlı olarak değişimleri standardize edildi (Stahlberg, Zoric, Aman ve Kubista., 2005).

HOXA10 geni için kullanılan primer dizileri;

Forward primer: 5'-TTTCAAAGTTGCTGAGGGGC-3'

Reverse primer: 5'- AGAAGGGCATCATTGGTCCA-3'

HOXB7 geni için kullanılan primer dizileri;

Forward primer: 5'- AGCCTTTAAGAGCCAGCAGA-3'

Reverse primer: 5'- GGCCACCTCCCTCTTATACC-3'

Tablo 1. RT-qPCR Reaksiyon Protokolü

Tek örnek için	MİKTAR
RealQ Plus Master Mix	12,5µL
Primerler (Forward/Reverse) (10µM)	0,5/0,25*µL
Tamplete cDNA	1µL
PCR-grade su	x µL
Toplam	25µL

*HOXA10 primerleri 10µM konsantrasyonda 0,25µL hacimde optimize edilmiştir.

Tablo 2. RT-qPCR Şartları

PCR basamağı	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
Predenatürasyon	95 °C	15dak.	1
Denatürasyon	95 °C	30sn	40
Annealing	55 °C*	30sn	40
Extansion	72 °C	30sn	40
Melting programı	95 °C	10sn	1
Melting programı	65 °C	60sn	1
Melting programı	97 °C	1sn	1

*****Annealig sıcaklığı primerlerin erime sıcaklığına göre 55°C olarak opitimize edilmiştir.

3.14 Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Çalışmada kullanılan sarf malzemeler tablo 3 de gösterildiği gibidir.

Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

KİMYASAL	**ÜRETİCİ FİRMA**	**KULLANIM AMACI**
PBSTABLETS (Fosfat Buffer Saline)	Bioshop	Hücre kültüründe tampon çözelti olarak kullanılır.
RPIM 1640 with L-Glutamine	Capricorn (CP23-6152)	Hücre kültüründe besiyeri olarak kullanılır.
FBS(Fetal Bovine Serum)	Thermo Fisher	Hücre kültürü besiyeri içerisinde yer almaktadır. %10 oranında bulunmaktadır.
Collagen 1, hıgh concentration, rat tail,100 mg	Corning	Hücre kültürü ortamının kontrolü için deney grubunda kullanılmaktadır.
Trypsın 0.25 % edta 100 ml	Thermo fisher	Hücre kültüründe hücreleri kültür ortamından uzaklaştırmak amaçlı enzimdir
Trypan blue stain	Gibco	Hücre pasajlanması sırasında hücre sayımında kullanılmaktadır.
Cell countıng kıt 8 (cck-8)	Abcam	Hücre proliferasyon analizi için kullanıldı.
İnnuprep rna mini kit 2.0	Innuscreen gmbh	RNA izolasyonu için kullanılmaktadır.
c-DNA sentez kiti (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit)	Thermo scientific	Elde edilen RNA'nın tamamlayıcı DNA iplikçiğini sentezlemek için kullanılır.

PCR master mix (RealQ Plus 2x Master Mix Green Without ROX)	Ampliqon	Gen ifadesi analizi için kullanılmaktadır.
Primerler (HOXA10 forward/ reverse, HOXB7 forward/ reverse)	BM Laboratuvar Sistemleri	Genlerin PCR analizinde çoğaltılması için kullanılmaktadır.

3.15 Çalışmada kullanılan cihaz ve kullanım amaçları

Çalışmada kullanılan cihazlar tablo 4 de gösterilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan Cihazlar

CİHAZLAR	KULLANIM AMAÇLARI
Laminar Flow Kabin (Telstar Bio II Advance)	Hücre kültürü çalışmalarının aseptik teknik kullanılarak gerçekleştirilmesinde kullanılmaktadır.
Inkübatör (Panasonic)	Hücrelerin ihtiyacı olan biyolojik şartların sağlanması (37derece ve %5 karbondioksit).
Inverted Mikroskop (Zeiss Primo Vert)	Hücre kültürü sürecinin, deney düzeneğinin takip edilmesi, hücrelerin canlı olarak takibinin yapılması ve görüntülenebilmesi.
Işık Mikroskop (Zeiss Primo Star)	Hücre sayımı için kullanılmaktadır.
Mikroplate okuyucu (BioTek, Synergy H1)	İzolasyonu yapılan RNA'ların uygun konsantrasyon ve saflıkta olup olmadığının tespitinde kullanılmaktadır.
Mikro Santrifüj (MIKRO 200R,Hettich ZENTRIFUGEN)	RNA izolasyon prosedüründe mikrotüplerin santrifüjü amaçlı kullanılmaktadır.
Esco Aeris Thermal Cycler	Farklı kültür ortamlarından izole edilen ve uygun saflık ve konsantrasyonlarda belirlenen RNA'dan ifade analizine geçmeden önce tamamlayıcı DNA (cDNA) dizisini sentezlemek amacı ile kulanılmaktadır.

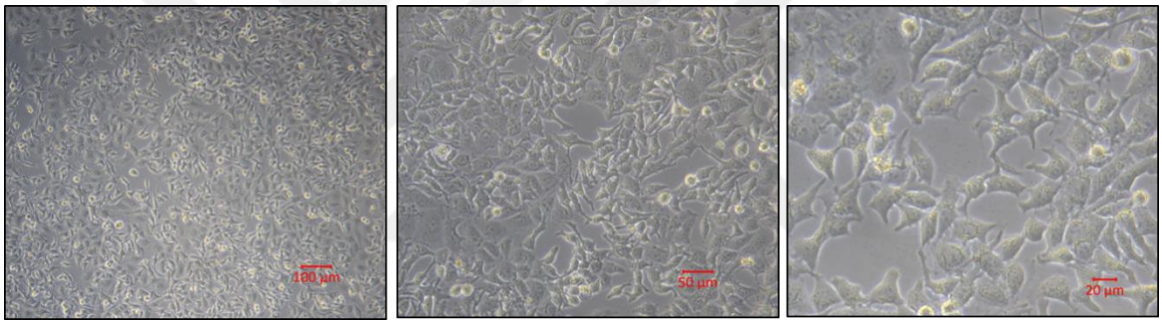
Gerçek Zamanlı PCR (Roche- 96 Light Cycler)	cDNA sentezi yapılan farklı kültür ortamlarına ait hücrelerde HOXA10, HOXB7 genlerinin ifadesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır.
Su Banyosu (Senova)	SKOV-3 hücrelerinde kullanılan besi ortamı gibi malzemelerin ısıtılması için kullanılmaktadır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 SKOV-3 Hücrelerinin Mikroskobik Görüntüleri

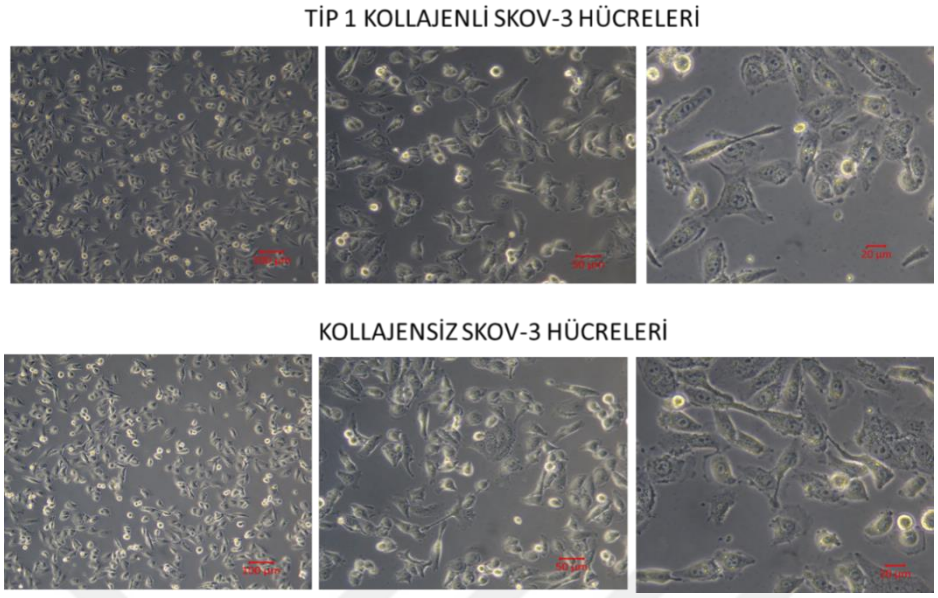
SKOV-3 hücreleri kültür edildikten sonta tip 1 kollajenin hücre morfolojisi üzerindeki etkisinin mikroskobik olarak gösterilmesi üzerine 1. ve 3. günlerde inverted mikroskop altında incelendi. Farklı büyütmelerdeki objektifler ile fotoğrafları çekilerek mikroskop software programına kaydedildi.

Deney düzeneğine göre hücre pasajlaması yapılmadan önce çoğaltılmış SKOV-3 hücrelerinin mikoskobik görüntüleri şekil 9 da gösterilmiştir. Buna göre SKOV-3 hücreleri aderhant epitelyal hücre morfolojisine uygun görünümdedirler.



Şekil 9. Deney Düzeneği Başlatılmadan Önce Çoğaltılan SKOV-3 Hücreleri

Deney düzeneğinde yer alan SKOV-3 hücrelerin mikroskobik görüntüleri ise şekil 10 da gösterilmiştir. Buna gore; tip 1 kollajen üzerine ekimi yapılmış SKOV-3 hücrelerinin morfolojik yapılarının kontrol grubu hücreler ile benzer olduğu görülmüş, kollajen etkisine bağlı herhangi bir morfolojik değişiklik görülmemiştir.

