

**T.C.
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI**

TIBBİ LABORATUVAR

**SİTOLOJİK PREPARAT HAZIRLAMA
725TTT141**

Ankara, 2011

- Bu modül, mesleki ve teknik eğitim okul/kurumlarında uygulanan Çerçeve Öğretim Programlarında yer alan yeterlikleri kazandırmaya yönelik olarak öğrencilere rehberlik etmek amacıyla hazırlanmış bireysel öğrenme materyalidir.
- Millî Eğitim Bakanlığınca ücretsiz olarak verilmiştir.

PARA İLE SATILMAZ.

İÇİNDEKİLER

AÇIKLAMALAR.....	iii
GİRİŞ	1
ÖĞRENME FAALİYETİ-1	3
1. SİTOPATOLOJİ.....	3
1.1. Sitolojik Yöntemler.....	5
1.1.1. Eksfoliyatif Sitoloji.....	5
1.1.2. İnce İğne Aspirasyon Sitolojisi.....	6
1.2. Fiksasyon.....	7
1.2.1. Sitopatolojide Kullanılan Fiksatifler	7
1.2.2. Sitopatolojide Kullanılan Fiksasyon Yöntemleri.....	7
1.3. Sitopatolojik Örneklerin Kabulü.....	9
UYGULAMA FAALİYETİ.....	10
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	11
ÖĞRENME FAALİYETİ-2	12
2. SİTOLOJİK PREPARAT HAZIRLAMA.....	12
2.1. Sıvılardan Sitolojik Preparat Hazırlama.....	12
2.1.1. Sıvılardan Direkt Yayma Hazırlama.....	13
2.1.2. Santrifüj Tekniğiyle Sitolojik Yayma Hazırlama	13
2.1.3. Sitospin Yöntemi İle Preparat Hazırlama.....	21
UYGULAMA FAALİYETİ.....	33
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	37
ÖĞRENME FAALİYETİ-3	38
3. SIVI BAZLI SİTOLOJİK YÖNTEMLER.....	38
3.1. Thin Prep Yöntemiyle Yayma Hazırlama	39
3.1.1. Cihaz ve Ekipmanlar.....	39
3.1.2. Thin Prep Cihazın Çalışması	42
3.1.3. Örneklerin Saklanması	46
3.2. Sure Path Yöntemiyle Yayma Hazırlama.....	46
3.2.1. Sure Path Cihazı ve Ekipmanları.....	47
3.2.2. Dansite Gradyanı ve Hücre Sedimenti Elde Etme.....	49
3.2.3. Sedimentten Yayma Hazırlama	53
3.2.4. Yayma Boyama	54
3.3. Sitosantrifüj Yöntemiyle Yayma Hazırlama	56
UYGULAMA FAALİYETİ.....	57
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	59
ÖĞRENME FAALİYETİ-4	60
4. SIVILARDAN HÜCRE BLOĞU HAZIRLAMA.....	60
4.1. Santrifüj Yöntemi İle Hücre Bloğu Oluşturma.....	60
4.2. Sitosantrifüj Yöntemi İle Hücre Bloğu Oluşturma	63
4.2.1. Araç-Gereçler.....	63
4.2.2. Örnek Hazırlama.....	65
4.2.3. Uygulama	66
UYGULAMA FAALİYETİ.....	67
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	69

ÖĞRENME FAALİYETİ-5	70
5. SİTOLOJİK BOYAMA YÖNTEMLERİ	70
5.1. Yayımların Boyaya Hazırlanması	70
5.2. PAP Boyası.....	71
5.2.1. PAP Boyama Tekniği	72
5.3. May-Grünwald - Giemsa Boyası	74
5.3.1. May-Grünwald - Giemsa Boyama Tekniği	74
5.4. Sitolojik Tanıda Etken Hücre Özellikleri	74
UYGULAMA FAALİYETİ.....	76
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	77
MODÜL DEĞERLENDİRME.....	78
CEVAP ANAHTARLARI.....	79
KAYNAKÇA	80

AÇIKLAMALAR

KOD	725TTT141
ALAN	Tıbbi Laboratuvar
DAL/MESLEK	Tıbbi Laboratuvar Teknisyenliği
MODÜLÜN ADI	Sitolojik Preparat Hazırlama
MODÜLÜN TANIMI	Sitoloji çalışma alanını kavrama, santrifüj ve sıvı bazlı sitoloji yöntemiyle preparat hazırlama, hücre bloku hazırlama ve sitolojik boyama tekniği becerilerinin kazandırıldığı öğrenme materyalidir.
SÜRE	40/16
ÖNKOŞUL	Histolojik Analizler Öncesi Hazırlık ve Histolojik Preparat Hazırlama modüllerini almış olmak
YETERLİK	Sitolojik preparat hazırlamak
MODÜLÜN AMACI	<p>Genel Amaç Sitopatoloji örneklerinin elde edilme yöntemlerini ve kayıt kabul ölçütlerini kavrayabilecek, santrifüj ve sıvı bazlı sitoloji yöntemiyle preparat ve sıvılardan hücre bloku hazırlayıp sitolojik boyamaları tekniğine uygun yapabileceksiniz.</p> <p>Amaçlar</p> <ol style="list-style-type: none">1. Sitopatoloji örneklerinin elde edilme yöntemlerini ve kayıt kabul ölçütlerini kavrayabileceksiniz.2. Santrifüj yöntemiyle sitolojik preparat hazırlayabileceksiniz.3. Sıvı bazlı sitolojik yöntemlerle sitolojik preparat hazırlayabileceksiniz.4. Sıvılardan hücre bloku /sitoblok hazırlayabileceksiniz.5. Sitolojik boyama yöntemlerinin tekniğine uygun sitolojik preparat boyayabileceksiniz.
EĞİTİM ÖĞRETİM ORTAMLARI VE DONANIMLARI	<p>Donanım: Santrifüj, sitosantrifüj, thin prep, sure path, şale (dik şale, 500/1000 ml yatık şale), pastör pipeti/cam pipet, lam (sitosantrifüj, thin prep, sure path lamları), lamel, santrifüj tüpü, sitoklip, funnel (standart ve megafunnel), filtre kartı, hücre blok kaseti, doku kaseti, lam taşıma sepeti, filtre kâğıdı, % 95'lik etil alkol, mukus çözücü solüsyon, lizin solüsyonu, stoblok reagent (reagent-1, reagent-2), hücre koruyucu madde (cytospin collection fluid), giemsa, hematoksilen, orange-G, AE-50, eozin, my-grünwald boyaları</p> <p>Ortam: Sitopatoloji laboratuvarı/ histopatoloji laboratuvarı sitopatoloji bölümü</p>

**ÖLÇME VE
DEĞERLENDİRME**

Modülün içinde yer alan, her faaliyetten sonra verilen ölçme araçları ile kazandığımız bilgileri ölçerek kendi kendinizi değerlendireceksiniz.

Öğretmen, modülün sonunda, size ölçme aracı (test, çoktan seçmeli, doğru-yanlış, v.b) kullanarak modül uygulamaları ile kazandığımız bilgi ve becerileri ölçerek değerlendirecektir.

GİRİŞ

Sevgili Öğrenci,

Teknolojik gelişmelere paralel olarak laboratuvar araç, gereç ve cihazları da gelişmektedir. Bu da laboratuvar analizlerinin daha kısa zamanda az iş gücü kullanılmasını sağlamaktadır.

Bu modülde sitopatoloji örneklerinin elde edilme yöntemlerini ve kayıt kabul ölçütlerini, farklı tekniklerle sitolojik preparat hazırlama ve boyama yöntemlerini öğreneceksiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-1

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgiler ile sitopatoloji örneklerinin elde edilme yöntemlerini ve kayıt kabul ölçütlerini kavrayabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Histopatoloji ve sitopatoloji arasındaki farkları araştırınız.
- Sağlık kuruluşlarının sitopatoloji laboratuvarına giderek gelen örnekleri ve kayıt kabul ölçütlerini inceleyiniz.

1. SİTOPATOLOJİ

Sitoloji, “cyto” ve “logos” kelimelerinin birleşimi ile oluşmuştur ve hücre bilimi anlamına gelir. Modern patolojinin kurucusu sayılan Alman patolog Prof. Rudolf Virchow, “Her şeyin temeli hücredir.” özdeyişiyle hastalıkların temelinde hücresel düzeydeki bozuklukların yattığını öngörmüş ve hücresel (sellüler) patoloji kavramını ortaya atmıştır. Tıp bilimi pratiğinde modern anlamda sitoloji dönemini başlatan hekimler, 1928’de ABD’de Dr. George N. Papanicolaou ve Romanya’dan Dr. Aurel Babes’tir. Dr. Papanicolaou serviko-vajinal yaymada uterin serviks kanserlerinin saptanmasına ilişkin çalışmaları “PAP test” olarak bilinen tarama yönteminin çekirdeğini oluşturarak sitolojik preparasyonları geliştirmiş ve pratik sitolojinin kurulmasına büyük katkıda bulunmuştur.

Sitoloji; hücrenin normal görünüşü dışındaki sapmaları inceler. Sitoloji yerine **sitopatoloji** terimi tercih edilir. Sağlık işletmelerinde sitopatoloji laboratuvarları genellikle histopatoloji laboratuvarlarının içinde bir bölüm olarak bulunur.

Histopatoloji’de, histolojik preparat hazırlama teknikleriyle hazırlanan doku preparatlarında hücre ve dokular incelenir. Sitopatoloji ise hücre düzeyindeki değişiklikleri ele alır. Beden boşlukları ve salgılarından, solid ya da kistik yapı ve organlardan örnekler alınarak lama yayılır. Hazırlanan preparatlar sitolojik boyalarla boyanır. Hücreler yapı, şekil ve boyanma özelliklerine göre mikroskopta incelenir. Normal dışındaki hücre sapmaları değerlendirilerek tanıya gidilir. Böylece, özellikle kanser erken tanısında ve hormon durumunun saptanmasında ayrıca tedavi sürecindeki hastalıkların denetimi yönünden kolay ve önemli bir tanı aracı işlevini görür.



Resim 1.1: Sitopatoloji laboratuvarı

➤ **Sitopatolojinin uygulama alanları**

- **Neoplazi tanısı ve taraması:** Benign, malign ve malign potansiyelli kuşkulu lezyonların varlığının saptanmasıdır. Sitopatoloji, asemptomatik kişilerde tarama amaçlı da kullanılır. Servikal kanser taramaları (PAP test taraması), meme kanserinin erken tanısı, ince iğne aspirasyon materyalleri (İİAS), mesane kanseri erken tanısı, idrar sitolojisi, sigara tiryakilerinde balgam sitolojisi taramaları gibi.
- **Tümör tipinin tanınması ve tedavinin yönlendirilmesi:** Uterus, akciğer, sindirim sistemi, üriner traktüs tümörleri, genellikle eksfoliyatif sitoloji materyallerinde; meme, tiroid, tükürük bezi, lenf düğümü, prostat, karaciğer, pankreas tümörleri ise ince iğne aspirasyon materyallerinde tanınabilmektedir.
- **Prognoz tayini ve takip:** Kemoterapi ve radyoterapi tedavilerine yanıt vermeyen agresif seyirli tümörler ya da nüks metastazların tanımlanmasında kullanılır.
- **İnflamatuvar lezyon tanısı ve etken mikroorganizma tanısı:** Tüberküloz ve sarkoidoz granülomları ve funguslar, virüs, bakteri ve parazitler sitolojik materyallerde saptanabilen etken patojenlerdir.
- **Jinekolojik sitolojik hormonal değerlendirme**
- **Baş – boyun bölgesi kistik lezyonların tedavisi:** Baş - boyun, meme ve tiroidin yüzeysel kistik lezyonlarında, ince iğne aspirasyonu ile kistin drenajı tedavi işlevi görür.

1.1. Sitolojik Yöntemler

Sitolojik inceleme materyalleri, eksfoliyatif sitolojisi ve İİA yöntemleriyle elde edilir.

1.1.1. Eksfoliyatif Sitoloji

Vücudumuzdaki dokular yenilendikçe yüzeydeki hücreler dökülür ve altından yeni hücreler gelir. Kapladıkları yüzeyden dökülen hücrelerin toplanıp sitolojik olarak incelenmelerine **eksfoliyatif sitoloji** denilmektedir. Yüzeysel epitelden, mukoz membranlardan, bronş, böbrek tüpleri vb. doku ve organlardan düşen hücreler, yaymalar yoluyla incelenir. Ayrıca beden sıvıları da bu yolla işleme alınır. Buna en iyi örnek vagina boşluğudur. Bu boşluğa vajinadan kendiliğinden dökülen hücreler jinekolojik muayene sırasında spatula, endoservikal fırça vb. ile toplanır. Toplanan örnek bir lama smear yayma şeklinde nakledilir. Smear (yayma, froti), mikroskopta tetkik edilmek üzere kan veya diğer vücut ifrazatının cam üzerine ince bir şekilde yayılmasıdır. Bu yöntem, konvansiyonel (geleneksel) smear tekniği olarak isimlendirilir. İkinci bir yöntem; fırça, spekulumla alınan hücreler özel hücre koruyucu sıvılar içine yıkanarak aktarılır. Bu yöntemle alınan örneklerle sıvı bazlı sitolojik yöntemle preparat hazırlama teknikleri uygulanır.

Vücudumuzda bazı bölgelerde kendiliğinden dökülmeyen hücreler vardır. Bu bölgelere endoskopi, rektoskopi, özefagoskopi ve bronkoskopik yöntemlerle girilerek fırça veya tuzlu su gönderilir. Fırça ile alınan örnek vücut dışına çıkarılır. Fırça üzerindeki örnek lama yayılarak veya fırça sıvı bazlı koruyucu sıvılar içinde laboratuvara gönderilir. Skopik yöntemle vücuda gönderilen tuzlu su vücut dışına alınarak laboratuvara gönderilir. Fırça çevresindeki ve su içindeki hücreler çeşitli preparat hazırlama teknikleri uygulanarak lama aktarılır. Eksfoliyatif sitoloji örnekleri aşağıdaki vücut bölgelerinden elde edilir.

➤ **Kadın – genital sistemi**

PAP testi, serviks kanserinin erken tanısında tarama testi olarak kullanılır. Kadın genital sistem inceleme örneği; sıklıkla uterus serviksi ve vajen daha sıklıkla tuba ve overlere ait serviks posterior forniksine dökülmüş hücreler çeşitli yöntemlerle alınarak lam üzerine yayılarak elde edilir. Temel görevi, preinvaziv ve invaziv serviks kanserinin tanısında tarama testi olarak kullanılmasıdır. Bunun dışında;

- Benign atipi çeşitleri,
- İnflamatuvar değişiklik,
- Enfeksiyöz mikroorganizmalar,
- Endokrin durum,
- Neoplazm hakkında da bilgi verir.

➤ **Solunum sistemi**

- Balgam: Derin öksürtülerek alınan balgamda, alt solunum yollarına ait hücreler incelenir.
- Bronşial yıkama/fırçalama: Havayolları ve periferik alveoler boşluklardan dökülmüş hücreler incelenir.

➤ **Vücut boşlukları sitolojisi**

Vücut boşluğu sıvıları; plevra, periton ve perikard sıvıları, eklem sıvısı, BOS, idrar vb. dir. Bu sıvılar yoğunluklarına, protein içeriği ve biyokimyasal özelliklerine göre transuda veya eksuda olarak sınıflandırılır.

- **Transudalar:** Şeffaftır, az sayıda hücre içerir, bunların çoğu da mezotelyal hücredir. Beklerken koagüle olmaz.
- **Eksudalar:** Bulanık ve köpüksüdür. Fibrin ve protein içerdiği için kolayca koagüle olur. Bakteri içerebilir ve oldukça hücrelidir. Bazı eksudalar yağ (şilöz) içerir, süt kıvamında ve beyaz görünür.

➤ **İmprint (Dokundurma)**

Lezyonlu dokuların makroskopik incelemesi sırasında, lezyonların taze kesit yüzeylerinin lam üzerine dokundurularak lezyon yüzeyindeki hücrelerin lam yüzeyine geçmesininin sağlanmasıdır. Bu yöntem; frozen için gönderilmiş dokulara da uygulanan bir yöntemdir.

1.1.2. İnce İğne Aspirasyon Sitolojisi

Histositoloji aynı zamanda iç organlarda meydana gelen bir kitlenin incelenmesine olanak sağlar. Herhangi bir tümöral yapıya girilerek o kitleden sıvı çekilmesi olayına **aspirasyon** denir. Bu amaçla ince uçlu enjektörler kullanılır.

İnce iğne aspirasyon sitolojisi yöntemi, giderek artan sıklıkla ilk basamak tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır. İİAS; enjektör ucuna ince iğneler takılarak bir dokudan iğnenin keskin ucu ve emme-basma hareketlerinin oluşturduğu negatif basınç ile hücre kopartma ve bu hücreleri lama yayarak değerlendirme işlemidir. Bu yöntemle, palpe edilen yüzeysel ve organlardaki lezyonlara anesteziye ve özel aletlere gereksinim duyulmadan İİA sitolojisi uygulanabilir. Derindeki organlara ise ultrasound veya bilgisayarlı tomografi gibi görüntüleme yöntemleri eşliğinde iğne ile girilerek örnek alınır. Tükürük bezi, lenf nodu, deri-derialtı ve yumuşak doku kitlelerinden direkt olarak; akciğer, safra kesesi, safra yolları, karaciğer, pankreas ve böbrekteki oluşumlarda ise US, BT ya da endoskopi/endosonografi ile radyolojik görüntüleme eşliğinde ince iğne aspirasyon materyalleri alınır. Bu şekilde alınan materyalden İİAS preparatları hazırlanır.

- Yeterli miktarda yayma yapılacak kuru temiz lam hazırlanır.
- İğne şırıngadan ayrılır.
- Şırınga hava ile doldurulur.
- İğne şırıngaya tekrar takılır.
- Enjektörün ucu tutularak iğne ucu lama değiştirilir.
- Hazne içindeki materyalin tümü lamlara püskürtülerek lamlar laboratuvara gönderilir.

İİAS yaymaları genellikle havada kurutularak laboratuvara gönderilir. İİA materyalleri havada kurutularak fikse edilir ve May-Grünwald-Giemsa (MGG) boyası ile boyanır.

NOT: Bazı uygulamalarda, İİAS ile alınan materyal çok sayıda lama yayılır. Bu lamaların bir kısmı PAP boyası ile boyanmak üzere alkolle tespit edilir, diğerleri MGG boyasıyla boyanmak üzere havada kurutularak laboratuvara gönderilir.

1.2. Fiksasyon

Sitolojik materyal alındıktan kısa süre sonra materyalin protein içeriği, pH, enzimatik aktivite ve materyalde bakteri bulunup bulunmaması gibi faktörlere bağlı olarak hücre zedelenmeleri meydana gelir. Bu değişiklikleri önlemek ve materyaldeki hücreleri invivo durumuna en yakın biçimde korumak amacıyla kısa sürede materyalin özelliğine uygun yöntemlerle fikse edilmeleri gerekir.

1.2.1. Sitopatolojide Kullanılan Fiksatifler

Fiksatifler, hücrelerin sitolojik boyalarla özel olarak boyanabilmesini sağlamalıdır. Sitolojik preparatların, boya yöntemlerine uygun yöntem ve maddelerle fiksasyonları yapılır. Bu amaçla sitopatolojide en çok aşağıda belirtilen alkoller fiksatif olarak kullanılır.

- %100'lük metil alkol,
- %95'lik denatüre alkol,
- %80'lik isopropanol alkol,
- %95'lik etil alkol, sitopatolojide en sık kullanılan fiksatifdir.

NOT: Formalin sitolojik materyallerde tespit maddesi olarak kullanılmaz. Formalin hücrenin yapısını ve boyanma özelliklerini bozar.

1.2.2. Sitopatolojide Kullanılan Fiksasyon Yöntemleri

İnceleme örnekleri, klinik doktorlar tarafından yayma ve çeşitli vücut bölgelerine ait sıvı örnekler şeklinde hazırlanarak sitopatoloji laboratuvarına gönderilir. Bu örneklerin fiksasyonları aşağıdaki yöntemlerle yapılır.

