

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ



TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**GENETİK HASTALIKLAR DEĞERLENDİRME MERKEZİ
SİTOGENETİK LABORATUVARI REHBERİ**

HAZIRLAYANLAR
Prof. Dr. M.Selman YILDIRIM
Prof. Dr. Ayşe Gül ZAMANI

DOKÜMAN KODU: DL.RH.04	YAYIN TARİHİ: 05.02.2023	REVİZYON : 01	REVİZYON TARİHİ: 01.01.2024
------------------------	--------------------------	---------------	-----------------------------

A.SİTOGENETİK LABORATUVARI

Üniversitemiz Sitogenetik birimimiz, kromozomlarla ilişkili yapısal ve/veya sayısal düzensizliklerin neden olduğu hastalıkları bulunan hasta ve ailelerine doğum sonrası (postnatal) ya da bu tip hastalıklar açısından riskli gebeliklerde doğum öncesi (prenatal) dönemde tanı konulabilmesi için gerekli laboratuvar hizmetleri sunmaktadır. Ayrıca Moleküler Sitogenetik Laboratuvarı'nda rutin uygulamalara göre daha kısa sürede çok daha fazla hücreyi analiz etmeye, kanser genetiği ve prenatal tanıda daha hassas ve hızlı şekilde hizmet vermeye olanak sağlayan FISH yöntemi de kullanılmaktadır.

Sitogenetik hizmetleri anabilim dalı bünyesinde bulunan sitogenetik ve moleküler sitogenetik laboratuvarlarında yürütülmektedir. Sitogenetik birimimizde yapılması istenen tüm sitogenetik tetkikler için hekim tarafından endikasyon konması gerekmektedir. Aile veya hastaların bireysel başvuru yapmaları durumunda, öncelikle klinik genetik polikliniklerimizde hekimlerimiz tarafından endikasyon uygunluğu açısından değerlendirmeler yapılmaktadır.

Sitogenetik analizlerde kullanılacak örnek çeşitleri, analizlerde kullanılacak teknikler ve testlerden çıkacak potansiyel sonuçlarla ilgili bilgiler yanı sıra hasta ve ailelerinin danışmak istediği tıbbi konular hekimlerimiz tarafından açıklanmaktadır.

Misyonumuz; laboratuvarımızda uluslararası kalite standartlarına ve etik kurallara uygun olarak, bilimsel veriler ışığında, güvenilir, kaliteli, verimli bir hizmet sunmaktır.

Vizyonumuz; güven, saygınlık konusunda lider, referans ve ulusal standartlara uygun bir laboratuvar olmaktır.

Sitogenetik testler saat 08:00'de çalışılmaya başlanır. Laboratuvarımızda her tekniker her işi yapabilecek şekilde eğitilmiştir. Çalışmalar uluslar arası yöntemlere uygun şekilde çalışılır.

B. SİTOGENETİK LABORATUVARI'NDA KALİTE KONTROL ÇALIŞMALARI:

1. İÇ (INTERNAL) KALİTE KONTROL:

İç kalite; sonuçları önceden bilinen normal ve patolojik olan hastaların örnekleri alınarak yeniden çalışılır. Elde edilen preparatlar incelenerek yeniden analiz edilir. Eski sonuçlarla karşılaştırılır.

2. DIŞ (EKSTERNAL) KALİTE KONTROL:

Sonuçları önceden bilinen normal ve patolojik olan hastaların örnekleri alınarak çalışılır. Elde edilen preparatlar laboratuvarında analiz edilir ve çıkan sonuçlar karşılaştırılır.

C. SİTOGENETİK LABORATUVARI'NDA ÇALIŞILAN TESTLERİN İSTENMESİ:

Hastanemiz ilgili polikliniklerinin doktorları tarafından HBYS'ye(Hastane Bilgi yönetim Sistemi)girilerek tetkik adı veya tetkik kodu ile istem yapılır. Testlerin tam ve zamanında çıkması için test girişleri tam eksiksiz yapmalıdır. Test girişleri onaylandıktan sonra test eklenmemelidir.

D.SİTOGENETİK LABORATUVARDA ÇALIŞILAN TESTLERE AİT ÖRNEKLERİN ALINMASI:

1. GELEN ÖRNEKLERİN ALINMASI:

Hastane içi polikliniklerden ve kliniklerden gelen (Kemik iliği, periferik kan ve amniyon mayii) örneklerinde sitogenetik ve moleküler sitogenetik testler çalışılır.

1.1. ACİL SERVİS VE YATAKLI BİRİMLERDE KAN

ÖRNEKLERİNİN ALINMASI:

Yataklı birimlerde ve Acil Serviste kimlik doğrulaması yapıldıktan sonra kan alma işlemi gerçekleştirilir. Hekim test taleplerini otomasyon sisteminde yapar. Klinik hemşiresi sistemde talepleri görür. Testlerin barkotlarını basar, tüplere yapıştırır. Barkotlarda hastanın kimlik tanımlayıcılarıyla birlikte, testin adı, testin hangi servisten istendiği, örneğin alınış tarihi ve saati yer alır. Böylece numune alım tarihi ve saati HBYS(Hastane Bilgi yönetim Sisteminden) ve buna entegre çalışan Laboratuvar İşletim Sistemi'ne (LİS) kaydedilmiş olur.

1.2. POLİKLİNİKLERDEN KAN ALMA ÜNİTESİNE GELEN HASTALARDAN KAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI:

Kan Alma Ünitesine gelen hastayı, ünite sekreteri karşılar. Ünite sekreteri hastaya ait kimlik doğrulaması yapar. Hastanın test istemlerini otomasyon sisteminde görülür, testlere ait barkotları basar. Barkotlarda hastanın kimlik tanımlayıcılarıyla birlikte, testin adı, testin hangi poliklinikten istendiği, örneğin alınış tarih ve saati yer alır. Böylece örneğin alım tarihi ve saati HBYS (Hastane Bilgi yönetim Sisteminden) ve Laboratuvar İşletim Sistemi'ne (LİS) kaydedilmiş olur. Sekreter, barkotları ilgili kan tüplerine yapıştırdıktan sonra, tüplerle birlikte hastayı kan alma hemşiresine yönlendirir.