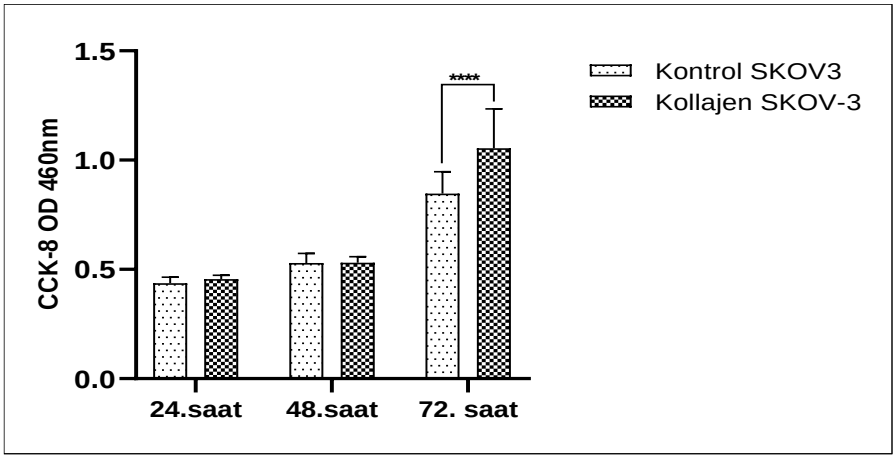


Şekil 10. Kollajenli ve Kollajensiz Kültür Ortamlarında Çoğaltılmış SKOV-3 Hücreleri

4.2 SKOV-3 Hücrelerinin Proliferasyon (CCK-8) Testi Sonucu

Kit prosedürüne göre hazırlanan örnekler spektrofotemekrik olarak mikroplate okuyucuda (BioTek Synergy H1), 460nm dalga boyunda okutularak oluşan renk değişimi elde edilen optik dansiteler değerlendirildi. Proliferasyon testi üç tekrarlı ve örnekler üç kuyucuklu çalışıldı. SKOV-3 hücrelerin proliferasyon test sonucu tablo 5 te verilmiştir.

Tablo 5. SKOV-3 Hücrelerinin Proliferasyon Test Sonucu



SKOV-3 hücreleri proliferasyon test sonucuna göre; her iki deney grubu kendi aralarında karşılaştırıldığında, 72. saatte kollajen grubunun proliferasyon oranı aynı saat

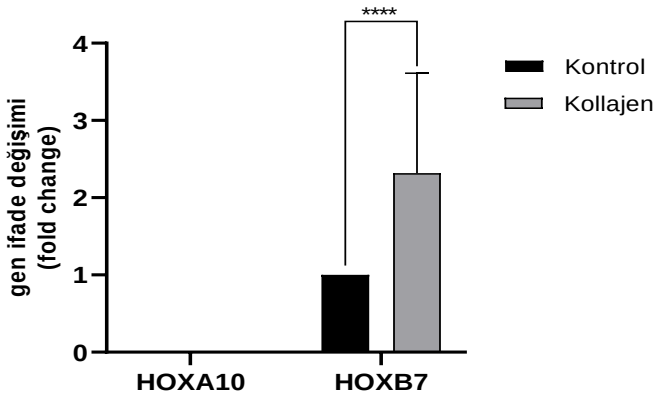
kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış göstermiştir ($p<0.0001$). 24. ve 48. saatlerde yapılan ölçümlerde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. İstatiksel olarak Anova çift yönlü varyans analizi ile Sidak's çoklu karşılaştırılmalı test çalışılmıştır.

4.3 RT-PCR Sonuçları

4.3.1 HOXA10 ve HOXB7 gen ifade sonuçları

Tip 1 kollajen üzerinde kültüre edilen SKOV-3 hücrelerinin RT- qPCR ile analizleri iki set cDNA örneği ile çoklu tekrar şeklinde yapıldı. Beta-aktin Ct ortalama değeri kontrol grubunda 16.37, tip 1 kollajen bulunan deney grubunda 15.83 bulundu. HOXA10 Ct değeri her iki hücre kültürü grubunda negatif bulundu. Kontrol grubunda HOXB7 Ct değeri 23.85±0.72 (23.1-24.77), HOXB7 -Beta-aktin ΔCt değeri 7.48±0.72 (6.73-8.4) bulundu. Tip 1 kollajen deney grubunda HOXB7 Ct değeri 22.27±0.39 (21.74-22.63), HOXB7-Beta-aktin ΔCt değeri 6.44±0.39 (5.91-6.8) bulundu. HOXB7 gen kollajen grubun kontrol grubuna göre karşılaştırmalı ifadesi, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri 2.33±1.22 (0.95-3.43) bulundu. İstatiksel olarak tip 1 kollajen deney grubu hücrelerde HOXB7 gen ifadesinin kontrol grubu hücrelere göre anlamlı olarak artış gösterdiği bulunmuştur ($p<0.0001$). Kontrol ve tip 1 kollajenli ortamda kültüre edilen SKOV-3 hücrelerin HOXA10, HOXB7 gen ifadelerının karşılaştırmalı sonuç (fold change) grafikleri tablo 6 da gösterilmiştir.

Tablo 6. HOXA10 ve HOXB7 Genlerinin Deney Grupları İfade Karşılaştırılması



4.4 Tartışma

Over kanseri, en yaygın kadın genital malignitesidir ve jinekolojik kanserler arasında en yüksek ölüm oranına sahip olanıdır (Gilbert vd., 2012). İnfertilite over kanseri için risk faktörleri arasındadır (Tomao vd., 2014). İnfetilite tedavisinde kullanılan ilaçlar over kanseri gelişme riskini arttırabilir (Asante vd., 2013).

Kanser hücreleri, metabolizma, proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz süreçleri sırasında sinyal yolları aracılığıyla kollajen ile iletişim kurar (Laklai vd., 2016).

Kollajen birikiminin artışı, kanser hücrelerinin çoğalma ve yayılma artışının göstergesidir (Provenzano, Inman, Eliceiri ve Keely, 2009).

Ren ve arkadaşlarına göre; quercetin'in yumurtalık kanseri hücrelerinin apoptozunu indüklediğini ve hücre apoptoz hızının doza bağlı bir şekilde arttığını gösterilmiştir (Ren, Deng, Ai, Yuan ve Song, 2015).

Basu ve Ray'ın yaptığı çalışma sonucuna göre PITX2, kanonik Wnt sinyalini indükleyerek SKOV-3 hücrelerinin çoğalmasını arttırdığı gözlenmiştir (Basu, Ray ve 2013).

Zheng ve diğerleri (2017) yaptıkları çalışmada tip 1 kollajen ile kaplanmış kültür ortamındaki hepatoselüler karsinoma hücrelerinin fibronektin ortamda büyütülen hücrelere göre daha fazla proliferasyon gösterdiğini bulmuşlardır (Zheng vd., 2017).

Olumsuz kültür şartlarında büyütülen hepatoselüler karsinoma hücrelerinde tip 1 kollajenin hücre proliferasyonuna etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada, düşük sıcaklıkta canlı kalan hücre sayısının kollajen bulunan ortamda daha fazla olduğu, kanser prognoz belirteçlerinin tip 1 kollajen varlığından daha fazla görüldüğü belirtilmiştir (Akbulut, Kavaklı, Köroğlu, Maraş ve Aktaş, 2020).

SKOV-3 hücrelerinin proliferasyonuna tip 1 kollajenin etkisini araştırdığımız bu çalışmada ise; kültür süresince ilk 24, 48, 72. saatlerde ölçüme alınan proliferasyon sonuçlarında kollajen grupta kültüre edilen hücrelerin proliferasyon oranı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark 72. saatte görülmüştür.

Paradiso ve diğerlerinin yaptığı çalışmada; tip 1 kollajen (rat kökenli) ve deniz anası kökenli kollajenin over kanseri hücre hatları üzerindeki etkileri araştırılmış, SKOV-3 hücrelerinin ilk 3 günlük kültür sürecinde proliferasyon oranlarının yakın olduğu bulunmuştur (Paradiso vd., 2019). Rat kökenli tip 1 kollajen kullandığımız çalışmamızda kontrol grubuna göre proliferasyon sonuçları arasında artış gözlemledik.

Zheng ve diğerlerinin yaptığı çalışmada tip 1 kollajenin integrin β1/FAK (Focal adhesion kinase) yolağının düzenlenenmesinde etkili olduğunu göstermiş (Zheng vd., 2017), hücre içi sinyalleşmede önemli yeri olan FAK'ın ekstraselluler matriks ve integrinlerle etkileşimi farklı hücresel fonksiyonların düzenlemesinde etkili olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Guan, L-J. 2010).

Biz de çalışmamızda SKOV-3 hücrelerin tip 1 kollajenin proliferasyon artışı üzerindeki etkisinin bu moleküler yolaklar üzerinden olabileceğini düşünmekteyiz.

HOXA10 embriyonik gelişim ve tümör ilerlemesinde önemli bir rol oynayan HOX gen ailesine aittir. Song ve Zhou yaptığı çalışmada HOXA10' un mide kanseri hastalarında yukarı regüle edildiğini ve lenf nodu metastazı olan hastalarda olmayanlara göre farkın daha belirgin olduğunu göstermişlerdir. HOXA10, in-vitro olarak mide kanseri hücrelerinin göçünü ve istilasını destekler ve in vivo olarak akciğer metastazını hızlandırmaktadır. Epitelyal mezenkimal geçiş HOXA10 ile ilgili metastazdan sorumlu önemli bir mekanizmadır. Mekanik olarak, transforming growth factor beta (TGFB2) promotör bölgesinde zenginleştirilmiş HOXA10'u ortaya çıkararak transkripsiyonu destekler, böylece Smad2/3 nükleer ifadesinin ardından TGFβ/Smad sinyalinin aktivasyonu tetiklenmektedir (Song ve Zhou, 2021).

