

KONU 3.11.: Kan Sayımında Kullanılan Malzemeler

Laboratuvarında yapılan direkt kan sayımlarında hemositometre adı verilen özel bir sayım seti kullanılır (Şekil:3.11.1). Bu setin içinde sayma lamı (Thoma lamı, Neubauer lamı, Bürker lamı, Türk lamı, Helber lamı, Speirs-Levy lamı, Zappert lamı, Elzholz lamı, Levy-Hausser lamı, Spencer lamı, Brant lamı, Fuchs-Rosenthal lamından herhangi bir tanesi), geniş bir lamel, alyuvar ve akyuvar sayımı için iki adet sulandırma pipeti ve bu pipetlere takılan, üzerinde bir ağızlığı olan lastik hortumlar bulunur (Şekil:3.11.2.). Şimdi bunları sırasıyla yakından tanıyalım.

Sayma Lamaları:

Üzerine özel yöntemlerle küçük kareler çizilmiş kalın lamlardır. Üstten geniş bir lamelle kapatılınca alt kesimde bir boşluk oluşması nedeniyle sayma kamarası da denir. Yukarıda isimleri verilen birçok çeşidi vardır. Bu sayma lamlarının temel kullanım prensibi aynı olmakla beraber, üzerinde sayımın yapıldığı kare alanları farklıdır. Hepsisi Thoma-Zeiss in kurmuş olduğu esasa dayanır. Kan sayımında kullanılan lamın ne tip bir lam olduğu lam üzerine yazılmıştır. Bu lamlardan, kan hücrelerinin sayımı için en çok kullanılan tip Thoma sayma lamıdır. Bu nedenle burada Thoma lamının özelliklerinden bahsedilecektir (Şekil:3.11.5.).

Thoma lamı: Üzerinde dört olukla ayrılmış üç çıkıntı vardır. Bunlardan ortada bulunan çıkıntı, sayımın yapıldığı alan olup, yanlardakinden 0.1 mm daha aşağıdadır. Bu alan üzerinde özel olarak çizilmiş küçük kareler bulunur. Çıplak gözle de görülebilen bu çizgiler, artı (+) işareti şeklindedir. Ortada bulunan ve sayımın yapıldığı büyük karenin alanı 1 mm² dir. Bu karenin birer milimetre olan kenarları 20 eşit bölüme ayrılarak, 400 küçük kare meydana gelmiştir. Bu küçük karelerin bir kenarı 1/20 mm, alanı ise 1/400 mm² dir. Lamın üzeri geniş bir lamelle kapatılınca, sayım alanının bulunduğu orta alan ile lamel arasında 0.1 mm lik bir açıklık kalır. Bu biçimde büyük karenin bulunduğu yerde 0.1 mm³ lük bir hacim meydana gelir. Bir küçük kare prizmanın hacmi ise 1/4000 mm³ dür. Bunun yanında Thoma lamında, soldan-sağa ve yukarıdan-aşağıya 1., 6., 11., ve 16. çizgiler çift çizilerek içlerinde 16 küçük kare bulunan orta büyüklükteki kare alanlarına ayrılmıştır. Büyük kare içinde, orta büyüklükteki karelerden 16 tane vardır. Thoma lamının bazı tiplerinde, sayım alanının bulunduğu orta alan yatay bir olukla iki bölüme ayrılmıştır. Her bir bölümde bir sayım alanı vardır. Bu sayede bir kişinin hem alyuvar hem akyuvarları veya farklı kişilere kan hücreleri, lamın sayıma bir defa hazırlanmasıyla aynı anda yapılabilir. Bu da zaman tasarrufu sağlar.

Thoma lamının sayım için hazırlanması: Hatasız sayım yapmak ve güvenilir bir sonuç almak için Thoma lamının titizlikle ve doğru bir şekilde kan sayımına hazırlanması gerekir.

Önce lam ve lamel temizlenip kurulandıktan sonra lamel, sayım alanının veya alanlarının bulunduğu lamın orta bölgesinin üzerine konur. İki elle, işaret parmakları altta, baş parmaklar üstte olacak şekilde yatay vaziyette tutulur. Baş parmakla ileri ve yanlara doğru hafif bir basınç uygulanarak, lamel sayma lamının ortasına sürülür ve bırakılır. Lamelin iki kenarında, kumaş hareketlerine benzer biçimde Newton renk çizgileri oluşur. Bu çizgiler, lamın üst yüzü ile lamel arasında kalan boşluğun 0.1 mm

yüksekliğinde olduğunu ve sayım alanının uygun bir şekilde hazırlandığını gösterir (Şekil:3.11.4).

Sulandırma Pipetleri:

Kanın amaca uygun eriyiklerle homojen bir şekilde karıştırılıp sulandırılmasında kullanılan malzemelerdir. Bunlara karıştırma pipetleri adı da verilir. Alyuvar ve akyuvar sulandırma pipetleri hacim olarak farklı, genel yapı olarak birbirinin aynıdır. Bir pipet üç bölümden oluşur. Bunlar cam bölüm, lastik boru ve emme ağızlığı bölümleridir. Cam bölüm ise kapiller kanal ve balon olmak üzere iki bölgeye ayrılmıştır (Şekil:3.11.6.).

