

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK DERSİ

HEMATOLOJİ DERSİ

LABORATUVAR FÖYÜ

ADI SOYADI:

NO:

UYGULAMA DEĞERLENDİRMELELERİ

Uygulama 1	Uygulama 2	Uygulama 3	Uygulama 4	Uygulama 5
Uygulama 6	Uygulama 7	Uygulama 8	Uygulama 9	Uygulama 10
Uygulama 11	Uygulama 12	Uygulama 13	Uygulama 14	Uygulama 15

UYGULAMA 1

İDRAR ANALİZİ

İdrar, vücuttaki sıvının böbrekler aracılığıyla filtre edilmesiyle atılan bir sıvıdır. Vücudumuzun elektrolit ve pH dengesi böbrekler aracılığıyla düzenlenmektedir. Bu nedenle atılan idrarda oluşabilecek değişiklikler bu sistemlerdeki hasarlardan kaynaklanabilecektir. Böbrek ve üriner sistemle ilgili hastalıklar veya böbreğe bağımlı olmayan metabolik ve sistemik hastalıklarda idrar analizi yapılmalıdır.

Görünüş: İdrara sarı rengini veren, idrarda bulunan urokrom, az sayıdaki urobilin ve uroerytrin pigmentleridir. Daha açık renkteki idrarlar genellikle daha sık idrara giden insanlarda rastlanmaktadır. Koyu renkteki idrarlar daha az sıklıkta idrara giden insanlarda rastlanmaktadır. İdrarın rengi, idrar konsantrasyonu ve hidrasyon derecesi hakkında bilgi vermektedir. Normal konsantrasyonlu bir idrar soğutulduğunda, bir sediment oluşmaktadır. Patolojik durumlarda oluşan presipitasyonların nedeni ise fosfat ve ürikasid kristalleridir.

İdrar berrak veya bulanık olabilir. Normal idrarlarda gölgeli veya bulutumsu görüntüler üriner ve genital yollardan salgılanan mukustan kaynaklanmaktadır.

Normal idrar rengi bir takım patolojik durumlar sonucunda ortaya çıkar. Örneğin idrarda kanın bulunması, üriner porfirin veya safra pigmentlerinin artışı idrar renginin değişmesine neden olmaktadır.

Koku: Normal idrarın tam tayin edilemeyen, kendine has aromatik bir kokusu vardır. Koku özellikle idrar yolu enfeksiyonu geçiren kişilerde büyük önem taşımaktadır. İdrar yoluna yerleşen bakteri enfeksiyonlarında amonyak veya iyod kokulu idrar alınabilmektedir.

İdrar Hacmi: Erişkin bir kişi günde ortalama 1500ml idrar atmaktadır. Bu sınırlar 600-2000 ml arasında değişmektedir. 24 saat süreyle 2000 ml'den fazla idrar atılması poliüri olarak adlandırılmaktadır. Diabetes Mellitus, Diabetes İnsipidus ve Antidiüretik Hormon (ADH) eksikliği hastalıklarında poliüri görülmektedir. Eğer günlük idrar boşaltımı 400 ml'nin (16.6ml/h) altına düşerse bu duruma oligüri denir. İdrar hacmindeki azalma dehidratasyon, renal iskemi, bazı böbrek hastalıkları ve idrar yolu tıkanmaları sonucu olabilir.

Yoğunluk: Normal idrar yoğunluğu 1010-1030 arasında değişmektedir. Yoğunluğun ölçülmesi idrarda mevcut bulunan toplam katı konsantrasyonu hakkında bilgi vermektedir. Normal idrarın yoğunluğunu veren fizyolojik katılar NaCl ve üredir. Patolojik koşullarda glukoz ve protein idrara yoğunluğuna etki etmektedir.

