

SİTOLOJİK NUMUNE HAZIRLANMASI, KULLANILAN BOYALAR, BOYAMA TEKNİKLERİ VE ARTEFAKTLAR

Sitoloji, lezyonları temsil edecek sayıda hücrenin lezyonlardan elde edilmesi, lam üzerine yayılması ve mikroskop altında incelenerek teşhis konmasıdır. Daha az invaziv bir yöntem olarak, anestezi veya analjezi gerektirmeksizin ekonomik ve hızlı sonuç sağlar. Mevcut çok sayıda çalışmada, sitolojinin güvenilir bir teknik olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Sitolojik yöntem ile kesin tanı yapıldığında histopatoloji ve mikrobiyolojik ekim gibi ek tanı yöntemlerine sıklıkla ihtiyaç duyulmaz. Bu da hastanın stresini azaltır, maliyeti düşürür ve hekimlerin hızlı şekilde tedaviye başlamasına olanak sağlar. Sitolojik inceleme histopatolojinin yerine geçmez ancak lezyon hakkında oldukça etkili ve faydalı bir değerlendirme sunar.

Sitolojinin hayvana en az müdahale ile güvenilir bir tanı aracı olarak veteriner hekimlikte kullanımı gitgide yaygınlaşmaktadır. Ultrasonografinin kullanımının yaygınlaşması ile vücut boşluklarındaki derin lezyonlardan da doğru bir şekilde örnekleme yapılabilmekte, böylece klinisyenlerin bu tanı metodunu kullanma sıklığı gitgide artmaktadır. Sitolojinin yanı sıra histopatolojik incelemeler tanı konulmasında birbirini tamamlayıcı teknikler olarak kullanılagelmektedir.

Yöntemin Avantajları

Veteriner patolojide histopatolojik inceleme altın standart olsa da sitolojik değerlendirmenin önemli avantajları vardır. Bunlar içerisinde invaziv olmaması, anestezi gerektirmemesi, düşük oranda komplikasyon şekillenmesi, hızlı sonuç alınabilmesi ve düşük maliyet sayılabilir. Hızlı sonuç alınabilmesi sayesinde hangi testlerin ve uygulamaların yapılacağına zamanında karar verilebilir (antimikrobiyal tedavi, kültür, eksizyon, vb.). Sitoloji temel bilgilere sahip bir klinisyen tarafından kolayca uygulanabilecek bir yöntemdir. Uygulama için çok gelişmiş aletlere ihtiyaç yoktur. Alınan örneklerin işlenmesi birkaç dakika içerisinde tamamlanabilir. Bu nedenlerle sitoloji, cerrahi biyopsi gibi değerli bir tanı aracı olarak düşünülebilir.

Yöntemin Zorlukları ve Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar

Sitolojinin bazı dezavantajları da mevcuttur. Bunlar içerisinde düşük hücresellik ve/veya yapım hataları nedeniyle yetersiz sonuç ile doku yapısının yokluğundan dolayı yanlış yorumlama durumları yer alır. Düşük hücresellik probleminin üstesinden gelmek için frotiler incelenip yetersiz oldukları düşünüldüğünde yeniden örnekleme yapılmalıdır. Birden fazla froti hazırlandığında tüm preparatların boyanıp incelenmesi gereklidir, nitekim çok sayıda preparattan sadece bir tanesi tanı koydurucu özellikte olabilir. Bütün preparatların aynı özellikte boyanmama

olasılığına karşı inceleme yaparken yalnızca bir alandaki hücelere göre değerdendirme yapılmamalı, bütün preparatlar incelenmeli ve tüm hücre tipleri çekirdek ve sitoplazmik özellikleri ile birlikte değerdendirilmelidir.

Sitolojik ve histopatolojik örneklerin toplanmasındaki bilgi ve tecrübe yetersizlikleri tanının doğruluğunu etkileyen önemli nedenlerden birisidir ve bu durum örneğin alındığı dokuya göre değışkenlik gösterir. Sitoloji tümörlerin tanısında genellikle yüksek doğruluk oranına sahipken, tümörlerle birlikte sekonder olarak seyreden yangısal reaksiyon ve örneklerdeki düşük hücresellik, lezyonların yanlış yorumlanmasına yol açabilir. Mezenkimal tümörlerde düşük hücresellik yaygın bir problemdir. Sert kıvamlı lezyonlardan elde edilen hücre sayısı genellikle düşük kalırken, damardan zengin lezyonlar bol miktarda periferel kanla kontamine olabilir ve bu tümörler için biyopsi gerekebilir. Hızlı büyüyen tümörler sıklıkla nekrotik merkeze veya heterojeniteye sahiptir. Lezyonun periferinin aspirasyonu ile merkezde bulunabilecek nekrozdan örnekleme yapmaktan kaçınılmış olur. Nekrotik bölgeden örnekleme yapılırsa, teşhis konulması da mümkün olmayacaktır. Bu nedenle mümkün olduğunca kitlenin farklı bölgelerinden çok sayıda örnekleme yapmak gerekir. Az sayıda hücre ile tanıya gidilebilmesi için sitopatoloji alanında oldukça tecrübeli olmak gerekir.

Sitoloji genellikle özel tanıdan ziyade genel sınıflandırmalara olanak tanır. Örneğin sitolojik inceleme sonucu mezenkimal tümör tanısı konulan bir olgu histolojik olarak nörofibrosarkom olarak daha net isimlendirilebilir. Sitolojik preparatlarda hiperplastik hücreler, adenom hücreleri ve yüksek derecede farklılaşmış malign hücreleri arasında küçük farklılıklar vardır. Bu nedenle doğru tanı için sitolojik tanının histopatolojik inceleme ile desteklenmesi gerekir.

Yüksek derecede farklılaşmış tümöral oluşumlar sitolojik incelemede normal dokudan veya iyi huylu oluşumlardan ayırt edilemeyebilir. Normal lenfoid dokular çok sayıda küçük lenfositlerden oluştuğu için, lenf yumrusu veya dalak aspiratlarında küçük hücreli lenfoma tanısının konulması genellikle mümkün değildir. Benzer olarak karaciğer aspiratlarında da küçük hücreli lenfoma ile lenfositik yangısal infiltrasyonları ayırt etmek çok zordur.