Alyuvar pipetinde kapiller kanalın hacmi, balonun yüzde biri kadardır. Kapiller boru 10 eşit bölüme ayrılmış, ortasına 0.5 ve balonun hemen altına gelen üst kesimine 1 rakamı yazılmıştır. Balon üzerindeki işaretli yerde ise 101 rakamı bulunur. Alyuvar pipetinde balonun içinde kırmızı bir boncuk vardır. Bu boncuk o pipetin hem alyuvar sayımı için kullanılacağını gösterir hem de sulandırma eriyiği ile kanın homojen karışımına yardımcı olur. Alyuvar pipeti, hacim olarak akyuvar pipetinden daha büyüktür. Neden?

Akyuvar pipetinde ise kapiller borunun hacmi balonun onda biri kadardır. Kapiller bölümün ortasında 0.5 ve balonun hemen altına gelen üst kesiminde 1 rakamı bulunur. Balon üzerindeki işaretli yerde ise 11 rakamı bulunur. Akyuvar pipetinde, balonun içinde beyaz bir boncuk vardır. Boncuğun görevi, alyuvar pipetinde bahsedildiği gibidir.

Her iki pipette cam malzemeden yapılmıştır. Kanın emildiği uçları sivri, ağızlıklı lastik borunun takıldığı uçları ise kütür. Özel yapıları nedeniyle bu pipetlere kan çekerken dikkatli ve yavaş davranmak gerekir. Kapiller olduklarından, çekilen kan çok hızlı yükselir ve yutulabilir. Fakat çekim esnasında kapiller cam boruda ilerleyen kan borunun sonuna gelince duraklar ve kolaylıkla balona geçemez. Böylece çekimde kolaylık sağlanmış olur. Balon kısmı dolunca çekme işlemi çok yavaş yapılmalıdır.

Her iki pipette de kan 0.5 ya da 1 rakamına kadar çekilir. Çekilen bu kan alyuvar pipetinde 101, akyuvar pipetinde ise 11 rakamına kadar amaca uygun eriyiklerle sulandırılır. Daha sonra pipetler yatay doğrultuda öne ve arkaya doğru döndürülerek, balonun içindeki kan ile sulandırma eriyiğinin homojen karışımı sağlanır. Hazır olan pipetler 5 dakika kadar masa üzerinde bekletilir. Kullanıma başlarken, 2-3 damla boşa akıtılır. Böylece balon içindeki karışımın kapiller kanala girmesi sağlanır. Pipetin ucu daha sonra önceden hazırlanmış sayım lamında, lamelin kapattığı orta bölümüne değiştirilerek, içindeki karışımın lam lamel arasındaki 0.1 mm yüksekliğindeki boşluğu, ince bir film tabakası halinde yayılması sağlanır (Şekil:3.11.3.). Araya sızdırılan miktar yanlardaki oluklara taşmamalıdır. Şayet taşarsa, pamuk veya kağıt bir mendille lamelin kenarından çekilmelidir. Buna göre hazırlanan sayma lamaları, şaryolu mikroskoplara konularak, orta veya büyük büyültmelerde, sayım alanının üzerindeki kan hücrelerinin sayımına başlanır (Şekil: 3.11.7.).

Sulandırma Eriyikleri:

Çeşitli hücrelerin sayımında kullanılmak üzere değişik bileşimlerde eriyikler hazırlanmıştır. Burada amaç, sayımı istenen kan hücresine zarar vermeden ve normal biçimini bozmadan sulandırmaktır. Ayrıca kullanılan eriyik, sayımı kolaylaştırmak ve sayım alanını boşaltmak için diğer hücreleri yok etmelidir. Bu eriyiklerin bileşimleri, uzun süre değişmeden kalabilmeleridir. Örneğin alyuvarların sayımında kullanılan

Hayem eriyiği, akyuvarları ve diğer hücresleri yok eder. Akyuvarların sayımı için kullanılan Türk eriyiği ise alyuvarları parçalar. Böylece amaca uygun doğru hücrelerin sayımı gerçekleşmiş olur. Kan hücrelerinin sayımı için kullanılan sulandırma eriyikleri, hazırlandıktan sonra genellikle süzülerek kullanılırlar.

Kan Tahlillerinde Kullanılan Malzemelerin Temizliđi:

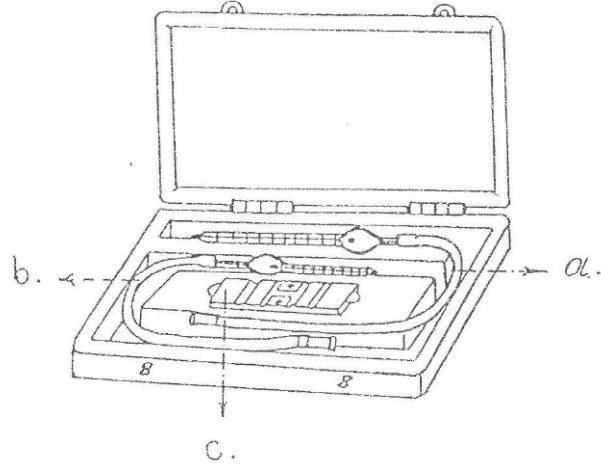
Kan sayımında, örnek kanın hemolize olmasını önlemek, doğru ve güvenilir sonuçlar alabilmek için kullanılan malzemelerin çok temiz ve kuru olmalarına özen gösterilmelidir.