Endometriyum her yeni adet döngüsü ile büyüme, farklılaşma ve gerileme dönemlerini içeren döngüsel değişikliklere uğrar. HOXA10 geni, adet döngüsü sırasında endometriyal gelişimin düzenlenmesinde önemli bir işleve sahiptir ve gen ifadesi, endometrial gelişim ve implantasyon için gereklidir (Salih ve Taylor, 2004). Samadieh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre; HOXA10 geninin endometriyumda dinamik olarak eksprese edildiğini ve en yüksek ifadesi adet döngüsünün salgılama fazında meydana geldiğini göstermiştir (Samadieh vd., 2019).

Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışamaya göre; HOXA10'un pankreatik duktal adenokarsinom ile ilişkili olduğu, RNA-seq verilerinde HOXA10 ifadesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. HOXA10, kanonik nükleer transkripsiyon faktörü kappa B (NF-κB) sinyalini in-vitro ve in vivo olarak aktive ederek pankreatik duktal adenokarsinom proliferasyonunu, ankraj koloni oljuşumunu ve ksenogreft büyümesini arttırdığı gözlenmiştir (Li vd., 2022).

HOX genleri, embriyonik gelişim sırasında morfogenez ve hücre farklılaşmasında yer alan transkripsiyon faktörleridir. Yetişkin dokularında düzensiz HOX gen ifadesi, birden çok insan kanserinde sıklıkla gözlenir ve kanserin başlamasında ve ilerlemesinde nedensel bir faktör olarak karakterize edilir (Gong vd., 2021). HOXA10 aşırı ifadesi, hücre proliferasyonunu aktive ederek, apoptozu inhibe ederek ve hücre metastazını teşvik ederek kanserin ilerlemesini kolaylaştırdığı gözlenmiştir (Carrera vd.,2015).

Yapılan bir çalışmada polikistik over hastalarında, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan düşüklerde endometrial HOXA10 ifadesinin değiştiği göstermiş, HOXA10 geni bu hastalarda gözlemlenen kusurlu implantasyondan sorumlu olduğu belirtilmiştir (Yang vd.,2017).

SKOV-3 hücreleri ile yaptığımız çalışmada endometrial HOXA10 ifadesi tespit edilmemiş, tip 1 kollajene bağlı olarak bir değişiklik gözlenmemiştir (Tablo.6). Bu sonucun, HOXA10 geninin endometrial gelişimde etkili olması (Salih ve Taylor, 2004). ve çalışma materyalimizin over kanseri hücresi olması ile ilişkili olabileceği, farklı primer dizileri ile geniş çalışmalar yapılması gerekliliğini düşünmekteyiz.

Cheng ve arkadaşların yaptığı çalışmada over kanseri hastalarda endometrial tümörlerde HOXA10 gen ifadesinde artış olduğu gösterilmişdir (Cheng vd., 2005).

HOXB7, proliferasyon, invazyon, migrasyon, anjiyogenez ve epitelyal-mezankimal geçiş olmak üzere birçok kanser hücresi fonksiyonunu düzenler (Errico vd., 2016).

Hematopoietik kök hücrelerin proliferasyonunun ve kendini yenilemesinin HOXB7 tarafından arttırıldığı bildirilmiştir (Carè, vd., 2019). HOXB7'nin aşırı ifadesi, kanserin ilerlemesi ve kötü prognoz ile önemli ölçüde ilişkilidir (Zhang vd., 2016).

Son zamanlarda, HOXB7'nin hepatosellüler kanser (HCC) hücrelerinin proliferasyonunu ve göçünü modüle edebildiği ve HCC hastalarının kötü prognozu ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bildirilmiştir (Komatsu vd., 2016).

HOXB7 ve HCC prognozu arasındaki korelasyonu incelemek için, Huan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmaya göre; 77 HCC örneğinde ve karşılık gelen eşleştirilmiş kanserli olmayan dokularda HOXB7 ifadesi tespit edildi. Bu sonuçlara göre HOXB7'nin ifade seviyesinin HCC dokularında kanserli olmayan dokuya göre daha yüksek olduğunu ve kanserli olmayan dokuda çok az HOXB7 boyanması olduğunu veya hiç olmadığını göstermişlerdir. HOXB7'nin hepatoma hücrelerinde aşırı ifadesi, in-vitro ve in-vivo olarak büyümesi metastazı arttırdığı belirtilmiştir (Huan, vd., 2017).

Nguyen Kovochich ve diğerlerinin (2013) yaptığı çalışmaya göre; farklı hücre hatları, doku veya mikrodisseke tümörlerden elde eilen cDNA mikrodizilerinde HOXB7'nin sıklıkla pankreatik adenokarsinomda aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir. 43 pankreatik adenokarsinom tümörü ve 7 normal pankreas örneğinden oluşan oligonükleotit mikrodizi veri seti analiz edilerek, HOXB7 ifadesinde istatistiksel olarak 4 kat bir artış gözlenmiştir (Nguyen Kovochich vd., 2013).

HOXB7 amplifikasyonu ve aşırı ifadesi, mide, pankreas ve akciğer kanserleri gibi çeşitli kanserlerde kötü prognoz ile ilişkilidir. Ayrıca, HOXB7'nin epitelyalden mezankimal geçişe, antikanser ilaç direncine ve anjiyogenezi teşvik ederek kanserin ilerlemesine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Meme kanseri hastaları ile yapılan bir çalışmada, HOXB7'nin tirozin protein kinaz reseptör proteinini kodlayan ERBB2 geni ile birlikte çoğaldığını ve HOXB7 ifadesinin human epidermal büyüme faktörü reseptör 2 (HER2-) pozitif meme kanseri hastalarında kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Azuma vd., 2023).

Yamashita ve diğerlerinin (2006), HOX genlerinin araştırıldığıifadeleri ve invasyon ile ilişkisinin araştırdıkları çalışmada, over kanser hücre hatları, over kanser olan hasta ve sağlıklı kadınlardan alınan over dokusu ile çalışılmış, HOXB7 gen ifadesinin SKOV-3 hücre hattında ve over kanser dokusunda, normal hücrelere göre yüksek olduğu gösterilmiştir (Yamashita, T.,Tazawa, S.,Yawei, Z., vd.,2006).

Kanser prognozu ile ilişkilendirilmiş HOXB7 geninin (Zhang vd., 2016) ifadesinde tip 1 kollajenin etkisini araştırdığımız bu çalışmada, kontrol grubuna göre kollajen varlığında HOXB7 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görülmüştür (Tablo. 6). Bu durum tip 1 kollajen bulunan gruptaki proliferasyon oranı artışı ile uyumlu görülmüştür.

Hepatoselüler karsinoma hücre hatları ile yapılan çalışmalarda tip 1 kollajenin hücre morfolojisi ve proliferasyon ile ilgili moleküler mekanizmalarda artan yönde etki gösterdiği sonuçlar ile (Zhang vd., 2017; Akbulut vd., 2020), SKOV-3 hücrelerinde HOXB7 geninin tip 1 kollajen varlığında artışı benzerlik göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tip 1 kollajenin kanser prognozunu arttırdığını gösteren çalışmalardan hareketle, over kanserinde tip 1 kollajenin etkisinin proliferasyon ve gen ifadesi üzerinki etkisini göstermeyi amaçladığımız bu çalışmada; over kanseri hücre hattı dizisi SKOV-3 hücrelerinin tip 1 kollajen varlığında, proliferasyon oranı ve HOXB7 gen ifadesinde artış olduğu gözlenmiştir. HOXA10 gen ifadesi her iki deney grubunda görülmemiştir. HOXB7 gen ifadesinde görülen artış, proliferasyon testi sonucumuz ile de uyumludur. Tip 1 kollajenin kanser hücrelerinde integrin β1/FAK gibi moleküler yolakları kullanarak proliferasyonu arttırıcı etkisi olduğu bilinmektedir. HOXB7 gen ifadesindeki artışın over kanseri invasyonunu arttırması, hücre adezyonunda etkili genler ile ilişkili olabileceğini, daha geniş kapsamlı araştırmaların yapılması ile bu mekanizmaların aydınlatılacağı düşünülmektedir. Literatürde HOXA10 gen ifadesi endometriozis ile ilişkilendirilmiş over kanseri hastalarında artış göstermiştir. SKOV-3 hücre hattında HOXA10 gen ifadesinin tespit edilmemesi, ilgili gen bölgesine yönelik farklı primer dizileri ile de çalışılması gerekliliğini ve ayrıca in vivo çalışmalar gibi detaylı araştırmalara da ihtiyaç olduğunu düşündürtmektedir.

Tüm bu literatür taramaları ve elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, infertil kadınlarda endometriozis gibi altta yatan nedenleri göz önünde bulundurarak, tüp bebek uygulamalarında genetik araştırmaların yapılmasının etkili olacağı, gebe kalma başarısı ve kanser ile ilgili olası risklerinin takibi açısından da bu çalışmaların önemli olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Abate-Shen C. (2002). Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence?. *Nature reviews. Cancer*, *2*(10), 777–785. https://doi.org/10.1038/nrc907

ACS (2018, Nisan). What Is Ovarian Cancer? Atlanta, Ga: American Cancer Society, Erişim Tarihi: 05.03.2023 https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/about/what-isovarian-cancer.html adresinden alındı.

Adur, J., Pelegati, V. B., Thomaz, A. A., Baratti, M. O., Verade, L. A., Carvalho, H. F., vd. (2014). İnsan yumurtalık kanseri için güçlü bir teşhis görüntüleme yöntemi olarak ikinci harmonik nesil mikroskopi. *Biyofotonik Dergisi* , *7* (1-2), 37-48.

