

T.C.

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KRONİK BOR ETKİSİNDE KALAN VE KALMAYAN KADINLARIN
EKSFOLİYE SERVİKS HÜCRELERİNDE MİKRONÜKLEUS
SIKLIĞININ KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hatice YILDIRIM

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ

MANİSA

HAZİRAN 2014

YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA TUTANAĞI

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Hatice YILDIRIM'ın Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı **“Kronik Bor Etkisinde Kalan ve Kalmayan Kadınların Eksfoliy Serviks Hücrelerinde Mikronükleus Sıklığının Karşılaştırılması”** başlıklı bu çalışma jürimizce Lisansüstü Eğitim Öğretmenliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek KABUL kararı verilmiştir. 26.06.2014

İmza

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ (Tez Danışmanı)

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Selim UZUNOĞLU

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Berrin TUĞRUL

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU

TEŐEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim süresince ve tezimin hazırlanmasında bana destek veren, bilgi ve birikimiyle benden değerli fikirleri esirgemeyen, Tıbbi Biyoloji ve Genetik alanında en iyi şekilde yetişmemi sağlayan çok değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ'a, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na geldiğim günden beri her konuda yardım ve desteklerini benden esirgemeyen çok değerli hocalarım Prof. Dr. F. Sırrı ÇAM ve Yard. Doç. Dr. Nuray ALTINTAŐ'a,

Tezimdeki materyallerin patolojik değerlendirmesini yapan Prof. Dr. Ali KÜPELİOĞLU'na istatistik analizinin yapılmasında yardımcı olan Doç. Dr. Ekrem ERĐİN'e, yüksek lisans eğitimim boyunca her başım sıkıştığında yardımına koŐan Dr. Seda ÖRENAY BOYACIOĞLU'na,

Yüksek lisans arakadaŐım Onat GÜL'e tanıştığımız günden itibaren manevi desteğini benden hiç esirgemeyen, çok kıymetli arkadaŐım Müjde KIVANÇ'a,

Bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan hayatım boyunca her konuda ve durumda yanımda olan ve benden desteklerini esirgemeyen sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hatice YILDIRIM

ÖZET

Son yıllarda yapılan araştırmalar bor ve türevlerinin prostat, meme, akciğer ve serviks kanseri gibi bazı kanser türlerini oluşmasını önleyici ve tedavi edici potansiyelinin olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan Mikronükleus (MN) frekansı kanserli hücrelerde genomik karasızlık nedeniyle yüksek bulunmaktadır. Bu bağlamda bor maruziyetindeki bireylerde doz eşiğine bağlı olarak MN frekansının düşük olması beklenir. Ayrıca günümüzde kanserin tedavisinin yanında erken tanısı da oldukça önemlidir. (MN) testinin kanserin erken tanısında biyomarkır olarak kullanılabileceğini ileri sürülmektedir. Bu nedenle bilinen MN boyama yöntemlerinin yanı sıra servikal patolojik tanı için kullanılan PAP boyamanın MN değerlendirilmesi yönünden dikkate alınabilmesi tarama ve tanı programlarının etkinliğini artıracacağı beklenebilir.

TÜBİTAK tarafından desteklenen bir proje kapsamında (proje no.111S177) 1046 kadında (bor bölgesinden 534, kontrol bölgesinden 512) serviks kanseri taraması yapılmıştır. Bu tarama sonucu 15 HPV (Human Papillomavirüs) pozitif ve 36 ASCUS (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) vakası belirlenmiştir. Araştırmamız saptanan olguların temelinde planlanmıştır. Çalışma evreni tarama sırasında belirlenen HPV pozitif ve ASCUS olgularından oluşmaktadır. Ayrıca, rastgele seçilen bor bölgesinden 10, bor dışı bölgeden 10 olmak üzere toplam 20 kadın kontrol grubu olarak araştırmaya dahil edilmiştir. Böylece, bu araştırmaya toplam 71 kadın katılmıştır. 71 kadının servikal sürüntü örnekleri PAP (Papanicolaou) ve MGG (May- Grünwalds- Giemsa) yöntemine göre boyandıktan sonra 1000 hücrede Mikronükleus (MN) sayımı yapılmıştır. Daha sonra boyama yöntemine göre elde edilen sonuçlar istatistik yönden değerlendirilmiştir. Bor bölgesi ve kontrol bölgesi (bor dışı bölge) HPV pozitif ve ASCUS'lu kadınların smear örnekleri PAP ve MGG yöntemine göre boyanmıştır.

Bor etkeni göz önüne alınarak her iki bölgedeki herhangi bir servikal virütik ve patolojik bulgusu olmayan normal olgular arasında MN sayısı bakımından herhangi bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). Her iki bölgedeki HPV pozitif ve ASCUS'lu olguların smear örnekleri farklı boyama sonuçları MN sayısı bakımından karşılaştırıldığında, istatistik yönden önemli bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). Bölge farkını dikkate almaksızın toplam HPV pozitif ve ASCUS'lu olguların smear örneklerinin MN sayısı bakımından karşılaştırması sonucunda, iki boyama yöntemi arasında istatistik yönünden anlamlı fark bulunamamıştır. ($P>0,05$).

Bizim bulgularımız insanda 5.27 mg/günlük bor maruziyetinin MN insidansına bir etkisinin olmadığını gösterirken, PAP boyanmış prepartlarda MN değerlendirilmesinin MGG boyanmış prepartalarda MN değerlendirilmesi kadar güvenilir olduğunu işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bor, Serviks Kanseri, Mikronükleus, PAP boyama, MGG boyama

ABSTRACT

Studies performed in the recent years have showed that boron and its derivatives have curable and inhibiting effect on formation of some cancers types as prostate, breast, lung and cervical cancer. On the other hand, Micronucleus (MN) frequency is highly found in cancerous cells because of the genomic instability. In this sense, it is expected that MN frequency is low based on dose threshold in people in exposure to boron. Moreover, nowadays early diagnosis is also very important besides treatment of cancer. It is put forward that MN test can be used as biomarker in the early diagnosis of cancer. That's why, it is expected that taking PAP staining, besides MN staining methods, used for cervical pathological diagnosis into consideration increases effectiveness of screening and diagnosing programs in terms of MN assessment.

In a project supported by TUBITAK (Project no.111S177) 1046 women (534 from boron region, 512 from the control region) were screened for cervical cancer. End of this screening, 15 HPV (+) and 36 ASCUS (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) cases were identified. Our research was planned on the basis of detected cases. Working univers consist of HPV-positive and ASCUS cases identified during screening. In addition, randomly selected 10 from boron region, 10 from auth of boron region, totally 20 women have been included in the study as control group. Thus, totally 71 women participated in this study. After the swab samples of 71 women were stained according to PAP (Papanicolaou) and MGG (May- Grünwalds- Giemsa) methods, in 1000 cells micronucleus (MN) counts was performed. Then, the results obtained from the staining process were evaluated statistically. Smear samples of the women with HPV positive and ASCUS in boron and the control region (auth of boron region) were stained according to PAP and MGG methods.

There is not any differences in MN numbers between normal cases which has not any cervical viral and pathological diagnosis in the both region having regard to the boron factor($P>0,05$). When different staining results of smear samples of HPV positive and ASCUS cases in the both region compared in terms of MN number, any significant statistical difference was not found. ($P>0,05$). Without thinking regional difference, there is not any significant stastically difference between the both staining method in the result of comparing smear samples of HPV positive and ASCUS cases in terms of MN number. ($P>0,05$). Our finding indicates that MN assessment in PAP dyed preparts is as reliable as MN assessment in MGG dyed preparts whereas it shows that boron exposition for 5.27 mg/day in people has not any effect MN incidence.

Key Words: Boron, Cervical Cancer, Micronucleus, PAP staining, MGG staining

KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AGC	Atipik glandüler hücreler
ASC	Atipik skuamöz hücreler
ASCUS	Önemi belirsiz atipik yassı epitel hücreleri (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance)
BA	Borik Asit
BB	Bor Bölgesi
BD	Bordışı Bölge
BDH	Boraks Dekahidrat
BNCT	Boron Neutron Capture Therapy
BO	Bor Oksit
BP	Boraks Pentahidrat
CAb	Yapısal Kromozom Aberasyonu
CBMN	Sitokinezi Bloklanmış Mikronükleus Testi
CIN	Servikal İntraepitelyal Neoplazi (Cervical Intraepithelial Neoplasia)
Cyt-B	Sitokalsin-B
DM	Double minute
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörünü
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
HGSIL	İleri derecede skuamöz intraepitelyal lezyon (High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion)
HIV	Human Immun Deficiency Virus
HPV	Human Papilloma Virus
HR HPV	Yüksek Riskli Human Papillomavirüs (High risk HPV)
HSV	Herpes Simplex Virüs
HUMN	Human Micronucleus Project
ICTV	Uluslararası Virüs Taksonomi Konseyi (International Council on Taxonomy of Viruses)

KVH K	Kardiyovasküler hastalıklar
KETEM	Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezleri
LA	Linear Array
LCR	Long Control Region
LGSIL	Düşük derecede skuamöz intraepitelyal lezyon (Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion)
LR HPV	Düşük Riskli Human Papillomavirus (Low risk HPV)
LCR	Long control region
MGG	May- Grünwalds Giemsa
MN	Mikronükleus
MTA	Maden Tetkik Arama
NPB	Nükleoplazmik Köprü (Nucleo Plasmic Bridge)
ORF	Açık Okuma Çerçevesi (Open Reading Frame)
Pa	Polyadenylation
PAP	Papanicolaou Smear (Pap Smear)
PBL	Periferel Kan Lenfositleri
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Erken Promotor
PL	Geç Promotor
PSA	Prostat Spesifik Antijen
PVs	Papillomavirüsler
Rb	Retinoblastoma
SB	Susuz Boraks
SCJ	Skuamo-kolumnar birleşke (Squamo-columnar Junction)
SIL	Skuamöz İntraepitel Lezyon
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SS	Tek şeritli (single stranded)
T-zone	Transformasyon bölgesi
URR	Upstream Regulatory Region
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)

CİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1	Dünya’ da en çok bor (B_2O_3) rezervi bulunan ülkeler	6
Çizelge 2	Dünya ham borat üretim miktarının zamanla değişimi	7
Çizelge 3	Ticari önemi olan bor mineralleri ve bileşiklerinin önemli kullanım alanları	10
Çizelge 4	Ülkeler bazında günlük alınan bor miktarı	12
Çizelge 5	Erkek farelerin besinlerine katılan 9000 ppm borik asit (1575 ppm bor) ile 7 gün sonunda dokulardaki bor düzeyi	15
Çizelge 6	Bor bölgesinde HPV (+), ASCUS ve Kontrol grubuna ait toplam MN sayım sonuçları	55
Çizelge 7	Kontrol bölgesinde HPV (+), ASCUS ve Kontrol grubuna ait toplam MN sayım sonuçları	56
Çizelge 8	Bor ve Kontrol bölgesinde saptanan HPV (+) ve ASCUS’ lu olgularda MN sayılarının karşılaştırması	56
Çizelge 9	Kontrol gruplarında saptanan MN sayılarına göre Bor ve Bor dışı bölgenin karşılaştırılması	57
Çizelge 10	Bor ve bor dışı bölgedeki HPV (+) ve ASCUS’ lu olgularda MN sayısının iç kontrol grupları ile karşılaştırılması	57
Çizelge 11	Tüm bölgede olgu gruplarının kendi aralarında karşılaştırılması	58
Çizelge 12	MN İndüksiyonun Saptanmasında PAP ve MGG boyalı örneklerde MN sayısının karşılaştırılması	59
Çizelge 13	Boyama yöntemlerinin bölgeler arası çapraz karşılaştırılması	59

SEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1	Dünya'daki önemli bor yatakları	5
Şekil 2	Dünya'daki başlıca bor rezervleri ve yüzde olarak miktarları	6
Şekil 3	Dünya'da ve Türkiye'de bor üretim oranı	7
Şekil 4	Türkiye'de bulunan en zengin bor alanları	8
Şekil 5	İnsan Papillomavirüsünün (HPV) ikosahedral simetrisini gösteren şematik tasviri	22
Şekil 6	Alfa Papillomavirüs genom organizasyonu	23
Şekil 7	118 Papillomavirüs tipinin dizisini içeren filogenetik ağaç	24
Şekil 8	HPV tiplerine göre serviks kanseri, Dünya'da HPV genotiplerinin prevalansı	26
Şekil 9	Dünya'da HPV tip- spesifik prevalans	27
Şekil 10	HPV'nin konak DNA'sına integrasyonu ile erken ve geç gen bölgelerinde oluşan kırılma	28
Şekil 11	HPV E6 ve E7 proteinlerinin tümör baskılayıcıları (p53 ve Rb) üzerindeki etkileri	29
Şekil 12	HPV'nin yaşam döngüsü	30
Şekil 13	Sadece bukkal hücrelerde MN testini kullanan laboratuvar ve yıllık makale sayısındaki artış	40
Şekil 14	Nükleus bölünmesi sırasında MN ve NPB oluşum mekanizması	41
Şekil 15	Servikal smear örneklerinin PAP boyalı preparatlarında eksfoliy hücrelere ait genel görüntü	53
Şekil 16	Servikal smear örneklerinin MGG boyalı preparatlarında eksfoliy hücrelere ait genel görüntü	54
Şekil 17	PAP yöntemi ile boyanmış preparatlarda MN saptanan eksfoliy hücre görüntüsü	54
Şekil 18	MGG yöntemi ile boyanmış preparatlarda MN saptanan eksfoliy hücre görüntüsü	55

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	2
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Bor	4
2.1.1. Dünya’da ve Türkiye’de Bor	4
2.1.2. Borun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	8
2.1.3. Çeşitli Ortamlarda Bor Düzeyi ve İnsanların Teması	9
2.1.3.1. Havada	10
2.1.3.2. Suda	11
2.1.3.3. Besinlerde	11
2.1.4. Absorbsiyon (Emilim)	13
2.1.4.1. Gastrointestinal Emilim	13
2.1.4.2. Solunum Yolu ile Emilim	13
2.1.4.3. Dermal Emilim	14
2.1.5. Borun Vücutta Dağılımı	14
2.1.6. Borun Metabolizması	15
2.1.7. Borun Vücuttan Atılması (Eliminasyonu)	16
2.1.8. Bor Toksikitesi	16
2.1.9. Genotoksisite Çalışmaları	18
2.1.10. Bor ve Kansere İlişkisi	18
2.2. Serviks (Rahim Ağzı) Kanseri	19
2.2.1. Tarihçe	20
2.2.2. Human Papilloma Virüs (HPV) ve Yapısı	21
2.2.3. HPV Sınıflandırması	24
2.2.4. HPV Replikasyonu, Entegrasyon ve Yaşam Döngüsü	27
2.2.5. Serviks Kanserinin Risk Faktörleri	31
2.2.5.1. HPV Enfeksiyonu	31
2.2.5.2. Cinsel Aktivite	31
2.2.5.3. Partner Sayısı	31
2.2.5.4. Yaş	32

2.2.5.5. Irk	32
2.2.5.6. Düşük Sosyo-Ekonomik Düzey	32
2.2.5.7. Sigara	32
2.2.5.8. İmmünoşüpresif İlaç Kullanımı	33
2.2.5.9. HIV Enfeksiyonu	33
2.2.5.10. Oral Kontraseptif Kullanımı	33
2.2.5.11. Diyet (Vitamin Eksikliği)	33
2.2.5.12. Aile Öyküsü	34
2.2.6 Serviksin Premalign Lezyonları	34
2.2.7. Servikal Tarama Yöntemleri	36
2.2.8. Viral Karsinojenezis	36
2.2.9. HPV ve Genotoksosite İlişkisi	37
2.3. Mikronükleus (MN)	38
2.3.1. Mikronükleus Tekniğinin Gelişimi	38
2.3.2. MN ve NPB Oluşum Mekanizması	41
2.3.3. Mikronükleus Hesaplama Kriterleri	43
2.3.4. MN ve Kanser	44
2.3.5. MN ve Radyasyon	45
2.3.6.Çalışmada Kullanılacak Boyaların Özellikleri	46
2.3.6.1. PAP (Papanicolaou) Boyasının Özellikleri	46
2.3.6.2. PAP Boyasında Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar	47
2.3.6.3.May-Grünwald - Giemsa Boyasının Özellikleri	47
3. GEREÇ VE YÖNTEM	48
3.1. MN için Çalışma Bölgesi ve Örnek Seçimi	48
3.2. Kullanılan Malzemeler	49
3.3. Kullanılan Cihazlar	49
3.4. Kullanılan Çözeltiler	50
3.4.1.Fiksatif Çözeltisinin Hazırlanışı	50
3.4.2.Giemsa Boya Çözeltisinin Hazırlanışı	50
3.5. Servikal PAP Smear Testi	50
3.6. Servikal Sürüntü Örneklerinin May-Grünwald - Giemsa Boyaması	51
3.7. MN Sayımı	52
4. BULGULAR	53

4.1 Çalışmaya Alınan Olguların Demografik Bilgileri	53
4.2. Olgularda PAP ve MGG Boyama Yöntemine Göre Saptanan Ortalama MN Sayıları	53
4.3. Bor ve Kontrol Bölgesinde Saptanan HPV (+) ve ASCUS' lu Olgularda MN Sayıları	56
4.4. Bölgelerin Kendi İçinde PAP ve MGG Boyanma Yöntemine Göre Olguların Karşılaştırması	57
4.5. Bor Faktörü Dikkate Alınmaksızın Olgu Gruplarının Kendi İçinde Karşılaştırılması	58
4.6. MN İndüksiyonun Saptanmasında PAP ve MGG Boyama Yöntemlerinin Karşılaştırılması	58
4.7. Bor ve Bor Dışı Bölgelerde HPV pozitif ve ASCUS lu Olgular Temelinde MN İndüksiyonun İki Boyanma Yöntemiyle Karşılaştırılması Sonuçları	59
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	60
6. KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	80

Bu Yüksek Lisans tezinde TÜBİTAK 111S177 no'lu projenin koleksiyon materyalleri kullanılarak asıl projeye ekbilgiler elde edilmiştir. Bu projeye Yüksek Lisans tezini yapan Hatice YILDIRIM' da katılmıştır.

1.GİRİŞ

Son yıllarda yapılan araştırmalar bor ve türevlerinin değişik kanser türlerinin oluşmasını önleyici ve tedavi edici potansiyelinin olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan her ne kadar kanserde tedavi potansiyeli olabilecek ajanlara ulaşmak asıl hedef olmakla birlikte günümüzde kanserin erken tanısının yadsınamaz yaşamsal bir önemde olduğu görülmektedir. Bu amaçla araştırmaların önemli bir bölümü kanserin erken tanısında belirteç olabilecek yöntemlerin ve yaklaşımların araştırılmasına ayrılmaktadır.

Bor ve türevleriyle yapılan daha önceki çalışmalarda prostat, meme, akciğer ve serviks gibi kanser türlerinde etkin olabileceği yönünde bulgular ortaya çıkmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bor elementinin anti kanserojen etkisinden dolayı bor insidansı ile kanser insidansı arasında ters bir ilişki olduğunu ortaya çıkarmıştır (1,2).

Mikronükleus testinin kanser erken tanısında ve tedavi sırasındaki prognozunun izlenmesi açısından kullanılabilen yönünde araştırmalar mevcuttur. Mikronükleus hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom parçalarından köken alan oluşumlardır (3). Mikronükleus Testinin kanserin erken tanısında biyomarkır olarak kullanılabilen potansiyeline sahip olabileceği yönünde araştırmalar mevcuttur.

Serviks kanseri kadınları etkileyen en yaygın kanserlerden biridir. Meme, kolorektal ve akciğer kanserlerinden sonra kadınları etkileyen 4. kanserdir. Her yıl Dünya’da yaklaşık olarak 528,000 kadın serviks kanserine yakalanmaktadır. Dünya’da 2012 yılında 266,000 kadın bu kanserden hayatını kaybetmiştir (4). Türkiye’de ise serviks kanseri onuncu sırada olup, insidansı 100.000 kadında 4,5’tur (5). Kadın genital kanserleri arasında tarama programı olan ve de bu nedenle teorik olarak önlenbilir bir kanser olmasına rağmen özellikle gelişmekte olan ve de geri kalmış ülkelerde önemli bir sağlık sorunu olarak güncelliğini korumaktadır.

Servikal kanser, prekanseröz aşamalardan geçtikten sonra invaziv lezyon haline gelmektedir. Bu nedenle servikal kanserlerin premalign aşamada yakalanması ve tedavi edilmesi, insidans ve mortaliteyi düşürecektir. Son yıllarda PAP Testi ile yapılan taramalar,

serviks kanserinde bir azalmanın olduğunu göstermektedir. Ancak bu azalma yeterli düzeyde değildir.

Bu araştırma da öncelikle, bor ve bor dışı olgulardan oluşan serviks HPV pozitif uyarımlı ve prekanseriyöz olgularının değerlendirilmesinde biyomarkır olarak MN testinin katkısını ve borun bu alanda etkisinin olup olmadığını ortaya koymaktır. Ardından PAP boyama ve MGG boyama sonuçları karşılaştırılarak aralarında mikroçekirdek indüksiyonu yönünde herhangi bir fark olup olmadığını saptamaktır.

Bu çalışmada kromik bor etkisinde kalan ve kalmayan kadınların eksfoliye serviks hücrelerinde Papanicolaou (PAP) ve May- Grünwalds-Giemsa (MGG) boyanan preparatlarda, bor maruziyetinin MN sıklığına etkinin belirlenmesi yanı sıra her iki boyama yönteminin duyarlılığı test edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bor

Bor mineralinin çok eskiden beri kullanıldığı bilinmektedir. Bugün Dünya genelinde bilimsel ve teknolojik gelişmelerin getirdiği güncel uygulamalara bakıldığında borun çok geniş bir kullanım alanı olduğu görülmektedir (6). Bu nedenle pek çok sektörü ve teknolojik alanı yakından ilgilendiren bir elementtir. Kullanım alanları ve ülkemizin sahip olduğu zengin bor yatakları birlikte düşünüldüğünde, borun ülkemiz için son derece önemli olduğu anlaşılabacaktır (7).

Borun, canlılar için mikro besin elementleri arasında önemli bir yeri vardır. Mikro elementler, canlılar için mutlaka gereklidir. Çok az miktarlarda optimum tesiri sağlamak için yeterlidirler (8). Ancak fazlalığı toksik etki yapar (9). Bitkiler için toksik etkilerinden dolayı herbisit olarak kullanılır (10, 11).

Üretilen bor minerallerinin en önemli kullanım alanları, ülkelere göre değişmekle birlikte deterjan sanayi, cam ve cam elyafı sanayi, seramik sanayi, demir-çelik sanayi, çimento sanayi, nükleer uygulamalar, uzay ve havacılık sektörü, enerji, sağlık, inşaat ve tarımdır. Borik asit ve borun sodyum tuzu (boraks ya da açık adı ile disodyum tetraborat dekahidrat) en çok kullanılan bor bileşikleridir (7, 12).

Sağlık açısından ele alındığında bor, mineral ve hormonal metabolizmada hücre membranı işlevlerinde ve enzim reaksiyonlarında önemli rol oynayan bir elementtir (9, 13). Keza bor osteoporoz, diyabet ve kalp rahatsızlıklarını etkiler, kalsiyum ve kemik metabolizmasında yer alır (13).

2.1.1. Dünya' da ve Türkiye'de Bor

Dünyada önemli bor yatakları Asya kıtasında ve daha az olarak da Amerika kıtasında bulunmaktadır (Şekil 1). Bor üreten önemli iki ülke olan Türkiye ve ABD' dir. Dünya'daki üretimin yaklaşık % 90'nını gerçekleştirmektedirler. Bor üreten diğer önemli ülkeler Rusya, Çin ve Kazakistan'dır (2, 13, 14-17).

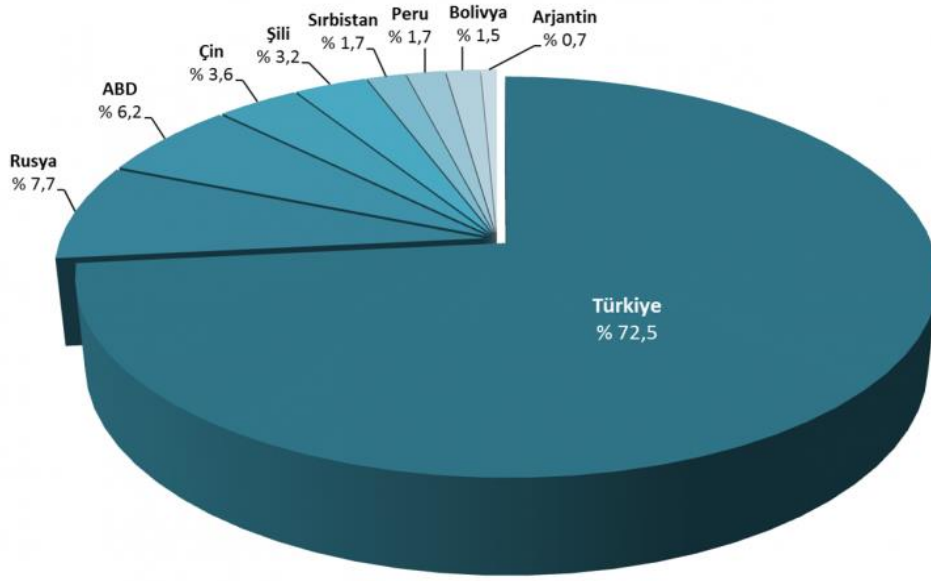


Şekil 1. Dünya’da önemli bor yatakları (14)

Türkiye’de kolemanit, üleksit ve boraks mineralleri, borik asit, boraks dekahidrat, boraks pentahidrat, sodyum perborat monohidrat ve susuz boraks ticari olarak üretilmekte ve üretimin büyük bir bölümü ihraç edilmektedir. Dünya’da ve ülkemizde borat cevheri yataklarının bilinen ve tahmin edilen miktarları ülkelere göre Çizelge 1’de verilmiştir.

Toplam rezervde ülkemiz %72.20’lik pay ile birinci sıradadır. Ülkemizi, %8.50’lik pay ile Rusya ve onu da sırası ile ABD, Çin, Kazakistan ve Şili takip etmektedir (13,14). Bazı kaynaklarda ise %7.7’i ile Rusya ve %6.2 ile ABD sıralanmaktadır (Şekil 2) (18). Bor üretim oranlarına baktığımızda ise ülkemiz %47,2’lik pay ilk sırada yer almaktadır (Şekil 3) (19).