1.2.2.1. Yayma Fiksasyonu

Yaymaların fiksasyonu, alkolde bekletilerek veya havada kurutularak yapılır. Eksfoliyatif materyallerden hazırlanan yaymalar (smear) alkolle, İİAS materyal yaymalar ise havada kurutularak fiksasyonları yapılır ve laboratuvara gönderilir.

- **Alkolle fiksasyon:** Bu örnekler lama alınır alınmaz eldeki imkanlara göre;
 - İçinde %95'lik alkol bulunan taşıma kabına konarak fiksasyonu yapılır ve laboratuvara bu şekilde gönderilir.
 - Laboratuvara fiksatif kap içinde gönderme imkânı yoksa %70'lik, ideali %95'lik etil alkolde 30 dakika bekletilir. Süre sonunda yayma havada kurutulur. Lamalar kurutulmuş ve etiketlenmiş şekilde kapalı kaplar içinde laboratuvara gönderilir.

➤ **Spreyle fiksasyon**

- Sitoloji için özel hazırlanmış fiksatif spreyleri püskürterek fiksasyon yapılır. Fiksatif spreylere, lama 15-25 cm uzaklıktan dik açıyla uygulanır. Lamalar havada kurutulurken laboratuvara gönderilir.



Resim 1.2: Spreyle fiksasyon

- **Havada kurutma:** May grönwald - giemsa (MGG) boyası ile boyanacak yaymalar havada kurumaya bırakılır. May grönwald boyasının içeriğinde bulunan alkol preparatları tespit eder.

1.2.2.2. Sıvıların Fiksasyonu

Sıvı örnekler; enjektör, deney tüpü ve özel kaplar içinde sitopatoloji laboratuvarına gönderilir. Tüm sıvıların hastadan alındıktan hemen sonra fiksasyonsuz olarak laboratuvara gönderilmesi gerekmektedir. Laboratuvara gönderilmesi uzun sürecekse buzdolabında 2 saat bekletildikten sonra fiksasyonsuz gönderilir. Laboratuvara gelen sıvı örnekler bekletilmeden hızlı bir şekilde çalışmaya alınır. Sıvılarda fiksasyon aşağıdaki sorunlara yol açar:

- Alkol, sıvı içindeki proteinleri koagüle ederek hücrelerin görünebilirliğini azaltır.
- Hücrelerin lama yapışmasını zorlaştırır.
- Alkol, hücreleri yuvarlaklaştırır ve boyanın hücreye ulaşmasını zorlaştırır.
- Örnekten filtre preparatları hazırlanmasını zorlaştırır.

Sıvılarda fiksasyonun bu olumsuzluklarına rağmen kısa sürede laboratuvara hemen gönderilemeyecek abdominal ve pelvik yıkantı sıvıları, vücut kavimleri yıkantı sıvıları, özefageal yıkantı sıvıları, idrar vb. sıvı örnekler %50'lik etil alkol ile aynı hacimde örnek karıştırılarak fiksasyonları yapılır ve laboratuvara gönderilir.

1.3. Sitopatolojik Örneklerin Kabulü

- Sitopatoloji laboratuvarına gelen eksfoliyatif ve İİAS materyallerinin laboratuvar gönderilme ve taşıma ölçütlerine uygun olup olmadığı kontrol edilir.
 - Sürüntü – yayma lamaları, PAP smearler, İİAS materyal yaymaları %95'lik etil alkol içeren yayma taşıma kaplarında,
 - Klinikte fikse edilip kurutulmuş yaymalar toz vb. maddeden korumak için kapalı bir kutu içinde veya etiketlenmiş preparat taşıma kutularında,
 - Lavaj (aspirasyon- yıkama- parasentez) materyal sıvıları uygun sıvı kaplarda laboratuvar istem raporu ile uygunluğu kontrol edilir.



Resim 1.3: Sitolojik çalışma örnekleri



Resim 1.4: İİAS materyal yaymaları

- Kabul ölçütlerini taşıyan materyallerin kayıt sekreteri tarafından sitoloji kayıt defterine kaydı yapılır ve kayıt numarası verilir.
- Defter kayıt numaraları, aynı zamanda materyallerin laboratuvar işlem takip numarası olarak belirlenir. İşlem takip numarası yazılı etiketler sitopatoloji istem formuna ve materyal kabının üzerine yapıştırılır.
- Kayıt sekreteri tarafından materyali getiren kişiye hastanın adı soyadı, sitoloji numarası, raporun alınabileceği tarih vb. bilgileri içeren bir sitoloji takip formu doldurularak verilir.
- Kaydı yapılan sitolojik materyaller bekletilmeden sitoloji bölümüne gönderilir.

UYGULAMA FAALİYETİ

Bu faaliyette yapmış olduğunuz uygulamalarla sitopatoloji örneklerinin elde edilme yöntemlerini ve kayıt kabul ölçütlerini kavrayınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Sitopatolojinin tanımını yapınız.	
➤ Sitopatoloji ile histopatoloji arasındaki benzerlik ve ayrılıkları sıralayınız.	
➤ Sitolojik inceleme yöntemlerini açıklayınız.	
➤ Eksfoliyatif sitoloji ile İİAS materyallerinin elde edilme yöntemlerini açıklayınız.	
➤ Sitolojik materyallerin fiksasyon yöntemlerini açıklayınız.	
➤ Sitolojik materyallerin laboratuvara gönderme ve kayıt kabul ölçütlerini açıklayınız.	➤ Laboratuvara gelen örneklerle istem raporu bilgilerinin uygunluğunu kontrol etmeyi unutmayınız.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisi vücut yüzeylerinden dökülen hücrelerin çeşitli yöntemlerle alınmasıyla elde edilen sitolojik inceleme örneğidir?
A) Histolojik inceleme örnekleri
B) İnce iğne biyopsi örnekleri
C) İnce iğne aspirasyon örnekleri
D) Eksfoliyatif inceleme örnekleri
E) Yayma inceleme örnekleri
2. Aşağıdakilerden hangisi bir dokudan enjektörle hücre örneği alınarak elde edilen sitolojik inceleme örneğidir?
A) Histolojik inceleme örnekleri
B) İnce iğne biyopsi örnekleri
C) İnce iğne aspirasyon örnekleri
D) Eksfoliyatif inceleme örnekleri
E) Yayma inceleme örnekleri
3. Aşağıdakilerden hangisi lezyonların taze kesit yüzeyinin lama değdirilerek yapılan sitolojik yayma hazırlama yöntemidir?
A) İnce iğne aspirasyon yayması
B) İmprint
C) Frozen yayma
D) Sıvılardan preparat hazırlama
E) Katı örnekten preparat hazırlama
4. Aşağıdakilerden hangisi sitoloji örneklerinin fiksasyonunda en sık kullanılan fiksasyon maddesidir?
A) %95'lik etil alkol
B) %10'luk formaldehit
C) Pikrik asit çözeltisi
D) %10'luk formaldehit salin çözeltisi
E) Zenker solüsyonu

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-2

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgiler ile santrifüj yöntemiyle sitolojik preparat hazırlayabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

Sağlık kuruluşlarının sitopatoloji laboratuvarına giderek sitolojik preparat hazırlama teknikleri hakkında bilgi edinip bunları arkadaşlarınızla paylaşınız.

2. SİTOLOJİK PREPARAT HAZIRLAMA

Sıvı materyaller, kayıt kabul işleminden sonra sitolojik preparat hazırlanmak üzere çalışmaya alınır. Sitolojik preparat şu aşamalarla hazırlanır:

- Makroskobik görünüm
- Sitolojik preparat hazırlama
 - Direkt sitolojik yöntemlerle peraparat hazırlama
 - Sanfrifüj yöntemi ile preparat hazırlama
 - Sitosanfrifüj yöntemi ile preparat hazırlama
 - Sitoblok hazırlama
 - Sıvı bazlı sitolojik yöntemlerle preparat hazırlama
 - Thin prep
 - Sure path
 - Sitosantrifüj
- Hücre bloku hazırlama
- Sitolojik boyama
- Kapatma/montaj

2.1. Sıvılardan Sitolojik Preparat Hazırlama

Sıvıların özelliklerine ve laboratuvar olanaklarına göre farklı teknikler kullanılarak sitolojik yayma hazırlanabilir. Bunlar; direkt, santrifüj sedimentinden yayma, sitosantrifüj yöntemiyle yayma ve sıvı bazlı sitolojik yöntemle hazırlanan yaymalarıdır.

2.1.1. Sıvılardan Direkt Yayma Hazırlama

Bulanık ve yoğun sıvı örneklerdeki hücreler kap tabanına çöker. Pipet/pastör pipeti ile sıvı tabanından örnek alınır. Örnek temiz bir lama damlatılarak yayma yapılır.

2.1.2. Santrifüj Tekniğiyle Sitolojik Yayma Hazırlama

Vücut sıvıları içine eksfolye olmuş hücreler santrifüjle yoğunlaştırılarak hücre sedimenti elde edilir ve uygun teknikle lam üzerine yayılır.

➤ Araç - gereçler

- Santrifüj
- Konik santrifüj tüpü: Tek kullanımlık kapaklı konik plastik tüpler kullanılır.



Resim 2.1: Konik santrifüj tüpleri

- Dik şale: İçerdiği yivler sayesinde lamları birbirine temas etmeyen bir pozisyonda tutan cam kaplardır. Yaymaların alkolle fiksasyonunda kullanılır.
- Pastör pipeti/ pipet/ ekivyon
- Lam: Temiz, kuru ve buzlu (rodajlı) lamlar kullanılır. Sitoloji örnek numarası, lamların buzlu kısmına santrifüj işlemi bitmeden önce kurşun kalemle yazılarak hazırlanmalıdır.

Sitopatoloji laboratuvarında sık karşılaşılan sorunlardan biri, lamlara yayılan inceleme örneklerinin fiksasyon ve boyama sırasında lamdan kolaylıkla dökülmesidir. Protein içerikli sıvılar lamlara iyi yapışır ancak protein içeriği az olan sıvılardan hazırlanan yaymalarda örneğin lamdan akması sık karşılaşılan sorundur. Bu amaçla, sitopatolojik yaymalarda kullanılacak lamların yapışkan (addesif) bir maddeyle önceden kaplanmaları gerekir. Bu amaçla addesif solüsyonu kullanılır.

Jelatin	10 gram
Krom alum	1 gram
Distile su	1000 ml
Hazırlanan çözeltiye 10 ml %10'luk timol eklenir.	

Tablo 2.1: Addesif solüsyonu

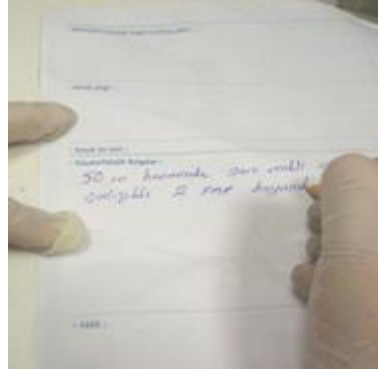
Hazırlanan çözelti 1000 ml yatık şale içine konur. Lam taşıma sepetine dizilmiş lamalar çözelti içinde 30 dakika bekletilir. Süre bitiminde lamalar çözeltiden çıkarılarak oda ısısında kurumaya bırakılır. Kuruyan lamalar kutularına tekrar konarak uygun şekilde muhafaza edilerek kullanılır.

2.1.2.1. Örnek hazırlama

- Sitoloji formu ile örnek kapları üzerindeki barkotların doğruluğu bir kez daha kontrol edilir. Hasta ismi, formda belirtilen sayıda örnek kabı ya da barkodu bulunmayan kapla karşılaştığında kayıt kabul bölümüne haber verilir. Gerekli düzenlemeler yaptırılarak örnek çalışmaya alınır.
- Çalışmaya kabul edilen tüm örnekler makroskobik olarak incelenir. Sıvıların makroskobik olarak şu özelliklerine bakılır:
 - Sıvının fiksatif içerip içermediği,
 - Berraklık,
 - Bulanıklık,
 - Renk,
 - Kıvam,
 - Miktarı,
 - İçeriği yönünden içinde kan, küçük partiküller, kendiliğinden oluşmuş çökelti, pıhtı varlığı vb. özellikler çalışma yapan teknisyen tarafından laboratuvar istem formunun arkasına yazılır.



Resim 2.2: Makroskobik değerlendirme



Resim 2.3: Makroskobik değerlendirmenin rapora kaydı

- Çalışılacak örneğin özelliğine göre hazırlanacak yayma adedi, yaymaların fiksasyon yöntemleri ve boyama yöntemi rapor arkasına kaydedilir. Bazı sıvı örneklerden hazırlanan yaymalara uygulanan fiksasyon ve boya yöntemleri aşağıdaki şekildedir.
 - **BOS:** Hazırlanan lamalar alkolle tespit edilerek PAP'la boyanır.
 - **Kist sıvısı:** Hazırlanan lamaların yarısı havada kurutulularak MGG ile boyanır, diğerleri %96'lık etil alkolde fikse edilerek PAP ile boyanır.

- **İdrar ve mesane yıkama sıvısı:** Hazırlanan lamlar %96'lık etil alkolde fikse edilerek PAP ile boyanır.
 - **Eklem sıvısı:** Hazırlanan lamların yarısı havada kurutularak MGG ile boyanır, diğerleri %96'lık etil alkolde fikse edilerek PAP ile boyanır.
 - **Batın yıkama sıvısı:** Hazırlanan lamların yarısı havada kurutularak MGG ile boyanır, diğerleri %96'lık etil alkolde fikse edilerek PAP ile boyanır.
 - **Seröz effuzyonlar (parasentez, torosentez, plevra sıvısı, periton sıvısı, perikard sıvısı, asit sıvısı):** Hazırlanan lamların yarısı havada kurutularak MGG ile boyanır, diğerleri %96'lık etil alkolde fikse edilerek PAP ile boyanır.
- PAP boyası uygulanacak yaymaların fiksasyonu için %95'lik etil alkol kabı hazırlanır. Her örnek için ayrı fiksasyon kabı hazırlanır.
- Lamın buzlu kısmına örnek numarası yazılır.

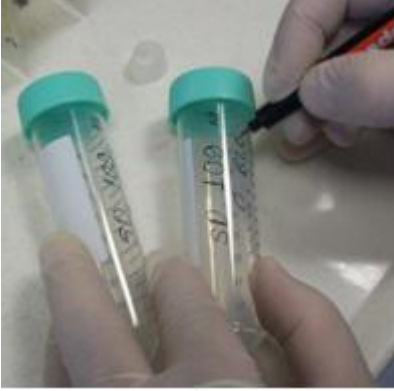


Resim 2.4: Fiksatif solüsyonu hazırlama



Resim 2.5: Lam yazılımı

- Örnekten inceleme örneği hazırlanır. Sitoloji laboratuvarlarına gelen sıvı örnek miktarı, çok küçük hacimli (<0,5ml) olabileceği gibi büyük hacimde (>1000 ml) de olabilir.
- Küçük hacimli sıvılarda sıvıların tamamı inceleme örneği olarak işleme alınır.
 - Büyük hacimli sıvılarda miktarı fazla olan sıvıların tamamını incelemeye almak imkânsızdır. Konik santrifüj tüpüne 50 ml örnek almak çoğu zaman yeterli olur. Santrifüj için örnek almadan önce eşit hücresel içerik oluşturmak amacıyla sıvının iyice karıştırılması gerekir. Homojen karışımı sağlanan sıvı, örnek santrifüj tüpüne nakledilir.



Resim 2.6: Örnek numarasının santrifüj tüpüne yazımı

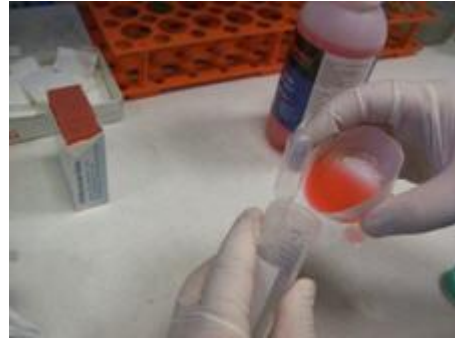


Resim 2.7: İnceleme örneğinin santrifüj tüpüne alınması

- Pıhtılaşmış sıvılarda, pıhtı cam bir çubuk ile kabın kenarına yavaşça bastırılarak sıkılır. Çıkan sıvı santrifüj için kullanılır. Pıhtıdan hücre bloku yapılır.
- Mukoid örneklerden balgam, BAL vb. çok akışkan olmadıkları için santrifüj edilmeye uygun materyaller değildir. Bu örneklere mukoid çözücü maddelerle eritilerek akışkanlık kazandıran mukoid örnek hazırlama yöntemi uygulanır. Bu yöntem;
 - Balgam üzerine 1/3 oranında mukoid çözücü (mucolax) eklenir. Karışım vortekslenerek mukus yapının çözünmesi için 30 dakika bekletilir.
 - Mukus yapısı eriyen örnek santrifüj tüpüne aktarılarak santrifüj edilir.
 - Mukuslu bronş sıvıları önce santrifüj edilir. Üst süpernatant atıldıktan sonra sediment üzerine mukoid çözücü eklenir. Karışım vorteksle karıştırılır. 30 dakika beklenerek mukus yapının çözünmesi beklenir.
 - Mukoid örnekler kanlı görünümde ise mukus çözücü maddeyle birlikte eritrositleri lizis edici (hemoliz) maddeler eklenebilir.

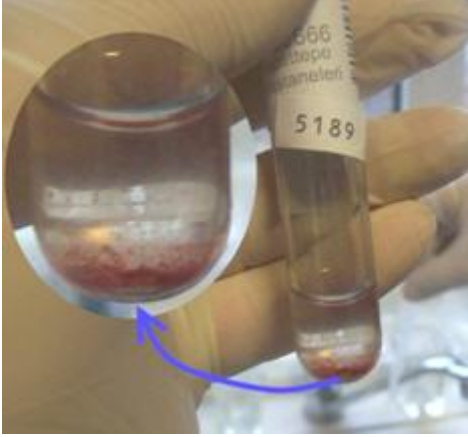


Resim 2.8: Mukoid örneğe mukus solüsyonu eklenmesi



Resim 2.9: Mukoid örneğin santrifüj tüpüne alınması

- Kanlı sıvılarda fazla miktarda bulunan eritrositler, hazırlanan yaymada asıl incelenmek istenen eksfolye olmuş hücrelerin görülmesini ve incelenmesini zorlaştırır. Bu nedenle, eritrosit lizisi uygulanarak sıvıdan uzaklaştırılması gerekir. Santrifüj sonrası kanlı sıvılara eritrosit lizisinde şu yöntem uygulanır.
 - Kanlı materyallerin lizisi için oluşan tortu üzerine 1/3 oranında alkol bazlı solüsyonlar (cyto rich red gibi) eklenir.



Resim 2.10: Kanlı sediment

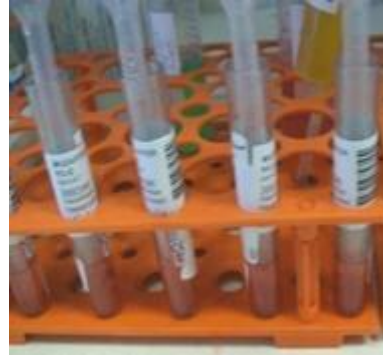


Resim 2.11: Lizis solüsyonu (cyto rich red)

- Karışım vorteks veya pastör pipetiyle iyice karıştırılır. 30 dakika bekletilir.



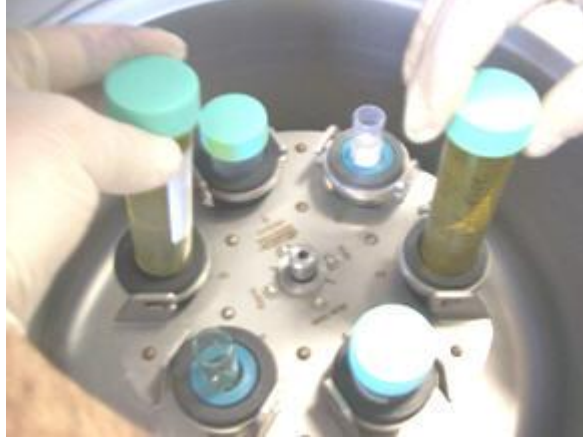
Resim 2.12: Sedimentin lizis solüsyonuyla karıştırılması



Resim 2.13: Lizis solüsyonu eklenmiş örnekler

- Süre sonunda örnek üzerine dengeli fizyolojik sıvı eklenip santrifüj edilir, üst süpernatant atılır. Bu işlem iki kez uygulanır.
- İdrar örneğine eritrosit lizisi uygulanmaz.