Akbulut, Z., Kavaklı, A.Ö., Karagöz Köroğlu, A., Maraş, H., ve Aktaş, R.G. (2020). The Effects of Temperature ve Carbondıoxıde Changesn Related to Type I Collagen Presence on Hepatocellular Carcınoma Cells. *Research ve Science Today.* 2(20), 193-204. https://doi.org/10.38173/RST.2020.20.2.20:193-204

Alkmin, S., Brodziski, R., Simon, H., Hinton, D., Goldsmith, R. H., Patankar, M., vd. (2020). Role of Collagen Fiber Morphology on Ovarian Cancer Cell Migration Using Image-Based Models of the Extracellular Matrix. *Cancers*, *12*(6), 1390. https://doi.org/10.3390/cancers12061390

Alpoim-Moreira, J., Fernvees, C., Rebordão, M. R., Costa, A. L., Bliebernicht, M., Nunes, T., vd. (2022). Collagen Type III as a Possible Blood Biomarker of Fibrosis in Equine Endometrium. *Animals : an open access journal from MDPI*, *12*(14), 1854. https://doi.org/10.3390/ani12141854

Arıncı, K. ve Elhan, A. (2006). *Anatomi* I. Cilt, 4. Baskı, Ankara: Güneş Kitapevi. s.337-348

Asante, A., Leonard, P. H., Weaver, A. L., Goode, E. L., Jensen, J. R., Stewart, E. A., vd. (2013). Fertility drug use ve the risk of ovarian tumors in infertile women: a

case-control study. *Fertility ve sterility*, *99*(7), 2031–2036. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.02.010

Avcı, Y. (2015). *Uterin Leiomyomlarda Ve Leiomyosarkomlarda Mcm7 Ve Cd117 İfadelarının Kök Hücre Belirteçleri (Cd34, Cd44) İle İlişkisi Ve Uterin Leiomyosarkomlarda Prognostik Parametrelerle İlişkisi.* (Yayın no. 394040) *[*Tıpta Uzmnanlık Tezi / Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi] https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp

Azuma, K., Sakamoto, M., Katayama, S., Matsui, A., Nakamichi, K. ve Goshima, N. (2023). HOXB7 induces STAT3-mediated transformation and lung metastasis in immortalized mammary gland NMuMG cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, *28*(4), 277–287. https://doi.org/10.1111/gtc.13009

Basu, M., ve Roy, S. S. (2013). Wnt/β-catenin pathway is regulated by PITX2 homeodomain protein ve thus contributes to the proliferation of human ovarian adenocarcinoma cell, SKOV-3. *The Journal of biological chemistry*, *288*(6), 4355–4367. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.409102

Borghese, B., Mondon, F., Noël, J. C., Fayt, I., Mignot, T. M., Vaiman, D., vd. (2008). Gene expression profile for ectopic versus eutopic endometrium provides new insights into endometriosis oncogenic potential. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, *22*(11), 2557–2562. https://doi.org/10.1210/me.2008-0322

Bowen, N. J., Walker, L. D., Matyunina, L. V., Logani, S., Totten, K. A., Benigno, B. B., vd. (2009). Gene expression profiling supports the hypothesis that human ovarian surface epithelia are multipotent ve capable of serving as ovarian cancer initiating cells. *BMC medical genomics*, *2*, 71. https://doi.org/10.1186/1755-8794-2-71

Carè, A., Valtieri, M., Mattia, G., Meccia, E., Masella, B. Ve Luchetti, L. (1999). Enforced expression of HOXB7 promotes hematopoietic stem cell proliferation and myeloid-restricted progenitor differentiation. *Oncogene*, *18*(11), 1993–2001. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202498

Carrera, M., Bitu, C. C., de Oliveira, C. E., Cervigne, N. K., Graner, E. ve Manninen, A. (2015). HOXA10 controls proliferation, migration and invasion in oral squamous cell carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*, *8*(4), 3613–3623.

Cheng, W., Liu, J., Yoshida, H., Rosen, D., ve Naora, H. (2005). Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. *Nature medicine*, *11*(5), 531–537. https://doi.org/10.1038/nm1230

Cui, J., Miner, B.M., ve Eldredge, J.B. (2011). Regulation of gene expression in ovarian cancer cells by luteinizing hormone receptor expression ve activation. *BMC Cancer* 11, 280 https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-280

Çınar, Ç., Küçüksezer, U.C., ve Deniz, G.. (2014) Proliferasyon ve Aktivasyon Testleri. Deniz, G. ve Yanıkkaya Demirel, G. (Ed), *Akan Hücre Ölçer* içinde (137). İstanbul: Yelken Matbaacılık

Dansuk, R. (2011). Kadın genital sisteminin embriyolojisi ve cinsel farklılaşma . *Türk Pediatri Arşivi* , 46 (11) , DOI: 10.4274/tpa.46.49

Doubeni, C. A., Doubeni, A. R., ve Myers, A. E. (2016). Diagnosis ve Management of Ovarian Cancer. *American family physician*, *93*(11), 937–944.

Du, H., ve Taylor, H. S. (2015). The Role of HOX Genes in Female Reproductive Tract Development, Adult Function, ve Fertility. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *6*(1), a023002. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023002

Errico, M. C., Jin, K., Sukumar, S., ve Carè, A. (2016). The Widening Sphere of Influence of HOXB7 in Solid Tumors. *Cancer research*, *76*(10), 2857–2862. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3444

Eşrefoğlu, M. (2016). *Özel Histoloji* (Birinci Baskı). Ankara: İstanbul Tıp Kitabevi, 200- 250.

Fambrini, M., Sorbi, F., Bussani, C., Cioni, R., Sisti, G., ve Veersson, K. L. (2013).

Hypermethylation of HOXA10 gene in mid-luteal endometrium from women with ovarian endometriomas. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, *92*(11), 1331–1334. https://doi.org/10.1111/aogs.12236

Ferraro, V., Gaillard-Martinie, B., Sayd, T., Chambon, C., Anton, M., vd. (2017). Collagen type I from bovine bone. Effect of animal age, bone anatomy ve drying methodology on extraction yield, self-assembly, thermal behaviour ve electrokinetic potential. *International journal of biological macromolecules*, *97*, 55–66. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.068

Garcia-Fernàndez, J. (2005). The genesis ve evolution of homeobox gene clusters. *Nature reviews. Genetics*, *6*(12), 881–892. https://doi.org/10.1038/nrg1723

Gartner, LP., ve Hiatt, JL. (2006). *Color Textbook of Histology*. Amerika: W.B Saunders.

Gedikli, S. (2013). *Melatonin Mcf-7 Hücre Kültüründeki Apoptoz Aktivasyonunun ve Sitotoksisitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pcr): MTT Hücre Canlılık Testi ve İmmunsitokimya Yöntemleriyle Araştırılması*. (Yayın no. 379413) [Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi]. https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp

Gedikli, S., Özbek, E., ve Demirci, T. (2013). Fertilizasyonun Moleküler Temeli. *Van Tıp Dergisi*, 20(4), 294-301.

Gilbert, L., Basso, O., Sampalis, J., Karp, I., Martins, C., Feng, J., vd. (2012). Assessment of symptomatic women for early diagnosis of ovarian cancer: results from the prospective DOvE pilot project. *The Lancet. Oncology*, *13*(3), 285–291. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70333-3

Gong, D., Zhu, H., Zeng, L., Hu, R., Hu, J. ve Ding, J. (2021). Overexpression of HOXA10 promotes the growth and metastasis of nasopharyngeal carcinoma. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, *246*(23), 2454–2462. https://doi.org/10.1177/15353702211030854 7

Guan J. L. (2010). Integrin signaling through FAK in the regulation of mammary stem cells and breast cancer. *IUBMB life*, *62*(4), 268–276. https://doi.org/10.1002/iub.303

Huan, H. B., Yang, D. P., Wen, X. D., Chen, X. J., Zhang, L. ve Wu, L. (2017). HOXB7 accelerates the malignant progression of hepatocellular carcinoma by promoting stemness and epithelial-mesenchymal transition. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, *36*(1), 86. https://doi.org/10.1186/s13046-017-0559-4

Idaikkadar, P., Morgan, R., ve Michael, A. (2019). HOX Genes in High Grade Ovarian Cancer. *Cancers*, *11*(8), 1107. https://doi.org/10.3390/cancers11081107

Jeevithan, E., Bao, B., Zhang, J., Hong, S., ve Wu, W. (2015). Purification, characterization ve antioxidant properties of low molecular weight collagenous polypeptide (37 kDa) prepared from whale shark cartilage (Rhincodon typus). *Journal of food science ve technology*, *52*(10), 6312–6322. https://doi.org/10.1007/s13197-015-1715-5

Jensen, A., Sharif, H., Olsen, J. H., ve Kjaer, S. K. (2008). Risk of breast cancer ve gynecologic cancers in a large population of nearly 50,000 infertile Danish women. *Amerikan journal of epidemiology,168(1), 49-57.* https://doi.org/10.1093/aje/kwn094

Kaplan, F. (2014*).Salinomisin'in İnsan Over Kanseri Hücre Serisi (Ovcar-3) Üzerine Olan Apopitotik Ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması.* (Yayın no. 359606) [Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi]. https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp

Kavak, V. (2018)**.** Organa Genitalia (Üreme Organları). Haspolat, Y. K, Büyükgebiz, A. Yolbaş, İ.- Aktar, F. Ertuğrul, S. (Ed.). *Puberte* (pp. 14-18) İstanbul: Orient Yayınları

Kavak, V. (2019). Over ve Uterus Anatomisi. Haspolat,Y. Aktar, F. Ege, S. Bilici,S. (Ed.). *Çocuk ve Ergenlerde Gonad Hastalıkları* (pp. 1-3) İstanbul: Orient

Yayınları

Kayalı, H., Satıroğlu, G., ve Tasyürekli, M. (1992). *İnsan embriyolojisi.* İstanbul: Alfa Yayınevi.