İdrar pH'ı: Plazma ve ekstrasellüler sıvıda bulunan hidrojen iyon konsantrasyonunun böbrek tarafından kontrol edilme yeteneği sonucu idrar pH'sı oluşmaktadır. Vücudun metabolik aktivitesi sonucunda uçucu olmayan asidler oluşmaktadır. Bunlardan sülfürikasid, fosforikasid ve hidroklorikasid akciğerler tarafından da atılmaktadır. Düşük miktarlarda pirüvik, laktik ve sitrikasid ile keton cisimleri oluşmaktadır. Bu asidler böbrek glomerüllerinde katyonlarla , özellikle sodyumla değiş tokuş edilerek atılmaktadır. Bu sırada bikarbonat da reabsorbe edilmektedir. Tubüler hücreler hidrojen iyonlarını sodyumla değiştirerek, glomerüler filtrattan geçirmekte ve idrar asidik özellik kazanmaktadır. Hidrojen iyonları amonyum iyonları halinde atılmaktadır. Sağlıklı kişilerde idrar pH'sı 4.6-8.0 arasında değişmektedir.

İdrar Stripleri ve Ayırıcı Özellikleri: Bu tip stripler glukoz, bilirubin, keton, yoğunluk, kan, pH, protein, urobilinojen, nitrit ve lökositlerin idrarda hızlı bir şekilde tesbit edilmesi için kullanılır.

Rapor 1:

İdrarın Strip ile İnceleme Sonuçları:

Hasta Adı Soyadı:

Glukoz	:
Bilirubin	:
Keton	:
Yoğunluk	:
Kan	:
pH	:
Protein	:
Urobilinojen	:
Nitrit	:
Lökosit	:

Onay:

UYGULAMA 2

İdrar Sedimentinin İncelenmesi:

İdrar sedimentinin mikroskopik incelenmesi doğrudan böbrek hastalıklarına ilişkin bilgi vermemekte, fakat bir lezyonun varlığı ve bu lezyonun aktivitesi hakkında bilgi vermektedir. İdrar sedimentinde bulunabilecek elemanları üç grupta toplamak mümkündür:

1. Kristal veya amorf kimyasal elemanlar (fosfataz, üretaz, kalsiyum okzalat, aminoasitler, kolesterol)
2. Kandan veya idrar yollarından elde edilen hücreler (eritrositler, epitel hücreleri, spermatozoa, mikroorganizmalar).
3. Silindirik Yapılar: Bunlar idrar yollarından atılan ve proteinlerce şekillendirilen kümelerdir. Hyalin, granüler, epitelyal, yağasidi silindirleri, eritrosit ve lökosit kümeleri buna örnek oluşturur.