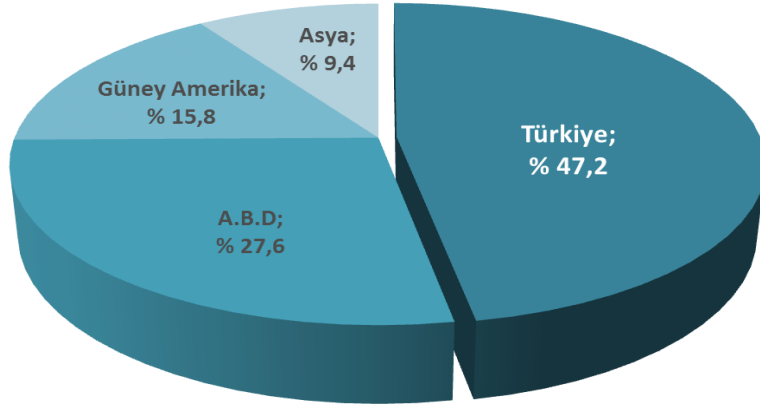
Türkiye’de boraks elde edilmesi 1850’li yıllarda başlar. Yabancılar tarafından işletilmeye başlanan ilk boraks alanı Balıkesir, Susurluk, Sultançayırı mevkidir. 1935 yılında kurulan Etibank da bor ile ilgilenmeye başlamıştır. MTA’nın Emet ilçesinde linyit arama faaliyetleri sırasında kolemanit yatağı bulunmuştur.



Şekil 2. Dünya'daki başlıca bor rezervleri ve yüzde olarak miktarları (18)

Çizelge 1. Dünya'da en çok bor (B₂O₃) rezervi bulunan ülkeler (13, 14, 19)

Ülke	Görünür Ekonomik Rezerv (bin ton)	Muhtemel Rezerv (bin ton)	Toplam Rezerv (bin ton)	Toplam Rezervdeki Pay
Türkiye	227.000	624.000	851.000	72,20
Rusya	40.000	60.000	100.000	8,50
ABD	40.000	40.000	80.000	6,80
Çin	27.000	9.000	36.000	3,10
Kazakistan	14.000	1.000	15.000	1,30
Şili	8.000	33.000	41.000	3,50
Peru	4.000	18.000	22.000	1,90
Bolivya	4.000	15.000	19.000	1,60
Sırbistan	3.000	0	3.000	0,30
Arjantin	2.000	7.000	9.000	0,80
TOPLAM	369.000	807.000	1.176.000	100,0



Şekil 3. Dünya’da ve Türkiye’de bor üretim oranı (%) (19)

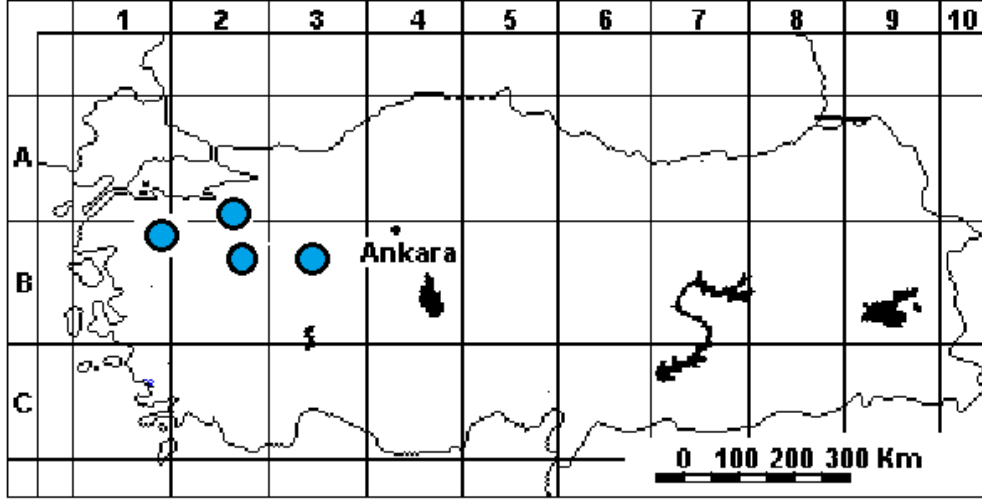
Etibank bor işletme ruhsatı aldıktan sonra 1958 ve 1959 yıllarında aramalarını sürdürürken aynı zamanda üretime de başlamıştır. 1955 yılından sonra yabancı şirketlere de işletme ruhsatı verilmiştir (1, 14, 15). Türkiye ve diğer ülkelerde yıllara göre borat üretim miktarları Çizelge 2’de verilmiştir.

Çizelge 2. Dünya ham borat üretim miktarının zamanla değişimi (1000 ton B₂O₃) (13, 17).

Ülke	1970	1975	1980	1985	1990	1995	1998
Türkiye	122	242	320	259	476	435	475
ABD	510	547	710	577	608	728	619
Arjantin	11	27	55	55	50	86	123
Rusya+Kazakistan	94	140	130	130	120	106	78
Çin	31	33	27	27	75	140	140
Şili			1	2	46	74	60
Diğer			7	4	10	17	16
TOPLAM	768	989	1250	1054	1385	1586	1511

Türkiye’de bor rezervleri Bursa Mustafakemalpaşa, Kestelek köyü; Balıkesir Bigadiç; Kütahya- Emet; Eskişehir Kırka’ da bulunmaktadır (Şekil 4). Toplam tahmini 800 milyon ton olan bu rezerv, Dünya’ daki toplam bor rezervinin %72’ sini oluşturmaktadır.

Ülkemiz bugün bu rezerv ile Dünya ham bor ihtiyacının %95'ini karşılamaktadır. Tek başımıza Dünya bor ihtiyacını 400 yıl karşılayabilecek bor rezervimiz vardır (6, 13, 14, 19, 20).



Şekil 4. Türkiye’de bulunan en zengin bor alanları (orjinal)

Türkiye’de boratların tüketimi çok düşük seviyede olup, Dünya tüketiminin %1-2' si civarındadır. 2000 yılı itibariyle Türkiye’de borun %27' si demir-çelik, %12' si cam ve cam elyafı, %38' i seramik ve firit, %12'si deterjan, %5' i kimya ve %6' sı diğer sektörlerde tüketilmiştir (7).

2.1.2. Borun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Bor, B simgesi ile gösterilir. Metal ve ametal arasında bir özelliğe sahip olan bor, periyodik cetvelin beşinci elementidir. Alüminyum, galyum, indiyum ve talyumla birlikte **IIIA** grubunu oluştururlar ve grubun ilk ve en hafif elementidir (21). Atom numarası 5, atom ağırlığı 10,81' dir. Yarı iletken özelliğe sahip bir elementtir. Periyodik cetvelin temel hal elektron konfigürasyonu $1s^2 2s^2 2p^1$ dir. Elementel halde doğada bulunmayan bor, borik asit ya da borat tuzları gibi oksijen ve bazı elementlerle bileşik halinde bulunmaktadır.

Bor elementi 8B, 10B, 11B, 12B, 13B izotoplarından oluşmaktadır. En kararlı izotopları olan **10B** ve **11B** doğada yaygındır. Bu izotopların doğada bulunma oranları

sırasıyla %19.1-20.3 ve %79.7-80.9' dur. 10B izotopu, çok yüksek termal nötron tutma özelliği gösterir. Bu özelliğinden dolayı nükleer malzemeler ve nükleer enerji santrallerinde kullanılabilir. Türkiye' de 10B izotobunun oranı yüksek olan bor cevheri yatakları bulunmaktadır. Kristalize bor, görünüm ve optik özellikleri açısından elmasa benzer ve neredeyse elmas kadar serttir (11, 14, 21, 22).

Bor, yer kabuğunda yaygın olarak bulunan 51. elementtir ve hiçbir zaman serbest halde bulunmaz. O₂ ile bağ yapmaya yatkın bir element olduğu için doğada çok değişik bor-oksijen bileşiği bulunmaktadır. Bor-oksijen bileşiklerine Na, Ca, Mg gibi elementler de bağlanabilir. Bu bileşiklere genel olarak **borat** denir. Doğada yaklaşık 230 çeşit bor minerali olduğu bilinmektedir. Tinkal (Na₄B₄O₂. 10H₂O), kernit (Na₂B₄O₇. 4H₂O), kolemanit (Ca₂B₆O₁₁. 5H₂O) ve üleksit (NaCaB₅O₉. 8H₂O) önemli bor mineralleridir ve sanayide en çok kullanılanlardır. Bor, dört hidroksil iyonu ile birleşirse borat [B(OH)₄⁻], üç hidroksil iyonu ile birleşirse borik asit [B(OH)₃] oluşur. Bor minerallerinin değeri genellikle içerdikleri B₂O₃ (bor oksit) ile ölçülmekte, yüksek oranda B₂O₃ bileşiğine sahip olanlar daha değerli kabul edilmektedir. (11, 14, 22-25).

Bor doğada yaygın, ancak düşük konsantrasyonlarda bulunan bir elementtir. Şist ve bazı topraklarda 100 ppm kadar bulunduğu kaydedilmişse de genel olarak kayalarda ve toprakta 10 ppm den az bulunmaktadır. Genel olarak dünyanın kabuğunda ortalama 10 ppm bulunduğu tahmin edilmektedir. Deniz suyundaki konsantrasyonunun 0.5-9.6 ppm arasında değiştiği, ortalama olarak 4.6 ppm olduğu rapor edilmiştir. Tatlı sulardaki konsantrasyonu oldukça düşük olup 0.01-1.5 ppm kadardır (11, 25).

Bugün bor mineralleri 200'ü seçeneksiz olmak üzere 250 den fazla sanayi sektörünün binlerle ifade edilen ürün çeşitlemesine girmektedir Bor minerallerinin kullanım alanları Çizelge 3' de verilmiştir (7, 13, 14).

2.1.3. Çeşitli Ortamlarda Bor Düzeyi ve İnsanların Teması

Bor, Dünya'da en çok bulunan elementler sıralamasında 51. sırada yer almaktadır. Bor, doğal olarak boratlar şeklinde okyanuslarda, sedimenter kayalarda, kömürde, bazı topraklarda bulunmaktadır (26, 27).

Çizelge 3. Ticari önemi olan bor mineralleri ve bileşiklerinin önemli kullanım alanları

Kullanım Alanı		Mineral/Bileşik
Cam	İzolasyon cam elyafı Tekstil cam elyafı Borosilikat camları Özel camlar	Tinkal, üleksit, probertit, BDH, BP, SB, BA, Kolemanit, Tinkal, üleksit, probertit, kolemanit, BP, SB, BA, BDH, BPH, SB, BA
Cam seramikleri		Tinkal, üleksit, BDH, BP, SB, BA
Emaye, sır, frit		Tinkal, üleksit, kolemanit, BDH, BP, SB, BA, BO
Temizleme ve ağartma	Sabun, deterjan Kağıt hamuru	Sodyum perboratlar Sodyum borhidrür
Zirai uygulamalar	Gübre Yabani ot öldürücüler Böcek öldürücüler	BDH, BP, SB, BA, kolemanit, BDH, BP, BA, bakır metaborat, sodyum metaborat, BDH, BP, BA, disodyum oktaborat, glikol Boratlar
Ahşap emprenyesi		BDH, BP, BA
Alev geciktiriciler	Selülozik izolasyon malzemeleri Plastik malzemeler	BDH, BP, SB, BA Çinko boratlar, amonyum fluoborat, baryum metaborat, sodyum pentaborat
Metallurjik uygulamalar	Borürleme, Demir esaslı ve demir dışı borlu Alaşımlar, Flakslar	Bor halojenürler Susuz boraks, bor oksit, boratlar Susuz boraks, bor oksit, boratlar

İnsanların borla teması en çok besinler (birincil olarak meyve ve sebzeler) ve su ile olmaktadır. Ancak lokal olarak bor tozları ile karşılaşmak da olasıdır. Günümüzde kozmetik, insektisit, deterjan vb. gibi birçok tüketim ürünlerinin terki binde bulunduğu için bor ile temas yolları çeşitlenmiştir. Ayrıca borca zengin bölgelerde yaşayan insanların bor ile teması doğal olarak daha yüksektir (22, 26-28).

2.1.3.1. Havada

Bor, atmosferde önemli bir oranda bulunmamaktadır. Çünkü boratlar uçucu değildir ya da çok az uçucudurlar. Ancak doğal ve endüstriyel kaynaklardan atmosfere karışabilmektedir. Madenler, deniz suyu, volkanlar gibi doğal kaynaklar, cam ve seramik

sanayi, tarımda kullanılan kimyasallar, jeotermal buhar, kimya fabrikaları, roketler, kömür yakan termik santraller ve bor endüstrisi gibi endüstriyel kaynaklardan atmosfere borik asit formunda karışabilmektedir (22, 27, 28).

2.1.3.2. Suda

Bor, yüzey sularında ve yer altı sularında yaygın olarak bulunmaktadır. Konsantrasyonu lokal jeolojik formasyonlara ve antropojenik kaynaklara bağlı olarak büyük değişiklik göstermektedir. Yer altı ve yüzey sularının doğal borat içeriği genellikle düşüktür. Atık suların karışması, yüzey sularında bor miktarını artırır. Kayaların aşınması ve yıkanması ile yer altı sularında miktarı artabilir. Yer altı sularında ki oranı, yörenin bor miktarına bağlı olarak Dünya’da değişiklik gösterir ve 0.3- 100 mg/L arasında değişir. 300 mg/L ye kadar çıkabildiği belirlenmiştir. Genellikle içme suyu örneklerinin çoğunda yörenin bor miktarına bağlı olarak 0.4 mg/L bulunduğu belirlenmiştir. Dünya’nın farklı yörelerinde yer altı sularındaki bor konsantrasyonu değişmektedir. En yüksek konsantrasyon Avrupa’nın güneyinde (İtalya, İspanya) en düşük konsantrasyon ise Kuzey Avrupa’da (Danimarka, Fransa, Almanya, Hollanda ve İngiltere) bulunmuştur. İtalya ve İspanya’da ortalama bor konsantrasyonu 0.5- 1.5 mg/L arasında değişmektedir. İngiltere ve Hollanda’da 0.6 mg/L, Fransa ve Danimarka’da 0.3 mg/L, Almanya’da 0.1 mg/L olarak belirlenmiştir. Okyanuslarda borun bulunma oranı ise 4.5 mg/L dir (22, 27, 28).

2.1.3.3. Besinlerde

Borun bitkilerde bulunduğu 1857’den beri bilinmektedir. Bitkilerin hücre duvarının yapısında bulunduğu için bitkisel orijinli besinlerle alınmaktadır. Ayrıca toksik olmadığı için besinlerin korunmasında kullanılabileceği uzun yıllardan beri bilinmektedir (24, 29, 30).

Besinlerin analizi için geliştirilen son yöntemler bor miktarının belirlenmesine önemli katkı yapmaktadır (22). Bor, bitkiler için zorunlu bir elementtir. Topraktan köklerle alınır ve gıda zinciri yoluyla insana geçer. Bu nedenle bor, en fazla besinlerle alınmaktadır. Bor yönünden en zengin besinler sebzeler, meyveler, bakliyat, fındık, yerfıstığı, kuru üzüm ve elma şarabıdır. Süt ürünleri, et, balık, buğdaygiller ve patates ise bor bakımından fakirdir. Besinlerle alınan günlük bor miktarı ortalama 1,2 mg kadardır (22, 28, 29). Önemli bir bor

kaynağı olan erik kurusunun (*Prunus domestica*) 100 gramı vücudun günlük ihtiyacı olan 2-3 mg boru karşılar.

Pek çok ülkede besinlerde bulunan bor miktarı ile ilgili bilgi yoktur. Rainey vd. (1999) göre ülkeler bazında bor alınımı Çizelge 4’de verilmiştir (31).

Çizelge 4. Ülkeler bazında günlük alınan bor miktarı (31)

Ülke	Günlük alınan bor mg/gün	
	Yaşlı Erkekler	Yaşlı Bayanlar
ABD	1.11 ±0.69,	0.89 ±0.57
Almanya	1.72 ± 0.47	1.62 ± 0.76
İngiltere	1.30 ± 0.63	1.14 ± 0.55
Meksika	2.12 ± 0.69	1.75 ± 0.48
Kenya	1.95 ± 0.57	1.80 ± 0.49
Mısır	1.31 ± 0.50	1.24 ± 0.40

Besinlerin yanında çeşitli ürünlerden de bor alınmaktadır. Borik asit, boraks ve diğer boratlar tüketim ürünlerinin çok geniş bir yelpazesinde kullanılmaktadır. Borik asit ve boraksın en çok kullanıldığı yerlerden biri cam ürünleridir. Ancak camda bulunan bor serbest kalmaz.

Sodyum borat ve borik asit konsantrasyonu %5’e varan oranlarda makyaj malzemeleri, deri ve saç bakım ürünleri, deodorantlar, nemlendirici kremler, nefes parfümleri, tıraş kremleri gibi çok sayıda kozmetik üründe kullanılmaktadır (32- 34).

İnsanların yaygın kullandığı ve bor içeren ürünler sabunlar, deterjanlar, yapıştırıcılar, koruyucular, porselen, emaye ve deri endüstrileri, fotoğraf malzemeleri, insektisitler ve herbisitlerdir. Avrupa birliği ülkelerinde kişisel bakım ürünlerinden alınan borik asit miktarının, oral hijyen ürünlerinden 0.09-0,46 mg/kg-gün, göz bakım ürünlerinden 0.03 mg/kg-gün, deodorantlardan 0.25 mg/kg-gün olduğu kabul edilmektedir. Borik asit vajinal ürünler ve kontraseptiflerde de kullanılmaktadır. Bu nedenle vajinal ve bukkal mukozadan da emilmektedir (34).

Türkiye’de bor minerallerinin zengin olduğu bölgelerde günlük alınan bor miktarının 6.77 mg olduğu belirlenmiştir (26). İnsanlar tarafından alınan bor miktarının yaşa göre değiştiği gösterilmiştir. Bebeklerde 0.75 ± 0.14 mg/gün, 0-6 aylıkla bebeklerde 1.34 ± 0.02

mg/gün, 51-70 yaşındaki erkeklerde 1.39 ± 0.16 mg/gün, kadınlarda 1.39 ± 0.16 mg/gün (35).

2.1.4. Absorbsiyon (Emilim)

2.1.4.1. Gastrointestinal Emilim

Çok sayıda araştırma borik asit ve boraksın gastrointestinal yolda ve solunum sisteminden emildiğini göstermiştir. Farmakokinetik veriler genellikle borik asit şeklinde verilen borun hızla ve hemen hemen tamamının gastrointestinal yoldan emildiğini, idrar yoluyla %90'nın atılması ile göstermiştir (35).

Gönüllülerle yapılan sınırlı çalışmalarda, alınan borun %90'nın bağırsaklardan emildiği saptanmıştır. Schou vd. (36), 6 gönüllü ile yaptığı çalışmada, 131 mg borik asit uygulamış, 96 saat içinde %92-94'ünün idrar yoluyla atıldığını saptamıştır. Bu da alınan borun 96 saat içinde tamamına yakınının emildiğini göstermektedir. İki kadına borik asit olarak verilen 62 mg borun bir hafta içinde %90'nının idrarla atıldığı belirlenmiştir. İki hafta süre ile 100 mg/gün dozda bor verilen gönüllülerde, idrarla atılan miktara göre %90'nının absorbe olduğu belirlenmiştir (33, 36, 37). Gönüllülerin normal diyetine eklenen 10 mg/gün dozda borun %84'ünün idrarla atıldığı belirlenmiştir (38).

Ratlar, (39), koyunlar, (40), tavşanlar ve sığırlar (41) gibi çeşitli deney hayvanları ile yapılan çalışmalardan da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Oral temastan sonra borun kolayca absorbe olduğu gösterilmiştir. Farelere verilen borun 3 gün içerisinde %95'inin idrarla, %5'inin dışkı ile atıldığı belirlenmiştir (42).

2.1.4.2. Solunum Yolu ile Emilim

Bora maruz kalındığında solunum yolu ile de emilmektedir. Culvier vd (43) boraks üreten tesislerde borat tozları ile (boraks, boraks pentahidrat, ve susuz boraks) karşılaşan erkek işçilerde kan ve idrarda bor düzeyi ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. Boratla temas durumuna göre çalışanlar 3 gruba ayrılmıştır. Hem orta ve hem de yüksek derecede borata maruz kalan işçiler, pazartesi günü çalıştıktan sonra kanlarındaki bor düzeyinin, vardiya

öncesi ile karşılaştırıldığında (0.1:g/g). önemli oranda arttığını saptamışlardır (0.25 :g/g) (43).

2.1.4.3. Dermal Emilim

Borun deriden absorbe olmadığı yapılan çalışmalarda ortaya çıkmıştır. Toz borik asit lokal olarak gönüllülerin koluna 4 saat süreyle uygulanmıştır. Ancak idrarda bor artışına rastlanmamıştır. 1,7 ve 10 aylık bebeklere, bir ay süre ile %5 borik asit içeren talk pudrası uygulanmış (günlük doz 407 mg bor), bor uygulanmamış bebeklerle karşılaştırıldığında minimal bir fark bulunmuştur. Deney hayvanlarına toz ya da suda %5 lik çözelti şeklinde bor uygulanmış ve deriden emilmediği saptanmıştır. Ancak yaralardan çabuk emildiği farelerde gösterilmiştir. Çocuklar, yetişkin insanlar, tavşanlar ve fareler üzerinde yapılan pek çok araştırma ile borun deri (hasar görmemiş) yoluyla emiliminin olmadığı rapor edilmiştir (44).

2.1.5. Borun Vücutta Dağılımı

Çalışmalar borik asit ve borat bileşiklerinin vücutta esas olarak çözünmemiş borik asit şeklinde $B(OH)_3$, az miktarda da $B(OH)_4$ anyonu olarak bulunduğunu göstermiştir. Yine çalışmalar vücutta bulunan borun tüm yumuşak dokularda yaklaşık olarak düzenli dağıldığını göstermiştir. Ancak kemikte birikimin fazla olduğu gözlenmiştir (26, 45).

Ku vd.(46) erkek ratları 7 gün 9000 ppm borik asit (1575 ppm bor) ile beslemiş, dokulardaki birikimi ile ilgili elde ettiği veriler Çizelge 5’de verilmiştir. Çizelge 5 incelendiğinde kontrollere göre en büyük artışın kemikte olduğu görülmektedir. Chapin vd. (47) kemikte bor birikimi ile ilgili çalışmalarında ratları 9-12 hafta süre ile 200-9000 ppm borik aitle beslemişler ve kontrollere göre kemikte bor artış oranının yüksek olduğunu, serum bor düzeyine göre 4 kat fazla olduğunu belirlemişler. 9 haftalık bor uygulamasından sonra 32 hafta izlenmiş ve kemikteki bor düzeyinin yavaş yavaş düştüğü saptanmıştır. 8. haftadan sonra kemikteki bor düzeyinin, bor verilmesinin kesildiği zamanki düzeye göre %10 na düştüğü belirlenmiştir (60 g B/g dan 6 :g B/g). Uygulama kesildikten sonra kandaki

düzey 4 haftada normale dönerken kemikteki bor düzeyi 32. haftanın sonunda normale dönmüştür.

Çizelge 5. Erkek farelerin besinlerine katılan 9000 ppm borik asit (1575 ppm bor) ile 7 gün sonunda dokulardaki bor düzeyi (46)

Dokular	Kontrol	7 gün
Plazma	1.94 ± 0.17	16.00 ± 0.71
Karaciğer	0.66 ± 0.10	13.13 ± 0.54
Böbrek	1.55 ± 0.03	19.80 ± 1.65
Yağ dokusu	1.71 ± 0.17	3.78 ± 0.13
Kas	3.69 ± 0.54	14.23 ± 0
Kemik	1.17 ± 0.19	47.40 ± 1.14
Kalın barsak	3.08 ± 0.17	14.90 ± 0.7
Beyin	0.76 ± 0.02	13.50 ± 0.86
Hipotalamus	0.91	14.30
Testis	0.97 ± 0.10	16.00 ± 1.19
Seminalvezikül	0.64 ± 0.23	123.70 ± 6.56
Seminal vezikül sıvısı	2.05	19.20
Adrenal	7.99	21.90
Prostat	1.20	14.80

İçme suları ile yapılan bir çalışmada, ratlarda farklı dozlarda borik asit kullanılmıştır. Sonuçta böbrek hariç yumuşak dokulardaki bor düzeyinin plazmadaki ile aynı olduğu belirlenmiştir (48). Böbrekte ise diğer dokulara göre 1.5-2 kat daha fazla bor tespit edilmiştir. Bu farkın da borun idrarla atılıyor olmasından kaynaklanabileceği belirtilmektedir. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalara göre insanlarda bor dağılımı ile ilgili veriler azdır. İnsanlarda borun kanda birikmediğinin kanıtları Culver vd (43) tarafından elde edilmiştir.

2.1.6. Borun Metabolizması

Bor, bitkilerin çoğu için zorunlu bir mikrobisleyicidir ve vasküler bitkilerin kesinlikle bora ihtiyacı vardır. Bazı bitkiler bora karşı çok duyarlıdır. Ancak bazı bitkiler için zehir etkisi yaptığı da belirlenmiştir. Bu nedenle herbisit olarak kullanılmaktadır (49).

Henüz tam olarak kanıtlanamamış olmakla birlikte insanlar ve hayvanlar için de zorunlu olduğuna ilişkin kanıtlar vardır (50). Ancak gerekli minimum miktarın ne kadar

olduğu henüz belirlenememiştir. Olgun bir insanın aldığı günlük bor miktarı 1-2 mg kadardır. Gelişmiş analiz tekniklerinin kullanılması sonucu bu miktarın daha önce hesaplanandan az olduğunu göstermiştir. Çözünebilen inorganik bor miktarı insanlarda yüksek olmasına karşın organik formu henüz belirlenememiştir

Deney hayvanları ve insanlarla yapılan 3 klinik çalışma borun, Ca ve Mg gibi yaşam olaylarını etkileyen maddelerin hücresel metabolizmasını etkilediğini göstermiştir.