1.3. KAN ÖRNEKLERİ ALIM KURALLARI:

- 1.3.1. Hasta en az 15 dakika kadar rahat bir pozisyonda olmalıdır. Kol omuz hizasında düz durmalıdır.
- 1.3.2. Fistül, damar grefti uygulanmış ya da mastektomili meme tarafındaki kol, ödemli ve skarlı bölgeler, hematoma, kan transfüzyonu ile IV sıvı tedavisi uygulanan kolda üst seviyeler, zorunlu kalınmadıkça venöz kan alımı için uygun değildir.
- 1.3.3. Hematom oluşabileceğinden hastanın kolu kesinlikle bükülmemelidir.
- 1.3.4. Hem geniş hem de yüze yakın damar seçilmelidir.
- 1.3.5. Hastaya IV infüzyon yapılıyorsa infüzyona 5 dakika ara verildikten sonra veya mümkünse diğer koldan kan alınmalıdır.
- 1.3.6. Turnike, kan alınacak damardan yaklaşık 10 cm. yukarı bağlanır. Turnike en fazla bir dakika uygulanmalıdır ve iğne damara girdikten sonra hemen gevşetilmelidir.
- 1.3.7. Kan, enjektör ile alınmış ise, hemoliz olmaması için iğne çıkarıldıktan sonra yavaşça ve tüp kenarından kaydırarak tüpe boşaltılmalıdır.
- 1.3.8. Damara girilmeden önce yumruk açılıp kapatılmamalıdır; bu hareket, plazma potasyum, fosfat ve laktat konsantrasyonlarını artırır.
- 1.3.9. Önce katkı maddesiz, sonra katkı maddeli tüplere kan alınmalıdır.

1.4. KAN ÖRNEKLERİ VERİLMEDEN ÖNCE DİKKAT EDİLMESİ GEREKEN KONULAR:

- 1.4.1. Laboratuvar testleri için sabah kan verilmelidir
- 1.4.2. Hastaneye gelmeden önce ağır ve zorlayıcı egzersiz yapılmamalıdır, kan vermeden önce, yarım saat kadar dinlenilmesi önerilir.
- 1.4.3. Düzenli olarak kullanılan ilaçlar varsa, kan vermeden önce doktora danışılması gerekmektedir.

1.5. AMNİYON SIVISI ALIM KURALLARI:

- 1.5.1. İşlemden önce hamile kadın ultrason masasında sırtüstü uzanır.
- 1.5.2. İğnenin girileceği alan antiseptik solüsyonlar ile temizlendikten sonra karın steril örtü ile örtülür.
- 1.5.3. Bir doktor ultrason ile işlemi gerçekleştirecek olan doktora rehberlik eder. İşlem tek kişi ile yapılacak ise özel tasarlanmış ultrason guide'ları kullanılmalıdır.

- 1.5.4. İşlemi yapacak olan kişi ultrason görüntüsü altında iğneyi karın üzerinden yerleştirir ve önce karın katlarını daha sonra rahim kasını geçerek amniyon kesesine girer.
- 1.5.5.İğnenin ucunu ultrasonda gördükten sonra arkasına bir enjektör takarak yaklaşık 20 mililitre sıvı alır. Bu aşamada bebeğin tüm amniyon sıvısının miktarı yaklaşık 200-300 mililitredir.
- 1.5.6.Alınan sıvının kanlı olmaması gerekir. Yeterli miktarda sıvı alındıktan sonra iğne tek bir hamlede çıkarılır ve işlem tamamlanmış olur.

1.6.KEMİK İLİĞİ ALIM KURALLARI:

- 1.6.1.İşleme başlamadan önce hasta uygun konuma getirilir.
- 1.6.2.Biyopsi yaparken oldukça sağlam ve iç içe geçmiş metal bir iğne kullanılır.
- 1.6.3.İşlemin yapılacağı alandaki kıllar tıraş edildikten sonra bu bölge dezenfektan madde ile temizlenir.
- 1.6.4.Bunun ardından, bölge deri ve derialtına verilen yerel anestezikler ile uyuşturulur.
- 1.6.5.Anestezik maddenin etkisini göstermesi için birkaç dakika beklendikten sonra iğnenin gireceği alandaki deri biraz kesilir.
- 1.6.6.İğne deriden, derialtından, kemik zarından ve kemiğin dış bölümünden geçirildikten sonra hafif bir döndürme hareketiyle kemik iliğine sokulur. İğnenin kemik iliğine girdiği, zorlamanın aniden ortadan kalkması ile anlaşılır. İğnenin dışındaki halka bir düzeyden sonra iğnenin daha ileri gitmesine engel olur.
- 1.6.7.İğnenin içindeki kılavuz iğne çekilir; kemiğin içinde kalan iğnenin ucuna 10-20 ml kapasitesinde bir enjektör yerleştirilerek yeterli miktarda kemik iliği çekilir.
- 1.6.8.İlik çekildikten sonra iğne hemen çıkarılır. Bu sırada oluşabilecek kanamaları engellemek için bölgeye kısa bir süre basınç uygulanır.

E . SİTOGENETİK LABORATUVARI'NDAKİ TESTLERE AİT ÖRNEKLER

1.HEPARİNLE YIKANMIŞ 5 cc'lik ENJEKTÖR

Periferik kan ve kemik iliği örneklerinin alınmasında kullanılır.Steril ortamda laminar flow içerisinde hazırlanır.



2. HEPARİNLİ TÜP

Alınan periferik kan ve kemik iliği örneklerinin transportunda kullanılır.