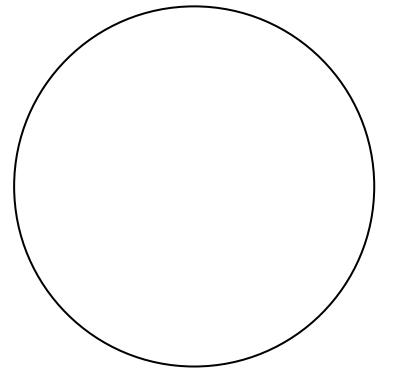
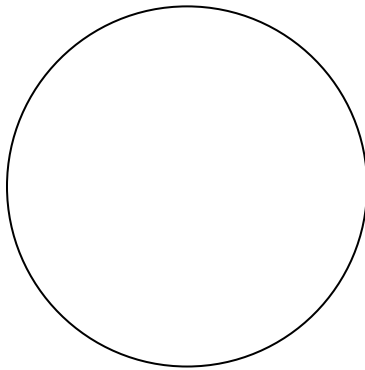
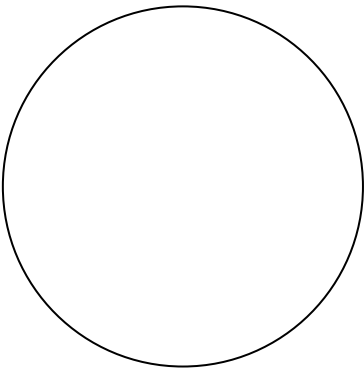
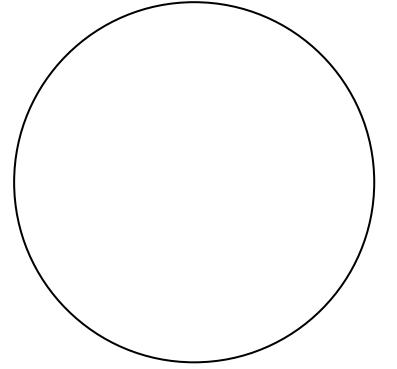
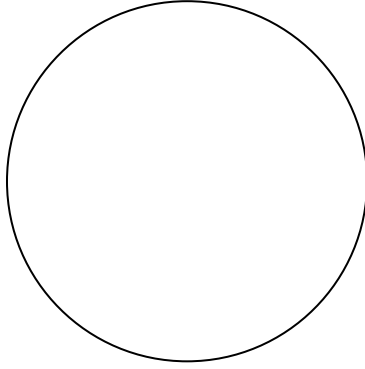
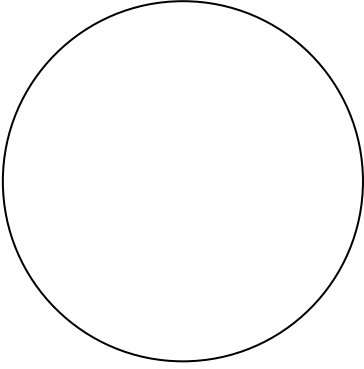
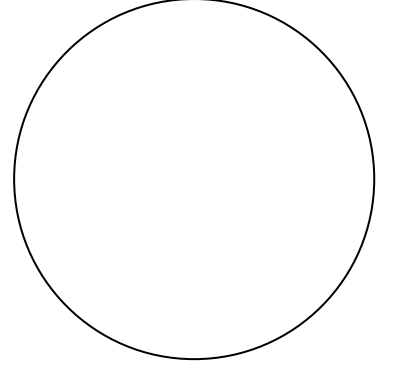
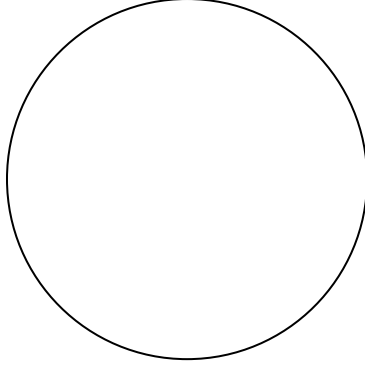
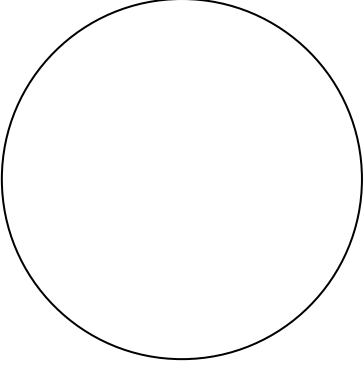
Normal sağlıklı bir kişinin idrar sedimentinde birkaç epitel hücresi, kristal, kırmızı kan hücresi ve lökosit görülebilir. Ayrıca idrarın alınıp laboratuvara getirilmesi esnasında oluşabilecek bazı kontaminasyonlar sonucunda, idrarda bulunmayan bakterilerin grölmesi mümkün olabilir. Bu durumda önemli olan idrarın alınımından sonra en geç 1-2 saat içinde incelenmesi ve temiz (mümkünse steril) bir kaba materyalin alınımıdır.

İdrar Sedimentinin İncelenmesi

- İdrar örneğini hafif çalkalayın ve 10 ml'sini bir tübe aktarın
- Tüpü 3000 rpm'de 5 dak. süreyle santrifüjleyin
 - Supernatani boca etmek suretiyle atın. Kalan sedimenti mevcut sıvıyla hafif karıştırın ve bir damlasını lam üzerine damlatarak üzerine lameli kapatın.
 - Hazırladığınız preparatı 10'luk ve 40'lık büyütmelemlerde inceleyerek gördüğünüz şekilleri laboratuvar defterinize çizin.

Rapor 2:

İdrar Sedimentinin İncelenmesi



UYGULAMA 3

İNSANDA KAN ALMA YÖNTEMLERİ, KAN PIHTILAŞMASI ve SERUM/PLAZMA AYRIMI

Kan plazma adı verilen sıvı bir ortamda süspansiyon halinde bulunan şekilli elemanlardan oluşur. Çevre kanında dolaşan kan hücreleri eritrositler, lökositler ve trombositlerdir.