Alyuvar, Akyuvar, Hemoglobin ve Sedimentasyon Pipetlerinin Temizliđi: Bu pipetler, içlerine birkaç defa çeşme suyu çekilip boşaltılarak iyice yıkandıktan sonra damıtık sudan geçirilmelidirler. Daha sonra önce alkol sonra eter çekip boşaltılarak, kurumaları sağlanmalıdır. Kan pipetlerinin iyi bir şekilde temizlenip kurumuş olduklarını anlamak için pipetler sallanarak, balon içindeki cam boncuğun serbestçe oynayıp oynamadığı kontrol edilmelidir. İyice kurumamışsa boncuk bir kenara yapışır. Böyle durumlarda pipet yeniden alkol ve eterden geçirilerek, hava akımında kurutulmalıdır.

Kan çekme pipetlerinde, pıhtılaşmış kan kalırsa, potasyum hidroksit veya sodyum hidroksit yoğun eriyiklerinden birisi içinde bir süre bırakıldıktan sonra su ile iyice temizlenmelidir. Kapiller kısım içindeki tıkanmaları açmak için gerekirse at kuyruğu kılı kullanılabilir. Bu amaç için ince madensel tel, iç kenarı çizdiğinden kesinlikle kullanılmamalıdır. Uzun süre kullanılmaları sonucu, alyuvar pipetlerinde buzlu cam görünümü, akyuvar pipetlerinde ise morumsu bir renk oluşabilir. Birincisi amonyak, ikincisi de alkol içinde tutularak temizlendikten sonra bol suda yıkanmalıdır.

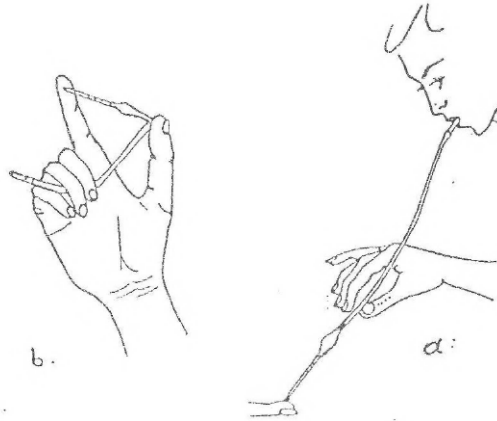
Sayma Lamları: Bunlar çeşme suyu ve saf suyla yıkandıktan sonra yumuşak bir bezle veya kağıt mendille silinerek kurutulmalıdır. Bu tip lamların temizliği için alkol ve eter kullanılması önerilmemiştir.

Tüm bu malzemeler temizlenip kurutulduktan sonra kapalı bir kap içinde saklanarak, tozlanmaları engellenmelidir. Bu tip malzemelerle yapılan çalışmalar, mümkün olduğunca hızlı yapılmalı, şayet hatalı kullanılırlarsa zaman kaybetmeden temizlenip, kurutulmalı ve yeniden kullanılmalıdırlar.



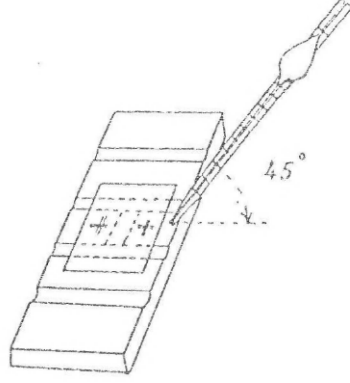
Şekil:3.11.1

Hemositometre. a. Alyuvar pipeti, b. Akyuvar pipeti, c. Sayma lamı.
(Konuk'dan)



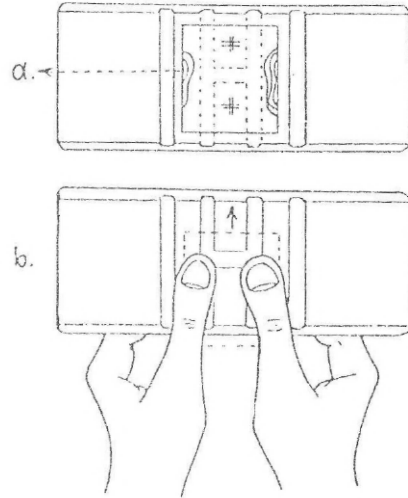
Şekil:3.11.2

Sulandırma pipetlerinin tutulması. a. Kan alırken, b. Sallarken. (Konuk'dan)



