**HEMATOLOJİ LABORATUVARI: KULLANILAN ÖRNEKLER**

Laboratuvara gelen örneklerden doğru sonuçlar elde edebilmek için laboratuvara gelen örneklerin de sağlıklı olması gerekir. Hematolojik tetkiklerin çoğu için antikoagülanlı (pıhtılaşmayı önleyen bir bileşim) kan ya da kemik iliği örnekleri kullanılır.

**KULLANILAN ANTİKOAGÜLANLAR:**

Hematoloji laboratuvarında en sık kullanılan antikoagülanlar:

Dipotasyumetilendiamin tetraasetat (K2EDTA),

Heparin ve

Sodyum Sitrat tır.

Test sonuçlarının doğruluğu için laboratuvar tarafından tanımlanmış olan antikoagülanın kullanılması ve antikoagülan: kan oranının doğru olması önem taşır.

***EDTA (K2EDTA)* :** **1.5 mg/1 mL kan** olarak kullanılır. İyonize kalsiyumu (Ca++ ) bağlayarak (şelasyon) pıhtılaşmayı önler. Tam kan sayımı veya burada yer alan parametrelerin tek tek değerlendirilmesi için, moleküler çalışmalar için tercih edilen antikoagülandır. EDTA oranının fazla olması durumunda eritrositlerdeki büzüşmeye bağlı hatalı ölçümler (ör: hatalı Hematokrit değerleri, trombositlerin kümeleşmesine bağlı yalancı trombosit sayım düşüklüğü....) olabilir. Geciktirilmemek şartıyla bu örneklerden lama yayma yapılması mümkün olabilir.

 ***Heparin:*** **0.2 ml doymuş heparin /1ml kan** olarak kullanılır. Antitrombin gibi etki göstererek pıhtılaşmayı önler. Ozmotik frajilite testi ve sitogenetik çalışmalar, in-situ hibridizasyon çalışmaları için tercih edilir. Rutin testlerin pek çoğu için kullanışlı değildir. Bu örneklerden yapılan yaymalarda Wright boyası ile aşırı mavi boyanma olduğu gözlenir.

***Sodyum Sitrat:*** **% 3.2- 3.8 lik solüsyonları** kullanılır. Koagülasyon testleri için %3.8 lik solüsyonların kullanılması gerekir. Ca++ ile çözünmeyecek şekilde bağlanarak etkisini gösterir. Eritrosit Sedimantasyon hızının (ESR) ölçümleri için de tercih edilen antikoagülandır. Koagülasyon testleri için 9 hacim kan örneğine 1 hacim sitrat eklenmesi gerekirken ESR ölçümleri için bu oran 4 hacim kan için 1 hacim antikoagülan olarak değişir. Kanın antikoagülan ile dilüe olması nedeniyle diğer leboratuvar testleri için uygun değildir.

***Asit sitrat dekstroz (ACD):***Glikoz taşıması nedeniyle hücre morfolojisinin korunması önem taşıdığında, serolojik olarak doku tiplendirmesi çalışmalarında tercih edilen antikoagülandır. Genellikle 6 hacim kan için 1 hacim antikoagülan olacak şekilde kullanılır. Bu örneklerde kan alındıktan 48-72 saat sonrasında bile serolojik testlerin çalışılması mümkündür.

**KAN ALMA EKİPMANI:**
***Vakumlu Kan Alma Tüpleri:***

Venöz kan örneklerinin alınması için yaygın olarak kullanılan bu sistem(şekil ) çoklu numune almaya elverişli bir subabı bulunan kan alma iğnesi, bir taşıyıcı (holder) ve belirlenmiş miktarlarda kan alacak şekilde vakumu ayarlanmış olan steril bir cam/plastik tüpten oluşur. İğnenin uzun olan ucu hastanın venine yerleştirilirken kısa olan uç ile tübün kapağı delinir. Bu amaçla taşıyıcı ile uyumlu, steril, gömlekle kaplı, çift uçlu iğneler kullanılır. Farklı uzunlukta olduğu gibi farklı çapta iğneler de mevcuttur (“Gauge” terimi ile ifade edilir, “gauge” numarası arttıkça iğnenin iç çapı daralmaktadır Ör: 18G pembe, 22g siyah). İğnenin kısa ucunda bulunan emniyet subabı tüpler değiştirilirken olabilecek sızıntıları engeller.

***Şırınga tekniği:***

İdeal olmasa da zaman zaman kan örneği almak için steril tek kullanımlık şırıngalar kullanılmaktadır. Hastanın damarlarına ulaşmak zor olduğunda bu yöntem tercih edilebilir. Ancak kanı örnek tüplerine boşaltırken hemolizi engellemek için **mutlaka iğne enjektörden çıkarıldıktan sonra tüplere aktarma yapılmalıdır.**

***Kapiller Kan Örneği alınması:***

 Bu amaçla en çok kullanılan mikrohematokrit tüpleridir. Bu tüpler kullanım amaçlarına göre antikoagülansız ya da heparinlenmiş olabilirler. Kapiller örneklerin alınması için steril bir lanset ya da bu amaçla geliştirilmiş tek kullanımlık aygıtlar kullanılmalıdır.

**KAN ALMA TEKNİKLERİ :**

Hematoloji laboratuvarlarında en sık kullanılan kan örnekleri venöz ve kapiller kaynaklı olanlardır.

Genel Prensipler:

* Tüm medikal personel kendisini tanıtarak yapacağı işlemi basit bir dilde hastaya anlatmalıdır.
* Kan alınacak tüplere mutlaka hasta ile ilgili bilgiler işlenmiş olmalıdır. Hastaya kendine ait bilgiler sorularak tüpteki bilgilerin doğruluğu kontrol edilmelidir. Hasta bu bilgiyi veremeyecek durumda ise refakat eden kişiden bu bilgiler alınarak istem kağıdına bilgilerin kontrol edildiği işaretlenmelidir.
* Tüplerin kan alınır alınmaz etiketlenmesi tercih edilmelidir. Bu şekilde çeşitli nedenlerle kan alınamadığında tüp sarfiyatına sebep olunmaz.