İyi bir sitolojik örnek hazırlamak deneyim ve sabır işidir. Bazen tanı koydurucu bir preparat elde etmek için bir düzine preparat hazırlamak gerekebilir. Eğer preparatta çok sayıda hücre varsa preparatın kalınlığından dolayı hücredeki sitoplazma ve çekirdek detaylarını değerdendirmek mümkün olmaz ve tanı konulamaz. Püskürtme şeklinde hazırlanan preparatlar eğer yayma yapılmazsa sıklıkla kalın olarak gözlenir. Formaldehit ile preparatların temas etmesi hücrelerde

istenmeyen etkiler oluşturur ve sitolojik tanı imkânsızlaşır. Önemli bir nokta da preparatların soğutucuya konulmamasıdır, çünkü soğutucuya konulduğunda suyun yoğunlaşması esnasında hücrelerde yıkımlanma şekillenir ve hücrelerin tanınması mümkün olmaz.

Klinik yönden karar verirken sitolojik örneğın yorumlanmasındaki en önemli nokta lezyonun tümöral olup olmadığının belirlenmesidir. Bazı olgularda iyi bir sitolojik preparat, biyopsiden daha faydalı olabilir. Bazı durumlarda da klinik bulgular ve lezyonun özellikleri patoloğa yorumlama sırasında yardımcı olur ve bazı vakalarda bu bilgiler histolojik inceleme eksikliğının yerini doldurabilir.

Sitolojik Preparatların Hazırlanması

Sitolojik örneğın hazırlama metodu örneğın kalitesini ve dolayısıyla tanının doğruluğunu etkiler. Sitolojik değerlendirme için hücre elde etme teknikleri daha önce tanımlanmıştır. Bu metodlar aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

1. İnce iğne biyopsi yöntemi
 - a. Aspirasyonlu
 - b. Aspirasyonsuz
2. Tuşetekniğı
3. Kazımatekniğı
4. Svab tekniğı

İnce İğne Biyopsi Yöntemi

İnce iğne biyopsisi standart iğne ve şırınga ile aspire edilerek veya aspirasyonsuz olarak uygulanabilir. Bu yöntemler hem yüzeysel, hem de derin dokulardan örnekleme için tercih edilmektedir.

İnce iğne biyopsisi ile hücreler alındıktan sonra lama aktarılırlar. Daha sonra sürme yöntemi ile hücrelerin tek katlı olarak yayılmaları sağlanır. Ardından preparatlar havada kurumaya bırakılmalıdır. Bu işlem hücreleri korur ve lama yapışmalarını sağlar. Kuruduktan sonra boyama işlemine geçilebilir veya örnekler tanı için bölgedeki bir laboratuvara gönderilebilir.

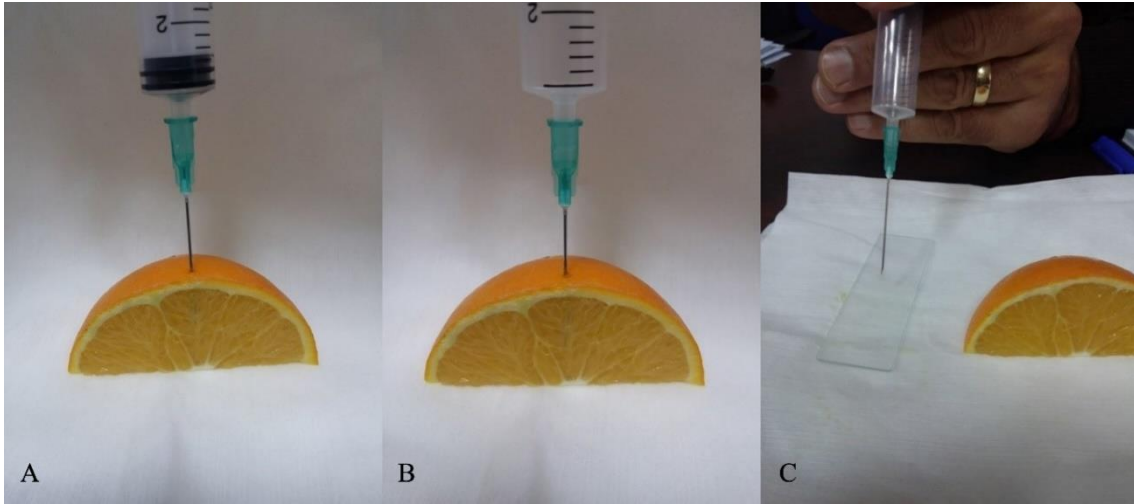
İnce iğne biyopsisi 0,4-0,6 mm çaplı iğne ve 3-20 ml şırınga ile yapılabilir. Yumuşak dokularda daha küçük iğne ve şırınga kullanılır. Kullanılan iğnelerin 0,6 mm'den büyük olması nedeniyle kan kontaminasyonu olasılığı artar ve hücre elde etme şansı azalır. Kullanılacak

şırınganın büyüklüğü aspire edilen dokunun kıvamına göre değişmektedir. Yumuşak dokularda, örneğin lenf yumrusunda sıklıkla 3 ml şırınga kullanılabilir. Daha sert dokularda, örneğin fibrom ve yassı hücreli karsinomlarda, daha büyük şırınga kullanılarak gerekli basıncın oluşturulması sağlanır. Yapısından emin olunamayan kitleler için 12 ml şırınga kullanımı iyi bir tercih olabilir.

Aspirasyonlu veya aspirasyonsuz ince iğne biyopsi teknikleri kitlelerde yüzeyin altındaki hücreleri elde etmek ve şekillenmiş olabilecek yüzeysel kontaminasyonlardan kaçınmak için daha uygundur. Deri üzerinde yer alan lezyonlarda bu yöntemin uygulanması, tuşe ve kazıma yöntemleri kullanıldığında meydana gelen kontaminasyonu önler, ancak kazıma yöntemine göre daha az hücre elde edilir.