3. STERİL 20cc'lik ENJEKTÖR

Amniyon örneklerinin alınmasında ve transportunda kullanılır.

F.SİTOGENETİK LABORATUVARINA ÖRNEKLERİN TRANSFERİ VE AYRIŞTIRILMASI:

1. Laboratuvar İşletim Sistemi'ne (LİS) test girişleri yapılırken testlerin aynı zamanda HBYS (Hastane Bilgi yönetim Sisteminden)test girişleri ve kayıtları yapılmış olması gereklidir.
2. Örneklerin üzerinde mutlaka barkot olmasına dikkat edilmelidir.
3. Poliklinik, Acil Servis ve yataklı birimlerden alınan tüm kan örnekleri testlere göre Genetik AD, Sitogenetik laboratuvarına bekletilmeden gönderilir.
4. Laboratuvara ulaşan örnekler ilgili laboratuvar teknisyenlerince düzenli olarak toplanır ve testlere göre gruplanır.
5. Testlere göre gruplanmış örnekler, numune kabul kriterleri'ne göre uygunluğu kontrol edilir, kabul-ret kriterleri doğrultusunda barkot okuyucudan geçirilerek girişi yapılır.

G. SİTOGENETİK LABORATUVARI ÖRNEK KABUL KRİTERLERİ:

1. Örnekler analize uygun tüp ya da enjektöre alınmış olmalıdır.
2. Periferik kan ve kemik iliği örnekleri pıhtılı olmamalıdır. Amniyon sıvısı örneği ise kanlı olmamalıdır.
3. Örnekler yeterli miktarda alınmış olmalıdır.
4. Hastane bilgisayar sistemine girilen ve barkot etiketi kesilen örnekler kabul edilir. Barkot kesimi ile numune kabulü arasındaki süre 30 dakikayı geçmemelidir.
5. Acil testler için de, örnekler hastadan alındıktan ve barkot etiketleri kesildikten sonra, en geç 30 dakika içinde gönderilmiş olmalıdır.
6. Barkot etiketleri silik ve yırtık olmamalı, barkot etiketi tüpün etiketi üzerine denk gelecek şekilde düzgün yapıştırılmış olmalıdır.

H. SİTOGENETİK LABORATUVARI ÖRNEK RET KRİTERLERİ:

1. Analize uygun olmayan tüp veya kaplara alınmış olan örnekler ret edilir.
2. Pıhtılı kan ve kanlı amniyon sıvısı örnekleri ret edilir.
3. Yetersiz miktarda alınan örnekler ret edilir.
4. Hastane bilgisayar sistemine girilmeyen ve barkot etiketi kesilmeyen örnekler ret edilir.
5. Acil testler için, hastadan alındıktan ve barkot etiketleri kesildikten sonra, en geç 30 dakika içerisinde gönderilmemiş örnekler ret edilir.
6. Barkot etiketleri silik ve yırtık örnekler, barkot etiketi tüpün etiketi üzerine düzgün şekilde yapıştırılmamış olan örnekler ret edilir.
7. Dondurulmuş örnekler ret edilir.

I. SİTOGENETİK LABORATUVARI SONUÇLARINA ERİŞİM VE SONUÇ TESLİM SÜRESİ:

Test sonuçları doğrudan hastaya veya birinci dereceden yakınlarına verilmektedir, güvenlik amacıyla sisteme verilmemektedir.

Kromozom analiz sonuçları 2-3 hafta içinde verilir. Araştırılma yapılması gereken durumlarda süre uzayabilir.

FISH analiz sonuçları 2-3 gün içerisinde verilir. Araştırılma yapılması gereken durumlarda süre uzayabilir.

İ. SİTOGENETİK LABORATUVARI PERSONELİNİN EĞİTİMİ

Personel eğitimi için her hafta bir adet olmak üzere ayda dört adet seminer yapılmaktadır.

J. SİTOGENETİK LABORATUVARINDA YAPILAN TESTLER ve UYGULAMA PROSEDÜRLERİ

Sitogenetik laboratuvarında yapılan analizler; prenatal çalışmalar, postnatal çalışmalar ve moleküler sitogenetik çalışmalar olmak üzere üç ana başlık altında toplanmaktadır.

1.Prenatal Çalışmalar

- 1.1.Amniyon sıvısından kromozom analizi
- 1.2.Abort materyalinden kromozom analizi
- 1.3.Kordon kanından kromozom analizi
- 1.4.Koryonik villustan kromozom analizi

2.Postnatal Çalışmalar

- 2.1.Periferik kandan kromozom analizi
- 2.2.Periferik kandan HRB tekniği ile kromozom analizi
- 2.3.Kemik iliğinden kromozom analizi
- 2.4.NOR Bantlama
- 2.5.C Bantlama

3. Moleküler Sitogenetik Çalışmalar

- 3.1.Prenatal tanı için FISH analizi
- 3.2.Kemik iliğinden FISH analizi
- 3.3.Periferik kandan FISH analizi

Analizlerde Kullanılan Numuneler:

- 1) Postnatal çalışmalarda periferik kan ve kemik iliği örnekleri
- 2) Prenatal çalışmalarda amniyon sıvısı, kordon kanı,abort materyali ve koryonik villus numuneleri
- 3) Moleküler sitogenetik çalışmalarda ise postnatal ve prenatal çalışmalarda kullanılan tüm numuneler.

PERİFERİK KAN LENFOSİT KÜLTÜRÜNDEN KROMOZOM ELDESİ

A-SOLÜSYONLAR:

1. Kültür Vasatı:

RPMI	100 ml
Fetal Calf Serum	20 ml
Penisilin Streptomisin Sol	1 ml

Fitohemaglutinin 2 ml

L Glutamine 1 ml

Steril olarak karıştırılır ve 5 ml'lik steril kültür tüplerine bölünür.