Venöz Kan Örneği alınması (Flebotomi)

*Gerekli malzeme:*

Eksiksiz doldurulmuş bir istem kağıdı

Turnike ve tek kullanımlık eldivenler

%70 alkol ile ıslatılmış gazlı bez

Steril iğne uçları

Vakumlu kan alma tüpleri

Enjektör ya da taşıyıcı

Özel test istemleri için gerekiyorsa kronometre, su banyosu gibi aygıtlar hazır bulundurulmalıdır

Yara bandı

*İşlem:*

1. Hastanın kimliğinden emin olun
2. Eldiveninizi giyin
3. İğne ucunu sıkı bir şekilde şırınga ya da taşıyıcıya tutturun. Vakumlu tüpler kullanılacaksa iki uçlu iğnenin kısa ucu taşıyıcının içine gelecek şekilde yerleştirilmeli ve üstündeki plastik koruma tüp yerleştirilinceye kadar yerinde kalmalıdır. Vakum kaybına sebep olmamak için tüp taşıyıcıya yerleştirilirken hafifçe itilmelidir.

Yer seçimi:

1. Kan örneğinin alınacağı bölge, intravenöz (IV) infüzyon yapılan bir bölgede olmamalıdır. Karşı koldan ya da mecbur kalınırsa infüzyon yerinin distalinde(aşağısında) bir bölgeden kan alınmalıdır. Mümkünse kan örneği almadan önce IV sıvı akışı 2-3 dk süreyle kesilmelidir.
2. Kanın infüzyon olan koldan alındığı test istem kağıdına belirtilmeli, infüzyonu yapılan sıvı da not edilmelidir. İntravenöz bir setten kan örneği alınması dilüsyona bağlı hatalı sonuçlara sebep olabileceğinden uygulanmamalıdır.
3. Kollar dikkatle gözlenerek daha önce sık kan alınmamış, deri bütünlüğünün korunduğu, enfekte olmayan bir alan seçilmelidir. Kolda kan alımında sıklıkla kullanılan 3 ven: *sefalik ven, bazilik ven, ve medial kubital venlerdir* (bkz şekil)
4. Turnike kola kan alınacak alanın 7-8 santim üstünden uygulanır. Bu amaçla geliştirilmiş bantlar kullanılabileceği gibi plastik yuvarlak turnikeler de kullanılabilir. Turnike istendiğinde kolayca açılabilecek şekilde bağlanmalıdır(bkz şekil).
5. Venlerin daha görünür hale gelmesi için hastadan avucundaki bir şeyi sıkması istenir. İşaret parmağı ile ven palpe edilir , gerekirse diğer kola geçilir. Turnikenin kolda 2 dakikadan daha uzun bir süre tutulmaması gerekir. Gerekirse ayak ya da el sırtındaki venlerden de kan alınabilir ancak bu işlemin ehil kişilerce yapılması gerekir.
6. Alan seçildikten sonra kan alınacak deri %70 alkol içeren pamukla merkezden dışarıya doğru olacak şekilde dairesel bir hareketle silinir ve kuruması beklenir.
7. Gerekmedikçe deri tekrar tutulmamalıdır. Tutulacaksa da alkolle silinmiş bir eldiven aracılığı ile palpasyon yapılabilir. Derinin ve venin fikse edilmesi için kol hafifçe aşağı doğru kıvrılmış olarak tutulur. İğnenin ucunu 20 derece kadar yukarıya doğru yönlendirerek deriyi geçip, vene girmesi sağlanır. Bir el ile taşıyıcı sabit tutulurken diğer el ile tüpler iki uçlu iğnenin kısa ucuna sırasıyla takılıp çıkarılır. Enjektör kullanılmışsa bir elle sabitlenirken diğer elle piston hafifçe geriye çekilmelidir.
8. Turnikenin kan akmaya başlar başlamaz veya en geç son tüp yerleştirilmeden serbestleştirilmesi gerekir.
9. Hastadan elini açması istenir
10. Kan alma aygıtı yerinden çıkarılır çıkarılmaz kan alınan noktanın üzerine bir tampon ile bası uygulanarak hematom oluşması engellenmelidir. Kan akışı durana dek bası sürdürülür, kolun yukarıda tutulması önerilir.
11. Kan alınan yer üzerine allerjik olmayan bir yara bandı yapıştırılır.
12. Kan alınan tüpler birkaç kez alt üst edilip karıştırılarak içindeki antikoagulanın dağılması sağlanır , alındıktan sonra hemen karıştırılamıyorsa öncelikle antikoagülan içermeyen tüplere kan alınması ve tüplerin yatık durumda tutulması, kan alma işlemi biter bitmez tüplerin karıştırılması önerilir.

Şırınga kullanılarak kan alındıysa **iğne dikkatle çıkarıldıktan sonra** tüplere üzerinde belirtildiği miktarlarda kan koyulup kapakları sıkıca kapatılmalıdır.

Kan alınan tüm tüplere hasta bilgileri işlendikten sonra tüpler laboratuvara iletilmelidir.

Aynı yerden kan almak için 2 kereden fazla girişimde bulunulmamalı, ilgili sorumlu haberdar edilmelidir.

Kan alma sırasında veni tespit etmek için kolun kan alınan yerin biraz altından tutularak tespit edilmesi yarar sağlar. Damara defalarca girmekten kaçınılmalıdır .

Kapiller Kan Örneği Alınması:

*Gerekli malzeme:*

Turnike ve tek kullanımlık eldivenler

%70 alkol ile ıslatılmış gazlı bez

Steril lanset

Lam, kurutma kağıdı, kapiller tüp gibi test için gerekli diğer malzemeler.

*Ön hazırlık:*

Kan alınması için eldeki 2.- 4. parmakların iç yüzü, ayak baş parmağı ve küçük parmağın tabanda ve dışta kalan kısımları uygun olabilir. Çocuklarda kemiğe ve bağlara, sinirlere hasar verme riski nedeniyle topuk ve bilek kısımları kan almada kullanılmamalı, 2.4 mm den derin kesiler yapılmamalıdır. Kan alınan bölgenin vücut ısında olması gerekir, değilse nazikçe ovarak ya da ılık uygulaması ile ısıtılması sağlanmalıdır.