İnce İğne Aspirasyon Tekniği

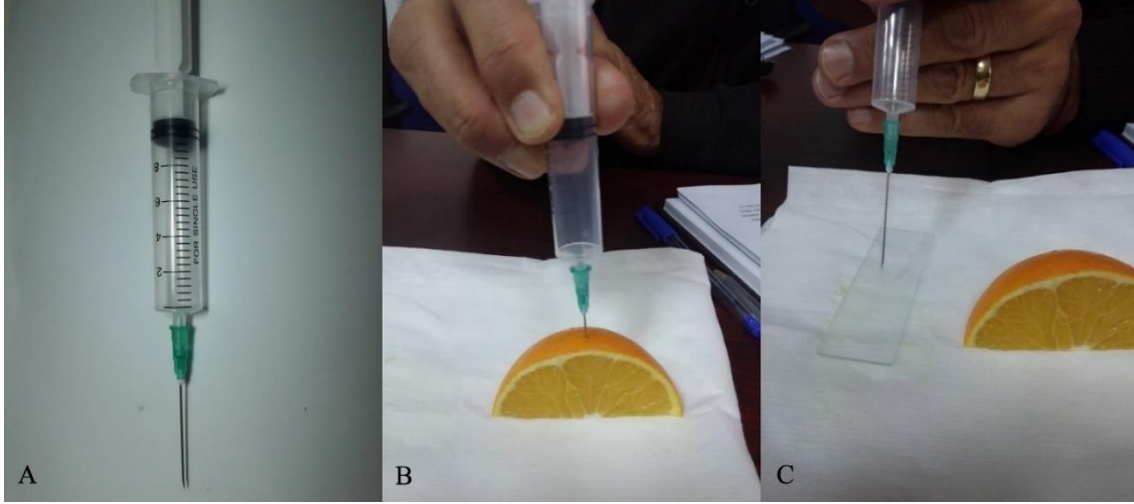
Bu yöntemde ucunda iğnesi olan enjektör ile kitleye girilir (Şekil 1A) ve piston geriye çekilerek tutulur (Şekil 1B), negatif basınç oluşturulur. İğnenin ucu dokuyu terketmeksizin, kitlenin farklı bölgelerine iğnenin girmesi sağlanarak örnekleme yapılır. Piston kendi haline bırakılarak dokudaki negatif basınç ortadan kaldırılır. İğne ve enjektör birbirinden ayrılmaksızın dokudan çıkarılır. Ardından iğne enjektörden ayrılır, enjektörün pistonu olabildiğince geri çekilerek hava ile doldurulur; iğne tekrar enjektörün ucuna takılarak iğne içerisinde kalan örnek lama püskürtülür (Şekil 1C). Bu teknikte uzun süreli aspirasyonlar damar hasarına ve kan kontaminasyonuna neden olabilir. Yetersiz örnekleme halinde işlem tekrarlanabilir.



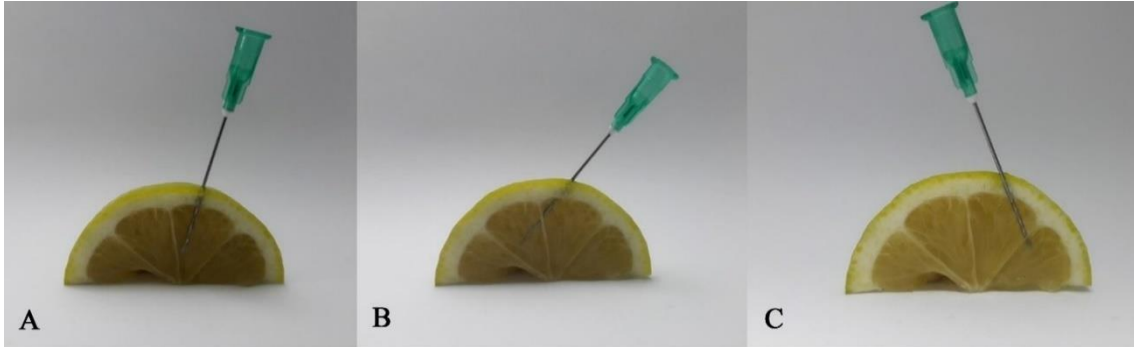
Şekil 1 *İnce iğne aspirasyon tekniği. A- İğne ile doku içerisine girilir. B- Piston geriye çekilerek hücreler aspire edilir. C- Aspire edilen hücreler lama püskürtülür.*

Aspirasyonsuz İnce İğne Biyopsi Tekniği

Bu yöntem damardan zengin kitlelerde daha güzel sonuç verir. Negatif basınç uygulanmaksızın kullanılan bir yöntemdir. İki şekilde yapılabilir; 1-incelenmek istenilen dokuya iğne ile girilmeden önce enjektöre hava çekilir (Şekil 2A), daha sonra örneklenecek doku içerisine girilerek örnekleme yapılır (Şekil 2B) ve ardından örnek hemen lama püskürtülebilir (Şekil 2C).



Şekil 2 Aspirasyonsuz ince iğne biyopsi tekniği. **A-** Piston geriye çekilerek negatif basınç oluşturulur. **B-** İğne ile doku içerisine girilir ve hücrelerin iğne içerisine girilmesi sağlanır. **C-** Elde edilen hücreler lama püskürtülür.

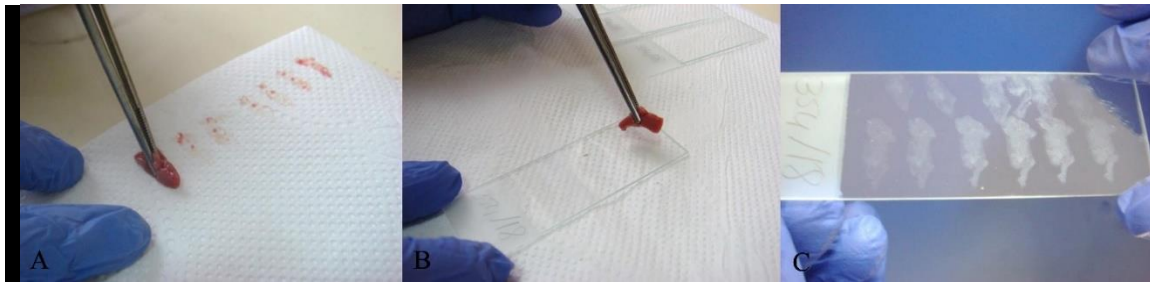


Şekil 3 İğnenin enjektörden bağımsız olarak kullanılması ile ince iğne biyopsi tekniği. **A-** İğne ile kitleye girilir. **B ve C-** İğne dokudan çıkarılmaksızın geriye çekilerek tekrar farklı yönlerde doku içerisine girilerek farklı bölgelerden hücreler toplanır.