İnsanda parmak ucundan, kulak memesinden veya topuktan kan alınması: Kan erişkin kişilerde parmak ucu veya kulak memesi, küçük çocuklarda ise ayak baş parmağının ucu veya topuktan alınır. Bu bölgeler alkolle temizlenip kuruması beklendikten sonra, steril bir Francke iğnesi veya lanset ile delinir. Delinecek bölgenin renginin normal ve sağlıklı olması, yani ödemli ve siyanoze (mor) olmaması gerekir. Kan alınırken, örneğe doku suyunun karışmasını önlemek amacıyla, delinen yerin etrafına basınç yapılmaması önerilir. Lokal vazodilatasyonu sağlamak ve kanın akmasını kolaylaştırmak için parmak 40-45°'lik suda tutulur veya bu sıcaklıktaki su ile ıslatılmış bir pamuk parçası kan alınacak yere uygulanır.

Lansetin kullanımı: Lanset ince metalden yapılmış bir aygıttır. Delici uç kısmı yaklaşık 3mm boyundadır. Steril koşullarda ambalajlanmış olarak satılmaktadır. Aygıtın ambalajı kullanım sırasında açılır. Çevreye dokunmaksızın, önceden alkollenmiş bölgeye hızlı bir şekilde batırılarak uygulanır.

Parmak, kulak memesi veya topuk delindikten sonra, ilk damlayı silmek gerekir. Bunun nedeni, ilk damlanın sonraki damlalara göre daha çabuk pıhtılaşması ve hücreler bakımından daha zengin olmasıdır. Çabuk pıhtılaşmasının nedeni ise, açık delikten akan ilk damlanın zedelenmiş doku ile temasa gelmesi ve bu suretle doku faktörlerinin pıhtı oluşumunu hızlandırmasıdır. Daha sonra akan kan damlaları yaranın çevresindeki ince bir kan tabakası arasından geçtiğinden, zedelenmiş doku ile direkt olarak temasa geçmez. İlk kan damlasının hücreler bakımından daha zengin olmasına gelince; Vücudun bazı bölgelerinde, örneğin parmak ucu veya kulak memesinde, bazı kapillerlerin çapı tek bir eritrositin çapından daha küçüktür ve bunlardan eritrositler ancak sürtünerek geçebilirler. Bu nedenle hücrelerin birikimi olabilir ve sayıları çoğalır.

Kol Veninden Kan Alınması: Fazla miktarda kana gereksinme olduğunda, genellikle kan venden alınır. Ven ponksiyonu denilen bu işlem için en uygun yer dirsek ön venleridir. Genellikle insanda kan *Vena mediana cubitalis*'den alınır. Bu bölgelerden kan alınamazsa, erişkinde el bileği, ayak bileği venleri; çocukta ise *Vena jugularis externa* da kullanılabilir.

Eğer kan örneği kol venlerinden alınacaksa, venin hemen üzerindeki üst kol bölgesi bir lastik bantla (turnikeyle) sıkıştırılır. Kişiye parmaklarını açıp kapaması söylenir. Genel olarak, ön dirsek bölgesinde, deri altında belirmiş bir venin, örneğin *Vena mediana cubitalis*'in üzeri alkolle temizlenir. Alınacak kanın miktarına uygun çapta bir enjektör iğnesi seçilir. Enjektör ve iğnesi, steril ve kuru olmalıdır. Alt kol, sol elle sıkıca kavrandıktan sonra, baş parmakla kan alınacak venanın üzerindeki deri gerilip, enjektör iğnesinin deliği yukarı bakacak şekilde döndürülür. Bundan sonra ani bir dalışla deri ve deri altı dokusu ve sonra da vene girilir. Ancak deri ve venin aynı noktada delinmemesi gerekir ve bu suretle, sağlam derinin delinen damara tampon yapması sağlanır.

