

T. C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MILLIPORE FİLTASYON TEKNİĞİ VE SİTOLOJİK
MATERYALLERDE KULLANILMASI**

Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tıbbi Biyolog
Buket KOSOVA

Danışman Öğretim Üyesi : Prof. Dr. Nejat TOPÇUOĞLU

İZMİR - 1994

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı 'nda Yüksek Lisans yapmama olanak sağlayan ve tez çalışması için büyük desteğini gördüğüm, tez danışmanım Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Hocam Prof. Dr. Nejat TOPÇUOĞLU 'na, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı' ndan Uz. Dr. Mehmet POLATLI'ya, Patoloji Anabilim Dalı'ndan Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yıldız ERHAN'a ve Prof. Dr. Özden GÜNEL'e, Üroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Özcan ERHAN'a ve tüm Anabilim Dalımız çalışanları ile, tez çalışmam sırasında bana destek olan Aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM I

Giriş ve Amaç	1
Genel Bilgiler	2

BÖLÜM II

Gereç ve Yöntem	11
-----------------------	----

BÖLÜM III

Bulgular	17
----------------	----

BÖLÜM IV

Tartışma	25
Sonuç	33
Özet	34
Zusammenfassung	36
Kaynaklar	38
Özgeçmiş	41

GİRİŞ VE AMAÇ

Peritoneal ve Plevral ponksiyon sıvıları ile, Bronşioalveolar lavaj sıvılarının ve İdrar materyalinin sitolojik değerlendirilmesi, klinik tanıya yardımcı çok önemli bir basamağı oluşturmaktadır. Klasik sitolojik yöntemlerle, bu sıvılardan içerdikleri hücreleri oldukları gibi bozulmadan ve kayba uğramadan ayırıp değerlendirmek, halen büyük bir sorun oluşturmaktadır. Sitoloji laboratuvarlarında bu tür sıvılar için uzun yıllar klasik santrifüj yöntemi uygulanmış, ancak elde edilen hücrelerin kaybı, yayma sırasında geniş bir alana dağılmaları ve hücrelerde meydana gelebilen bozulmalar nedeniyle yerini yeni yöntemlere bırakmıştır. Günümüzde yaygın olarak, hücrelerin doğrudan lamların üzerine belli bir alana yayılmalarını sağlayan sitosantrifüj tekniği kullanılmakta olup, değerlendirmeye alınan sıvı hacminin az olması bu tekniğin olumsuz bir yanını oluşturmaktadır. Millipore filtrasyon tekniği (MFT) kullanılarak, vücut sıvılarının sitolojik değerlendirilmesinde, sitolojik tanı için alınan bütün sıvı örneğinin süzülmesi yoluyla, filtre üzerinde sıvıdaki hücrelerin toplanması ve sitolojik olarak incelenmesi olanağı getirilmiştir. Millipore filtre çalışmaları, araştırmacılara yüksek hacimdeki vücut sıvılarının içindeki az sayıdaki dökülmüş hücreleri elde etme olanağını vererek, tanıya olan güvenin artmasına neden olmuştur. Son derece muntazam olan por büyüklüğü nedeniyle sıvı örneğinde bulunan bütün hücrelerin filtre yüzeyinde toplanması güvencesini sağlamakta ve tek bir Millipore lamı, 4 - 8 normal lama eşdeğer sitolojik materyal içermektedir.

Çalışmamızda, MFT uygulamasıyla Bronşioalveolar lavaj (BAL) sıvısında Asbestos cisimcikleri (Asbestos body - AB) bakılması yanında; idrarda, peritoneal ponksiyon yada yıkama sıvılarında sitolojik hücre özellikleri araştırılmıştır. MFT uygulamasında değişik tipte iki Millipore filtreden yararlanılarak, değerlendirmelerin tümü faz kontrast mikroskobu ile yapılmıştır.

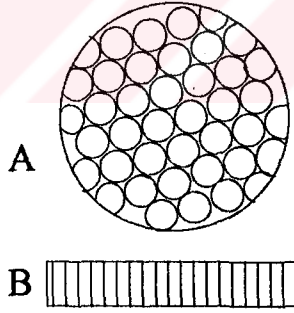
Bu çalışma ile, Fakültemizde henüz rutine girmemiş olan Millipore filtrasyon tekniğini, İdrar ve batin yıkama sıvılarının sitolojik tanısı ile, BAL' da AB değerlendirilmesinde kullanmak suretiyle, rutin sitolojik ve klinik tanıya katkıda bulunacak standart uygulama yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Membran filtrelerin genel özellikleri:

Membran (MF) tipi Millipore filtreler, selüloz asetat ve selüloz nitratın oluşan biyolojik inert karışımlardır ve bu nedenle plastik özellik taşırlar. MF tipi Millipore filtrenin yaklaşık % 84 'ü kapiller porlardan oluşmaktadır (14). Membranlar, firmaları tarafından, virüsleri alıkoyabilecek bir büyüklük olan 10 milimikron ile, alyuvarlardan çok daha küçük olan 5 mikrona kadar, değişik por büyüklüklerinde üretilmektedir. İstenilen partikül büyüklüğüne göre seçilen membranların por büyüklükleri, oldukça düzenli olarak belirlenmiştir ve bu, filtreden süzülüp giden sıvı içerisindeki ayrılan partiküllerin mikroskopla taranabilmelerini sağlamaktadır (23).

Filtredeki por yapısının mikroskopta çok büyütülmüş ve şematize edilmiş görüntüsü Şekil 1 'de gösterilmiştir.



Şekil 1 : Millipore filtrenin şematik por yapısı

A- Üstten, B- Yan kesit görünüşü

MF filtreler seyreltilmiş asit ve bazlar, alifatik ve aromatik hidrokarbonlar ve polar olmayan sıvılar ile kullanılmaya uygundur. Ketonlar, esterler, eter - alkoller, nitro - parafinler veya kuvvetli asit ve bazlar ile kullanılmaya uygun değildir. pH düzeyi 4 - 7.5 arasındadır. MF - Millipore filtreleri 121 °C 'ye kadar otoklavlanabilir ancak, 75 °C 'nin altındaki uygulamalar için tavsiye edilirler (14).

MF 'lerin başlıca uygulama alanları: MF' ler çok değişik alanlarda kullanılırlar.

Örneğin:

- İntra venöz sıvıların ve serumun temizlenmesinde,
- Kimyasal katkıların, antibiyotiklerin ve doku kültürü ortamlarının sterilizasyon için filtrasyonlarında,
- Asbest, arsenik, pamuk tozu, metaller ve pestisidler ile, zararlı tozların havadaki miktarının belirlenmesinde, steril odanın kontrolünde,
- Hücre eldesi ve yıkamasında
- Vücut sıvılarının sitolojik incelenmesinde,
- Koloni hibridizasyonunda
- Kimyasalların, yakıtların ve hidrolik sıvıların kontaminasyon analizlerinde
- Bira, hafif alkollü içeceklerin, su ve şarabın mikrobiyolojik analizinde
- Mikrodiyalizde kullanılmaktadır.

Millipore filtre teknolojisi, sıvıların mikroporöz ve ultrafiltrasyon membranlarından filtrasyonlarıyla analizleri ve pürifikasyonları için ürünler, sistemler ve uygulama teknikleri sağlamaktadır. Millipore mikroporöz membran filtrasyonu uzun zamanlar boyunca endüstriyel işleminin eksiksiz ve kritik bir basamağını oluşturmuştur. Farmasötik imalatında bu tip bir filtrasyon santral sistem suyunun pürifikasyonundan son aşamadaki ürün sterilizasyonuna kadar tüm basamaklarda, solüsyonları partiküllerinden arındırma işlemlerinde kullanılmaktadır. İçecek madde işlemleyicileri mikroporöz filtrasyonu mantarların, bakterilerin ve partiküllerin uzaklaştırılmasıyla bozulmayı önleme ve berraklığı artırmada kullanılırlar. Millipore membran filtrasyonu ayrıca bir analitik araç olarak partiküllerin ve mikroorganizmaların toplanması, idantifikasyonu ve ölçülmesi için de geniş çapta kullanılmaktadır. Millipore ultrafiltrasyon membranları moleküler ayrıştırma işlemleri için de kullanılır. Çok değişik tiplerdeki biyolojik ve kimyasal sıvıların konsantre hale getirilmesi ve saflaştırılmasında, sıvıların temizlenmesinde partiküllerinden oluşabilecek kontaminasyonu önlemek amacıyla kullanılır.

Bir membran filtrenin belirlediği alı koyma sınırı ayrıca bir sistemin doğruluğunu ve verimini onaylamak için bir analitik alet olarak kullanılabilir. Örneğin, temizleme veya sterilizasyon filtrasyonuna ek olarak bakteri ihtiva eden sıvılar filtre edilerek, içerdikleri mikroorganizmaların membran yüzeyinde tutulması sağlanır ve sonra kültürleri ve analizleri

gerçekleştirilebilir. Filtre membranının devamlı yapısından dolayı ortam göçü oluşmaz. Normalde filtrenin içinde üreme sorunu yoktur. Membran filtreler son filtrasyon ve ön filtrasyon işlemlerinde kullanılabilir, ki buna karşılık derinlik filtresi genellikle kantitatif bir alı koymanın gerekmediği durumlardaki temizleme uygulamalarında veya akıntı yönündeki bir membranın ömrünü uzatmak için bir ön filtre göreviyle kullanılır.

Derinlik Filtresi:

Yapısı, rasgele yönlendirilmiş lifler veya preslenmiş boncuklardan oluşan matriks, sarılmış veya başka türlü birbirine bağlanmış olarak, akıntı açıklıklarına sahip dolambaçlı bir labirenti oluşturabilecek şekilde bir araya getirilmiştir. Buna örnek olarak pamuk, fiberglas, yün, resin-bağlı kağıt yapraklar veya başka inorganik mikrofilamentler, ısı ve basınçla yapılandırılmış maden parçacıkları, porselen ve diyatomatöz toprak verilebilir. Avantajı, yüksek partikül yüklenme kapasitesi ve partikülleri yüzeyinde ve tüm matriksinde tutmasıdır. Dezavantajı ise, devamlı olmayan fibröz yapısından dolayı ortam göçü oluşabilmesi ve fragmentlerin filtre edilmiş ürünün içine dökülme eğilimi olmasıdır. Ayrıca, filtre matriksinin içinde tutulmuş olan organizmalar sonunda burada üreyerek, filtratı kontamine edebilirler. Belli bir süre içinde, nem ve besinde verilirse başarılı jenerasyonlar matriksin içinde iyicene ilerleyerek, sonunda filtrenin akıntı yönündeki tarafına çıkabilirler. Sınırlandırılmış por büyüklüğüne sahip değildir. Rasgele matriks alanları nedeniyle bunun içinden geçebilecek partiküllerin azami büyüklükleri hakkında bir sınırlandırılma getirilemez. Derinlik filtreleriyle kantitatif bir alı koyma olanağı yoktur. Sıvı ürünlerinin büyük hacimlerini emip alı koyabildiği için, pahalı sıvılar için önemli bir problem oluşturur (14, 20).

Tarama Filtresi:

Yapısı, polimerik materyali sert, değişmez şekilli devamlı bir ağdan oluşur ve por çapı imalatı esnasında çok hassas olarak belirlenir. Buna örnek olarak, metal elek filtreler, membran filtreler verilebilir. Avantajı, filtre membranının devamlı yapısından dolayı ortam göçü oluşmamasıdır. Ayrıca, normalde filtrenin içinde üreme sorunu yoktur. Por çapından büyük organizmalar filtreden geçemezler. Membran filtre oldukça incedir, az miktarda sıvı tutar. Dezavantajı ise, düşük partikül yüklenme kapasitesidir. Partikül alı koyması hemen yalnızca akıntıya karşı olan yüzeyi ile sınırlı kalır ve çabuk tıkanır.

Membran filtrelerin tıpta kullanılması

Tıpta membran filtrasyonu tekniği ile sitolojik tanı, lökosit kemotaksisi, lipozom ekstrüzyonu, alyuvar şekil bozukluklarının araştırılması gibi birçok spesifik çalışmalar yapılabildiği gibi; doku kültüründe kullanılan besiyerlerinin, mikroorganizmalardan arındırılması, çözeltilerin belirli büyüklükteki artefakt oluşturucu partiküllerden temizlenmesi gibi rutin amaçlar için de kullanım alanı bulunmaktadır.