İkinci tercih edilebilecek yol; iğne enjektörden bağımsız olarak kitle içerisine yerleştirilir (Şekil 3A) ve iğnenin farklı yönlerde hareketi ile (Şekil 3B ve 3C) örnekleme yapılır. İğne kitleden ayrılır ve önceden pistonu geri çekilen enjektöre takılarak yukarıdaki gibi (Şekil 2C) lama püskürtülebilir. İğne ileri, geri ve farklı yönlerde hareket ettirilirken iğne ucunun kitle ya da dokudan tamamiyle çıkmaması sağlanmalıdır.

Tuşe Tekniği

Hayvanın vücut yüzeyinde yer alan veya operasyon ya da nekropsi esnasında uzaklaştırılan dokulardan basma yöntemi ile preparat hazırlanabilir. Preparatlar canlı vücutundan uzaklaştırılmış örneklerden hazırlanıyorsa, kitleye kesit atılmalı ve taze doku yüzeyinden froti hazırlanmalıdır. Bu yöntemde hücre sayısı kazıma yöntemi ile elde edilenden daha az olmasına rağmen hücre morfolojisi genellikle daha iyi korunur. Aspiratlara oranla bakteriyel ve hücrel olarak daha fazla kontaminasyon vardır, çoğu olayda sekonder bakteriyel kontaminasyon ve yangısal reaksiyona ait hücreler görülür. Bu durum teşhisin doğruluğunu etkiler. Kontaminasyonu azaltmak ve daha temsili bir örnek elde edebilmek için taze yüzeylerden basma yapılmalıdır. Eğer yüzey çok kanlı veya ıslaksa yüzey önce kurutma kâğıdına bastırılarak fazla sıvı veya kanı uzaklaştırılmalı, ardından basma yapılmalıdır (Şekil 4A-4C). Baskı sırasında dokunun kaydırılması hücrelerde şekil bozukluklarına sebep olur. Bağ doku ne kadar fazlaysa elde edilen hücre sayısı o kadar az olacaktır.



Şekil 4 *Tuşe tekniğinin uygulanışı. A- Doku fazla kanın giderilmesi için kurutma kâğıdına bastırılır. B- Ardından doku kaydırılmaksızın hafifçe lama bastırılır. C- Bu baskı işlemi lam boyunca tekrarlanır.*

Kazıma Tekniği

Bu teknik vücut yüzeyindeki lezyonlara veya vücuttan uzaklaştırılmış kitlelere uygulanabilir. Çok daha fazla hücre elde edilmesini sağlar. Eğer lezyonun yüzeyi ülserleşmiş ve eksüdat ile kaplanmışsa, bu eksüdatın steril gazlı bezler kullanılarak uzaklaştırılması gereklidir. Bistüri ile kazıdıktan sonra lama yayma yapılır (Şekil 5).

Kazıma veya basma ile lezyonun yüzeyinden hücre elde edilirken, derin dokulardan hücre elde edilemez. Bununla beraber vücuttan uzaklaştırılmış kitlelerde kazıntı yöntemi basma tekniğine göre daha fazla hücre elde edilmesini sağlar. Dolayısıyla özellikle katı ve az hücre veren lezyonlar için bu yöntem kullanılabilir. Lama sürme aşamasında fazla bastırılması sonucunda hücrelerin parçalanması ve örneklemenin kalitesinin bozulma olasılığı yüksektir.



Şekil 5 *Kazıma tekniği*

Swab Tekniği

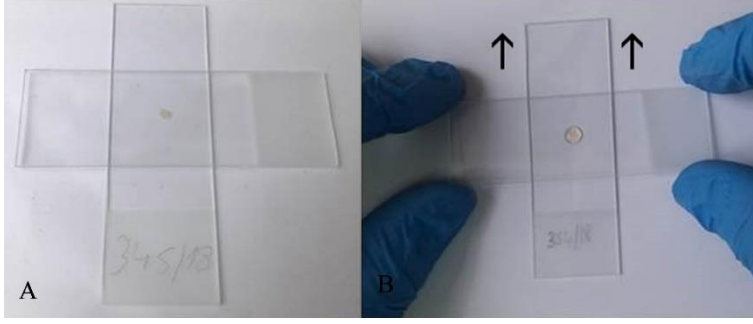
Genellikle konjunktiva, dış kulak yolu, burun, vajina ve fistüllü lezyonlar gibi basma, kazıntı ve aspirasyon yöntemlerine çok elverişli olmayan bölgelerden örnek hazırlanması için svab kullanılabilir (Şekil 6). Lezyona nemli, steril bir svab temas ettirildikten sonra bu çubuk lam üzerinde yuvarlanır. Çubuğun ıslatılması için steril, izotonik tuzlu su kullanılabilir. Bu yöntem yalnızca diğer teknikler uygulanamadığı durumlarda önerilmektedir.



