

DENEY: Lökosit (Akyuvar) Formülü – Froti

Teorik Bilgi: Kan yayma preparatına akyuvar formülü veya froti adı verilir. Bu yöntemle çeşitli akyuvar tiplerinin yüzde oranları tayin edilir. Kanda bulunan 100 akyuvarın kaç tanesinin nötrofil, eozinofil, bazofil, lenfosit ve monosit olduğunun saptanması bu yöntemle yapılır. Akyuvar sayısının arttığı her olayda, genel artışa akyuvar tiplerinin hepsi katılmazlar. Farklı rahatsızlıklarda ve bu rahatsızlıkların farklı dönemlerinde akyuvarların sadece bir ya da birkaç tanesi çoğalabilir. Akut hastalıklarda en fazla nötrofiller, kronik hastalıklarda ise lenfositler artar. Paraziter hastalıklarda ve bazı deri hastalıklarında eozinofiller artış gösterir. Kronik malaryada monositler çoğalır. Genel olarak komplikasyon yapmayan bir hastalığın savaş döneminde nötrofiller, savunma ve hastalığın yenilmesi döneminde monositler, iyileşme ve toparlanma döneminde ise lenfosit ve eozinofiller artar. Akyuvarların yüzde oranlarının saptanması, hastalıkların ayırt edici tanılarındaki bir dereceye kadar fikir verir. Bir hastalığın gidişinin izlenmesinde fayda sağlar.

Farklı akyuvar tiplerinin yüzde oranları insan ve hayvanlarda değişiktir. İnsanlarda dolaşım kanında en çok bulunan akyuvar tipi nötrofildir. Bundan sonra sırasıyla lenfosit, monosit, eozinofil ve bazofil gelir. Hayvan gruplarından sığır, koyun, keçi, tavşan, kobay ve balık kanlarında lenfositler daha çok bulunur. At, eşek, katır, köpek ve kedilerde ise nötrofiller çoğunluktadır. Kanatlılarla domuzlarda nötrofil ve lenfositlerin yüzde oranları yaklaşık olarak birbirine eşittir. Hayvanlarda genç yaşlarda lenfositler daha baskın görülür. İnsanlarda nötrofil, eozinofil ve bazofillerin oranı ihtiyarlıkta en fazladır. Buna ilaveten büyüklerde çocuklardan, erkeklerde kadınlardan daha fazladır. Lökosit formülü boyanmış yayma kan preparatlarında yapılır. Lökosit grubuna giren hücreler granüllü ve granülsüz lökositler olarak 2 ana gruba ayrılırlar. Granüllü olanlar nötrofil, eozinofil ve bazofildir. Bunların sitoplazmaları granüllü yapıdadır ve çekirdekleri hücre içini tamamen doldurmamıştır. Nötrofillerin çekirdekleri 3-5 loplulu, eozinofillerin 2 loplulu, bazofillerin ise “at nalı” ya da “S” şeklindedir. Granülsüz olanlar ise lenfosit ve monositlerdir. Bunların sitoplazmaları, çekirdeğin hücre içini yaklaşık tamamen doldurmasından dolayı, hücre çeperine ince bir tabaka halinde sıkışmış ve granülsüzdür. Aralarındaki fark büyüklükleridir. Lenfositler en küçük, monositler ise en büyük lökosit hücreleridir.

Lökositlerin Büyüklükleri

Granüllü lökositler:

1. Nötrofil: 9-12 mikron çapında
2. Eozinofil: 11-14 mikron çapında
3. Bazofil: 8-11 mikron çapında

Granülsüz lökositler:

1. Lenfosit: 8 mikron çapında
2. Monosit: 12-20 mikron çapında

Lökositlerin Bulunma Yüzdeleri

Granüllü lökositler:

1. Nötrofil: % 50-70
2. Eozinofil: % 1-4
3. Bazofil: % 0-1

Granülsüz lökositler:

1. Lenfosit: % 20-40
2. Monosit: % 2-8

Amaç: Omurgalı yayma kan preparatında, Giemsa boyamasıyla, lökosit (akyuvar) tiplerinin yüzde oranlarının saptanması.

Materyal: Kan, lam, lamel, lanset, pamuk, etil alkol, metil alkol, boyama küveti, Giemsa boyası, damıtık su, mikroskop, pens.