İnorganik borat bileşikleri $B(OH)_3$ olarak vücutta bulunur. İdrarda tespit edilen tek bor bileşiği borik asittir. Borik asidin vücutta degradasyonu ile ilgili bir kanıt yoktur. Vücutta parçalanması mümkün olmayabilir çünkü bor-oksijen bağını koparabilmek için büyük miktarda enerji (523 kJ/mol) gerekmektedir. Borik asit farklı biyomoleküllerle kompleks oluşturabilir (22). Hidroksil, amin ve tiyol grupları gibi moleküllere affinitesi vardır. Kompleks oluşumu konsantrasyona bağlı ve geri dönüşümlüdür.

2.1.7. Borun Vücuttan Atılması (Eliminasyonu)

Bor, insan vücuduna doğal olarak yiyecek- içeceklerle ağız yoluyla ve tozlarla da solunum yoluyla girmektedir. Vücuda nasıl girerse girsin, %90-95 kadarı vücutta birikmeden hemen idrar ile dışarı atılmaktadır. Yalnızca kemik, tırnak ve kıllarla, karaciğer ve dalak gibi organlarda birikmektedir (51).

Borun eliminasyonu insanlarda ve rodentlerde değerlendirilmiştir. Ağız yolu ile verilen borik asidin %90 dan fazlasının, alındıktan kısa süre sonra değişmeden idrar ile atıldığı gösterilmiştir. Böylece insan vücudundan borun atılmasında birincil yolun idrar (böbrekler) olduğu gösterilmiştir (33, 36). 750 mg borik asidin (131 mg B) sudaki çözeltisi oral yolla insana verildiğinde 24 saat içerisinde idrarla atıldığını rapor etmişlerdir (52).

2.1.8. Bor Toksisitesi

1980'lere kadar sadece bitkiler için değerli olduğu düşünülen borun, bu tarihten sonraki araştırmalar sonucunda birçok konuda hayati öneme sahip olduğu ortaya çıkmıştır.

Borun insanlarda toksik etkileri ile ilgili bilgiler yetersizdir ve araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu konudaki sınırlı veriler hayvanlarla yapılan toksisite çalışmalarından sağlanmaktadır. Ayrıca sınırlı sayıda rastlanan ve kazara meydana gelen bor

zehirlenmelerinden elde edilen verilerden de yararlanılmaktadır. Bor zehirlenmelerine dayanarak akut letal dozun bebekler için 3000-6000 mg, yaşlılar için 15.000–20.000 mg olduğu belirtilmektedir. Klinik etkiler sinirlilik, nöbet ve gastrointestinal bozuklukları içermektedir. Ayrıca mukozanın ekfoliasyonu, kan toplaması (kongestion) ve kızarıklık, ekfoliyatif dermatid, böbrek tubular hücrelerinde granular dejenerasyon ve ödem olgusu rapor edilmiştir. Bor toksisitesinin klinik semptomları, yaş/vücut ağırlığına bağlı olarak 100-55.500 mg doz aralığında rapor edilmiştir (22, 29, 33).

İnsanlar üzerinde yapılan sınırlı çalışmalar borun kalsiyum, bakır, magnezyum, azot, glikoz ve trigiliseritler gibi yaşam sürecinde önemli olan pek çok bileşenin kullanılması ve metabolizmasında etkin roller üstlendiğini ortaya koymaktadır. Bu rollerinden dolayı çeşitli vücut bölümlerinin (iskelet, beyin ve kan) yapılarını ya da fonksiyonlarını etkileyebilmektedirler. Yapılan araştırmalar borun toksik etkisinin çok düşük olduğunu göstermiştir. Borun akut etkisi 15-30 g boraks veya 2-5 g borik asit doğrudan alınırsa ortaya çıkmaktadır. Kronik etkisi açısından günde 3 g borik asit veya 5 g boraksın etkisinin olmadığı, 5-10 g boraksın sadece protein metabolizmasını etkilediği ve idrardaki azot miktarını artırdığı gözlenmiştir (53, 54).

Bor bileşikler ciltte irritasyon ve duyarlılık yapmazlar. Bazı sodyum boratlar hayvanlarda göz tahrişine neden olabilir. Ancak insanda normal dozda uzun süreli temasta olumsuz bir etki saptanmamıştır. Bor bileşikler yüksek dozda tüm türler için toksiktir. Ancak mutajenik ve karsinojenik değildir. İnsan fetüsü gelişimine bor bileşiklerinin etkisi ile ilgili doğrudan bir araştırma yoktur. Deneysel olarak fetal toksisite fareler, ratlar ve tavşanlarda gözlenmiştir. Bor ile temastan sonra doğum öncesi ölüm dahil cenin vücut ağırlığında azalma, gözlerde, kardiyovasküler sistemde ve iskelette malformasyon gibi gelişimsel toksisitenin olduğu rapor edilmiştir (55, 56).

Hayvanlarda borun toksik etkisi üreme sisteminde görülür. Ratlar, fareler ve köpeklerde erkek üreme kanallarında spesifik etkilere neden olmaktadır. Bu etkiler batık testis, sperm oluşumunun inhibisyonu, seminifer tübüllerin dejenerasyonu ve atrofi germin hücrelerinin kaybı ya da yokluğudur. Keza bor dışı ratlarda ovulasyonun azalmasına ve dışı farelerde renal lezyonlara neden olmaktadır (46, 55).

Borun toksik etkisi yetişkinlerde baş ağrısı, kusma, ishal, heyecan veya depresyon, çocuklarda ise daha çok havale, koma gibi beyin zarı tahribi etkileri şeklinde görülmektedir. Parmak uçlarında görülen pembe renk, bor ile zehirlenmeye işaret eden karakteristik

görünüştür. Bazı kaynaklarda bor tozlarıyla temas eden işçilerin sperm sayısında düşüklük cinsel hayatlarında gerileme olduğu iddia edilmiştir. Borun testise nasıl zarar verdiği, özetle olgunun mekanizması henüz açıklığa kavuşmamıştır. Ülkemizde ve Dünya’da yapılan pek çok araştırmada borun kısırlığa yol açmadığı sonucuna varılmıştır (51, 57, 58).

2.1.9. Genotoksisite Çalışmaları

Mutajenite çalışmalarının çoğunun sonuçlarına göre borun genotoksik etkisi yoktur. Streptomisin-bağımlı *Escherichia coli* Sd-4 testinden elde edilen verilere göre borik asit ya mutajenik değildir ya da sonuçlar şüphelidir. *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98, ve TA100 suşlarında borik asit mutajenik değildir (59, 60). Keza borik asitin, *Salmonella microsoma* TA1535, TA1537, TA1538, TA98, ve TA100 suşlarında da mutajenik olmadığı belirlenmiştir. Memeli mutajenite test sistemlerinde tüm sonuçlar negatif çıkmıştır. Borik asit fare lenfoma hücrelerinde de mutasyonu uyarmamıştır (61).

2.1.10. Bor ve Kanseri İlişkisi

Borun özellikle bazı kanser türlerine karşı koruyucu etki gösterdiği yönünde bulgular mevcuttur (62). Bor minerallerinin olduğu bölgelerde, mineralin su ve besin maddeleriyle farkında olmadan vücuda alınmasıyla bölgedeki prostat kanserli oranının düştüğü, borun prostat kanserinin önlenmesinde ve tedavisinde etken olduğu saptanmıştır (63).

Borun düşük toksisiteye sahip olması, vücutta birikmemesi gibi farmakolojik özellikleri çekici bir kanser tedavisi ajanı olmasına yol açmaktadır ancak mekanizmasının henüz tam olarak anlaşılabilmesi potansiyel kullanımını engellemektedir (64, 65).

Sudaki bor düzeyinin artmasıyla prostat kanseri riskinin ve ölüm oranlarının azaldığı literatürde ortaya konulmuştur (66). Yapılan çalışma sonucunda günlük yüksek bor maruziyeti yoluyla prostatik hücresel prosese bağlı hiperplazinin oluşumunun azalabileceği yönünde izlenim edinilmiştir.

Barranco ve Eckert’in (67) ilk çalışmaları, borik asitin DU145 prostat kanseri hücre hattının büyümesini tamamen inhibe ettiğini göstermişlerdir. Daha sonra Carper vd. (68) 1mM borik asitin DU145 hücrelerinin büyümesini belirgin bir biçimde ve LNCaP hücrelerinin büyümesini ise kısmen inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Bor, BNCT (Boron Neutron Capture Therapy) kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle beyin kanserinin tedavisinde kanser hücrelerinin seçilerek imha edilmesine yaraması ve sağlıklı hücrelere zararının minimum düzeyde olması nedeniyle tercih sebebi olmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki, yüksek miktarda bor alan erkeklerde prostat kanseri (PCa) riski azalmaktadır (69).

2.2. Serviks (Rahim Ağzı) Kanseri

Serviks kanseri (ya da rahim ağzı kanseri), servikal alanın habis kanseridir. Serviks epitelinin hasar gördüğü yavaş ilerleyen malign özellikli neoplastik bir hastalıktır ve sitopatolojik tanıda servikal intraepitel neoplazi (CIN) veya skuamöz intraepitel lezyon (SIL) olarak bilinmektedir (70)

Servikal kanserlerin çoğu transformasyon zonunda meydana gelmektedir. Bu bölge endoserviksin kolumnar epitelyum bölgesi ile ektoserviksin çok tabakalı skuamöz epitelyumun birleştiği bölgedir (71,72). Servikal kanserlerin büyük bir çoğunluğu skuamöz hücreli kanserlerdir (%85), adenokarsinom daha az görülür (%15) ve glandular epitelden köken alır (72). Serviks kanseri birden bire değil, sonradan kansere dönüşecek olan bazı kanser öncesi değişikliklerin sonucunda ve genellikle yıllar sonra ortaya çıkar HPV enfeksiyonu sonrası gelişen servikal prekanseröz lezyon servikal kansere genellikle 10-15 yıl gibi uzun bir sürede ilerler. Bu sebeple servikal prekanseröz lezyonların sitolojik test olan PAP testi ile erken tespiti ve tedavisi ile servikal kanser büyük oranda (>%90) önlenir (73).

Serviks kanseri kadınları etkileyen en yaygın kanserlerden biridir. Meme, kolorektal ve akciğer kanserlerinden sonra kadınları etkileyen 4. kanserdir. En fazla geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir. Her yıl Dünya’da yaklaşık olarak 528,000 kadın serviks kanserine yakalanmaktadır. Dünya’da 2012 yılında 266,000 kadın bu kanserden hayatını kaybetmiştir (4). Kadın genital kanserleri arasında tarama programı olan ve de bu nedenle teorik olarak önlenebilir bir kanser olmasına rağmen özellikle gelişmekte olan ve de geri kalmış ülkelerde önemli bir sağlık sorunu olarak güncelliğini korumaktadır Türkiye’de ise serviks kanser insidansı onuncu sırada olup, 100.000 kadında 4,5’tur (5).

Serviks kanserinin ortalama görülme yaşı 52 olup 35-39 ve 60-64 yaşları arasında, yani iki ayrı dönem içerisinde pik yapmaktadır (74). Erken tanıda %95 tedavi edilirken geç kalındığında ölüm oranı %50 yi geçmektedir.

Serviks kanserine yol açan ana etken Human Papillomavirüs (HPV)'dür. Serviks kanserli olguların hemen hemen %100'ünde HPV DNA'sı saptanmıştır (75,76). Diğer tüm faktörler ya bulaşmayı arttırıcı ya da karsinogenezi hızlandırıcı bir etkiye sahiptir.

Etiyolojide HPV'nin anahtar rolü oynaması bu virüse karşı aşı çalışmalarını indüklemiş ve HPV'nin bazı yüksek riskli tiplerine karşı oldukça etkin koruyucu aşular geliştirilmiştir. Yakın gelecekte bu aşuların kullanıma girmesi ile 20-30 yıllık bir süreçte serviks kanseri insidans ve mortalitesinde önemli azalmalar beklenmektedir.

2.2.1. Tarihçe

Servikal kanserlerde insan papillomavirüslerin varlığı deneysel olarak 1972 yılında araştırılmaya başlanmıştır. Bazı çalışmalarda genital lezyonların nadir olarak malign tümörlere dönüştüğü bildirilmiş olup bunun üzerine genital lezyonlarda rastlanacak virüsün kansere yol açan ilk aday olduğu görüşü kesinlik kazanmaya başlamıştır.

HPV ve servikal kanser arasındaki ilişki ilk kez 1976 yılında H. Zur Hausen (77) tarafından ortaya konmuştur. Gissmann ve zur Hausen 1980-1982 yılları arasında genital lezyonlardan ve laringeal papilloma örneklerinden iki HPV DNA'sı karakterize etmiştir. Her ne kadar bu karakterize edilen DNA'lara servikal kanser biyopsilerinde rastlamasa da aynı problemler kullanılarak servikal kanser biyopsilerinde ve anogenital kanser lezyonlarının prekürsörlerinde hibridizasyon tekniği ile HPV 16 ve 18'in belirlenmesini sağlamışlardır. Sonrasında devam eden çalışmaların birçoğu, test edilen biyopsilerin %70'inde bu iki tipe ait DNA'ya rastladıklarını belirtmişler ve diğer bulunan bazı tiplerin DNA'larının da biyopsi örneklerinde var olduğunu belirlemişlerdir. Daha sonra analiz edilen servikal kanser biyopsilerinin tümünde HPV DNA'sının varlığı netlik kazanmıştır (77). 2008 yılında zur Hausen HPV'nin serviks kanseri ile olan ilişkisini saptamasından dolayı Nobel Tıp ödülünü layık görülmüştür.

Geçmişte zarfsız ve çift sarmallı sirküler DNA genomuna sahip olmasından dolayı Papillomavirüsler, Polyomavirüsler ile birlikte Papovaviridae ailesinden olduğu kabul edilmekteydi. Tüm poliyomavirüslerin genomları yaklaşık 5 kb büyüklüğünde iken Papillomavirüslerinki 8 kb'a yakındır. Poliyomavirüsler ve Papillomavirüsler T antijeni ve E1 genlerindeki küçük homolog bölgeleri saymazsak, nükleik asit ve aminoasit dizilerinde tatmin edici miktarda benzer dizilere sahip değillerdir (78).

Bu nedenlerden dolayı günümüzde, bu virüslerin iki ayrı aile olduğu sonucuna varılmıştır. Papillomavirüs ailesi Uluslararası Virüs Taksonomi Konseyi (International Council on Taxonomy of Viruses-ICTV) tarafından resmen onaylanmıştır (79).

2.2.2. Human Papilloma Virüs (HPV) ve Yapısı

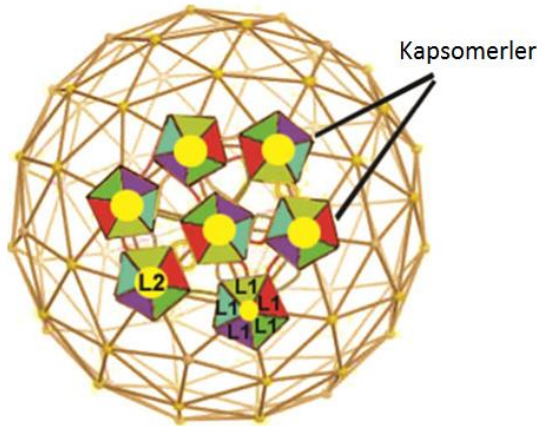
İnsan papillomavirüsleri ile servikal kanser arasındaki ilişki 1976 yılında Harald zur Hausen tarafından gösterilmiştir. HPV - serviks kanseri ilişkisinin, sigaranın akciğer kanseri ile arasındaki bağlantıdan veya hepatit B ile karaciğer kanseri arasındaki bağlantıdan daha güçlü olduğu belirlenmiştir (80).

Virüsler genetik materyal olarak DNA ya da RNA taşırlar. Tek şeritli (single stranded, ss) ya da çift sarmallı (double stranded, ds), linear ya da dairesel olabilirler.). Papillomavirüsler (PVs), kılıfsız virüsler olup tüm vertebralarda (memeliler, kuşlar sürüngenler) bulunan ve oldukça çeşitlilik gösteren bir virüs ailesidir (80). Bugüne kadar 150'den fazla HPV tipi tanımlanmıştır. Bu tiplerden yaklaşık 40 kadarının kadın genital organlarını etkilediği bilinmektedir (81).

Human Papillomavirüsler tıbbi açıdan da oldukça önemli olup, özellikle en büyük grup olan alfa cinsi içerisinde yer almaktadırlar. HPV çıplak, ikozahedral simetridir, yaklaşık 52- 55 nm çapında, genomun büyüklüğü yaklaşık olarak 8 kilobaz olan çift iplikli DNA virüslerdir. Viral kapsid 60 hekzon ve 12 penton olmak üzere toplam 72 kapsomerden oluşur (Şekil 5). Protein kılıf bir majör ve bir minör olmak üzere iki kapsid proteini içerir (81,82).

Papillomavirüsler zarfları olmadığından dolayı kuruluğa nispeten dirençli ve stabildir, hücre dışında en az bir hafta canlılığını koruyabilirler. Organik çözücülere dirençlidirler ve 56°C'de infektivitesinde minör bir kayıp meydana gelir.

1980' lerin başlarında, birçok Papillomavirüsün tüm genomu aydınlatıldı. 1982'de HPV-1'in, 1983'te HPV-6'nın, 1985 te ise HPV-16'nın genomları tanımlanmıştır. Bundan sonra bilinen tüm Papillomavirüslerin genomu tanımlandı ve bir veritabanında toplandı (82).



Şekil 5. İnsan papillomavirüsünün (HPV) ikosahedral simetrisini gösteren şematik tasviri. Kapsomerler 5 tane L1 (belirgin olması için farklı renklerde gösterilmiştir) ve 1 tane L2 proteininden oluşur. Genom bu kapsidin iç tarafında bulunur (82).

Virüs genomu 3 bölgeden meydana gelir (Şekil 6)

Üst regülatör bölge: (URR: Upstream regulatory Region veya LCR: Long Control Region) Kodlama yapmayan bölgedir. Viral DNA' nın replikasyonu ve transkripsiyonu için gerekli cis elementleri içerir.

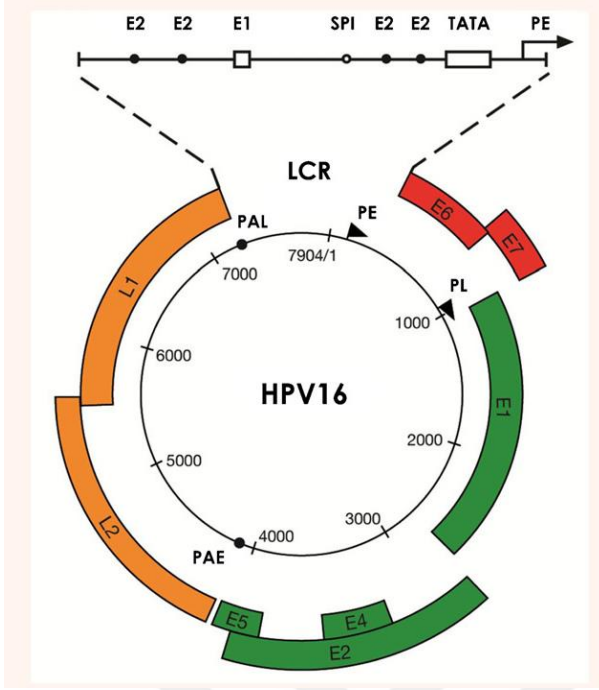
“Erken” (early) bölge: Viral replikasyon için gerekli olan proteinleri kodlar; 8 ORF'ye (Open Reading Frame) sahiptir (E1, E2, E3, E4, E5, E6 , E7 ve E8)

“Geç” (late) bölge: Virionun toplanması için gerekli yapısal proteinleri (L1–L2) kodlar.

Erken bölge viral genomun %50'den fazlasını, geç bölge %40'ını ve LCR %5'ini oluşturur. Tüm Papillomavirüslerde bu üç bölge, erken pA ve geç pA olarak iki poliadenilasyon (pA) bölgesi tarafından ayrılmaktadır. Bütün HPV ORF'leri virüsün sadece bir sarmalı üzerinde yer alır ve 10 ORF viral replikasyon döngüsündeki gen ekspresyon sırasına göre erken ve geç olarak isimlendirilir. Erken proteinler (E1, E2, E4, E5, E6 ve E7) viral replikasyon ve hücre transformasyonunda rol oynar (83,84).

E1, viral genomun devamı ve replikasyonunu, E2 transkripsiyonu düzenleyen proteinleri, E5 epidermal büyüme faktörünü (EGF) uyararak hücre büyümesini arttırırken, p21 tümör süpresör genini baskılayarak hücrenin kontrol sistemini bozmaktadır (85,86).

E6 ve E7 majör onkojenik genlerdir. E6 p53'ü, E7 ise aktif retinoblastoma (Rb) genini inaktive eder (87,88). Ayrıca E6 ve E7 proteinleri birçok faktöre etki ederek immün yanıtın oluşmasını önlerler (89,90).



Şekil 6. Alfa Papillomavirüs genom organizasyonu. HPV 16'nın genom organizasyonu yüksek riskli Alfa papillomavirüsler (HPV 18 dahil) için tipiktir. Uzun bir kontrol bölgesi içerirler ve virüsün yaşam döngüsünün farklı evreleri için 8 gen gereklidir. Bu genler, mRNA'nın alternatif sıplası sonucu olarak çok miktarda gen ürününü kodlarlar. LCR hüresel transkripsiyon faktörlerinin (örneğin, SP1, AP1, Oct1) yanı sıra, viral replikasyonu ve gen ekspresyonunu kontrol eden viral E1 ve E2 proteinleri için bağlanma yeri içerir. HPV 16, epitel farklılaşması sırasında mRNA ekspresyonunu düzenleyen PE (erken promotor, p97 olarak da ifade edilir) ve PL (geç promotor ya da p670 olarak ifade edilir) olarak bilinen iyi karakterize edilmiş iki promotor bölgeye sahiptir. PAE ve PAL, erken ve geç poliadenilasyonun genom içersindeki yerini belirtir (85).

Geç gen bölgesinde ise L1 majör kapsid proteinini ve L2 minör kapsid proteinini kodlanmaktadır. Bu proteinler aşı geliştirilmesinde tipe özel antikorlar için hedef antijen olarak kullanılır (91).

Tıbbi önemi nedeniyle insan Papillomavirüsleri (HPV) üzerinde en fazla çalışılan papillomavirüslerdir. İnsan Papillomavirüsleri Dünya'da yaygın olarak bulunmakta ve bulaşma direkt temas ya da cinsel yolla olmaktadır (92)

2.2.3. HPV Sınıflandırması

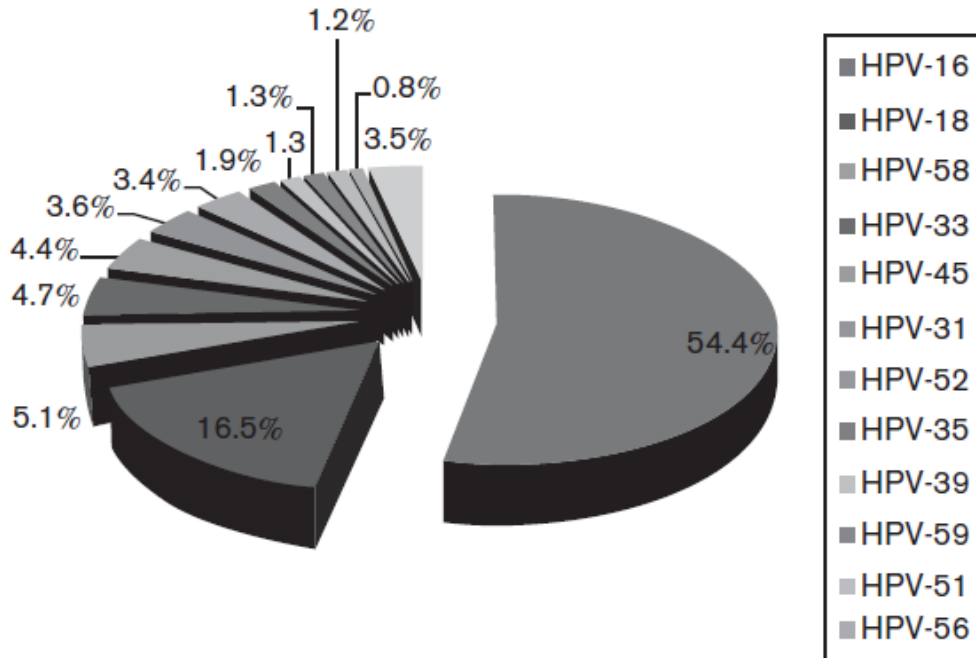
Bütün Papillomavirüsler, Papovaviridae virüs ailesinde sınıflandırılmışlardır. Bu virüs ailesinde 12 cins yer almaktadır (Şekil 7). İnsanlarda bulunan papillomavirüs tipleri,

L1, türler arasında yüksek oranda korunmuş bir gen bölgesidir. Bu nedenle yeni HPV tiplerinin tanımlanmasında bu bölgeden yararlanılmaktadır. L1 ORF bölgesinin nükleotid sekans farklılığına dayalı olarak 150'den fazla HPV tipi karakterize edilmiş olup bunlardan 40'dan fazlasının servikal mukozayı enfekte ettiği bilinmektedir.

Günümüzde Papillomavirüs Referans Merkezi (Heidelberg/Almanya) yeni bulunan tipleri onaylamaktadır. Yeni bir HPV tipi için kriter, izolatların L1 geninde %10'dan fazla nükleotid dizi farklılığı olmasıdır. İlk olarak 1980'de restriksiyon paternlerindeki farklılıklara dayanarak HPV için subtip terimi kullanılmıştır. HPV genomunun L1 genindeki %2-10 arası farklılık subtipleri belirler. Sadece HPV 5, 8, 20, 34, 44, 54, 68 ve 82'nin subtipleri bilinmektedir (94). Eğer %2'den daha az farklılık varsa bunlar "varyant" olarak kabul edilmektedir (95).

HPV tipleri, klinik olarak karsinojenik potansiyellerine göre de:

- düşük riskli HPV tipleri (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 ve CP6108),
- olası yüksek riskli HPV tipleri (26, 53 ve 66) ve
- yüksek riskli HPV tipleri (16 başta olmak üzere 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 68, 73 ve 82) olmak üzere üç gruba ayrılmışlardır (81,96). Tutulum bölgelerine göre kutanöz ve mukozal olarak ikiye ayrılırlar (97) .