Şekil 6 *Swab tekniği*

Alınan Örneklerin LamaAktarılması

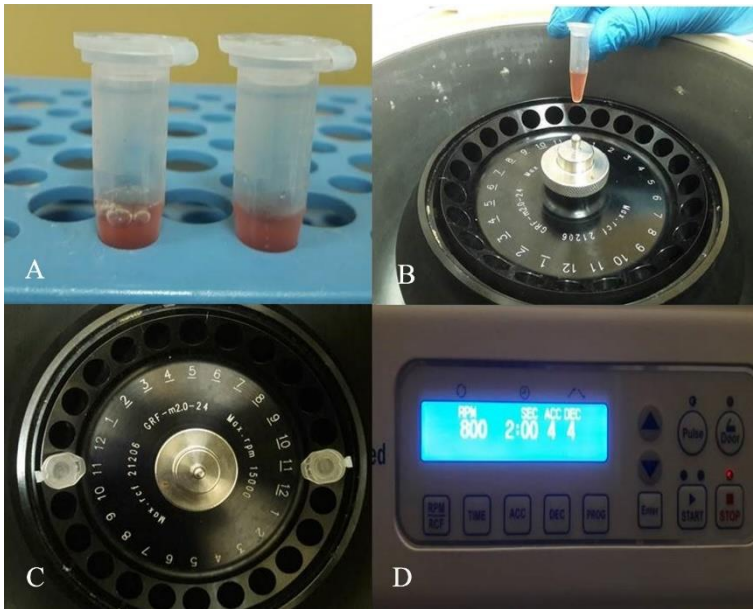
Bu amaçla iki lam arasında kaydırma yöntemi ve kan frotisi hazırlama yöntemi en kullanışlı tekniklerdir. İki lam arasında kaydırma yönteminde, örnek lama aktarıldıktan sonra, örnek üzerine diğer bir lam 90 derecelik açı ile konulur. Ardından fazla basınç uygulamaksızın üstteki lam alttaki lam boyunca ilerletilerek örneğin lama yayılması sağlanır (Şekil 7A-7D). Bu teknik kullanılırken lamın çok bastırılması sonucunda hücreler parçalanabilir.



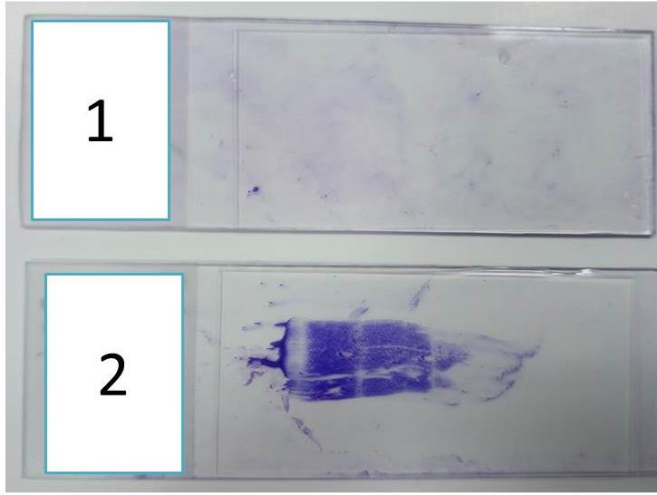
Şekil 7 İki lam arasında kaydırma yöntemi. **A-** Örneğin aktarıldığı lam üzerine diğer lamın 90 derecelik açı ile paralel olarak konulması. **B-** Üstteki lamın kaydırılarak örneğin yayılması.

Sıvı Örneklerde Sitoloji

Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren tüpler alınan örneklerde pıhtılaşmanın önlenmesi açısından tercih edilmelidir, fakat eğer mikrobiyolojik kültür yapılması düşünülüyorsa, EDTA mikroorganizmaların büyümesini baskılayabileceği için EDTA olmaksızın örnekleme önerilir. Alınan örnekler hücresel açıdan fakir ise santrifüj edilerek (Şekil 8A-8D) dipte kalan tortudan preparatlar hazırlanmalıdır. Böylece hücresel yoğunluğun daha fazla olduğu preparatlar hazırlanabilir (Şekil 9). Bu noktada dikkat edilmesi gereken santrifüjün yüksek devirlerde değil, kısa devirde uzun süreli olarak yapılmasıdır. Böylece hücrelerin parçalanması önlenir. Örnekler bekletilirse hücrelerde teşhisi güçleştirecek değişiklikler şekilleneceği unutulmamalıdır.



Şekil 8 Örneklerin santrifüjlenmesi. **A-** Örnekler iki adet tüpe konulur. **B ve C-** Tüpler cihaza karşılıklı olarak yerleştirilir. **D-** Düşük devirde ve uzun süreli santrifüj işlemi başlatılır.



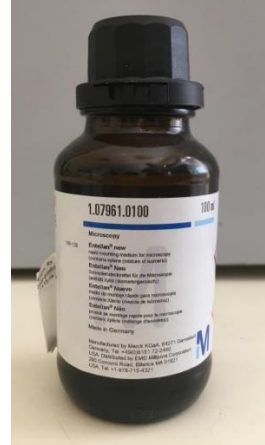
Şekil 9 Santrifüj öncesi (1) ve sonrası (2) hazırlanan sitolojik preparatlar.

Sitolojide Kullanılan Boyalar

1. Romanowsky tipi boyalar: Örnek olarak Wright boyası, Giemsa boyası, Wright- Giemsa boyası ve Diff-Quik gibi boyalar verilebilir. Preparatlar kurutulduktan sonra tespit edilir. Sitoplazma detayları güzel gözlenir. Çoğu patolog bu tip boyaları tercih eder (Şekil 10). *Bu kitapta kullanılan sitolojik resimler aksi belirtilmedikçe Merck Hemacolor® boyası ile boyanmıştır.*



Şekil 10 Merck Hemacolor® boyası.



Şekil 11 Merck Entellan® new.

2. Papanicolaou tipi boyalar: Örnek olarak Sano's trichrome verilebilir. Preparatlar ıslakken alkol tespiti gereklidir. Çekirdek detayları güzel gözlenir.