Millipore filtre, birçok açıdan sitolojik tanı alanında büyük bir ihtilal gerçekleştirmiştir. Çünkü araştırmacılara yüksek hacimdeki vücut sıvılarının içindeki az sayıdaki dökülmüş hücreleri elde etme imkanını vererek, tanıya olan güvenin artmasına da neden olmuştur. Son derece muntazam olan por büyüklüğü nedeniyle sıvı örneğinde bulunan bütün hücrelerin filtre yüzeyinde toplanması güvencesini sağlamıştır. Tek bir Millipore lamı 4 - 8 normal lama eşdeğer sitolojik materyal içermektedir. Sitolojik çalışmalarda, hücresel içerikli sıvıların, sulu kısmının santrifüjleme ile tortusundan ayrılması, üst kısmın atılması ve yıkama gibi işlemler, hücrelerin parçalanması ile birlikte, asıl değerli hücresel materyalin kaybına yol açmaktadır. Santrifüjleme sitolojik işlemlerin yararlı bir aşamasını oluşturmuştur ve oluşturmayada devam etmektedir. Bununla birlikte, hemen bütün sıvılar Millipore filtrasyonla rahatlıkla bu işlemde geçirilmeden işlenebilir. Böylece, ilk defa hücrelerin sıvılardan direkt toplanması için gerçek kantitatif bir uygulama bulunmuştur. Hücresel materyalin filtrasyonla nazikçe toplanması normal smear tekniklerinde sık sık olagelen hücresel bozulmaları önemli oranda azaltmıştır. Bunun bir sonucu olarakta, başka türlü kaybolacak olan nüklear ve sitoplazmik ayrıntıların büyük bir kısmı korunmaktadır. Dikkatli bir filtrasyon yapıldığında, hücresel materyal, bütün filtrasyon yüzeyi üzerinde düzenli bir oranda rasgele olarak biriktiğinden, Millipore tekniğiyle işlenen lamlarda, hemen hemen kusursuz bir dağılım gözlenmektedir. Kümelenmeler ve bazı alanlarda boş alanlarla birbiri ardına gelen üst üste binmeler çok azdır. Hücreler, filtreyi ne geçerler ne de matriksinin içine batarlar. Millipore filtrede hemen bütün hücreler tek bir mikroskopik plan üzerinde bulunurlar.

Millipore filtre üzerinde toplandıktan sonra her hücre ve hücre grubu filtre yüzeyine hem mekanik hemde Van der Waals etkisiyle kuvvetlice bağlanmaktadır. Bunun bir sonucu olarakta Millipore filtre temiz bir lama sıkıca tutturulabilir ve sonra lam, boyama için ticari bir daldırma tutucusuna yerleştirilebilir (14).

Eğer önemli morfolojik detaylar korunmak isteniyorsa, bütün sitolojik çalışmaların hızlı fiksasyonu kesinlikle şarttır. Millipore filtrenin kullanılması bu gerekliliği hiç bir şekilde değiştirmemektedir. Millipore kullanıldığında filtrasyondan önce tam bir fiksasyon uygulamasından kaçınılmalıdır. Çünkü bu ekstraselüler proteinin pıhtılaşp filtreyi tıkamasına ve süstratın boyanmasına yol açarak, detayların seçilmesini de zorlaştıracaktır.

Millipore tekniğinin can alıcı noktasını, tıkanmalara neden olan proteinin ve onun sulu hücre ortamının, serbestçe Millipore filtreden geçmesi ve dökülmüş hücrelerin filtre yüzeyinde tutulması oluşturmaktadır. Proteinlerin erken pıhtılaşması bu hedefi bozacak ve aynı zamanda filtre edilebilecek örneğide azaltacaktır. Aynı zamanda filtre matriksinde buruşmalara ve düzenli olmayan temizlenmeye yol açabilecek fiksatiflerin kullanımından da sakınılmalıdır. Konsantre metil alkol, aseton - formaldehit ve herhangi bir eter - alkol karışımı bu kategoriye girmektedir. % 95 'lik etanolde tam bir fiksasyon, yalnızca örneğin son filtrasyonundan sonra gerçekleştirilmelidir (13). Membran filtreler % 95 'lik etil alkole maruz bırakıldıklarında birazcık genleşirler. Bu sırada alyuvarlar hemolize olup, görünmez hale gelirler. Hemoliz, arayüzlerde tuz solüsyonun ve alkolün karışmasıyla sonuçlanan, düşük alkol konsantrasyonundan kaynaklanmaktadır (9).

Millipore filtrasyonun BAL sıvılarında kullanılması

a) Sitolojik tanı için : Akciğerin çeşitli hastalıklarının sitolojik tanısında, BAL sıvılarının incelenmesi önemli katkılar sağlar. Klasik sitolojik yöntemlerle, BAL sıvısının hücre içeriği incelenebildiği gibi, Millipore filtrasyon yöntemi de bu amaçla kullanılmaktadır. Bu yöntemle BAL sıvılarında; mantar, Pneumocystis carinii, viral inklüzyonlar, malign hücreler ve atipik hücreler yönünden araştırmalar yapılmıştır (17, 19, 28). Bu çalışmalarda, BAL sıvısı 25 mm çapta, 5 µ por büyüklüğünde MF tipi Millipore filtreden süzöldükten sonra, filtre serum fizyolojik ile yıkanıp, % 70 ve %95 'lik alkol ile fikse edildikten sonra; Papanicolaou boyasıyla boyanarak değişik hücre özelliklerine göre incelenmiştir.

b) Asbestos body (AB) - Asbest cisimciği aranması için: Asbeste maruz kalmış kişilerin akciğerlerinden elde edilen balgam veya BAL sıvısı gibi materyallerde, karakteristik yapısı ile tanımlanan asbest liflerine, Asbestos body (AB) - Asbest cisimciği adı verilmektedir.

Çeşitli meslek grupları içinde, özellikle asbest yada asbest ürünleri yapan fabrikalarda çalışanlar, asbest tozu inhalasyonuna maruz kalmaktadır.

Asbest mineralleri; minerolojik yapısına, kimyasal bileşimine ve kristal şekline göre, Serpantin ve Amfibol asbestleri olarak iki büyük gruba ayrılırlar. Serpantin grubunda lifli minerallerden Chrysotil; Amfibol grubunda da: Crocidolit, Amosit, Antrophyllit, Tremolit ve Actinolit mineralleri yer alır. Bütün bu maddeler, silikatlardır ve kristallerden oluşmuşlardır. Asbest tozu inhalasyonu sonucu ortaya çıkan patolojik durumlardan ilk tanınanı Asbestosis' tir. Asbestosis tanısında, solunum sisteminden elde edilen balgam, BAL sıvısı gibi materyallerde, AB bakısı önem taşımaktadır. BAL sıvılarından sitosantrifüj preparatı yapılarak AB bakılabildiği gibi (29, 30); Millipore filtrasyon yöntemi kullanılarak da, AB bakısı yapılmaktadır (4, 5, 6, 18, 21, 22, 30, 31). Bu çalışmalardaki yöntem genel olarak aşağıdaki basamakları içermektedir.

- 1- BAL sıvısı alındıktan sonra, 20 ml' si, eşit miktarda sodyum hipoklorit ile karıştırılıp, organik hücre içeriğinin sindirilmesi için 5 - 10 dakika arasında bir süre bekletilir.
- 2- Karışım daha sonra, por çapı 0,45 µ olan Millipore MF tipi filtreden süzülür.
- 3- Filtre 60 °C' ta kurutulur.
- 4- Filtre lama yerleştirilip, üzerine 1/1 amil ve etil asetat karışımı konarak lamel ile kapatılır.
- 5- Faz kontrast mikroskopta 250 kez büyütmede AB bakısı yapılır.
- 6- Mikroskopik değerlendirmede; iki ucu şişkin, ince şeffaf çekirdekleri olan, yer yer boğumlu bir yapı gösteren, sarı-kahverengi görülen, karakteristik yapılı asbest lifleri Asbestos body (AB) - Asbestos cisimciği olarak değerlendirilir.

Bazı çalışmalarda, AB morfolojisi gösteren yapıların dış katmanın ferroprotein ile kaplı olması ve demir boyalarıyla boyanması nedeniyle, " ferruginous bodies " - demirimsi gövdeler olarak adlandırıldıkları da görülmektedir (5, 6, 31).

AB sayısı 1 ml BAL sıvısı için standartize edilerek, bu alanda uluslararası kabul edilmiş bir AB değerlendirme tablosu ortaya konmuştur (4). Buna göre;

1 ml'inde hiç AB olmayana :	0
1 ml 'sinde 0.1 - 0.9 AB bulunana :	1
1 ml 'sinde 1 - 9.9 AB bulunana :	2
1 ml 'sinde 10 - 99 AB bulunana :	3
1 ml 'sinde 100 - 999 AB bulunana :	4
1 ml 'sinde 1000 'den fazla AB bulunana :	5 değeri verilmiştir.

Faz kontrast mikroskopta yapılan AB sayımlarında, ml' deki asbest sayısına göre, yukarıdaki tablo uygulanmaktadır. 1 ve üzerindeki değerler, asbest maruziyetini göstermektedir.

Millipore filtrasyonun idrarda kullanılması

İdrarda sitolojik inceleme yapılmasında; santrifüleme ile hücrelerin ayrılması, sitosantrifüj yöntemi gibi klasik sitolojik yöntemler, yaygın olarak kullanılmakla beraber, idrarın Millipore membran filtrasyonu yöntemi kullanılarak ta sitolojik incelenmesine olanak veren çalışmalar yapılmıştır (2, 7, 10, 13, 15, 23, 26, 33). İdrarın Millipore filtrasyonu için kullanılan yöntemler çoğunlukla benzer olmakla beraber, farklı basamakları olan uygulamalar da vardır. Genelde uygulanan yöntemde; idrar örneği toplandıktan hemen sonra , çok berrak idrarlar için 100 ml 'ye kadar, bulanık veya patolojik idrarlar buna oranla daha az miktarda % 30 'luk 1 - propanol solüsyonu ile 1 : 3 oranında seyreltilir. Koloidal proteini tamamen dağıtmak ve ayırmak için idrarı içeren kap, derecesi ayarlı olan bir sıcak su banyosuna konarak, kısa bir süre içinde 35 °C 'ta getirilir. İçeriğin tümü , propanol ile beraber 400 ml 'lik hacim , Millipore düzeneğinin toplama kabına boşaltılır ve içinde hazır bulunan SM filtre üzerinden filtre edilir. Kullanılan SM filtre, 45 mm çapında ve por büyüklüğü 5 µ olup, yaklaşık 20 mm Hg vakum altında, süzülür. Son olarak 10 - 20 ml fizyolojik su ile yıkama işlemi uygulanır. Yıkama solüsyonunu, içinde bulunabilecek döküntülerden arındırmak açısından, önceden Millipore filtrasyondan geçirmek gerekir. Daha sonra filtreler kurumadan fiksasyon sıvısına geçirilir. Fiksasyon için % 95'lik alkol (13, 15), % 99' luk isopröpil alkol veya Carnoy solüsyonu (10) kullanılmaktadır. Fikse edilen filtreler, ortadan kesilerek lamlara klipslerle tutturulur ve rutin boyama yöntemlerinden biri ile boyandıktan sonra, alkolde dehidratasyonu yapılarak ksilole getirilir. Balsam ve lamelle kapatılarak preparasyonu tamamlandıktan sonra, mikroskopta incelenir (13, 14).

Blanck ve arkadaşları (2), enjektör ucuna takılabilen 25 mm çapta, 5 µ por büyüklüğü olan, küçük Millipore filtreleri ile yaptıkları çalışmada, basit ve pratik bir filtrasyon tekniği geliştirerek, çocuk idrarlarının sitolojik araştırmalarını gerçekleştirmek üzere kullanmışlardır. Bu yöntemin yaygın sitomegalik inklüzyon hastalığı şüphesinde, rutin bir tarama testi olarak yararlı olabileceğini rapor etmişlerdir.

Taylor ve arkadaşları (26), idrarda Millipore filtrasyon uygulamasında, Epitel hücrelerinden arındırmak için örneklerin, 37 µ 'luk gözleri olan metal elekten ön filtrasyonunun yapılmasını, sonrada 5 µ 'luk Millipore filtre ile filtrasyonu önermişlerdir.