- Örnek 1680 rpm. de 10 dakika santrifüj edilir. Santrifüj işlemi yüksek devirlerde yapılırsa hücre parçalanmaları meydana gelir. Tümör hücreleri kolay zedelenebilir özelliğindedir. Sitolojik örnekler santrifüj edilirken santrifüj kuvvetine dikkat edilmelidir.



Resim 2.14: Sitolojik sıvı örneklerin santrifüje yerleştirilmesi

- Santrifüj edilen sıvının üstünde kalan berrak kısım (süpernatant) atılır. Konik santrifüj tüplerindeki süpernatant kısım, tek hareketle tüp eğilerek boşaltılır. Santrifüjlemede düz tabanlı tüp kullanılmışsa süpernatant konik tüplerde olduğu gibi tek bir hareketle boşaltılmaz. Oluşan tortu bu tüplerde tabana daha gevşek yerleşimlidir. Tüp eğilerek boşaltmada tortu kaybedilebilir. Süpernatant pastör pipeti/pipet kullanılarak alınır.



Resim 2.15: Konik tüpten süpernatantın atılması



Resim 2.16: Düz tüpten pastör pipetle süpernatantın alınması

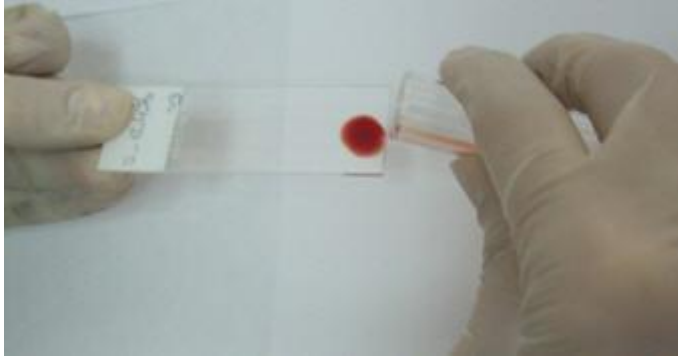
- Tortu, tüpün dibine avuç içine hafif şekilde vurularak çözülür.

- Santrifüj işlemi sonunda oluşan çökelti içinde bulunan hücre yoğunluğu kontrol edilir. Çünkü hazırlanacak yaymada hücreler tek tabaka hâlinde yayılmalıdır. Bu amaçla sedimentten hızlı şekilde aşağıdaki yöntemle hazırlanan preparat, vital bir boyayla boyanarak mikroskopik değerlendirmesi yapılır.
 - Tek kullanımlık bir pipet yardımı ile sedimentten lama bir damla damlatılır.
 - Üzerine bir damla toluidine blue damlatılır.
 - Temiz bir bagetle damlalar birbirine karıştırılır. Karışım üzerine lamel kapatılır.
 - Hücrelerin lam üzerine çökmesi için 1 dakika beklenir.
 - Mikroskopta incelenir. Mikroskop değerlendirmesine göre;
 - Hücre yoğunluğu uygun olan sedimentten ince bir yayma elde edecek miktar lama alınır.
 - Hücre yoğunluğu sınırlı ve sulu ise uygun bir sitolojik yayma yöntemiyle (sitospin) yayma hazırlanır.

2.1.2.2. Hücre Sedimentinin Lama Yayılması

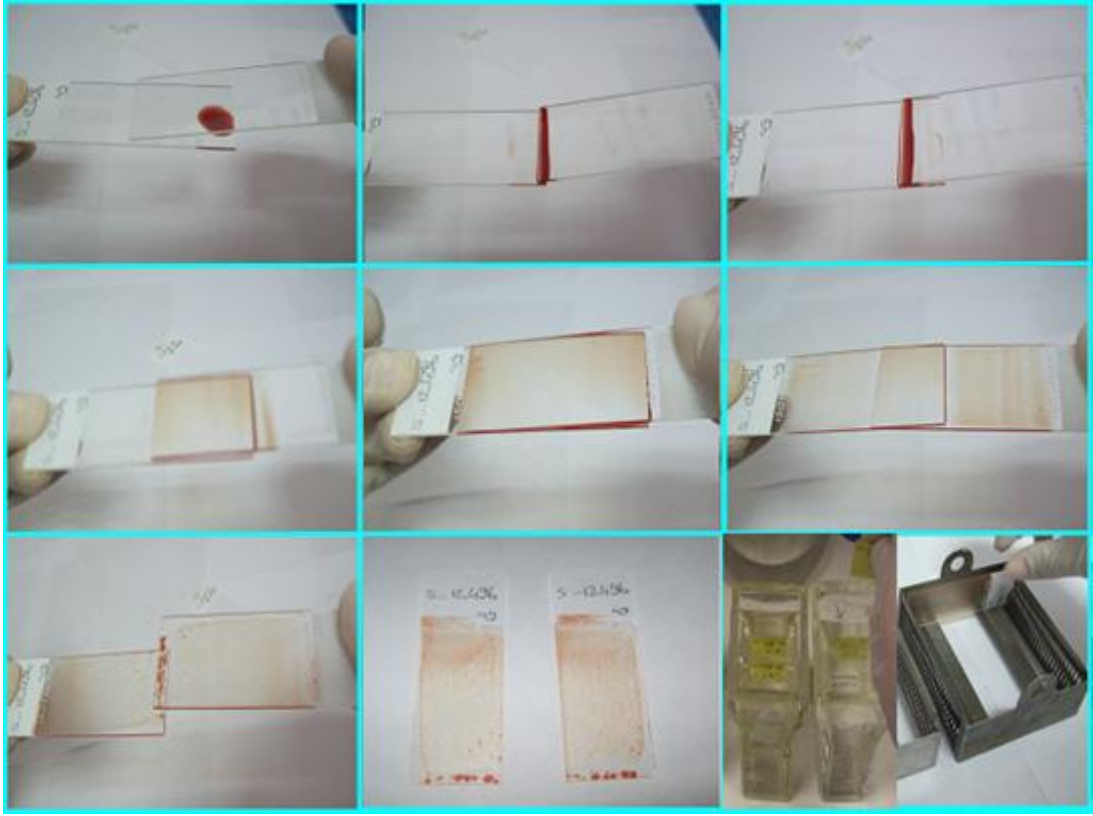
Santrifüj sonrası hazırlanan hücre sedimenti pipet, pastör pipet, luplu öze, emici olmayan ekivyon vb. araçla lam üzerine aktarılır. Çeşitli şekillerde yaymalar elde edilir. Bunlar;

- Çok az sulu hücre sedimentler: Sediment direkt olarak pastör pipeti, pipet, öze ile lam üzerine aktarılır.



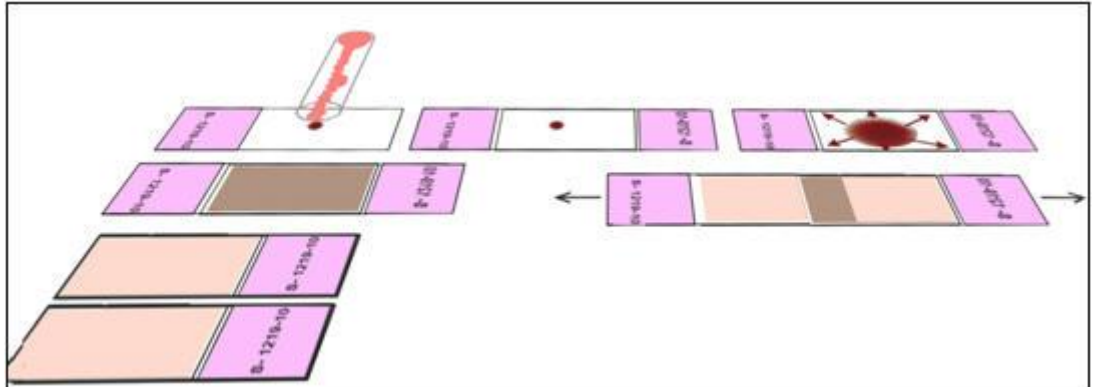
Resim 2.17: Hücre sedimentinin lama aktarılması

- Örnek bulunan lamın yüzeyine 45° açıyla tutulan diğer bir lamın (yayıcı lam) arkasına örnek toplanır. Lam, aynı açıyla örnek bulunan lam üzerinde ileriye hareket ettirilir. Yayıcı lam, örnek üzerine bırakılır. Lamlar yatay konumda aksi istikametlerle birbirinden ayrılarak birbirinin simetriği olan iki sitolojik yayma elde edilir.



Resim 2.18: Sıvı sedimentten sitolojik yayma hazırlama

- Örnek bulunan lam üzerine, temiz bir lam bırakılır. Sıvının kapiller difüzyon ile yayılması beklenir. Lamlar aksi istikamette birbirinin üzerinden çekilerek iki ayrı yayma elde edilir.



Şekil 2.1: Sitolojik yayma hazırlama

Yayma hazırlarken Őu hususlara dikkat edilir:

- Yaymalar ince ve dűzgűn bir tabaka hâlinde yayılmalıdır.
- PAP boyası yapılacak yaymalar hızlı bir Şekilde kurumadan (10 saniye içinde) %95'lik etil alkol içine konularak fiksasyon baŐlatılmalıdır.
- Havada kurutulacak yaymaların hűcre morfolojilerinin iyi korunması için hızlı bir Őekilde kurumaları gereklidir. Bu nedenle elde sallama ya da sıcak űfleme gibi yűntemler uygulanabilmektedir. Kuruma sűresini belirleyen en űnemli faktűr, materyalin ince ve dűzgűn bir tabaka hâlinde yayılabilmesidir. Kuruma iŐlemi yavaŐ olursa artefaktlar artar.

2.1.3. Sitospin Yűntemi İle Preparat Hazırlama

Sitosantrifűj yűntemi ile yaymalarda kűűk bir alana yoĐunlaŐtırılmıŐ tek tabaka hâlinde hűcre yayması oluŐturulur. Bu da yaymanın mikroskop incelemesinde kűűk bir tarama alanında çok sayıda hűcre incelenmesine olanak verir.

➤ Araç- gereçler

- Sitosantrifűj cihazı: Sıvı içindeki hűcreleri santrifűj “funnel”i ve sedimentasyon yolu ile lam űzerinde monolayer (tek katman) hűcre yayma ve sitoblok oluŐturmakta kullanılan cihazdır. Cihaz, santrifűj kuvvetini (g) lamda hűcrelerin toplandıĐı yűzeye uygular. Sitosantrifűj cihazı Őu bűlűmlerden oluŐur.



Resim 2.19: Sitosantrifűj

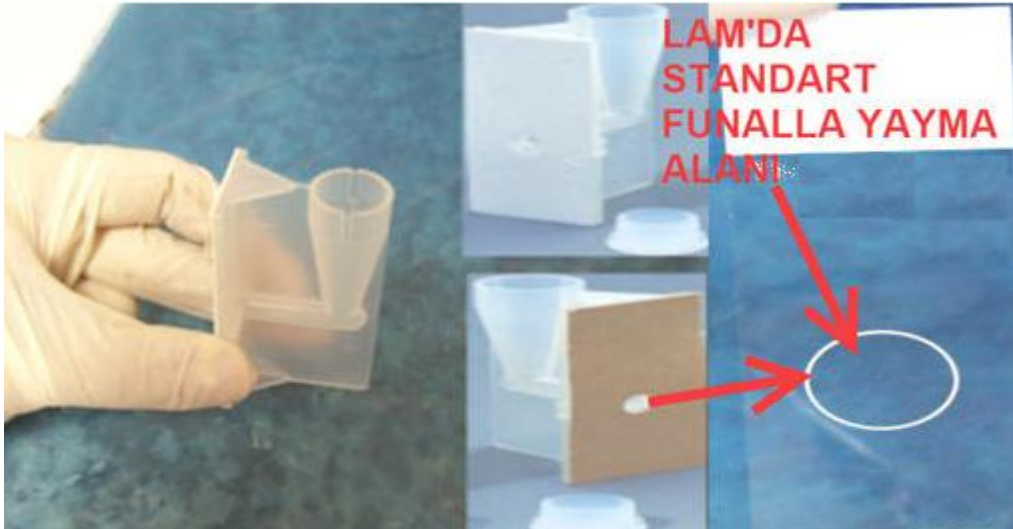
- Hazne kapağı
- Reaksiyon haznesi
- YalıtılmıŐ rotor: Potansiyel açıdan tehlikeli numunelerin rotor içinde tutulmasını sağlar. YalıtılmıŐ rotorun doldurulup boŐaltılma iŐlemi, her zaman biyolojik gűvenlik kabini içinde yapılmalıdır.
- Yalıtılmış rotor kapağı
- Lam



Resim 2.20: Yalıtılmış rotor

- Funnel/sitofunnel (örnek haznesi): Santrifüj edilecek sıvının konulduğu plastik örnek kaplarıdır. Tek kullanımlık, çok kullanımlık ve standart ve megafunnel tipleri mevcuttur.

Standart funnel 0,1, maksimum 0,5 ml hacimli kaplardır. Lamda daha küçük bir alanda yayma hazırlamada kullanılır. Tek kullanımlık sitofunneller sitoclibin yüklenmesi ve boşaltılmasını kolaylaştırmak için kalıcı olarak bağlanmış filtre kâğıtları içerir.



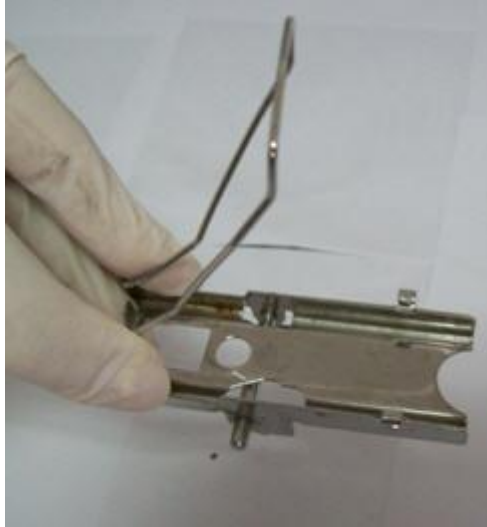
Resim 2.21: Standart funnel ve lam

Megafunnel; 6 ml hacimli kaplardır. Lamda daha geniş bir alanda yayma hazırlamada kullanılır. Lam taşıma tablası bulunur.



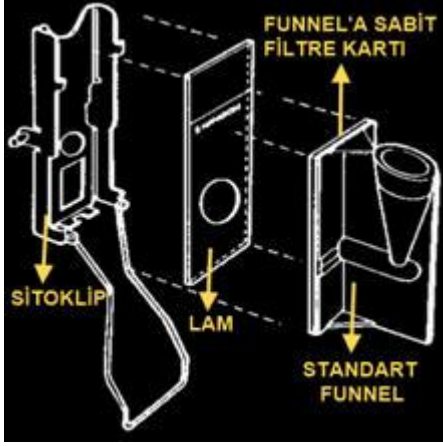
Resim 2.22: Megafunnel ve lamı

- Funnel kapakları: Örneklerin dökülmesini önler ve santrifüjle oluşan aerosollerden korunmak için ek bir koruma sağlar.
- Filtre kartı: Santrifüj yaparken örneğin akıp gitmesini önleyen kâğıt filtredir.
- Sitoklip: Lam, filtre ve sitofunnelin sabitlendiği düzenektir.

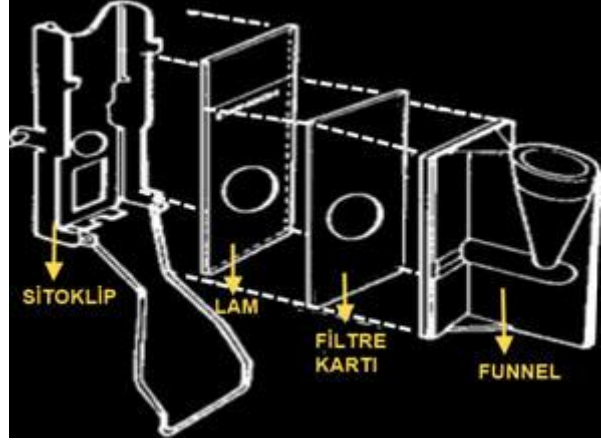


Resim 2.23: Sitoklip

Lam, filtre ve standart sitoklibe yerleştirilir. Sitofunnelin yerleştirilme işlemine sitoklibin yüklenmesi denir. Tek kullanımlık sitofunnelda filtre funnelda sabit şeklindedir.

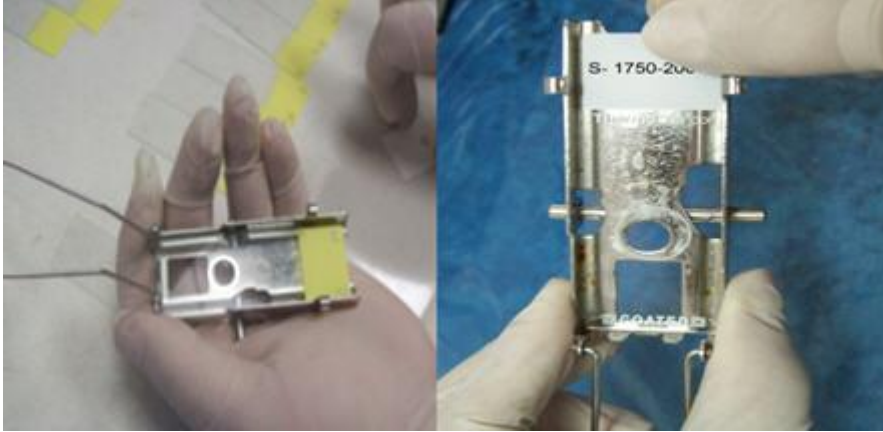


Şekil 2.1: Standart funnel ve lamın sitoklibe yüklenmesi



Şekil 2.3: Funnel, filtre kartı ve lamın sitoklibe yüklenmesi

- Lamın buzlu kısmına örneğin sitoloji kodu “S”, takip numarası “ 0001, 0002 ...” ve gönderilme yılı “2009,2010...” (S- 0001-09, S- 0002 - 09....) şeklinde yazılır.
- Lam, stoklip lam taşıma tablasına yerleştirilir. Lamlar yerleştirilirken yayma yapılacak işaretli kısma kesinlikle elle dokunulmamalıdır.



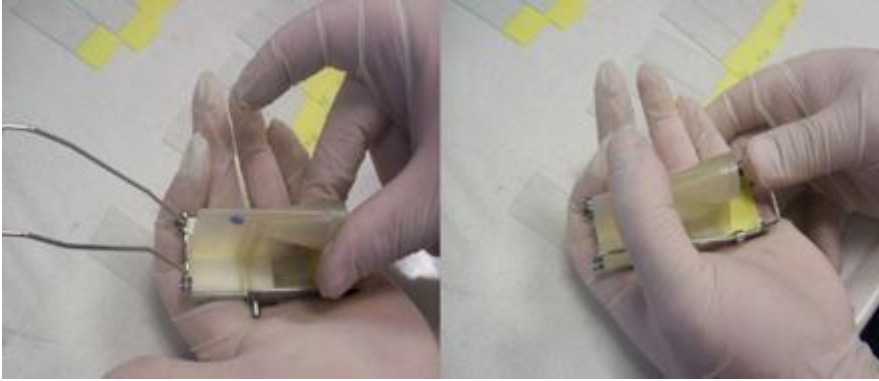
Resim 2.24: Sitoklibe lam yüklenmesi

- Lam üzerine filtre kartı yerleştirilir. Tek kullanımlık funnellarda filtre kartı funnela sabittir.