*İşlem:*

1. Kan alınacak yer baş ve işaret parmakları ile tutularak,
2. %70 alkol ile temizlenir.
3. Alan kuru değilse steril bir tampon ya da pamuk ile kurulanır. Çevre kuru olmazsa kan bir damla oluşturamayacaktır.
4. Steril bir lanset kullanarak seçilmiş olan alana parmak izlerine paralel olarak bir kesi yapılır ve lanset imha edilir.
5. İlk damla, lenfatik sıvı veya alkol ile karışmış olabileceğinden kullanılmaz ve dışarıya alınır.
6. Cilde hafif bir bası uygulanarak kanın akması sağlanır, lenfatik sıvı karışmaması için alanın sıkılmaması gerekir.
7. Örnek toplanır
	1. Periferik yayma istemleri için teknik anlatılacaktır.
	2. Mikro hematokrit tüpüne örnekleme yapılabilir (hava girmemesi için tüp horizontal tutulup, kapiller akış ile tübün dolması beklenir)
	3. Uygulamaları oldukça azalsa da manuel hücre sayımı yapılacaksa kan alınır alınmaz uygun dilüent ile karıştırılarak pıhtılaşmaması sağlanmalıdır.
8. Alan tekrar alkol ile temizlenir, yeni bir tampon ile kurutularak kanama duruncaya kadar basınç uygulanır.
9. Örnekler etiketlenir, lanset imha edilir. Eldivenler çıkarılır

**Periferik Yayma Yapılması:**

Kan örneğinden yayma yapılması için hasta başında kapiller kan alınırken alınan örnekler kullanılabileceği gibi tübe alınmış K3EDTA lı kan örneklerinden de laboratuvar ortamında yayma yapılabilir.

*“Push-wedge” tekniği*

*Gerekli Malzemeler:*

1. Temiz cam lamlar (bir tarafı işaretlemeye uygun buzlu, traşlı lamlar kullanılmalıdır)
2. Kurşun kalem
3. Yayma yapmaya elverişli lam ya da lamel

# İşlem

1. Lam üzerine, uzun kenarın 1cm ilerisinde, orta hat üzerinde 50 mcl kan örneği koyulur. Buzlu lamlarda kan bu kenara koyulmalıdır.
2. Lam, kan damlası sağ tarafınıza gelecek şekilde düz bir zemine yerleştirilir (bkz sekil)
3. Yayılmayı sağlayacak lam, kan damlasının hafifçe önüne yaklaşık olarak 45° lik açıyla yerleştirilir.
4. Bu lam, damlaya değecek kadar geri çekilir, damlanın lamın kısa kenarı boyunca (2/3 üne kadar) yayılması için beklenir. Kanın kısa kenarın sonuna kadar yayılması beklenmemelidir. Lam hızlı ve seri bir hareketle öne doğru kaydırılır. Böylece lam arkasındaki kanı öne doğru sürüklemiş olacak, hücrelerde ezilmeden doğan şekil bozuklukları olmayacaktır.
5. Lamın havada kuruması beklendikten sonra lam mutlaka kurşun kalemle işaretlenip; örnek bilgisi (isim, tarih) yazılmalıdır. Bir fan yardımı ile kuruma işlemi hızlandırılabilir.

Normalde bir defada iki lama yayma yapılması önerilir.

İdeal bir yayma aşağıdaki özellikleri taşımalıdır:

1. Başlangıç yerinden bitim yerine doğru gittikçe incelen düzgün bir dağılım vardır
2. Yayma, enine ya da boyuna lam kenarlarına taşma yapmamalıdır.
3. Görünümü dalgasız, düz olmalıdır.
4. Herhangi bir bölgesinde göllenme, çizgilenme izlenmemelidir.
5. Yeterli ve uygun miktarda kan ile hazırlanan yayma, lamın 2/3 ünden fazlasını işgal etmemelidir.

Kötü bir yaymaya sebep olabilecek faktörler:

1. Antikoagülanlı kan örneklerinin bekletilmiş olması hücre morfolojisinde bozulmalara neden olabilir.
2. Kan lama koyulduktan sonra yayılmadan lamda beklemişse nötrofil, monosit gibi büyük hücreler, yaymanın bittiği düzensiz kenarda biirkme eğiliminde olur
3. Kirli ve kalitesiz lamlar kullanılması. Kullanılacak lam toz , yağlı bir kir bulundurmamalıdır.
4. Damla büyüklüğü fazla ise: kalın ve uzun ; ufak ise ince ve kısa bir yayma olacaktır
5. Yayılmayı sağlayan lamın açısı azaldıkça yayma daha uzun olur; açı arttıkça ise yayma kalınlaşacaktır.
6. Yayma işleminin hızı yeterli değilse yaymadan düzensizlikler görülür.
7. Yayma işlemi sırasında uygulanan basınç arttıkça yaymanın daha ince olduğu görülecektir.
8. Laboratuvar ortamının çok nemli olması yayamaların kurumasını geciktirecektir. BU gecikme eritrositlerde şekil bozukluklarına sebep olur.

Lamel ile yayma yöntemi:

İşlem:

İki temiz lamel iki elin işaret ve başparmakları yardımıyla tutulur. Lamellerden birisinin üzerine bir damla kan koyulur.

İkinci lamel hemen damlanın üzerine diagonal bir pozisyonda yerleştirilir (bkz şekil)

Kanın kapiller akım ile yayılması beklenir. Bu yayılma işlemi tamamlanmak üzereyken lameller horizontal bir hareketle birbirlerinden uzaklaştırılır.

Yaymalar üste gelecek gelecek şekilde havada kurumaları beklenir.

Notlar:
Bu teknikle lokositlerin alana homojen dağılmaları sağlanır.

Uygulanan kan miktarı az olduğundan bir preparatta ancak 50 hücre sayılabilir.

Boyama işlemleri genellikle lamelin bir lama tutunmasını takiben yapılır.

Kemik İliği Örneklerinin Hazırlanması:

Hücresel anomaliler ile seyreden hematolojik hastalıkların tanınması için kemik iliği örneklerinin incelenmesi gerekli olabilir .Kemik iliği aspirasyonu ancak bir hekim tarafından yapılabilir.

A*spirasyon yerleri:*

Erişkin bir kişide hematopoetik olarak aktif olan bölgelerden aspirasyon yapılmalıdır. “Posterior iliac crest”, “anterior iliac crest”, ve sternum en sık kullanılan alanlardır. Onsekiz aydan küçük çocuklar için tibia kullanılabilir.