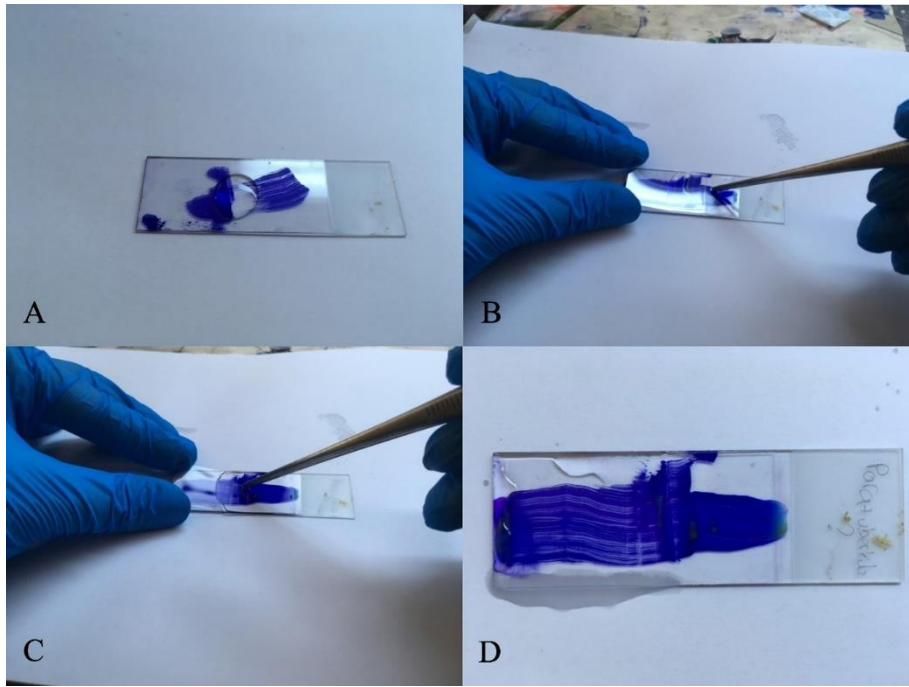
Boyanmış Preparatların Kapatılması

Sitolojik preparatların, histolojik preparatlarda olduğu gibi balsam ile kapatıldıktan sonra incelenmesi, sık rastlanan bir pratik olmasa da, pek çok yarar sağlamaktadır. Bu işlem, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında rutin olarak uygulanmaktadır.

Kapatmanın sağladığı yararlar:

1. İmmersiyon yağına gerek kalmadan hücre detaylarının 40'lık objektifle (high dry) incelenmesi objektifin ve preparatın immersiyon ile bulaşmasını engellediği için temizlik sağlamakta ve bu işlemleri yapmak için harcanacak zamanı da kazandırmaktadır. Daha da önemlisi çevre kirliliğine de sebep olan (özellikle su kirliliği) immersiyon yağının karsinojen olduğu bilinen ksilol ile temizlenmesine gerek kalmaz.
2. Preparatların bozulmadan arşivlenmesine imkân verir.
3. Hücreler çok daha net olarak gözlendiği için inceleme hevesini artırır ve tanı kolaylığı sağlar.

Laboratuvarımızda kullanılan balsam Şekil 11 ve balsam ile preparatların kapatılması Şekil 12A-12D'de gösterilmiştir.



Şekil 12 Entellan ile preparatların kapatılması. **A-** Bir cam bağıt vasıtasıyla balsam şişesinden alınan balsam lam üzerine damlatılır. **B ve C-** 45 derecelik bir açıyla lamel, pens yardımı ile balsama değdirilerek balsamın kapiller olarak yayılması sağlanır. **D-** Yavaş bir hareketle lamel, yayılmakta olan balsam üzerine kapatılır. Ufak ufak dokunuşlarla, bu işlem sırasında lam lamel arasında kalan hava kabarcıklarının çıkarılması sağlanır. Hemen bakılabildiği gibi, 15-20 dk kuruması sağlanarak, daha rahatlıkla incelenebilir.

Mikroskop ve İnceleme

Kapatılan ve belirli bir süre kuruması beklenen preparatlar incelenmeye hazır hale gelmiştir. İncelemede histolojik kesitlerin incelenmesinde olduğu gibi küçük büyütmeden başlayarak preparat taranır. Daha sonra 10'luk ve 40'luk objektifler ile incelemeye devam edilir. Üzeri lamel ile kapatılmış preparatların 40'luk objektif ile incelenmesi oldukça iyi olarak nitelenebilecek hücrel ayrıntıyı verebilir. Daha detaylı incelemeler için, örneğin sitoplazmik parazitlerin ortaya konması gibi, immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektif ile incelemeler yapılabilir. Lam, lamel ve mikroskobun temizlenmesi ile işlem bitirilir. Lamel ile üzeri kapatılmış lam arşivlenebilir ve tekrar tekrar gerekirse mikroskopta incelenebilir. Böyle bir inceleme için kullanılacak mikroskoplarda 4'lük, 10'luk, 40'luk ve 100'lük objektifler bulunmalıdır. Bu özellikleri taşıyan bir mikroskobun fiyatı, markaya, merceklerin özelliğine, eklentilerine göre 1000-10 000 TL arasında değişmektedir.

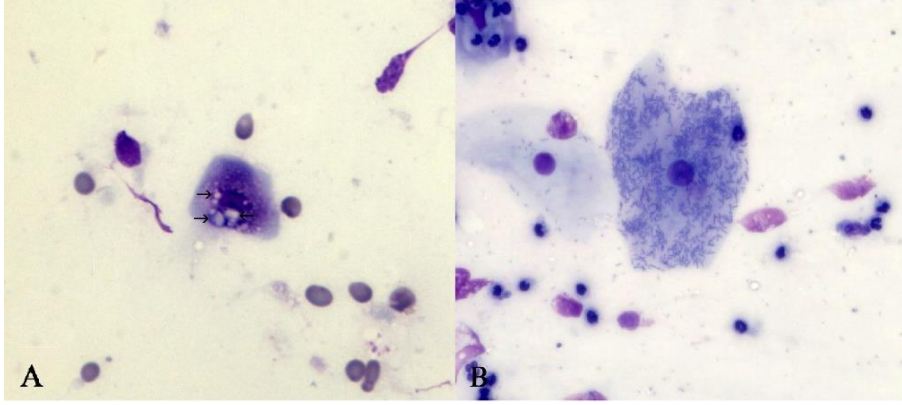
Sitolojide Karşılaşılan Bazı Artefaktlar

Artefaktlar bir doku işlenirken oluşan yapılar veya hücrel özelliklerdir ve tanıyı olumsuz etkileyebilirler. Bunlar normal dokuda bulunmazlar ve genellikle preparatlar hazırlanırken ya da patoloji laboratuvarlarındaki işlemler sırasında dış etkiler nedeniyle oluşurlar. Artefaktlar hücrelerin görünümünü değiştirerek yanlış yorumlamalara neden olabilirler, diğer bilinen dokuları taklit edebilirler, tanımlanamayan yapılarından dolayı kafa karışıklığı oluşturabilirler ve/veya mikroskobik bulguları maskeleyebilirler.