Resim 2.25: Sitoklibe filtre kartının yüklenmesi

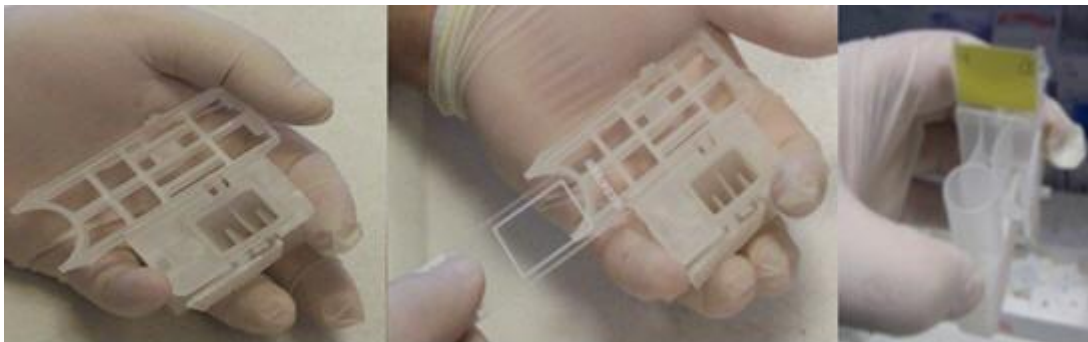
- Sitofunnel, sitoklibe yerleştirilir.



Resim 2.26: Birleştirilmiş sitoklip

- Sitoklip yayı kaldırılır, iki tutucu kancanın içine bastırılır. Lam ve sitofunnel sitoklibe sabitlenir.

Megafunnellarda klipsli lam yükleme tablası bulunur. Tablaya yerleştirilen lam, klipslenerek funnela sabitlenir.



Resim 2.27: Megafunnelın birleştirilmesi

➤ Örnek hazırlama

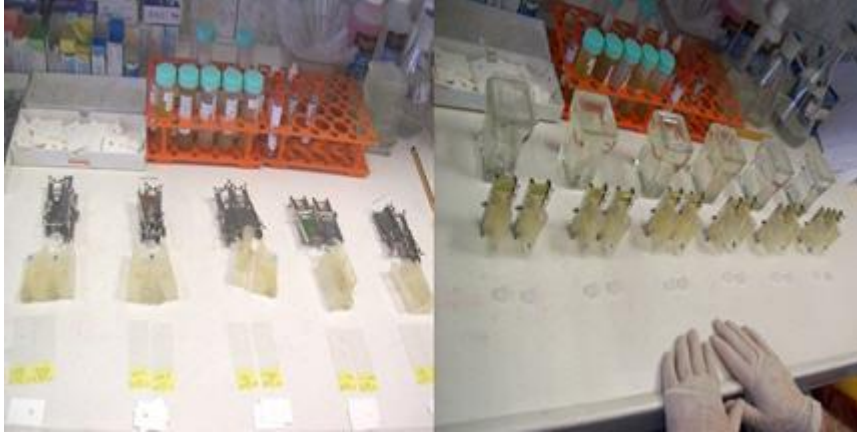
Sitosantrifüj, hacimce çok az miktarda akışkan sıvılardan hücresel yayma elde etmeye göre tasarlanmış cihazdır. Sitofunneller da buna göre tasarlanmıştır. Standart sitofunnelda maksimum 0,5 ml, megafunnelda maksimum 6 ml örnekle çalışılır. İncelemeye alınan örneklerin birçoğu büyük hacimde olmasına karşın hücre yoğunluğu düşüktür. Büyük hacimli sıvılardan alınacak az miktarda inceleme örneğinden hazırlanacak yaymada hücre görme olasılığı da çok az olacaktır. Mukoid örnekler akışkan yapıya sahip olmadıklarından bu hâllerile sitosantrifüjde çalışmaya müsait değildir. Bu tür örnekler mukoid hazırlama yöntemleri uygulanarak çalışmaya hazırlanır. Sitosantrifüj yöntemiyle preparat hazırlanacak örnekler, santrifüjle küçük hacimli yoğunlaştırılmış hücre içerikli materyal hâline getirilir. Bu işlem, örnekler makroskobik olarak değerlendirildikten sonra özelliklerine göre;

- Büyük hacimli sıvılar,
- Pıhtılaşmış sıvılar,
- Mukoid örnekler,
- Kanlı sıvılar,
- Az hacimli sıvıların tamamı (0.5 ml kadar olanlar), santrifüjle preparat hazırlama yönteminde olduğu gibi öncelikle santrifüj işlemiyle hücre sedimentleri elde edilir.
- Örnekler 1680 rpm.de 10 dakika santrifüj edilir.



Resim 2.28: Sitolojik sıvı örneklerin santrifüje yerleştirilmesi

- Çalışılacak örnek ve örnekten hazırlanacak yayma sayısına göre; lam, stoklip, filtre kartı, sitofunnel/megafunnel ve funnel kapakları hazırlanır.
- İnceleme örneğinin kabı ve laboratuvar istem raporu üzerindeki sitoloji takip numarası tekrar gözden geçirilir. Örnek takip numarası lam üzerine yazılır.
- Hazırlanacak yayma kadar sitoklip yüklemesi yapılır.



Resim 2.29: Sitokliplerin ve fiksatafif kapların çalışmaya hazırlanması

- Her bir hastanın PAP boyası uygulanacak örnek yaymaları tek bir kaptaki fiske edilecek şekilde %95'lik etil alkol kabı hazırlanır.
- Örnekler santrifüjden çıkarılır.



Resim 2.30: Sitolojik sıvı örneklerin santrifüjden çıkarılması

- Hücre sedimenti elde etmek için sıvının santrifüj sonrası süpernatant kısmı atılır.



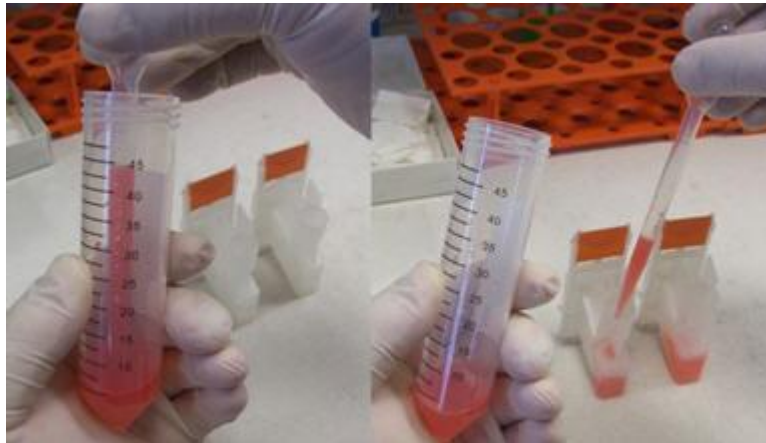
Resim 2.31: Hücre sedimenti elde edilmesi

- Santrifüj tüpünde oluşan hücre sedimenti tek kullanımlık temiz bir kaba dökülür. Üzerine uygun miktarda Hank'in dengeli tuz solüsyonu konularak karışım süspansiyon edilir. Amaç, santrifüj işleminde funnel içinde akışkanlığı sağlanarak sitosantrifüjle hazırlanacak yaymada hücrelerin tek tabaka hâlinde olmasıdır.
- PAP boyası uygulanacak yaymaların sedimentleri üzerine eşit miktarda hücre koruyucu madde (cytospin collection fluid) eklenir.



Resim 2.32: Hücre koruyucu (cytospin collection fluid) solüsyonunun hücre sedimentine eklenmesi

- Örnek miktarına ve örnekten hazırlanacak yayma sayısına göre sitofunnel hazırlanır. Örnek pastör pipetiyle sitofunnellara nakledilir. Standart funnel lamda küçük bir alanda yayma hazırlamak için 0.1- 0.5 ml (3 damla) örnek nakledilebilir. Lam yüzeyinde geniş bir alanda yayma hazırlanması isteniyorsa megafunneller kullanılır. Megafunnellara 6 ml kadar örnek konulabilir.



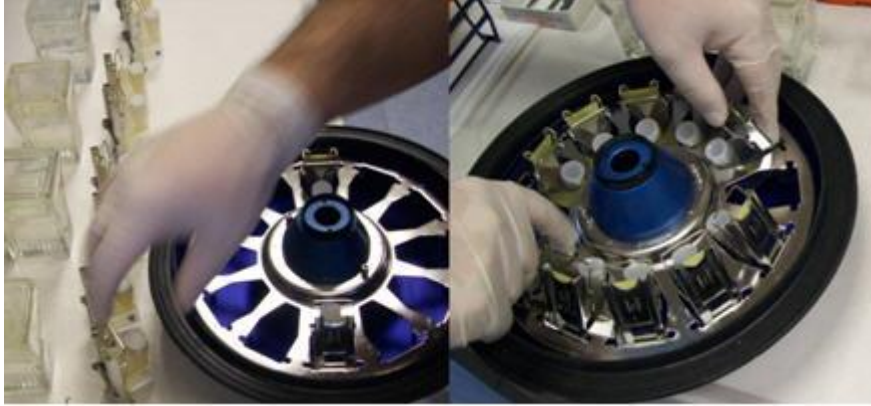
Resim 2.33: Megafunnella sıvı örnek nakledilmesi

- Örnek konulan funnel kapakları kapatılır.
- Sitosipin cihazının kapağı açılır. Yalıtılmış rotor haznesi, merkez tutacağından tutularak dışarı çıkarılır.
- Yalıtılmış rotor kapağı açılır.



Resim 2.34: Sitosantrifüjden yalıtılmış rotorun alınması

- Birleştirilmiş stoklipler, dönertepsi slotlarına karşılıklı (dengeli) şekilde yerleştirilir. Tüm sitokliplerin eğimli ve dik pozisyon arasında serbestçe salınım yapabilecek şekilde yerleştirilmesine dikkat edilir. Döner tepsi slotlarına yerleştirilmiş sitoklipler, yalıtılmış rotor içinde örneği filtre kâğıdından uzak tutmak için uygun bir açıyla durur. Cihaz çalıştığı zaman sitoklip örneğin lam üzerine yayılmasını sağlayacak dik bir pozisyonda döner.



Resim 2.35: Sitokliplerin yalıtılmış rotora yüklenmesi

- Sitokliplerin slotlara yerleşimi kontrol edilir.
- Yalıtılmış rotor kapağı kilitleme butonuna basılarak kapatılır.
- Yalıtılmış rotor, merkez tutacağından tutularak yalıtılmış rotor haznesine yerleştirilir. Cihaz kapağı kapatılır.



Resim 2.36: Örnek yüklü yalıtılmış rotorun sitosantrifüje yüklenmesi

- Cihazda bulunan gerekli program seçilir veya oluşturulur. Bu programlardan biri seçilerek uygulanır. Var olan programlar çalışma için uygun değilse cihaza aşağıda belirtilen girişler yapılarak yeni bir program oluşturulur:
 - Gerekli süre girilir.
 - Gerekli hız (rpm) girilir. Genellikle 600 rpm’de santrifüj için 4 dakika yeterlidir. Örnek BOS ise 500 rpm’de 5 dakika santrifüj gerekir.
 - Gerekli ivmelenme oranı girilir. İvmelenme işleminde istenilen hızlardan birini seçmek için LOW, MED ya da HIGH tuşlarından birine basılır.
- İşlemi başlatmak için start düğmesine basılır.
- Çalışma bitiminde cihaz kapağı açılır. Yalıtılmış rotor dışarı çıkarılır. Yalıtılmış rotor biyolojik olarak güvenli bir kabinde açılır.
- Yalıtılmış rotor kapağı açılır. Sitoklip döner tepsi slotundan dik pozisyonda tutularak alınır.
- Sitoklip lam mandalı sıkıca tutulur. Yayı kancalardan kurtarmak için sıkıca bastırılır ve yay kancadan uzaklaştırılır. Funnel sitoklipten ayrılır.



Resim 2.37: Sitoklibin açılması

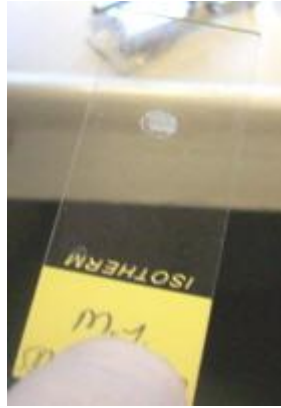
- Lam, üzerindeki filtre kartıyla birlikte yatay konumda sitoklipten ayrılır. Lam üzerindeki filtre kartı, lam üzerindeki yaymayı etkilemeyecek şekilde hareket ettirilmeden kaldırılır.



Resim 2.38: Sitoklipten lamın ayrılması

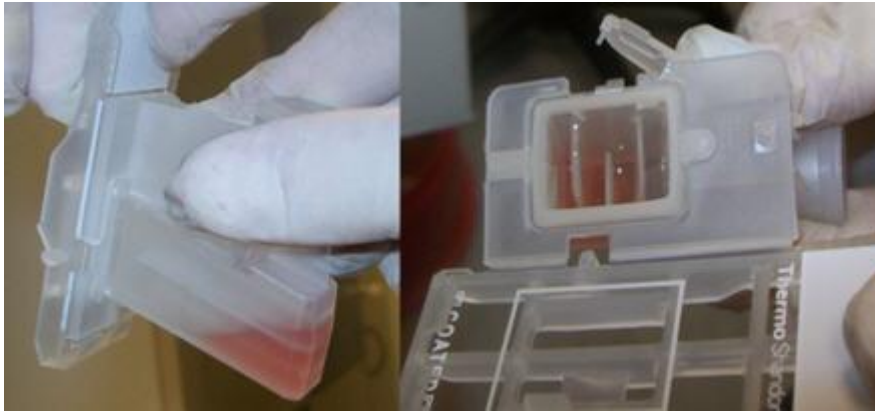


Resim 2.39: Filtre kartının lamdan ayrılması



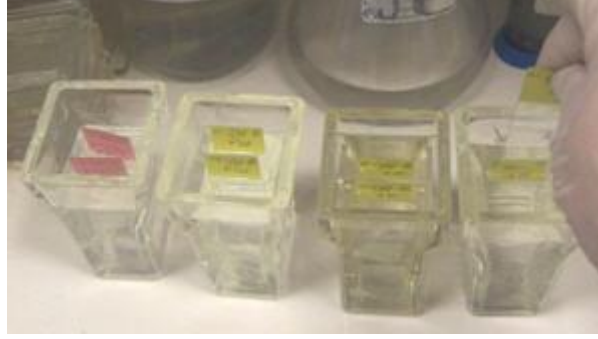
Şekil 2.40: Filtre kartı alınmış sitosantrifüj yayması

- Megafunnel içindeki sıvılar dökülmeyecek konumda tutularak klipleri açılır. Lam çıkarılır.



Resim 2.41: Lamın megafunneldan ayrılması

- MGG ile boyanacak yaymalar havada kurumaya bırakılır.
- PAP ile boyanacak yaymalar hızlı bir şekilde %95'lik etil alkol bulunan kaplara konur. Fiksasyonları başlatılır. Örneklere ait lamalar bulaşları önlemek amacıyla ayrı ayrı kaplarda fikse edilir. Fiksasyon sıvısı lamaları kaplamalı, içinde lamalar birbirine değmeyecek pozisyonda durmalıdır.



Resim 2.42: Yaymaların fiksasyonu

- Tek kullanımlık funnellar biyogüvenlik kurallarına uygun olarak imha atık kabına uygun şekilde atılır.
- Çok kullanımlı funnel ve stoklip dezenfaktan solüsyonunda 15-20 dakika bekletilir. Yıkayıp distile sudan geçirilir. 121°C'de 15 dakika otoklavda dekontamine edilerek tekrar kullanıma hazırlanır.



Resim 2.43: Sitofunnellarin dekontamine sıvıda bekletilmesi



Resim 2.44: Yıkamış funnellar

UYGULAMA FAALİYETİ-1

Santrifüj yöntemiyle sitolojik preparat hazırlayınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Biyolojik ve kimyasal maddelere karşı biyogüvenlik önlemleri alınız.	➤ Kişisel koruyucu ekipmanları kullanınız.
➤ Çalışma araç gereçlerini hazırlayınız.	
➤ Laboratuvar istem raporu bilgileriyle materyal bilgilerini karşılaştırınız.	➤ İstem raporundaki hasta adı, soyadı, sitoloji kayıt numarası vb. bilgiler ile materyal kabındaki bilgilerin doğruluğunu kontrol ediniz. ➤ İstem raporunda belirtilen inceleme materyali ile kap içindeki materyalin uygunluğunu kontrol ediniz. ➤ İstem raporundaki bilgilerle materyal kabındaki bilgileri uymayan örnekleri çalışmaya almayınız, materyal kayıt kabul bölümüne gönderiniz.
➤ Örneğin makroskobik görünümünü rapor arkasına kaydediniz.	
➤ Örnekte yapılacak çalışmaları rapor arkasına kaydediniz.	➤ Sıvılardan sitolojik preparat hazırlama talimatlarına (BOS, idrar vb.) uygun çalışma yapınız. ➤ Hazırlanacak lam sayısını rapora kaydediniz. ➤ Yaymalara uygulanacak fiksasyon yöntemini kaydediniz. ➤ Yaymalara uygulanacak sitolojik boyama yöntemlerini kaydediniz.
➤ Fiksasyon solüsyonunu hazırlayınız.	➤ PAP boyası uygulanacak yaymalar için %95'lik etil alkol fiksantifi hazırlayınız. ➤ Fiksasyon kabının kapaklı olmasına dikkat ediniz. ➤ Fiksasyon solüsyonunun lamları kaplayacak miktarda olmasına dikkat ediniz.
➤ Örnek yaymasında kullanılacak lamları hazırlayınız.	➤ Örneğin özelliğine uygun normal veya adessifli lam seçiniz. ➤ Transuda örnekler için adessifli lamlar kullanınız. ➤ Lamların buzlu kısmına örneğin sitoloji takip numarasını yazınız. ➤ Lam yüzeyine dokunmamaya dikkat ediniz.

<p>➤ Örnekten inceleme örneği alınız.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Örneğin özelliğine uygun yöntem seçiniz. ➤ Küçük hacimli sıvıların tamamını incelemeye alınız. ➤ Büyük hacimli sıvılardan homojen karışım sağladıktan sonra inceleme örneği alınız. ➤ Pıhtılaşmış örnekten pıhtıyı yavaşça sıkarak örnek alınız. ➤ Mukoid örnekler mukoid örnek hazırlama yöntemi uygulayarak inceleme örneği alınız. ➤ Kanlı örnekler lizis yöntemi uygulayarak inceleme örneği alınız.
<p>➤ Örnekleri santrifüj ediniz.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Santrifüj işleminde konik santrifüj tüpleri kullanınız. ➤ Santrifüj işlemini 1680 rpm'de 10 dakika uygulayınız. ➤ Yüksek santrifüj gücü uygulamanın hücreleri parçalayacağını unutmayınız.
<p>➤ Santrifüj edilmiş örneklerin süpernatantlarını atınız.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tüpleri santrifüjden sarsmadan çıkarınız. ➤ Konik tüplerde oluşan süpernatantı tek bir hamlede boşaltınız. ➤ Düz tüplerde oluşan süpernatantı pipet/pastör pipeti kullanarak alınız.
<p>➤ Tüp dibinde oluşan sedimentten sitolojik yayma hazırlayınız.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Sediment içinde bulunan hücre yoğunluğunu belirleyiniz. ➤ Tek tabaka hücre yayması elde edilecek miktara karar veriniz. ➤ Kararlaştırdığınız miktarı hazırladığınız lam üzerine naklediniz. ➤ Hücrelere zarar vermeden uygun basınç uygulayarak yayma elde ediniz.
<p>➤ Yaymaların fiksasyonunu uygun yöntemle yapınız.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ PAP boyası uygulanacak yaymaları, her örnek için ayrı ayrı hazırlanmış %95'lik etil alkol bulunan kap içine naklediniz. ➤ MGG ile boyanacak yaymaları havada kurumaya bırakınız.