*Gerekli malzemeler:*

Aspirasyon seti,

Pamuk ve gaz tamponlar

Hemostat, %1,%2 lidocaine,

Antiseptik bir solüsyon,

Eldiven

Zenker solüsyonu veya formalin (fiksatif olarak)

Gerekiyorsa heparin, lam, mikrotüpler de bulundurulabilir.

*İşlemler:*

Aspirasyon(işlem detayı???) yapıldıktan sonra bir teknisyen veya teknolog yardımı ile preparatar hazırlanabilir. Alınan örnek genellikle perifer kanı ile kontamine olduğundan aspire edilen materyal bir saat camına boşaltılıp buradaki partiküllü materyaller seçilerek perifer kan örneği ile kontaminasyon riski azaltılabilir. Yayma için yukarıda sayılan yöntemler ya da “squach” tekniği kullanılabilir. “Squash tekniğinde bir lamın ortasına damlatılan aspirasyon materyalinin üzerine ikinci bir lam kapatılarak lamların ikisine birden bası uygulanıp longitidunal olarak birbirlerinden uzaklaştırılırlar. Saat camında kalan materyal ve yapıldıysa biyopsi örneği ise bir fiksatif içine boşaltılmalıdır. İşlem biter bitmez tüm materyallerin kime ait olduğunu gösterecek şekilde işaretlenmesi gereklidir.

Yaymaların Boyanması:

Hematoloji Laboratuvarında yaymaların rutin boyanması için en sık kullanılan Romanowsky-tipi boyalardır.

Boyanmanın Prensipleri:

Metilen mavisi ve/veya bunun oksidasyon ürünlerini ile eosin B, eosin Y gibi halojenlenmiş bir floresan boyayı birlikte kullanan boyalar Romanowsky boyaları olarak bilinir. Wright, Giemsa, May-Grunwald boyaları gibi Romanowsky tipi boyalar bazik ve asidik komponentleri olan alkolik solüsyonlardır. Bu tip boyalar, aynı anda pek çok renk oluşturarak Romanowsky etkisi gösterdiklerinden polikrom boyalar olarak bilinirler.Ortamdaki boya kompleksi ile PH 6.4-7.0 olan bir ortamda hücrenin farklı bölümleri farklı renk alır: Tipik olarak : Nukleus mor, sitoplazma mavi ve pembe(maturasyonuna göre değişir), granüller de özelliklerine göre farklı renklerde boyanırlar.

Boyanma reaksiyonları:

Metilen Mavisi: Bazik bir boyadır. Çekirdeğin ve bazı sitoplazmik yapıların mavi ya da mor renklerde boyanmasını sağlar. Bu nedenle boyanan bu yapılar (Ör. DNA, RNA) bazofilik olarak tanımlanır.

Eosin: Asidik bir boyadır. Bazı sitoplazmik elemanların truncu-kırmızı renklerde boyanmasını sağlar. Bu renkte boyanan elemanlar asidofilik olarak bilinir (Ör: amino grubu taşıyan proteinler).

Sitoplazmadaki asidik ve bazofilik renklerde birlikte bir boyanma olduğunda ise pembe-leylak rengi bir görünüm sağlanır. Buna da nötrofilik boyanma denir.

Boyama İşlemi:

Boyalar kullanıma hazır satın alınır veya laboratuvarda hazırlanarak kullanılabilir. Manuel ya da otomatik boyama işlemleri uygulanabilir. Bazı laboratuvarlarda granüllerin daha iyi korunması için boyama işleminden önce preparatlar asetonsuz alkolde(genelde metanol) 1dk fikse edilir. Romanowsky boyalarında kullanılan çözücü metanol olduğundan normalde boyanma sırasında da fiksasyon gerçekleşmektedir. Boyalar her gün filtre edilerek taze olarak kullanılmalıdır. (Bir boyama işlemi için Bkz ek A)

(Turgeon, Wiliams)

Rutin Boyalar dışında lokositlerin tanımlanması için spesifik boyalar da kullanılabilir. Özellikle lösemik blastların akut lenfoblastik lösemiden mi yoksa akut miyeloid lösemilerden mi (özellikle de maturasyon göstermeyen miyeloblastik olan M1, akut monoblastik lösemiler, M5A ve akut megakaryoblastik lösemi M7) kaynaklandıkları çeşitli sitokimyasal boyama işlemleri ve Romanowsky boyaları ile alınan sonuçların birlikte değerlendirilmesi ile anlaşılabilir. (tablo Henry, 598, 27.6)

Sudan Black B boyası ve Miyeloperoksidaz:

Sudan black B fosfolipid ve sterolleri boyar. Bu boya, nötrofillerdeki azurofilik ve spesifik granülleri boyarken peroksidazın sadece azurofilik granüllerde bulunduğu bilinmektedir. Sudan black B ile öncü nötrofiller soluk boyanırken olgun olanlar daha koyu boyanır; eosinofilik granüller ise ortası soluk olarak boyanırlar. Monositlerde boyanma olmayabilir ya da az sayıda boyanma gösteren granül izlenebilir. Lenfosit ve lenfoblastlar ise negatiftir; miyeloblastlarda ise az sayıda da olsa pozitif boyanma beklenir.

Peroksidaz reaksiyonunda ise:

Lökositlerin granüllerinde bulunan miyeloperoksidaz enzimi, ortamda hidrojen peroksit varlığında substrat olarak kullanılan benzidin dihidrokloridi renksiz bir komponentten mavi- kahverengi renk veren bir derivesine çevirir. Miyeloperoksidaz aktivitesi, nötrofillerin gelişiminin her evresinde mevcut olup; azurofilik (nonspesifik) granüllerde bulunur. Eozinofillerde koyu bir boyanma izlenirken; lenfositler, olgun bazofiller, eritroid hücreler boyanma göstermezler. Monositler nötrofillerden daha zayıf renk verir ve granüler çökmeler daha ufaktır. Substrat olarak benzidin HCL yerine DAB(3,3’Diaminobenzidin) HCL kullanıldığında AML olgularında daha çok sayıdaki blastta boyanma olduğu gözlenir. DAB, miyeloperoksidaz yanısıra katalaz varlığını da gösterir ve sitokimyasal reaksiyon da hidroperoksidaz olarak adlandırılır. Sudan black B ve hidroperoksidazın miyeloperoksidaz dan daha duyarlı oldukları düşünülmektedir. Enfeksiyonu olan, AML tanısı alan bazı bireylerde bulunan toksik nötrofillerde, nadir görülen doğuştan miyeloperoksidaz eksikliklerinde peroksidaz aktivitesi izlenmeyebilir.