Kelly, Z. L., Michael, A., Butler-Manuel, S., Pveha, H. S., ve Morgan, R. G. (2011). HOX genes in ovarian cancer. *Journal of ovarian research*, *4*, 16. https://doi.org/10.1186/1757-2215-4-16

Komatsu, H., Iguchi, T., Masuda, T., Ueda, M., Kidogami, S. ve Ogawa, Y. (2016). HOXB7 Expression is a Novel Biomarker for Long-term Prognosis After Resection of Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer research*, *36*(6), 2767–2773.

Krishnamoorthi, J., Ramasamy, P., Shanmugam, V., ve Shanmugam, A. (2017). Isolation and partial characterization of collagen from outer skin of Sepia pharaonis (Ehrenberg, 1831) from Puducherry coast. *Biochemistry and Biophysics Reports,10*(39-45). https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.02.006

Kurnaz, S. (2011). *İnsan Uterus Ve Tuba Uterinasındaki İnterstisyel Cajal Benzeri Hücrelerin Değişik Yöntemlerle Gösterilmesi.* (Yayın no: 288798), [Yüksek Lisan Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü] https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp

Laklai, H., Miroshnikova, Y. A., Pickup, M. W., Collisson, E. A., Kim, G. E., Barrett, A. S., vd. (2016). Genotype tunes pancreatic ductal adenocarcinoma tissue tension to induce matricellular fibrosis ve tumor progression. *Nature medicine*, *22*(5), 497–505. https://doi.org/10.1038/nm.4082

Lee, A. W., Templeman, C., Stram, D. A., Beesley, J., Tyrer, J., Berchuck, A., vd. (2016). Evidence of a genetic link between endometriosis ve ovarian cancer. *Fertility ve sterility*, *105*(1), 35–43.e1-10. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.09.023

Li, J., Chang, J., Wang, J., Xu, D., Yang, M ve Jiang, Y.(2022). HOXA10 promote

pancreatic cancer progression via directly activating canonical NF-κB signaling pathway. *Carcinogenesis*, *43*(8), 787–796. https://doi.org/10.1093/carcin/bgac042

Liu, D. C., Lin, Y. K., ve Chen, M. T. (2001). Optimum Condition of Extracting Collagen from Chicken Feet ve its Characteristics. *AsianAustralas J Anim Sci*, 14(11): 1638-1644

Livak, K.J. ve Schmmitgen, D.T. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR ve the 2 -ΔΔCT Method. *METHODS* 25: 402-40.

Makareeva, E., ve Leikin, S. (2014). Osteogenesis Imperfecta. *Collagen structure, folding ve function*. (pp. 71-84). ABD: Academic Press.

Mark, M., Rijli, F. M., ve Chambon, P. (1997). Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatric research*, *42*(4), 421–429. https://doi.org/10.1203/00006450-199710000-00001

McGinnis, W., ve Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes ve axial patterning. *Cell*, *68*(2), 283–302. https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90471-n

Mescher, L.A. (2018) *Junqueira's Basic Histology: Text ve Atlas.* ABD: Mc Graw Hill LANGE

Michael, H., ve Ross, W.P. (2011).*Histology A Text Ve Atlas with Corralated Cell ve Molacular Biology*. 6th edition ed. Vol. LWW. 2011: 6th edition.

Modi, D., ve Godbole, G. (2009). HOXA10 signals on the highway through pregnancy. *Journal of reproductive immunology*, *83*(1-2), 72–78. https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.07.009

Naomi, R., Ridzuan, P. M., ve Bahari, H. (2021). Current Insights into Collagen Type I. *Polymers*, *13*(16), 2642. https://doi.org/10.3390/polym13162642

Naora, H., Montz, F. J., Chai, C. Y., ve Roden, R. B. (2001). Aberrant expression of

homeobox gene HOXA7 is associated with müllerian-like differentiation of epithelial ovarian tumors ve the generation of a specific autologous antibody response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(26), 15209–15214. https://doi.org/10.1073/pnas.011503998

Nguyen Kovochich, A., Arensman, M., Lay, A. R., Rao, N. P., Donahue, T. ve Li, X. (2013). HOXB7 promotes invasion and predicts survival in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*, *119*(3), 529–539. https://doi.org/10.1002/cncr.27725

Ota, T., Gilks, C. B., Longacre, T., Leung, P. C., ve Auersperg, N. (2007). HOXA7 in epithelial ovarian cancer: interrelationships between differentiation ve clinical features. *Reproductive sciences (Thousve Oaks, Calif.)*, *14*(6), 605–614. https://doi.org/10.1177/1933719107307781

Öktem, Ö., ve Urman, B. (2011). Over hayat döngüsünü anlamak. *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi,* 8(2), 71-82

Paço, A., Aparecida de Bessa Garcia, S., Leitão Castro, J., Costa-Pinto, A. R., ve Freitas, R. (2020). Roles of the HOX Proteins in Cancer Invasion ve Metastasis. *Cancers*, *13*(1), 10. https://doi.org/10.3390/cancers1301001

Paradiso, F., Fitzgerald, J., Yao, S., Barry, F., Taraballi, F., Gonzalez, D., vd. (2019). Marine Collagen Substrates for 2D ve 3D Ovarian Cancer Cell Systems. *Frontiers in bioengineering ve biotechnology*, *7*, 343. https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00343

Peng, X., Yu, M., ve Chen, J. (2020). Transcriptome sequencing identifies genes associated with invasion of ovarian cancer. Journal of International Medical Research, 28(9): 1-11.

Provenzano, P. P., Inman, D. R., Eliceiri, K. W., ve Keely, P. J. (2009). Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling ve gene expression through a FAK-ERK linkage. *Oncogene*, *28*(49), 4326–4343. https://doi.org/10.1038/onc.2009.299

Ren, M. X., Deng, X. H., Ai, F., Yuan, G. Y., ve Song, H. Y. (2015). Effect of quercetin

on the proliferation of the human ovarian cancer cell line SKOV-3 *in-vitro*. *Experimental ve therapeutic medicine*, *10*(2), 579–583. https://doi.org/10.3892/etm.2015.2536

Ricciardelli, C., ve Rodgers, R. J. (2006). Extracellular matrix of ovarian tumors. *Seminars in reproductive medicine*, *24*(4), 270–282.https://doi.org/10.1055/s-2006-948556

Roett, M.A., ve Evans, P. (2009).Ovarian Cancer: An Overview. American Family Physician, 15; 80(6), 609-616.

Romero, I., ve Bast, R. C., Jr (2012). Minireview: human ovarian cancer: biology, current management, ve paths to personalizing therapy. *Endocrinology*, *153*(4), 1593–1602. https://doi.org/10.1210/en.2011-2123

Ross, M. H., ve Pawlina, W. (2018). *Histology: A Text ve Atlas* : with Correlated Cell ve Molecular Biology. Wolters Kluwer Health, 831-844.

Rubin, E., Wu, X., Zhu, T., Cheung, J. C., Chen, H., Lorincz, A., vd. (2007). A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair. *Cancer research*, *67*(4), 1527–1535. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4283

Sadler, TW. (2004). *Langman's Medical Embryology*. Lippincott Williams ve Wilkins; 2004. 534 P. 17. Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human : *Clinically Oriented Embryology*. 6th Ed. Philadelphia; 2002.

Salih, S. M., & Taylor, H. S. (2004). HOXA10 gene expression in human fallopian tube and ectopic pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, *190*(5), 1404–1406. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.01.066

Samadieh, Y., Favaedi, R., Ramezanali, F., Afsharian, P., Aflatoonian, R., ve Shahhoseini, M. (2019). Epigenetic Dynamics of HOXA10 Gene in Infertile Women With Endometriosis. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, *26*(1), 88–96. https://doi.org/10.1177/1933719118766255

Sanes, D.H., Reh, T.A., ve Harris, W.A., (2006). *Development of the nervous system*.

ABD: Academic Press

Sarwar, M., Sykes, P. H., Chitcholtan, K., ve Evans, J. J. (2022). Collagen I dysregulation is pivotal for ovarian cancer progression. *Tissue ve cell*, *74*, 101704. https://doi.org/10.1016/j.tice.2021.101704

Schmidt, M. M., Dornelles, R. C. P., Mello, R. O., Kubota, E. H., Mazutti, M. A., Kempka, A. P., vd. (2016). Collagen extraction process. *Int Food Res J*, 23(3): 913-922.

Somaiah, C., Kumar, A., Mawrie, D., Sharma, A., Patil, S. D., Bhattacharyya, J., vd. (2015). Collagen Promotes Higher Adhesion, Survival ve Proliferation of Mesenchymal Stem Cells. *PloS one*, *10*(12), e0145068. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145068

Song, C., ve Zhou, C. (2021). HOXA10 mediates epithelial-mesenchymal transition to promote gastric cancer metastasis partly via modulation of TGFB2/Smad/METTL3 signaling axis. *Journal of experimental ve clinical cancer research : CR*, *40*(1), 62. https://doi.org/10.1186/s13046-021-01859-0

Song, C., ve Zhou, C. (2021). HOXA10 mediates epithelial-mesenchymal transition to promote gastric cancer metastasis partly via modulation of TGFB2/Smad/METTL3 signaling axis. *Journal of experimental ve clinical cancer research : CR*, *40*(1), 62. https://doi.org/10.1186/s13046-021-01859-0

Song, Y.B., Hwang, K., Kim, D. J., ve Han, S. H. (2009). Innervation of vagina: microdissection ve immunohistochemical study. *Journal of sex ve marital therapy*, *35*(2), 144–153. https://doi.org/10.1080/00926230802716195

Stahlberg, A., Zoric, N., Aman, P., ve Kubista, M. (2005) Quantative real- time PCR for cancer detection: the lymphoma case. *Expert Rev.Mol.Diag*. 5(2):221-230.