İdrarın sitolojik incelenmesinde, Millipore filtrasyonu uygulanarak yapılan değişik bir yöntem de; Aseton ve denatüre alkolden oluşan solüsyon ile hücre fiksasyonu yapılırken, filtre membranının çözüldüğü ve preparasyon sonucu berrak bir zeminde çok iyi korunmuş hücrelerin elde edildiği bir çalışmadır (33).

Millipore filtrasyonunun uygulandığı diğer vücut sıvıları

Millipore filtrasyon tekniği ; plevral sıvı, asidik sıvı, kan, kalın bağırsak yıkaması ve BOS gibi bir dizi değişik örnek üzerinde başarıyla denenmiştir (7).

Plevral ve Asidik Sıvılar: Plevral ve Asidik sıvılarda çoğu kez, çok geniş hacimlerde pul pul dökülmüş hücrel materyal bulunmaktadır. Filtrasyonda, örneğin tümünün filtre edilmeye kalkılması, genellikle filtre yüzeyinin aşırı kaplanmasıyla sonuçlanacaktır. Proteinlerin önceden çökmemesi için dikkat edilmelidir. Örneğin toplanmasından hemen sonra örnek, her mililitre örnek hacmi için bir ünite heparin eklenerek, heparinize edilmelidir. Filtre her zaman, içinden örnek geçirilmeden önce, normal fizyolojik su ile nemlendirilir. Örnek eklenmeden önce, birkaç ml fizyolojik su filtre tutucusuna boşaltılarak, hücrelerin havaya maruz kalmamaları sağlanır. Heparinize edilmiş sıvı örneği hemen filtrasyon düzeneğinin içerisinde bulunan bir SM filtrenin üzerine boşaltılır. Burada kullanılan SM filtre, 45 mm çapında, 5 µ por büyüklüğündedir. Filtrasyon düzeneğinin vakum kaynağından bağlantısı, örneğinin hava - sıvı düzeyi filtreye ulaşmadan hemen önce ayrılarak kesilir. Bu işlem havanın filtre içinden geçmesini önlemektedir. Filtre tutucusu ayrılarak, filtre çıkarılır ve hücreyle kaplı yüzeyi aşağıya gelecek şekilde hemen fiksatifte yerleştirilir. En az 10 dakikalık bir fiksasyon süresinden sonra filtre araştırılan tekniğe göre boyanır ve mikroskopta incelenir (11, 13, 25, 27). Millipore filtrasyon tekniği ile hücrel detay çok iyi korunmaktadır. Santrifüj ihtiyacını gerektirmediği için de bu teknik daha hızlıdır (7).

Kan : Tanısal sitoloji ve kandaki kanser hücre araştırmalarının sitopreparasyonunda, filtrasyon, kendisini değerli bir teknik olarak ispatlamıştır. Kanla çalışırken iyi bir sitopreparasyon için önemli olan ; ayrıştırma, yoğunlaştırma, toplama ve göstermeden oluşan 4 ana fazı kendi içinde tek başına birleştiren, bazı filtrasyon teknikleri geliştirilmiştir. Bunlardan bilinen en iyi uygulama; işlenmemiş, seyreltilmiş kanın por büyüklüğü 10 µ olan filtreden filtre edilmesidir (8, 16, 24).

Kanla yapılan Millipore filtrasyon çalışmaları içinde, Chang ve arkadaşlarının (3) çalışmasında, değişik bir yöntem uygulanmaktadır. Bu çalışmada; konsantre sıvı filtrasyon apareyine boşaltılmadan önce, flask 5 mm Hg gibi hafif bir vakum altında fizyolojik suyla doldurularak, membran filtre ıslatılmakta ve konsantrede bulunan hücresel elemanların filtrenin tüm yüzeyine daha iyi dağılabilmeleri sağlanmaktadır. Filtrasyon esnasında 25 mm Hg 'dan yüksek bir vakum uygulanmamıştır; Çünkü bu hücrelerin membran filtreye yapışması için önemlidir. Filtre filtrasyon apareyinden çıkartılarak ikiye kesilmiştir. Her parça hemen dondurulmuş bir lamın üzerine yerleştirilerek, hücresel elemanlar dondurulmuş yüzeye gelecek şekilde oturtulmuştur. Hafif fakat yinede basınçla, bir cam veya metal çubuk filtre üzerinden geçirilerek, bunun lama yapışması sağlanmıştır. Lamalar sonra bir boyama tutucusuna yerleştirilerek ya etil asetata yada tetrahidrofurana daldırılmıştır. Membran filtre etil asetatta 90 dakika içinde tamamen çözünürken, tetrahidrofuranda 30 dakikada çözünmüştür. Daha sonra lam üzerindeki hücreler boyanarak incelenmiştir.

Kalın bağırsak yıkaması: Millipore filtrasyon uygulaması yapılan az sayıdaki örneklerden biri olan kalın bağırsak yıkamalarında; boşaltımı yükseltmek için, sıvının her litresine 10 mg bisacodyl tozu eklenerek elde edilen filtrat, 5 µ por çaplı bir Millipore filtreden geçirilerek hücreler elde edilmiştir. Filtre modifiye bir Papanicolaou metoduyla boyanarak, lam ve lamelle kapatılmıştır (12).

Beyin omurilik sıvısı (BOS): Vücuttan özel yöntemler ile alınan beyin omurilik sıvısı (BOS) 'nda bütün hücre tipleri iyi korunamaz. Genelde çok az miktardaki sıvı içinde az sayıda hücrenin kayba uğramadan incelenmesi gereklidir. Bunun için, örneğin alınması ile fiksasyonu arasındaki süre çok kritiktir ve asgari olmak zorundadır. Basit yaymalarda, değerlendirilebilecek hücrelerin azlığı nedeniyle, BOS için Millipore filtrasyonu yöntemi, hücrelerin hepsinin filtre yüzeyinde toplanmasını sağladığı için çok daha iyi sonuçlar vermektedir . Bu yöntemde ; BOS 5 µ por büyüklüğüne sahip bir selüloz membran filtreden süzülür. Yavaşça artan şiddette hafif bir vakum uygulanır. Membran yüzeyindeki sıvı düzeyi gözden kaybolunca, kurummasına izin vermeden üstüne bir miktar % 95 'lik alkol boşaltılır. Vakum kesilir ve boyamadan evvel membranın en az 30 dakika fikse edilmesi sağlanır. Hücrelerin membran üzerinde boyanması normal Papanicolaou tipi boyalarla gerçekleştirilir. Yapıştırma vasatı Permout ile lama yapıştırılır ve bir lamelle kapatılır. Yapıştırma vasatı eklendiğinde membran şeffaf hale gelir. Tüm hücreler membran üzerinde tek bir tabaka halinde, morfolojik araştırma için ideal bir yapı oluştururlar (32).

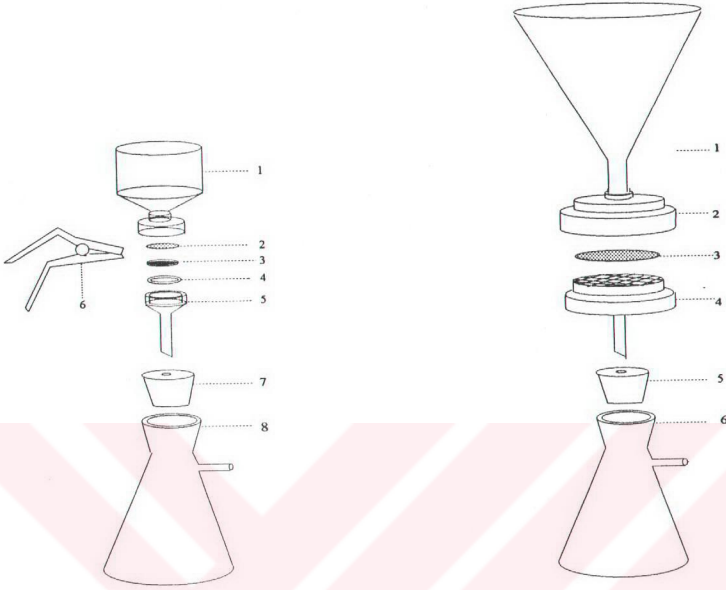
GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamızda Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı 'nda bulunan Millipore filtrasyon düzeneği kullanıldı.

Bu düzeneğin genel görünüşü Resim 1 'de ve şematik olarak içerdiği parçalar, Şekil 2 'de gösterilmiştir.



Resim 1: Millipore filtrasyon düzeneğinin genel görünüşü



A- 25 mm çapta Millipore filtre takımının parçaları:

- 1- Paslanmaz çelikten sıvı doldurulan filtre tutucu bölme
 2- 0.45 μ 'luk Millipore membran filtresi 3- Paslanmaz çelik destek eleği 4- Teflon conta 5- Cam destek yuvası 6- Filtre tutucu kelepçe 7- Lastik tapa 8- Vakum kabı.

B- 45 mm çapta Millipore filtre takımının parçaları:

- 1- Camdan sıvı doldurulan huni bölümü 2- Plastik filtre tutucu üst parça 3- 5 μ 'luk Millipore membran filtresi 4- Filtre tutucu alt ızgara parçası 5- Lastik tapa 6- Vakum kabı

Şekil 2

Millipore filtrasyon düzeneği

Millipore filtrasyon düzeneği Şekil 2'de de görüldüğü gibi çeşitli parçalardan oluşmaktadır. A'da 25 mm çaptaki filtre düzeneği, B'de 45 mm çaptaki filtre düzeneği görülmektedir. B'deki camdan sıvı doldurulan huni bölümü tarafımızdan yapılmış olup, özel bir bağlantı parçasıyla orijinal filtrenin plastik filtre tutucu üst parçasına bağlanmıştır. Diğer orijinal parçaların ayrıntılı özellikleri ve katalog numaraları aşağıda çıkarılmıştır:

- a- Millipore marka paslanmaz çelikten, sıvı doldurulan filtre tutucu bölme, 50 ml 'lik ve 25 ml ile 50 ml hacim çizelgesi; (Kat. No: XX10 025 40).
- b- Millipore marka membran filtre 1: Filtre materyali selüloz ester ve selüloz nitrat karışımı, filtre por gözenegi 0.45 μ , filtre çapı 25 mm, düz beyaz HA tipi; (Kat. No: HAWP 02500).
- Membran filtre 2: Filtre por gözenegi 5.0 μ , filtre çapı 47 mm, düz beyaz SM tipi; (Kat. No: SMWP 04700).
- c- Paslanmaz çelik destek eleği; (Kat. No: XX50 025 01).
- d- Teflon conta; (Kat. No: XX10 025 35).
- e- Cam destek yuvası; (Kat. No: XX10 025 42).
- f- Alüminyum filtre tutucu kelepçe; (Kat. No: XX10 025 03).
- g- No: 8 Neoprene lastik tapa, 9.5 mm delikli; (Kat. No: XX20 047 18).
- h- 1 lt 'lik Vakum kabı; (Kat. No: XX10 047 05).
- i- Vakum basınç pompası, 220 V, 50 Hz; (Kat. No: XX55 220 50).
- k- Plastik filtre tutucu üst parça ile alt ızgara parçası; (Kat. No: SX00 047 00).

Filtrasyon

Çalışmamızda Millipore filtrasyon uygulaması Bronşioalveolar lavaj (BAL) sıvıları, idrar ve batın sıvılarının incelenmesi amacıyla kullanılmıştır. BAL sıvılarında Millipore filtrasyon uygulamasıyla inorganik partikül ve özellikle Asbest cisimciği (Asbestos Body - AB) araştırılması amacıyla çalışıldı.