UYGULAMA FAALİYETİ-2

Sitosantrifüj yöntemiyle sitolojik preparat hazırlayınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Çalışma araç gereçlerini hazırlayınız.	➤ Örnek sayısına gören stoklipleri hazırlayınız. ➤ Örnek miktarına uygun standart ya da megafunnel kullanımına karar veriniz.
➤ Santrifüj yöntemiyle preparat hazırlama yöntemine uygun hücre sedimenti hazırlayınız.	
➤ Hücre sedimentinde bulunan hücre yoğunluğunu belirleyiniz.	➤ Hücre yoğunluğunu mikroskopta değerlendiriniz. ➤ Hücre yoğunluğunu tek tabaka yayma elde edecek şekilde dilüe ediniz. ➤ Funnela konulacak örnek miktarını belirleyiniz.
➤ Örnekleri funnellara aktarınız.	➤ Elde etmek istediğiniz örnek miktarına ve yayma alanına uygun standart ya da megafunnel kullanımına karar veriniz. ➤ Funnela sabitlenmiş lam bilgilerini kontrol ediniz. ➤ Pipet/pastör pipeti kullanarak funnellara örnek naklediniz. ➤ PAP boyası uygulanacak funneldaki örnek üzerine koruyucu madde (cyto spin collection fluid) ekleyiniz. ➤ Funnelları kapaklarını kapatınız.
➤ Funnelları, yalıtılmış rotor slotlarına yerleştiriniz.	➤ Funnelları dengeli şekilde slotlara yerleştiriniz. ➤ Funnelları slotlara uygun konumda yerleştiğini tekrar kontrol ediniz. Yalıtılmış rotor kapağını kapatınız. ➤ Yalıtılmış rotoru sitosantrifüj cihazına yerleştiriniz.
➤ Sitosantrifüjü çalıştırınız.	➤ Örnekleri 600 rpm.de 4 dakika santrifüj ediniz. ➤ BOS sıvısını 500 rpm.de 5 dakika santrifüj ediniz.

<ul style="list-style-type: none">➤ Santrifüj edilmiş funnelleri sitospin cihazından çıkarınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Funnelleri dik konumda slotlardan alınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Sitoklip/megafunneldan lamı ayırınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Stoklip mandalını açınız.➤ “Funnel”i sitoklipten ayırınız.➤ Stoklibi yatay konumda tutarak filtre kartını ve lamı ayırınız.➤ Megafunnel içindeki sıvıyı lama akmayacak pozisyonda eğik konumda tutarak lamı “funnel”den ayırınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Yaymaların fiksasyonunu uygun yöntemle yapınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ PAP boyası uygulanacak yaymaları, %95’lik etil alkol bulunan kap içine naklediniz.➤ Her örnek için ayrı ayrı hazırlanmış kaplarda alkol içinde fikse ediniz.➤ MGG boyası uygulanacak yaymaları havada kurumaya bırakınız.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

- Aşağıdakilerin hangisinde santrifüj yöntemiyle sitolojik preparat hazırlama işlem sırası doğru olarak verilmiştir?
 - Süpernatanın atılması → makroskopik görünüm → örneğin santrifüje hazırlanması → Santrifüj → hücre sedimentinin lama aktarılması → yayma tekniklerinin uygulanması
 - Santrifüj → makroskopik görünüm → örneğin santrifüje hazırlanması → süpernatanın atılması → hücre sedimentinin lama aktarılması → yayma tekniklerinin uygulanması
 - Makroskopik görünüm → hücre sedimentinin lama aktarılması → örneğin santrifüje hazırlanması → santrifüj → süpernatanın atılması → yayma tekniklerinin uygulanması
 - Örneğin santrifüje hazırlanması → santrifüj → süpernatanın atılması → hücre sedimentinin lama aktarılması → yayma tekniklerinin uygulanması → makroskopik görünüm
 - Makroskopik görünüm → örneğin santrifüje hazırlanması → santrifüj → süpernatanın atılması → hücre sedimentinin lama aktarılması → yayma tekniklerinin uygulanması
- Aşağıdaki örneklerden hangisine santrifüj işleminden önce mukoid örnek hazırlama yöntemi uygulanır?
 - BOS
 - İdrar
 - Balgam
 - Ekleme sıvısı
 - Kist sıvıları
- Aşağıdaki örneklerden hangisine lizis işlemi uygulanmaz?
 - BOS
 - İdrar
 - Balgam
 - Ekleme sıvısı
 - Kist sıvıları
- Aşağıdakilerden hangisi, sitosantrifüj yöntemiyle preparat hazırlamada kullanılan araç gereçlerden biri değildir?
 - Doku kaseti
 - Funnel
 - Sitoklip
 - Şale
 - Filtre kartı

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-3

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgiler ile sıvı bazlı sitolojik yöntemlerle preparat hazırlayabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

Sıvı bazlı sitolojik yöntemlerle preparat hazırlama tekniklerinden santrifüj ve filtrasyon tekniğini karşılaştırınız.

3. SIVI BAZLI SİTOLOJİK YÖNTEMLER

Sıvı bazlı sitolojik yöntemler, farklı tekniklerle tek tabakalı (tek tek duran hücreler) sitolojik yayma hazırlamak amacıyla kullanılır.

Bilgisayar destekli sitolojik tarama yöntemlerinin (PAPNET gibi) gelişmesi ile birlikte yaygınlaşmaya başlayan yöntemlerdir. Sıvı bazlı sitolojik yöntemlerde çalışma örnekleri şu şekilde elde edilir.

Uzman doktor tarafından alınan İİAS materyaller, jinekolojik örnekler, fırçalama, kazıma vb. örnekler özel preservsyt (hücre koruyucu sıvı) içeren örnek kaplarına konularak laboratuvara gönderilir. Enjektöre alınmış İİAS materyali sıvı bazlı sitolojik örnek alma kabına boşaltılarak, fırça ile alınmış jinekolojik örnek ise fırça sıvı içine konularak elde edilir.



Resim 3.1: Koruyucu sıvı içinde fırça ile alınmış sitolojik örnek

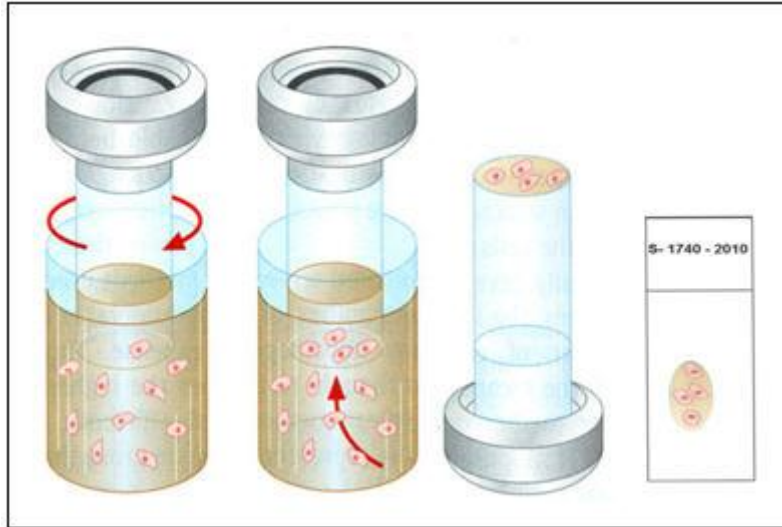
Laboratuvara gönderilen sıvılar, santrifüj edildikten sonra oluşan hücre sedimenti özel preservsyt içeren örnek kaplarına aktarılır ve çalışma örnekleri elde edilir.

- Sıvı bazlı sitolojik preparat hazırlamada iki teknik uygulanır.
 - Santrifüj tekniği (sure path, sitosantrifüj)
 - Filtrasyon tekniği (thin prep)

- Sıvı bazlı sitolojinin avantajları;
 - Hücrelerin direkt olarak fiksatif sıvı içine konması, optimum fiksasyon,
 - Örneklerin oda ısısında günlerce durabilmesi,
 - Üst üste binmemiş, ince bir tabaka hâlinde yayılmış yaymalar,
 - Lamda küçük bir alanda yayma oluşturma, tarama alanının küçülmesi,
 - Kuruma artefaktları oluşmaması,
 - Yaymalarda mukus ve kan içeriğinin azalmasıdır.

3.1. Thin Prep Yöntemiyle Yayma Hazırlama

Bir fırça yardımıyla alınan servikal örnek veya laboratuvarında hazırlanan hücre sedimentleri, hücrelerin asılı kalmasını sağlayan özel hücre koruyuculu sıvı içine aktarılır. Bu sıvı içinde hücreler üst üste çökmez. Sıvı, üzerinde 5 veya 8 mikron porlara (70.000 adet) sahip özel filtrelerle vakumla emilir. Sıvı içinde asılı duran hücreler, vakumla membran filtre porlarına hareketlenir. Hücrelerin geçişine müsait olmayan porlar hücreler tarafından kapatılır. Hücre tarafından kapanan pordan sıvı emilimi durur ve por açıklığını kapayan hücre üzerine yeni bir hücrenin gelmesinin de önüne geçilir. Membran filtreden sıvı emilimi, tüm porlar hücreler tarafından kapanıncaya kadar sürer. Sıvı emiliminin durmasıyla işlem biter. Üzerine tek tabaka hâlinde yapışan hücreler bulunan filtre, kalsiyum ile kaplı adheran lamlara dokundurulularak tek katlı ince tabakalı bir örnek elde edilir.



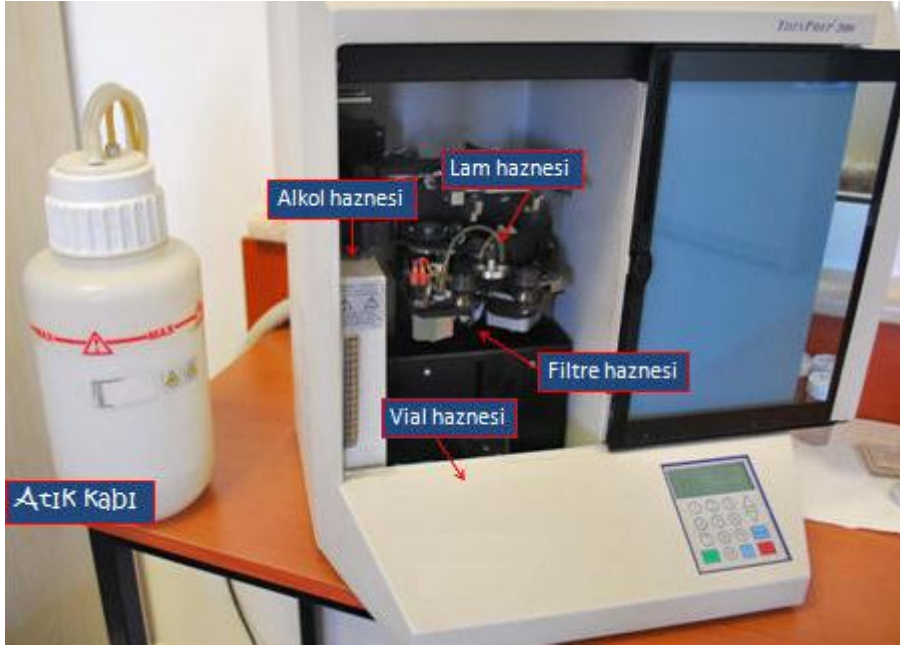
Şekil 3.1: Thin prep tekniğinin uygulaması

3.1.1. Cihaz ve Ekipmanlar

Thin prep cihazı ve cihaz ekipmanları kullanılarak preparat hazırlanır.

- **Thin prep cihazı**
 - Kapak: Cihazın ön kısmında numuneleri içeri koyabilmek için açılır kapanır kapaktır.

- LCD ekran: Program seçiminde kullanılan menünün bulunduğu kısımdır.
- Alkol kabı haznesi: İç kısımda %96'lık alkol fiksasyonunda kullanılan kabın bulunduğu bölümdür.
- Lam haznesi: Yayma hazırlamada kullanılan lamaların yerleştirildiği bölümdür.
- Vial haznesi: Örnek kabının yerleştirildiği bölümdür.
- Asansör: Numune kabını filtreye yaklaştıran düzendir.



Resim 3.2: Thin prep cihazı

➤ Cihaz ekipmanları



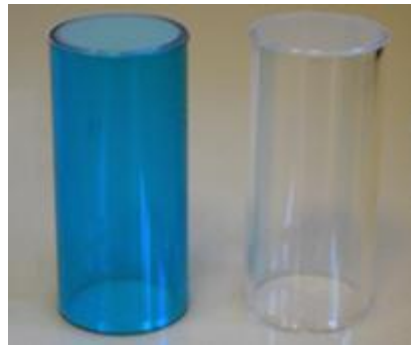
Resim 3.3: Thin prep cihazı ekipmanları

- Solüsyon: Ana maddesi metanol olan tamponlu bir sıvıdır. İki ayrı solüsyon bulunmaktadır.
 - Non-jinekolojik
 - Jinekolojik



Resim 3.4: Thin prep örnek kabı (vial)

- Lam: Hücrelerin vakum yöntemi ile üzerine yapışabilmesi için kalsiyum içerdiğinden pozitif yüklüdür. Hücrelerin yayıldığı dairenin çapı 2.1 cm'dir.
- Filtreler: Silindirik şeklindedir ve poröz membran filtre içerir. Filtre beyaz ve mavi olmak üzere iki ayrı renktedir.
 - Mavi renkli filtre, non-jinekolojik materyal için kullanılmaktadır. Membran filtre 5 mikron çapında 70.000 adet por ihtiva eder.
 - Beyaz renkli filtre, jinekolojik materyal için kullanılmaktadır. Membran filtre 8 mikron çapında 70.000 adet por ihtiva eder.



Resim 3.5: Filtreler

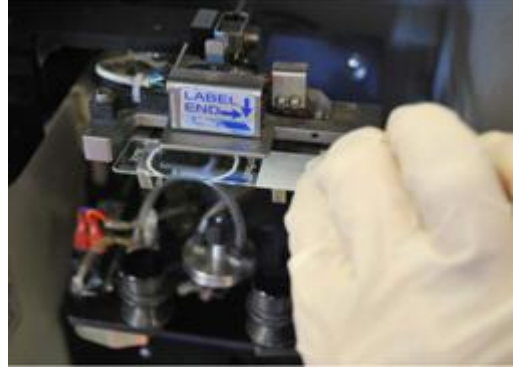
- Filtre başlığı: Filtreyi takmak için kullanılır.
- Alkol kabı: Thin prep preparatının fiksasyonunda kullanılan %96'lık etanol konulan kabtır.
- Atık boşaltma kabı: Makine tarafından çalışılan örneklerin hücreleri alındıktan sonra kalan atık sıvının vakumla boşaltıldığı kabtır.

3.1.2. Thin Prep Cihazının Çalışması

- Cihaz ilk açıldığında kalibrasyon için 10 dakika beklenir ve ön kapak açılır.
- Preparat hazırlamada kullanılacak thin prep'e ait özel lam üzerine hasta adı, soyadı, dosya numarası ve sitoloji protokol numarası yazılır. Lam, rodajlı kısım aşağı bakacak şekilde lam haznesine yerleştirilir. Lamı yerleştirirken yayma yapılacak işaretli kısma el değdirilmemelidir.



Resim 3.6: Lam yazımı



Resim 3.7: Lam yerleştirme

- Çalışma örneğine uygun filtre, filtre başlığına takılır. Jinekolojik örnekler için beyaz filtre, non-jinekolojik örnekler için mavi filtre takılır.



Resim 3.8: Filtrenin filtre başlığına takılması



Resim 3.9: Filtre

- Filtre cihaza takılır. Filtre başlığının tam yerleşip yerleşmediği, filtre 2 parmak arasında döndürülerek kontrol edilir.



Resim 3.10: Filtrenin cihaza monte edilmesi

- Çalışılacak örnek ile dolu thin prep solüsyonunun kapağı açılarak makine haznesine yerleştirilir.
- %96'lık etanol ile dolu fiksatif kabı cihaz üzerindeki haznesine yerleştirilir. Alkol seviyesinin kap üzerinde belirtilen maksimum ve minimum çizgiler arasında olmasına dikkat edilir. Makinenin kapağı kapatılır.



Resim 3.11: Örnek kabının cihaza yerleştirilmesi



Resim 3.12: Fiksasyon kabının cihaza yerleştirilmesi

- Kontrol tuşları kullanılarak ön paneldeki LCD ekranda görülen uygun program seçilir.



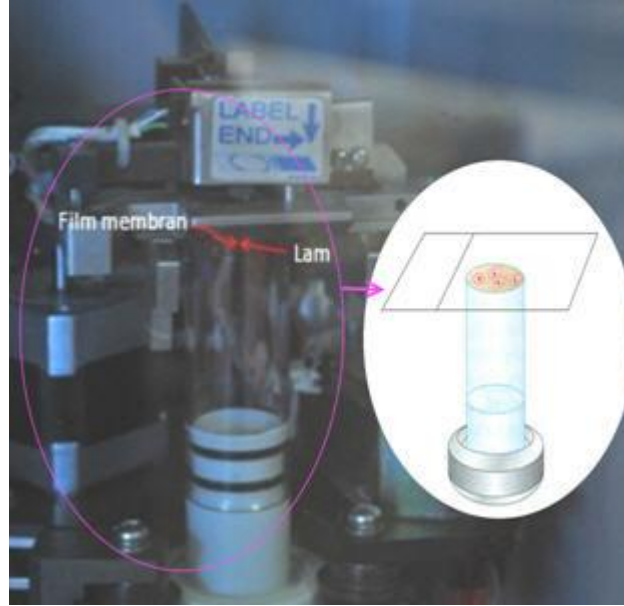
Resim 3.13: Örnek türüne uygun program seçilmesi

- Makine tercih edilen programda çalışmaya başlar. Makine içine yerleştirilen lam, alkol, numune kabı makine tarafından kontrol edilir. Kalibrasyonu yapılır.
 - Makine asansörü solüsyon kabını filtreye uygun yüksekliğe çıkartır. Filtre ile 3-4 kere karıştırarak homojenize eder ve içinden hücre seçimi yapar. Bu genellikle hücrenin azlığı-çokluğu arasında tahminen 1.5 dakika ile 3 dakika arasındadır.



Resim 3.14: Örneğin filtreden emilmesi

- Filtre tarafından alınan hücreler vakumlanır. Fazla sıvı atık kabına gönderilir.
- Membran filtre üzerindeki hücreleri lama yapıştırır.

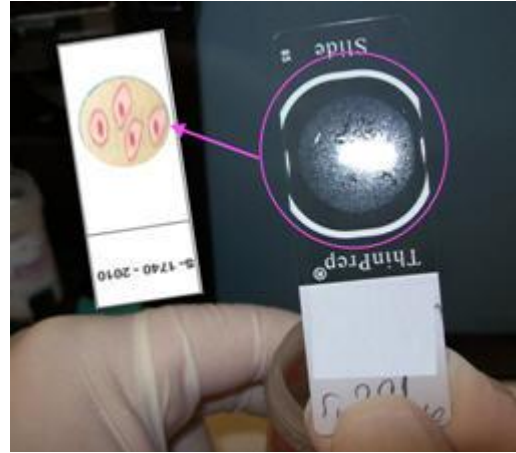


Resim 3.15: Filtre membranına yapışmış hücrelerin lama aktarılması

- Lam fiksasyon kabına bırakılır.



Resim 3.16: Lamın fiksasyona alınması



Resim 3.17: Thin prep yayması

- İşlem bittiğine dair sinyal sesi duyulunca cihazın kapağı açılır.
- Filtre başlığı çıkarılır. Kullanılan filtre atılır.
- Filtre başlığının içi ve dışı yumuşak bir kâğıt ile temizlenir. Tekrar kullanım için kaldırılır.

- Örnek kabı hazneden alınır. Kapağı kapatılarak kaldırılır.
- Fiksatif kabı cihazdan çıkartılır. İçindeki lam alınarak boyanmak üzere %96'lık etanol bulunan sepete yerleştirilir.



Resim 3.18: Yaymaların fiksasyon sıvısında bekletilmesi

- En az 15 dakika fiksasyondan sonra manuel PAP boyama işlemine geçilir.
- Çalışılacak başka numune yoksa cihazın kapağı kapatılır. Günlük bakımı ve kalibrasyonu yapıldıktan sonra makine kapatılır.

3.1.3. Örneklerin Saklanması

Günlük gelen örnekler, oda sıcaklığında (15 – 32 OC) en az 21 gün bekletilebilir. Düzenli olarak 5 gün içinde hastanın raporunun çıkıp çıkmadığı kontrol edilir. Hastanın raporu çıkmış ise materyal atılır. Raporunda herhangi bir epitelyal hücre anomalisi mevcut olan materyal atılmaz, buzdolabında(4OC)muhafaza edilir. Gerekli durumlarda immünsitokimyasal ya da moleküler çalışmalar için kalan materyal tekrar kullanılabilir.

Patologlar tarafından morfolojik incelemenin tekrarı ya da immünsitokimyasal/ moleküler çalışmalar için numuneden tekrar preparat hazırlanması istenebilir. Materyalden tekrar preparat hazırlamak için sıvının yeterli olup olmadığı kontrol edilir. Solüsyon tüpü üzerinde işaretli olan seviyenin altında ise jinekolojik stok sıvıdan (kullanılmamış) ilave edilir. Materyal tekrar çalışmaya hazırdır. Solüsyon üzerinde işaretli olan seviyenin altında veya üzerinde sıvı bulunuyor ise Thin Prep cihazı işlem yapmaz.