2. Colsemid

3. Hipotonik

0,56 gr.KCl
100 ml distile su

4. Fixatif

3 birim metanol
1 birim glacial asetik asit

5. Tripsin

1 adet PBS tablet
100 ml distile suda eritilir.
0,05 gr. toz Tripsin eklenir.

6. Giemsa Boya

5 ml giemsa
95 ml soransen tamponu

B-UYGULAMA:

1.Kültür Tekniği:

1.1. Steril heparinize enjektöre alınan periferik kan örneğinden, içinde 5 ml kültür vasatı bulunan 37 °C deki tüplere 10-12 damla damlatılarak ekim yapılır.

1.2. Ekim yapılan kültür tüpleri 72 saat sürecek inkübasyon için 37 °C lik etüve 45 ° lik eğimle konulur.

2.Kromozom Eldesi:

2.1. İnkübasyonun sonunda steril iğne ucuyla 5-6 damla kolcemid eklenir. İyice alt üst edilip tekrar etüve konur. 30 dakika etüvde bekletilir.

2.2. İnkübasyon sonunda kültürler etüvden alınarak 6 dk. 1200 rpm de santrifüj edilir.

2.3 Süpernatant pastör pipet ile atılır. Dipte kalan kısım vortexlenir.

- 2.4. Üzerine önceden hazırlanan ve sıcaklığı 37 °C ye getirilmiş olan hipotonikten 10 ml basınçla eklenir. Kültürler 25-30 dakika inkübasyon için tekrar etüve alınır.
- 2.5. İnkübasyon sonunda kültürler etüvden alınarak 6 dk. 1200 rpm de santrifüj edilir.
- 2.6. Süpernatant atıldıktan sonra kalan kısma vortex üzerinde 20 damla kadar soğuk fixatiften (damla damla) eklenir. Üzerine basınçla 8 ml fixatif eklenir.
- 2.7. Kültürler tekrar 6 dk. 1200 rpm de santrifüj edilir.
- 2.8. Süpernatant atıldıktan sonra kalan kısım vortexlenir ve üzerine basınçla 5 ml fixatif eklenir.
- 2.9. Kültürler tekrar 6 dk. 1200 rpm de santrifüj edilir.
- 2.10. Süpernatant atıldıktan sonra kalan kısım vortexlenir ve üzerine basınçla 3 ml fixatif eklenir.
- 2.11. Süpernatant atıldıktan sonra dipte kalan kısım pipetaj yapılır.
- 2.12. Hücreler temiz ıslak ve soğuk lamlar üzerine 45° lik eğimle damlatılır ve oda ısısında bir gece kurumaya bırakılır.
- 2.13. Kuruyan preparatlar tripsinle muamele edilip sonra giemsa boya ile bantlama yapılır.

HRB (High Resolution Banding)

A-Solüsyonlar:

1. **Hazırlanmış 5 ml lik vasat**
2. **Metotreksat (MTX) solüsyonu**
Stok:

2,5 mgr metotreksat

5 ml Hank's BSS Steril ortamda karıştırılır. Ependorflara 1 ml şeklinde bölünüp -20 °C de 1 yıl saklanabilir.

Çalışma için 1 ml stok solüsyona 100 ml HBSS eklenir. Bu da -20 °C de 1 yıl saklanabilir.

3. **Thymidine**
5 mgr thymidine

20 ml HBSS Steril ortamda karıştırılır. -20 °C de 1 yıl saklanabilir. +4 °C de ise 2 ay saklanabilir.

4. Çalışma için gerekli diğer malzemeler

B-ÇALIŞMA:

Periferik kan kültürü için hazırlanan vasatlara aynı şekilde ekim yapılır (Saat 16:00 da) inkübasyon için 37 °C lik etüve 45 ° lik eğimle konulur. İnkübasyonun 48. saatinde (iki gün sonra saat 16:00 da) 50 µl MTX (metotreksat) eklenir. İyice altüst edilir ve tekrar etüve alınır. İnkübasyonun 64. saatinde (ertesi sabah saat 08:00 da) 50 µl thymidine eklenir. İyice altüst edilir ve tekrar etüve alınır. İnkübasyonun 72. saatinde (saat 12:00 da) kolşisin eklenir. 18-20 dk etüvde bekletilir. Sonraki çalışma periferik kan çalışmasının aynısıdır. Ancak HRB de hipotonik süreside 20 dk kadardır.

KEMİK İLİĞİ ÇALIŞMASI

A-SOLÜSYONLAR:

1. Kültür Vasatı:

RPMI	100 ml
Fetal Calf Serum	25 ml
Penisilin Streptomisin Sol	1 ml

Steril olarak karıştırılır ve 5 ml'lik steril kültür tüplerine bölünür.

4. Kolşisin

5. Hipotonik

0,57 gr.KCl

100 ml distile su

4. Fixatif

3 birim metanol

1 birim glacial asetik asit

5. Tripsin

1 adet PBS tablet

100 ml distile suda eritilir.

0,05 gr. toz Tripsin eklenir.

6. Giemsa° Boya

5 ml giemsa

95 ml soransen tamponu

B-UYGULAMA:

1.Kültür Tekniği:

1.1. Steril heparinize enjektöre alınan kemik iliği örneğinden, içinde 5 ml kültür vasatı bulunan 37 °C deki tüplere lökosit sayısına göre damlatılarak ekim yapılır.

1.2. Ekim yapılan kültür tüplerinin iki tanesi direk çalışılır.Diğerleri ise 24,48 ve 72 saatlik inkübasyonlar için 37 °C lik etüve 45 ° lik eğimle konulur.

2.Kromozom Eldesi: Bundan sonraki çalışması periferik kan çalışması ile aynıdır. Kolşisin süresi 25 dakika hipotonik süresi 25 dakikadır.