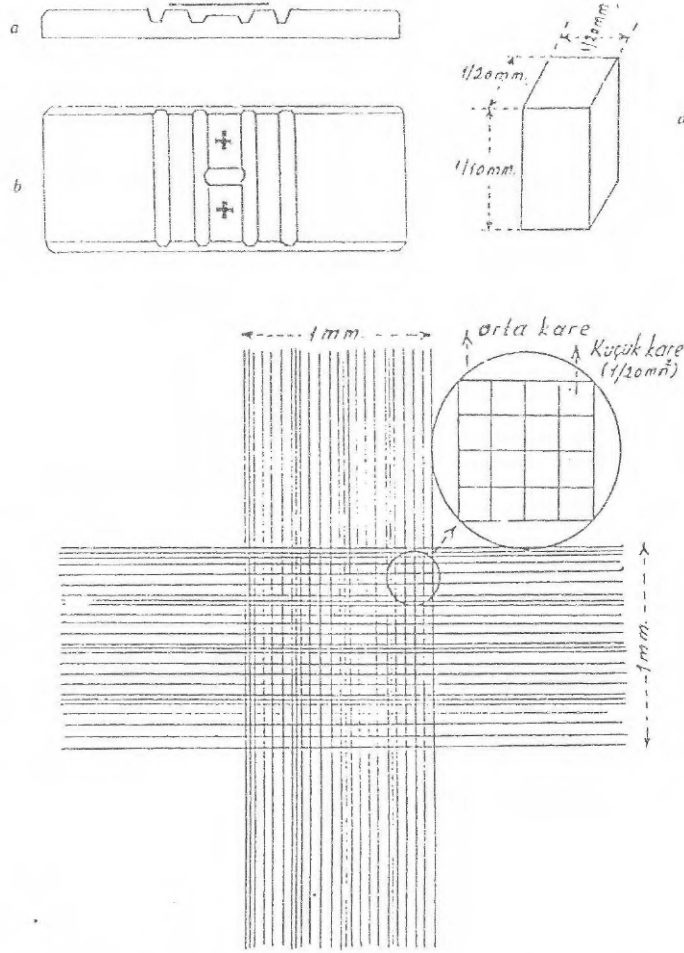
Şekil:3.11.3

Thoma lamında sayım alanının doldurulması. (Konuk'dan)



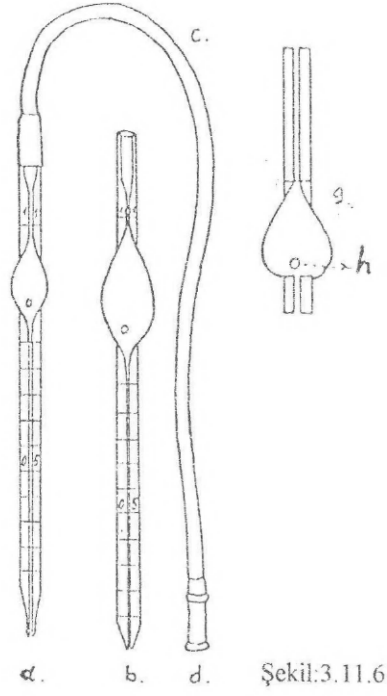
Şekil:3.11.4

a. Newton renk çizgileri, b. Thoma lamının lamelle kapatılması. (Konuk'dan)



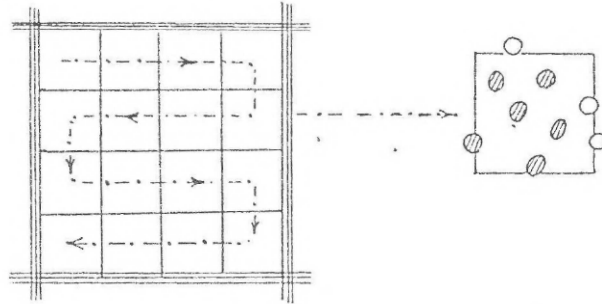
Şekil:3.11.5

Thoma sayma lamı: a. Lamın kesiti, b. Üstten görünüşü, c. Lam üzerindeki kareler, d. Bir küçük kare prizmanın ölçüleri. (Konuk'dan)



Şekil:3.11.6

Thoma sulandırma pipetleri. a. Alyuvar b. Akyuvar pipeti, c. Lastik boru, d. Ağızlık, g. Cam balonun kesiti, h. Cam boncuk. (Konuk'dan)



Şekil:3.11.7 a.

b.

a. Orta karelerde kan hücreleri sayılırken izlenen yol, b. Küçük karelerde sayım. (taramalı olanlar sayıma dahil, boş olanlar değildir) (Konuk'dan)

DENEY 3.12.: Eritrosit Sayımı

Teorik Bilgi: Kan plazmasında bulunan hücrelerden en fazla olanı eritrositler (alyuvarlar) dir. Plazmadaki bulunma yüzdesi ortalama % 35-45 arasındadır. Omurgalı canlıların kanında bulunan bu hücrelerin plazma içindeki hareketleri pasiftir. Eritrositlerin memelilerdeki yapısı yuvarlak ve küçüktür. Kırmızı kemik iliğinde çekirdekli olarak oluşmalarına rağmen (eritropoesis), plazmaya geçecekleri zaman çekirdeklerini kaybederler. Bu haliyle plazmadaki memeli eritrositleri, yuvarlak ve ortasında çekirdek boşluğu olan bir görünümündedir. Kuşlar, sürüngenler, kurbağalar ve balıklardaki şekli ise oval ve çekirdekli olup, memeli eritrositlerinden daha iridir. İnsan kanındaki eritrositler ortalama 7.5 mikron çapında olmasına rağmen, bir kurbağa kanındaki çapları ortalama 35 mikron kadardır. İnsan kanının 1 mm³ ünde 4.000.000-5.000.000 arasında eritrosit mevcuttur. Bu miktar cinsiyete bağlı olarak fark gösterdiği gibi yerleşim bölgelerine göre de fark gösterir. Örneğin kuzey bölgelerde yaşayan insanların 1 mm³ kanındaki eritrosit miktarı daha fazladır. Hayvanlarda aynı hacimdeki miktarları insanlardakinden farklıdır. Örneğin, atlarda 9.500.000, keçide 13.000.000, inekte 7.000.000, köpekte 6.800.000, tavukta 2.700.000, güvercinde 3.400.000, maymundada 5.000.000, beyaz farede 9.000.000, kurbağada 280.000 ve balıkta 800.000 dir. Yetersiz beslenmeye bağlı olarak ve bazı hastalıklarda (anemi, sarılık, v.b.) 1 mm³ kandaki miktarları oldukça azalabilir. Şayet eritrositler bir metabolik bozukluk sonucu tahrip olursa (hemoliz), hemoglobini plazmaya geçer ve üre ile birlikte idrarla dışarıya atılır. Bu gibi durumlarda idrarın rengi, hemoglobindeki demirden dolayı kırmızı-kahverengi bir tonda görülür. Eritrositlerin ortalama ömürleri 100-120 gün arasındadır. Bu süreyi dolduran eritrositler karaciğer ve dalakta parçalanır. Saniyede ortalama 2.500.000-2.700.000 eritrosit kırmızı kemik iliğinde yapılırken, aynı miktar kadarı karaciğer ve dalakta parçalanır ve böylece kandaki miktarları sabit tutulur.