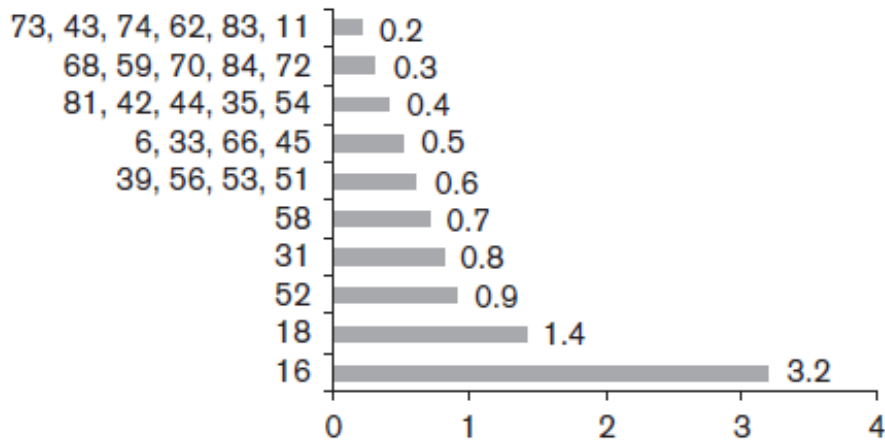


Şekil 8. HPV tiplerine göre serviks kanseri. Dünya’da HPV genotiplerinin prevalansı (98).

Yüksek riskli HPV tipleri arasında en onkojenik olan tip ise HPV16' dır ve tüm servikal kanserlerinin %54,4'den sorumludur (Şekil 8). İkinci sırada en onkojenik olan tip de HPV 18'dir ve bu da kanserlerin %16,5'den sorumludur (98). Diğer 11 tip ise kalan %29-30'undan sorumludur (99,100) Daha seyrek görülen tiplerinde, tip 31 ve 45'i içeren dünya genelinde geniş bir varyasyon mevcuttur (101,102).

HPV prevalansı, Dünya'nın gelişmiş bölgeleri (%10.3) ile karşılaştırıldığında az gelişmiş bölgelerde yüksektir (%14.3). HPV enfeksiyonlarının en yüksek prevalans, özellikle Doğu Afrika olmak üzere (%33.6) Afrikalı kadınlarda (%21.3) görülmektedir (98).

59 ülkeden bir milyondan fazla kadından elde edilen verilere göre prevalans %1.6- %41.9 arasında değişmektedir. En yaygın onkojenik HPV tiplerinin Avrupa ve Latin Amerika'da 16, 18, 52, 31, 58, 39, 51, ve 56 tipleri olduğu belirlenmiştir. En yaygın tipin HPV-52 olduğu Asya ve Kuzey Amerika'da daha az rastlandığı saptanmıştır. Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ışığında Dünya genelinde ki HPV tip spesifik prevalans Şekil 9'da görülmektedir (103).



Şekil 9. Dünya'da HPV tip- spesifik prevalans (%) (103).

HPV enfeksiyonlarının sonucu, konak faktörlerine bağlı olduğu gibi virüsün tipine ve enfekte olan bölgeye de bağlıdır. Virüs insanda primer olarak skuamöz epitel hücreleri ve mukozayı enfekte etmekte, deri ve mukozalarda bazal tabakalardan başlayarak çeşitli lezyonlar oluşturmaktadır. Düşük riskli tipler benign lezyonlar ile ilişkilidir ve genital siğiller ile kondiloma akuminata etkenleri olarak değerlendirilmektedir, yüksek riskli HPV tipleri ise servikal, vajinal, vulvar, anal, penil ve orofarengeal kanserleri de içine alan çeşitli kanserlerin gelişiminde doğrudan ya da dolaylı olarak rol oynayabilmektedir (104).

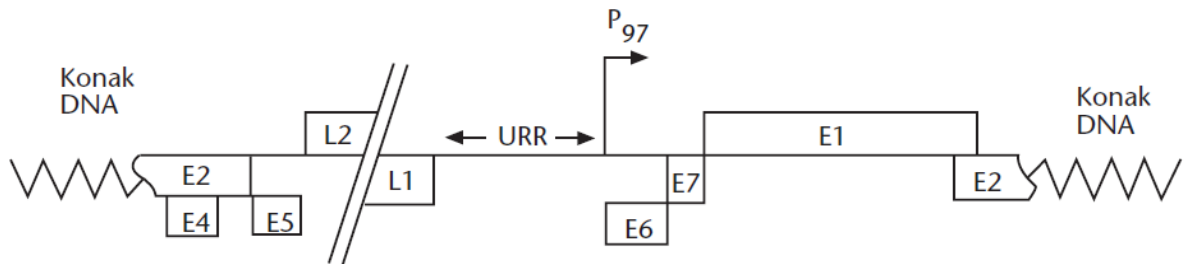
HPV ilişkili lezyonlarda doğal seyir akut enfeksiyon ile başlar. Subklinik ve klinik enfeksiyon gelişir. Subklinik enfeksiyon genellikle semptomsuz olarak geçirilir ve virüs

eradike edilir veya ölçülemeyecek düzeylere iner. Yüksek dereceli HPV’de klinik enfeksiyon düşük dereceli veya yüksek dereceli lezyon gelişimine yol açar ve persistan enfeksiyon haline gelir (105). Güncel bilgiler ışığında servikal lezyonlarda progresyon CIN 1 ile başlayıp sonrasında CIN2-3 ve en sonunda da servikal kanser gelişimi şeklindedir (106). Düşük dereceli lezyonların çoğu tedavisiz gerilemekte ve yüksek dereceli lezyonların önemli bir kısmı ise tedavi verilmediğinde kansere ilerlemektedir.

2.2.4. HPV Replikasyonu, İntegrasyon ve Yaşam Döngüsü

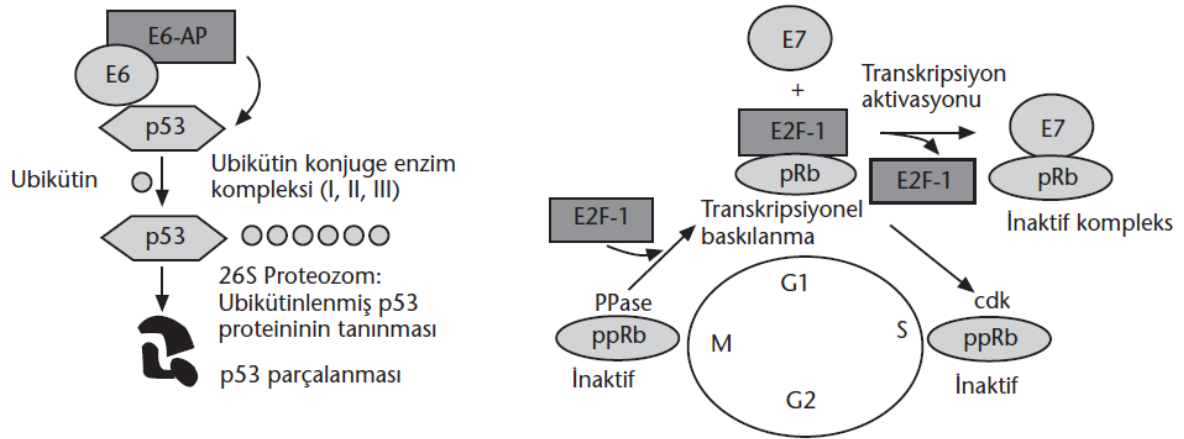
İnsan Papillomavirüsün replikasyon döngüsü epitelyumun stratum germinativumundaki (bazal tabaka) hücrelere girişi ile başlar. Diğer pek çok virüs gibi HPV’de konak hücreye, hücre yüzeyindeki heparan sülfat aracılığıyla tutunur. HPV tutunmasında ikincil bir reseptör veya stabilize edici proteoglikanlar da rol oynayabilir (107). HPV, replikasyon için konakçı hücrenin DNA sentez mekanizmasına ihtiyaç duyar. Replikasyonda sırasıyla erken ve geç proteinler sentezlenir. Üretken HPV enfeksiyonlarında, HPV DNA’sı epizomal statüde kalır ve E1/E2 ORF’leri 2 önemli onkoprotein (E6/E7) ekspresyonunu baskılar (108,109). Buna karşın karsinoma ve yüksek dereceli displazide ise integrasyon viral E1 ve E2 bölgelerinde meydana gelmektedir. Viral genomun konak genomuna integrasyonu ile birlikte E1/E2 yaygın şekilde bozulur. E2 ve E2 ORF’sine yakın genler (E4, E5 ve L2’nin bir kısmı) viral integrasyon gerçekleştiğinden sonra düzenli bir şekilde silinir (83).

E1 proteini viral DNA replikasyonu için önemli olan helikaz aktivitesine sahiptir. Ayrıca, viral replikasyonun başlamasında da anahtar rol oynamaktadır. E2 proteini ise aynı zamanda iki protein kodlar; bunlardan biri erken bölgenin transkripsiyonunu inhibe eder, diğeri ise artırır (106). Kanser gelişiminde E2 bölgesinde sıklıkla kırılma meydana geldiğinden HPV DNA integrasyonunda önemlidir (Şekil 10) (110).



Şekil 10. HPV'nin konak DNA'sına integrasyonu ile erken ve geç gen bölgelerinde oluşan kırılma (111).

İntegrasyon esnasında E2'de meydana gelen kırılma, E2'nin E6 ve E7 üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırır ve E8 bölgesinin oluşumuna yol açar. Sonuçta, E6 ve E7 viral proteinlerinin kontrolsüz olarak ifade edilir. (111). E6 proteini, p53 ve hücrel ubikuitinasyon enzim E6- AP'yi (protein yıkımında kullanılan bir enzim) kapsayan üçlü bir kompleksin oluşumuyla tümör baskılayıcı p53 proteininin parçalanmasını uyararak hücre proliferasyonunu teşvik eder ve sonuç olarak kontrol edilemeyen hücre siklus progresyonu meydana gelir (Şekil 11) (112,113).



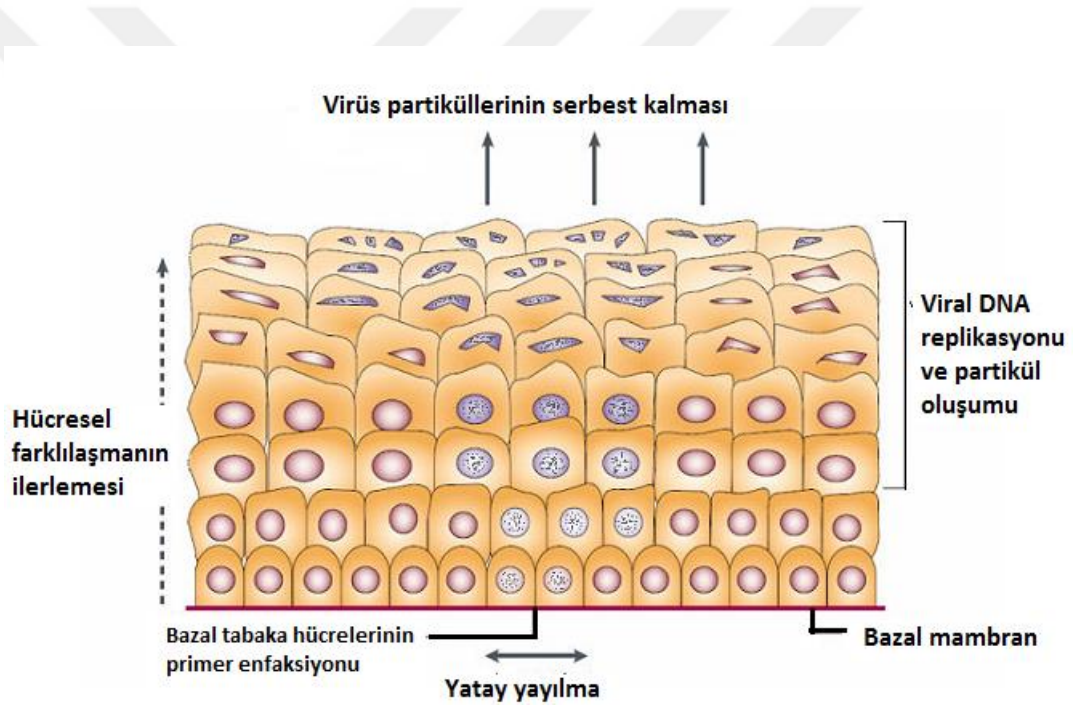
Şekil 11. HPV E6 ve E7 proteinlerinin tümör baskılayıcıları (p53 ve Rb) üzerindeki etkileri (112).

E7 proteininin, HPV 16 ve HPV 18 gibi yüksek riskli HPV'ler tarafından kodlandığı ve Rb (retinoblastoma)'ya yüksek kuvvetle bağlanığı tespit edilmiştir. E7 proteini Rb'ye 'cep domaini' adı verilen bir bölgeden bağlanır. Rb'nin cep domain dizisi tümör baskılayıcı fonksiyonu için önemlidir. Rb'nin önemli biyokimyasal fonksiyonlarından biri, E2F transkripsiyon faktörlerine bağlanmak ve replikasyonda görevli olan enzim genlerinin salınımını baskılamaktır (114,115).

Sonuç olarak hücre siklus regülatörü olan Rb siklin D/pINK4a yolu bozular. Diğer taraftan Rb geninin susturulması veya ekspresyonunun azaltılması p16INK4a'nın hipometilasyonu ile sonuçlanır ve bu gende aşırı ekspresyon meydana getirir (116,117).

Papillomavirüsler ilk olarak öncül bazal keratinositleri enfekte ederler ve bir DNA replikasyon enzimi içerirler. Bu virüs için problem, hücresel DNA polimerazın ve replikasyon faktörlerinin sadece mitotik olarak aktif hücrelerde üretilmesidir. Viral proteinlerin yüksek seviyede sentezi ve viral ürünlerin bir araya toplanması sadece skuamöz epitelin stratum spinosum ve granulosum tabakalarında meydana gelir (108).

Deri veya mukozadaki mikrolezyonlar sayesinde virüs bazal epitel tabakasına ulaştığında, herbir hücre için 50-100 kopya oluşturulur (Şekil 12). Bazal tabakadaki hücreler bölünebilir, üst tabakalara ilerler ve terminal farklılaşmaya uğrarlar. Farklılaşmış hücrelerin replikasyon yeteneği çok azdır veya hiç yoktur. Dolayısıyla, eğer hücreler terminal farklılaşmaya uğrarlarsa virüs çoğalamayacaktır (118).



Şekil 12. HPV'nin yaşam döngüsü. Enfeksiyon için bazal hücre tabakasının bulunması gerekir. Enfekte hücreler bölünür ve populasyon yanal yönde dağılır. Soyların bazıları subrabazal farklılaşan hücrelere göç eder ve burada viral genler aktive olur. Viral DNA replike olur ve kapsid proteinleri oluşturulur. Daha sonra viral partikül oluşumu gerçekleşir. Partiküller yüzeye boşaltılır ve bundan sonra yeni dokular enfekte olur (83).

Virüs proteinleri erken enfeksiyon fazında bazal ve parabazal tabakalarda eksprese edilir. G1'den S fazına geçişi stimüle eden biyolojik özellikler bu hücrelerde bulunmaktadır. Bununla birlikte virüs bir miktar farklılaşmaya ihtiyaç duyar. Çünkü mRNA kapsid proteininin transkripsiyonunu sağlayan erken promotordan geç promotora geçiş, farklılaşmış

hücrelerce sağlanır. Bu promotör değişimini sağlayan faktörler henüz tanımlanamamıştır (118).

Farklılaşmaya duyulan bu ihtiyaç, kapsid protein sentezinin ve viral DNA amplifikasyonunun bazal epitel hücrelerinde hiçbir zaman gözlenmemiş olmasıyla açıklanabilir. Enfekte hücreler, epitelin yukarısına doğru hareket ettikçe ve kısmi olarak farklılaştıkça, viral DNA çoğalır ve böylece geç genlerin transkripsiyonu ve translasyonu gerçekleşir (108).

Epidermis veya mukozanın üst tabakalarında tamamlanmış viral partiküller birleştirilip salıverilir. Bu sayede virüs diğer dokuları da enfekte edebilir (83).

2.2.5. Serviks Kanserinin Risk Faktörleri

2.2.5.1. HPV Enfeksiyonu

Serviks kanseri için birçok risk faktörü tanımlansa da, son epidemiyolojik çalışmalar bu kanser türü için majör risk faktörünün HPV enfeksiyonu olduğunu göstermiştir. HPV, serviks kanserinin gelişmesinde her ne kadar büyük bir role sahip olsa da kofaktörlerinde bulunması serviks kanserini gelişimini hızlandırmaktadır. Kofaktörler, HPV enfeksiyonunu kalıcı hale getirmektedir.

2.2.5.2. Cinsel Aktivite

Epidemiyolojik çalışmalar serviks kanserinin cinsel yolla geçen bir hastalık türü olduğunu göstermektedir (119). Çünkü hastalık evli kadınlarda, genç yaşta evlenenlerde ve çok fazla cinsel ilişkide bulunanlarda fazla oranda görülmektedir. Çok eşlilik enfeksiyon kapma riskini önemli ölçüde artırır. Ayrıca birçok çalışmada ilk koitin çok erken yaşta olması (15 yaşından önce) servikal kanser riskini artırmaktadır (120,121). Bunun nedeni adölesanlardaki aktif metaplazi olabilir. Servikal glandular epitelin yassı hücreli epitele dönüşümü sırasında karsinojenin serviksle etkileşim riski artmaktadır. Metaplazi tamamlandığında serviks artık risk altında değildir (122).

İlk cinsel ilişki yaşı ne kadar küçük olursa ileriki yaşlarda servikal kansere yakalanma olasılığı artmaktadır. 15 yaşından önce cinsel aktiviteye başlandığında risk 10 kat

artmaktadır (123,124). İlk cinsel temasını 18 yaşından önce yapan kadınlar, ilk cinsel temaslarını 22 yaşından sonra yapan kadınlar ile kıyaslandığında CIN 1–2'ye yakalanma riskleri 2- 3 ve CIN 3'e yakalanma riskleri 2-4 kat artmaktadır (119).

2.2.5.3. Partner Sayısı

Partner sayısı altı ve altının üstünde olduğunda risk 10 kat artmaktadır. Monogamik yaşamın ağır bastığı Müslüman ülkelerde, Yahudiler de ve düzenli dini eğitim yapan Katolikler de serviks kanseri daha az görülmektedir (119). Müslümanlar da ve Yahudiler de insidansın düşük oluşu sünnet ve aile bütünlüğü ile açıklanmaktadır (125). Ayrıca kadının eşinin birlikte olduğu kadın sayısının fazla olması da enfeksiyon riskini artırdığı için önemli bir risk faktörüdür (126). Kadının eşi evlilik dışında 15 veya daha fazla partnere sahipse kadında risk 7-8 kat artmaktadır (127). Bu durum eşlerin kaptığı enfeksiyöz ajanın tipi (HPV) ve kadının bu ajana maruziyet süresiyle ilişkilidir (128).

2.2.5.4. Yaş

Serviks kanseri görülme yaşı genel olarak 20-80 yaş gibi geniş bir yelpazeye yayılır. Displaziler 20-34 yaş grubunda, karsinoma in situ ise en sık 25- 40 yaş grubunda görülür. Mikroinvazif kanserler 45-54 yaşları arasında, klinik kanserler ise sıklıkla 65-69 yaşları arasında görülür (119).

2.2.5.5. Irk

Servikal kanser insidansı siyahlarda beyazlara oranla 2 kat daha fazladır ve mortalite oranı da yaklaşık 2-4 kat fazladır (129).

2.2.5.6. Düşük Sosyo-ekonomik Düzey

Gelişmekte olan ülkelerde serviks kanserlerinin düşük sosyoekonomik durumla ilişkili olduğu, bu nedenle hastalığın gelir düzeyi düşük kadınlarda daha fazla görüldüğü

bildirilmektedir. Bunun sebebi; maddi olanaklar ve erişim yetersizliği nedeniyle rutin sağlık kontrollerinin düzenli yapılamamasıdır (130).

2.2.5.7. Sigara

Sigara immünsupresiftir, kadın hormonları üzerine etki eder, genetik hasar oluşturur. İn hale edilen nikotin, kotinine dönüştürülmekte ve bu da servikte depolanmaktadır ve bu da antijen üretiminde rol oynayan langerhans hücrelerine ters etki etmektedir (131). Tütün de bulunan benzopren, nitrozaminler gibi aromatik hidrokarbonlar karsinogenezi etkili bir şekilde indükleyen maddelerdir (132). Sood 1991 yılında yaptığı araştırmada serviks kanserleri ve sigara içme alışkanlığı arasındaki ilişkiyi belirlemek amacı ile 1977–1990 yıllarında yayınlanan olgu kontrol araştırmalarını incelemiş, sigara içen kadınlar arasında serviks kanserlerinin %42–46 arttığını belirlemiştir. Sigara içimine bağlı serviks kanseri riskinin kontrol grubuna göre 2–3 kat arttığı çalışmalarla gösterilmiştir (133).

2.2.5.8. İmmünosüpresif İlaç Kullanımı

İmmünsüpresyon servikal kanser riskini büyük ölçüde artıran bir durumdur (134).

2.2.5.9. HIV Enfeksiyonu

Özellikle son yıllarda ciddi bir sorun haline gelen HIV (Human Immunodeficiency Virus) serviks kanserinin etiyolojisinde tartışılmaktadır. HIV pozitif olgularda patolojik sitolojik bulgu 10 misli daha fazla bulunmuştur. Risk hastadaki immünosüpresyonun derecesine bağlıdır (119).

2.2.5.10. Oral Kontraseptif Kullanımı

Oral kontraseptifler servikte HPV gen ekspresyonunu artırmakta ve konakçı kromozomuna virusun entegrasyonunu sağlamaktadırlar (131). Oral kontraseptiflerin

özellikle servikal adenokarsinoma oluşumunda risk faktörü olabileceği iddia edilmiştir (119).

2.2.5.11. Diyet (Vitamin Eksikliği)

Vitamin eksikliğinin servikal kanseri de içine alan bazı malignitelerde rolü olduğu düşünülmektedir. Butterworth 294 displazili hasta ve 170 kişilik kontrol grubuna sitolojik ve kolposkopik değerlendirme yapmıştır. Kandaki 12 besleyici faktör ve servikal neoplazinin diğer risk faktörleri incelenmiştir. Plazmadaki besin düzeyleri risklerle ilişkili değildir, fakat eritrositlerdeki 660 nmol/l' nin altındaki folat düzeyleri HPV-16 enfeksiyonu ile ilişkilidir (122). C vitamininin az alınmasının da serviks kanseri riskini artırdığı bildirilmektedir (119,128). Meykens ve arkadaşlarının yaptığı çalışma vitamin A'nın serviks kanserini önlemede rolünü göstermektedir. Beslenme bozukluğu, yeterli meyve ve sebze tüketiminin olmaması kanser riskini artırmaktadır (135).

2.2.5.12. Aile Öyküsü

Annesi ya da kız kardeşi servikal kanser olan kadınlarda, ailesinde hasta olmayanlara göre hastalığa yakalanma oranının 2-3 kat fazla olduğu belirtilmektedir (136).

2.2.6. Serviksin Premalign Lezyonları

İlk olarak 1949 yılında Papanicolaou tarafından invaziv kansere ilerleme gösterecek lezyonları belirlemek için "displazi" terimi tanımlanmıştır. İnvazif kansere dönüşme potansiyeli olmayan lezyonlar; bazal hücre hiperplazisi, rezerv hücre hiperplazisi, immatür skuamöz metaplazi ve matür skuamöz metaplazi gibi benign fizyolojik durumlardan oluşur. Malign potansiyel taşıyan grupta displazi ve karsinoma in situ yer alır. Displazi hafif, orta ve ağır derecelere ayrılır.

Daha sonra, 1968 yılında Richart ve Barron tarafından displazi sınıflaması modifiye edilerek, invaziv karsinom ile ilişkili lezyonların hepsi "Servikal İntraepitelyal Neoplazi" (CIN) olarak tek ortak kategoriye alınmıştır.

- CIN I, Hafif displazi (atipik hücreler epitelin alt 1/3'ünde sınırlı)
- CIN II, Orta displazi (atipik hücreler epitelin alttan 2/3'lük kısmında ise)
- CIN III, Ağır displazi (epitelin tamamına yakını tutulmuş ise)

CIS karsinoma insitu.

CIN I düşük evreli skuamöz intraepitelyal lezyon; CIN II ve III yüksek evreli skuamöz intraepitelyal lezyon olarak da isimlendirilir. CIN I olgularının %80– 90 oranında geriledikleri bildirilmektedir. Ağır displazi ve in situ karsinom olguları ise çok az bir oranda regresyona uğramaktadır (119,137). WHO displaziyi, “epitelin kalınlığının değişen oranlarında atipi gösteren hücrelerle yer değiştirdiği bir lezyon” olarak tanımlar (138). Bu gelişmeler ışığında serviksin premaling lezyonları ve hastalığın doğal seyri hakkında önemli histolojik tanımlamalar yapılmış ve son 50 yılda asemptomatik kadınların konvansiyonel smear ile taranmasıyla Amerika Birleşik Devletleri'nde servikal kanserden ölümler %70 oranında azaltılabilmektedir (136).

Bethesda Sınıflandırma Sistemi: Klinik takibe yardımcı olması ve servikal sitoloji sonuçlarının tek bir şekilde raporlanması için 1988 yılında Bethesda sistemi geliştirilmiştir (139). Buradaki asıl amaç laboratuvar sonuçlarını standardize etmektir. Alınan ilk raporlar yeterli görülmediğinden 1991 yılında modifiye Bethesda olarak yeniden düzenleme yapılmıştır. Ancak en son şeklini 2001 yılında almıştır (140,141).

Bethesda Sistemi'nde, potansiyel premalign skuamöz lezyonlar dört kategoriye ayrılmaktadır. Önemi belirgin olmayan atipik skuamöz intraepitelyal lezyonlar (ASCUS), ekarte edilemeyen ASC-H, düşük grade skuamöz intraepitelyal lezyonlar (LSIL) ve yüksek grade skuamöz intraepitelyal lezyonlar (HSIL). ASC (atipik skuamöz hücreler), skuamöz intraepitelyal lezyon kriterlerine yanıt veremeyen ve daha çok reaktif değişikliklere benzeyen anormal hücrelere ASCUS (Atypical squamous cells of undetermined significance, önemi net belirlenemeyen atipik skuamöz hücreler) denir (142). Daha önceleri “atipik” olarak adlandırılan küçük anormalliklerin çoğu bu kategoride yer almaktadır.

2001 Bethesda sınıflandırmasıyla atipik skuamöz hücreler iki kategoriye ayrıldı. Bunlar önemi belirlenemeyen (ASCUS) ve yüksek dereceli lezyon dışlanamayan (ASC-H).