Bronşioalveolar Lavaj (BAL) materyalinin Millipore filtrasyonu

Göğüs Hastalıkları Ana Bilim Dalı 'ndan asbest maruziyeti düşünülen olgulardan alınıp, kapalı cam kavanozlar içerisinde Ana Bilim Dalı 'mıza gönderilen BAL sıvıları, önce hacimleri ölçülerek, üzerine eşit miktarda sodyum hipoklorit eklendi. Sıvının proteinik madde içeriğinin sindirimi için yapılan bu işlemde, kaynaklarda 5 - 10 dakika bekletme önerilirken (18); deneylerimizde bu sürenin yeterli gelmediği ve sindirilmemiş proteinik maddelerin filtrenin por gözeneklerini tıkadıkları görüldü. Sorunun çözülmesi için, BAL sıvısı eşit miktarda sodyum hipoklorit ile birlikte 1 saat ile 24 saat arasında değişik sürelerde bekletilerek, filtrasyonları yapıldı. Bunlar arasında 1 gece boyunca + 4 °C 'de bekletmenin ,

proteinik maddelerin tamamen sindirilmesi ve materyalin daha kolay filtre edilmesi açısından en iyi sonucu verdiği gözlemlendi. + 4 °C 'de bir gece bekletildikten sonra 50 ml 'si 0.45 µ por çaplı bir Millipore filtreden filtre edildi. Millipore filtre 20 ml distile su ile yıkandıktan sonra filtre tutucusundan çıkartılıp, tozsuz bir ortamda bir gece başka bir filtre kağıdı üzerinde tutuldu ve sonra 2 saat 60 °C 'de etüvde bırakılarak kurutuldu. Bu yöntemin uygulandığında çeşitli çalışmalarındaki uygulamalardan yararlandı (4, 5, 6, 16, 18, 21, 22).

Kaynaklarda, kurutulmuş Millipore filtrenin lam üzerine konduktan sonra üzerine eşit hacimlerde karıştırılmış etil asetat ve amil asetat karışımı damlatıldıktan sonra lamel kapatılıp, faz kontrast mikroskopta inceleme yapıldığı belirtilmektedir (4, 5, 6).

Bu alanda yaptığımız ön araştırmalarda, etil asetat ve amil asetat karışımı ile kapatılmış preparatların hemen bakılması gerektiğini ve zaman geçirildiğinde, preparatların bozulduğunu gözledik. Bu sorunu çözmek için yaptığımız araştırmada, yeni bir yöntem geliştirerek problemi çözdük. Buna göre, eşit oranlarda etil asetat ve amil asetat karışımı, 1 / 1 oranında sentetik balsam ile karıştırılarak, bir kapatma ortamı elde edilmekte ve kurutulmuş filtre lama yerleştirildikten sonra, üzerine bu karışım damlatılarak lamel kapatılmaktadır. İlk uygulamalarda opaklaşmış olan preparatları kurtarmak ve bunları tekrardan şeffaflaştırmak için, lamlar 1 : 1 amil - etil asetat karışımına yerleştirilip, buzdolabında kapiller difüzyon ile filtre tekrar şeffaflanmaya kadar bekletildi. Daha sonra, 1:1 oranında sentetik balsam ve etil-amil asetat karışımı ile kapatıldı. Balsamın, amil - etil asetat ile eşdeğer hacimde kullanılması ile şeffaflığı bozulmayan uzun süre dayanıklı preparatlar elde edildi.

Preparasyonu tamamlanmış preparatlarda, Asbestos Body (AB) değerlendirmesi, Wild M 20 faz kontrast mikroskobunda yapıldı. Mikrofotolar, faz kontrast mikroskopa eklenen Olympus PM 10 Otomatik mikrofoto aygıtı ve Kodacolor Gold II 100 ASA 'lık film kullanılarak çekildi.

İdrar materyalinin Millipore filtrasyonu

İdrarda Millipore filtrasyon uygulaması için materyal, Üroloji Ana Bilim Dalı 'ndan mesane kanseri tanısı konmuş olgulardan toplandı. Uygulanacak yöntem için çeşitli kaynaklardan yararlanıldı (10, 13, 15, 23). Olgulardan steril, kapaklı cam kavanozlar içerisinde 20 - 100 ml sabah idrarları alınıp, üzerlerine hacimlerinin 3 katı kadar % 30 'luk 1 - propanol solüsyonu eklendi. Su banyosunda 35 °C 'ye getirilip, proteinik içeriğinin çözülmesi sağlandı ve sonra, Şekil 2-B 'deki düzenekte, 5.0 µ por çaplı Millipore filtreden filtre edildi. Millipore filtre 100 ml fizyolojik su ile yıkandıktan hemen sonra, % 95 'lik etil alkol içerisine alınıp, en az 30 dakika fiksasyonu yapıldı.

Fiksasyondan sonra filtre ortadan kesilerek, lamalara klipsler ile tutturuldu ve aşağıda verilen yöntemle, Hematoksilen - eosin boyası ile boyandı. Ksilol 'den sonra kapatma vasatı kondu ve lamelle kapatılıp, normal ışık mikroskopunda incelendi.

Hematoksilen - eosin boyama tekniği

1- % 80 'lik etil alkol	10 daldırış (1 daldırış = 1 saniye)
2- % 70 'lik etil alkol	10 daldırış
3- % 50 'lik etil alkol	10 daldırış
4- Distile su	10 daldırış
5- Harris' Hematoksileni	3 - 5 dakika
6- Çeşme suyu altında yıkanır	2 dakika
7- % 70 'lik etil alkol içerisinde % 1 'lik HCl	15 daldırış
8- Çeşme suyu altında yıkanır	2 dakika
9- NH ₄ OH solüsyonu (% 28 'likten 6 damla / 100 cc su)	1 dakika
10- Çeşme suyu altında yıkanır	2 dakika
11- Sulu Eosin	15 daldırış
12- % 95 'lik etil alkol	2 dakika
13- % 95 'lik etil alkol	2 dakika
14- Absolü 1 - propanol	20 dakika
15- 1 - propanol ve Ksilol (1 : 1)	20 dakika
16- Ksilol	20 dakika
17- Hemen kapatma ortamı konup lamel ile kapatılır.	

Batın Yıkama materyalinin Millipore filtrasyonu

Patoloji Ana Bilim Dalı 'dan elde edilen batın yıkama materyallerinden, 2 - 10 ml arasında alınan örnekler, 5.0 μ por çaplı Millipore filtreden filtre edildi. Kanlı materyallerde miktar az alınarak, filtrenin tıkanmamasına dikkat edildi. Hücre içeriği fazla olan, bulanık görünümlü batın sıvılarından, 2 ml alınıp, 1:1 oranında serum fizyolojik ile seyreltikten sonra filtrasyon uygulandı. Filtre, 100 ml fizyolojik su ile yıkandıktan sonra, % 95 'lik etil alkol içerisine alınıp, en az 30 dakika fiksasyonu yapıldı (7, 11, 13).

İdrar preparasyonunda olduğu gibi, bu filtreler de fiksasyondan sonra ortadan kesilerek, lamlara klipslerle tutturuldu ve Hematoksilen - eosin boyası ile boyandı. Ksilol 'den sonra filtre lam üzerine kapatma vasatı ve lamelle kapatılıp, normal ışık mikroskobu ile incelendi.

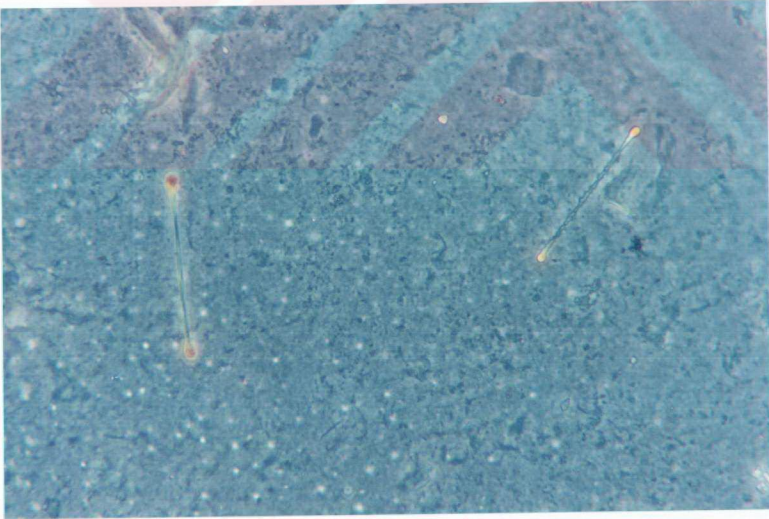
BULGULAR

Çalışmamızda Millipore filtrasyon tekniği uyguladığımız örneklerle ilgili bulgular ana başlıklar altında ortaya konmuştur.

Bronşioalveolar Lavaj (BAL) Sıvısında Millipore Filtrasyon Bulguları

BAL sıvılarında asbest cisimciği (AB) bakılan 10 olguda, faz kontrast mikroskopik incelemelerde filtre yüzeyinde çok sayıda asbest lifi gözlemlendi. Bunlar arasında iki ucu şişkin, yer yer boğumlar içeren gövde kısmı ile, tipik AB yapısı gösteren asbest lifleri değerlendirilmeye alındı.

Resim 2 'de faz kontrast mikroskopta AB 'lerin iki ucu şişkin, yer yer boğumlu çubuk şeklinde gövdesi ile tipik yapısı görülmektedir.



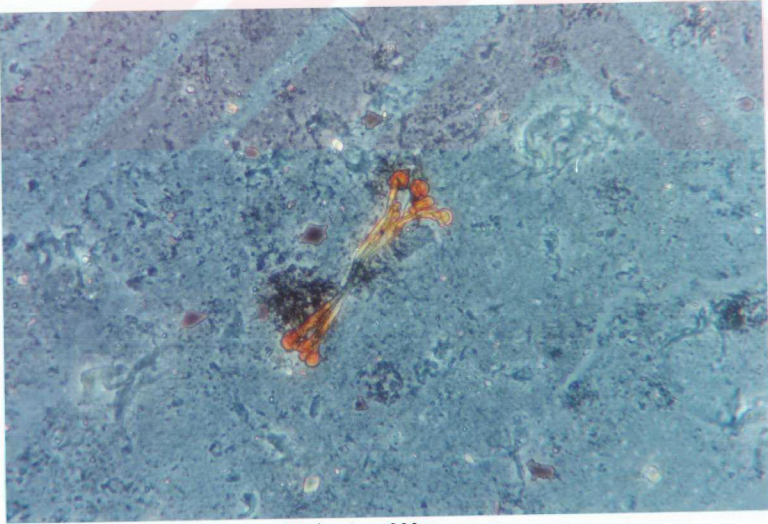
Resim 2: 900 ×

Resim 3 'te çubuk bölgesinde değişik büyüklüklerde boğumlar içeren bir AB görölmektedir.



Resim 3: 900 ×

Bazı olgularda AB 'lerin bir araya toplanarak üçlü dörölü AB grupları oluşturdukları gözlenmiştir (Resim 4).



Resim 4: 900 ×

Çalışmamızda Millipore filtrasyon tekniği uygulanarak BAL sıvılarında AB 'lerin izolasyonu ve preparasyonu ile ilgili bir araştırma yürütülmüş. BAL sıvılarının sayıca yeterli olmaması nedeniyle, AB 'lerin ml 'de AB sayılarına yönelik bir değerlendirme yapılmamıştır.

BAL sıvılarında AB bakışı için, gereç yöntem bölümünde verildiği gibi, standart sonuç veren bir yöntem geliştirilmiş olup, sonuçlarımız bu yöntemin rutin olarak laboratuvarımızda uygulanabileceğini göstermiştir.

İdrarda Millipore Filtrasyon Bulguları

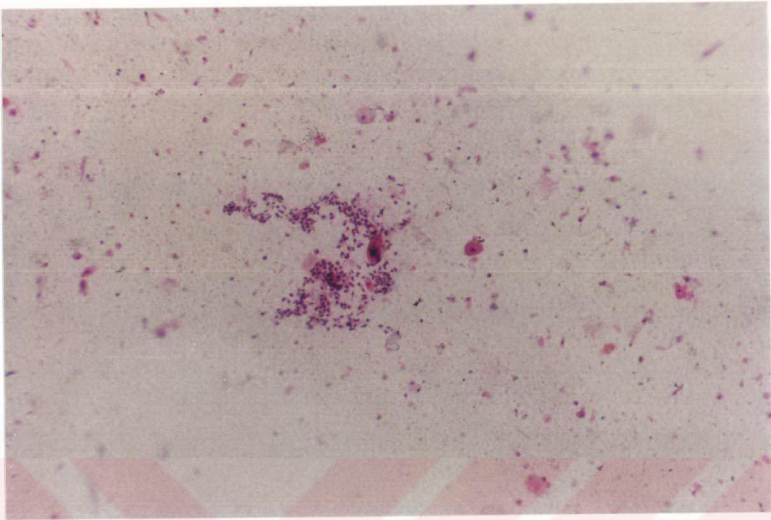
İdrarda Millipore filtrasyon 3 normal kontrol ve biyopsi sonucu Mesane tümörü tanısı almış olan 7 olgunun idrarlarına uygulandı.