Eritrositlerin canlılardaki en önemli görevi, solunum gazlarının taşınmasıdır. Bu faaliyet oksijen ve karbondioksitin solunum organları arasında değiş tokuş u şeklindedir. Bu faaliyetlerini içlerindeki hemoglobin (Hb) molekülü sayesinde gerçekleştirirler. Hemoglobin, dört polipeptid zincirinden oluştuğundan dolayı, bir tür kan proteindir.

Amaç: 1 mm³ insan kanında bulunan eritrosit sayısının saptanması.

Materyal: Etil alkol, eter, pamuk, lanset, hemositometre seti, Hayem sulandırma eriyiği, şaryolu mikroskop, temizleme solüsyonları, gazlı bez ya da kurutma kağıdı.

Metot:

1. Kalem tutmadığınız elinizin işaret parmağının ucunu, önce etil alkol sonra eter ile silip, kurummasını bekleyiniz.
2. Lansetle delerek, ilk çıkan damlayı siliniz.

3. Alyuvar sulandırma pipetini sağ elin baş ve işaret parmakları arasında, lastikli boru ile cam bölümün birleştiği yerden tutunuz. Bu tutmada, pipetin kapiller kesiminde bulunan beyaz çizgi altta, sayılar üstte olmalıdır.
4. Ağızlığı dudaklar arasında tespit ediniz.
5. Pipetin ucunu kan damlasına daldırarak 0.5 çizgisine kadar çekiniz. (1 çizgisine kadar da kan çekebilirsiniz. Bu tamamen el alışkanlığına bağlıdır. Bu takdirde hesaplamada sulandırma faktörünün yarısı alınmalıdır.)
6. Ucundaki kan bulaşığını pipetin deliğine temas etmeden gazlı bezle ya da kurutma kağıdı ile siliniz.
7. Dikeye yakın tutarak, Hayem sulandırma eriyiği içine daldırıp, hemen 101 rakamına kadar çekiniz. Böylece kan 1/200 oranında sulandırılmış olacaktır.
8. Önce açık sonra lastikli uç olmak üzere pipetin iki ucunu sağ elin baş ve işaret parmakları arasında kapatınız. Serbest kalan lastik ucu, küçük parmakla yüzük parmağı arasında tespit ediniz.
9. Pipeti yatay doğrultuda tutarak, öne arkaya 3-4 dakika döndürünüz. Böylece pipetin balon kısmındaki kanla sulandırma eriyiğinin homojen bir şekilde karışmasını sağlamış olacaksınız.
10. Pipetin kapiller kısmında sadece sulandırma eriyiği bulunduğundan, ilk iki damlayı atınız.
11. Pipeti 45° lik eğimle tutarak, ucunu lamelle Thoma lamının birleştiği ortadaki sayım alanına değdiriniz.
12. Kapillerite özelliği ile sayım alanı kan solüsyonuyla dolacaktır. Burada pipetten Thoma lamına boşaltılan kan ne çok ne de az olmalı, ortadaki sayım alanını ince bir film tabakası halinde dolduracak kadar olmalıdır. Fazla olursa lameli kaldırır ve sayım alanının 1/10 mm lik yüksekliği değişebilir. Az olursa kurumalar nedeniyle sayım alanındaki eriyik hareket eder ve hücreler yer değiştirir ya da sayım yapılan alanda hava kabarcıkları meydana gelir.
13. Thoma lamını yatay tutarak, şaryolu mikroskobun preparat tablasına koyup, kıskaçlarla tutturunuz.
14. Alyuvarların çökmesi için 4-6 dakika bekleyiniz.
15. Sayım için düz aynayı kullanınız ve diyaframı yeteri kadar kısarak kondansatörü ayarlayınız.
16. Önce küçük büyültme ile alyuvarların homojen bir biçimde dağılıp dağılmadıklarını kontrol ediniz. Yer yer toplanmalar varsa sayım lamını yıkayıp yeniden doldurunuz.
17. Yayılma muntazam ise orta büyültme ile sol üst köşeden sayıma başlayınız.
18. Hacimleri 1/4000 m³ olan küçük karelerden 80 tanesinin içindeki alyuvarları sayınız. Bunun için dört köşeden birde ortadan olmak üzere (içlerinde 16 adet en küçük kare bulunan) orta büyüklükteki karelerden 5 tanesini sayınız.
19. Orta büyüklükteki bu kareleri sayarken, önce üst sıranın sol başından sağa doğru gidiniz, sağ kenarın sonuna gelince alt sıraya geçerek bu kez sağdan sola doğru bir yol izleyiniz.
20. Bir en küçük karede bulunan alyuvarları sayarken, karenin içtekilerle birbirine komşu olan iki kenar üzerine rastlayanları sayıma dahil ediniz. Daha basit bir ifadeyle, sol ve alt kenar üzerindeki sayıma dahil ediniz, sağ ve üst kenardakileri sayıma dahil etmeyiniz.