ASC-H: Önemli bir sitolojik bulgudur. Bu bulgu saptanan hastalarda fazla miktarda orta/ağır displazi ve daha ağır lezyon olasılığı vardır. ASCUS'a göre daha ciddidir.

ASCUS: Düşük veya yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon kriterlerine yanıt veremeyen anormal hücrelere ASCUS denir (143). ASCUS tanısı maligniteyi dışlayıcı

bir tanı değil, özellikle altında intraepitelyal lezyon mevcut olabilir diye düşündürmesi gereken bir tanıdır (142).

LSIL, CIN I (hafif displazi) ve koilositik atipi olarak adlandırılan HPV değişiklikleri, düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonları kapsar (168). **HSIL** ise CIN II ve CIN III (orta displazi, ağır displazi ve karsinoma in situ) yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar arasında yer almaktadır. LSIL daha çok HPV enfeksiyonuna bağlı geçici bir enfeksiyöz durumu yansıtırken HSIL daha kalıcı ve ilerleme gösterme riski yüksek bir enfeksiyonu yansıtmaktadır (144,145).

Kansere ilerleme ASCUS'ta %0,25, LSIL'de %0,15 ve HSIL'de %1,44 oranında görülmektedir. Normale gerileme ASCUS'ta %68, LSIL 'de %47 ve HSIL'de %35 oranında görülmektedir (169). AGC, Atipik glandüler hücreler atipik endoservikal, endometrial veya glandüler hücreler olarak sınıflandırılmaktadır. Bu hastaların takibinde %10-39 oranında yüksek dereceli lezyonlar tanı almaktadır (146).

2.2.7. Servikal Tarama Yöntemleri

Sitolojik yöntemler

1. PAPS (PAP Smear)
2. Sıvı bazlı teknikler (ThinPrep)
3. Bilgisayar tabanlı teknikler (AutoPap-Papnet)

Visüel yöntemler

4. Asetik asit testi (VIA/VİAM)
5. Spektroskopi
6. Speculoskopi
7. Servikografi
8. Kolposkopi

Diğer

9. HPV testleri
10. Polar prob

2.2.8. Viral Karsinogenezis

Viral karsinogeneziste konakçıyla ilgili faktörler önemli rol oynar. Yaşam tarzı, coğrafi konum, sosyoekonomik durum, bireysel duyarlılık, immün mekanizmalar ve çevresel faktörler enfeksiyon sonrasında kanser gelişimini etkilemektedir. Tümör oluşturma yeteneğine sahip virüsler genellikle konakçı hücrede kalıcı enfeksiyon oluştururlar (147).

IARC bazı patojenleri kesinlikle karsinojenik (Grup 1) olarak sınıflandırmış (HPV 16 ve 18 gibi), bunun yanı sıra içinde HPV 31 ve 33'ün de bulunduğu bir grup patojen de muhtemelen karsinojenik (Group 2) olarak sınıflandırmıştır. Genomik instabiliteyi arttıran herhangi bir etken karsinojenik süreci kolaylaştırır. Kromozomal değişiklikler genomik instabilitenin göstergesidir ve malign değişimlerle ilişkilidir (148,149).

2.2.9. HPV ve Genotoksisite İlişkisi

HPV servikal karsinoma gelişiminde önemli rol oynamasına rağmen tek başına karsinogenezisi başlatma yeteneğine sahip değildir (113). HPV ile enfeksiyonun hücreler üzerindeki etkisi ile ilgili birçok çalışma olmasına karşılık, virüsün genotoksik etkisi ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (150).

Onkojenik HPV tipleri birçok mekanizmayla kromozomal kararsızlığa neden olur (151). HPV, kromozomların ayrılması sırasında, DNA hasarına hücrenin cevabında ve kontrol noktası regülasyonunda değişiklikler oluşturarak kromozomal kararsızlığa neden olur. HPV onkoproteinlerini eksprese eden hücrelerin DNA hasarını onarmada yetersiz olduğu bilinmektedir (149). Yüksek riskli HPV E6-E7 eksprese eden hücre toplulukları kromozomal kararsızlık gelişimine yatkındır. Genomik kararsızlık gelişimi HPV-ilişkili karsinogeneziste erken evrelerde gerçekleşen çok önemli bir olaydır. Kromozomal kararsızlık erken dönemde intraepitelyal öncül lezyonlarda oluşur ve karsinojenik süreç ile artar. Genel olarak HPV'nin sebep olduğu kromozomal kararsızlık sayısal ve yapısal kromozomal aberasyonları içerir (152).

Yüksek riskli HPV'lerin E6 ve E7 onkoproteinleri hücresel büyüme kontrolünde kritik göreve sahip tümör supresörlerin işaretlediği yolları hedefler (151).

İnsan keratinositlerinde yüksek riskli HPV 16 enfeksiyonu ile sayısal kromozomal değişiklikler oluşuyorken düşük riskli HPV'lerle enfeksiyonda bu etki gözlenmez (153). Yüksek riskli HPV'lerle enfeksiyon sonucunda bazı kromozomların kopya sayılarında değişiklikler olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiş ancak bu değişikliklerin farklı HPV tipleriyle ilişkisi bulunamamıştır (154,155).

Çeşitli çalışmalarda servikal kanser vakalarında komozomal abnormaliteler tespit edilmiştir (113). Larson ve arkadaşları “3p14-25” bölgesinde yerleşik ve bozulmuş olabilen bir tumor supresor gen tanımlamışlardır (Fragile Histidine Triad Gene =FHIT). FHIT kapsülü HPV 16 nın sıklıkla integre olduğu kırılğan bir alandır (FRA3B) (156). Bir gen içerisinde bulunan bir allelin normal fonksiyonun kaybını (Loss Of Heterozygosity; LOH) tanımlayan LOH bu bölgede bulunmaktadır. Servikal tümörlerin % 71’inde FHIT ekspresyonun kaybını rapor edilmektedir (157).

2.3. Mikronükleus (MN)

Mikronükleuslar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom parçalarından köken alan oluşumlardır. Hücre bölünmesi sırasında serbest kalan kromozomların ya da kromozom fragmentinin nükleoplazma ile sarılmasıyla oluşan sitoplazma içerisinde ana nükleusun yanında yer alan nükleer materyaldir. Mikronükleus oluşumu ilk olarak William Henry Howell ve arkadaşları tarafından eritrositlerde saptanmıştır. Daha sonra Justin Marie Jolly tarafından tanımlanmıştır. Bu nedenle Howell-Jolly cisimciği adı da verilmektedir (3).

MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. MN testinin genetik hasarın ölçülmesinde, toksikolojide, diyetle, ilaç sanayiinde, kanser riski oluşumu şüphesinde, radyoterapide önemi anlaşılmıştır.

Günümüzde hızlı endüstrileşmeye bağlı olarak çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlılar daha fazla fiziksel ve kimyasal ajana maruz kalmakta dolayısıyla güçlü toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit etme ve önlemler alma ihtiyacı kaçınılmaz olmaktadır. Bu nedenle, MN testi sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajlar sağladığından yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olmuştur (3,158,159).

2.3.1. Mikronükleus Tekniğinin Gelişimi

MN testi 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde ve daha sonra Haddle ve arkadaşları tarafından kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bazı araştırmacılar geliştirdikleri modifiye metotlarla anöploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MN büyüklük farkından yararlanmışlardır. Klastojenlerce uyarılan MN'lerin asentrik kromozomal fragmanlar içeren küçük, anojenlerce uyarılan MN'lerin tam kromozomları içeren daha büyük ebatlı olduğunu göstermişlerdir (160,161,162).

Morley (163) tarafından geliştirilen Sitokinezi-Bloklama (CBMN) Metodu, bazı kinetik problemlerin ortadan kalkmasını ve tekniğin uygulanmasındaki güvenilirliğin artmasını sağlamıştır. Bu metot, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan Sitokalsin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir. İncelenen alanda kültür süresi içinde ikinci bölünmesini tamamlamış 4 çekirdekli hücrelere de rastlanmaktadır. Ancak MN sayımında Heddle ve Countryman'ın (162) kriterleri kullanıldığından bu hücrelerde görülen MN'ler değerlendirme dışı bırakılmaktadır. Heddle ve Countryman'ın (161) kriterlerine göre:

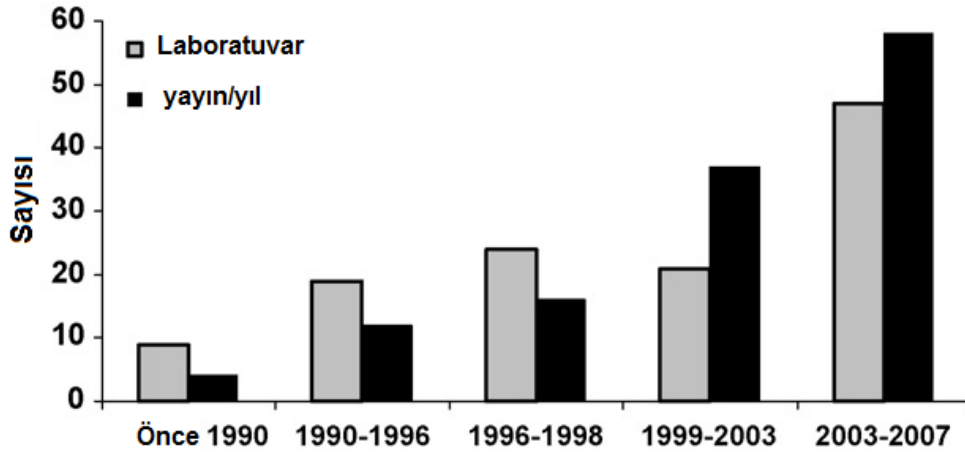
1. MN çapının esas çekirdeğin 1/3'ünden küçük olması;
2. Boya alma yoğunluğunun esas çekirdek ile aynı olması;
3. Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması esas alınmaktadır (162).

Lenfosit kültürlerindeki çalışmalara paralel olarak MN tekniği, eksfoliy hücrelere 1982 yılında ilk defa Stich ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır (164). Bu teknik sayesinde ağız, burun, bronş ve ürotelyal eksfoliy hücrelerde kimyasalların ve enfeksiyonların etkilerini değerlendirmek mümkün olmuştur (165). Hızla çoğalan bu epitelyal dokular çevreleriyle sürekli temas halindedir ve epitelin yüzeyel tabakasını oluşturan eksfoliy hücreler kolaylıkla elde edilebilmekte ve bu hücrelerdeki genotoksik hasarlar kolaylıkla gösterilebilmektedir. Böylece bu hücreler ait oldukları dokularda meydana gelen morfolojik bozukluklarını, kromozom kırıklarının, premalign değişiklikleri ve

kanseri gösterebildiklerinden bir biyomarker olarak değerlendirilmekte ve karsinojenlere maruz kalmış bireylerde artan kanser riskini göstermek amacıyla kullanılabilir (165,166,167). Eksfoliy hücrelerde uygulanan MN tekniğinde Fuelgen-Fast Green boyama yöntemi kullanılmakta, hücrenin çekirdeği parlak pembe, sitoplazması ise açık yeşil boyanmaktadır. MN testi sigara, pestisid ve parazitik enfeksiyonlar gibi çevresel ve mesleki etkileri değerlendirebilmek için kolaylıkla kullanılmaktadır (167,168). Yapılan bir araştırmada periferal kan, bukkal mukoza ve üriner sistem eksfoliy hücrelerinde sigaranın genotoksik etkisi gösterilmiştir. (169,170).

MN araştırmalarında in situ hibridizasyon (FISH) tekniği, ilk defa kromozomların sentromerini tanımlamak için Norppa ve arkadaşları tarafından 1993 yılında uygulanmıştır (171). Daha sonra, Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) tekniği ile MN oluşturan kromozomların her birinin kimliğini belirleyebilecek teknolojik gelişmeler sağlanmıştır. 1990 öncesinde Dünya genelinde 10 kadar laboratuvar da yapılan çalışmaların ve yapılan yayınların sayısı çok azdı. 2007'ye gelindiğinde laboratuvar sayısı 50, yıllık yayın sayısı 60'ı geçmiştir. 2007 den bu yana özellikle yayın sayısı çok artmıştır. 1990'dan sonraki laboratuvar ve yayın sayısındaki artış Şekil 13 de verilmiştir (172).

Iarmarcovai vd. (173) yaptıkları derlemede 1 Ocak 1985 - 30 Eylül 2007 yılları arasında basılan ilgili pek çok yayını gözden geçirerek, genetik polimorfizm ve MN oluşumu arasındaki ilişki ile ilgili araştırmalardaki olağanüstü artışı vermişlerdir. Sadece genetik polimorfizm ile mikronukleus arasındaki ilişkiyi tanımlayan kriterlerle ilgili yayın sayısı 72 dir. En çok araştırma kanser ve MN ilişkisi ile ilgilidir ve çok sayıda makale yayınlanmıştır. Bu yayınların sayısı belirlenemeyecek kadar fazladır. Kanseri, hematolojik hastalıklar, kardiyo- vasküler hastalıklar, nörodejeneratif (Alzheimer, Parkinson vb) hastalıklar, yaşam kalitesi özellikleri (alkol, sigara vb.), çevresel etkenler, (iş yeri özellikleri, pollütantlar vb), mikrobeyici (folat, vitaminler, mikroelementler vb.) eksikliği gibi konular izlemektedir. Son yıllarda ortaya çıkan ve giderek yaygınlaşan nanomateryaller ve MN ilişkisi ile ilgili çalışmaların sayısı da artmaktadır.



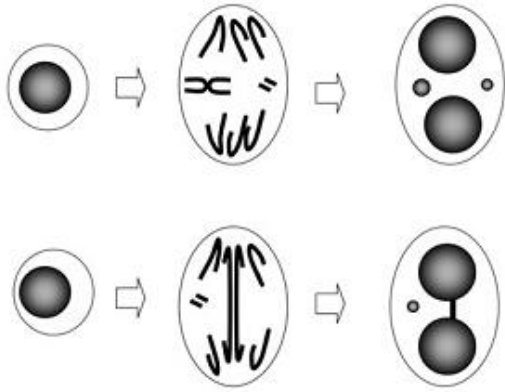
Şekil 13. Sadece bukkal hücrelerde MN testini kullanan laboratuvar ve yıllık makale sayısındaki artış (172).

Son yıllarda toplum genelinde MN sıklığında bir artış olduğu gözlenmektedir. Bunun nedenlerinin: Toplumumuzda giderek artan hazır gıdalar, sigara ve alkol kullanımı, medikal uygulamalar ve ilaç kullanımı, çevre kirliliği, petrol ve türevlerinin kullanımı gibi faktörler olduğu düşünülmektedir.

2.3.2. MN ve NPB (Nükleoplazmik Köprü) Oluşum Mekanizması

MN oluşumu, kromozomal hasar ve genom kararsızlıklarında bir biyomarkır olarak çok fazla kullanılır hale gelmiştir. Biyomonitöring çalışmalarında MN testinin kullanılması son 15 yılda çok artmıştır ve HUMN projesi gibi (Human Micronucleus Project) uluslararası çabaların da bu artışta ve testin güvenilirliğinde önemli rolü olmuştur (173,174).

MN'ların başlıca asentrik kromozom fragmentlerinden, asentrik kromatid fragmentlerinden ya da anafazda ayrılma evresinde iğ iplikçiklerine bağlanamadığı için ayrılamayan ve telofazda yavru hücrelere aktarılamayan tam kromozomlardan kökenlendiği çok iyi bilinmektedir (Şekil 14). Bu kromozom parçaları ya da tam kromozom çekirdek zarı çevrilir. Çekirdek boyaları ile boyandığında morfolojik olarak büyüklüğü hariç çekirdek gibi görülürler (175).



Şekil 14. Nükleus bölünmesi sırasında MN ve NPB oluşum mekanizması (176). MN ya tam kromozomdan ya da kromozom fragmentinden oluşmaktadır.

Buna göre MN oluşumunun temelini DNA hasarı oluşturmaktadır. Organizmanın çeşitli mutajenik, klastojenik ve karsinojenik ajanlara maruz kalması sonucunda DNA’da tahribat meydana gelmektedir (175). Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadır.

Fenech ve arkadaşları (175) NPB (Nucleo Plasmic Bridge: Nükleoplazmik Köprü) oluşumlarının anafazda kromozomların sentromerlerinin zıt kutuplarına çekilmesi sırasında gerçekleştiğini ve bir ya da daha fazla NPB’lerin yanındaki 1’li veya 2’li MN’ların % 60’ından fazlasının asentrik kromozom parçasından orijin aldığını göstermişlerdir. Bu oluşumların moleküler mekanizması tam olarak ortaya konamamıştır ama gelecekte bu yönlü çalışmalar ile mekanizmalar açığa çıkarılacaktır.

Mikronükleuslardaki kromozom orijinlerini belirleyebilmek ve MN’un orijininin tüm kromozomdan mı (sentromer pozitif MN) yoksa asentrik kromozom parçasından mı kaynaklandığını (sentromer negatif MN) anlayabilmek için de FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon) tekniği kullanılmaktadır.

Kromozomal materyalden MN oluşumuna (kromozomal mikronükleuslar) ek olarak ekstrakromozomal materyalden de MN oluşumu vardır (Double minute (DM)-type micronuclei). Bu iki tip MN, hücrede bağımsız olarak gelişen ve bulunan farklı iki oluşumdur. Bir DM, normal hücrelerde görülmeyen, genellikle kanserli hücrelerde görülen amplifiye genlerden ibaret büyük bir ekstra kromozomal elementtir. Bu nedenle DM lerin varlığı kanser öngörüsünde yararlıdır. Kromozom tipi ve DM tipi MN farklı olup bir hücrede

kısmen çakışan mekanizmalarla birbirinden bağımsız olarak oluşurlar. DM'ler değişik kanser hücrelerinde görülür ancak normal hücrelerde görülmez (176,177).

MN tekniği, insan periferik kan lenfositlerinde, kemik iliğinde ve yanak mukoza hücresinde kimyasal ajanların genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Tekniğin basit oluşu kısa zamanda sonuca ulaşılması ve DNA harabiyeti konusunda güvenilir bilgi vermesi tekniği önemli hale getirmiştir. Bugün pek çok kanser tipi ile spesifik kromozom düzensizlikleri arasında bağlantı olduğu bilinmektedir. Bu amaçla kanserli olgularda mikronükleus testi yapılmakta ve anlamlı sonuçlar elde edilmektedir. MN testi ile ölçülen genotoksisite ve iyonize radyasyonla tedavi sırasında sitotoksik ilişki incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre MN testi, gerek kanserin erken tanısında gerekse tedavi sırasında kullanılabilen bir test haline gelmiştir.

MN testinin geniş bir araştırma ortamı bulunduğu diğer bir alanda yaşlanmadır. Yaş artışıyla anöploid sıklığı arasında yakın bir ilişki vardır. Bireyin yaşam içerisinde maruz kaldığı çevresel ajanların etkisiyle kromozomların normal bölünmeden saptığı belirlenmiştir. Her hücrenin mitotik aktivitesi yaş ilerledikçe yavaşlamakta ve mitoz bölünmede iğ iplikçiklerinde katalizör görevi yapan enzimlerde dejenerasyon oluşmaktadır. CBMN analizleri, Cyt-B'nin hücre bölünmesini sitokinez evresinde durdurması özelliği temel alınarak tanımlanmıştır (178,179). Cyt-B, *Helmin dematiodeum*' dan elde edilen bir ekstraktır. Cyt-B hücre bölünmesini sitokinez evresinde aktin filamentlerini etkileyerek durdurur. Bu etkisini de aktin filamentlerin ucuna bağlanarak, aktinin polimerize olmasını önleyerek gerçekleştirir (180,181).

Maluf ve arkadaşları, CBMN yönteminden faydalanarak Down sendromlu ve Fanconi anemili hastalarda MN frekanslarının yüksek olduğunu göstermişlerdir. Down sendromlu bireylerin malign hastalıklar için yüksek riske sahip hastalık grubundan olduğunu belirterek, bu hücrelerin çeşitli mutajen, radyasyon, virüs ve kimyasallara karşı fazlaca hassas olduğu için periferik kanlarında MN frekansının yükseldiğini belirlemişlerdir (182). Bisht ve arkadaşları da doza bağlı olarak artan MN dağılımından 1'li MN oranının fazla oluşunun asentrik fragment kaynaklı olduğunu açıklamışlardır (183).

2.3.3. Mikronükleus Hesaplama Kriterleri

İnsan lenfositlerinin sitokinezinde bloklanan mikronükleus için detaylı hesaplama yöntemleri Washington'da Genotoxicity International Work Shop'la tüm Dünya'ya bildirilmiştir (170). Buna göre, CBMN analizlerinde öncelikle hücre tipleri belirlenmelidir. Hücreler; mononükleus, binükleus, multinükleus hücre tipinde ya da apoptotik veya nekrotik hücre tipinde olabilirler.

Mononükleuslu hücreler küçük sitoplazma, büyük nükleus şeklindedir. Binükleuslu hücreler ise aynadaki görüntü kadar eş büyüklükteki iki hücre tipindedir. Bu tip hücreler nükleoplazmik köprüyle (NPB) beraber olabilir. Nükleuslar birbirine dokunabilir veya üst üste olabilir. Multinükleuslu hücreler üç veya dördü halde, farklı büyüklükteki hücre formundadır (170). Bu tip hücreler pek çok MN içerebilir. Apoptotik hücrelerde ise sitoplazma bozulmamıştır.

Sarto vd. (1987) ve Tolbert vd.(1992) tarafından belirlenen eksfoliye hücrelerde mikronükleus sayım kriterleri aşağıdaki gibidir.

1. Mironükleus ışığı geçirmemeli
2. Şekli yuvarlaktan ovale kadar olmalı
3. Düz yüzeyli bir membrana sahip olmalı
4. Çapı, hücre nükleusunun çapının 1/3 ile 1/16'sı arasında olmalı
5. Hücre nükleusu ile bağlantısı olmamalı
6. Şekil, renk ve tekstür bakımından hücre nükleusuna benzeyen yapılar MN olarak değerlendirilmelidir.

2.3.4. MN ve Kanser

Son on yılda kanser hastalarında artan DNA hasarı ve genetik kararsızlık arasında bir korelasyon olduğuna ilişkin çok sayıda yayın yapılmıştır. Yine bilimsel literatürde, kanser hastalarının lenfosit ve eksfoliye epitel hücrelerinde MN frekansı ile ilgili çok fazla makale yayınlanmıştır. Farklı tümörlü hastaların periferik kan lenfositlerinde yapılan analizler, sağlıklı kontrollere göre MN frekansının önemli derecede arttığını göstermiştir. Kanser hastalarında (özellikle meme ve akciğer kanseri) ya da pre-neoplastik lezyonlarda MN frekansında bir artışın olduğu da belirtilmektedir (184).

Sitokinezi bloklanmış mikronükleus sitom (CBMNcyt) testi kromozomal anormalliklerin ölçülmesinde güçlü bir yöntemdir. Kansere fenotipik hassasiyetin bir

belirteci olarak MN'un geçerliliği, mutajen duyarlılığı çalışmaları ile (özellikle sigara ve akciğer kanseri ilişkisinde) gösterilmiştir. 10 ülkedeki 20 laboratuvardan toplanan 6700 den fazla hastadan elde edilen verilerin en son ileriye yönelik analizinin sonuçları, periferik lenfositlerinde (PBL) MN frekansının yükselmesinin artan kanser riskini, özellikle ürogenital ve gastro-intestinal kanserleri göstermektedir. Mikronukleuslar, karsinogenez ile ilgili çok spesifik kromozomal değişiklikleri yansıtan uç noktalardır (184,185).

MN frekansı ve kanser riski arasındaki ilişki, yapısal kromozom aberasyonu (CAb) ve anöploidi ile ilgili araştırmalardan elde edilmiştir (184). Hedef dokudaki MN frekansı ile kanser gelişimi arasındaki doğrudan ilişki birçok bulgu ile desteklenmiştir.

1. Kanser hastalarında periferik lenfositlerde ve hedef dokuda MN' un frekansı açıkça artmaktadır.

2. Bloom sendromu ve atascia telangiectasia gibi konjenital hastalıklardan etkilenen hastalarda hem anormal yüksek MN frekansı hem de artan kanser riski vardır.

3. İnsan ve hayvanlarda tütün içme, benzen, etilen oksit iyonize radyasyondan kaynaklanan karsinojenite ve genotoksisite arasında MN frekansını arttırabilen bir korelasyon bulunmaktadır.

4. MN frekansı ile eksikliğinde bazı kanser riskinin arttığı vitamin ve folatın kandaki konsantrasyonu arasında kuvvetli bir ilişki vardır. (184).

Bu bulgular MN ve kanser arasında nedensel bir ilişki olduğunu açıkça göstermektedir. Eksfoliy hücreler genotoksik ajanlara maruz kalan ya da koruyucu tedavi altında olan popülasyonlarda biyomonitoring araç olarak güçlü potansiyele sahiptir. Çünkü ağız, burun ve mesaneden kolaylıkla elde edilebilir. İlave olarak kanserlerin %90 dan fazlası epitel dokudan meydana gelir. Birçok durumda bu dokular karsinojenlerin gerçek hedefidir.

Epitel dokular nefesle ya da yemekle alınan genotoksiklerle hemen temas etmektedir. Böbrek ve mesane epiteli ise kimyasalların metabolitleri ile temas etmektedir. Bronşlarda, özefagusta, servikte, meme kanallarında ve diğer tip epitelde genotoksik değişmeler rapor edilmiştir. Ancak kolon, akciğer, prostat ve meme kanseri gibi en yaygın kanserleri önceden kestirmek için eksfoliy hücrelerin lenfositlerden daha iyi olduğuna dair veri yoktur. Kanser riskine karşı biyomarkır olarak kullanılması ve protokol stardizasyonu için farklı epitel dokularında MN ile ilgili daha çok araştırmaya gerek vardır (184).

Sadece Amerika'da serviks kanseri teşhis ve tedavisi için yılda 6 milyar dolar harcanmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde testlerin maliyeti, kaynak yetersizliği ve

deneyimli uzmanların olmaması nedeniyle serviks kanseri yeterince araştırılmamaktadır. Tahminlere göre yılda yaklaşık 500.000 yeni vaka görülmektedir (186).