Damara girildiğine emin olabilmek için enjektör pistonu hafifçe çekilir ve enjektörün içine kanın girip girmediğine bakılır. Eğer enjektöre kan girmişse, üst koldaki bant hafifçe gevşetilir ve böylece dolaşımın devamı sağlanır. Sonra piston yavaş yavaş çekilerek, kan enjektöre alınır. Yeterli kan alınmasından sonra, steril bir pamukla iğne deliğinin üzerine basınç yapılır, lastik bant tamamen gevşetilir ve iğne dışarıya çekilir. Kanın deri altında toplanmasını, yani hematom oluşumunu önlemek amacıyla, bir süre yaranın üstüne basınç yapılır.

Eğer kanın pıhtılaşması engellenmek isteniyorsa, önceden enjektörün içine uygun bir antikoagülanın (heparin, sitrat, EDTA) çekilmesi veya kanın antikoagülan bulunan bir kaba derhal boşaltılması gereklidir. Kanın saklanması gerektiğinde, kan sıvısının buharlaşmasına ve bileşiminin değişmesine engel olmak amacıyla, tüp sıkıca kapatılır ve buzdolabında bekletilir.

Pıhtılaşma Nedir?

Pıhtılaşma, vücutta meydana gelebilecek herhangi bir dış veya iç hasar sonucunda kan kaybının önlenmesi için kan sıvısında bulunan fibrinin trombositlerle birleşerek, hasarlı bölgede bir tıkaç oluşturmaya neden olan bir fizyolojik bir olay olup, hayati önemi vardır.

Pıhtılaşmayı engelleyen bir antikoagülan ile birlikte kan bir tüpe konur ve santrifüj edilirse, kan hücreleri plazmadan ayrılır. Dipte bulunan hücre sütununun hemen hemen tamamını eritrositler oluşturur. Eritrositlerin üzerinde çok ince bir tabaka halinde lökositler ve trombositler yer alır. Hücre sütununun üstünde ise plazma vardır.

Eğer kan, herhangi bir antikoagülan olmaksızın bir tüpe konursa, bir süre sonra kanın pıhtılaşarak, serumun ayrıldığı gözlenir. Antikoagülanlar serum içinde bulunan pıhtılaşma faktörlerini inhibe ettiklerinden pıhtı oluşmaz. Antikoagülan içermeyen kan örneklerinde kan hücreleri bir fibrin ağı içinde kümeleşerek, pıhtıyı oluştururlar.

KOL VENİNDEN KAN ALINMASI

Gerekli Malzemeler: Enjektör, turnike, alkollü pamuk, alkolsüz kuru pamuk, test için gerekliyse antikoagülan.

Kan almaya başlamadan önce alkollü ve alkolsüz (kuru) pamuk hazırlanır. Enjektör paketinden çıkarılır. İğne hiç bir yere değdirilmeden enjektörün ucuna takılır. Bir - iki kez enjektörün pistonu çekip-itererek kontrol edilir. Turnike hazırlanır.

1. Koldaki kazak veya bluz dirseğin üst kısmına kadar yukarı çekilir.
2. Koldaki damarlar gözle incelenir, yumruk yapılması istenir ve belirgin bir damar tesbit edilir.
3. Damarın bulunduğu alan alkollü pamukla temizlenir ve kuruması beklenir.
4. Dirseğin üst kısmından turnike bağlanır.
5. Enjektörün açık ucu yukarı gelecek şekilde deriye ve damara girilir.
6. Enjektörün pistonu hafifçe çekilerek, kanın gelip gelmediği kontrol edilir.
7. İstenilen miktarda kan alındıktan sonra turnike gevşetilir.
8. Enjektör çıkarılarak üzerine kuru pamuk kapatılır.
9. Kan alındıktan sonra , kan alınan bölgenin yeri ovuşturulmamalıdır. Kuru pamukla tampon yapılması yeterlidir.

Bu uygulamada kol veninden ve parmak ucundan kan alınmasını demonstratif bir şekilde izledikten sonra, parmak ucundan kan alınacaktır.