Sitolojik preparatların hatalı hazırlanması, yapılacak işlemlerde gecikme veya kontaminasyon, yanlış yorumlamalara, hatalı tanımlara ve yanlış pozitif/negatif sonuçlara yol açabilir. Örneği toplama tekniği ne olursa olsun, örnekler alındıktan sonra havada kurutmayı takiben çok beklemeden tespit edilmelidir.

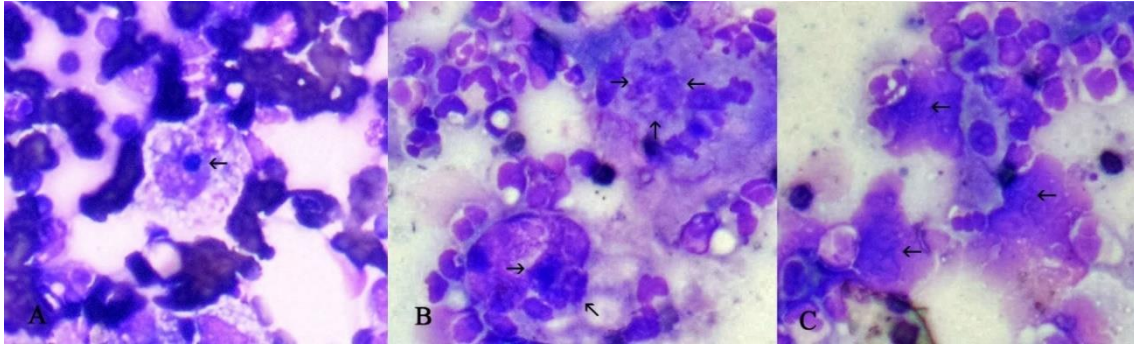
Fiksasyonun gecikmesi ile ilgili problemler hücrede kromatin kaybı, solgunluk veya çekirdeğin tamamen kaybına yol açabilir. Hücrelerde büzüşme, sitoplazmada bozulma ve artefakt boşlukları oluşabilir. Yapılan bir çalışmada oda sıcaklığında fiksasyonun birkaç saat gecikmesi hücrelerde kısmi ve tam dejenerasyon ile sonuçlanmış, gözlenen ilk bulgular sitoplazmik vakuolizasyon ve parçalı boyanma şeklinde olmuştur (Şekil 13A). Dördüncü günde mikronükleus ile bakteriyel kolonilerin periferden merkeze doğru invaze olduğu (Şekil 13B), bir hafta sonra piknoz, karyoreksis ve karyolizis şekillendiği gözlenmiştir (Şekil 14A-14C). Ondört günlük süre sonunda çekirdek vakuelleri ile yoğun eozinofilik sitoplazmanın görüldüğü ve bunu hücrel yapının kaybının takip ettiği görülmüştür. Bir ay sonunda ise hücrelerin hayali görünümleri geride

kalmıştır. Beş saatlik fikzasyon gecikmesi ile birlikte yüksek ve düşük sıcaklık değişiklikleri hücrelerde büzüşmeye, sitoplazmik vakuollere, kromatin yoğunlaşmasına ve hücrelerde buruşma ile nükleer vakuollerin görünmesine neden olmuştur.



Şekil 13 A- Sitoplazmik vakuolizasyonlar (oklar) B- Bakteriyel invazyon.

Bu bulgulardan dolayı hücresel değişikliklerin minimize edilmesi için fikzasyonun hemen yapılması önemlidir. Bilindiği gibi fikzasyonun hemen yapılması otolitik enzimlerin hücreyi dejenerasyona uğratmasını engeller ve hücreleri mümkün oldukça yaşarken ki hallerinde tutar.

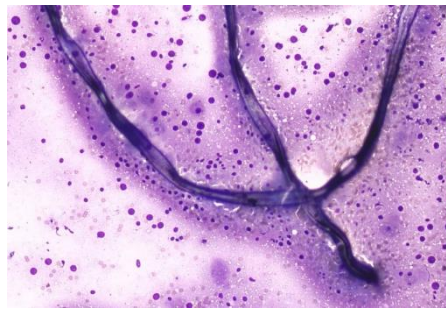


Şekil 14 A- Piknoz (ok); B- Karyoreksis (oklar); C- Karyolizis (oklar)

Dış kaynaklı artefaktların çoğunluğu sitolojik preparat hazırlama sırasındaki yaygın kontaminantlardır. Hayvan kılı (Şekil 15), pamuk fibrilleri (Şekil 16) ve insan saç gibi cisimler yanlışlıkla fungal hifa, filamentöz veya ip benzeri patojenler ile karıştırılabilir.

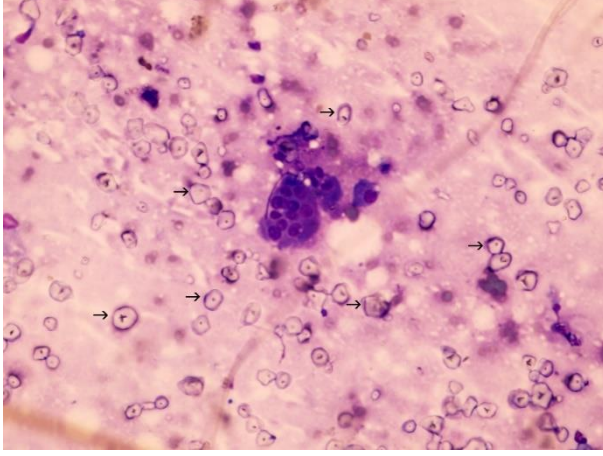


Şekil 15 Kıl artefaktı



Şekil 16 Pamuk fibrili

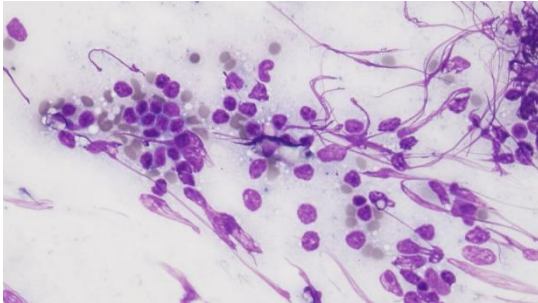
Sitolojik preparatlar hazırlanırken fazla basınç uygulanması sonucunda hücrelerde yıkımlanmaya veya sitolojik değişikliklere yol açabilir. Bu hücreler nekrotik olarak değerlendirilebilirler. Eldiven pudrası sitolojik smearlarda epitel hücrelerine benzeyebilir ve genellikle 5-20 mikrometre çaplı, ışığı kıran, camsı, poligonal/oval/armut şekilli cisimcikler olarak görülürler (Şekil 17).