Lökosit Sayısına Göre Ekim Miktarları	
Lökosit	Damla sayısı
1000-2500	30-35
2500-5000	25-30
5000-10000	20-25
10000-25000	15-20
25000-100000	5-10
>100000	2-3

C BANTLAMA TEKNİĞİ

Kültürlerden elde edilen preparatlar havada 3-4 gün kurutulduktan sonra sırayla aşağıdaki işlemler uygulanır.

- 1- 0,2 N' lik HCl'de 20 dakika çalkalanır.
0,2 N'lik HCl= 1,66 cc HCl + 100 cc distile su
- 2- Üç ayrı distile suda çalkalanır(yıkanır) ve havada kurutulur.(Kendi kendine kurumaya bırakılır.)
- 3- Oda sıcaklığında NaOH ile 50 saniye çalkalanır.
NaOH= 1,4 gr.NaOH+ 100 cc distile su
- 4- 2xSSC' de üç kez çalkalanır.
2xSSC= [1,75 gr. NaCl+100 cc distile su] + [0,88 gr.Na sitrat + 100 cc distile su]
- 5- 65 derecede 2xSSC' de 4 saat inkübe edilir.
- 6- Sırasıyla 2 adet % 70' lik 3 adet % 90 'lık alkolden geçirilir.(çalkalanır)
- 7- Havada kurutulur.
- 8- Soransende çalkalanır.
- 9- Giemsa'da yaklaşık 30 dakika boyanır.
- 10- Distile suda çalkalanır(yıkanır) ve havada kurutulur.

Kuruduktan sonra vakit kaybedilmeden kapatılmalıdır.

NOR- BANTLAMA TEKNIĐİ

A-Kullanılacak solüsyonlar

1. %50 lik Gümüş Nitrat solüsyonu

1 gr AgNO_3 (Merck), 2ml distile su içerisinde çözülür. Alüminyum folyo ile sarılır, + 4°C de saklanır.

2. Amonyak solüsyonu (NH_3)

6,4 ml NH_3 (Merck), 3,6 ml bidistile su ile karıştırılarak stok solüsyonu hazırlanır.

3. Amonyak- Gümüş Nitrat solüsyonu (AgNO_3)

0,5 gr AgNO_3 üzerine stok amonyak solüsyonundan 1,25 ml ilave edilir ve karıştırılır. Alüminyum folyo ile sarılır ve + 4°C de saklanır.

4. %35 lik formaldehit solüsyonu

3,5ml Formaldehit (merck) üzerine 6,5 ml distile su ilave edilerek karıştırılır

5. %2 lik Giemsa solüsyonu

2ml Giemsa boyası, 98 ml Sörensen tamponuna ilave edilir.

B-Yapılacak işlemler

1.Plastik veya cam petri kabının tüm tabanını kaplayacak şekilde adi kurutma kağıdı yerleştirilerek, distile su ile nemlendirilir.

2.Preparatın üzerine %50 lik AgNO_3 solüsyonundan damlatılır ve lamelle kapatılır. Petri kutusuna konarak kapağı kapatılır. İçerisine su girmemesi ve nemini kaybetmemesi için etrafı parafilm ile kapatılır,alüminyum folyo ile sarılır ve naylon torbaya konarak ağzı bağlanır.

3.Petri 60°C de ki su banyosunda 3 saat bekletilir.

4.Sonra preparat 45°C lik eğimle tutularak distile su ile yıkanır ve lamel uzaklaştırılır.

5.Preparat havada sallanarak kurutulur.

6.Preparatın yayma olmayan ucuna ayrı ayrı amonyak gümüş nitrat ve %35 lik formaldehit solüsyonlarından birer damla konur. Pastör pipeti ile hemen karıştırılıp üzeri lamel ile kapatılır. Fazla solüsyon kurutma kağıdı ile alınır. Mikroskop altında 10x objektifte, hücrelerin ve metafazların renklerinin sarıdan açık kahverengiye dönüşleri gözlenerek, preparat incelenir. Preparatın tüm yüzeyinde renk değişikliği olduğunda preparat distile sudan geçirilerek üzerindeki lamel uzaklaştırılır. Preparat havada sallanarak kurutulur.Bu aşamanın son derece süratli yapılması çok önemlidir. Çok koyu boyanırsa sonuç iyi çıkmaz.Ayrıca eller boyandığında dikkatli çalışmak gerekir.

7.%2lik Giemsa ile 10 saniye boyanır.Pisetle yıkanır.Whatman 40 kurutma kağıdı ile kurutulur ve lamel entellan ile kapatılır.

FISH ÇALIŞMASI

Çalışma bittikten sonra üstte kalan supernatan kısmı atılır. Pipetaj yapıp temiz soğuk ve ıslak lama damlatılır. Lam mikroskopta incelenerek metafazların veya interfaz hücrelerinin yoğun olduğu bölge işaretlenir.

Preparat kuruduktan sonra:

1. Sırası ile 2X SSC , % 75, % 85 ve % 100' lük etanol serisinde oda sıcaklığında 2 şer dakika yıkanır. Bir şaleden diğerine kurutmadan direk olarak geçirilir.
2. Lamel üzerine FISH probu koyulur ve işaretli olan bölgeye lamel ters çevrilerek yapıştırılır. Lamelin etrafı boşluk kalmayacak şekilde yapıştırılır.
3. Slide hot platein üzerinden alınır, hot plate 80 °C'ye getirilir ve 3,30 dakika daha bekletilir.
4. 39 °C ye ayarlanmış etüv veya kapalı hot plate içerisinde nemli olacak şekilde bir gece bekletilir.
5. Ertesi gün 72 °C'de ısıtılmış olan benmari içerisine bir şaleye 4XSSC(100 cc SSC içerisine 50 mikrolitre Tween 20 eklenir) konur ve lam üzerindeki lamel ayrılarak şale içerisinde 1,30 dakika bekletilir.
6. Oda sıcaklığındaki 2XSSC(Tween 20 ilave edilmiş) de de 30 sn bekletilir ve 5 mikrolitre dapi koyulmuş lamel ile kapatılır. Bu aşamalarda lamın kuruması beklenmez. Karanlık ve soğuk ortamda bakılıncaya kadar bekletilebilir.