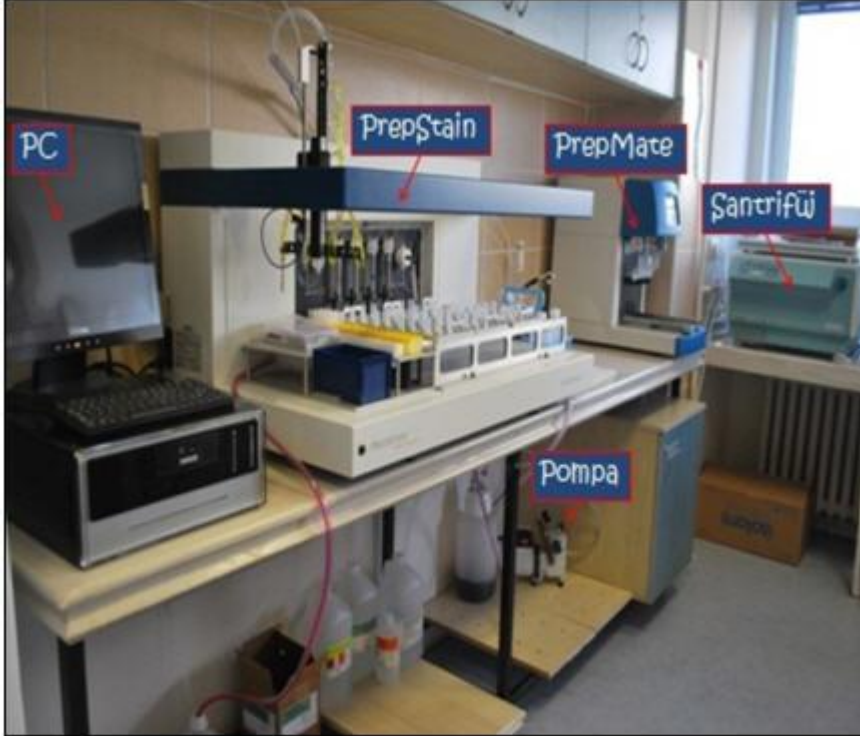
3.2. Sure Path Yöntemiyle Yayma Hazırlama

Sıvı bazlı santrifüj tekniğine dayalı bir yöntemdir. Örnekteki istenmeyen yapıları ayırarak santrifüj yöntemiyle boyalı yayma hazırlayan bir yöntemdir. Sure Path yöntemiyle preparat hazırlama üç aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar şunlardır:

- Dansite gradyanı ve hücre sedimenti elde etme

- Sedimenten yayma hazırlama
- Yayma boyama

Örnekler, prep mate ve santrifüj işlemleriyle hazırlanır. Hazırlanan örnek tüplerin yayma hazırlama cihazına yüklemesi yapılır. Cihaz yayma ve boyama işlemi aynı anda yaparak boyalı sitolojik preparat hazırlar.



Resim 3.19: Sure Path preparat hazırlama sistemi

3.2.1. Sure Path Cihazı ve Ekipmanları

Sure path preparat hazırlama sistemi iki ana cihaz bileşiminden oluşur.

- **Prep mate** (Dansite gradyanı oluşturan cihaz)
- **Prep stain** (Preparasyon ve boyama cihazı)
- **Cihaz Ekipmanları**
 - Santrifüj cihazı
 - Aspirasyon cihazı
 - Numune kabı (vial)



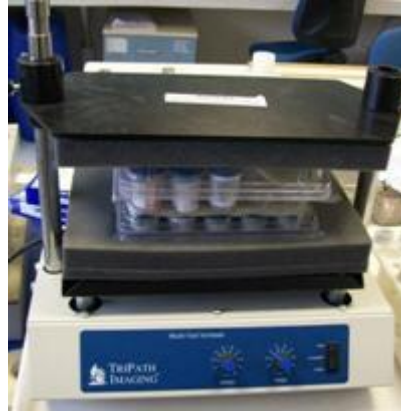
Resim 3.20: Çalışma örneği

- Enjektör
- Plastik tüp
- Özel pipetler
- Lam
- Özel odacıklar; lam üzerine yerleştirilen plastik silindir kaplardır. İçinde numune hazırlama ve boyama işlemi gerçekleştirilir.



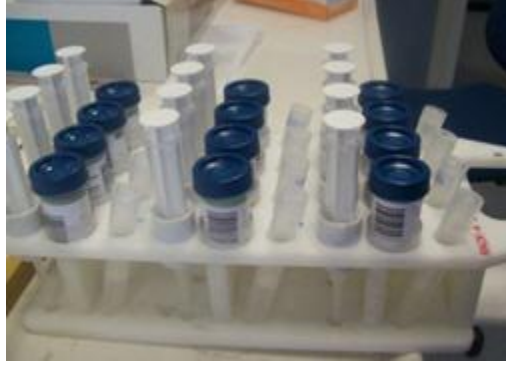
Resim 3.21: Özel odacık

- Ajitatör; vialeri çalkalayarak fırçadaki hücreleri solüsyona geçirmede kullanılır.



Resim 3.22: Ajitatör

- Prep mate rackı; numune kabı(vial), enjektör ve içinde solüsyon bulunan plastik tüplerin yerleştirildiği tepsidir. Dansite gradyanı oluşturmak için plastik tüplerdeki solüsyon içine enjektörle numune aktarılır.



Resim 3.23: Prep mate tepsisi (rack)

- Slide (lam) tepsisi; lamaların yerleştirildiği metal tepsidir.



Resim 3.24: Slide (lam) tepsisi

3.2.2. Dansite Gradyanı ve Hücre Sedimenti Elde Etme

Ajitatör, prep mate, aspiratör ve santrifüj cihazları kullanılarak çalışma örneğinden dansite gradyanı ve hücre sedimenti oluşturulur. Homojen karışım sağlanmış örnek, prep mate cihazıyla dansite reagenti bulunan santrifüj tüplerine nakledilir. Santrifüj işlemleriyle hücre sedimenti aşağıdaki aşamalarla gerçekleştirilir.

- Numuneler sırasıyla ajitatöre ait özel plastik kutulara yerleştirilir. Üzerine ince plastik kapak kapatılır ve cihaza yerleştirilir. Numunelerin içindeki fırçada bulunan hücrelerin solüsyon içinde karışması sağlanır. Bu işlemin süresi 2 dakikadır.



Resim 3.25: Örnek kapları



Resim 3.26: Örnek kaplarının ajitatörde karıştırılması

- Ajitatörden alınan numuneler prep mate tepsisine sırayla yerleştirilir. Her bir numunenin önüne plastik tüp, arkasına bir enjektör yerleştirilir. Tüplerin içine 4 ml stok tampon solüsyon sıvısı ilave edilir.



Resim 3.27: Tüplere stok tampon solüsyon konulması



Resim 3.28: Prep mate tepsisine tüp, vial ve enjektörlerin yerleştirilmesi

- Hazırlanan tepşiler prep mate cihazına yerleştirilir ve cihaz çalıştırılır.



Resim 3.29: Prep mate tepşinin yerleştirilmesi



Resim 3.30: Prep matede enjektörle örneklerin karıştırılması

- Makine enjektörler aracılığıyla numuneyi 8-9 kere vorteksleyerek homojenize eder ve 8 ml sıvıyı plastik tüp içine aktarır.



Resim 3.31: Örneğin tüplere aktarılması



Resim 3.32: Dansite gradyanı oluşturulmuş örnek

- Daha sonra tüpler santrifüj haznelerine yerleştirilir ve santrifüj edilir. Birinci santrifüj işlemi 200 rpm.de 2 dakika 15 saniyedir.

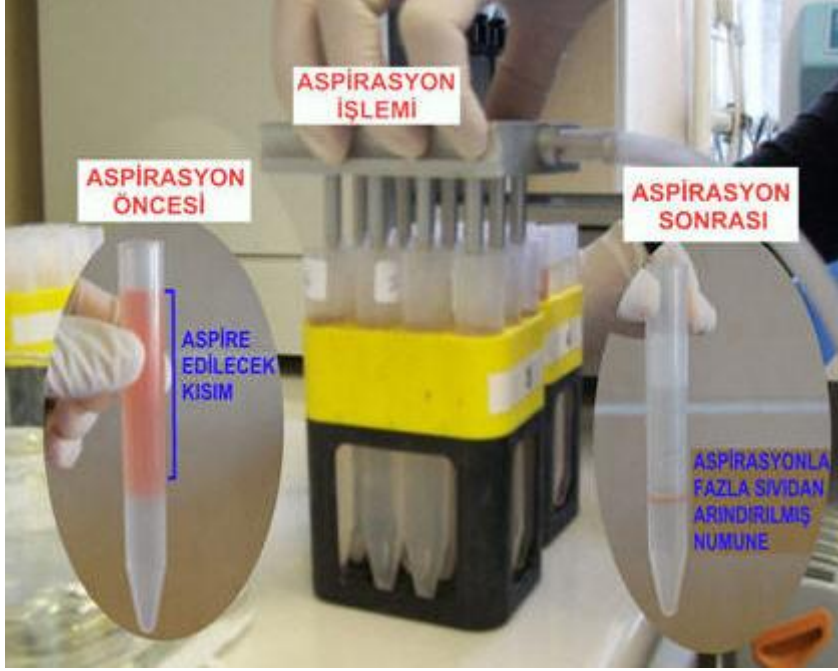


Resim 3.33: Örneklerin santrifüj godelerine alınması



Resim 3.34: Örneklerin santrifüje nakledilmesi

- Birinci santrifüj bittikten sonra santrifüj haznesinden alınan tüpler, aspirasyon makinası yardımı ile üzerindeki fazla sıvıdan arındırılır.



Resim 3.35: Örnek tüplerindeki fazla sıvının aspire edilmesi

- Örnekler santrifüje tekrar konur ve ikinci santrifüj işlemi yapılır. Bu işlem 800 rpm.de 10 dakikadır.
- İşlem bitince santrifüj haznesinden alınan tüplerin üzerinde kalan fazla sıvı dökülür.



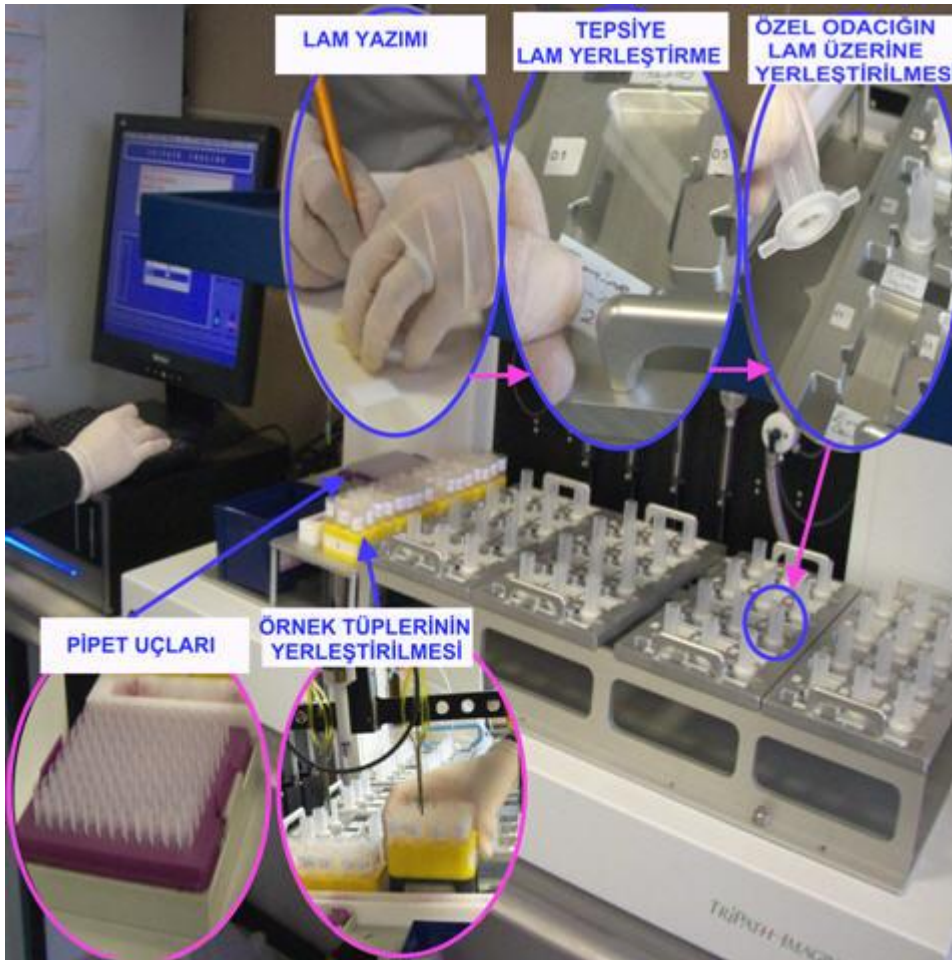
Resim 3.36: Süpernatanın dökülmesi

- Tüpler ajitatör ile 10 saniye çalkalanır.

3.2.3. Sedimentten Yayma Hazırlama

Prep stain cihazı yaymaların hazırlanma ve boyamasını otomatik olarak gerçekleştirir. Cihaz; öncelikle hücre sedimentini dilüe eder, dilüe örnekten aldığı örneği lam özel odacığına naklederek aşağıdaki işlemlerle yayma hazırlar.

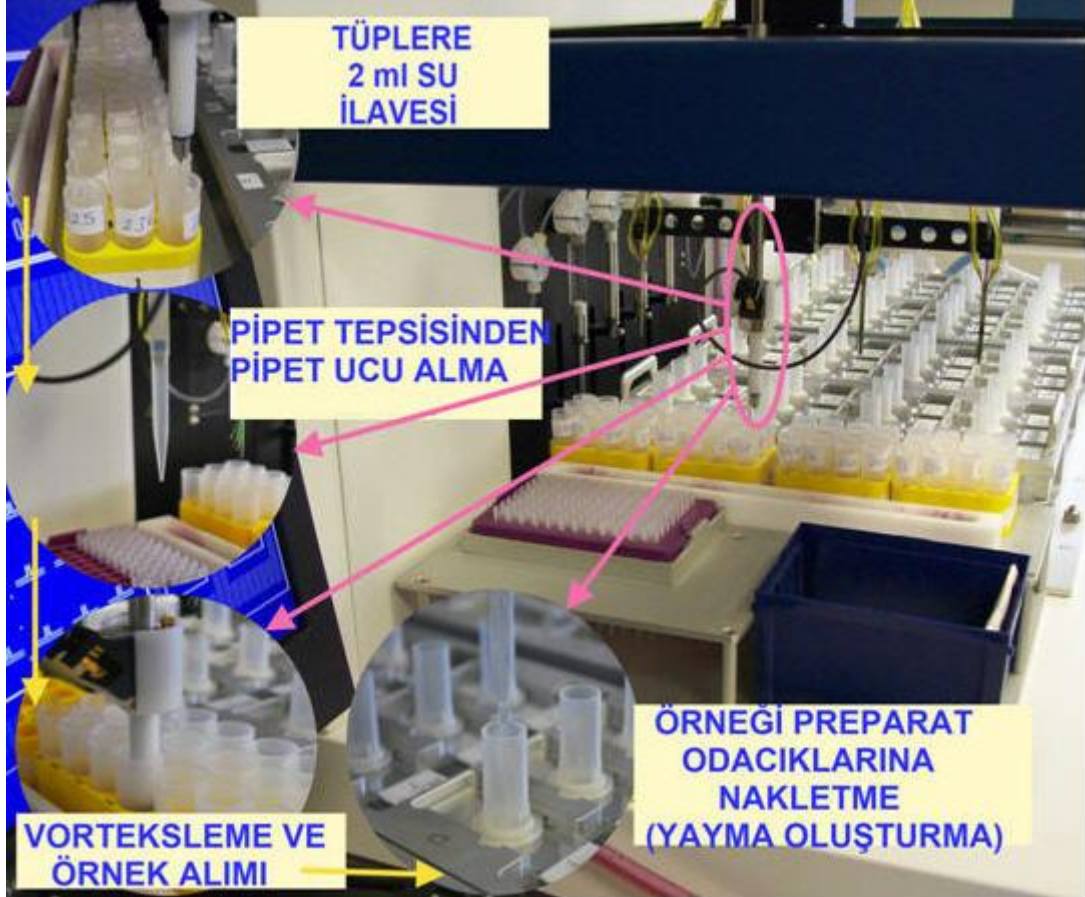
- Protokol numarası yazılan lamlar slide tepsisindeki özel yerine yerleştirilir. Lam üzerine özel odacıkları takılır ve kontrol edilir.
- Slide tepsisi, prep stain cihazındaki özel yerlerine yerleştirilir.
- Santrifüj işlemi biten tüpler prep stain cihazındaki yerlerine yerleştirilir.



Resim 3.37: Prep staine slide tepsisinin örnek tüpleri ve pipet uçlarının yerleştirilmesi

- Prep Stain cihazı preparasyon ve boyama için çalışmaya hazırdır. Bilgisayarla program başlatılır. Cihaz;
 - Hücreden zenginleştirilmiş (sediment) tüplerin içindeki numunelere 2 ml distile su ilave eder.

- Numuneyi 8-9 kez vorteksleyerek homojen karışım sağlar. Karışımdan örnek olarak özel lam üzerinde yayma yapar.



Resim 3.38: Yayma işlemi

3.2.4. Yayma Boyama

Prep stain cihazı hazırladığı yaymaları ara vermeden boyama işlemini gerçekleştirir. Cihaza bağlı olan boya setinden su, alkol, hematoksin, AE-50 ve orange-G boyaları boya probu aracılığıyla preparat odacıklarına naklederek yaymaları boyar.



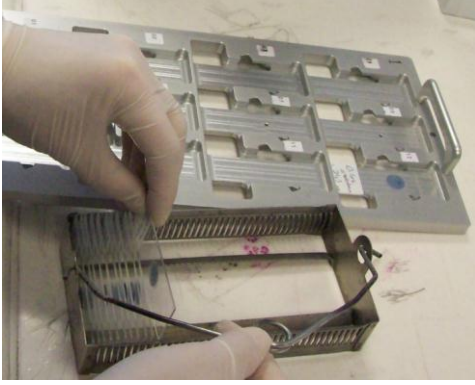
Resim 3.39: Boyama

- Boyama işlemi bitmiş lam tepsiyi cihazdan alırsınız. Lam odacıkları içinde kalan boya fazlalıkları tepsiyi ters çevirerek dökülür.

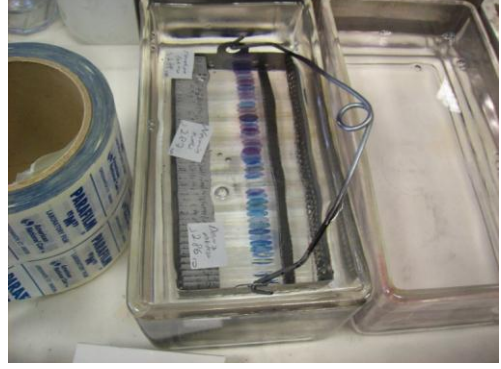


Resim 3.40: Lam odacıklarından boya kalıntılarının dökülmesi

- Lam odacıkları dikkatlice lam üzerinden alınır. Boyalı lamlar lam taşıma sepetine yerleştirilerek ksilen dolu kaba nakledilir.

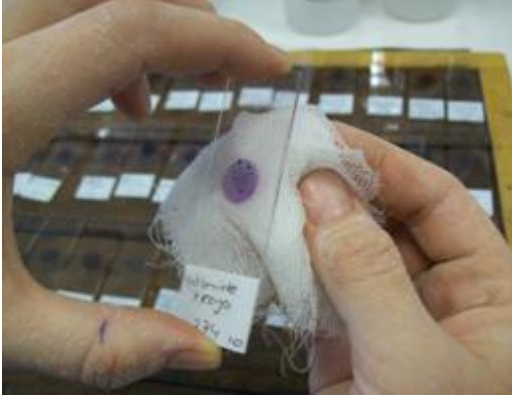


Resim 3:41. Boyalı lamaların lam taşıma sepetine dizilmesi



Resim 3:42. Lamaların ksilene alınması

- Boyanan preparatın yayma bulunmayan yüzeyi gazlı bezle silinir. Yayma üzerine entelland/Kanada balzamu damlatılarak el ile kapatılır.