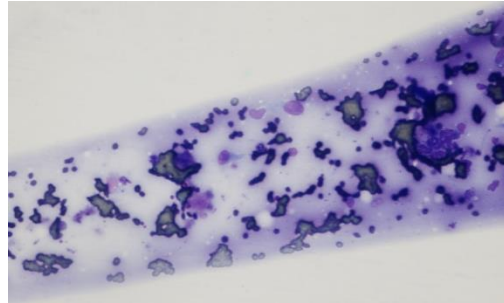
Şekil 17 Oval şekilli, camsı görünümde eldiven pudrası (oklar)

Fazla basınç uygulanarak hazırlanan preparatlarda sık karşılaşılan artefaktlardan biriside hücre çekirdeği zarının yırtılması ile genetik materyalin iplik gibi görünecek şekilde serbest halde bulunmasıdır (Şekil 18).

Sitolojik örnekleme sırasında kullanılan ultrason jeli de sitolojik preparatlarda bir artefakt olarak önemli sorun teşkil eder. Jel kontaminasyonunun temel problemi, fazla kontaminasyonun yetersiz bir örnekte hücre lizisine yol açması iken, az kontaminasyon şekillendiği durumlarda hücrelerde şişkinlikler gibi daha hafif değişiklikler şekillenir (Şekil 19). Bu nedenle sitolojik örneklemeler yapılırken jel kontaminasyonuna karşı dikkatli olunmalıdır.



Şekil 18 Uzun DNA fragmentleri



Şekil 19 Ultrason jelinin sitolojideki görünümü

Kaynaklar

- AHMED, H.G. and TOM, M.A. (2011) The Consequence of Delayed Fixation on Subsequent Preservation of Urine Cells. *Oman Medical Journal***26**, 14–18.
- BAKER, R. and LUMSDEN, J. (2000) Cytopathology techniques and interpretation. In Color atlas of cytology of the dog and cat. Eds R. Baker and J. Lumsden. Mosby. pp 7–70.
- BANIN, E., BRADY, K.M. and GREENBERG, E.P. (2006) Chelator-Induced Dispersal and Killing of *Pseudomonas aeruginosa* Cells in a Biofilm. *Applied and Environmental Microbiology***72**, 2064–2069.
- CARSON, F. and HALADIK, C. (2009) Histotechnology: A self-instructional text. 3rd ed. American Society for Clinical Pathology Press.
- CHALITA, M.C., MATERA, J.M., ALVES, M.T. and LONGATTO FILHO, A. (2001) Nonaspiration fine needle cytology and its histologic correlation in canine skin and soft tissue tumors. *Analytical and quantitative cytology and histology***23**, 395–9.
- COWELL, R., TYLER, R., MEINKOTH, J. and DENICOLA, D. (2008) Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat. 3rd ed. Mosby Elsevier.
- GHAJ, C. (2003) A textbook of practical physiology. 5th ed. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.
- GHISLENI, G., ROCCABIANCA, P., CERUTI, R., STEFANELLO, D., BERTAZZOLO, W., BONFANTI, U. and CANIATTI, M. (2006) Correlation between fine-needle aspiration cytology and histopathology in the evaluation of cutaneous and subcutaneous masses from dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology***35**, 24–30.
- HAJDU, S.I. and MELAMED, M.R. (2018) Limitations of aspiration cytology in the diagnosis of primary neoplasms. *Acta cytologica***28**, 337–45.
- İpek, V. Köpeklerde Deri ve Deri Altı Yerleşimli Kitlelerin Teşhisinde Sitolojik ve Histopatolojik Bulguların Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Patoloji Anabilim Dalı, Bursa, 2016.
- VAN HOEVEN, K.H. and BERTOLINI, P.K. (1996) Prevalence, Identification and Significance of Fiber Contaminants in Cervical Smears. *Acta Cytologica***40**, 489–495.
- JADHAV, K.B., GUPTA, N. and AHMED, M.B. (2010) Maltese cross: Starch artifact in oral cytology, divulged through polarized microscopy. *Journal of cytology***27**, 40–1.
- MACNEILL, A.L. (2011) Cytology of Canine and Feline Cutaneous and Subcutaneous Lesions and Lymph Nodes. *Topics in Companion Animal Medicine***26**, 62–76.
- MCINNES, E. (2005) Artefacts in histopathology. *Comparative Clinical Pathology***13**, 100–108.
- MÉNARD, M., FONTAINE, M. and MORIN, M. (1986) Fine needle aspiration biopsy of malignant tumors in dogs and cats: a report of 102 cases. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne***27**, 504–10.
- MOLYNEUX, A.J. and COGHILL, S.B. (1994) Cell Lysis Due to Ultrasound Gel In Fine Needle Aspirates; an Important New Artefact In Cytology. *Cytopathology* **5**, 41–45.

- SAHAY, K., MEHENDIRATTA, M., REHANI, S., KUMRA, M., SHARMA, R. and KARDAM, P. (2013) Cytological artifacts masquerading interpretation. *Journal of Cytology***30**, 241.
- SHARKEY, L.C., DIAL, S.M. and MATZ, M.E. (2007) Maximizing the Diagnostic Value of Cytology in Small Animal Practice. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice***37**, 351–372.
- SHELLY, S. (2003) Cutaneous lesions. *The Veterinary clinics of North America***33**, 1–46.
- TYLER, R., COWELL, R., BALDWIN, C. and MORTON, R. (1999) Introduction. In Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat. Eds R. Cowell, R. Tyler and J. Meinkoth. 2nd ed. Mosby. pp 1–19.