BUKKAL MUKOZA FISH ÇALIŞMASI

1. RPMI 1640 besiyeri solüsyonundan (antibiyotiksiz) 5ml, 50 ml'lik falkon tüpüne aktarılır.
2. Hastanın ağzını suyla iyice çalkalaması söylenir.
3. Örnek yanak içi mukozadan abeslang ile hafif kazınarak alınır ve falkon tüpünün içerisinde hücreleri yerinden çıkarmak amacıyla abeslang çalkalanır. Alınan örnek beklenmeden çalışmaya alınır.
4. 3500 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edilir.
5. Süpernatant uzaklaştırılır ve pelet fiksatifle silinmiş kuru temiz lama yayılır.
6. Oda sıcaklığında kurumaya bırakılır.
7. Kuruduktan sonra lamın üzeri tamamen kaplanacak şekilde %96 Metanol damlatılır, 2 dk bekletilir ve lam 45 derecelik açıyla konularak bir gece kurumaya bırakılır.
8. Ertesi gün %100 Etanol, %85 Etanol, %70 Etanol ve dH²O 'dan 2'şer dk geçirilir.
9. Preparatlar süzülür ve elmas uçlu kalemle preparatın arka tarafından bölge işaretlenir.
10. 95 °C'ye ulaşan kaynatma solüsyonuna preparatlar konulur ve 20 dk kaynatılır.

11. Preparatlar dH²O ile 2 dk yıkanır.
12. Preparatların suyu iyice süzildükten sonra varsa su damlacıkları kurutma kağıdı ile dokuya zarar vermeden iyice kurulanır.
13. Preparatlar pepsin enzimi damlatılıp üzerine lamel kapatılır ve 37 °C etüvde 15 dk inkübe edilir.
14. Süre sonunda üzerindeki lamel çıkarılan preparatlar dH²O'da 1 dk, 2xSSC'de 5 dk bekletilir. Ardından %70 Etanol, %85 Etanol ve %100 Etanol'de 1'er dk bekletilir.
15. Preparatların oda sıcaklığında kurduğundan emin olduktan sonra, ilgili FISH probu lamele konulur, preparatın işaretli bölgesi ile birleştirilip lamelin etrafı yapıştırıcı ile kapatılır ve 80 °C'de 10 dk denatürasyon işlemi gerçekleştirilir. 37 °C etüvde nemli ortamda 1 gece bekletilir.
16. Ertesi gün yapıştırıcısı ve lameli üzerinden alınan preparatlar 70 °C'de 10-20 sn süreyle 0,4xSSC'de; oda sıcaklığında 30-45 sn süreyle 2xSSC 'de bekletilir ve %70 Etanol, %85 Etanol ve %100 Etanol serisinde 2'şer dk yıkanır.
17. Yıkama sonrası kuruyan preparatlar, yeni lamel üzerine konulan dapi ile kapatılarak analize hazır hale getirilir.

AMNİYOTİK SIVI DOKU KÜLTÜRÜ

A-EKİM

- 1-Pistonsuz steril enjektörde gelen (yaklaşık 20 cc) amnion sıvısının ilk olarak kayıt ve etiket işlemleri yapıp fotoğrafları çekilir.
- 2-Laminar Flow'da steril olarak amnion sıvısı 1,5cc olmak üzere 3 ependorf tüpüne, kalan kısmı ise 3 ayrı kültür ekim tüpüne eşit olarak aktarılır.
- 3-Hücreleri çöktürmek amacıyla 1500RPM de 8 dk. santrifüj işlemi gerçekleştirilir.
- 4-Bu arada 3 ayrı flask isimlendirilip A,B,C olmak üzere tarih atılarak hazırlanır.
- 5-A flaskına Amniochrome, B flaskına B10-Amf2, C flaskına Chang Medium (3 cc) eklenir.
- 6-Santrifüjü tamamlanan amnion sıvısının yine steril ortamda laminar flow da süpernatantı cam pipet yardımı ile atılır. Pellet kısmını homojenize etmek için pipetaj yapılır ve flasklara ekilir.
- 7-Flaskların kapakları kapatılarak 37 derece, %0,5 CO₂ içeren etüvde 7 gün hücreler üremeye bırakılır.

B-İLK KONTROL-ÜS KURMA-BESLEME

- 1-Yaklaşık 1 haftada hücreler kültür kabının içinde çoğalmaya başlayıp flaskların yüzeyine yapışmıştır.
- 2-Mikroskopik olarak ilk incelemeler yapılarak hücrelerin tutunduğu alanlar işaretlenir.
- 3-Yeterince bölgede tutunma var ise üs kurmak üzere 3 ayrı flask A', B', C' şeklinde isimlendirilir.
- 4-Üremenin olduğu flasklardaki besiyeri ,yeni isimlendirilen diğer flasklara aktarılır.
- 5-İçi boşalan eski flasklara 3 cc yeni besiyeri eklenir.

6-Eğer üremenin olduğu ana flasklardaki hücreler harwest aşamasına geçecek kadar çoğalmış ise kültür sonlandırılır yada gerekli durumlarda subculture yöntemi uygulanıp devam ettirilir,değilse kültürler tekrar inkübasyona bırakılır.

7-Hemen hergün kontrolü yapılarak gerekli durumlarda besiyeri değiştirilir.

8-Beslenenecek flasklardaki sıvı atılarak yerine 3 cc besiyeri eklenir.(besleme)

C- HARWEST

1-Üremesi sonlandırılacak kültürlere optimizasyon koşullarına göre enjektör ucu ile (iğnesiz)5 damla 'colsemid' damlatılarak üreme durdurulur.