Szczepańska, M., Wirstlein, P., Luczak, M., Jagodziński, P. P., ve Skrzypczak, J. (2010). Reduced expression of HOXA10 in the midluteal endometrium from infertile women with minimal endometriosis. *Biomedicine ve pharmacotherapy = Biomedecine ve pharmacotherapie*, *64*(10), 697–705.

https://doi.org/10.1016/j.biopha.2010.09.012

Tang, M., Li, T., Gvehi, N. S., Burrage, K., ve Gu, Y. (2017). Heterogeneous nanomechanical properties of type I collagen in longitudinal direction. *Biomechanics ve modeling in mechanobiology*, *16*(3), 1023–1033. https://doi.org/10.1007/s10237-016-0870-6 .

Tatar, M. C. (2023). Kadın Genital Sistem Anatomisi Systema Genitale Femininum. Dinç, Ayten. (Ed), *Sağlık ve Bilim 2022: Ebelik-IV*, (pp.14). İstanbul:Efe Akademi Yayınları

Taylor, H. S., Vveen Heuvel, G. B., ve Igarashi, P. (1997). A conserved HOX axis in the mouse ve human female reproductive system: late establishment ve persistent adult expression of the HOXa cluster genes. *Biology of reproduction*, *57*(6), 1338–1345. https://doi.org/10.1095/biolreprod57.6.1338

Tomao, F., Lo Russo, G., Spinelli, G. P., Stati, V., Prete, A. A., Prinzi, N., vd. (2014). Fertility drugs, reproductive strategies ve ovarian cancer risk. *Journal of ovarian research*, *7*, 51. https://doi.org/10.1186/1757-2215-7-51

Tunalı, G. (2019). Gametogenez. Karakoç L, Fındıklı N, Ünsal E, Enginsu E, Balaban B, Özkavukçu S ve Ergin E (Ed), *Üreme Yardımcı Tekniklerde Laboratuvar* (pp.67-83).Ankara: Nobel Tıp Kitapevi.

Varma, S., Orgel, J. P., ve Schieber, J. D. (2016). Nanomechanics of Type I Collagen. *Biophysical journal*, *111*(1), 50–56. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.05.038

Veraksa, A., Del Campo, M., ve McGinnis, W. (2000). Developmental patterning genes ve their conserved functions: from model organisms to humans. *Molecular genetics ve metabolism*, *69*(2), 85–100. https://doi.org/10.1006/mgme.2000.29638

Xu, S., Xu, H., Wang, W., Li, S., Li, H. ve Li, T. (2019). The role of collagen in cancer: from bench to bedside. *Journal of Translational Medicide* 17 (309) https://doi.org/10.1186/s12967-019-2058-1

Yamashita, T., Tazawa, S., Yawei, Z., Katayama, H., Kato, Y. ve Nishiwaki, K. (2006). Suppression of invasive characteristics by antisense introduction of overexpressed HOX genes in ovarian cancer cells. *International journal of oncology*, *28*(4), 931–938.

Yang, H.,ve Shu, Z. (2014). The extraction of collagen protein from pigskin. *J Chem Pharm Res*, 6(2): 683-687.

Yang, Y., Chen, X., Saravelos, S. H., Liu, Y., Huang, J. Ve Zhang, J. (2017). HOXA-10 and E-cadherin expression in the endometrium of women with recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Fertility and sterility*, *107*(1), 136–143.e2. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.09.016

Yetimalar, H., Köksal, A., Çiftçi, M., Çukurova, K., İnceoğlu, M., ve Keklik, A. (2007). Over kanserlerinin epidemiyolojik faktörler açısından incelenmesi. *Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi*, 10, 72-82.

Yıldırım, M. (2013). *Resimli Sistematik Anatomi*. 2nd Ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.

Zanatta, A., Rocha, A. M., Carvalho, F. M., Pereira, R. M., Taylor, H. S., Motta, E. L., vd. (2010). The role of the HOXA10/HOXA10 gene in the etiology of endometriosis ve its related infertility: a review. *Journal of assisted reproduction ve genetics*, *27*(12), 701–710. https://doi.org/10.1007/s10815-010-9471-y

Zhang, Y., Qazi, S., ve Raza, K. (2021). Differential expression analysis in ovarian cancer: A functional genomics ve systems biology approach. Saudi Journal of Biological Sciences, 28: 4069–4081.

Zhang, Y., Zeng, S., Ma, J., Deng, G., Qu, Y. ve Guo, C. (2016). Nestin overexpression in hepatocellular carcinoma associates with epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, *35*(1), 111. https://doi.org/10.1186/s13046-016-0387-y

Zheng, X., Liu, W., Xiang, J., Liu, P., Ke, M., Wang, B., vd. (2017). Collagen I promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation by regulating integrin

β1/FAK signaling pathway in nonalcoholic fatty liver. *Oncotarget*, *8*(56), 95586–95595. https://doi.org/10.18632/oncotarget.21525

Zhou, T., Fu, H., Dong, B., Dai, L., Yang, Y., Yan, W., vd. (2020). HOXB7 mediates cisplatin resistance in esophageal squamous cell carcinoma through involvement of DNA damage repair. *Thoracic cancer*, *11*(11), 3071–3085. https://doi.org/10.1111/1759-7714.13142

EKLER

HAM VERİLER

EK-1 Skov-3 Hücre Hattı CCK-8 460nm OD Sonuçları

Reader Type: Synergy H1

Reader Serial Number: 14052916

24.

SAAT

1. çalışma kontrol	2.çalışma kontrol	3.çalışma kontrol	1.çalışma kollajen	2.çalışma kollajen	3.çalışma kollajen	**BLANK**
0,423	0,453	0,42	0,451	0,484	0,452	0,086
0,441	0,377	0,431	0,441	0,485	0,432	0,08
0,456	0,473	0,454	0,453	0,454	0,446	0,087

48.

SAAT

1. çalışma kontrol	2.çalışma kontrol	3.çalışma kontrol	1.çalışma kollajen	2.çalışma kollajen	3.çalışma kollajen	**BLANK**
0,512	0,515	0,536	0,516	0,516	0,586	0,079
0,515	0,5	0,518	0,55	0,521	0,521	0,08
0,642	0,53	0,5	0,541	0,491	0,537	0,082

72.

SAAT

1. çalışma kontrol	2.çalışma kontrol	3.çalışma kontrol	1.çalışma kollajen	2.çalışma kollajen	3.çalışma kollajen	**BLANK**
0,853	0,678	0,762	0,837	1,17	0,973	0,086
0,901	0,941	0,934	1,246	0,837	1,17	0,08
0,82	0,762	0,973	1,246	0,837	1,17	0,085

EK-2 Skov-3 Hücre Hattı Cck-8 Sonuçları İstatistiksel Analiz Raporu

Çift yönlü ANOVA- Sidak's Çoklu Karşılaştırmalı Test

Table Analyzed	CCK-8 Analiz				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summ	Significant?	
Interaction	3,659	0,0014	**	Yes	
Row Factor	82,31	<0,0001	****	Yes	
Column Factor	2,419	0,0027	**	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DF	P value
Interaction	0,1169	2	0,05847	F (2, 48) =	P=0,0014
Row Factor	2,63	2	1,315	F (2, 48) =	P<0,0001
Column Factor	0,07729	1	0,07729	F (1, 48) =	P=0,0027
Residual	0,3709	48	0,007727		
Difference between column means					
Mean of Kontrol SKOV3	0,6044				
Mean of Kollajen SKOV-3	0,6801				
Difference between means	-0,07567				
SE of difference	0,02392				
95% CI of difference	-0,1238 to -0,02756				

Compare each cell mean with the other cell mean in that row								
Number of families	1							
Number of comparisons pe	3							
Alpha	0,05							
Sidak's multiple comparis	Mean Diff,	95,00% CI	Significant	Summary	Adjusted P Value			
Kontrol SKOV3 - Kollajen SKOV-3								
24.saat	-0,01889	-0,1214 to	No	ns	0,9573			
48.saat	-0,001222	-0,1037 to	No	ns	>0,9999			
72. saat	-0,2069	-0,3094 to	Yes	****	<0,0001			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
Kontrol SKOV3 - Kollajen SKOV-3								
24.saat	0,4364	0,4553	-0,01889	0,04144	9	9	0,4558	48
48.saat	0,5298	0,531	-0,00122	0,04144	9	9	0,0295	48
72. saat	0,8471	1,054	-0,2069	0,04144	9	9	4,993	48

EK-3 Skov-3 Hücre Hattı Rna Kantifikasyon Sonuçları

	1.set RNA		2.set RNA	
	kontrol	kollajen	kontrol	kollajen
260/280nm	2,069	2,07	2,05	2,029
	2,07	2,071	2,07	2,03
ng/µL	880,557	716,517	1337,947	1506,841
	853,336	733,74	1370,306	1573,269

EK-4 Skov-3 Hücre Hattı Rt-Qpcr Analiz Sonuçları

			Kontrol Grup SKOV3 Ct	Deney Grubu SKOV3 Ct
1. set cDNA	1.çalışma	HOX10 primer	negatif	negtif
	2.çalışma	HOX10 primer	negatif	negatif
2.set cDNA	1.çalışma	HOX10 primer	negatif	negatif
	2.çalışma	HOX10 primer	negatif	negatif
1. set cDNA	1.çalışma	HOX7 primer	23,48	22,21
	2.çalışma	HOX7 primer	23,1	22,63
2.set cDNA	1.çalışma	HOX7 primer	24,06	21,74
	2.çalışma	HOX7 primer	24,77	22,52
Housekeeping	1.çalışma	Beta-aktin	15,79	14,76
	2.çalışma	Beta-aktin	15,48	15,73
	3.çalışma	Beta-aktin	17,85	17,01
		Ortalama*	16,37	15,83

* Deney grupları CT değerleri housekeeping gen Beta-aktin CT ortalama değerlerine göre normalize edildi.