Esterazlar:

Lökosit esterazlar, naftalen derivesi olan bir esteri hidrolize uğratırlar. Açığa çıkan naftol (veya naftil) hızla ortamda bulunan diazonyum tuzları ile birleşir ve enzimin bulunduğu yerlerde renkli, parlak bir çöküntü oluşur. Kloroasetat esteraz reksiyonunda nötrofiller ve öncüleri pozitif boyanırken monositler ve öncüleri , diğer kan hücreleri zayıf ya da negatif boyanma gösterirler. Akut lösemilerde kloroasetat esteraz reaksiyon özellikleri, sudan black B ve peroksidaz ile benzerlik gösterse de bu reaksiyon, nötrofil serisi için daha özgündür.

Non spesifik esterazlar ( substrat olarak alfa naftil asetat veya alfa naftil butirat kullanılır) ise monositlerde kuvvetle pozitif iken nötrofillerde zayıf reaksiyon verirler. Megakaryositler alfa naftil asetat ile pozitif , alfa naftil butirat ile negatif reaksiyon verirler. Makrofajlar iki substrat ile de pozitif boyanma gösterir. Alfa naftil asetat esteraz, bazofiller ve plazma hücrelerinde pozitiftir, istirahat halindeki T lenfositlerde fokal pozitiflikler görülür, normoblastlar da zayıf boyanma gösterebilirler. Ortama eklenen sodyum florid nötrofiller ve lenfositler dışındaki hücrelerde görülen pozitiflikleri engeller. Alfa naftil asetat esteraz reaksiyonu, akut lenfoblastik lösemilerin az bir kısmında (özellikle T hücreli olanlar) fokal pozitiflikler olarak kendisini gösterebilir, megakaryositik, eosinofilik, ve bazofilik lösemilerde ve eritrolösemilerde görülen eritroblastlarda pozitif izlenebilir.

“Periodik Acid-Schiff” (PAS) Reaksiyonu:

 “Periodic Acid”(HIO4), komşu iki karbondaki hidroksi guplarını aldehitlere çeviren oksitleyici bir ajandır. Oluşan dialdehitler “Schiff” reaktifi ile birleşerek kırmızı renk veren bir ürün oluştururlar. Kan hücrelerinde PAS reaksiyonunun pozitif olması hücrelerin glikojen taşıdıklarının bir göstergesidir. Nötrofiller, eosinofiller, matür formlarında daha kuvvetli olmak üzere evrimlerinin tüm aşamalarında pozitif reaksiyon verirler. Pozitif boyanma granüllerde değil, sitoplazmada serbest olarak izlenir. Miyeloblastlarda az sayıda ufak PAS pozitif granül izlenebilir, monositlerdeki boyanma da çok soluk boyanan ince granüller şeklindedir.Lenfositlerde az sayıda küçük ya da büyük granüller şeklinde boyanma izlenebilir, Normoblastlarda PAS reaksiyonu negatiftir. Eritrolösemiler ve bazı talasemi olgularında nadiren de demir eksikliği anemilerinde ve sideroblastik anemilerde eritroid öncü hücrelerde PAS pozitifliği görülebilir. Akut lenfoblastik lösemilerde lenfoblastların iri PAS pozitif reaksiyon veren yapılar taşıdıkları görülür. Kronik lenfositik lösemi ve Non\_Hodgkin lenfoma olgularında , Enfeksiyoz Mononukleozda lenfositlerin artmış sayıda PAS pozitif granüller taşıdıkları görülebilir.

Asit Fosfataz :

Hücrelerdeki asit fosfataz, kendisi için bir substrat olan Naftol AS-BI fosforik asidi hidrolize uğratarak, çözünmez bir yapı olan ve heksazotize edilmiş pararosaniline ile kompleks oluşturan naftol ün açığa çıkmasına sebep olur. Hücrelerdeki renkli çöküntü (kırmızı renkli granüller), asit fosfataz aktivitesinin varlığını işaret eder. Ortamda bulunan L (+) tartarik asit, “Hairy Cell Leukemia”(HCL) hücreleri dışında çeşitli hücrelerde bulunan asit fosfataz izoenzimlerini inhibe eder. Normal ve anormal lokositlerin çoğunda asit fosfataz aktivitesi vardır. Monositler, nötrofiller ve öncülerinden daha koyu boyanır. T lenfositler zayıf pozitiflik verirken B lenfositler reaksiyon göstermez. TRAP (Tartarik asit Rezistan Asit Fosfataz) pozitifliği ise HCL için karakteristik olup; bu hücrelerde nadiren negatif reaksiyon görülebilir.

Nötrofil Alkalen Fosfataz

 Nötrofillerin metamiyelositten segmente kadar olan evrelerinde bu enzimin üçüncü bir granüler bölmede yer aldığı düşünülmektedir. Enzim, alkali bir ortamda, diazonyum tuzlarının (“fast blue” veya “fast violet) varlığında, substratı olan bir Naftol fosfat ile karşılaşınca onu hidrolize edip, ortama fosfat ve arilnaftolamid salınmasına sebep olur. Arilnaftolamid hemen diazonium ile reaksiyona girip bir azo boyası oluşturur. Zıt boyanma da sağlandıktan sonra boyanmanın koyuluğuna göre 0-4 arasında bir skorlama yaparak 100 lokosit sayılır ve skorları toplanır. Bu şekilde 0-400 arasında bir skor bulunması gerekecektir. Referans değerlerin her laboratuvar tarafından belirlenmesi gerekse de skorun normalde 20-100 arasında olması beklenmektedir.

Enfeksiyonlarda, Polisitemia Vera, Hodgkin Hastalığı, ve bazı miyelofibroz durumlarında skorun yükselmesi beklenirken; Kronik Miyelojenik Lösemi, Akut Miyeloid Lösemiler, Paroksismal Nokturnal Hemoglobinüri, aplastik anemi, bazı viral enfekiyonlar özellikle de Enfeksiyoz Mononukleoz ile aktivite azalmaktadır.