21. Bu kurallara uyarak sayıma başlayınız ve bitiriniz.
22. Sayımın dayanağı, bilinen hacim içinde ne kadar hücre bulunduğunu saptayıp, buradan 1 mm^3 hacimdeki miktarı hesaplamaktır.
23. Hacmi $1/4000 \text{ mm}^3$ olan en küçük karelerden birinin içindeki alyuvarları sayıp, 4000 ile sonrada sulandırma oranıyla çarparak 1 mm^3 karedeki alyuvar sayısını bulabilirsiniz.
24. Temelde böyle olmakla beraber, hücrelerin dağılımı aynı olmadığından, küçük karelerden her birindeki alyuvar sayısı farklıdır. Bu nedenle küçük karelerden yalnız birinin içindeki hücreleri sayıp sonucu hesaplamak yanlıştır.
25. Doğruya en yakın olan değeri bulmak için en az 80 adet en küçük kare içindeki alyuvarları sayınız ve bulduğunuz rakamı en küçük kare adedine bölünüz. Böylece bir en küçük kareye düşen ortalama alyuvar sayısını bulunuz.
26. Bu sayı da önce sulandırma oranı ile sonra da 4000 ile çarpılarak 1 mm^3 kandaki alyuvar sayısını verecektir. Bunu kısaltılmış olarak şu şekilde formüle edebiliriz.

$$A \times 10.000 = 1 \text{ mm}^3 \text{ kandaki alyuvar sayısı.}$$

A: En az 80 en küçük kare içindeki toplam alyuvar sayısı.

Önemli Not:

1. Kan sayımının doğru bir biçimde yapıp yapılmadığını kontrol için aynı kan örneğinden ya da aynı kişinin kanından birkaç defa arka arkaya sayımlar yapılır. Bulunan değerlerin en yükseği ile en düşüğü arasında 200.000 ya da daha az fark varsa sayım doğrudur.
2. Kullandığınız tüm malzemeleri zamanında ve usulüne uygun olarak temizleyip, kuru olarak bırakınız.

Sorular:

1. Olgun alyuvarlarda niçin tamir ve regenerasyon yeteneği yoktur?
2. Sarılığın (ictenus) ortaya çıkmasında, alyuvar sayısında bir değişiklik gözlenir mi?
3. Kan plazmasında hemoglobin bulunur mu?
4. Yüksekliğin ve derinliğin alyuvar sayısı üzerindeki etkisini tartışınız?
5. Olgun kurbağa alyuvarları neden çekirdeklidir?
6. Olgun memeli alyuvarları neden çekirdeksizdir?
7. Size göre canlının beden büyüklüğü ile alyuvar sayısı arasında bir ilişki var mıdır?
8. Size göre canlının beden aktivitesi ile alyuvar sayısı arasında bir ilişki var mıdır?
9. 1 mm^3 kanda bulunan alyuvar sayısının, normalin altında ve üstünde olmasını nelere bağlayarak yorumlayabilirsiniz?

DENEY 3.13.: Alyuvar Çapının Ölçülmesi

Teorik Bilgi: Alyuvar büyüklüğünün saptanması, hematopoietik sistemin çalışması ve bu sistem üzerine etki yapan hormonal ve sinirsel faktörlerle ilgili bilgi verir. Farklı tip anemilerin tanımlanmasında ve takibinde önemli bir kriter teşkil eder.

Alyuvar çapının ölçülmesi için farklı metotlar geliştirilmiştir. Ölçümler genellikle oküler mikrometre ve objektif mikrometre kullanılarak, Giemsa veya Wright boyama yöntemi ile hazırlanmış yayma kan preparatlarında (froti) yapılır.

Oküler mikrometre, oküler içerisine yerleştirilmiş olarak ya hazır vaziyettedir ya da oküler içerisine konabilecek şekilde dairesel camlar halindedir. Bu mikrometrede ölçüm alanı 0'dan 100'e kadar bölmelere ayrılmış olup, her 10 çizgi 1 olarak gösterilerek, yanlarına 1'den 10'a kadar sayılar yazılmıştır. Ölçümde kullanılan büyültmeye göre iki çizgi arasındaki uzunluğun gösterdiği değer değişir. Bu sebeple önce objektif mikrometre ile oküler mikrometredeki iki çizgi arasının, kullanılan objektife göre kaç mikrona karşılık geldiği bulunur. Oküler mikrometreler genellikle 10'dan küçük (8-9) numaralı oküler ile kullanılır.

Objektif mikrometre özel bir lamdır ve üzeri bölmelidir. Burada 1 mm uzunluk çizgilerle 100 bölüme ayrılmıştır. Her 5 çizgi orta uzunlukta ve her 10 çizgi daha uzun bir çizgi ile belirlenmiştir. Objektif mikrometre lamı, mikroskop tablasının üzerine konur. Alyuvar çapını ölçmede kullanılacak büyültmeyle ve şaryo yardımıyla her iki mikrometrenin sıfır çizgileri aynı seviyeye gelecek biçimde ayarlanır. Bu işlemi kolaylaştırmak için önce küçük büyültmeyle çizgiler bulunup, üst üste getirildikten sonra ölçüm yapılacak objektif çevrilir. Objektif mikrometre üzerinde belirli bir uzunluğun, oküler mikrometredeki kaç çizgiye uyduğu bulunur. Örneğin 0.1 mm uzunluk 65 çizgiye eşit olsun. Bu oküler mikrometre üzerindeki iki çizgi arasının 0.0015 mm (1.5 µ) göstermesi demektir (Bakınız: Şekil:3.13.1).