2-Yaklaşık 50 dakika flaskların kapakları sıkı kapatılarak etüvde bekletilir.

3-Bu arada kaç flask varsa flask başına 2'şer cc olmak üzere sökme işleminde kullanılacak besiyeri ve tripsin-edta enjektörlere çekilerek etüve kaldırılır.

4-Her flask için 20 cc olacak şekilde fiksatif (1 asetik asit/3 methanol)soğumak üzere -20 derecede bekletilir.

D-SÖKME

1-İlk olarak her flask için tüp,cam,pipet,pastör pipeti hazırlanarak ismlendirilir.

2-Etüvden çıkarılan her flaskın içindeki vasat her hasta için hazırlanan kültür ekim tüpüne boşaltılır ve 2 cc tripsin-edta eklenip,yaklaşık 2 dk. etüvde bekletilerek hücrelerin kültür kaplarından ayrılması sağlanır.

3-Mikroskopta kontrol edilir,eğer hücreler sökülmiş ise flasklara 2 cc sökme besiyeri eklenerek tripsin-edta nötürlenir,flaskın tamamı kültür ekim tüpüne aktarılır. Bazı durumlarda tutunan hücrelerin bi kısmı sökülür,bi kısımda flaskda subculture yöntemi ile devam ettirilir.

4-Kültürü sonlanan hücreler 1500 Rpmde 8 dk. santrifüj edilir,çöktürülür.

5-Süpernatant kısmı atılarak vortexlenip homojenizasyon sağlanır.

6-Yaklaşık 8 cc (%56 KCL,distile su) hipotonik çözeltisi hacimli bir şekilde eklenerek hücreler patlatılır.

7-Optimizasyon koşullarına göre 5 dk. 30 sn etüvde bekletilir.

8-Tekrar 1500 Rpm de 8 dk. santrifüj edilerek fiksatif ile yıkama işlemine geçilir.

9-İlk fiks vortexte pipetle damla damla (10-15 damla)girilir.

10-Süpernatant atılarak pellet vortexlenir.2. fiksatif enjektörle basınçlı şekilde 5 cc olarak tüplere boşaltılır.Tekrar 1500 Rpm de 8 dk. vortexlenip ,süpernatant atılır.Son olarak 3 cc fiks ile yıkama gerçekleşir.Harwesti tamamlanan tüpler +4 derecede muhafaza edilir.

E-DAMLATMA

1- Damlatmanın yapılacağı lamalar soğuk ve temiz olmalıdır

2- Çalışması tamamlanan tüplerin süpernatantı atılarak pellet pipetaj yapılır.

3- Cam pipet yardımı ile her tüp pellet miktarına göre ortalama olarak üç lama yayılır.

4- Lamlar bir miktar fiks ile nemlendirildikten sonra ,mikroskop altında metafaz kalitesine göre uzaktan veya daha yakından damlatma yapılır.

5- Bir gün kurumaya bırakılan preparatlar analiz için hazır hale gelmiştir.

CVS/DÜŞÜK MATERYALİ DOKU KÜLTÜRÜ

A-EKİM

1-İçerisinde besiyeri olan steril falkon tüpünde gelen cvs materyali ilk olarak kayıt işlemi yapıp fotoğrafı çekilir.

2-Her hasta için 2 flask isimlendirilip A,B olmak üzere ve ekim tarih atılarak hazırlanır.

3-Laminar flow'da steril olarak Petri kabında yıkanır ve ayıklanır.

4-Ayıklanan materyal bistüri ucu ile küçük parçalar haline getirilip,kültür ekim tüpüne aktarılır.

5-Kültür ekim tüpüne 2cc tripsin-edta ilave edilip 1 saat 37 derece etüvde bekletilir.

6-1 saat sonunda 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.

7-Santrifüjden sonra tekrar laminar flow'da steril olarak süpernatantı cam pipet yardımı ile hiç tripsin-edta kalmayacak şekilde atılır.

8-Kalan materyal yeni bir kültür ekim tüpüne aktarılır ve üzerine 2cc kollajenaz ilave edilip,1 saat 37 derecede etüvde bekletilir.

9-1 saat sonunda kültür ekim tüpünün üzerine 8cc besiyeri ilave edilir ve 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.

10-A ve B flaskına 2cc Chang-Medium besiyeri ilave edilir.

11-Santrifüjü tamamlanan cvs materyali laminar flow'da steril olarak süpernatantı cam pipet yardımı ile atılır.Pellet kısmını homojenize etmek için pipetaj yapılır ve bir kısmı A flaskına,kalanıda B flaskına ekilir.

12- Flaskların kapakları kapatılarak 37 derece ,%0,5 CO2 içeren etüvde 7 gün hücreler üremeye bırakılır.

B-İLK KONTROL-ÜS KURMA-BESLEME

1-Yaklaşık 1 haftada hücreler kültür kabının içinde çoğalmaya başlayıp flaskların yüzeyine yapışmıştır.

2-Mikroskopik olarak ilk incelemeler yapılarak hücrelerin tutunduğu alanlar işaretlenir.

3-Yeterince bölgede tutunma var ise üs kurmak üzere 1 flask A'B' şeklinde isimlendirilir.

4-Üremenin olduğu flasklardaki besiyeri ,yeni isimlendirilen diğer flaska aktarılır.

5-İçi boşalan eski flasklara 3 cc yeni besiyeri eklenir.

6-Eğer üremenin olduğu ana flasklardaki hücreler harwest aşamasına geçecek kadar çoğalmış ise kültür sonlandırılır yada gerekli durumlarda subculture yöntemi uygulanıp devam ettirilir,değilse kültürler tekrar inkübasyona bırakılır.

7-Hemen hergün kontrolü yapılarak gerekli durumlarda besiyeri değiştirilir.