### Hemoglobin

İnsan hemoglobinleri ( Hb) birbirine bağlı iki çift globin zincirinden oluşur. Bu 4 globin zincirinin her biri bir HEM molekülü taşır. Normalde 6 çeşit Hb oluşabilir.Bunlardan Hb Gower 1, Hb Gower 2, Hb Portland embriyonik dönemde geçici olarak oluşur; Hb F ise fetal hayatta baskın olan Hb dir. Hb A (>% 95) ve Hb A2 (%2,5- 3,5) ise erişkin döneme ait Hb lerdir. Hb F yeni doğanda %65- 95 oranlarında görülse de azalma göstererek yaklaşık 1 yaşlarında yerini Hb A ya bırakır.

Doğumdan sonra sentezlenen belli başlı globin zincirleri **** dir

 Hb A **: **

 Hb A2 **: **

 Hb F : ****  zincirlerinden oluşur.

Görüldüğü gibi alfa zinciri bilinen üç Hemoglobin tipi için de vazgeçilmez bir yapıdır. Dört globin zinciri bir tetramer oluşturacak şekilde bir arada bulunur. Globin zincirlerine HEM bağlanması, Hemoglobinin nin oksijen (O2) taşıma kapasitesi ile doğrudan ilişkilidir ve molekülü daha sabit hale getirmeye yarar. HEM bağlanması zayıf ise globın zincirleri birbirlerinden ayrılma eğilimi gösterirler.

Hemoglobin sentezinde görülen bozuklukların hepsi Hemoglobinopati adı altında toplanabilir. İnsanda tanımlanmış Hemoglobin çeşitlerinin bazıları zararsız olup; varlıkları klinik belirti vermezken bazıları yapısal olarak bozuk hemoglobin sentezine bağlı hastalık belirtileri görülmesine sebep olabilir ( Ör: orak hücre anemisi). Bazı durumlarda ise anormal bir hemoglobin çeşidi bulunmayıp normal Hb (Hb A) sentezinde yetersizlik söz konusudur

 ( Ör: Talasemiler).

**Hemoglobınopatiler üç gruba ayrılabilir.**

1. Yapısal farklılık gösteren bir Hb varlığı ( Ör: Hb S)

Genellikle nedeni bir amino asit değişimi ile sonlanan gen mutasyonlarıdır. Bu mutasyonların moleküler yöntemler ile tespit edilmesi mümkündür.

1. Normal Hb A sentezinde yetersizlik (Ör: Talasemiler)

Alfa ve beta olmak üzere iki tip talasemi tanımlanmıştır. Sentez bozukluğu hangi zincirden kaynaklanıyorsa hastalık o isimle anılır. Bunların da çeşitli alt grupları vardır. Beta talasemi için heterozigot olanlar şiddetli belirti vermeseler de homozigot olanlarda ileri derecede anemi görülür. Alfa talasemi için heterozigot olanlar pek belirti vermeseler de homozigot olanlarda yaşamın sürmediği ve ceninin anne karnında öldüğü bilinmektedir .

1. Yeni doğanda görülen Hb F nin beklenen zamanda Hb A ya değişmemesi

Genelikle doğumdan sonraki 6. ayda Hb F değerlerinin %8 in, 12. ayda ise %5 in altına inmesi beklenir. HB A ya dönüş olmamasına sebep olan genetik anormalliğe bağlı olarak Hb F oranları değişebilir. Bu kişilerde sadece Hb F bulunsa bile bir belirti görülmeyebilir. Ancak bu durumlarda başka bir hemoglobin sentez bozukluğu varsa klinik belirti görülebilir.

**Hemoglobinopati düşülen hastalarda kullanılan tarama testleri :**

* Periferik yayma, tam kan sayımı
* Selluloz asetat Elektroforezi (alkalen pH da )
* Hb S için oraklaşma testi
* Hb A2 miktar tayini (elüsyon testi)
* Hb F tayini (alkali denatürasyon yöntemi)
* HB F nin hücre içindeki dağılımının göstermesi
* İnkluzyon cisimciklerinin (denatüre Hb ) görülmesi
* Diğer testler

Agar elektroforezi

Asit ortamda elektroforez

Globın zincir elektroforezi

Nişaşta jel elektroforezi

Moleküler genetik teknikler ile inceleme

**Hemoglobın Elektroforezi :**

EDTA , Heparin veya ACD li (asit sitrat deksroz) kan örneklerinden hemolizat hazırlanır. Bunun için eritrositler üç kez serum fizyolojikle yıkandıktan sonra hacimlerinin iki katı kadar su, bir hacim karbon tetra klorür (CCl4) eklenerek parçalanırlar. Üç bin devirde 30 dk döndürülerek üste kalan kısım başka bir tüpe aktarılır. Çalışma için hazırlanmış olan bu hemolizat kullanılır. Bu örnekler + 4 °C de bir iki gün, - 20° C de birkaç hafta dayanıklıdır.

Hb molekülleri alkalen ortamda negatif yüklüdürler ve elektrik akımı uygulandığında anoda doğru hareket ederler. Hb A en hızlı hareket ederken bunu Hb F , Hb S, Hb A2 takip eder. Ancak elektroforez ile anormal bir bant görüldüğünde mutlaka bir doğrulama testi ile desteklenmelidir (ör HbS şüphesinde oraklaşma testi, asit elektroforez); çünkü bazı Hb tipleri örneğin Hb D Hb S Hb G elektroforezde aynı görüntüyü verirler. Hb Bart’s ve HbH , HbI nın Hb A dan daha hızlı hareket eden Hb ler olduğu da bilinmektedir. Bu bantları birbirinden ayırmak için kullanılabilecek bir diğer yöntem, ortamın pH sını değiştirerek elektroforez işlemi uygulamaktır. Asit ortamda bazı Hb ler negatif bazıları nötr bazıları ise pozitif yüklenmiş oldukları için elektroforez ile hareket özellikleri alkalen ortamındakinden farklı olacaktır. Alkali ve asit ortamdaki veriler birleştirilerek daha sağlıklı bir değerlendirme yapılması mümkün olur.