HPV enfeksiyonları, serviks hücrelerinde sitogenetik kararsızlığı uyardığından MN testi yoluyla tahmin edilebilir. Gerçekten hastaların eksfoliyeye serviks hücrelerinde, sağlıklı kadınlarla karşılaştırıldığında yüksek MN frekansı belirlenmiştir. MN frekansı ile serviks lezyonu derecesi arasındaki korelasyon ve MN frekansı ile artan serviks kanseri riski arasındaki pozitif ilişki gösterilmiştir. 143 kadında moleküler sitogenetik tekniğin (FISH) uygulanması bu bulguları desteklemiştir (187).

2.3.5. MN ve Radyasyon

İyonize radyasyon bir çok neoplasianın tedavisinde önemli rol oynar fakat aynı zamanda genetik hasara da yol açar. Sonuç olarak birincil tümörlerin tedavisinden yıllar sonra sekonder tümör oluşturabilir. Baş ve boyun bölgesinden radyoterapi uygulanan hastaların bukkal hücrelerinde bir çok araştırma yapılmıştır. Sitogenetik hasardan en dikkati çeken artış (150-300/ 1000 hücrede), 3400-4000 cGy doz uygulanan 3 hastada (eski bir çalışma) görülmüştür (188). Başka otörler hastalarda 2000 cGy doz uygulandıktan sonra 68 MN/1000 hücre , 3 hafta 1000 cGy doz uygulandıktan sonra 16 MN/1000 hücre belirlendiğini rapor etmişlerdir (189).

Moore vd. çalışmaları radyoterapinin başlamasından kısa süre sonra MN frekansının 16 kat arttığı, 12. haftada (tedavinin kesilmesinden 3 hafta sonra) normal seviyeye düştüğü gözlenmiştir (167). Bu araştırmanın ilginç bir yönü sentromer-pozitif ve negatif MN arasındaki ayrımı mümkün kılan pansentromerik etiketlemenin kullanılmasıydı. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, radyoterapi gören bir grup baş ve boyun kanserli hastalarda hem bukkal hücrelerde ve hem de periferel lenfositlerde MN frekansının arttığı saptanmıştır.

2.3.6. Çalışmada Kullanılacak Boyaların Özellikleri

2.3.6.1. PAP (Papanicolaou) Boyasının Özellikleri

Pap smear testi ilk olarak 1928 yılında George Papanicolaou tarafından tanımlanmıştır. PAP boyama; multikromatik boyama tekniğidir ve Harris Hematoksilen, Orange G ve EA(eosin azure) boyalarından oluşur.

Hematoksilen; nükleous boyası olup kromatin ile nükleer membranları mavi- mora, nükleolü kırmızı, pembe ya da oranj renge boyar.

Orange G; keratin varlığında sitoplazmayı sarı ya da portakal rengi boyar. Sitoplazmaya kolay penetre olan bir boyadır.

AE(eosin azure); eosin Y, light green ve bismark browndan oluşan polikrom bir karışımdır. İçeriğini oluşturan boyaların kombinasyonlarına göre AE-36, AE-50 ve AE -65 olarak üç çeşidi vardır.

EA tiplerinden EA-36 ve EA-50 benzer formülde olup, EA-65 e göre 2 kat daha fazla "light green" içerirler. Dolayısıyla kalın nonjinekolojik yaymalarda zemin boyanmasına neden olabilirler. Bu tür yaymalarda EA-65 tercih edilmelidir. Genel olarak nonjinekolojik yaymalarda 1/1 oranında karıştırılmış EA-50 ve EA-65 en iyi sonucu vermektedir. Jinekolojik yaymalarda ise EA-65 önerilmektedir. (yaymaların hücresel ve kalın olması dolayısıyla; ayrıca endoservikal adenokarsinomlar ile endometrial adenokarsinomların farklı sitoplazmik boyanma özelliklerini vurgulaması dolayısı ile). Bununla birlikte tüm EA tipleri her türlü yaymada kullanılabilirler.

- **Eosin Y;** asodifilik sitoplazmalı hücreler eosin için afinite göstererek pembeden sarıya değişen tonlarda boyar.
- **Light green;** bazofilik bir boyadır. Bazofilik sitoplazmalı hücreler soluk mavi (siyonofilik) ya da yeşilimsi mavi boyanır.
- **Bismark brown:** Glikojen, keratohiyalin granüller ve bazı mantarlarda kahverengi boyama gözlenir (190).

PAP boyası jinekolojik smear başta olmak üzere BOS, balgam, bronşial yıkama/fırçalama, plevra, periton ve perikard sıvıları, idrar ve İİAS (ince iğne aspirasyon sıvısı) gibi sitolojik materyallerden hazırlanan ve alkolle fiksasyonu yapılan yaymaların boyanmasında kullanılır (191).

2.3.6.2. PAP Boyasında Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar

Hematoksilen boyası üzerinde oluşan artefakt, boyamaya başlamadan önce süzgeç kâğıdı ile alınmalıdır. Böylece boyama sırasında preparatlarda istenmeyen herhangi bir artığın kalması önlenmiş olur. Hematoksilen boyasında oksidasyona bağlı çökelti oluşabilir. Bu durumda boya süzöldükten sonra kullanılmalıdır (192).

2.3.6.3. May-Grünwald - Giemsa Boyasının Özellikleri

May-Grünwald - Giemsa boyası genellikle havada kurutulan kan yaymaları, kemik iliği yaymaları ve İİAS materyallerinin havada kurutulmuş preparatlarının boyanmasında kullanılır. Romanowski tipi boyalar (May-Grünwalds Giemsa: MGG, Giemsa, Diff-Quik) metilen mavisi ve eosin içerir. Hücrelerin asidik bileşeni (sitoplazma ve kromatin) boyanın bazik olan metilen mavisi- azur içeriği ile bağlanır ve giemsa boyasına özgü mavi renk oluşur (190).

Bu boyaların en önemli avantajı uygulamalarındaki kolaylık ve hızdır. Ancak hücrelerin morfolojilerini iyi koruması için, yaymaların hızlı bir şekilde kurumaları gereklidir. Kuruma işlemi yavaş olursa, artefaktlar artar. Bu nedenle elde sallama ya da sıcak üfleme gibi yöntemler uygulanabilmektedir. Kuruma süresi, materyalin ne kadar ince ve düzgün bir tabaka halinde yayıldığı ile yakından ilişkilidir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. MN için Çalışma Bölgesi ve Örnek Seçimi

TÜBİTAK tarafından desteklenen 111S177 nolu proje kapsamında bor bölgesinden 534 ve kontrol bölgesinden 512 olmak üzere 1046 gönüllü kadın da serviks kanseri taraması yapılmıştır. Taramaya katılan 30-60 yaş arasındaki gönüllü kadınların arasından hem bor bölgesinde hem de kontrol bölgesinde rastgele seçilen 30'ar kadından 24 saat idrar toplamaları istenmiş ve kreatinin klerensi ölçümleri yapılarak kadınların günlük bor alımları bu proje kapsamında saptanmıştır (193).

Tübitak destekli proje kapsamındaki verilerde idrardaki bor ve günlük alınan bor, kontrol grubunda sırası ile 0.98 ± 0.42 mg/gün ve 1.15 ± 0.95 mg/gün olarak bildirilirken, bu değerler bor grubunda, $3,02 \pm 1,45$ mg/gün ve $5,27 \pm 2,01$ mg/gün olarak bulunmuştur . Proje kapsamındaki tarama sonucunda bor bölgesinde 8 HPV pozitif, 19 ASCUS (Bethesda sistemine göre histopatolojik bulgu) olmak üzere 27 şüpheli olgu saptanmıştır. Aynı şekilde kontrol bölgesinde 7 HPV pozitif ve 17 ASCUS olmak üzere 24 şüpheli olgu saptanmıştır. İlgili projede örneklerden DNA eldesi GeneAll Ribospin Vrd Kit kullanılarak gerçekleştirildiği, ayrıca amplifikasyon aşamasında Seeplex HPV4A ACE kiti kullanıldığı bildirilmektedir (193).

Bu veriler temelinde planladığımız araştırmamızda çalışma grubumuzu bor bölgesinde saptanan 27, kontrol bölgesinde saptanan 24 kadına ait servikal smear örneklerinden oluşturulmuştur. Kontrol grubunu herhangi bir histopatolojik olgusu olmayan ve HPV negatif kadınlar arasından rastgele seçilen bor bölgesinden 10, bor dışı bölgeden 10 olmak üzere 20 kadına ait servikal smear örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir.

Bu çalışmanın etik kurul izni Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığından 18.12.2013 tarih 321 numaralı kararı ile alınmıştır.

3.2. Kullanılan Malzemeler

- May Grünwalds Solüsyonu, Merck HX135575
- Giemsa Solüsyonu, Merck HX947066
- Asetik Asid, 2.5L, Sigma lot: 81900
- Methanol, 2.5L, Sigma lot: 81560
- Agaroz, Lonza 50002
- TBE 10X ,Gibco 1489900
- Etidyum Bromür, Sigma 068K8705
- İzolasyon Kiti, Gene-All Ribospin Vrd 302-150
- Amplifikasyon Kiti
- Ksilol, İron Kimya 01FS/040714

- Entellan, Merck HX126033
- İmmersiyon yağı, Merck OB132624
- Etanol, Merck K41392783 037
- Lam, Citoglas 10128105P
- Lamel, Isotherm
- Pastör Pipeti
- Kurutma Kağıdı
- Şale
- Mezür

3.3. Kullanılan Cihazlar

- Su Banyosu, Nüve
- Işık Mikroskobu, Nikon YS2H
- Vortex, Dragon Lab MX-2
- Santrifüj, Hettich EBA 20
- Distile su cihazı, Elga DV25
- Hassas Terazi , Sartorius BA210S
- Amplifikasyon cihazı, Eppendorf AG 6325
- Mikropipet Pipet seti (20-200-1000 µl'lik) , Eppendorf
- Pipet Tabancası,
- +4, -20 Buzdolabı, Arçelik
- Pens

3.4. Kullanılan Çözeltiler

3.4.1.Fiksatif Çözeltisinin Hazırlanışı

1 birim glasiyal asetik asit'in üzerine 3 birim metanol eklenerek iyice karıştırıldı. Solüsyon her kullanım için taze olarak hazırlandı. Kullanmadan önce buzdolabında bekletilerek +4°C'ye soğutuldu.

3.4.2. Giemsa Boya Çözeltisinin Hazırlanışı

Bir birim hazır olarak gelen giemsa (Giemsa – Solution, Merck HX947066) boyası alınıp üzerine 9 birim distile su ilave edilerek hazırlandı.

3.5. Servikal PAP Smear Testi

Sahada gönüllülerden alınan servikal sürüntü örnekleri uygun koşullarda ve etiketlenmiş olarak patoloji laboratuvarına ‘Thin-Prep’ solüsyonu içerisinde gönderildi. Çalışmaya başlamadan önce her örnek için temiz 4 adet lizinli lam hazırlandı. Lamaların üzerine ait olduğu hastanın kodu yazıldı. Servikal sürüntülerin içerisinde bulunduğu materyalin tamamı 15 ml’lik falcon tübe boşaltılarak 14000 rpm’ de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı mikropipet yardımıyla çekilerek tekrar örnek kutusuna geri konuldu. Dipte kalan hücre pelletinin üzerine pellet hacminin 3 katı kadar %95’lik alkol eklendi. Mikropipet yardımıyla hızla pipetaj yapılarak pelletin alkol içerisinde iyice homojenize olması sağlandı böylece hücrelerin fiksasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen homojenizat daha önceden hazırlanmış lamlara mikropipet yardımıyla yavaşça daireler çizerek yayıldı ve oda sıcaklığında en az 24 saat havada kurumaya bırakıldı. Kuruma işlemi tamamlanan lamaların 2 tanesine PAP boyaması yapıldı. Diğer 2 adet lam May- Grünwalds Giemsa boyaması yapılmak üzere ayrıldı.

PAP boyama protokolü aşağıdaki gibidir;

%95’lik etil alkolde tespit edilmiş yaymalar, azalan konsantrasyonlu alkollerden geçirildi. Alkolle fikse edilmiş hücre öncelikle boyayla uyum sağlaması için kademeli olarak su seviyesine getirilmelidir.(rehidratasyon). Bu amaçla sırasıyla, %85’lik alkol, %75’lik alkol, %50’lik alkollerden geçirildi. Yaymalar çeşme suyunda 3-5 dakika yıkandı. Harris hematoksilende 45 saniye – 2 dakika bekletildi. Hematoksilen çözeltisi hazırlamada çözücü madde olarak su kullanıldı. Lamalar, çeşme suyunda yıkanarak fazla boya giderildi. Lamalar, asit alkolde 10 saniye çalkalanarak hücrelerin diferansiyasyonla almış olduğu fazla boya uzaklaştırıldı. Lamalar, hızlıca çeşme suyuna sokularak diferansiyasyon durduruldu. Yaymalar artan konsantrasyonlu alkollerden sırayla geçirildi: %50’lik alkol, %75’lik alkol, %85’lik alkol, %95’lik etil alkol içine 10 -12 kez daldırılıp çıkarıldı. Bu basamakta hücrelerin almış olduğu hematoksilen tespit edilmiş oldu. Lamalar iyice süzülerek orange- G boyasında 3 dakika bekletildi. Lamalar süzülerek boyadan çıkarıldı. Üç ayrı kaptaki %95’lik

etil alkol içinde 10 -12 kez daldırılıp çıkarıldı. Böylece preparattaki fazla boya çıkarılarak orange G tespit edildi. İyice süzülen preparatlar EA-50 boyasında 5 dakika bekletildi. Üç ayrı kaptaki %95'lik etil alkol içinde 10 -12 kez daldırılıp çıkarıldı. Preparattaki fazla boya çıkarılarak EA-50 boyası tespit edildi ve hücreler dehidrate edildi. Lamlar üç ayrı ksilol serilerinden geçirilerek hücreler saydamlaştırıldı (193).

Prepatların örnek olmayan yüzü gazlı bezle silindi ve yayma üzerine 1-2 damla entellan damlatılarak hava kabarcığı oluşturmada 45°lik açı ile bırakılan lamelle kapatıldı. Örnekler mapeye dizilerek kurumaya bırakıldı. Boyama işleminden sonra mikroskobiye hazır hale getirilen lamlar BETHESDA sistemine göre patoloji uzmanı tarafından değerlendirildikten sonra aynı preparatlardan MN sayımı yapıldı.

3.6. Servikal Sürüntü Örneklerinin May-Grünwalds - Giemsa Boyaması

Yukarıda anlatıldığı şekilde alkolle fiske edilerek lizinli lamlara yayılan preparatlardan her hasta örneği için 2 lam ilk olarak (3:1) metanol-asetik asit solüsyonunda 20 dakika fiske edildi. Daha sonra hücrelerin boyayı daha iyi alabilmeleri için 60° C ye kadar ısıtılmış su banyosunda 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Preparatlar, May –Grünwalds boyasında 15 dakika bekletildi. Çeşme suyunda su berrak hale gelinceye kadar yıkandı. Böylece fazla boya artıkları ortamdanda uzaklaştırıldı. Havada kurutuldu. Giemsa boyasında 15 dakika bekletildi. Preparatlar yine aynı şekilde akan suda yıkandı. Havada kurutuldu. Lamlar, ksilol serilerinden geçirilerek hücreler saydamlaştırıldı. Prepatların örnek olmayan yüzü gazlı bezle silindi ve yayma üzerine 1-2 damla entellan damlatılarak hava kabarcığı oluşturmada 45°lik açı ile bırakılan lamelle kapatıldı. Örnekler mapeye dizilerek kurumaya bırakıldı.

3.7. MN Sayımı

MN sayımı için Nikon YS2H marka ışık mikroskobu kullanıldı. Sayımlar 100x (immersiyon) objektifle yapıldı. MN sayımı yapılırken hücrelerin lam üzerine tek tek düşmüş olmasına dikkat edilmiştir. Hücrelerde dejenerasyon varsa bu hücreler sayılmamıştır. Ayrıca apoptotik hücreler ve sitoplazmik fragmentlerde dikkate alınmamıştır. MN sayımında;

- a. Işığı geçirmeyen
- b. Şekli yuvarlaktan ovale kadar olan,
- c. Düz yzeyli bir membrana sahip olan,
- d. apı, hücre nükleusunun çapının 1/3 ile 1/16'sı arasında olan,
- e. Hücre nükleusu ile bağlantısı olmayan
- f. Şekil, renk ve tekstür bakımından hücre nükleusuna benzeyen MN'lar değerlendirilmiştir.



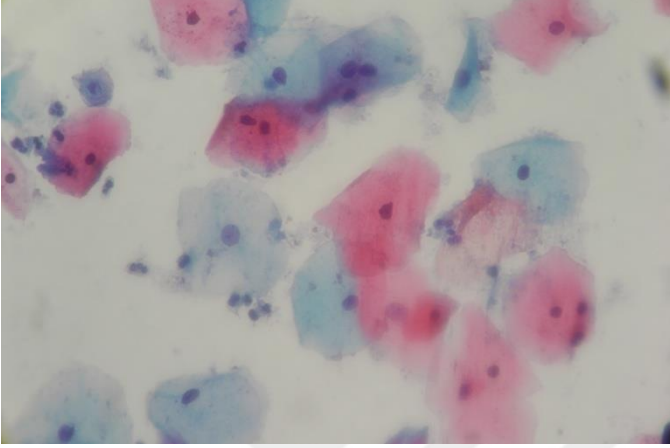
4. BULGULAR

4.1 Çalışmaya Alınan Olguların Demografik Bilgileri

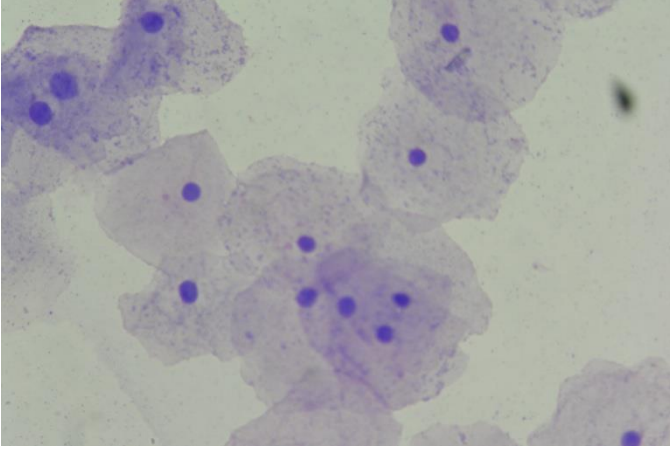
ÇalıŐmamıza katılan bor bölgesindeki kadınların yaş ortalaması $45,11\pm 7,96$ iken, kontrol bölgesinde $46,88\pm 7,68$ olarak hesaplandı ve yaş ortalamasının benzer olduğu saptandı. Bor bölgesinde, bora maruziyet süresi $41,81\pm 10,73$ iken kontrol bölgesinde ise aynı bölgede yaŐama süreleri $41,21\pm 11,79$ ' dur. Vücut Kitle İndeksleri (VKİ) ve evlenme yaşları sırası ile bor bölgesinde $29,97\pm 5,62$ ve $19,27\pm 2,68$ olarak hesaplandı, kontrol bölgesinde ise sırası ile $29,63\pm 4,42$ ve $19,44\pm 3,85$ ' dir. Gnllerin hiç biri sigara ve alkol kullanmamakta olup herhangi bir vitamin ve antioksidan kullanmamaktadır.

4.2. Olgularda PAP ve MGG Boyama Yöntemine Göre Saptanan Ortalama MN Sayıları

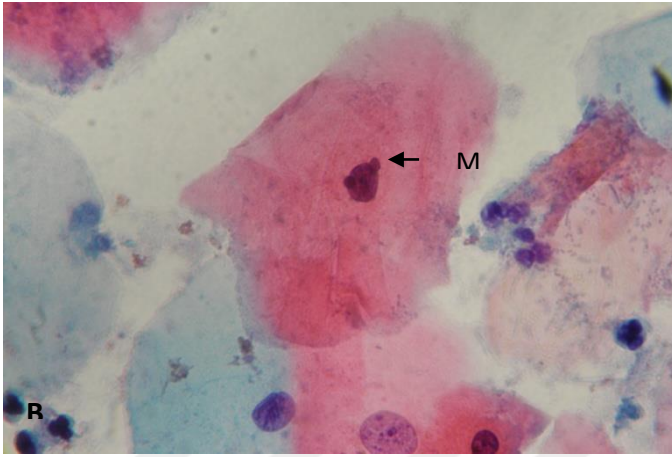
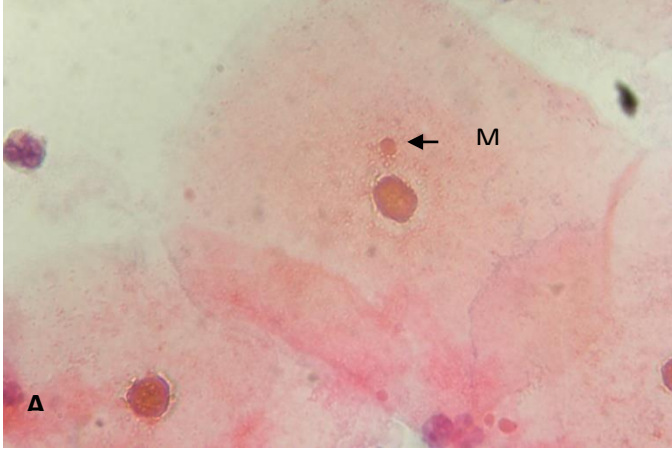
Çalışma gruplarından alınan smear örnekleri PAP ve MGG boyama metotlarına göre boyanarak 1000 hücrede MN sayımı yapıldı. Çalışmamızdan elde ettiğimiz PAP ve MGG boyanmış bir kısım servikal eksfoliyasyon hücrelerinden görünüşleri şekil 15 ve 16 de yer alırken MN li hücreler ise şekil 17 ve 18’de görülebilmektedir. Çizelge 6 ve 7 de görülebileceği üzere bor ve kontrol bölgesindeki (bor dışı bölge) olgulardan saptanan ortalama mikronükleus sayıları kendi iç kontrolleri ile birlikte görülebilir.



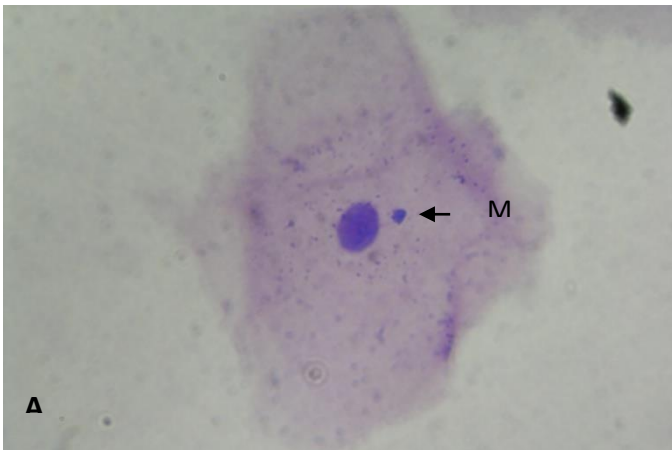
Şekil 15. Servikal smear örneklerinin PAP boyalı preparatlarında eksfoliyasyon hücrelerine ait genel görüntü (x40)

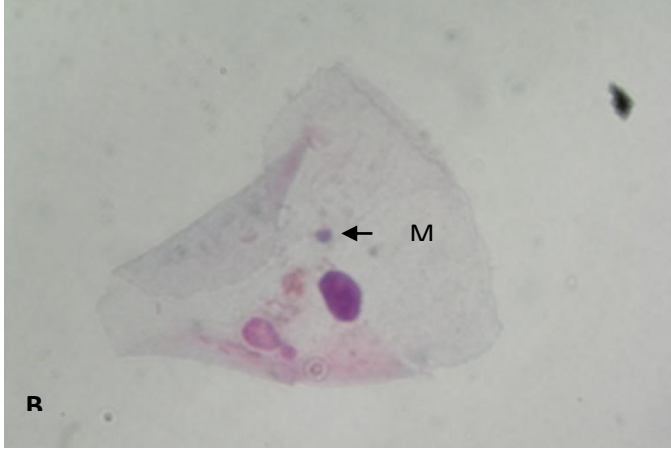


Şekil 16. Servikal smear örneklerinin MGG boyalı preparatlarında eksfoliyasyon hücrelerine ait genel görüntü (x40)



Şekil 17. PAP yöntemi ile boyanmış preparatlarda MN saptanan eksfoliyeye hücre görüntüsü
A: Sayım kriterlerine uyan MN saptanan eksfoliyeye hücre (x100), B: Sayım kriterlerine uymayan MN saptanan eksfoliyeye hücre (x100)





Şekil 18. MGG yöntemi ile boyanmış preparatlarda MN saptanan eksfoliyeye hücre görüntüsü A ve B: 1 adet Mikronükleus saptanmış eksfoliyeye hücreler x100,

Çizelge 6. Bor bölgesinde HPV (+), ASCUS ve Kontrol grubuna ait toplam MN sayım sonuçları

Gruplar	Denek sayısı	PAP boyama	MGG boyama
		ortalama MN sayısı /1000 hücre	ortalama MN sayısı / 1000 hücre
HPV (+)	8	5.75±3.19	5.37±2.26
ASCUS	19	0.95±0.97	2.11±1.88
KONTROL	10	0.50±0.70	0.50±0.70

Çizelge 7. Kontrol bölgesinde HPV (+), ASCUS ve Kontrol grubuna ait toplam MN sayım sonuçları

Gruplar	Denek sayısı	PAP boyama	MGG boyama
		ortalama MN sayısı /1000 hücre	ortalama MN sayısı / 1000 hücre
HPV (+)	7	5.86±2.54	4.86±1.95
ASCUS	17	2.18±2.46	2.53±2.76
KONTROL	10	0.90±0.99	0.60±0.70

4.3. Bor ve Kontrol Bölgesinde Saptanan HPV (+) ve ASCUS' lu Olgularda MN Sayıları

Çizelge 8'de görüleceği gibi HPV (+) ve ASCUS'lu kadınların örneklerinde saptanan MN sayısı bor bölgesi ile bor dışı bölge sonuçlarının karşılaştırılması sonucunda bütün gruplarda fark anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$).