8-Beslenenecek flasklardaki sıvı atılarak yerine 3 cc besiyeri eklenir.(besleme)

C- HARWEST

1-Üremesi sonlandırılacak kültürlerle optimizasyon koşullarına göre enjektör ucu ile (iğnesiz)5 damla ‘colsemid’ damlatılarak üreme durdurulur.

2-Yaklaşık 40 dakika flaskların kapakları sıkı kapatılarak etüvde bekletilir.

3-Bu arada kaç flask varsa flask başına 2’şer cc olmak üzere sökme işleminde kullanılacak besiyeri ve tripsin-edta enjektörlere çekilerek etüve kaldırılır.

4-Her flask için 20 cc olacak şekilde fiksatif (1 asetik asit/3 methanol)soğumak üzere -20 derecede bekletilir.

D-SÖKME

1-İlk olarak her flask için tüp,cam,pipet,pastör pipeti hazırlanarak ismlendirilir.

2-Etüvden çıkarılan her flaskın içindeki besiyeri her hasta için hazırlanan kültür ekim tüpüne boşaltılır ve 2 cc tripsin eklenip,2 dk. etüvde bekletilerek hücrelerin kültür kaplarından ayrılması sağlanır.

3-Mikroskopta flasklar kontrol edilir,eğer hücreler sökülmiş ise flasklara 2 cc sökme besiyeri eklenerek tripsin nötürlenir,flaskın tamamı kültür ekim tüpüne aktarılır.Bazı durumlarda tutunan hücrelerin bi kısmı sökülür,bi kısımda flaskda subculture yöntemi ile devam ettirilir.

4-Kültürü sonlanan hücreler 1500 Rpmde 8 dk. santrifüj edilir,çöktürülür.

5-Süpernatant kısmı atılarak vortexlenip homojenizasyon sağlanır.

6-Yaklaşık 8 cc (%56 KCL,distile su) hipotonik çözeltisi hacimli bir şekilde eklenerek hücreler patlatılır.

7-Optimizasyon koşullarına göre 6 dakika etüvde bekletilir.

8-Tekrar 1500 Rpm de 8 dk. santrifüj edilerek fiksatif ile yıkama işlemine geçilir.

9-İlk fiks vortexte pipetle damla damla (10-15 damla)girilir.

10-Süpernatant atılarak pellet vortexlenir.2. fiksatif enjektörle basınçlı şekilde 5 cc olarak tüplere boşaltılır.Tekrar 1500 Rpm de 8 dk. vortexlenip ,süpernatant atılır.Son olarak 3 cc fiks ile yıkama gerçekleşir.Harwesti tamamlanan tüpler +4 derecede muhafaza edilir.

E-DAMLATMA

1- Damlatmanın yapılacağı lamalar soğuk ve temiz olmalıdır

2- Çalışması tamamlanan tüplerin süpernatantı atılarak pellet pipetaj yapılır.

3- Cam pipet yardımı ile her tüp pellet miktarına göre ortalama olarak üç lama yayılır.

4- Lamalar bir miktar fiks ile nemlendirildikten sonra ,mikroskop altında metafaz kalitesine göre uzaktan veya daha yakından damlatma yapılır.

5- Bir gün kurumaya bırakılan preparatlar analiz için hazır hale gelmiştir.

AMNİYON FISH ÇALIŞMASI

1. Gelen amnion mayiinden 2-3 cc ayrılarak santrifüj edilir.
2. Santrifüj edildikten sonra üst kısmı atılır ve 5 cc Tripsin –EDTA vortexlenerek konur.30 dk.37 derecede etüvde bekletilir.
3. Sonra etüvden çıkarılır ve 1500 rpm de 8 dk.santrifüj edilir.
4. Süpernatant atılır,5 cc hipotonik solüsyon (KCl)ilave edilir.Vortexlenir ve etüvde 37 derecede 30 dakika prefiksasyon yapılır.1 saat bekletilir.
5. 1 saatin sonunda 1500 rpm de 8 dk. santrifüj edilir.Süpernatant kısmı atılır ve önce yavaş olarak 7-8 damla olacak şekilde 5 cc 1. fix girilir.(1/3 asetik asit /metanol)
6. 1500 rpm de 8 dk. Santrifüj edilir.Süpernatant kısmı atılır ve 5 cc 2. fix girilir.
7. 1500 rpm de 8 dk. Santrifüj edilir.Süpernatant kısmı atılır ve 3 cc 3. fix girilir.
8. 1500 rpm de 8 dk. Santrifüj edilir.Süpernatant kısmı atılır ve altta kalan kısım 1,5 ml lik ependorf tüpe aktarılır.
9. Ependorf tüp 2000 rpm de 10 dk. santrifüj edilir.
10. Üst kısım atılarak ,altta kalan hücreli kısım mikro pipetle temiz bir lama damlatılır.
11. Damlatılan bölgeye FISH probu uygulanır.

KORDOSENTEZ APT TESTİ

1. 5 cc distile su iki adet test tüpüne alınır.
2. Distile su bulunan iki tüpten birisine 0,05 cc fetal kan diğerine ise 0,05 cc yetişkin kanı(yaklaşık 4-5 damla)eklenir
3. Kan su karışımı 1200 rpm de 6 dakika santrifüj edilir.
4. Santrifüjden sonra iki tüpe de pastör pipeti ile 1 ml NaOH damlatılır.
5. Yetişkin kanında Hemoglobin A bulunduğuından NaOH ile reaksiyona girerek sarı-yeşil bir renk oluşacaktır.Fetusta bulunan hemoglobin F ise NaOH ile reaksiyona girmediği için renk değişimi gözlenmez.Kan kırmızı renkte kalır.
6. Fetus kanının bulunduğu tüpte renk değişimi oluyorsa kan anne kanına aittir değerlendirilmesi yapılır.