Elektroforez işlemi için bakınız ek 1

Hb leri iyi ayırt edebilen bir kimyasal yöntemin de “**cation-exchange high performance chromartografi”. (HPLC)** olduğu bilinmektedir. HPLC tarama testi olarak kullanıldığında atipik bir bant görülmemişse ilave bir test yapılmasına gerek yoktur. Ancak bir Hb varyantının varlığı gösterilmişse miktar ve hemoglobin tipinin belirlenmesi için ek yöntemlerin kullanılması gerekebilir (yeni geliştirilmiş cihazlar bunu otomatik olarak yapabiliyor).

**Hb A2 Miktar Tayini :**

Elektroforez örneklerinden densitometrik olarak ( yani bantlar tarafından tutulan boyanın yoğunluğu tespit edilerek) Hb A2 tespit edilmesi çok güvenilir bir yöntem değildir. Bunun yerine elektroforezden sonra görülen A2 bantı kesilerek bulundurduğu Hemoglobin bir çözücü ile serbestleştirilip; Hb miktarı spektrofotometrik olarak ölçülür. Normal de Hb A2 oranı, totalin %1,5- 3,5 unu oluşturur. Talasemi taşıyıcılarında ise Hb A2 oranı %7 lere çıkar (evlilik öncesinde talesemi taşıyıcılarının tespit edilmesi için bu yöntem kullanılmaktadır).

# **Hb F nin Alkali Denatürasyonu**

 Fetal hemoglobin alkalen bir ortamda denatüre olmaz (yapısı bozulmaz). Hb A ise alkali ortamda denatüre olur. Bunun için eritrositlerin parçalanması ile hazırlanan hemolizatın “pH” sı önce alkalen yapılıp sonra nötralize edilir ve denetüre olan hemoglobin amonyum sülfat ile çöktürülüp filtre edilerek sıvı fazdan ayrılır. Kalan sıvı sadece çözünür hemoglobinleri taşımaktadır. Burada hemoglobin ölçümü yapılarak Hb F miktarı belirlenebilir. Beta talasemi dışında bazı edinsel kan hastalıklarında Hb F düzeyleri yükselebilir. Örneğin lösemiler, aplastik anemi.......

**Oraklaşma Testi :**

Hb S varlığını göstermek için kullanılır. Kana indirgeyici bir ajan olan sodyum metabisulfit eklendiğinde ve oksijensiz bırakıldığında eritrositlerin şeklinde hızla bir oraklaşma gözlenir. Bunun için reaktif ile karıştırılan kan hızla bir lama damlatılır ve üzerine bir lamel kapatılarak kenarları hava almayacak şekilde mum ile kapatılır ve mikroskopta eritrositlerin şekli değerlendirilir.

## İnkluzyon Cisimciklerinin Gösterilmesi

En sık görülen inkluzyon cismi Hb H den kaynaklanıp alfa talasemiler de görülür. Beta talasemilerde ise alfa zincir inkluzyonları görülür. Bunlar aslında çökmüş olan Hemoglobın zincirleridir ve “methyl-viyolet” ile boyanınca hücre içerisinde düzensiz şekilli cisimcikler olarak görünür. Bu cisimcikler eritroid seriye ait genç hücrelerde görülürler. Heinz cisimcikleri (çözülmeyen denatüre globin zincirleri), bazı kimyasal zehirlenmelerde ve glikoz 6 Fosfat Dehitrogenaz enzim eksikliğinde de görülebilir. Sebep bir Hemoglobinopati olduğunda kan 37 ° C de 24 – 48 saat beklediğinde kişinin dalağı alınmadıysa bile bu cisimciklerin bulunduğu gösterilebilir.

**Eritrosit Sedimentasayon Hızı (ESR)**

*Prensip :* Venöz kan örneği iyice karıştırılarak vertikal bir pozisyonda tutulursa eritrositler dibe çökme eğilimi gösterirler. Tepe noktasından belli bir zaman diliminde görülen çökmenin miktarı Eritrosit Sedimentasyon Hızı olarak bilinir. ESR yi etkileyen pek çok faktör vardır

*Plazma Kaynaklı Faktörler:*

Fibrinojen artışı, daha az olarak 2-, 2- ve  globulin artışları ESR de artmaya sebep olur. Asimetrik yapıdaki bu proteinler, eritrositlerin birbirlerini itmesine sebep olan üzerlerinde taşıdıkları negatif yükü (zeta potansiyeli) diğer plazma proteinlerinden daha fazla azaltırlar. Zeta potansiyelinin azalması rulo formasyonunun oluşmasına ve hücrelerin tek tek iken olduğundan daha hızlı çökmesine neden olurlar. Defibrine edilmiş kanlarda ESR daha düşük bulunur. ESR ile plazma proteinleri rasında mutlak bir korelasyondan bahsedilemez. Albümin ve lesitin ESR yi geciktiriken: kolesterol ESR yi aerttırıcı etki gösterir.

*Eritrositlerden Kaynaklanan Faktörler:*

Anemilerde eritrosit/plazma oranındaki azalma nedeniyle rulo formasyonu kolaylaşır ve ESR değerleri artar. Kullanılan tüm ölçüm yöntemlerinin hematokrit değerleri %30-45 arasında iken daha güvenilir oldukları bilinmektedir. ESR, çöken hücrelerin ağırlığı ve yüzey alanı ile doğrudan ilişkilidir. Mikrositler, alan/volüm oranı daha düşük olan makrositlerden daha yavaş çöker; rulo formasyonu da alan/volüm oranı daha düşük olduğundan aynı mekanizma ile ESR yi arttırır. Orak hücreleri ya da sferositozda olduğu gibi eritrositlerin şekilbozukluğu söz konusu olduğunda ise rulo formasyonu zorlaşacağından ESR azalır.

*ESR nin evreleri:*

1. İlk 10 dk içinde rulo formasyonu şeklinde az bir çökme olur
2. 40 dk içinde çökme sabit bir hızla devam eder.
3. Hücreler tübün dibinde toplandıklarından son 10 dk içinde çökme yavaşlar

Kullanılan Yöntemler:

Westergren Yöntemi: Halen referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Ölçümü yapılacak örneğin hematokrit değerinin %35 i geçmemesi önerilir ve bu amaçla kan dilüe edilir(sitrat ile). Bu durumda; bulunan değer = (dilue olmamış ESRx 0.86)-12, formülü ile daha tutarlı sonuçlar alındığı görülür. Ölçüm için kullanılan tüplerin iç çapı 2.55 mm olup; 30 cm uzunluğundadır, üzerleri mm olarak 0-200 arasında işaretlenmiştir. Tüplere “0” noktasına kadar 1+4 oranında sitrat(0.105 molar) ile karıştırılmış kan (toplam 2 ml) doldurulup; özel tüp tutucuna yerleştirilir ve titreşim olmayan bir alanda, oda ısında güneş ışığı almadan vertikal olarak 1 saat süre ile bekletilir. 60 dk sonra “0” noktasından itibaren kaç mm çökme olduğu skala üzerinden okunarak kaydedilir.