Amaç: Oküler ya da objektif mikrometresi yardımıyla, Giemsa boyalı yayma kan preparatında alyuvar çapının ölçülmesi.

Materyal: Şaryolu mikroskop, oküler mikrometresi, objektif mikrometresi, Giemsa boyalı yayma kan preparatı, sedir yağı, ksilol.

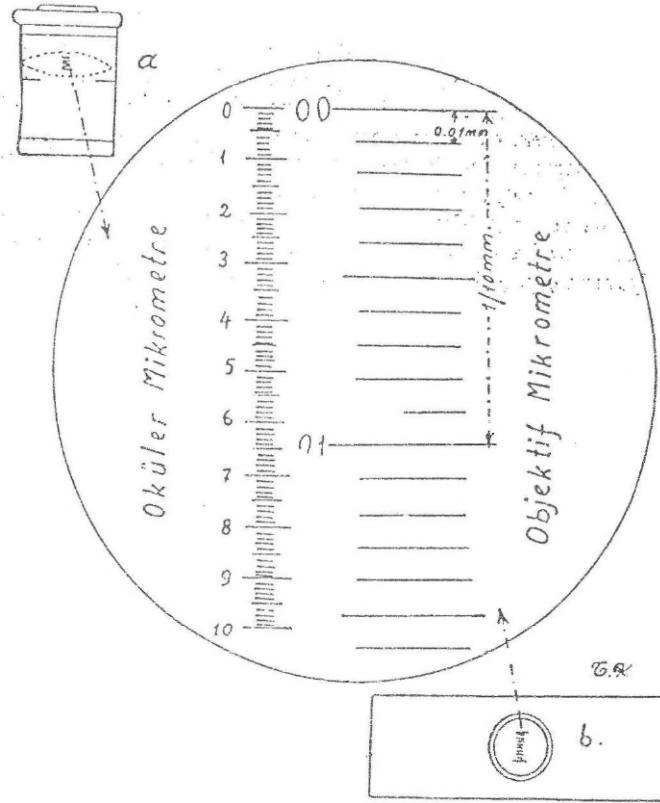
Metot:

1. Mikroskop tablasından şayet varsa objektif mikrometresini alarak, Giemsa ile boyanmış yayma kan preparatını koyup, netlik ayarını yapınız.
2. İmmersiyon objektifi ile sedir yağı kullanarak, yayma kan preparatının farklı yerlerinden, yuvarlak olan alyuvarları seçerek ortalama 750 alyuvarı inceleyiniz.
3. Her alyuvarın birbirine dikey ve yatay iki çapını ölçerek, oküler mikrometrede kaç çizgiye denk geldiğini ve daha önce saptanan değerlerden de kaç mikron olduğunu bulunuz. Örneğin, herhangi bir alyuvarın bir çapı

okülerde 6, diğer çapı 7 çizgi olsun. Ortalama çap $(6+7):2 = 6.5$ çizgidir. Daha önce oküler mikrometrede iki çizgi arasının 0.0015 mm'ye eşit olduğu saptandığından, bu alyuvarın çapı $(6.5 \times 0.0015 = 0.00975$ mm ya da 9.75μ olarak bulunur.

Tablo:3.13.1 İnsanda ve Farklı Hayvanlarda Alyuvar Büyüklükleri (mikron = μ)

| | |
|---------------|------|
| İnsan | 7.3 |
| At | 5.5 |
| Keçi | 3.2 |
| Köpek | 7.0 |
| Kedi | 5.8 |
| Maymun | 6.2 |
| Tavşan | 6.8 |
| Kobay | 7.3 |
| Beyaz sıçan | 6.2 |
| Beyaz fare | 5.7 |
| Tavuk | 9.0 |
| Kurbağa | 15.0 |
| Balık (sazan) | 7.1 |



Şekil:3.13.1

a-Objektif mikrometresi b-Oküler mikrometresi (Konuk'dan)

KONU 3.14.: Eritrositlerin Büyüklükleri İle İlgili Değerlerin Hesaplanması

a. Ortalama eritrosit hacmi (MCV: Mean Corpuscular Volume)

Bu değer, eritrositlerin ortalama hacmini gösterir. Kanda hematokrit tayini ve eritrosit sayımı yapılarak hesaplanır.

$$\text{MCV} = \text{Hematokrit değeri} \times 10 / \text{Eritrosit sayısı (milyon/l mm}^3 \text{ kan)} = \text{mikron}^3$$

b. Hacim indeksi (VI: Volume Index)

Bu indeks, eritrosit ortalama hacminin, normal ortalama eritrosit hacmine oranını verir. Hematokrit değeri ve eritrosit sayısı bulunduğundan sonra hesaplanır. Hesaplama normal hematokrit değeri %43 standart kabul edilir.

$$\text{VI} = \text{Hematokrit değeri} \times 0.116 / \text{Eritrosit sayısı (milyon/l mm}^3 \text{ kan)}$$

c. Direkt metotla eritrosit çapının ölçülmesi. Price-Jones eğrisi ve ortalama eritrosit çapı.