Rapor 3. İnsandan Kan alma Teknikleri. Kandan Serum plazma elde edilmesi:

Aşağıdaki soruları yanıtlayınız:

1. Parmak ucundan kan almak için gerekli ekipmanlar nelerdir?

2. Damardan kan almak için gerekli ekipmanlar nelerdir?

3. Antikoagülan nedir? Antikoagülan çeşitlerini yazınız.

4. Pıhtılaşmaya hangi hücreler yardımcı olur?

5. Serum ve plazmanın tanımını yazınız.

Onay

UYGULAMA 4

KANDA HEMATOKRİT DEĞERLERİNİN TESBİTİ

Plazma ve Yuvarların Yüzde Oranı (Yüzde Hematokrit Değeri):

Kan yuvarlarının veya yalnız eritrositlerin kandaki % oranını saptamak amacıyla özel tüpler kullanılır. Farklı çapta çeşitli hematokrit tüpleri vardır. Bunların bazıları 0'dan 100'e kadar dereceli, bazıları ise derecesizdir. Önemli olan, tüm boru boyunca iç yüzeyin eşit çapta olmasıdır. Boru çapına göre, hematokrit yöntemleri makro- ve mikro diye ikiye ayrılır. İsimlerinden de anlaşılacağı gibi, makro yöntemde kullanılan borunun çapı geniş ve üzeri derecelidir. Mikro yöntemde ise, ince kapiller tüpler kullanılır; bunlar çoğunlukla derecesizdir.

Kan yuvarlarının veya eritrositlerin kandaki % oranını saptamak için, kanın pıhtılaşmasını engellemek gerekir. Bu amaçla, genellikle organik antikoagülanlar kullanılır.

Mikro Hematokrit Yöntemi: Eğer bu yöntemde damardan alınan kan kullanılacaksa, kanın makro yöntemde anlatıldığı gibi pıhtılaşmasının önlenmesi gerekir.

Parmak ucu, kulak memesi veya topuktan alınan kanda uygulanacak yöntem, kullanılan tüpün özelliğine göre değişir. Düzgün bir kapiller tüpten oluşan bazı mikro-hematokrit tüplerinin iç yüzü ilgili firma tarafından önceden heparinlenerek hazırlanmış olabilir. Böyle bir kapiller tüpün uç kısmı kan damlasına değdirilir, kapillerite nedeniyle, kan borudan yukarıya doğru yükselir. Tüpün yaklaşık 3/4'ü kan ile doldurulduktan sonra, boş kısmının ucu ısıtılarak veya cam macunu ile kapatılır. Tüp kapalı ucu dışa gelmek üzere hematokrit santrifüjüne yerleştirilir ve 5 dakika santrifüj edilir.

Santrifügasyon işlemi tamamlandıktan sonra bir cetvel veya firma tarafından hazırlanmış özel bir ölçer üzerinde kan yuvarları veya eritrosit sütunu ile plazma sütununun uzunlukları ölçülür ve bu suretle yuvarlar ve eritrositlerin kandaki oranı saptanır.

Rapor 4. HEMATOKRİT DEĞERİNİN SAPTANMASI

Kan aldığınız kişinin adı soyadı:

Bulduğunuz hematokrit değeri:

Hematokrit değerinin normal sınırları: Erkek:

Kadın:

UYGULAMA 5

KANDA HEMOGLOBİN DEĞERİNİN SAPTANMASI

Kanda Hemoglobin konsantrasyonunu saptamak için çeşitli yöntemlerden yararlanılır. Bunlardan başlıcaları, renk karşılaştırılmasına dayanan kolorimetrik yöntem, kandaki demir konsantrasyonuna dayanan ferrometrik yöntem oksijen miktarına dayanan gazometrik yöntemlerdir. Ayrıca fotometrik, spektrofotometrik ve elektronik yöntemlerle de hemoglobin konsantrasyonu saptanabilir.

Kandaki Hemoglobin Konsantrasyonunun Spektrofotometrik Yöntemle Saptanması

Siyanohemoglobin Ölçümü: 5 ml Drabkin çözeltisine 0.02 ml kan eklenir. Tüp birkaç kez baş aşağı çevrilerek, kanın hemoliz olması sağlanır. Bu koşullarda hemoglobin siyanohemoglobin haline dönüşür. Örnek hazırlandıktan sonra 3-30 dakika içinde ölçüm yapılmalıdır.