Metot:

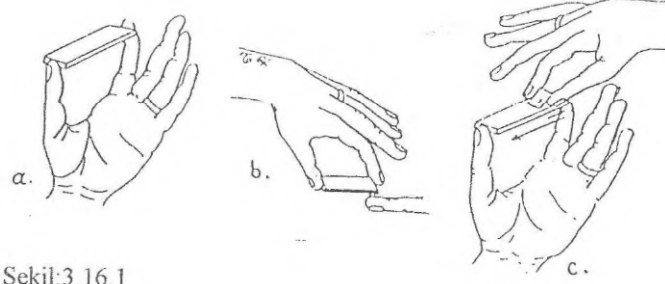
1. Temiz bir lam alıp, önce alkol sonra saf su ile yıkayıp iyice kurutunuz.
2. Kalem tutmadığımız elinizin işaret parmağını alkollü pamukla silip, steril bir lansetle deliniz.
3. Lamın kısa kenarından 1 cm kadar içeriye, parmak ucundaki kan damlasını, deriyi lama dokundurmadan değdiriniz.
4. İkinci bir lamın (lamel de olabilir) kısa kenarını kan damlası üzerine 45 ° lik açıyla değdirip, ileriye doğru hareket ettirerek, damlayı birinci lama yavaşça yayınız. Yavaş hareket yaymanın ince olmasını sağlar (Şekil.3.16.1.).
5. Preparatı havada kuruttuktan sonra, kurşun kalemle kanın kenarına sahibinin adını yazınız.
6. Preparatı boyama kabındaki cam çubuklar üzerine biraz aralıklı olarak yerleştiriniz.
7. Üzerine metil alkol damlatıp, 10-15 dakika fiksasyon (tespit) için bekleyiniz.
8. Bu süre sonunda preparatları bir pensle tutarak alkolün fazlasını eğerek dökünüz. Daha sonra her preparat üzerine 5 ml Giemsa boyası dökünüz. Bu boya dikkatli dökülmeli ve lamın kenarından taşırılmamalıdır.
9. Preparatları bu durumda 30 dakika bekletiniz.
10. Bu süre sonunda preparatları bir ucundan pensle tutarak, boyanın fazlasını dökünüz.
11. Yavaş akan suda yıkadıktan sonra, lamın arka yüzündeki boya kalıntılarını, ucuna pamuk sarılmış bir pensle siliniz.
12. Preparatları açık havada dikkatli bir şekilde kurutup, mikroskopta incelemeye hazır hale getiriniz.

Lökosit Formülünün Yapılması:

1. Bu amaç için hazırlamış olduğunuz preparatı mikroskop tablasına koyunuz.
2. İncelemeyi ortanca veya büyük objektifte (10x40 ya da 10x60) ve şaryolu mikroskopta yapınız.
3. Lamın sol ucunun üst köşesinden başlayarak, sağ tarafa doğru şekildeki gibi ilerleyerek, gördüğünüz ve tanıdığımız lökosit tiplerini kaydediniz (Şekil:3.16.3.).
4. Kayıt için şekildeki gibi bir tablo hazırlayınız (Şekil:3.16.2.).
5. Toplam lökosit sayısı 100 adet oluncaya kadar rastlanan farklı lökosit tiplerinin sayısını kaydederek, formülü tamamlayınız. Şayet lamın sonuna geldiğinizde toplam 100 adet lökosit kaydetmediyseniz, bu sefer aynı işlemi sağdan sola ters yönde şekildeki gibi tekrarlayınız.
6. Sonuçta, 100 adet hücre içindeki her lökosit tipine ait rakamları saptayarak, yüzde lökosit tipi oranlarını çıkarınız.

Sorular:

1. En fazla ve en az hangi lökosit tipini kaydettiniz?
2. Bulduğunuz yüzde oranlar teorik bilgilerdeki normal değerlerle uyum sağlıyor mu?
3. Yayma kan preparatı hazırlanırken, kanın neden ince olarak yayılması gereklidir?
4. Farklı hayvan gruplarına ait lökosit formüllerini teorik olarak araştırarak, insan kanı ile karşılaştırınız.
5. Lökosit formülü ne amaçlarla yapılır?
6. Lökosit formülü preparatı hazırlanırken neden boyama yapılır?
7. Kullandığınız Giemsa boyasından başka boyalarda bu amaç için kullanılabilir mi, araştırınız?
8. Burada öğrendiklerinize göre, eritrosit (alyuvar) formülü de yapılabilir mi?

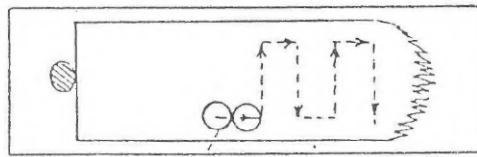


Şekil:3.16.1

Yayma kan frotisi yapımı. a. Lamın tutulması, b. Kan alınması, c. Yayma.(Konuk'dan)

Granüllü Akyuvarlar		Granülsüz Akyuvarlar				Tipik Olmayan
Nöt.		Eoz.	Baz.	Len.	Mon.	
Çubuk ç.	Parçalı ç.					
Toplam						

Şekil:3.16.2 Akyuvar formülü yapımında kullanılan tablo.(Konuk'dan)



Şekil:3.16.3

Akyuvar formülü yapımında froti üzerinde izlenen yol.(Konuk'dan)