Eritrositlerin çapı doğrudan, direkt ölçülebildiği gibi, ince bir yayma kan filminin farklı dalga boylarındaki ışığı kırma indeksinden faydalanılarak da ölçülebilir. Direkt yöntemde eritrositlerin çapı, sayma lamalarında ıslak olarak ölçülebildiği gibi, boyanmış kuru yayma kan preparatlarında da ölçülebilir. Kuru yayma kan preparatlarından immersiyon objektifli mikroskopta, belirli bir büyültmede fotoğraf çekilerek, tam dairesel görünen eritrositlerden 200 tanesinin çapı ölçülerek, mikroskop büyültmesine oranlamak koşuluyla eritrositlerin gerçek çapları mikron cinsinden hesaplanır.

Price-Jones eğrisinin çizilmesi:

Yukarıdaki yöntemlere göre eritrositlerin çapları ölçüldükten sonra çapları 0.5 mikron fark gösteren eritrositler ayrı ayrı gruplandırılır.

Örnek:

$4 \pm 0.25 \mu$, $4.5 \pm 0.25 \mu$, $5 \pm 0.25 \mu$, $6 \pm 0.25 \mu$, $6.5 \pm 0.25 \mu$ gibi farklı çaptaki eritrositler farklı gruplara ayrılırlar. Her gruptaki eritrosit sayısı, apsiste çap ve ordinatta eritrosit sayısını gösteren bir koordinat sistemine kaydedilerek Price-Jones eğrisi çizilir (Bkz. Şekil).

d. Ortalama eritrosit çapı (MCD: Mean Corpuscular Diameter)

Her grupta bulunan eritrosit sayısı, o grubun çapı ile çarpılarak, çarpımlar toplanır. Sonuç, sayılan eritrositlerin toplam sayısına bölünürse, ortalama eritrosit çapını (MCD) verir.

e. Ortalama eritrosit kahlığı (MCT: Mean Corpuscular Cell Thickness)

Bu değer, ortalama eritrosit hacmi (MCV) ve ortalama eritrosit apı (MCD) bulunduktan sonra, aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\text{MCT} = 4 \text{ MCV} / 2 / \text{MCD} \times 3.1416$$

DENEY 3.15.: Lökosit Sayımı

Teorik Bilgi: Lökositler (Akyuvarlar), plazma içinde bulunan kan hücrelerindedir. Eritrositlere oranla daha az sayıdadırlar. 1 mm³ kanda ortalama 7.000-10.000 arasında lökosit bulunur. Bu kan hücreleri, protoplazmik uzantıları sayesinde serbest olarak hareket etme özelliğine sahiptirler. Plazmanın dışında lenf sıvısı içinde de bulunurlar. Lökositler sitoplazmalarının granüllü olup olmadıklarına göre 2 ana gruba ayrılırlar.

Granüllü lökositler: Bu lökositler özellikle çekirdeklerinin şekline göre 3 tipe ayrılırlar. Hepsininde sitoplazmaları granüllü bir yapı gösterir. Bunlardan **bazofil** tipinde olanların çekirdekleri at nalı veya "S" şeklinde olup, sitoplazmaları büyük granüllüdür. Büyüklükleri 8-11 mikron arasındadır. **Nötrofil**, 3-5 loplu bir çekirdeğe sahip olup bunlar ince kromatin köprüleri ile birbirine bağlanmışlardır. Sitoplazmalarındaki granüller daha ufaktır. Bazofillere göre daha aktiftirler. Büyüklükleri 9-12 mikron arasındadır. **Eozinofiller** 2 loplu bir çekirdeğe sahip olup, bu loplar ince kromatin bir köprü ile bağlanmıştır. Sitoplazmaları büyük granüllüdür. Büyüklükleri 11-14 mikron kadardır.

Bu lökositlerden bazofil ve nötrofiller bazik karakterli boyalarla, eozinofiller ise asit karakterli boyalarla boyanırlar. Her üçü de bakterileri fagosite etme yeteneğine sahip olup, nötrofiller bu konuda daha aktif bir faaliyet gösterirler. Bu gruptaki lökositlerin çekirdekleri parçalı bir yapı gösterdiğinden, polinükleer lökositler adını da alırlar.

Granülsüz lökositler: Bu gruba giren lökositler, çekirdeklerinin bütün ve büyük bir yapı göstermesinden dolayı, mononükleer lökositler adını da alır. Çekirdek hücrenin tamamına yakın bir kısmını doldurmuştur. Bu gruptaki lökositlerden **lenfositler**, en küçük lökosit tipi olup, büyüklükleri ortalama 8-10 mikron kadardır. **Monositler** ise en büyük lökosit tipi olup, büyüklükleri ortalama 12-20 mikron arasındadır.

Lökositler vücutta farklı yerlerde meydana getirilirler. Granüllü lökositler kırmızı kemik iliğinde, granülsüz olanlardan monositler, kemik iliği ve lenf bezlerinde, lenfositler ise, lenf bezleri ve dalakta meydana getirilir.

Akyuvarların 1 mm³ kandaki normal miktarları, bir enfeksiyon etkisiyle artış gösterir. Lökositlerin sayısı, vücutta iltihap dönemlerinde 22.000 e kadar çıkabilir. Bu gibi durumlarda da hangi tip lökositin kanda aşırı artış gösterdiği, yayma kan preparatları (froti) ile saptanarak, buna neden hastalıklar teşhis edilebilir. Lökositlerin ortalama ömrü 2-4 gün arasındadır.

Amaç: 1 mm³ insan kanında bulunan lökosit sayısının saptanması.

Materyal: Etil alkol, eter, pamuk, lanset, Hemositometre seti, Türk sulandırma eriyiği, şaryolu mikroskop, temizleme solüsyonları, gazlı bez ya da kurutma kağıdı.