Ölçümden önce 5 ml Drabkin çözeltisiyle aygıtın sıfır ayarı yapılır. Tüp boşaltılır temizlenir ve aynı tüpe test örneği konur. Siyanohemoglobin değeri aygıtın skalasında kırmızı renkli sayılarla % g olarak verilmiştir. Saptanan değer ($\%100=14.8\text{g}/100\text{ml}$) eşitliğine dayanarak %Hgb cinsine istenildiği gibi çevrilir.

Hemoglobin ölçümlerinin seri halinde yapılması gerektiğinde şu noktaya dikkat edilmelidir. Saf su veya Drabkin ile (0) ayarı yapıldıktan sonra tüp aygıttan çıkarılır. Bu durumda göstergede belli bir sapma görülür. Bu değer belirlendikten sonra standart tüp yeniden aygıta yerleştirilip göstergenin sıfırlanmasına bakılır. Böylece ölçüm sırasında her örnek için ayrı sıfır ayarlaması yapılması gerekli değildir.

Rapor 5:

Bulduğunuz hemoglobin değeri:

hemoglobin değerinin normal sınırları: Erkek:

Kadın:

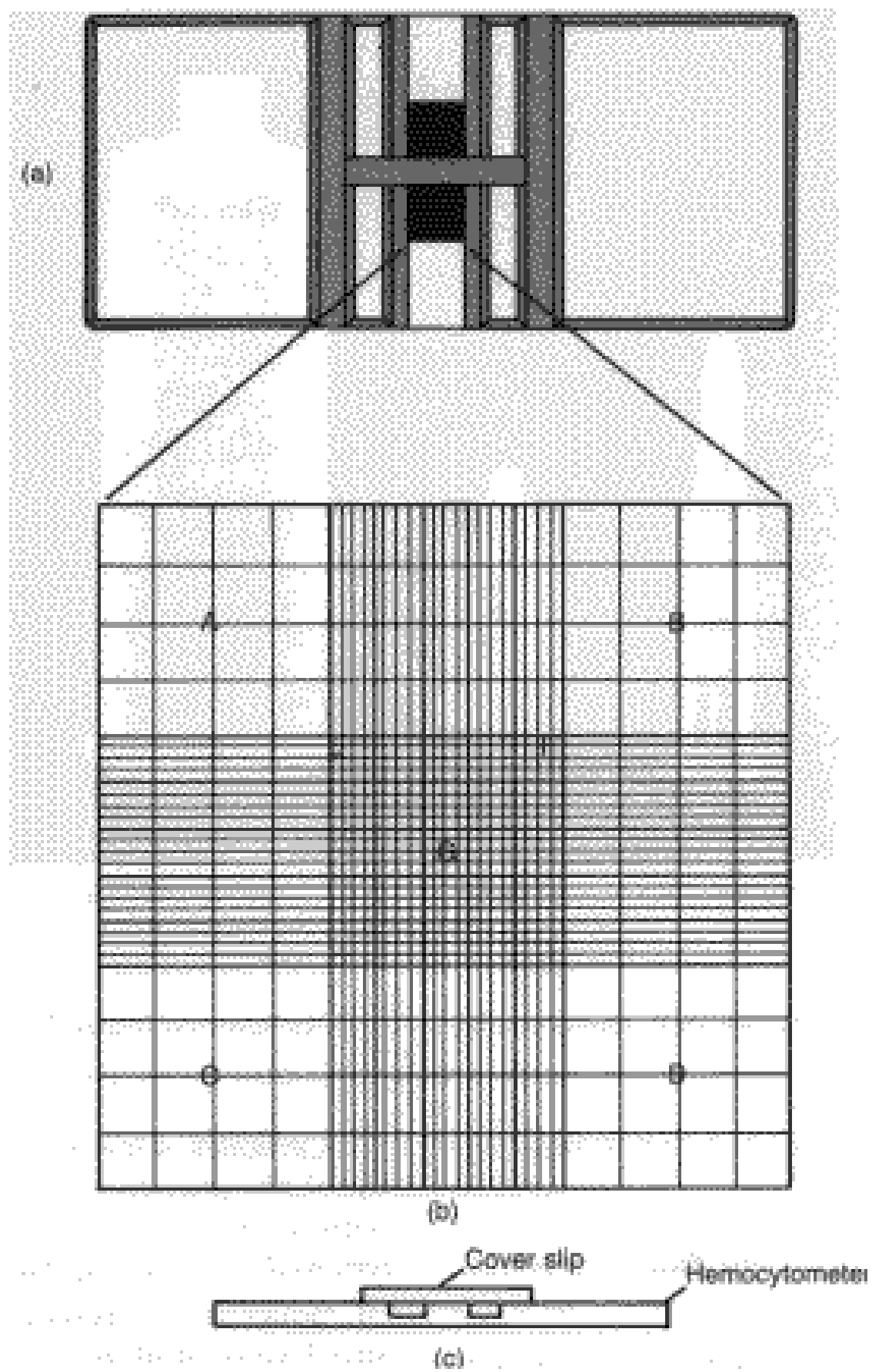
UYGULAMA 6

KAN SAYIM YÖNTEMLERİ

Kanın şekilli elementleri veya yuvarlarının sayısını saptamak amacıyla genellikle hemositometrik yöntemler kullanılır. Ancak son zamanlarda özellikle araştırma laboratuvarlarında bu amaçla bazı elektronik aygıtlardan yararlanılmaktadır. Bunlarla yapılan sayımların çok kısa sürede sonuçlanması ve eş zamanlı olarak farklı parametrelerin de tayin edilebilmesi otomatize sistemlerin tercih edilmektedir.

Hemositometrik yöntem: Kan yuvarlarının hemositometrik yöntemle sayımı için kullanılan farklı aygıtların prensibi genellikle aynıdır. Kan özel pipetlerde belirli bir oranda sulandırılır. Sulandırılmış kandan alınan örnek hacmi belli özel kamaraya konarak yuvarların sayısı saptanır. Basit bir hesap işlemi sonucunda yuvarların mm^3 kandaki değeri bulunur. Hemositometrik yöntem dört ayrı kısımdan oluşur. Eritrosit ve lökosit sayımı için ayrı sulandırma pipeti, üzerinde sayma kamarası veya kamaraları bulunan kalın özel bir lam ile bunları örtmek için kullanılan kalın bir lamel.