Millipore filtrasyonun idrar materyaline uygulanmasında birkaç önemli hususa dikkat edilmesi gerektiği saptandı.

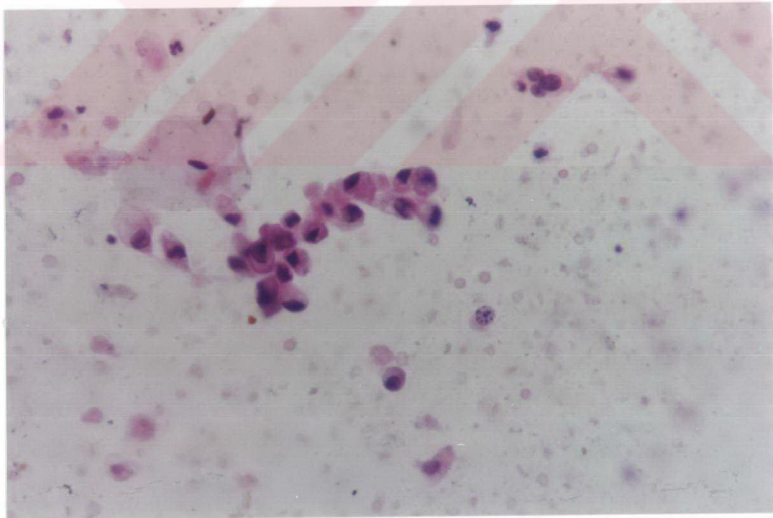
1. İdrarın hücre içeriği

a- Hücre içeriği az idrar materyalleri: Hücre içeriği az, tortusu olmayan, berrak idrarlarda Millipore filtrasyon sonucu elde edilen filtre materyalindeki hücrelerin normal gruplarda (Resim 5) gözleendiği gibi, filtre üzerinde düzgün dağılmış epitel hücreleri ve tek tük yagısal hücreler şeklinde dağılım gösterdiği saptandı.

Hücre konsantrasyonu az olan idrarlarda, Millipore filtrasyon uygulaması mikrohematüri gösteren olguların belirlenmesinde de yararlı oldu (Resim 6). Burada normal gruptan alınan idrar örneğinde tüp epitelleri yanında, az sayıda eritrosit varlığı Millipore filtrasyon yöntemi yardımıyla gösterildi.

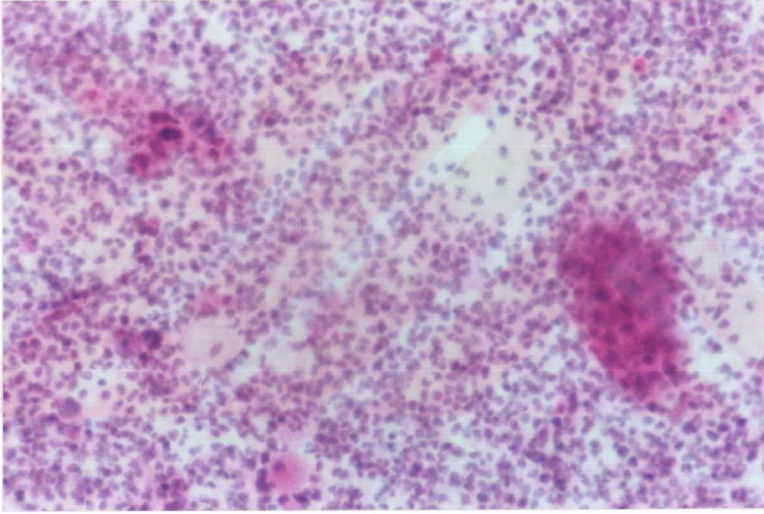


Resim 5: 225 ×



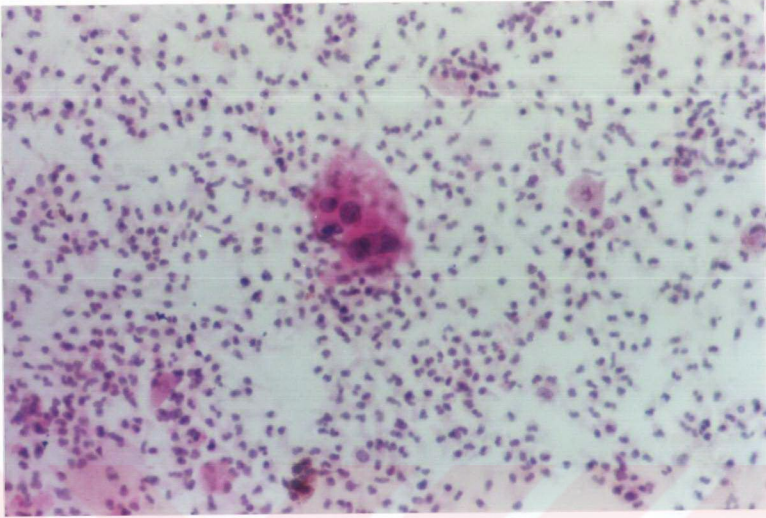
Resim 6: 900 ×

b- Hücre içeriği fazla idrar materyalleri: Resim 7 'de biyopsi ile Mesane tümörü tanısı konmuş bir olgunun çok yoğun yangısal hücrelerden ve çok sayıda tümör hücre ve plakalarından oluşan idrar materyalinin Millipore filtrasyon preparatı görülmektedir. Burada yoğun hücre içeriği nedeniyle, hücrelerin filtre yüzeyinde üst üste toplandıkları gözlenmektedir. Bu durum yangısal hücrelerin yanında bulunan, yer yer tek tek, yer yer plakalar oluşturan tümör hücrelerin seçilmesini ve tanınmasını güçleştirmektedir.



Resim 7: 450 ×

Aynı olgudan alınan idrar materyalinin, % 25 idrar + % 75 propanol olacak şekilde seyreltilmesinden sonra yapılan Millipore filtrasyonda (Resim 8), çok sayıda yangısal hücre ve epitel hücresi yanında, belirgin Mesane tümörü hücresel özelliklerini gösteren plakalar ayırt edilmiştir. Bu da, yoğun hücre içeriği olan idrarlarda, uygun seyreltmelerle hücre ayrıntılarının daha iyi ortaya konulabileceğini göstermektedir.

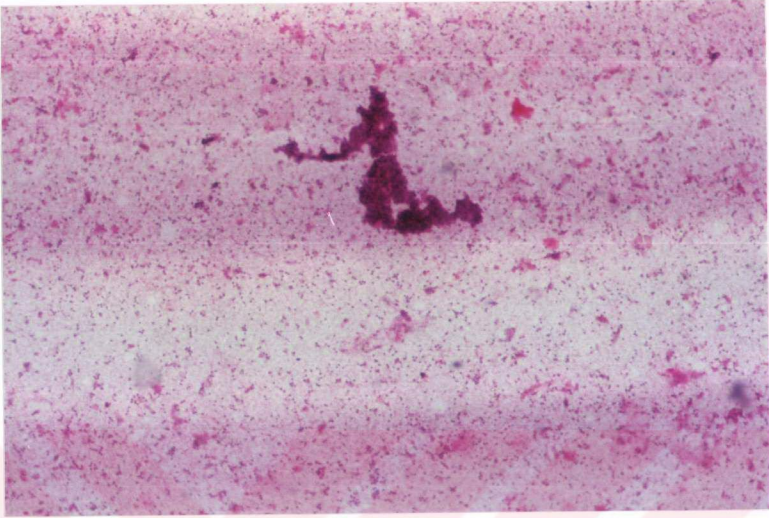


Resim 8: 450 ×

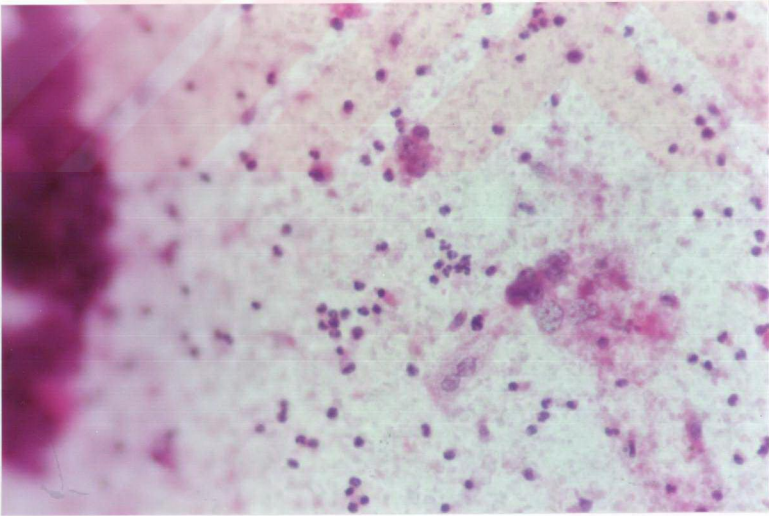
2. Uygulanan vakum miktarı

Yaptığımız çalışmada, idrarın hücre içeriği yanında Millipore filtrenin por büyüklüğüne göre uygulanan vakum miktarının da Millipore filtrasyon sonucunu etkilediğini gözledik.

a- Yüksek vakum uygulaması: Yüksek vakum uygulaması 5 µ por çaplı filtreler için literatürde önerilen 15 - 20 mm Hg arasında yapıldığında, Millipore filtrenin yüzeyinde filtre taşıyıcı yuva oyuklarına, vakum etkisi ile filtrenin çökmesi nedeniyle, filtre yüzeyi mikroskobik düzeyde dalgalı bir görünüm kazanmaktadır. Bu dalgalı görünüm, filtre yüzeyindeki hücreler boyandığı zaman, boyanma ve netlik yapma yönünden sorunlar ortaya çıkarmaktadır. Boyanma özelliği yönünden filtrenin çukur alanları açık, tümsek alanları koyu boyanarak bir farklılık göstermektedir (Resim 9). Koyu ve açık boyanmış bölgelerin yükseklik farklılıkları olması nedeniyle, hücrelerin mikroskop alanındaki netliği de değişmektedir. Resim 10 'da açık renkte boyanmış çukur filtre alanında netleştirilen mesane epiteli ve nötrofillerin hemen yanında, solda kalan koyu boyanmış ve tümsek alandaki hücrelerin aynı anda net olmadığı görülmektedir.

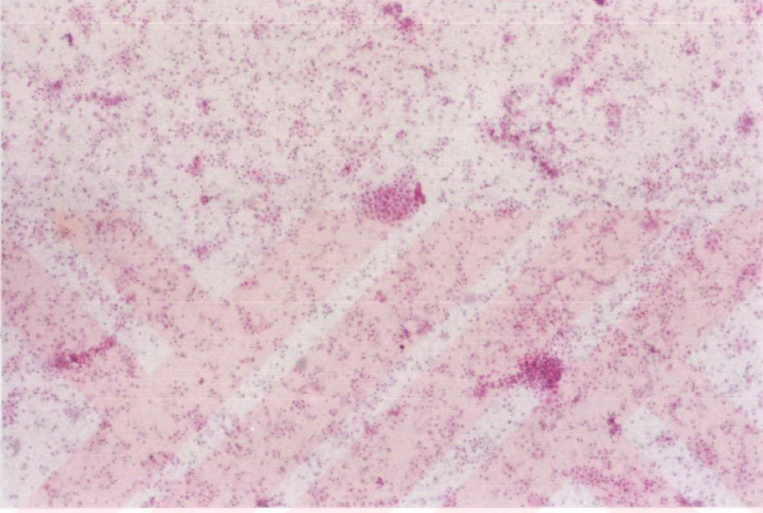


Resim 9: 90 ×



Resim 10: 450 ×

b- Düşük Vakum uygulaması: Hücre içeriği fazla idrar materyalinde, 5 - 10 mm Hg arasında düşük miktarda bir vakum uygulanarak, filtre üzerinde yüksek vakum uygulamasında karşılaşılan sorunların azaltılması, filtre üzerinde dağılan hücresel elemanlarının homojen boyanmaları ve tek düzlemde dağılmaları sağlanmıştır (Resim 11).