Çizelge 8. Bor ve Kontrol bölgesinde saptanan HPV (+) ve ASCUS' lu olgularda MN sayılarının karşılaştırması*

Bulgusu olan hastalar	Boyama metodu	Bor bölgesi ortalama MN sayısı	Karşılaştırılan gruplar	Bor dışı bölge ortalama MN sayısı	p değeri	İstatistiksel sonuç
HPV (+)	PAP	5.75±3.19	BB / BD	5.86±2.54	0.769	Fark yok
HPV(+)	MGG	5.37±2.26	BB / BD	4.86±1.95	0.639	Fark yok
ASCUS	PAP	0.95±0.97	BB / BD	2.18±2.46	0.289	Fark yok
ASCUS	MGG	2.11±1.88	BB / BD	2.53±2.76	0.923	Fark yok

*Mann-Whitney U testi

Çizelge 9. Kontrol gruplarında saptanan MN sayılarına göre Bor ve Bor dışı bölgenin karşılaştırılması*

Grup	Boyama metodu	Bor bölgesi ortalama MN sayısı	Karşılaştırılan n gruplar	Bor dışı bölge ortalama MN sayısı	p değeri	İstatistiksel sonuç
Kontrol	PAP	0.50±0.70	BB / BD	0.90±0.99	0.341	Fark yok
Kontrol	MGG	0.50±0.70	BB / BD	0.60±0.70	0.702	Fark yok

* Mann-Whitney U

4.4. Bölgelerin Kendi İçinde PAP ve MGG Boyanma Yöntemine Göre Olguların Karşılaştırması

Çizelge 10'den de anlaşılacağı gibi hem bor bölgesinde hem de bor dışı bölgedeki HPV (+) kadınların PAP ve MGG boyamalarının, kontrol grubu ile karşılaştırılmasında MN sayısı bakımından fark, anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). ASCUS'lu olgular yönünden PAP ve MGG boyamalarının MN sayısı bakımından kendi iç kontrol grubu ile karşılaştırılmasında yalnızca MGG boyamada anlamlı fark elde edilirken ($p<0.05$), PAP boyamada ise istatistik yönden fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Bor dışı bölgede ise kendi iç kontrolü ile ASCUS'lu olgularda hem PAP hemde MGG boyamada istatistik yönden fark bulunmamıştır ($P>0.05$).

Çizelge 10. Bor ve bor dışı bölgedeki HPV (+) ve ASCUS' lu olgularda MN sayısının iç kontrol grupları ile karşılaştırılması*

Bölgeler	Boyama metodu	HPV(+) ortalama MN sayısı	Karşılaştırılan gruplar	Kontrol grubu ortalama MN sayısı	p değeri	Sonuç
Bor bölgesi	PAP	5.75±3.19	HPV(+) / Kontrol	0.50±0.70	0.000	Fark var
Bor bölgesi	MGG	5.37±2.26	HPV (+)/ Kontrol	0.50±0.70	0.000	Fark var
Bor dışı bölge	PAP	5.86±2.54	HPV(+)/ Kontrol	0.90±0.99	0.001	Fark var
Bor dışı bölge	MGG	4.86±1.95	HPV(+)/ Kontrol	0.60±0.70	0.000	Fark var
Bor bölgesi	PAP	0.95±0.97	ASCUS / Kontrol	0.50±0.70	0.235	Fark yok
Bor bölgesi	MGG	2.11±1.88	ASCUS / Kontrol	0.50±0.70	0.012	Fark var
Bor dışı bölge	PAP	2.18±2.46	ASCUS / Kontrol	0.90±0.99	0.359	Fark yok
Bor dışı bölge	MGG	2.53±2.76	ASCUS / Kontrol	0.60±0.70	0.051	Fark yok

* Mann-Whitney U

4.5. Bor Faktörü Dikkate Alınmaksızın Olgu Gruplarının Kendi İçinde Karşılaştırılması

Çizelge 11'de de görüldüğü gibi, bölge farkı gözetmeksizin HPV/Kontrol ve HPV/ASCUS olgu gruplarında PAP ve MGG boyanmış preparatların, MN sayısı bakımından karşılaştırılma sonuçları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). Buna karşın yalnızca ASCUS/Kontrol olgu grubunun karşılaştırılmasında MGG boyama da fark anlamlı iken ($P<0.05$), PAP boyama da anlamlı fark bulunmamıştır ($P>0.05$).

Çizelge 11. Tüm bölgede olgu gruplarının kendi aralarında karşılaştırılması*

	Boyama metodu	Ortalama MN sayısı	Karşılaştırılan gruplar	Ortalama MN sayısı	p değeri	Sonuç
Tüm Bölge	PAP	5.80± 2.81	HPV /Kontrol	0.70± 0.86	0.000	Fark var
Tüm Bölge	MGG	5.13± 2.07	HPV / Kontrol	0.55± 0.69	0.000	Fark var
Tüm Bölge	PAP	5.80± 2.81	HPV /ASCUS	0.70± 0.86	0.000	Fark var
Tüm Bölge	MGG	5.13± 2.07	HPV / ASCUS	0.55± 0.69	0.000	Fark var
Tüm Bölge	PAP	1.53± 1.90	ASCUS /Kontrol	0.70± 0.86	0.177	Fark yok
Tüm Bölge	MGG	2.31± 2.32	ASCUS/ Kontrol	0.55± 0.69	0.001	Fark var

* Mann-Whitney U

4.6. MN İndüksiyonun Saptanmasında PAP ve MGG Boyama Yöntemlerinin karşılaştırılması

Çizelge 12'den de anlaşılacağı gibi, bölge farkı olmaksızın toplam HPV pozitif ve ASCUS'lu olguların PAP ve MGG boyamalarının MN indüksiyonu bakımından karşılaştırması sonucunda p değeri sırası ile 0,584 ve 0,103 olduğundan aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Benzer şekilde hem bor bölgesinde ve hem de bor dışı bölgelerin kendi içlerinde HPV pozitif olguların smear örneklerinin PAP ile MGG boyanmaları MN sayısı bakımından karşılaştırıldığında, p değeri sırası ile 0.790 ve 0.350 olduğundan istatistik yönden anlamlı fark bulunmamıştır. Ancak bor bölgesinin kendi ASCUS'lu olguların smear örneklerinin PAP ve MGG boyamalarının MN sayısı bakımından karşılaştırılmasında, p değeri 0.045 olduğundan fark anlamlı iken, bor dışı bölgenin kendi içinde p=0.697 olarak saptanmış olup anlamlı bulunmamıştır.

Çizelge 12. MN İndüksiyonun Saptanmasında PAP ve MGG boyalı örneklerde MN sayısının karşılaştırılması*

Bölge	Hasta Grubu	Ortalama MN sayısı	Boyanma Karşılaştırması	Ortalama MN sayısı	p değeri	İstatistiksel Sonuç
Tüm bölge	HPV (+)	5.80± 2.81	PAP/MGG	5.13± 2.07	0,584	Fark yok
Tüm bölge	ASCUS	1.53± 1.90	PAP/ MGG	2.31± 2.32	0.103	Fark yok
Bor bölgesi	HPV(+)	5.75±3.19	PAP/ MGG	5.37±2.26	0,790	Fark yok
Bor dışı bölge	HPV(+)	5.86±2.54	PAP/ MGG	4.86±1.95	0.350	Fark yok

Bor bölgesi	ASCUS	0.95±0.97	PAP/MGG	2.11±1.88	0.045	Fark var
Bor dışı bölge	ASCUS	2.18±2.46	PAP/MGG	2.53±2.76	0.697	Fark yok

*Mann-Whitney U testi

4.7. Bor ve Bor Dışı Bölgelerde HPV pozitif ve ASCUS lu Olgular Temelinde MN İndüksiyonun İki Boyanma Yöntemiyle Karşılaştırılması Sonuçları

Çizelge 13’de görüldüğü gibi PAP ve MGG boyanan örneklerdeki MN sayısının anlamlılık düzeyini belirlemek için yapılan çapraz karşılaştırmalar da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (P>0.05).

Çizelge 13. Boyama yöntemlerinin bölgeler arası çapraz karşılaştırılması.

Bölge	Hasta Grubu	Ortalama MN sayısı	PAP-MGG Karşılaştırması	Ortalama MN sayısı	p değeri	Sonuç
BB / BD	HPV (8 kişi) HPV (7 kişi)	5.75±3.19	BB-PAP/ BD-MGG	4.86±1.95	0.555	Fark yok
BD / BB	HPV (7 kişi) HPV (8 kişi)	5.86±2.54	BD-PAP/ BB-MGG	5.37±2.26	0.907	Fark yok
BB / BD	ASCUS (19 kişi) ASCUS (17 kişi)	0.95±0.97	BB-PAP/ BD-MGG	2.53±2.76	0.082	Fark yok
BD/ BB	ASCUS (17 kişi) ASCUS (19 kişi)	2.18±2.46	BD-PAP/ BB MGG	2.11±1.88	0.734	Fark yok

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

HPV pozitif, ASCUS ‘lu ve herhangi bir bulgusu olmayan olguların servikal eksfoliya hücrelerinde MN indüksiyonunun, PAP ve MGG boyanma yöntemleriyle ile hem bor (BB/BD) yapılan karşılaştırma sonucunda 2 bölge arasında fark bulunmamıştır. Bu durum, alınan bor miktarının (bor bölgesinde 5,27 mg/gün kontrol bölgesinde 1,15 mg/gün) bölgeler arasında MN sayısı bakımından etkin olmadığını göstermektedir. (Çizelge 9)

Korkmaz vd. tarafından 2006'da yayınlanan bir çalışmada da bor bölgesi ve kontrol bölgesi MN sayısı bakımından karşılaştırıldığında bor bölgesinde saptanan günlük bor alımı 8,41 mg/gün olmasına rağmen fark olmadığı saptanmıştır. Bu sonuç bizim verilerimizle de desteklenmektedir (62). Diğer taraftan Uçkun tarafından yapılan bir çalışmada bor minerali açısından zengin bölgede yaşayan bireylerden kan alınarak lenfositlerde meydana gelen MN sayısında ki değişim miktarları tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bora maruz kalan bireylerde tespit edilen MN miktarlarının daha düşük olduğu görülmüş ve borun herhangi bir genotoksik etkisine rastlanmadığı gibi genetik hasara karşı koruyucu bir etkisi olabileceğini öne sürülmüştür (194).

Servikal kanseri önlemenin başlıca yolu düzenli servikal kanser taramasının yapılmasıdır. Böylece genellikle asemptomatik olan servikal prekanseröz lezyonların sitolojik tarama testi olan PAP testi ile erken tanısı ve anormal servikal sitoloji bulguları olan kadınlarda kolposkopi ve biyopsi sonucuna göre bulunan lezyonların tedavisi ile servikal kanser büyük oranda (>%90) önlenebilir bir hastalıktır. Gelişmiş ülkelerde PAP testinin yaklaşık 50 yıldır kullanılması ile servikal kanser %70 oranında azalmıştır. Ancak bu sonuç beklenenin altındadır. Tanıyı güçlendirecek ek testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız MN testi de hücredeki genomik kararsızlığı saptamayı sağlayan bir testtir. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Yapılan birçok çalışmada kansere doğru ilerleme sırasında hücredeki genomik kararsızlığın arttığı yönünde bulgular elde edilmiştir (184).

Servikal kanser için prekanseröz lezyon aşamasında hücrede oluşan genomik kararsızlık düzeyi belirlenebilirse lezyonun kansere gidip gitmeyeceği ya da ne kadar sürede kanserleşebileceği hakkında bilgi sahibi olmak prognozun takibinde hayati öneme sahiptir. Bizim çalışmamızda da PAP boyama sonuçları MN indüksiyonu açısından MGG boyama sonuçları ile karşılaştırılması sonucunda eksfoliyat serviks hücrelerinde MN sayısını belirlemesi yönünden aralarında fark olmadığı görülmektedir (Çizelge 12).

Birçok araştırmacı sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, kanserli hastalar arasında MN'lu hücrelerin frekansının yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Murgia vd. (2007) kontrollerle karşılaştırıldığında kanser hastalarında MN frekansının yüksek olduğunu göstermişlerdir (kontrolde $1,5 \pm 1,7$ MN/1000 BN hücre, kanser hastalarında $4,7 \pm 3,4$ MN/BN hücre). Tüm kanserlerde MN sayısı kontrollere göre 2,5 ve ya 3,5 kat artmaktadır (195).

Serviks kanserine yol açan ana etken Human Papillomavirüs (HPV)'dür. Serviks kanserli olguların hemen hemen %100'ünde HPV DNA'sı saptanmıştır (196). Campos vd. (2008) 101 servikal kanser hastası ile yaptıkları çalışmada HPV enfeksiyonu olan kadınların, HPV negatif olanlara göre MN frekansında önemli derecede artış olduğunu belirlemişlerdir (186). Araştırmamızda hem bor bölgesinde hem de bor dışı bölgedeki HPV pozitif kadınların PAP ve MGG boyamalarının, kontrol grubu ile karşılaştırılmasında MN sayısı bakımından fark anlamlı bulunmuştur. Bu sonuç ile HPV genomunun kişinin eksfoliyeye serviks hücrelerinde genomik kararsızlığa sebep olduğu, genetik hasarların duyarlı ve güvenilir göstergesi olarak kabul edilen mikronükleus testi ile birkez daha ortaya koymuştur. Viral genomun epitel hücre genomuna integrasyonu klastojenik bir olaydır ve kromozom kararsızlığının bir göstergesi olarak kabul edilen MN'lu hücre sayısındaki artışa sebep olur. Bu kromozom kararsızlığı yapısal kromozom aberasyonlu hücrelere götürür. Özellikle kromozom 1, 3, 5, 11 ve 17 de serviks kanserinin gelişimine eşlik eder (197). Ülkemizde servikal kanser ve prekanseröz lezyonlarda HPV genotiplerinin prevalansı ile ilgili epidemiyolojik veriler sınırlıdır.

Samanta vd. (2011) yaptıkları çalışmada 224 kadını 6 gruba ayırmışlardır: Normal (40), inflamasyonlu (40), ASCUS (30), LGSIL (38), HGSIL (30), IC (46). Bu gruplardan alınan smear örnekleri rutin PAP boyaması yapılmıştır. Araştırmacılar diğer tüm gruplar ile karşılaştırıldığında HSIL ve IC da MN sayısında önemli derecede fark olduğunu belirlemişlerdir. Keza LSIL ve ASCUS'da da normal ve inflamasyonlu kişilerle karşılaştırıldığında önemli fark olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada normalden inflamasyonlu ASCUS, LSIL ve HSIL'e doğru MN sayısının kademeli olarak arttığını göstermişlerdir. Aynı grup içerisinde bireyler arasındaki MN skorundaki büyük farklılık genotoksik ajanlar gibi çevresel faktörlere maruz kalma, yaşam şekli faktörleri, mikroblesleyici eksikliği, genetik altyapı gibi faktörlere bağlanabileceğini belirtmişlerdir (198).

Bizim çalışmamızda LGSIL, HGSIL ve IC vakası olmadığından dolayı sadece değerlendirmemiz HPV pozitif, ASCUS'lu ve kontrol grubundaki kadınlardan alınan servikal sürüntü örneklerinin PAP ve MGG boyalı preparatlarında saptanan MN sayısının hem bölge bazında hemde tüm bölgede kendi aralarında karşılaştırması yapılmıştır. Bor bölgesinde ASCUS'lu kadınların PAP ve MGG boyamalarının MN sayısı bakımından kontrol grubu ile karşılaştırılmasında MGG boyamada anlamlı fark elde edilirken PAP

boyamada istatistik yönden fark bulunmamıştır. Bor bölgesinde ASCUS lu olguların daha önce HPV enfeksiyonu geçirdiği yada eşik değerde HPV enfekte bireylerden oluştuğunu düşündürmüştür. Bu yönden MN testi kanseri yakalamda daha hassas bir işlev gördüğü söylenebilir. Bor dışı bölgede ise hem PAP hemde MGG boyamada istatistik yönden fark bulunmamıştır (Çizelge 10).

Bölge farkı gözetmeksizin HPV/Kontrol ve HPV/ ASCUS gruplardaki PAP ve MGG boyalı örneklerinin MN sayısı bakımından karşılaştırılma sonuçları istatistik yönden anlamlı bulunmuştur (Çizelge 11). Elde ettiğimiz bu sonuçlarla; HPV pozitif kadınlarda ASCUS ve kontrol grubuna oranla genomik kararsızlığın daha fazla olduğunu bir kez daha göstermiş olduk. Ancak ASCUS/Kontrol karşılaştırılmasında MGG boyamada fark anlamlı iken, PAP boyamada anlamlı bulunmamıştır. Bu durumda HPV negatif tanısı aldığı halde, servikal kanserde Bethesda sınıflandırmasına göre bir kategori olan ASCUS tanısı alan kadınlarda PAP boyamaya ilaveten MGG boyamanın yapılmasının genomik kararsızlığı daha hassas bir şekilde saptamak için kullanılması gerektiğini önerebiliriz. Çünkü ASCUS tanısı direkt olarak genomik kararsızlık için bir gösterge olmayabilir. Bu çalışmanın ASCUS boyutunda MGG boyanan servikal sürüntü örneklerinde MN sayımının, PAP boyamaya göre daha değerli sonuçlar verebileceğini öngörebiliriz. Samanta vd. (2011) yaptıkları çalışmanın sonucunda servikal epitelial hücrelerde MN sayımının kanser taramasında biyomarkır olarak kullanılabilir olduğunu çünkü bu yöntemin kolay, basit, güvenilir, tekrarlanabilir ve objektif bir test olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca MN aranmasının kolay ve düşük maliyetli olması da kanser erken tanısında biyomarkır olarak kullanılabilir olmasını sağlamaktadır (198). Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz veriler de bu görüşü desteklemektedir

Araştırmamızda bölge farkı olmaksızın toplam olguların HPV pozitif ve ASCUS'lu smear örneklerinin PAP ve MGG boyamalarının MN sayısı bakımından iki boyama yöntemi arasında anlamlı fark bulunmamıştır (Çizelge 12). Elde ettiğimiz sonuçlar genetik hasarların duyarlı ve güvenilir göstergesi olan MN testi için MGG boyamanın PAP boyamadan farklı sonuçlar vermediğini göstermiştir. Bu durumda rutinde histopatolojik bulgu saptanmasında kullanılan PAP boyanan preparatlarda genomik kararsızlığı saptamak için MN sayımı yapılmasında herhangi bir sakınca görülmemektedir. Farklı bir boya kullanılması durumunda gerekli olacak ek preparat hazırlama, boyama masrafları ve zaman kaybının önünü geçilmiş olunacaktır. Ancak yukarda vurguladığımız üzere ASCUS lu olgularda

düşük genomik kararsızlıkta MGG boyama yönteminin daha duyarlı olabileceği göz önüne alınmalıdır.

Bunlara ek olarak Çizelge 12 'de görüleceği üzere her iki bölgede de saptanan HPV pozitif kadınların bölge içinde PAP ve MGG boyama yöntemi temelinde karşılaştırılması durumunda smear örneklerinde MN sayısı bakımından iki yöntem arasında fark olmadığı saptanmıştır. Aynı değerlendirme ile ASCUS'lu kadınlarda PAP ve MGG boyamaları MN sayısı bakımından karşılaştırılması sonucunda bor dışı bölge içinde anlamlı fark ($p=0,045$) saptanırken bor bölgesi içinde fark olmadığı saptanmıştır. Ancak p değerinden de anlaşılacağı gibi $p=0,05$ e çok yakın olduğundan ihmal edilebilir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak Palaskar ve Jindal (2010) yaptıkları çalışmada bukkal eksfoliy hücrelerinde MN sayısı bakımından PAP ve MGG boyama yöntemlerini karşılaştırdıklarında PAP boyanan preparatlarda MN sayısının önemli derece de yüksek olduğunu saptamışlardır (199).

Sonuç olarak tüm bu bulgular dikkate alındığında servikal sürüntü örneklerinde genomik kararsızlığı saptamakta kullanılan MN sayımı için her iki boyama yönteminde kullanılabilirliğini söyleyebiliriz. Bor bölgesinde yaşayan ve günde $5,27\pm 2,01$ mg/gün bor alan bireylerin servikal eksfoliy hücrelerinde MN indüksiyonunu üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı düşünülmüştür.

6. KAYNAKLAR

1. Korkmaz M., Saylı U., Saylı BS., Bakırdere S., Titretir S, Ataman OY., Keskin S. Estimation of human daily boron exposure in a boron-rich area, *British Journal of Nutrition*, 2007; 98:571–575.
2. Kalafatoğlu İE., Örs SN. 21. Yüzyılda Bor Teknolojileri Ve Uygulamaları, *BAÜ Fen Bil. Enst. Derg.* 2003; 5.1:60-71.

3. Fenech M., Crott W.J. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutation Research*, 2002, 504: 131-136.
4. IARC (International Agency for Research on Cancer). Cancer Incidence and Mortality Worldwide, Globocan. 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
5. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı. 2009 Kanser İnsidansları, <http://www.kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html> 13 Mart 2014.
6. Alma HK., Acemioğlu B. Türkiye'nin Bor Kaynakları, Kullanım Yerleri Ve Orman Ürünleri Endüstrisi, *Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2001; 4, 2:62-72.
7. Yenialaca Ç. Bor ve Kullanım Alanları, Gazi Üniv, Eğitim fak. Y.L. Tezi, 2009, Ankara.
8. Yılmaz A. Her Derde Deva Hazinemiz Bor, *TÜBİTAK-Bilim ve Teknik Dergisi*, 2002. Ankara.
9. Gupta UC., James Yw., Campbell C.A., Leyshon et al. Boron toxicity and deficiency: a review. *Can J. Soil Sci.* 1985; 65: 381-409.
10. Benderdour M., Bui-Van T., Dıcko A., Bellevillp F. In Vivo and In Vitro Effects of Boron and Boronated Compounds *J. Trace Elements Med. Biol.* 1998; 12: 2-7.
11. U.S. EPA. Toxicology review of boron and compounds in support of information on integrated risk information (IRIS), *National Center for Environmental Assessment*, Washington DC. 2004. <http://www.epa.gov/iris>. Erişim 15. 1. 2014
12. Bakırdere S., Örenay S, Korkmaz M. Effect of Boron on Human Health, *The Open Mineral Processing Journal*, 2010; 3: 54-59.
13. TÜBİTAK Bor Raporu 2003. http://www.tubitak.gov.tr/tubitak_content_files/vizyon2023/mm/Ek2h.pdf
14. Eti maden, Bor Rezervleri. <http://www.etimaden.gov.tr/dunyada-bor-rezervi-55s.htm>
15. Boren. Bor Madeninin Anadolu'daki Tarihçesi. <http://www.boren.gov.tr/tr/bor/bor-tarihcesi>
16. Demir C. Bor Minerallerinin enerji kaynağı olarak değerlendirilmesi", Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Y.L. Tezi, 2000, Konya.
17. Roskill N. *The Economics of Boron*. 11th Edition, R. Inf. Services Ltd., London, 2006, Isbn086214516-3.
18. Boren. (Ulusal Bor Araştırmaları Enstitüsü). Bor Üretimi.

<http://www.boren.gov.tr/tr/bor/bor-uretimi>.

19. Kar Y., Şen N., Demirbaş A. Boron Minerals in Turkey, Their Application Areas and Importance for the Country's Economy. *Minerals and Energy - Raw Materials Report*, 2006, 20(3): 2-10.
20. Boren. Dünya Bor Rezervleri. <http://www.boren.gov.tr/tr/bor/bor-rezervleri>
21. Miessler GL., Tar DA. *İnorganik Kimya* (Çev. N. Karacan, P. Gürkan). Palme yayıncılık, Ankara. 2009.
22. WHO. Boron, World Health Organization, IPCS (Environmental Health Monograph) 204. Geneva: 1998.
23. Bolaños L., Lukaszewski K., Bonilla I., Blevins D. Why boron? *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004; 42:907–912.
24. Power PP., Woods WG. The chemistry of boron and its speciation in plants. *Plant and Soil*, 1997; 193: 1–13.
25. Boren. Bor Elementi, Bor Mineralleri. <http://www.boren.gov.tr/tr/bor/bor-elementi>
26. Korkmaz M., Saylı U., Şaylı B.S., Bakırdere S., Titretir S., Ataman O.Y., Keskin S. Estimation of human daily boron exposure in a boron-rich area. *British Journal of Nutrition*, 2007; 98: 571–575.
27. HERA (Human and Environmental Risk Assessment on ingredients of Household Cleaning Products). 2005, Substance: Boric Acid. (CAS No 10043 -35 -3). Edition 1.0, http://www.heraproject.com/files/27-F-06_HERA_Boric_Acid%20Jan_2005.pdf, Erişim tarihi: 22.03.2014
28. ECETOC Technical Report, Reproductive and general toxicology of some inorganic borates and risks assessment for human beings.: European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, 1995 No. 63 Brussels, Belgium.
29. Expert Group on Vitamins and Minerals. Revised Review of Boron. 2002.
30. Nielsen FH. Is boron nutritionally relevant? *Nutrition Reviews*, 2008; 66(4):183–19.
31. Rainey CJ., Nyquist L., Casterline J., Herman D. Estimation of Dietary Boron Intake in Six Countries: Egypt, Germany, Great Britain, Kenya, Mexico, and the United States, *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 1999;12:263–270.
32. U.S. EPA. Toxicological Review of Boron and Compounds. (CAS No. 7440-42-8), June 2004. www.epa.gov/iris. Erişim 2. 5. 2014.
33. US. EPA (Environmental Protection Agency). Health Effects Support Document for

- Boron. Document Number EPA-822-R-08-002, January, 2008. Erişim: 3. 5 204
http://www.epa.gov/safewater/ccl/pdfs/reg_determine2/healtheffects_ccl2-reg2_boron.pdf
34. Beyer KH., Bergfeld FW., Berndt WO., et al. Final report on the safety assessment of sodium borate and boric acid. *J Am Coll Toxicol*. 1983, 2(7):87-125.
 35. Food and Nutrition Board: Institute of Medicine. *Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Cooper, Iodine, Iron, Manganese. Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium. and Zinc*. Washington, D.C: National Academy Press, 2001.
 36. Jansen JA., Schou JS., Aggerbeck A. Gastrointestinal absorption and *in vitro* release of boric acid from water-emulsifying ointments. *Food Chem Toxicol*, 1984, 22: 49-53.
 37. Schou JS., Jansen JA. Aggerbeck, B. Human pharmacokinetics and safety of boric acid. *Arch Toxicol*, 1984, 7:232-235.
 38. Naghii MR., Samman S. The effect of boron supplementation on its urinary excretion and selected cardiovascular risk factors in healthy male subjects. *Biol Trace Element Res*. 1997, 56:273-286.
 39. Ku WW., Chapin RE., Moseman RF., et al. Tissue disposition of boron in male Fischer rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1991. 111:145-151.
 40. Brown T.F., McCormick ME., Morris DR., Zeringue LK. Effects of dietary boron on mineral balance in sheep. *Nutr Res*, 1989. 9: 503-512.
 41. Weeth HJ., Speth CF., Hanks DR. Boron content of plasma and urine as indicators of boron intake in cattle. *Am J Vet Res*, 1981; 42:474-477.
 42. Vanderpool RA., Haff D., Johnson PE. Use of inductively coupled plasma-mass spectrometry in boron-10 stable isotope experiments with plants, rats and humans. *Environ Health Perspect*, 1994; 102(Suppl 7): 13-20.
 43. Culver BD., Shen PT., Taylor TH., Lee-Feldstein A., Anton-Culver H., Strong PL. The relationship of blood- and urine-boron to boron exposure in borax-workers and the usefulness of urine-boron as an exposure marker. *Environ Health Perspect*, 1994, 102 (Suppl 7): 133-137.
 44. Friis-Hansen B., Aggerbeck B., Jansen, J A. Unaffected blood boron levels in newborn infants treated with a boric acid ointment, *Food Chem Toxicol.*, 1982, 20, 451-454.
 45. Treinen KA., Chapin RE. Development of testicular lesions in F344 rats after treatment with boric acid. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1991; 107:325-335.