Resim 3.43: Lamın yayma olmayan yüzeyinin gazlı bezle silinmesi



Resim 3.44: Lamaların l amelle kapatılması/montaj

- Hem vial içindeki hem de ağızları parafilmle kapatılmış plastik tüp içindeki örnekler buzdolabında muhafaza edilir.

3.3. Sitosantrifüj Yöntemiyle Yayma Hazırlama

Sitosantrifüjle preparat hazırlama yöntemiyle aynıdır. Farklı tarafı, diğer iki teknikte olduğu gibi çalışma örneği özel koruyucu sıvı içinde gönderilmesidir. Örnek direkt megafunnella aktararak çalışılır.

UYGULAMA FAALİYETİ

Thin Prep yönteminin tekniğine uygun sıvı bazlı sitolojik preparat hazırlayınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
<ul style="list-style-type: none">➤ Biyolojik ve kimyasal maddelere karşı biyogüvenlik önlemleri alınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Kişisel koruyucu ekipmanlarını kullanınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Cihaz ekipmanlarını hazırlayınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Çalışma örneğini hazırlayınız.➤ Çalışma örneğine uygun jinekolojik materyal için beyaz, diğer materyaller için mavi filtre seçiniz.➤ Filtreyi filtre başlığına takınız.➤ Thin prep lamına örnek numarasını yazınız.➤ Lam yüzeyine elle dokunmayınız.➤ Cihaz atık kabı doluluk oranını kontrol ediniz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Cihazın kalibrasyonunu yapınız.	
<ul style="list-style-type: none">➤ Thin prep lamını yerleştiriniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Çalışma örneğinin laboratuvar takip numarasının lam üzerine doğru yazıldığından emin olunuz.➤ Lam üzerinde işaretli yayma alanına elle temas etmeyiniz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Filtreyi cihaza takınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Filtre membranına elle temas etmeyiniz.➤ Filtre başlığının tam olarak yerleştiğinden emin olunuz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Çalışma örneğini cihazın örnek haznesine yerleştiriniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Çalışma örneği ısısının oda ısısında olmasına dikkat ediniz.➤ Örnek kabının kapağını açarak örnek haznesine yerleştiriniz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Fiksasyon kabını cihazın fiksasyon haznesine yerleştiriniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Fiksasyon sıvısı olarak %96'lık etil alkol kullanınız.➤ Alkol seviyesinin kap üzerinde belirtilen maksimum ve minimum çizgileri arasında olduğundan emin olunuz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Çalışma örneğinin türüne uygun programı seçerek cihazı çalıştırınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Cihaz menüsünde örnek türlerine uygun program olduğunu unutmayınız.➤ Örnek türüne uygun program seçtiğinizden emin olunuz.

<p>➤ Cihazın çalışmasını takip ediniz.</p>	<p>➤ Cihaz çalışma süresince panel kapağının kapalı olmasına dikkat ediniz.</p> <p>➤ Cihaz hata sinyallerine kısa sürede müdahale ediniz.</p>
<p>➤ Çalışması biten cihazdan çalışma örneği ve ekipmanlarını çıkarınız.</p>	<p>➤ Hazırlanmış yaymayı fiksatafif kabın içinden çıkarınız.</p> <p>➤ Filtreyi çıkarınız.</p> <p>➤ Filtreyi tıbbi atık kutusuna atınız.</p> <p>➤ Örnek kabını alarak kapağını kapatınız.</p> <p>➤ Çalışma örneğini raporu çıkıncaya kadar saklayınız.</p>
<p>➤ Hazırlanan yaymaları boyamaya veriniz.</p>	

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangi örnek alımı, sıvı bazlı sitolojik yöntemde uygulanır?
A) Örneklerin distile su içine yıkanması
B) Örneklerin %95'lik etil alkol içine alınması
C) Örneklerin %50'lik etil alkolle 1/1 oranında karıştırılması
D) Örneklerin lam üzerine alınması
E) Örneklerin fiksatafif içeren özel koruyucu sıvı içine aktarılması
2. Aşağıdaki tekniklerden hangisi, thin prep yönteminde kullanılır?
A) Santrifüj tekniği
B) Sitosantrifüj tekniği
C) Filtrasyon tekniği
D) Titrasyon tekniği
E) Fiksasyon tekniği
3. Aşağıdaki tekniklerden hangisi, sure path yönteminde kullanılır?
A) Santrifüj tekniği
B) Sitosantrifüj tekniği
C) Filtrasyon tekniği
D) Titrasyon tekniği
E) Fiksasyon tekniği
4. Aşağıdakilerden hangisi, sure path yönteminde yayma ve boyama uygulamasını birlikte yapan cihazdır?
A) Sure path
B) Thin prep
C) Ajitator
D) Özel odacıklar
E) Prep stain
5. Aşağıdakilerden hangisi, sıvı bazlı sitolojik preparat hazırlama yönteminin avantajlarından değildir?
A) Optimum fiksasyon elde edilmesi
B) Tek tabaka hâlinde hücre yayması elde edilmesi
C) Lamda küçük bir alanda yayma elde edilmesi
D) Bol mukus, kan içeren ince hücre yayması elde edilmesi
E) Çalışma örneklerinin oda ısısında saklanabilmesi

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-4

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığımız bilgiler ile sıvılardan hücre bloğu hazırlayabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

Histolojik blok hazırlama ile sitolojik hücre bloğu hazırlama yöntemleri arasındaki farkları arkadaşlarınızla tartışınız.

4. SIVILARDAN HÜCRE BLOĞU HAZIRLAMA

Hücre bloğu tekniği, sitolojik ve histolojik yöntemlerin bulunduğu, sitoloji ile histoloji arasında köprü kuran bir yöntemdir. Bu teknik; balgam, asit ve plevra sıvıları ile değişik bölgelerden yapılan ince iğne aspirasyonlarından hazırlanan yayma preparatlara tanıda yardımcı olmak üzere uygulanmaktadır.

Sitolojik inceleme için laboratuvara gönderilen örneklerden yayma preparatları hazırlandıktan sonra geriye kalan materyal içinde, tanı koydurucu hücre ve yapılar bulunabilmektedir. Bu materyal, hücre bloğu hâline getirilerek değerlendirilmektedir. Ayrıca, yayma preparatlar üzerinde gerektiği gibi değerlendirilemeyen kalın doku parçacıkları, hücre bloğu hâline getirildiğinde birçok ince kesit alınarak incelenebilmektedir.

Sitopatoloji laboratuvarlarında santrifüj ve sitosantrifüj yöntemleriyle hücre bloğu oluşturulur.

4.1. Santrifüj Yöntemi İle Hücre Bloğu Oluşturma

Santrifüj yöntemiyle preparat hazırlanan sıvı örneklerden geriye kalan hücre sedimenti veya sıvılar direkt olarak santrifüj edilerek hücre bloğu oluşturulur.

Santrifüj işlemi için çalışma örneği alımı; sitolojik preparat hazırlama yönteminde olduğu gibi gerçekleştirilir.

- Santrifüj edilen sediment üzerindeki berrak sıvı dökülür.



Resim 4.1: Tüpte hücre sedimenti ve süpernatant



Resim 4.2: Hücre sedimenti

- Santrifüj sonrası santrifüj tüpünün dibinde oluşan çökeltiye 1/3 oranında alkol veya %10'luk formaldehit eklenerek tekrar santrifüj edilir. Bu şekilde en az iki saat fikse edilir. Fiksasyon sonunda çökelti solid (katı) hâle gelir.

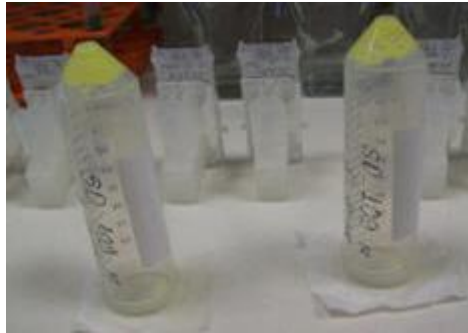


Resim 4.3: Hücre sedimenti üzerine fikstatif sıvı koyma



Resim 4.4: Hücre sedimentini fikstatifte bekletme

- Fiksasyon sonunda üst berrak sıvı dökülür.
- Tüp ters çevrilerek filtre kâğıdı üzerinde bir süre bekletilerek fazla sıvının süzülmesi beklenir.



Resim 4.5: Sedimentin süzülmesi

- Hazırlanacak blok sayısına göre filtre kâğıdı, doku kaseti ve eosin boyası hazırlanır.
- Doku kasetine örneğin laboratuvar takip numarası yazılır.



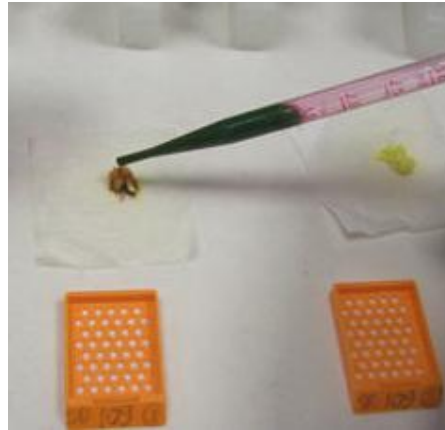
Resim 4.6: Kaset yazımı

- Oluşan çökelti bir spatula yardımıyla filtre kâğıdı üzerine alınır.



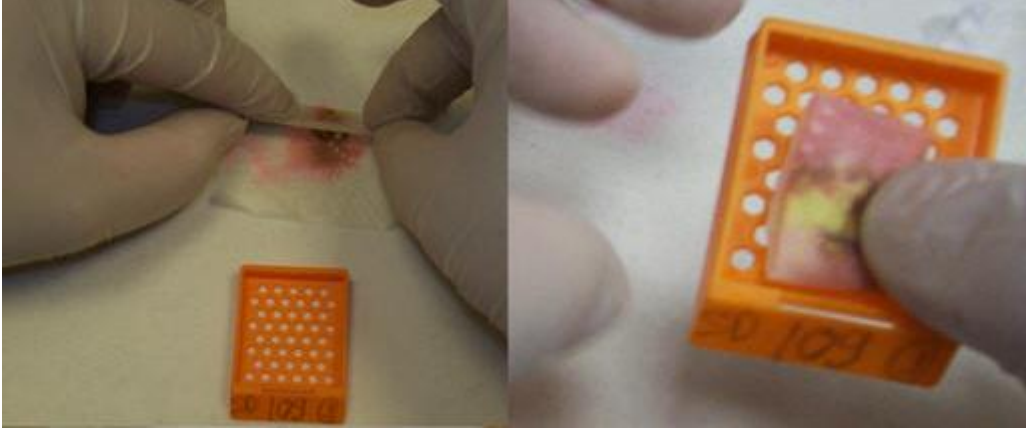
Resim 4.7: Hücre sedimentinin tüpten spatula ile filtre kağıdına nakledilmesi

- Çökelti üzerine pastör pipetiyle eosin boyası damlatılır. Çökelti, beyaz saydam görünümlüdür. Histolojik çalışmalarda; bloklama, kesit alma ve sudan almada görünürlüğü artırmak amacıyla çökelti üzerine eosin boyası damlatılır.



Resim 4.8: Hücre sedimentinin eosin boyası ile boyanması

- Kırmızı görünüm alan çökelti, filtre kâğıdına sarılarak kasetlenir.



Resim 4.9: Hücre sedimentinin filtre kâğıdına sarılarak kasetlenmesi

- Kaset, fiksasyon kabı içinde doku takibine verilir.
- Histolojik preparat hazırlama tekniği uygulanarak hematoksilin – Eosinle boyanır ve preparat hazırlanır.

4.2. Sitosantrifüj Yöntemi İle Hücre Bloğu Oluşturma

Sitosantrifüj sitoblok sistemi; hücre süspansiyonlarının, hücre kümelerinin ya da doku parçalarının işlenmesine ve parafine doyurulmasına imkân verir. Sitoblok sistem, ayrıca başka yollarla yapılması zor ya da imkânsız olan doku biyopsi parçalarının işlenmesi için de kullanılır.

4.2.1. Araç-Gereçler



Resim 4.10: Sitosantrifüj ve sitoblok sistemi

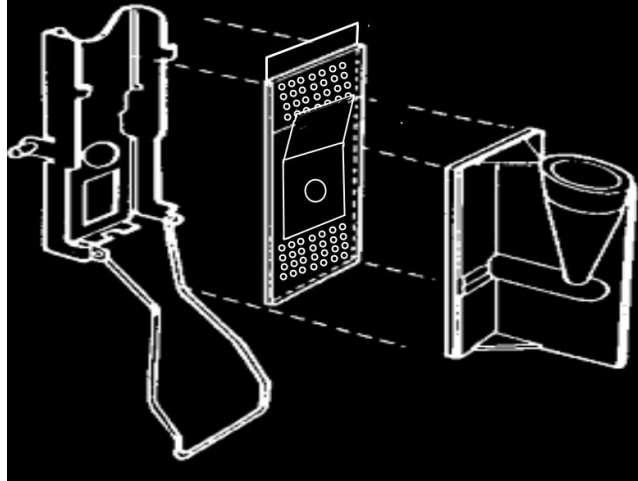
- Sitoblok kaseti; hücre yoğunlaştırma çukurluğuna sahip, hücre takibinin yapılmasında kullanılan kapaklı plastik kasettir.



Resim 4.11: Sitoblok kaseti

- Reagent-1 ve reagent-2; fiksataif içerir.

Sitoklibin yüklenmesi; sitoklibe kaset, filtre ve sitofunnelin yerleştirilme işlemidir. Tek kullanımlık sitofunnelda filtre, funnела sabit şekildedir.



şekil 4.1: Funnel ve sitoblok kasetinin sitoklibe yüklenmesi

- Örneğin sitoloji takip numarası kasete yazılır. Kaset sitoklibe yerleştirilir.



Resim 4.12: Örnek numarasının sitoblok kasete yazılması



Resim 4.13: Stoblok kasetinin sitoklibe yerleştirilmesi

- Kaset hücre yoğunlaştırma bölümüne (orta çukurluk) sitoblok reagent-1 den 3 damla damlatılır. Reagent-1 orta çukurluğun çevresini tamamen kaplamalıdır.



Resim 4.14: Stoblok kasetinine reagent-1 damlatılması

Sitoklip yayı kaldırılır, iki tutucu kancanın içine bastırılır. Bu şekilde kaset ve sitofunnel sabitlenir.

4.2.2. Örnek Hazırlama

- Örnek %10'luk nötral tamponlu formaldehitte en az 1 saat bekletilerek fikse edilir.
- Örnek birkaç dakika santrifüj edilerek fikse edilmiş hücreler konsantre edilir. Üst berrak sıvı dökülür.
- Örnek sedimenti 2 damla veya daha az ise 4 damla reagent-2 damlatılır. 2 damla örnekten bir hücre bloğu oluşturulur. Örnek hacmine uygun reagent -2 miktarı artırılır. Karışım homojen olacak şekilde karıştırılır.



Resim 4.15: Santrifüj öncesi örnek üzerine reagent-2 solüsyonu konulması

4.2.3. Uygulama

- Pipet/pastör pipeti ile süspanse edilmiş örnek karışımından iki damla standart sitofunnella konur.



Resim 4.16: Funnella örnek konulması

- Örnek 1500 rpm.de 5 dakika santrifüj edilir.
- Sitospin çalışması tamamlandığında, citofunnellar dikey olarak çıkarılır. Klipsler açılarak funnel sitoklipten ayrılır. Hücreler sitobloğa yapıştığından emin olunduktan sonra sitofunnellar atılır.
- Sitoblok ortasına reagent -1'den bir damla damlatılarak kaset kapatılır.
- Kaset doku takibine verilir.
- Histolojik preparat hazırlama teknikleri uygulanarak HE ile boyanmış preparat hazırlanır.



Resim 4.17: Doku kasetinin takibe alınması ve bloklama

UYGULAMA FAALİYETİ-1

Sıvılardan santrifüj yöntemi tekniğine uygun hücre bloğu hazırlayınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
<ul style="list-style-type: none">➤ Santrifüj yöntemiyle preparat hazırlama tekniğine uygun hücre sedimenti hazırlayınız.	
<ul style="list-style-type: none">➤ Hücre çökeltisi üzerine 1/3 oranında %10'luk formaldehit ekleyiniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Sedimenti fiksataifte en az iki saat bekletiniz.➤ Sedimentin solid hâle geldiğinden emin olunuz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Katı forma geçmiş sedimentin fiksasyon sıvısını dökünüz.	
<ul style="list-style-type: none">➤ Kasetlemede kullanacağınız araç gereçleri hazırlayınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Doku kaseti, filtre kâğıdı ve eosin boyasını hazırlayınız.➤ Örneğin laboratuvar takip numarasını doku kasetine yazınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Santrifüj tüpündeki sedimenti spatula kullanarak filtre kâğıdına naklediniz.	
<ul style="list-style-type: none">➤ Örneği eosin boyası ile boyayınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Hücre sedimentinin genellikle saydam renksiz görünümde olmasının uygulanacak histolojik çalışmalarda görünürlüğünü azaltacağını unutmayınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Örneği kasetleyiniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Örneği filtre kâğıdına sarınız.➤ Örneği kasetleyiniz.➤ Doku kasetini bekletmeden fiksasyon sıvısına koyunuz.➤ Doku kasetini doku takibine gönderiniz.

UYGULAMA FAALİYETİ-2

Sıvılardan sitosantrifüj yöntemi tekniğine uygun hücre bloğu hazırlayınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Araç gereçleri hazırlayınız.	
➤ Örneği %10'luk nötral tamponlu formaldehitte fikse ediniz.	➤ Örneği en az 1 saat fiksatatif içinde bekletiniz.
➤ Fikse olmuş örneği santrifüj ediniz.	➤ Örneğin solid form kazandığından emin olunuz. ➤ Santrifüj edilmiş örneğin süpernatant sıvısını atınız.
➤ Örnek üzerine reagent-2 solüsyonu ekleyiniz.	➤ Örnek 2 damla ve daha az ise üzerine 4 damla reagent-2 damlatınız.
➤ Hücre kasetinin sitoklibe yüklemisini yapınız.	➤ Hücre kasetine örnek laboratuvar takip numarasını yazınız. ➤ Kaset hücre yoğunlaştırma açıklığına reagent-1 damlatınız.
➤ Funnellara örneği naklediniz.	➤ Funnellara 2 damla örnek naklediniz.
➤ Funnelları yalıtılmış rotora naklederek sitosantrifüj ediniz.	➤ Örneği 1500 rpm.de 5 dakika santrifüj ediniz.
➤ Santrifüj edilen hücre kasetini doku takibine veriniz.	➤ Hücre kasetini stoklipten ayırınız. ➤ Kasetteki hücre yığını üzerine reagent-1 damlatınız. ➤ Kaset kapağını kapatınız. ➤ Kaseti histolojik çalışma uygulaması için doku takibine veriniz.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdaki fiksatiflerden hangisi hücre bloğunda fiksatif olarak kullanılır?
A) Zenker solüsyonu
B) Guluteralehit solüsyonu
C) Pikrik asit
D) %10'luk formaldehit
E) Aseton
2. Sitoblok hazırlamada hücre sedimentine hangi teknik kullanılarak preparat elde edilir?
A) Direkt yayma tekniği
B) Sıvı bazlı sitolojik teknikler
C) Santrifüj preparat hazırlama tekniği
D) Sitosantrifüjle preparat hazırlama tekniği
E) Histolojik preparat hazırlama tekniği
3. Aşağıdakilerden hangisi, hücre sedimentinin eosin boyasıyla boyanmasının nedenidir?
A) Histolojik çalışmalarda sedimentin görünürliğini artırmak
B) Hücrelerin hızla boyanmasını sağlamak
C) Hücrelerin eosinle fiksasyonunu sağlamak
D) Hücre dayanıklılığını artırmak
E) Hücre sedimentinin saydam renksiz görünümde olmasını sağlamak
4. Hücre bloğundan hazırlanan preparat hangi boyama tekniğiyle boyanır?
A) PAP
B) Hematoksilen – Eosin
C) Giemsa
D) Giemsa- Wright
E) Diff - Quick

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-5

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgiler ile sitolojik boyama yöntemlerinin tekniğine uygun sitolojik preparat boyayabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Tıbbi laboratuvarlarda kullanılan boyalar ve boyama yöntemlerini araştırınız.
- Hematoloji ve mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan boyalar ve boyama yöntemleri ile sitolojik boyalar ve boyama yöntemleri arasındaki ortak noktaları ve farklılıkları arkadaşlarınızla paylaşınız.