Modifiye Westergren Yöntemi: Antikoagülan olarak Sitrat yerine EDTA kullanılır. Bu durumda tam kan sayımı yapılan tüpler kullanılarak ESR de ölçülebilir. EDTA lı kan gene 1+4 oranında sodyum sitrat veya sodyum klorür ile karıştırılır (toplam 2ml). Dilüe edilmemiş EDTA lı kanlar ile yapılan ölçümlerde presizyon azalmaktadır.

ESR de yaşlandıkça bir artma olduğu gözlenir. Westergren yöntemi ile normal değerlerin üst sınırı aşağıdaki gibidir:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Erkek | Kadın |
| <50 yaş | 15 mm/saat | 20 mm/sasat |
| > 50 yaş | 20 mm/saat | 30 mm/saat |
| > 85 yaş | 30 mm/saat | 42 mm/saat |

Bazı araştırmacılar ise yaşlılar için de 50 yaş altındaki değerlerin kullanılmasını , saptanan yüksek değerlerin bir hastalık durumu ile ilgili olduğunu savunmaktadır.

Hata Kaynakları:

Antikoagülan oranı fazla ise ESR artabilir

Heparinli kan örneklerinde zeta potansiyeli değişeceğinden Heparin kullanılmamalıdır. Heparinize edilmiş hastalarda da ESR değerleri yüksek bulunur. Doğru konsantrasyonda kullanılması şartıyla EDTA ya da Sitrat kullanılması sonuçları etkilemez.

Tüp içindeki hava kabarcıkları, örneğin hemolizli oluşu, tübün kirli olması sonuçları etkiler.

Tüplerin eğilmesi ESR yi arttırır. 3 derecelik bir eğim bile ESR değerlerini %30 oranında değiştirebilir.

Plastik ESR pipetleri kullanıldığında sonuçlar, cam tüplerinkinden 1-2 mm yüksek bulunabilir.

Oda ısısı 20-25°C arasında olmalıdır. İki yöndeki sapmalar da sonucu değiştirebilr. Kan örneği buzdolabında saklanmışsa ölçüme geçmeden önce oda ısısına gelmesi sağlanmalı en az 8 kere alt-üst edilmelidir.

Ölçümler kan alındıktan sonraki iki saat içerisinde yapılmalıdır (EDTA’lı kanlar +4°C de saklanması şartıyla 12 saat boyunca kullanılabilir ).

 Wintrobe yöntemindeki gibi bu yöntemde de aneminin etkisini ortadan kaldırmak için standart bir yöntem yoktur . Bu amaçla (Westergren ile bulunan değer) **x**15 **/** 55-Hct gibi bir formül geliştirilmiştir.

Zeta Sedimentasyon Hızı

“Zetafuge” adında bir santrifüj kullanılarak kapiller tüpler vertikal pozisyonda 4 kez 45 saniyelik periyotlar halinde santrifüj edilip rulo formasyonu oluşmasına ve 3 dk içinde eritrositlerin sağlıklı bir şekilde çökmelerine izin verilir . kapiller tüpler hematokrit gibi okunur ancak bulunan değer zetakrit olarak adlandırılır; normal değerleri %41ile %54 arasındadır. Bu ölçüm anemiden etkilenmez ancak cihaz artık üretilmemektedir.

Ves-Matic, Sedisystem , Test1, Sedimat gibi daha kısa sürede sonuç verebilen pekçok modifiye (son nokta analizi ile, belli eğimde okuyarak, santrifüj ederek ...) ESR ölçüm sistemi geliştirilmiştir.

Testin Yorumlanması:

ESR halen kullanımda olan en eski laboratuvar testlerinden bir tanesidir. Hastalıkların takibi için daha duyarlı yöntemler (Ör: CRP) geliştirilmiş olsa bile yaygın olarak kullanılmaktadır. Bulunan değerlerin prognostik değeri olabileceği durumlardan söz edilmektedir. Örneğin ESR nin “stroke” olgularında >28mm/saat olması kötü prognozun , prostat kanserlerinde > 37 mm/saat olması daha hızlı bir ilerlemenin, koroner Arter hastalıklarında >22 mm/saat olmasını yüksek kalp krizi riskinin habercisi olarak bildiren yayınlar vardır.

Gebelikte ESR hafifçe artar. Mulipl Myelom veya makroglobunemi gibi monoklonal kan hastalıklarında, hiperfibrinojenemide, enflamasyona bağlı gelişen poliklonal hiperglobulinemilerde ESR değerleri artar. Romatoid artrit, kronik enfeksiyonlar, kollojen hastalıkları gibi aktif enflamatuvar hastalıklarda ESR değerlerinde ılımlı bir artış olabilir. Neopazması olan hastalarda ESR değeri negatif olabileceğinden ESR nin normal olması bir neoplaziyi ekarte ettirmez; ancak bilinen bir neoplazi varken değerlerin 100mm/saatin üzerine çıkması genellikle bir metastazın habercisidir.

Asemptomatik hastalarda tarama testi olarak kullanılması doğru değildir. Ancak “polymiyalgia rheumatica” ve “temporal arteritis” gibi ESR nin 90mm/saat değerlerini aştığı olguların tanınmasında işe yarayabilir.

Ateş, kilo kaybı, gece terlemeleri gibi sistemik semptomların bulunmadığı Hodgkin olgularında ESR nin prognostik değeri olduğu söylenmektedir (<10mm/saat iyi, >60 mm/saat ise sistemik belirtilerinki kadar kötü).

ESR de yavaş seyreden sürekli bir artış kaydedildiğinde renal ultrasonografi ile bir değerlendirme yapılması önerilmektedir (Renal cell ca olgularının %70 inde tanıdan 6 yıl öncesinden başlayarak böyle bir artış eğilimi gösterilmiş)