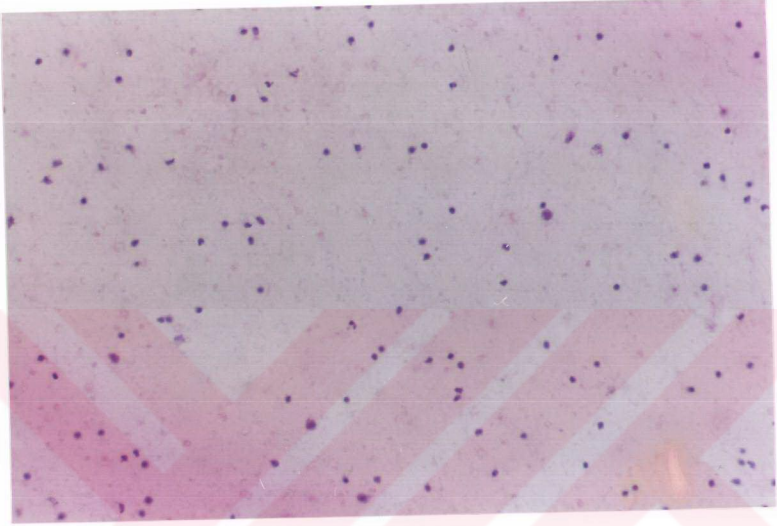


Resim 11: 90 ×

Batın (Peritoneal) Yıkama Sıvılarında Millipore Filtrasyon Bulguları

8 olgunun batın yıkama sıvılarına uygulanan Millipore filtrasyonda, hücre ve proteinik madde içeriği yönünden iki farklı bulgu saptanmıştır.

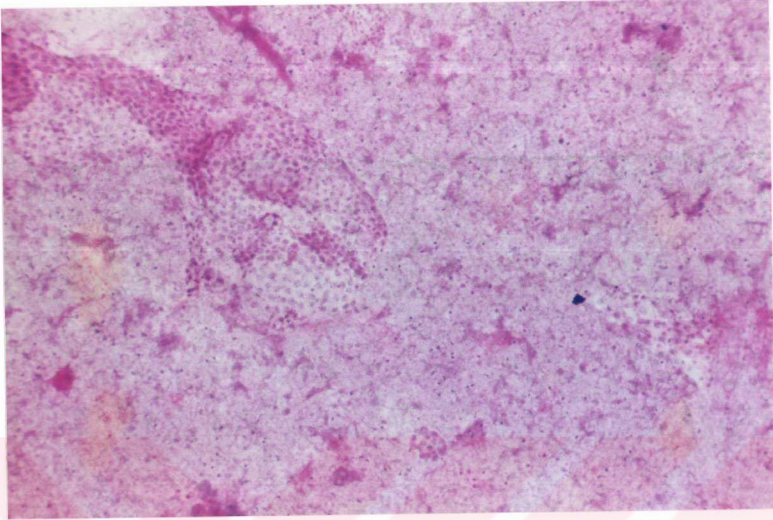
Hücre içeriği ve proteinik maddesi az olgularda (Resim 12), Millipore filtre yüzeyinde hücre dağılımları düzenli, boyanma özelliği yönünden homojen bir görüntü izlendi.



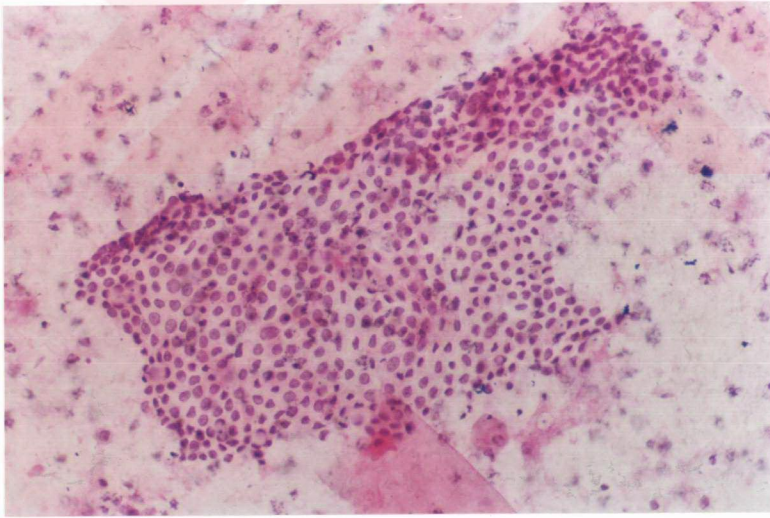
Resim 12: 450 ×

Hücre içeriği ve proteinik maddesi fazla olgularda (Resim 13), proteinik materyalin filtre yüzeyine yoğun bir şekilde toplanmasından dolayı, dağılmış hücrelerin örtülmesi izlenmiş olup, yalnızca plakalar oluşturan büyük hücre grupları seçilebilmektedir. Bu durum nedeniyle, proteinik materyal ve örtülü hücrelerin fazla boya tutması sonucu, preparat daha koyu boyanmaktadır.

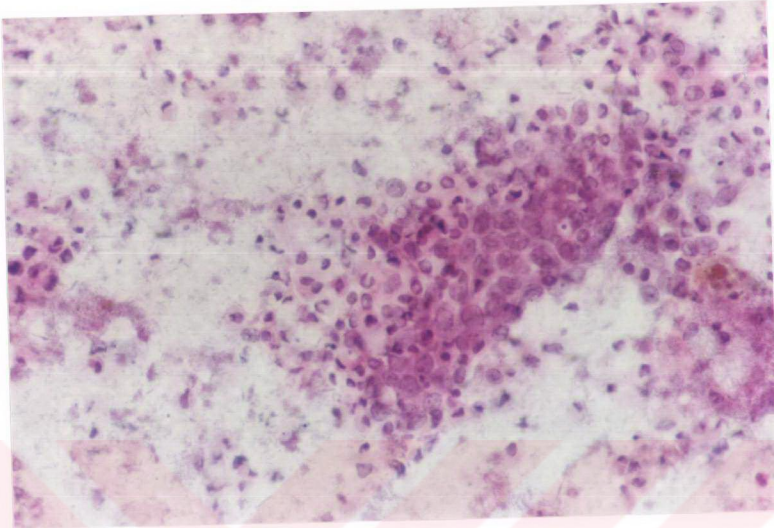
Hücre yoğunluğu çok fazla olmayan batın yıkama sıvılarında (Resim 14), filtre yüzeyinde serbest ve plakalar oluşturan hücre yapılarının net bir şekilde ayırt edilebildiği gözlenmiştir. Bu olgularda hücreler çok iyi kontrast veren bir boyanma özelliği göstermişlerdir.



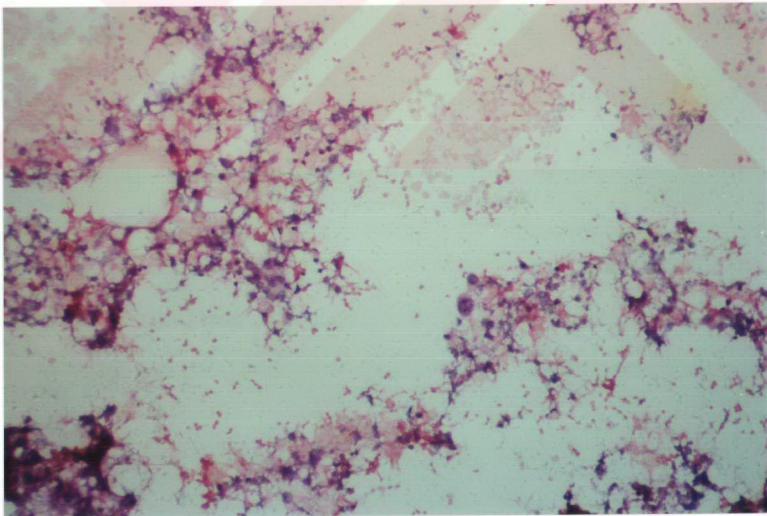
Resim 13: 225 ×



Resim 14: 450 ×



Resim 16: 450 ×



Resim 17: 225 ×

TARTIŞMA

Çeşitli vücut sıvılarının sitolojik değerlendirilmesinde, klasik sitoloji yöntemleri yanında, Millipore filtrasyon tekniği (MFT) de, geniş kullanım alanı bulmuştur. Bu yöntem, bronşioalveolar lavaj, idrar, plevral sıvı, batin yıkama sıvısı, beyin omurilik sıvısı, kan, gastrik sıvı ve sinoviyal sıvı gibi değişik örnekler üzerinde başarıyla denenmiştir (7).

Bizim çalışmamızda, MFT uygulamasıyla Bronşioalveolar lavaj (BAL) sıvısında Asbestos cisimcikleri (Asbestos body - AB) bakılması yanında; idrarda, peritoneal ponksiyon yada yıkama sıvılarında sitolojik hücre özellikleri araştırılmıştır. Birbirinden farklı özelliklerdeki vücut sıvılarında MFT uygulamasını yaparken, sitolojik tanyı destekleyebilecek standart sonuçlar veren, rutin bir uygulama yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızın başlangıcında, MFT 'ni öncelikle balata fabrikasında çalışan ve asbest maruziyeti açısından taranan işçilerin BAL örneklerine uyguladık. Kaynaklardan sağladığımız ve gereç yöntem bölümünde verdiğimiz bilgilerle, BAL sıvılarının preparasyonunu yaparak, AB bakılması için uygulamaya başladık. Ancak, kaynaklarda verilen yöntem bilgilerini, bize gelen materyallere uyguladığımızda, birçok yöntem basamağında değişiklikler yapmamız gereği ortaya çıktı. BAL sıvısının alınmasından sonra uygulanan ilk basamakta; sıvının proteinik madde içeriğinin sindirimi için, sıvının eşit miktarda sodyum hipoklorit ile karıştırılması ve 5 - 10 dakika etkileşime bırakılması önerilirken (18); deneylerimizle bu sürenin yeterli gelmediğini ve sindirilmemiş proteinik maddelerin filtrenin por gözeneklerini tıkadıklarını gördük. BAL sıvısını eşit miktarda sodyum hipoklorit ile birlikte 1 saat ile 24 saat arasında değişik sürelerde bekleterek, filtrasyonlarını yaptık. Bunlar arasında 1 gece boyunca + 4°C 'de bekletmenin , proteinik maddelerin tamamen sindirilmesi ve materyalin daha kolay filtre edilmesi açısından en iyi sonucu verdiğini gözledik.

Filtrasyonda uygulanan vakum, kalan son sıvı hacmi filtreyi geçmeden hemen önce kesilmelidir ve kalan hacmin kendiliğinden süzülmesine izin verilmelidir. Bu filtrenin içine hava girmesini engelliyecektir. Filtrenin kurutulması da BAL sıvısının işlenmesinin önemli bir aşamasını oluşturmaktadır. İyi kurutulmayan veya son sıvı hacmi filtreyi geçmeden önce vakumu kesilmeyen filtrelerde, kapatma işlemi sırasında bozulmalar meydana gelerek filtrelerin opaklaşmasına yol açmaktadır (9). BAL sıvısı filtrasyonunda, kurutulmuş filtrenin kapatılması aşamasında benzer bir sorun ile karşılaştık. Kaynaklarda filtrenin 1 : 1 oranında amil asetat-etil asetat karışımı ile kapatılarak mikroskopta incelenmesi önerilmektedir (4, 5, 6,). Bizim çalışmamızda, bu uygulama yapıldıktan kısa bir süre sonra kapatma ortamının buharlaşmış preparattan uzaklaşmasına bağlı olarak, filtrenin opaklaştığını gözledik. Bu şekilde hazırlanmış filtre dayanıksız olup, bir saat içinde mikroskopik bakışının yapılması gerekiyordu. Bu sorunu çözmek için yaptığımız araştırmada, yeni bir yöntem geliştirerek problemi çözdük. Buna göre, eşit oranlarda etil asetat ve amil asetat karışımı, 1 : 1 oranında sentetik balsam ile karıştırılarak, bir kapatma ortamı elde edildi. Kurutulmuş filtre lama yerleştirildikten sonra, üzerine bu karışım damlatılarak lamel kapatıldı. Bu suretle uzun süre bozulmadan inceleme olanağını veren preparatlar elde edildi. İlk uygulamalarda opaklaşmış olan preparatları kurtarmak ve bunları tekrardan şeffaflaştırmak için, lamlar 1 : 1 amil - etil asetat karışımına yerleştirilip, buzdolabında kapiller difüzyon ile filtre tekrar şeffaflanmaya kadar bekletildi. Daha sonra, 1:1 oranında sentetik balsam ve etil-amil asetat karışımı ile kapatıldı. Balsamın, amil - etil asetat ile eşdeğer hacimde kullanılması ile şeffaflığı bozulmayan uzun süre dayanıklı preparatlar elde edildi.