EK-5 Kontrol Ve Deney Grubu Skov-3 Hücrelerin Hox Genleri Ve Housekeeping Gen Δct Değerleri

	HOXA10 Ct Mean±SD (alt-üst değer)	**HOXB7 Ct Mean±SD (alt-üst değer)**	**HOXB7- Beta-aktin ΔCt Mean±SD (alt-üst değer)**
Kontrol SKOV-3	Negatif	23.85±0.7 (23.1-24.77)	7.48±0.72 (6.73-8.4)
Tip 1 kollajen SKOV-3	Negatif	22.27±0.39 (21.74-22.63)	6.44±0.39 (5.91-6.8)

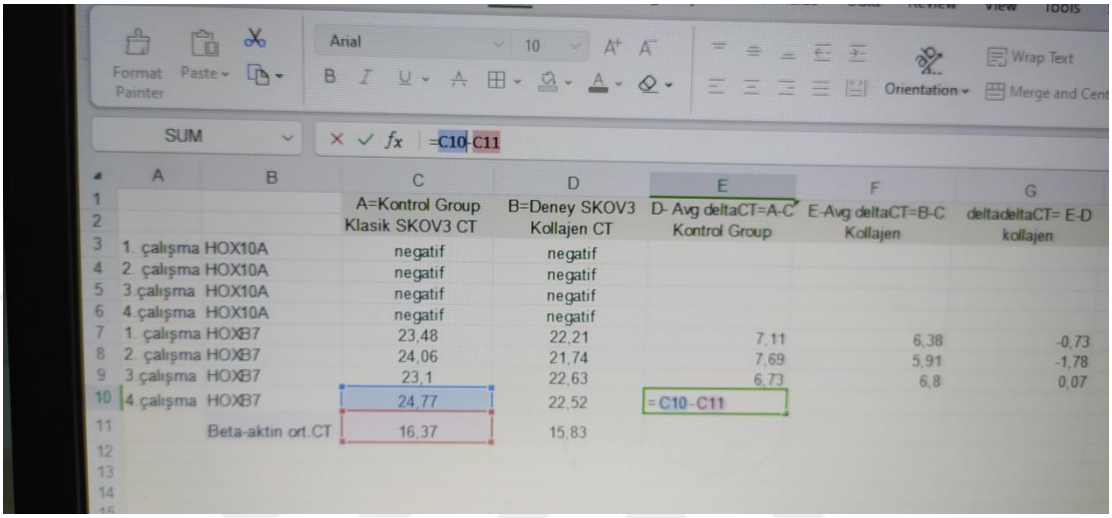
EK-6 Skov-3 Hücre Hattı Rt-Qpcr Sonuçlarına Göre Gen İfadesi Analizi

		A=Kontrol Group Klasik SKOV3 CT	B=Deney SKOV3 Kollajen CT	D- Avg deltaCT=A-C Kontrol Group	E-Avg deltaCT=B-C Kollajen	deltadeltaCT= E-D kollajen	2^-deltadeltaCT kollajen ekspresyonu
1. çalışma	HOX10A	negatif	negatif				
2. çalışma	HOX10A	negatif	negatif				
3.çalışma	HOX10A	negatif	negatif				
4.çalışma	HOX10A	negatif	negatif				
1. çalışma	HOXB7	23,48	22,21	7,11	6,38	-0,73	1,658639092
2. çalışma	HOXB7	24,06	21,74	7,69	5,91	-1,78	3,434261746
3.çalışma	HOXB7	23,1	22,63	6,73	6,8	0,07	0,952637998
4.çalışma	HOXB7	24,77	22,52	8,4	6,69	-1,71	3,271608234
	Beta-aktin ort.CT	16,37	15,83				

EK-7 Skov-3 Hücre Hattı Rt-Qpcr Sonuçlarına Göre Gen İfadesi Analizi

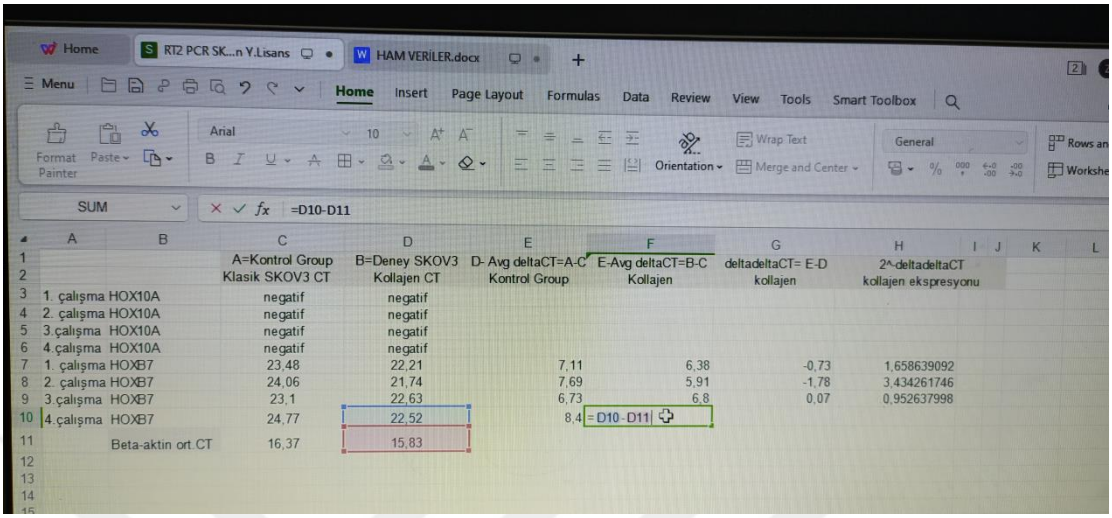
2^Deltadelta Ct Hesaplama

HOXB7 geni kontrol grubu Ct değerinin housekeeping gen Beta-aktin Ct değerine göre normalize edilmesi



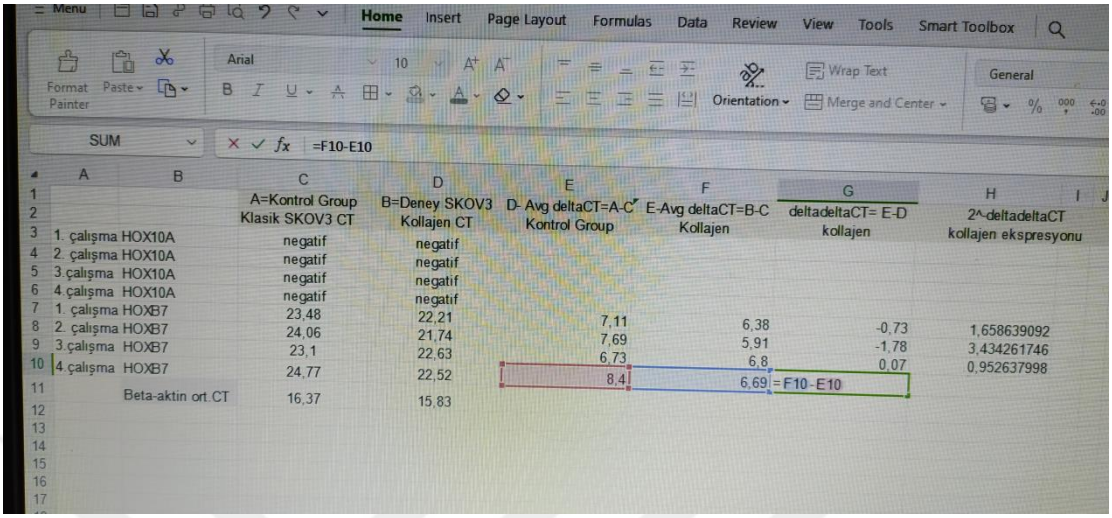
	A	B	C	D	E	F	G
1			A=Kontrol Group Klasik SKOV3 CT	B=Deney SKOV3 Kollajen CT	D- Avg deltaCT=A-C Kontrol Group	E-Avg deltaCT=B-C Kollajen	deltadeltaCT= E-D kollajen
3	1. çalışma	HOX10A	negatif	negatif			
4	2. çalışma	HOX10A	negatif	negatif			
5	3.çalışma	HOX10A	negatif	negatif			
6	4.çalışma	HOX10A	negatif	negatif			
7	1. çalışma	HOXB7	23,48	22,21	7,11	6,38	-0,73
8	2. çalışma	HOXB7	24,06	21,74	7,69	5,91	-1,78
9	3.çalışma	HOXB7	23,1	22,63	6,73	6,8	0,07
10	4.çalışma	HOXB7	24,77	22,52	=C10-C11		
11		Beta-aktin ort.CT	16,37	15,83			

EK-8 HOXB7 Geni Deney Grubu Ct Değerinin Housekeeping Gen Beta-Aktin Ct Değerine Göre Normalize Edilmesi