5. SİTOLOJİK BOYAMA YÖNTEMLERİ

Sitolojik preparatlara uygulanan fiksasyon yöntemine göre;

- Alkol fiksasyonlu preparatlarda,
 - Papanicolaou (PAP)
 - Hematoksilen-eozin
 - Sitokimyasal
 - İmmünohistokimyasal boyama yöntemleri uygulanır.
- Havada kurutulan preparatlarda,
 - Giemsa türevleri (MGG, Wright, Diff-Quick) boyama yöntemleri uygulanır.

5.1. Yaymaların Boyaya Hazırlanması

- Kliniklerden hazırlanarak gönderilen yaymaların sayısı istem raporuna kaydedilir.
- Örneğin sitoloji takip numarası lamalar üzerine sitoloji kodu “S”, takip numarası (0001) ve gönderilme yılı (S- 0001-09, S- 0002 -09....) şeklinde yazılır.



Resim 3.1: Lam yazımı



Resim 5.2: Lamaların lam taşıma sepetine dizilmesi

- Yazım işlemi bitmiş yaymalar uygulanacak boya çeşidine göre ayrı lam taşıma sepetlerine yerleştirilir.
- Havada kurutulmuş yaymaların tam olarak kurumuş olmasına dikkat edilir.
- PAP boyası uygulanacak lamalar, fiksasyon süresi bitiminde boyama işlemine alınır.

5.2. PAP Boyası

PAP boyası; Papanicolaou'nun geliştirdiği multikromatik boyama tekniğidir ve Harris Hematoksilen, orange G ve EA(eosin azure) boyalarından oluşur.

- Hematoksilen; nükleous boyası olup kromatin ile nükleer membranları mavimora, nükleolü kırmızı, pembe ya da oranj renge boyar.
- Orange G; sitoplazmaya kolay penetre olan bir boyadır. Keratin mevcutiyyetinde sitoplazmayı sarı ya da portakal rengi boyar.
- AE; eosin Y, light green ve bismark brown'dan oluşan polikrom bir karışımdır. İçeriğini oluşturan boyaların kombinasyonlarına göre AE-36, AE-50 ve AE -65 olarak üç çeşidi vardır. Bunlar:
 - 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, keratohyalin granüller ve bazı mantarlarda kahverengi boyama gözlenir.

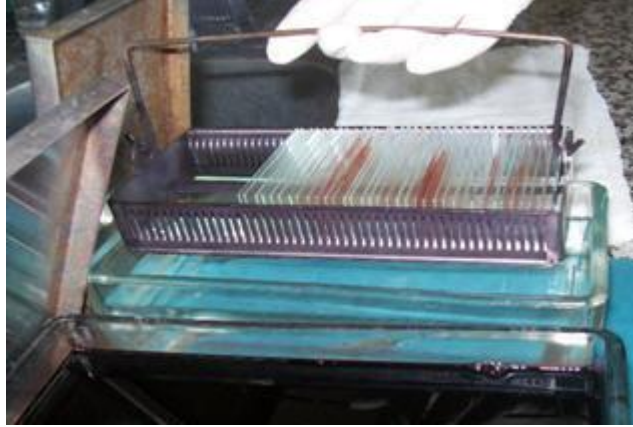
PAP boyası aşağıda belirtilen sitolojik materyallerden hazırlanan ve alkolle fiksasyonu yapılan yaymaların boyanmasında kullanılır.

- Jinekolojik smear
- BOS
- Balgam
- Bronşial yıkama/fırçalama

- Plevra, periton ve perikard sıvıları
- İdrar
- İİAS

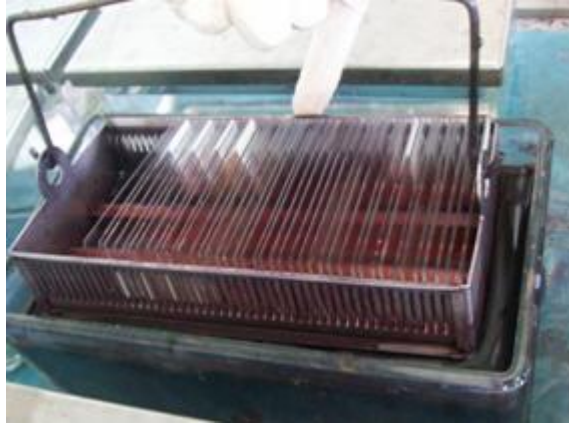
5.2.1. PAP Boyama Tekniği

- %95'lik etil alkolde tespit edilmiş yaymalar, azalan konsantrasyonlu alkollerden geçirilir. Hematoksilen çözeltisi hazırlamada çözücü madde olarak su kullanılır ve su oranı yüksek bir boyadır. Alkolle fikse edilmiş hücre öncelikle boyayla uyum sağlaması için kademeli olarak su seviyesine getirilmelidir (rehidre). Bu amaçla %95'lik etil alkolden çıkarılan preparatlar sırayla,
 - %85' lik alkol,
 - %75' lik alkol,
 - %50' lik alkollerden geçirilir.



Resim 5.3: Yaymaların alkolden çıkarılması

- Yaymalar çeşme suyunda 3-5 dakika yıkanır.
- Harris hematoksilende 45 saniye – 2 dakika bekletilir.



Resim 5.4: Harris hemotoksilen boyama

- Lamlar, çeşme suyunda yıkanarak fazla boya giderilir.
- Lamlar, asit alkolde 10 saniye çalkalanır. Diferansiyasyonla hücrelerin almış olduğu fazla boya uzaklaştırılır.



Resim 5.5:Yaymaları asit alkolden çıkarma

- Lamlar, hızlıca çeşme suyuna sokularak diferansiyasyon durdurulur.
- Yaymalar artan konsantrasyonlu alkollerden sırayla geçirilir.
 - %50'lik alkol,
 - %75'lik alkol,
 - %85'lik alkol,
 - %95'lik etil alkol içine 10 -12 kez daldırılıp çıkarılır. Hücrelerin almış olduğu hematoksilen tespit edilir.
- Lamlar iyice süzülerek orange- G boyasında 3 dakika bekletilir.
- Lamlar boyasından süzülerek orange G boyasından çıkarılır.
- Üç ayrı kaptaki %95'lik etil alkol içinde 10 -12 kez daldırılıp çıkarılır. Preparattaki fazla boya çıkarılarak orange G tespit edilir.
- İyice süzülen preparatlar EA-50 boyasında 3 dakika bekletilir. Smearlar 5 dakika bekletilir.
- Üç ayrı kaptaki %95'lik etil alkol içinde 10 -12 kez daldırılıp çıkarılır. Preparattaki fazla boya çıkarılarak EA-50 boyası tespit ve hücreler dehidre edilir.
- Lamlar üç ayrı ksilol kabından geçirilir. Hücreler saydamlaştırılır.
- Prepatların yayma/smear olmayan yüzü gazlı bezle silinir. Yayma üzerine 1-2 damla Kanada balzamu/entelland damlatılarak hava kabarcığı oluşturmadan lamelle kapatılır. Lamlar mapeye dizilir.
- **PAP boyasında dikkat edilmesi gereken hususlar**
 - PAP boyasında solüsyonlar en fazla 15 gün kullanılmalıdır. İş yüküne bağlı olarak bu süre daha da kısa olmalıdır.
 - Boya setindeki çözeltilerin kapakları devamlı kapalı olmalıdır.

- Hematoksilen boyası üzerinde oluşan artefakt, boyaya başlamadan önce süzgeç kâğıdı ile alınmalıdır.
- Hematoksilen boyasında oksidasyona bağlı çökelti oluşmuşsa boya süzüldükten sonra kullanılmalıdır.
- Boyalar üzerinde mantar üremelerine karşı dikkatli olunmalıdır. Boya seti kapları uygun dezenfektanlarla yıkanmalıdır.

5.3. May-Grünwald - Giemsa Boyası

Havada kurutulan kan yaymaları, kemik iliği yaymaları ve İİAS materyallerinden havada kurutulmuş fiske edilen yaymaların boyanmasında kullanılır.

5.3.1. May-Grünwald - Giemsa Boyama Tekniği

- Yaymalar, May –Grünwald boyasında 15 dakika bekletilir.
- Giemsa boyasında 30 dakika bekletilir.
- Akan suda yıkanır.
- Kurutulur.
- Yayma üzerine 1-2 damla Kanada balzamu/entelland damlatılarak lamlar kapatılır.
- Boyalı lamlar mapeye dizilerek laboratuvar istem raporlarıyla birlikte mikroskobik inceleme bölümüne verilir.



Resim 5.6: Yaymalara Kanada balzamu damlatma

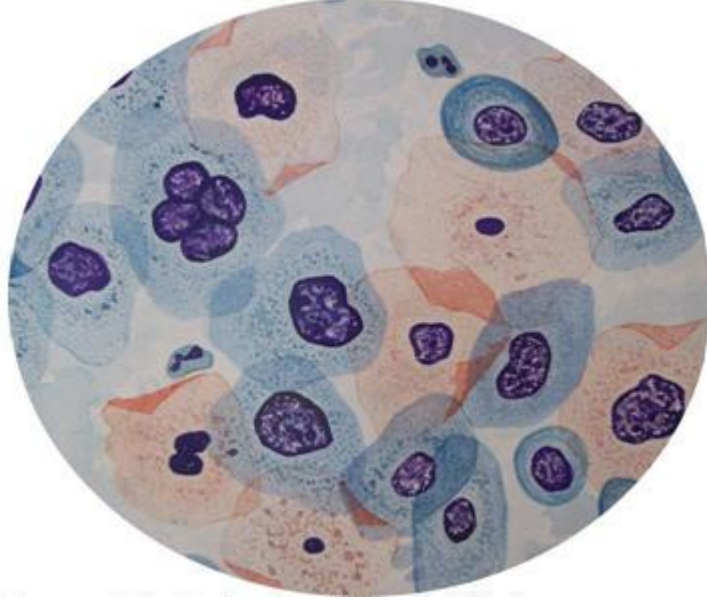


Resim 5.7: Mapeye dizilmiş lamaların mikroskopiye sunulması

5.4. Sitolojik Tanıda Etken Hücre Özellikleri

Sitolojik boyalarla boyanan yaymalar, uzman doktor (sitopatolog) tarafından mikroskopta incelenir. Mikroskobik incelemede;

- Hücre büyüklüğü,
- Hücre şekli,
- Nükleus kromatini, nükleolus ve sitoplazma özellikleri incelenir.



Şekil 5.8: Boyanmış hücrelerin mikroskobik görünümü

İntrasellüler ve ekstrasellüler sekretuar madde gibi özellikler değerlendirilerek tanı konur.

UYGULAMA FAALİYETİ

Sitolojik boyama yöntemlerinin tekniğine uygun sitolojik preparat boyayabilirsiniz.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Biyolojik ve kimyasal maddelere karşı biyogüvenlik önlemleri alınız.	➤ Kişisel koruyucu ekipmanları kullanınız.
➤ PAP boya setini hazırlayınız.	➤ Boya solüsyonlarını kontrol ediniz. ➤ Boyaların taze olduğundan emin olunuz.
➤ Preparatları, uygulanacak boya yöntemlerine göre ayrı lam taşıma sepetlerine yerleştiriniz.	➤ PAP boyasının alkolle tespit edilen yaymalara uygulandığını unutmayınız.
➤ Preparatları azalan konsantrasyonlu alkol serilerinden geçiriniz.	➤ Alkol solüsyonlarının özellikle son alkol solüsyonunun temiz olmasına dikkat ediniz.
➤ Dokuları hematoksilenle boyayınız.	➤ Tortulaşmış hemotoksilen boyasını süzdükten sonra kullanınız. ➤ Suyu iyi süzülmemiş lam sepetlerini boya solüsyonuna sokmayınız.
➤ Lamları asit alkolde 10 saniye çalkalayıp hızlıca çeşme suyuna sokarak diferansiyasyonu durdurunuz.	➤ Diferansiyasyonla hücrelerin almış olduğu fazla boyayı uzaklaştırınız, ➤ Lamları hızlıca çeşme suyuna sokarak diferansiyasyonu durdurunuz.
➤ Preparatları, artan konsantrasyonlu alkol serilerinde geçiriniz.	➤ Alkol solüsyonlarının özellikle son alkol solüsyonunun temiz olmasına dikkat ediniz.
➤ Preparatları orange-G boyasıyla boyayınız.	➤ Preparatları boya içinde 3 dakika bekletiniz.
➤ Orange-G boyasını tespit ediniz.	➤ Alkol solüsyonlarının özellikle son alkol solüsyonunun temiz olmasına dikkat ediniz.
➤ Preparatları AE-50 boyasıyla boyayınız.	➤ Preparatları boya içinde 3 dakika bekletiniz.
➤ AE-50 boyasını tespit ediniz.	➤ Alkol solüsyonlarının özellikle son alkol solüsyonunun temiz olmasına dikkat ediniz.
➤ Lamları ksilolda şeffaflştırınız.	
➤ Preparatları lamelle kapatınız/montajını yapınız.	➤ Preparat üzerine yeterli miktarda Kanada balzamu/entelland damlatınız. ➤ Hava kabarcığı oluşturmadan lameli kapatınız.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisinde, Papanicolaou boyama yönteminde boyama sırası doğru olarak verilmiştir?
A) Hematoksilen → Orange-G → AE-50
B) Orange-G → Hematoksilen → AE-50
C) AE-50 → Hematoksilen → Orange-G
D) Hematoksilen → AE-50 → Orange-G
E) Orange-G → AE-50 → Hematoksilen
2. Aşağıdaki boyalardan hangisi, sitolojide kullanılan rutin boya değildir?
A) Hematoksilen
B) Giemsa
C) Orange-G
D) Sulu fuksin
E) May- Grünwald
3. Aşağıdaki sitolojik boyama tekniklerinden hangisi, alkolle fiske edilen yaymaların boyanmasında kullanılır?
A) Giemsa
B) May- Grünwald
C) Hematoksilen
D) Orange-G
E) Papanicolaou
4. Aşağıdakilerden hangi boyama tekniği, öncelikle İİAS materyallerin boyanmasında kullanılır?
A) Papanicolaou
B) Orange-G
C) Hematoksilen
D) May- Grünwald-Giemsa
E) Hematoksilen -Eozin

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise “Modül Değerlendirme”ye geçiniz.

MODÜL DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisinde, sitopatolojik iş akışı doğru olarak verilmiştir?
A) Materyal kayıt kabul → Makroskopik inceleme → Sitolojik yayma hazırlama → Sitolojik boyama → Kapatma/montaj → Mikroskopik inceleme
B) Materyal kayıt kabul → Sitolojik yayma hazırlama → Makroskopik inceleme → Sitolojik boyama → Kapatma/montaj → Mikroskopik inceleme
C) Materyal kayıt kabul → Makroskopik inceleme → Sitolojik yayma hazırlama → Kapatma/montaj → Sitolojik boyama → Mikroskopik inceleme
D) Materyal kayıt kabul → Makroskopik inceleme → Sitolojik yayma hazırlama → Sitolojik boyama → Mikroskopik inceleme → Kapatma/montaj
E) Materyal kayıt kabul → Sitolojik boyama → Sitolojik yayma hazırlama → Makroskopik inceleme → Kapatma/montaj → Mikroskopik inceleme
2. Aşağıdakilerden hangisi, sitolojik yaymaların alkolle fiksasyonunda tercih edilen en ideal yöntemdir?
A) Spreyle fiksasyon
B) Hazırlanan preparatın 10 saniye içinde %95'lik alkolde fiksasyonu
C) Kolonya veya alkol oranı yüksek spreyle fiksasyon
D) Havada kurutulmuş lamaların hemen alkol içinde fiksasyonu
E) Preparat üzerine alkol damlatarak yapılan fiksasyon
3. Aşağıdakilerden hangisi, sitolojik inceleme vücut boşlukları sıvısı değildir?
A) Vajinal smear
B) Plevra sıvısı
C) Periton sıvısı
D) BOS
E) Eklem sıvısı
4. Aşağıdakilerden hangisi, sıvıların makroskopik özelliği değildir?
A) Renk
B) Kıvam
C) Bulanıklık
D) Berraklık
E) Sıvının türü
5. Aşağıdakilerden hangisinde, sitoklip yüklemesi doğru olarak sıralanmıştır?
A) Lam → filtre kartı → funnel
B) Filtre kartı → lam → funnel
C) Funnel → lam → filtre kartı
D) Filtre kartı → funnel → lam
E) Lam → funnel → filtre kartı

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki modüle geçmek için öğretmeninize başvurunuz.

CEVAP ANAHTARLARI

ÖĞRENME FAALİYETİ 1'İN CEVAP ANAHTARI

1	D
2	C
3	B
4	A

ÖĞRENME FAALİYETİ 2'NİN CEVAP ANAHTARI

1	E
2	C
3	B
4	A

ÖĞRENME FAALİYETİ 3'ÜN CEVAP ANAHTARI

1	E
2	C
3	A
4	E
5	D

ÖĞRENME FAALİYETİ 4'ÜN CEVAP ANAHTARI

1	D
2	E
3	A
4	B

ÖĞRENME FAALİYETİ 5'İN CEVAP ANAHTARI

1	A
2	D
3	E
4	D

MODÜL DEĞERLENDİRME CEVAP ANAHTARI

1	A
2	B
3	E
4	E
5	A

KAYNAKÇA

- AÇIKALIN Ergin, Cengiz BAYÇU, Firdevs GÜRER, Erineç ARAL, **Histoloji**, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No:894, Eskişehir, 1995.
- ADAM Bahattin, Muhlise ALVUR, Abdulkirim BEDİR, Sevgi ESKİOCAK, H. Kemal ERDEMLİ, **Laboratuvar Aletleri**, Nobel Yayın Dağıtım Ltd. Şti, Ankara, 2000.
- AKAY M. Turan, **Genel Histoloji Atlası**, Palme Yayıncılık, Ankara, 2004.
- AKAY M. Turan, **Genel Histoloji**, Yücel Ofset, Ankara, 1997.
- ARSLAN Nuğran, **Histoloji ve Histopatoloji**, Çare Tek Bilim Eğitim Ltd. Şti, Ankara, 2001.
- CANDA Şerafettin, Tülay CANDA, Dilek Basımevi, **Temel Patoloji I**, Sivas, 1988.
- DEMİR Ramazan, Selma YILMAZER, Melek ÖZTÜRK, İsmail ÜSTÜNEL, Necdet DEMİR, Emin Türkay KORGUN, Gökhan AKKOYUNLU, **Histolojik Boyama Teknikleri**, Palme Yayıncılık, Ankara, 2001.
- DOĞAN Öner, Rengin AHISKALI, Fulya ÇAKALAĞAOĞLU, Naziye ÖZKAN, Gülsün EKİCİOĞLU, Emine ŞALVA, Mükerrerem SAFALI, Özgür METE, **Türk Patoloji Derneği, Meslek İçi Eğitim Kursu 2004/3 Patolojide Temel Histolojik Laboratuvar Teknikleri**.
- KUMAR Vinay, Cotran, Ramzi S. Robbins, Stanley L, **Temel Patoloji**, Nobel Yüce İstanbul, 1994.
- TEL Nilüfer, Ülkü ÖNER, Özgül PAŞAOĞLU, **Patoloji**, T. C. Anadolu Üniversitesi Yayınları NO:495, Eskişehir, 1993.
- TULUNAY Özden, **Genel Patoloji**, Antıp A. Ş. Ankara, 1998.
- ÜZMEZ Önal Binnur, Kanserin Tanı ve Takibinde Sitopatolojinin Rolü ve İnce İğne Aspirasyon Ünitesinin Fonksiyonu, T.C. Sağlık Bakanlığı (Yayın No:616), Ankara, 2001.
- YENERMAN Münevver, **Genel Patoloji Cilt I, II**, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı, 1994.