Gill ve arkadaşları (9), kurumuş Millipore filtrelerin beyaz opak görünümünün ışığın porlardaki difraksiyonundan kaynaklandığını, benzer kırılma oranına sahip sıvılarla preparasyon yapıldığında transparan hale getirilebileceklerini ve bu amaç için Eukitt adlı özel bir preparasyon ortamının kullanılmasını önermektedirler. Biz Eukitt bulamadığımız için sorunu yukarıda belirttiğimiz biçimde çözümledik.

MFT' nin idrarda uygulamasında, kaynaklarda önerildiği gibi (2, 7, 13), 45mm çapta ve 5 µ por büyüklüğünde Millipore filtre kullanıldı. Ancak, kaynaklarda önerilen 15-20 mm Hg arasındaki vakum uygulamasında; 15 mm Hg' dan fazla vakum uygulandığında ve filtrasyon süresi iki dakikayı geçtiğinde, filtrede dalgalanmalar meydana geldiğini gözledik. Bu dalgalanma, boyanmış filtrelerde hücrelerin iki ayrı plan üzerinde netleşmesine ve

mikroskopik değerlendirmenin gleşmesine neden oldu. Yaptığımız araştırma ile, idrar filtrasyonunda, 5-10 mm Hg gibi düşük miktarda bir vakum uygulaması ile, dalgalanma sorunu çözümlenerek, filtre üzerinde dağılan hücresel elemanların homojen boyanmaları ve tek düzlemde dağılmaları sağlanmıştır.

Vakum oluşturmak için enjektör kullanılmış olan Blanc ve arkadaşlarının çalışmasında (2), tekniğin daha kolay ve ekonomik olduğu, enjektörün kirlenmediği için temizlenmesinin gerekmediği, filtrasyonun hızlı gerçekleştiği, sitolojik detay ve hücre kaybı görölmediği bildirilmiş olup, idrarda sitomegalik inklüzyon aranmasında kullanılmıştır.

Taylor ve arkadaşları (26), idrarın millipore filtrasyonu ile elde edilen bulguların, şüpheli mesane, üreter ve renal pelvis epiteliyal tümörlerinin sitolojik incelenmesinde tanı için tek araştırma olarak kullanılamayacağını, ancak bu prosedürün, sistoskobik ve piyelografik bulguların bir tümör varlığını düşündürdüğü durumlarda değerli ve yararlı olabileceğini rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da, klinik tanısı ve patolojik biyopsi sonucu mesane tümörü tanısı almış olguların idrar örnekleri kullanıldı. Uygun preparasyonları yapılan olgularda, klinik ve patolojik tanıyı destekler sonuçlar aldık.

MFT 'nin batın yıkama sıvılarına uygulanmasında da, hücre içeriği ve proteinik materyal içeriğine göre değişik sonuçlar aldık. Batın yıkama sıvısının filtrasyonunda, filtrenin önceden serum fizyolojik ile ıslatılması önerilmektedir (11, 13). İlk uygulamamızda bu öneriyi uyguladık. Ancak, filtre edilen sıvı içerisinde bulunan hücrelerin, filtrenin yalnızca bir bölümü üzerinde toplanmasına neden olan bir sonuç aldık. Filtreyi ıslatmadan, batın yıkama materyalini doğrudan doğruya filtre ederek, hücrelerin filtre üzerine daha homojen olarak dağıldıklarını gördük ve filtrasyona bu şekilde devam ettik. Batın yıkama sıvısındaki hücrelerin kümeleşmesini engellemek için, her ml 'sine 1 ünite heparin kullanılması önerilmekle (11) beraber, bizim uygulamamızda, çok daha iyi preparasyonlar sağlamaması nedeniyle, bu işlemi uygulamadık

Yüksek kalitedeki hücresel morfoloji detaylarını elde etmek için filtrenin kurumasına izin verilmeden, hemen fikse edilmelidir. Fiksasyon filtrasyondan sonra yapılmalıdır. Çünkü fikse olmamış hücreler, hücre membranlarının yüzeyine daha iyi tutunurlar (11, 13). Bizim

çalışmamızda da, filtrasyon sonrası serum fizyolojik ile yıkama ve % 95 'lik alkol ile fiksasyon uygulandı.

Millipore filtrasyonun birçok vücut sıvısına uygulanması ile sitolojik tanı alanında önemli gelişmeler elde edilmiştir. Ancak, bu yöntemin çeşitli zorlukları da araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. Bernhardt ve arkadaşları (1) yaptıkları çalışmada; membran filtrelerin genel kullanımını azaltan birçok dezavantaja sahip olduklarını ileri sürmüşlerdir. Bunlara göre : a- Filtrenin çok pahalı olması; b- Özel lam ve lamele gereksinim olması; c- Normal bir lama uyması için boyanmış filtrenin sıkıcı olan kesme aşaması; d- Boyama esnasında özel plastik filtre tutucuların kullanılması; e- Filtrasyon için vakum pompası ve manometre kullanılması; f- Filtrenin havayı çekip kuruma tehlikesi; g- 5 µ por büyüklüğündeki filtrenin çabuk tıkanması; h- Filtrenin yapıştırılması esnasında bozulması; i- Boyama esnasında filtrenin temizlenmesindeki zorluklar bu yöntemin dezavantajlarını oluşturmaktadır.

Bizim çalışmamızda da, MFT 'nin BAL sıvısı, idrar ve batın yıkama sıvılarıyla ilgili uygulamasında, çeşitli zorluklarla karşılaşmış ve bunların çözümlenilmesine çalışılmıştır.

SONUÇ

Elimizdeki kaynaklara dayanarak yürütmüş olduğumuz çalışmamızın sonucunda, BAL sıvısında AB taraması için kullanılan yöntemle memnun edici sonuçlar elde edilmiş olup, AB bakısı için standart bir uygulama yöntemi oluşturuldu. Bu yöntemle, asbest maruziyeti olan kişilerde, BAL sıvısında AB bakısı yapılarak, asbest maruziyetini ortaya koyabilecek ve rutin uygulanabilecek standart bir uygulama getirilerek sitolojik taniya katkı sağlandı.

İdrar materyalindeki uygulamada, materyalin içerdiği hücre yoğunluğuna göre uygun seyreltmeler yapıldığında iyi sonuçlar elde edilmiş olup, standart bir uygulama yöntemi oluşturulması için yeni çalışmalar yapılması gerektiği saptandı.

Batın yıkama materyalinde; hücre ve protein içeriği fazla, kanlı materyallerde, uygun seyreltmeler yapıldığında, iyi sonuçlar elde edildi. Ancak tam standart bir yöntemin oluşturulması için, filtrede çabuk tıkanmaya neden olan çok fazla proteinik içeriğin ortadan kaldırılmasına yönelik çalışmaların geliştirilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

İdrar ve batın yıkama sıvılarından yapılan preparasyonlarda, iyi bir hücre eldesi sağlanmış olup, sitosantrifüj preparatları ile karşılaştırıldıklarında hücresel morfoloji ile detayların daha iyi korundukları ve büyük hacimdeki sıvılar içerisindeki az sayıdaki hücrelerin izole edilmesi için uygun bir yöntem oluşturduğu gözlemlendi.

ÖZET

Günümüzde Millipore filtrasyon tekniği (MFT), sanayinin birçok dalında sıvıların sterilizasyonunda, mikrobiyolojik analizinde ve santral sistem suyunun temizlenmesinde kullanıldığı gibi; tıpta, çeşitli hastalıkların sitolojik tanısında, hücre ve doku kültürü sarf malzemelerinin temizliğinde ve sterilizasyonunda; steril oda gibi, bazı yerlerin havasının belirli büyüklükteki partiküllerinden arındırılmasında kullanılmaktadır.

Çalışmamızda, MFT uygulamasıyla Bronşioalveolar lavaj (BAL) sıvısında Asbestos cisimcikleri (Asbestos body - AB) bakılması yanında; idrarda, peritoneal ponksiyon yada yıkama sıvılarında sitolojik hücre özellikleri araştırıldı.

BAL sıvısında AB bakısı için, sıvı eşit miktarda sodyum hipoklorit ile karıştırılıp bir gün bırakıldı. 25 mm çapta, 0.45 mikron por büyüklüğünde Millipore filtreden filtre edilerek, 60°C 'de kurutuldu ve lam üzerine yerleştirilip, 1 / 1 oranında karıştırılmış sentetik balsam ve 1 : 1 etil asetat amil asetat karışımından oluşan kapatma ortamı ve lamel ile kapatıldı. Preparatlar faz kontrast mikroskopunda 250 kez büyütmede incelenerek AB değerlendirmesi yapıldı

İdrar materyali 1 : 3 oranında % 30 'luk 1 - propanol ile seyreltilip , 45 mm çapta, 5 mikron por büyüklüğünde Millipore filtreden filtre edildi. Filtre % 95 'lik etil alkolde fikse edildikten sonra, hematoksilen - eosin boyası ile boyandı ve normal ışık mikroskopunda hücrelerin sitolojik özellikleri açısından incelendi.

Batın materyali proteinik içeriğine ve kanlı olup olmadığına göre, fizyolojik su ile seyreltilip, 45 mm çapta, 5 mikron por büyüklüğünde Millipore filtreden filtre edildi. Filtre % 95 'lik etil alkolde fikse edildikten sonra, hematoksilen - eosin boyası ile boyandı ve normal ışık mikroskopunda hücrelerin sitolojik özellikleri açısından incelendi.

Çalışmamızın sonucunda, BAL sıvısında AB taraması için kullanılan yöntemle memnun edici sonuçlar elde edilmiş olup, AB bakısı için standart bir uygulama yöntemi oluşturuldu. Bu yöntemle, asbest maruziyeti olan kişilerde, BAL sıvısında AB bakısı yapılarak, asbest maruziyetini ortaya koyabilecek ve rutin uygulanabilecek standart bir uygulama getirilerek sitolojik tanıya katkı sağlandı.

İdrar materyalindeki uygulamada; materyalin içerdiği hücre yoğunluğuna göre uygun seyreltmeler yapıldığında iyi sonuçlar elde edilmiş olup, standart bir uygulama yöntemi oluşturulması için yeni çalışmalar yapılması gerektiği saptandı.

Batın yıkama materyalinde; hücre ve protein içeriği fazla, kanlı materyallerde, uygun seyreltmeler yapıldığında, iyi sonuçlar elde edildi. Ancak tam standart bir yöntemin oluşturulması için, filtrede çabuk tıkanmaya neden olan çok fazla proteinik içeriğin ortadan kaldırılmasına yönelik çalışmaların geliştirilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

İdrar ve batın yıkama sıvılarından yapılan preparasyonlarda, iyi bir hücre eldesi sağlanmış olup, sitosantrifüj preparatları ile karşılaştırıldıklarında hücresel morfoloji ile detayların daha iyi korundukları ve büyük hacimdeki sıvılar içerisindeki az sayıdaki hücrelerin izole edilmesi için uygun bir yöntem oluşturduğu gözlemlendi.



ZUSAMMENFASSUNG

Heutzutage wird die Millipore Filtration Technik (MFT) wie neben den vielen Bereichen der Industrie, z. B. in der Sterilization von Flüssigkeiten, deren Mikrobiologische Analyse und zur Reinigung des Wassers vom Zentralen Wassersystem; auch in der Medizin, z. B. zur Zytologischen Identifikation verschiedener Krankheiten, zur Reinigung und Sterilization der für die Zell- und Gewebekulturen verwendeten Materialien, zur Reinigung der Luft von Räumen, wie z. B. steriles Kabinett, von Partikeln bestimmter Größen angewendet.

In unserer Arbeit wurde die MFT neben dem bestimmen von Asbestosekörperchen (Asbestos body - AB) in der bronchoalveolaren Lavage (BAL) Flüssigkeit, auch zum untersuchen von Zytologischen Zellbesonderheiten von Urin, Peritonealer Punktion- oder Waschflüssigkeit verwendet.