46. Ku WW., Chapin RE., Wine RN., Gladen, BC. Testicular atrophy of boric acid 2 (BA): Relationship of dose to lesion development and recovery in F344 rat. *Reprod. Toxicol.* 1993, 7: 3 305-319.
47. Chapin RE., Warren W., Ku WW., Kenney MA., et al. The Effects of Dietary Boron on Bone Strength in Rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, 1997, 35, 205-21 5.
48. Naghii MR., Samman S. The effect of boron supplementation on the distribution of boron in selected tissues and on testosterone synthesis in rats. *Nutr Biochem*, 1996, 7:507-512.
49. Banuelos GS. Managing high levels of boron and Selenium with trace element accumulator crops. *J. Environ. Sci. Health.* 1996, A 31, 1179-1196.
50. Rainey CJ., Nyquist LA., Christensen RE., et al. Daily boron intake from the American diet. *J Am Diet Assoc*, 1999, 99(3):335-340
51. Şaylı BS. İnsan Sağlığı ve Bor Mineralleri, A.Ü.Tıp Fakültesi, Eti Holding Projeleri Yürütücüsü, 2000. Ankara, (www.bigadic.gov.tr).
52. Muray FJ. A comparative review of the pharmacokinetics of boric acid in rodents and humans, *Biol Trace Elem Res.*, 1998, 66: 331-341.
53. Moseman RF. Chemical disposition of boron in animals and humans. *Environ Health Perspect*, 1994, 102:113-117.
54. Demirtaş A. Bor'un İnsan Beslenmesi ve Sağlığı Aç ısından Önemi, *A. Ü, Z. F. Dergisi*, 2010, 41 (1): 75-80.
55. Heindel JJ., Price CJ., Field EA., Marr MC., Myers CB., Morrissey RE Schwetz BA. Developmental toxicity of boric acid in mice and rats, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1992, 18: 266-277,
56. Price CJ., Marr MC., Myers CB., Seely JC., Heindel JJ., Schwetz BA. The developmental toxicity of boric acid in rabbits, *Fundam.Appl.Toxicol.*,1996, 34:176-187.
57. Şayli BS. An assessment of fertility in boron- exposed Turkish subpopulations. Evidence that boron has no effect on human reproduction, *Biol.Trace Elem.Res* 1998a, 66:409-422.
58. Şayli BS. The sex ratio of offspring of people exposed to boron. *Reprod Toxicol.* 1998b, 12(6):673-674.

- 59.** Benson WH., Birge WJ., Dorough, HW. Absence of mutagenic activity of sodium borate (borax) and boric acid in the Salmonella preincubation test. *Environ Toxicol Chem*, 1984, 3:209-214.
- 60.** Haworth S., Lawlor T., Mortelmans K., Spec W., Zeiger E. *Salmonella* mutagenicity test results for 250 chemicals. *Environ. Mutagen*, 1983, 1(Suppl): 3-142.
- 61.** Stewart KR. Salmonella/microsome plate incorporation assay of boric acid. Submitted by U.S. Borax Corporation; MRID No. 4203901.1991.
- 62.** Korkmaz M., Uzgören E., Bakırdere S., Aydın F., Ataman OY. Effects of Dietary Boron on Cervical Cytopathology and on Micronucleus Frequency in Exfoliated Buccal Cells, *Environ Toxicol*, 2007, 22:17–25
- 63.** Müezzinoğlu T. Bor Madeni Prostat Kanserini Önlüyor mu, 2008., www.frm.tr.com/1442-159 .
- 64.** Bradke T.M., Hall C., Carper SW., Plopper G.E. Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability, *Cell Adhesion & Migration*, 2008, 2(3):153-160.
- 65.** Mcauley E.M. Bradke T.A. Plopper G.E. Phenylboronic acid is a more potent inhibitor than boric acid of key signaling networks involved in cancer cell migration, *Cell Adhesion & Migration*, 2011, 5(5):382-386.
- 66.** Barranco W.T., Hudak P.F., Eckhert C.D. Evaluation of ecological and in vitro effects of boron on prostate cancer risk (United States), *Cancer Causes Control*, 2007, 18:71-77.
- 67.** Barranco W.T., Eckhert C.D. Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation, *Cancer Lett*, 2004, 216:21–6.
- 68.** Carper S.W., Hall C., Meacham S.L. Boric acid and phenyl boric acid induce apoptosis in prostate cancer cell lines, *Cell Biol Toxicol*, 2007, 24. S30.
- 69.** Bakırdere S., Korkmaz M. Bor elementinin prostat kanseri üzerine etkisinin incelenmesi: Topluma dayalı çalışma, *Üroonkoloji Bülteni*, 2011, 2:117-118.
- 70.** Wright TJ., Kurman R., Ferenczy A. Precancerous lesions of the cervix. In: Kurman R, ed. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. New York: Springer-Verlag, 1994, 229-77.
- 71.** Steben M., Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol*, 2007, 107(2 Suppl 1):2-5.

72. Monk BJ., Tewari KS. The spectrum and clinical sequelae of human papillomavirus infection. *Gynecologic Oncolog*, 2007, 107:6-13.
73. Ulukuş Ç. Rahim Ağzı Kanseri, Dokuz Eylül Üniv. Tıp Fak., 2005.
74. Jemal A., Thomas A., Murray T. et. al. Cancer statistics, *CA Cancer J Clin*, 2002, 52:23-47.
75. Walboomers JM. Jacobs MV. Manos MM. Bosch FX., Kummer JA., Shah K.V. et al. "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide", *J Pathol*. 1999, 189(1):12-9.
76. Güner H., Taşkıran Ç. Serviks Kanseri Epidemiyolojisi Ve Human Papillomavirüs *J Turk Soc Obstet Gynecol*, 2007, 4(1):11-19
77. zur Hausen H. "Papillomavirus in anogenital cancer: the dilemma of epidemiologic approaches", *J Natl Cancer Inst.*, 1989, 81(22):1680-2.
78. Bernard HU. The clinical importance of nomenclature evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2005, 325:1-6
79. Kubar A. Papillomavirüslerin genel özellikleri. XXXII.Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı S:231-233
80. Franco EL. Harper DM. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine*, 2005, 23(17-18): p. 2388-94.
81. De Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H. Classification of papillomaviruses, *J Virol*, 2004, 324, 17-27.
82. Malik H., Khan FH., Ahsan H. Human papillomavirus: current status and issues of vaccination. *Arch Virol*, 2014, 159:199–205.
83. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application, *Nat Rev Cancer*, 2002; 2, 342-350.
84. Leto MG., Santos Júnior G.F., Porro A.M., Tomimori J. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations, *An Bras Dermatol*, 2011, 86: 306-317.
85. Doorbar J., Quint W., Banks L., Bravo I.G., Stoler M., Tom R., Broker T.R., Stanley M.A. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine* 2012, 30:55–70.
86. Tsai TC., Chen SL. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein, *ArchVirol*, 2003, 148: 1445-53.

- 87.** Scheffner M., Werness BA., Huibregtse JM., Levine AJ., Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53, *Cell*, 1990, 63:1129-36.
- 88.** Dyson N., Howley PM., Munger K., Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product, *Science* 1989, 243 : 934-7.
- 89.** Nees M., Geoghegan JM., Hyman T., Frank S., Miller L., Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation associated and NF-kappa B responsive genes in cervical keratinocytes, *J Virol*, 2001, 75:4283-96
- 90.** Park JS., Kim EJ., Kwon HJ., Hwang ES., Namkoong SE., Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis, *J Biol Chem*, 2000, 275:6764-9.
- 91.** Hagensee ME., Yaegashi N., Galloway DA. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins, *J. Virol.* 1993, 67, 315–322
- 92.** Yarkın F., Vardar MA. HPV immunolojisi ve natürel enfeksiyonlar , *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst Special Topics*, 2009, 2, 43-47.
- 93.** Van Regenmortel MH., Maniloff J., Calisher CH. The concept of virus species. *Arch Virol.* 1991, 120:313–314.
- 94.** Hans-Ulrich B., Itzel E., Calleja-Macias S., Terence D. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *Int. J. Cancer*, 2006, 118:1071–1076
- 95.** Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses, 2005, *J Clin Virol*, 32: 1-6.
- 96.** No JH., Kim MK., Jeon YT., Kim YB., Song YS. Human papillomavirus vaccine: widening the scope for cancer prevention, 2011, *Mol Carcinog*, 50, 244-253.
- 97.** Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence, *J Clin Virol*, 2000, 19:1-5.
- 98.** WHO/ICO. Information centre on HPV and cervical cancer (HPV information centre). Human papillomavirus and related cancers in world, Summary Report HPV related statistics. Available at: <http://www.who.int/hpvcentre>. (2010)

- 99.** Walboomers JM., Jacobs MV., Manos MM., Bosch FX., Kummer JA., Shah KV., Snijders PJ., Peto J., Meijer CJ., Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, *J Pathol.* 1999, 189(1), 12-9.
- 100.** Smith JS., Lindsay L., Hoots B., Keys J., Franceschi S., Winer R. et al. Humanpapillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-gradecervical lesions: a meta-analysis update, *International Journal of Cancer*, 2007, 121, 621–32.
- 101.** Munoz N., et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 2003, 348(6): p. 518-27.
- 102.** Bosch FX., et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87(11): p. 796-802.
- 103.** Asiaf A. Ahmad ST. Mohammad SO., Zargar MA. ‘Review of the current knowledge on the epidemiology, pathogenesis, and prevention of human papillomavirus infection, *Eur J Cancer Prev*, 14 Oct 2014
- 104.** Münger K., Baldwin A., Edwards KM., Hayakawa H., Nguyen CL., Owens M. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis, 2004, *J Virol*, 78: 11451-1160.
- 105.** Carter JR., Ding Z., Rose BR. HPV infection and cervical disease: a review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2011, 51(2):103-8.
- 106.** Richart RM., Barron BA. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol*, 1969, 105(3):386-93.
- 107.** Syrjanen SM., Syrjanen KJ. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann Med* 1999, 31: 175–187.
- 108.** Doorbar J. The papillomavirus life cycle, *J Clin Virol*, 2005, 32 (Suppl 1):7-15
- 109.** Andersson S., Hansson B., Norman I., et al. Expression of E6/E7 mRNA from high risk human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and p16INK4a. *Int J Oncol*, 2006, 29: 705-711.
- 110.** Motoyama S., Cecilia AL., Villanueva SL., Maruo T. The role of Human papillomavirus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci* 2004,50 (1): 9-19.
- 111.** Fehrman F., Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 2003, 22(33): 5201-7.

112. Yim E.K., Park JS. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV- associated cervical carcinogenesis. *Cancer Res Treat* 2005, 37(6): 319-324.
113. Wolf JK., Ramirez PT. The molecular biology of cervical cancer. *Cancer Invest*, 2001, 19(6), 621-629.
114. zur Hausen H. Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1288: F55-F78.
115. Kubbutat MH., Vousden KH. Role of E6 and E7 oncoproteins in HPV- induced anogenital malignencies. *Sem Virol* 1996, 7: 295-304.
116. Zhang HS., Postigo AA., Dean DC. Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition. *Cell*, 1999, 97: 53-61.
117. Dyson N., Howley PM., Munger K., Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 1989, 243: 934-937.
118. McMurray HR., Nguyen D., Westbrook TF., Mcance DJ. Biology of human papillomaviruses, *Int J Exp Pathol*. 2001, 82:15-33.
119. Atasü T., Aydınlı K. (eds) *Jinekolojik Onkoloji* (2. Baskı). Logos Yayıncılık, İstanbul, 1999.
120. Hatch KD. Handbook of colposcopy, Diagnosis and treatment of Lower Genital Tract Neoplasia and HPV Infections. Boston: Little, Brown and Co, 1989, 7- 19p.
121. Reich O. Is early first intercourse a risk factor for cervical cancer? *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch.* Oct, 2005, 45(4):251-6.
122. Disaia PJ., Creasman WT. (Eds), *Klinik Jinekolojik Onkoloji*, Güneş Kitapevi, Ankara, 2003.
123. Juneja A., et al. A Survey on Risk Factors With Cervical Cancer, *Indian Journal of Cancer*, 2003, 40(1): 15-22.
124. Prabhakar AK., Menon GR. Age at marriage and cervical cancer incidence, *Indian J Cancer*, 1995, 32(2): 63-8.
125. Ayhan A., Dursun p. (eds) *Kadın Genital Kanseri ve HPV Kitabı*. Akademi Yayınevi, Ankara, 2010.
126. Kişnişçi HA., Gökşin E. (eds). *Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi*. Güneş Kitapevi, Ankara, 1996.

- 127.** American Cancer Society guideline for human papillomavirus (HPV) vaccine use to prevent cervical cancer and its precursors, *CA Cancer J Clin* 2007, 57: 7–28.
- 128.** Berman ML., Grosen EA. *Cervix*. In: Haskell C.M. Berek J.S. Cancer Treatment, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1995.
- 129.** Makuc DM., et al. Health insurance and cancer screening among women, advance data, 1994, 254: 1–9.
- 130.** Wang PD., Lin RS. Sociodemographic factors of pap smear screening in Taiwan, *Gynecol. Oncol.* 1996, 62: 1: 10–8.
- 131.** Trottier H., Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*, 2006, 24 Suppl 1: p. S1-15.
- 132.** Alam S., Conway MJ., Chen HS., Meyers C. The Cigarette Smoke Carcinogen Benzo[a]prene Enhances Human Papillomavirus Synthesis, *Journal of Virology* 2008, 1053-1058p.
- 133.** Sood AK. Cigarette smoking and cervical cancer: meta-analysis and critical review of recent studies. *Am. J. Prev. Med*, 1991, 7: 208–13.
- 134.** Tuncer S. *Servikal Sitolojik Anormalliklere Klinik Yaklaşım ASCCP Önerileri*. Ankaraform, Ankara, 2004.
- 135.** Türkiye’de Serviks Kanseri Durumu ve Servikal Kanser Tarama Çalışmaları. <http://www.ukdk.org/pdf/kitap/30.pdf>
- 136.** A.C.S. Cervical Cancer Overview, 2103.
- 137.** Buckley CH., Butler EB., Fox H. Cervical intra epithelial neoplasia. *J Clin Pathol* 1982, 35(1): 1-13.
- 138.** Schiffman MH., et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, 1993, 85(12): 958-64.
- 139.** The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. National Cancer Institute Workshop. *JAMA*, 1989, 262(7):931-4.
- 140.** Davey DD., et al. Terminology and specimen adequacy in cervicovaginal cytology. The College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program experience. *Arch Pathol Lab Med*, 1992, 116(9): 903-7.
- 141.** Broder S. From the National Institutes of Health. *JAMA*, 1992, 267(14): p.1892.

- 142.** Solomon D., et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*, 2002, 287(16):2114-9.
- 143.** Diane S, Diane D, Robert K et al. Bethesda System Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology 2002, 287: 2114-2119.
- 144.** Park TW., et al. Association between human papillomavirus type and clonal status of cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst*, 1996, 88(6): 355-8.
- 145.** zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(9):690-8.
- 146.** Eddy GL., et al. Biopsy findings in five hundred thirty-one patients with atypical glandular cells of uncertain significance as defined by the Bethesda system. *Am J Obstet Gynecol*, 1997, 177(5): 1188-1195.
- 147.** Butel JS. Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease, *Carcinogenesis*, 2000, 21: 405-26.
- 148.** Herrera LA., Benitez-Bribiesca L., Mohar A., Ostrosky-Wegman P. Role of infectious diseases in human carcinogenesis, *Environ Mol Mutagen*. 2005, 45: 284-303.
- 149.** Gollin SM. Mechanisms leading to chromosomal instability, *Semin Cancer Biol.*, 2005,15:33-42.
- 150.** Heselmeyer K., Schrock E., Du Manoir S., Blegen H., Shah K., Steinbeck R., Auer G., Ried T. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1996, 93:479-84.
- 151.** Duensing S., Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability, *Cancer Res.*, 2002, 62:7075-82.
- 152.** Duensing S., Munger K. Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins, *Prog Cell Cycle Res.*, 2003, 5: 383-91.
- 153.** Giannoudis A., Evans MF., Southern SA., Herrington CS. Basal keratinocyte tetrasomy in low-grade squamous intra-epithelial lesions of the cervix is restricted to high and intermediate risk HPV infection but is not type-specific, *Br J Cancer*, 2000, 82: 4248.
- 154.** Mia C., Bancher, D., Kohlberger, P., Kainz, C., Haitel, A., Czerwenka, K., Stani, J., Breitenecker, G., Wiener, H. Fluorescence in Situ Hybridization in cervical smears: detection of numerical aberrations of chromosomes 7,3, and X and relationship to HPV infection, *Gynecologic Oncology*, 1999, 75:41-46.

- 155.** Jin Y., Zhang H., Tsao SW., Jin CL., Strombeck B., Wiegant J., et al. Cytogenetic and molecular genetic characterization of immortalized human ovarian surface epithelial cell lines: consistent loss of chromosome 13 and amplification of chromosome 20, *Gynecologic Oncology*, 2004, 92:183-191.
- 156.** Ohta M., Inoue H., Cotticelli MG., et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers, *Cell*, 1996; 84: 587–597
- 157.** Connolly DC., Greenspan DL., Wu R., et al. Loss of Fhit expression in invasive cervical carcinomas and intraepithelial lesions associated with invasive disease, *Clin. Cancer Res.*, 2000; 6: 3505–3510
- 158.** Majer BJ., Laky B., Knasmuller S., Kassie F. Use of the micronucleus assay with damage and in chemoprevention trials. *Mutat Res*, 2001, 489:147-72.
- 159.** Demirel , Zamani AG. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları *Genel Tıp Derg*; 2002, 12(3):123-127.
- 160.** von Ledebur MM., Schmid W. The micronucleus test: Methodological aspects. *Mutat Res*, 1973, 19:109-117.
- 161.** Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res*, 1975, 31:9-15.
- 162.** Heddle JA., Countryman RI. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res*. 1976, 41:321-332.
- 163.** Fenech M., Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes, [Mutation Research, 1985, 147: 29–36.](#)
- 164.** Stich HF., Stich W., Parida BB. Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: Betel quid chewers. *Cancer Lett.* 1982, 17:125-34.
- 165.** Stich HF., Rosin MP. Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and intervention. *Cancer Lett.* 1984, 22:241-53.
- 166.** Lehucker-Michel MP., DiGiorgio C., Amara Lehucke –Michel MP., DiGiorgio C., Amara YA., Laget M. The micronucleus assay in human exfoliated urothelial cells: Effects of smoking. *Mutagenesis*, 1995, 10:329-32.
- 167.** Moore LE., Warner ML., Smith AH., Kalman D., Smith MT. Use of fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells. *Envir Mol Mutagen*, 1996, 27:176-84.

- 168.** Moore LE., Smith AH., Hopenhayn-Rich C., Biggs ML., Kalman D., Smith MT. Micronuclei in exfoliated bladder cells among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1997, 6:31-36.
- 169.** Rosin MP., Anwar W. Chromosomal damage in urothelial cells from Egyptians with chronic *Schistosoma Haematobium* infections. *Int J Cancer*, 1992, 50:539-43.
- 170.** Fenech M. The invitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 2000, 455, 81–95.
- 171.** Norppa H., Renzi L., Lindholm C. Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization, *Mutagenesis*, 1993, 8:519–525.
- 172.** Holland N., Bolognesi C., Kirsch-Volders M., Bonassi S., Zeiger E. Knasmueller S., Fenech M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN Project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research*, 2008, 659:93–100.
- 173.** Iarmarcovai G., Bonassi S., Botta A., Baan RA., Orsiere T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. *Mutation Research*, 2008, 658:215–233,
- 174.** Fenech M., Holland N., Chang WP. Zeiger E., Bonassi S. The HUman MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*, 1999, 428:271–283.
- 175.** Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan AT., Surralles J., Crott JW., Parry J., Norppa H. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 2011, 26 (1):125–132.
- 176.** Heddle JA., Fenech M., Hayashi M., MacGregor JT. Reflections on the development of micronucleus assays. *Mutagenesis*, 2011, 26(1):3–10.
- 177.** Shimizu N. Molecular mechanisms of the origin of micronuclei from extrachromosomal elements. *Mutagenesis*, 2011, 26(1)119–123.
- 178.** Fenech M. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Phys.*, 2010, 98:234–243.
- 179.** [Thomas P.](#), [Fenech M.](#) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes, [Methods Mol Biol.](#) 2011, 682:217-34.

- 180.** Lindholm C., Norppa H., [Hayashi](#) M., Sorsa M. Induction of micronuclei and anaphase aberrations by cytochalasin B in human lymphocyte cultures, *Mutation Research*, 1991, 260(9): 369–375.
- 181.** Tawn EJ., Whitehouse CA. Frequencies of chromosome aberrations in a control population determined by G banding, *Mutation Research*, 2001, 490: 171-177.
- 182.** Maluf SW., Erdtmann B. Genomic instability in Down syndrome and Fanconi anemia assessed by micronucleus analysis and single-cell gel electrophoresis. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001, 124:71–75.
- 183.** Bisht SK., Devi UP. Dose dependent increase in the frequency of micronuclei and chromosomal aberrations by misonidazole in mouse bone marrow, *Mutation Research*, 1994, 325: 57-63.
- 184.** Bonassi S., El-Zein R., Bolognesi C., Fenech M. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis* 2011, 26(1):93–100.
- 185.** Bonassi S., Znaor A., Ceppi M., et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 2007, 28: 625–631.
- 186.** Campos LM., Diaz F., Antunes LM., Murta EF. Prevalence of micronuclei in exfoliated uterine cervical cells from patients with risk factors for cervical cancer. *Sao Paulo Med J.* 2008, 126(6):323-8.
- 187.** Leal-Garza CE., Cerda-Flores RM., Leal-Elizondo E., Cortes-Gutierrez EI. Micronuclei in Cervical Smears and Peripheral Blood Lymphocytes from Women with and without Cervical Uterine Cancer, *Mutat. Res.* 2002, 515:57–62.
- 188.** Stich HF., Rosin MP. Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and intervention. *Cancer Lett.* 1984, 22:241-53.
- 189.** Tolbert PE., Shy CM., Allen JW. Micronucleus and other nuclear anomalies in buccal smears: A field test in snuff users. *Am J Epidemiol*, 1991, 134: 840-850.
- 190.** Demir R., Yılmaz S., Öztürk M., Üstünel İ., Demir N, Korgun ET., Akkoyunlu G. *Histolojik Boyama Teknikleri*, Palme Yayıncılık, Ankara, 2001.
- 191.** Üzmez Önal B. *Kanserin Tanı Ve Takibinde Sitopatolojinin Rolü Ve İnce İğne Aspirasyon Ünitesi'nin Fonksiyonu*. Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı Yayınları, 2001.
- 192.** *Practical Principles of Cytopathology Revised*, Richard M Demay, 2007.

- 193.** Korkmaz M., Güvenal T., Akçalı S., Keskin S., Göker A., Demirci H., Yıldırım H. Kronik Bor Etkisinde Kalan ve Kalmayan Kadınlarda HPV Sıklığı ile Genotiplerinin Karşılaştırılması. TÜBİTAK, 111S177 No'lu Proje, 2014, Ankara.
- 194.** Uçkun Z. Bor Maruziyetinin İnsanlar Üzerindeki Genotoksik Etkilerinin Araştırılması, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, *Yüksek Lisans Tezi*, 2006.
- 195.** Murgia E., Ballardini M., Bonassi S., Rossi AM., Barale R. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. *Mutat. Res.* 2008, 639: 27–34.
- 196.** Clifford G., Franceschi S., Diaz M., Munoz N., Villa LL. HPV type distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine*, 2006, 24(Suppl 3):S26-34.
- 197.** Leal-Garza CG., Cerda-Flores RM., Leal-Elizondo E., Cortés-Gutiérrez EI. Micronuclei in cervical smears and peripheral blood lymphocytes from women with and without cervical uterine cancer. *Mutation Research* 515 2002, 57–62.
- 198.** Samantha S., Dey P., Nijhawan R. Micronucleus in cervical intraepithelial lesions and carcinoma. *Acta Cytol.* 2011, 55(1):42-7.
- 199.** Palaskar S., Jindal C. Evaluation Of Micronuclei Using Papanicolaou And May Grunwald Giemsa Stain In Individuals With Different Tobacco Habits – A Comparative Study, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2010, December ;(4):3607-3613.

ÖZGEÇMİŞ

Hatice YILDIRIM 28.10.1989 tarihinde Tekirdağ'da doğdu. İlk ve ortaokulu bitirdikten sonra lise öğrenimini 2004-2007 yılları arasında Tekirdağ Namık Kemal Lisesi (Y.D.A)'da tamamladı. 2007 yılında Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimi sırasında TEV başarı bursunu almaya

hak kazandı ve 2011 yılında Fakülte birincisi olarak mezun oldu. Aynı yıl Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programına kaydoldu. Yüksek lisans öğrenimine devam ederken 2012-2013 öğretim yılında Celal Bayar Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi tarafından verilen Pedagojik Formasyon programını tamamladı. Yüksek Lisans öğrenimi sırasında TÜBİTAK tarafından desteklenen bir projeye bursiyer olarak görev aldı.