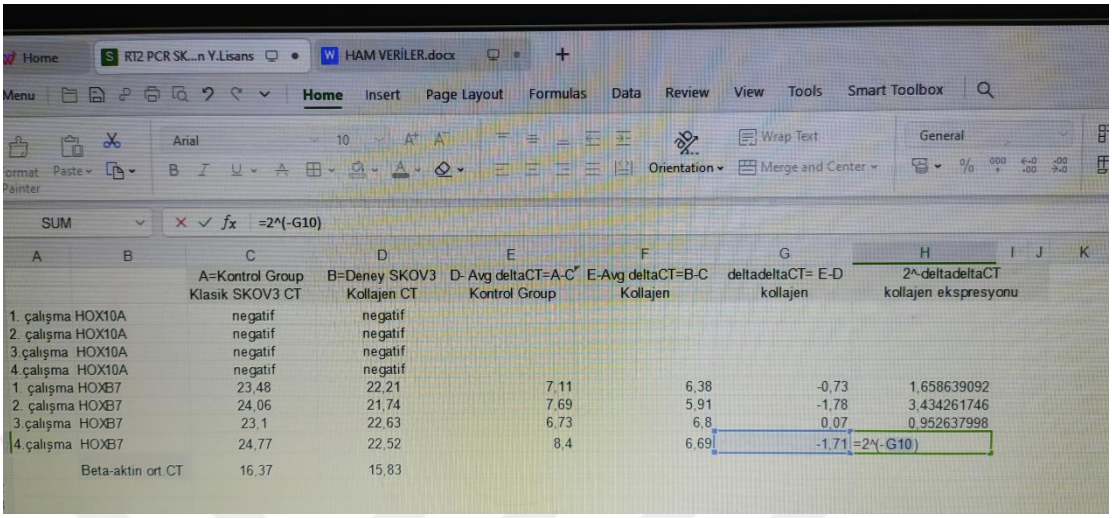
	A	B	C	D	E	F	G	H
1			A=Kontrol Group	B=Deney SKOV3	D- Avg deltaCT=A-C	E-Avg deltaCT=B-C	deltadeltaCT= E-D	2^-deltadeltaCT
2			Klasik SKOV3 CT	Kollajen CT	Kontrol Group	Kollajen	kollajen	kollajen ekspresyonu
3	1. çalışma	HOX10A	negatif	negatif				
4	2. çalışma	HOX10A	negatif	negatif				
5	3.çalışma	HOX10A	negatif	negatif				
6	4.çalışma	HOX10A	negatif	negatif				
7	1. çalışma	HOXB7	23,48	22,21	7,11	6,38	-0,73	1,658639092
8	2. çalışma	HOXB7	24,06	21,74	7,69	5,91	-1,78	3,434261746
9	3.çalışma	HOXB7	23,1	22,63	6,73	6,8	0,07	0,952637998
10	4.çalışma	HOXB7	24,77	22,52	8,4	=D10-D11		
11		Beta-aktin ort.CT	16,37	15,83				

EK-9 HOXB7 Geni Deney Grubu Delta CT Değerinden Kontrol Grubu Delta CT Farkını Bularak Deltadeltact'yi Hesaplama



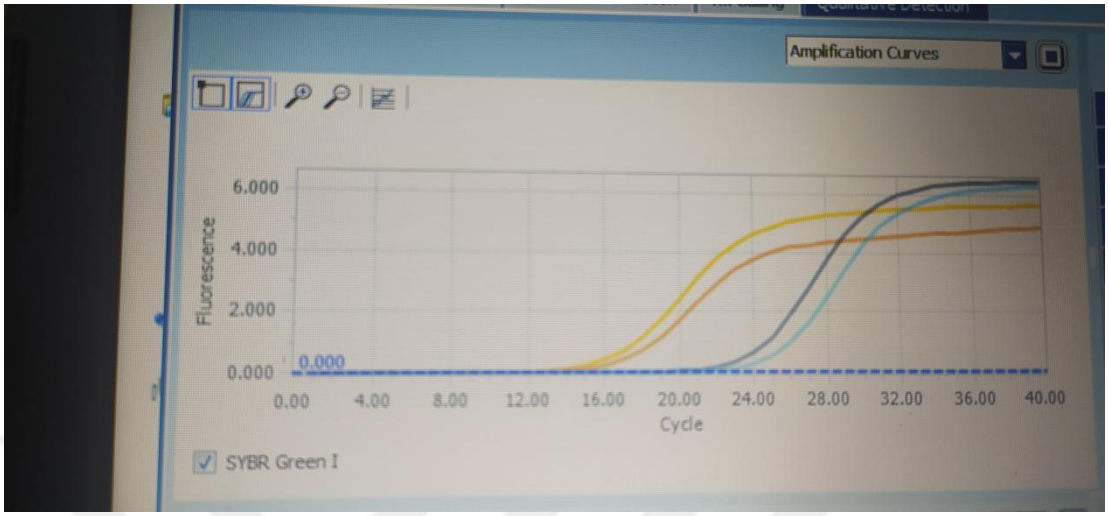
	A	B	C	D	E	F	G	H
1			A=Kontrol Group Klasik SKOV3 CT	B=Deney SKOV3 Kollajen CT	D- Avg deltaCT=A-C Kontrol Group	E-Avg deltaCT=B-C Kollajen	deltadeltaCT= E-D kollajen	2^-deltadeltaCT kollajen ekspresyonu
3	1. çalışma HOX10A		negatif	negatif				
4	2. çalışma HOX10A		negatif	negatif				
5	3.çalışma HOX10A		negatif	negatif				
6	4.çalışma HOX10A		negatif	negatif				
7	1. çalışma HOXB7		23,48	22,21	7,11	6,38	-0,73	1,658639092
8	2. çalışma HOXB7		24,06	21,74	7,69	5,91	-1,78	3,434261746
9	3.çalışma HOXB7		23,1	22,63	6,73	6,8	0,07	0,952637998
10	4.çalışma HOXB7		24,77	22,52	8,4	6,69	=F10-E10	
11		Beta-aktin ort.CT	16,37	15,83				

EK-10 HOXB7 Geni İfadesinin Deney Grubunda Kontrol Grubuna Göre Karşılaştırmalı Sonucu 2^(-Deltadeltact) Değerinin Hesaplama

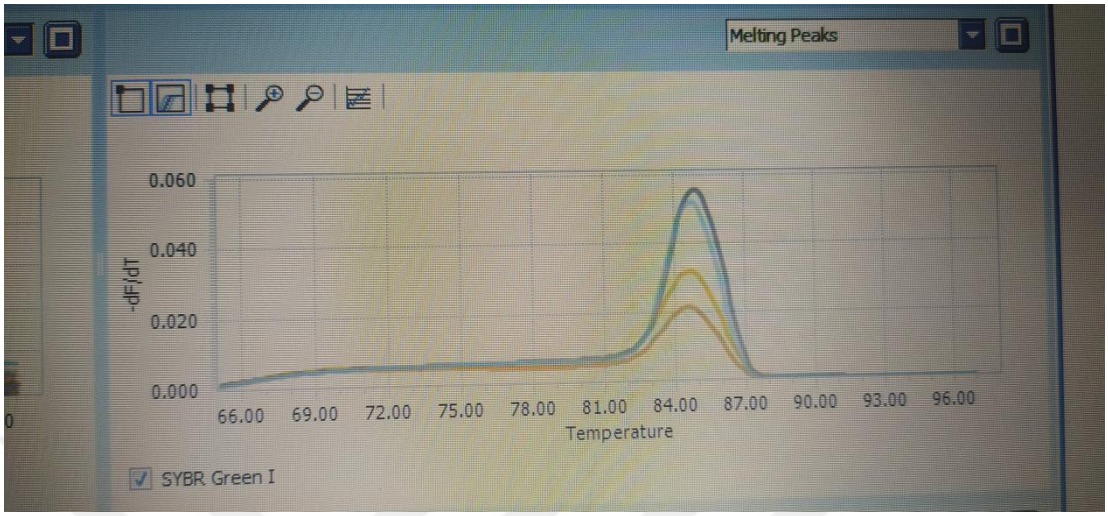


	A=Kontrol Group Klasik SKOV3 CT	B=Deney SKOV3 Kollajen CT	D- Avg deltaCT=A-C Kontrol Group	E-Avg deltaCT=B-C Kollajen	deltadeltaCT= E-D kollajen	2^-deltadeltaCT kollajen ekspresyonu
1. çalışma HOX10A	negatif	negatif				
2. çalışma HOX10A	negatif	negatif				
3.çalışma HOX10A	negatif	negatif				
4.çalışma HOX10A	negatif	negatif				
1. çalışma HOXB7	23,48	22,21	7,11	6,38	-0,73	1,658639092
2. çalışma HOXB7	24,06	21,74	7,69	5,91	-1,78	3,434261746
3.çalışma HOXB7	23,1	22,63	6,73	6,8	0,07	0,952637998
4.çalışma HOXB7	24,77	22,52	8,4	6,69	-1,71	=2^(-G10)
Beta-aktin ort.CT	16,37	15,83				

EK-11 SKOV-3 RT-Qpcr (Roche 96 Light Cycler) Kontrol Ve Deney Grubuna Ait Amplikasyon Ölçüm Ekranı



EK-12 SKOV-3 RT-Qpcr (Roche 96 Light Cycler) Kontrol Ve Deney Grubuna Ait Melting Analiz Ekranı



ÖZGEÇMİŞ

Azize ERASLAN

Eğitim

Derece	Yıl	Üniversite, Enstitü, Anabilim/Anasanat Dalı
Yüksek Lisans	2023	Maltepe Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Disiplinlerarası Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans
Ön Lisans	2021	İstanbul Üniversitesi- Adalet
Lisans	2014	İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi- Biyoloji

İş/İstihdam (Varsa)

Yıl	Görev
2022-Halen	Maltepe Üniversite Hatanesi Tüp Bebek Merkezi-Biyolog
2016-2018	Özel İbni Sina Okulları- Biyoloji ve Sağlık Öğretmeni