Für die Bestimmung von AB in der BAL Flüssigkeit, wird diese mit dem gleichen Volumen Natriumphosphat vermischt und einen Tag lang zum einwirken gelassen. Nachdem es durch einen Millipore Filter von 25 mm Durchmesser und 0.45 Mikrometern Porengröße gefiltert wird, wird es bei 60 °C getrocknet, auf einen Objektträger gelegt, und mit Hilfe einer in der Proportion von 1 / 1 mit synthetischem Balsam und mit der in der Proportion von 1 : 1 angefertigten Äthyl- und Amylacetat Lösung selbst zusammengestellten Eindeckmittel mit einem Deckglass verdeckt. Die Präparate werden anhand eines Phasenkontrast Mikroskopes mit einer Gesamtvergrößerung von 250 nach AB durchsucht.

Die Urin Probe wird in einer Proportion von 1 : 3 mit 30 % 'igem 1 - Propanol verdünnt und durch einen Millipore Filter mit 45 mm Durchmesser und 5 Mikrometern Porengröße gefiltert. Nach dem fixieren des Filters in 95 % 'igem Äthylalkohol, wird es mit einer Hematoxylen - Eosin Färbung gefärbt und die Zellen mit einem normalem Lichtmikroskop nach deren Zytologischen Eigenschaften hin untersucht.

Die Peritoneale Waschflüssigkeitsprobe wird nach ihrem Eiweiß- und Blutgehalt mit physiologischem Salzwasser verdünnt und durch einen Millipore Filter mit 45 mm Durchmesser und 5 Mikrometern Porengröße gefiltert. Nach dem fixieren des Filters in

95 % 'igem Äthylalkohol, wird es mit einer Hematoxylen - Eosin Färbung gefärbt und die Zellen mit einem normalem Lichtmikroskop nach deren Zytologischen Eigenschaften hin untersucht.

Am Ende unserer Arbeit wurde mit der Methode für das aufspüren von AB in der BAL Flüssigkeit ein gutes Resultat erzielt und für diese Anwedung eine gute Standartsmethode zusammengestellt. Mit dieser Methode können von Leute mit Asbest Belastung, mit dem aufsuchen von AB in deren BAL Flüssigkeit, die Asbest Belastung gezeigt und mit einer in der Routine verwendbaren Standartsmethode, der Zytologischen Diagnose ein Beitrag geleistet werden.

In der Methode für die Urin Probe wurde ein gutes Resultat erzielt, nachdem diese nach ihrem Zellgehalt hin verdünnt wurde; doch für das Erstellen einer Standartsmethode müssen noch weitere neue Arbeiten durchgeführt werden.

In der Methode für die Peritoneale Waschflüssigkeitsprobe wurde ein gutes Resultat erzielt, nachdem diese angemessen nach ihrem Zell-, Eiweiß- und Blutgehalt verdünnt wurde. Doch um eine korrekte Standartsmethode zu erstellen, müssen zusätzliche Arbeiten für das Entfernen des überflüssigen Proteingehalts unternommen werden, damit diese das Filter nicht zu schnell verstopft.

Bei den Präparationen der Urin- und Peritonealen Waschflüssigkeitsproben wurde ein guter Zellertrag erzielt und bei der Vergleichung deren, mit Zytocentrifuge Verfahren angefertigten Präparationen festgestellt, daß die Zellmorphologie und Einzelheiten besser aufbewahrt werden. Beobachtet wurde auch, das dieses, für die Isolierung von wenigen Zellen die sich in großen Flüssigkeitsvolumen befinden, eine gute Methode darstellt.

KAYNAKLAR

- 1- Bernhardt, H., Gourley, R. D., Young, J. M., Shepherd, M. C., Killian, J. J., "A Modified Membrane-Filter Technic for Detection of Cancer Cells in Body Fluids ", Am. J. Clin. Path., 36, 5, 1961, 462 - 464.
- 2- Blanc, W. A., Gaetz, R., " Simplified Millipore Filter Technique for Cytologic Diagnosis of Cytomegalic Inclusion Disease in Examination of Urine ", Pediatrics, 29, 1962, 61 - 64.
- 3- Chang, S. C., Russell, W. O., " Dissolving Membrane Filters in Detecting Malignant Cells in Circulating Blood ", Am. J. Clin. Path., 44, 5, 1965, 530 - 532.
- 4- De Vuyst, P., Jedwab, J., Dumortier, P., Vandermoten, G., Vande Weyer, R., Yernault, J. C., " Asbestos Bodies in Bronchoalveolar Lavage ", Am. Rev. Respir. Dis., 126, 1982, 972 - 976.
- 5- De Vuyst, P., Dumortier, P., Léophonte, P., Vande Weyer, R., Yernault, J. C., " Mineralogical analysis of bronchoalveolar lavage in talc pneumoconiosis ", Eur. J. Respir. Dis., 70, 1987, 150 - 156.
- 6- De Vuyst, P., Dumortier, P., Moulin, E., Yourassowsky, N., Yernault, J. C., " Diagnostic Value of Asbestos Bodies in Bronchoalveolar Lavage Fluid ", Am. Rev. Respir. Dis., 136, 1987, 1219 - 1234.
- 7- Del Vecchio, P. R., DeWitt, S. H., Borelli, J. I., Ward, J. B., Wood, T. A., Malmgren, R. A., " Application of Millipore Filtration Technique to Cytologic Material ", J. Nat. Cancer Inst., 22, 1959, 427 - 431.
- 8- Frost, J. K., Gill, G. W., Hankins, A. G., La Corte, F. J., Miller, R. A., Hollander, D. H., " Cytology Filter Preparations: Factors Affecting their Quality for Study of Circulating Cancer Cells in the Blood ", Acta Cytol., 11, 5, 1967, 363 - 373.
- 9- Gill, G. W., " Methods of Cell Collection on Membrane Filters ", Tutorials of Cytology, 4, 2, 1976, 34 - 44.
- 10- Harpst, H. C., Ware, R. E., Eisenberg, R. B., O'Dell, J. B., " Exfoliative Cytology of the Urinary Tract: Evaluation of the Millipore Technic ", Acta Cytol., 5, 3, 1961, 195 - 197.

- 11- Juniper, K., Chester, C. L., " A Filter Membrane Technique for Cytological Study of Exfoliated Cells in Body Fluids ", *Cancer*, 12, 2, 1959, 278 - 285.
- 12- Knoernschild, H. E., Cameron, A. B., Zollinger, R. M., " Millipore Filtration of Colonic Washings in Malignant Lesions of the Large Bowel ", *American Journal of Surgery*, 101, 1961, 20 - 22.
- 13- Millipore Filter Corporation, " Techniques for Exfoliative Cytology ", *Application Data Manuel*, Bedford, MA U.S.A., 1964, 1- 18.
- 14- Millipore Filter Corporation, " 1991 - 1992 Millipore Direct ", Millipore, Bedford, MA U.S.A., 1991, 8 - 21.
- 15- Naib, Z. M., " Exfoliative Cytology of Renal Pelvic Lesions ", *Cancer*, 14, 5, 1961, 1085 - 1087.
- 16- Pruitt, J. C., Hilberg, A. W., Kaiser, R. F., " Malignant Cells in Peripheral Blood ", *The New England Journal of Medicine*, 259, 24, 1958, 1161 - 1164.
- 17- Radio, S. J., Rennard, S. I., Ghafouri, M. A., Linder, J., " Cytomorphology of Alternaria in Bronchoalveolar Lavage Specimens ", *Acta Cytol.*, 31, 3, 1987, 243 - 248.
- 18- Roggli, V. L., Piantadosi, C. A., Bell, D. Y., " Asbestos Bodies in Bronchoalveolar Lavage Fluid ", *Acta Cytol.*, 30, 5, 1986, 470 - 476.
- 19- Saltini, C., Hance, A. J., Ferrans, V. J., Basset, F., Bitterman, P. B., Crystal, R. G., " Accurate Quantification of Cells Recovered by Bronchoalveolar Lavage ", *Am. Rev. Respir. Dis.*, 130, 1984, 650 - 658.
- 20- Schleicher and Schuell GmbH, " Membrane Filtreler Membrane Tabakalar ", *Ser Matbaacılık* 554 03 80, 1980.
- 21- Schwartz, D. A., Galvin, J. R., Burmeister, L. F., et al., " The Clinical Utility and Reliability of Asbestos Bodies in Bronchoalveolar Fluid ", *Am. Rev. Respir. Dis.*, 144, 1991, 684 - 688.
- 22- Sebastien, P., Armstrong, B., Monchaux, G., Bignon, J., " Asbestos Bodies in Bronchoalveolar Lavage Fluid and in Lung Parenchyma ", *Am. Rev. Respir. Dis.*, 137, 1988, 75 - 78.
- 23- Solomon, C., Amelar, R. D., Hyman, R. M., Chaiban, R., Europa, D. L., " Exfoliated Cytology of the Urinary Tract: A new Approach with Reference to the Isolation of Cancer Cells and the Preparation of Slides for Study ", *J. Urol.*, 80, 1958, 374 - 382.

- 24- Stevenson, T. D., von Haam, E., " Cancer Cell Detection in the Peripheral Blood II. Comparison of Techniques Using Seeded Specimens ", *Acta Cytol.*, 9, 2, 1965, 111 - 115.
- 25- Taft, P. D., Arizaga - Cruz, J. M., " A Comparison of the Cell Block, Papanicolaou, and Millipore Filter Technics for the Cytologic Examination of Serous Fluids ", *Am. J. Clin. Path.*, 34, 6, 1960, 561 - 564.
- 26- Taylor, J. N., Macfarlane, E. W. E., Ceelen, G. H., " Cytological Studies of Urine by Millipore Filtration Technique: Second Annual Report ", *J. Urol.*, 90, 1, 1963, 113 - 115.
- 27- Thomison, J. B., " Combination of Millipore Filtration and Fluorescence Microscopy in Cytologic Examinations ", *Am. J. Clin. Path.*, 35, 5, 1961, 407 - 410.
- 28- Thompson, A. B., Robbins, R. A., Ghafouri, M. A., Linder, J., Rennard, S. I., " Bronchoalveolar Lavage Fluid Processing ", *Acta Cytol.*, 33, 4, 1989, 544 - 549.
- 29- Topçuoğlu, N., " İnsan bronş lavaj materyalinde alveolar makrofajlar ve asbest liflerinin tarama elektron mikroskopik yapısı. Enerji dağılımlı X ışını analiz yöntemiyle elementer analiz ", Profesörlük takdim Tezi, E. Ü. Tıp Fakültesi, 1988.
- 30- Tuomi, T., Oksa, P., Anttila, S., et al., " Fibres and asbestos bodies in bronchoalveolar lavage fluids of asbestos sprayers ", *Br. J. Ind. Med.*, 49, 1992, 480 - 485.
- 31- Utidjian, M. D., Gross, P., deTreville, R. T. P., " Ferruginous Bodies in Human Lungs ", *Arch. Environ Health*, 17, 1968, 327 - 333.
- 32- Wagner, J. A., Frost, J. K., Wisotzkey, H., " Subarachnoid Neoplasia: Incidence and Problems of Diagnosis ", *Southern Medical Journal*, 53, 1960, 1503 - 1508.
- 33- Wheeler, E. S., Shea, M. M., " Dissolving Millipore Filters in Urinary Cytology ", *Am. J. Clin. Path.*, 41, 1, 1964, 109 - 112.

ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Almanya 'nın Münih kentinde doğdum. 1976 - 1984 yılları arasında Münih 'teki Manzoschule Grundschule ilkokulu ve Moosacher Gymnasium ile Arthur - Kutscher - Realschule ortaokullarında öğrenim gördüm. 1984 yılında ailemle Türkiye 'ye kesin dönüş yaptım. 1984 - 1987 yılları arasında İzmir Bornova Anadolu Lisesi 'nde ön lisansımı tamamladım.

1987 - 1988 öğretim yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü 'ne girdim ve 1991 yılında mezun oldum.

Temmuz. 1991 - Ekim. 1991 arasında İzmir 'de Tıbbi Malzeme satan özel bir şirkette satış sorumlusu olarak çalıştım. Aynı yılın Ekim ayında Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 'nün açtığı sınavda, E. Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalının Yüksek Lisans programını kazandım ve öğrenimine başladım.