Deneylerimizde kullanacağımız Thoma tipi hemositometrelerde ortadaki 1 mm^2 'lik alan 16 büyük kareye ayrılmıştır. Ayrıca her bir kare kendi içinde tekrar 16 küçük kareye ayrılmıştır. Ancak büyük kareleri çevreleyen üçlü sınır çizgileri öyle yapılmıştır ki üç çizginin kapladığı alan bir küçük kareye eşit büyüklüktedir. Bu nedenle büyük kareler gerçekte 16 değil 25 küçük kareden oluşur. 1 mm^2 'lik alanın üst ve sağ kenarlarında üçlü sınır çizgileri bulunmaz. Bu şekilde her bir büyük karenin oluşması sağlanmıştır. Şu halde bu karelerin alanları da yukarıda anlatılan tiplere uygun olarak $1/400 \text{ mm}^2$ 'dir. Hacmi ise $1/4000 \text{ mm}^3$ 'tür. Sayım sırasında en dış çizgi sınır çizgisi olarak kabul edilir.



KANDA ERİTROSİT SAYISININ HEMOSİTOMETRİK YÖNTEMLE SAPTANMASI

Parmak ucuna veya tüpte bulunan kana eritrosit sulandırma pipeti eğik bir durumda tutulur ucu kan damlasına değdirilir ve lastik tüpün ucundaki ağızlıkla hafifçe emilerek 0.5 veya 1 çizgisine kadar çekilir. Kan sütunu çizgiyi geçerse pipetin dış kısmı kanlanmışsa pipetin ucu hafifçe filtre kağıdına değdirilir ve fazla kan kağıda emilir. Daha sonra pipete sulandırma çözeltisi çekilir. Bu işlemin pipete kan alındıktan sonra kısa bir sürede yapılması gerekir. Aksi halde kan pipette pıhtılaşır. Sulandırma çözeltisinin pipetin 101 çizgisine kadar çekilmelidir. Özellikle üst sınırlarda emme işlemi çok yavaş yapılmalıdır. Sayımı yapılacak örnek lama konulmadan önce pipetin iki ucu baş ve işaret parmaklarıyla kapatılır ve pipet yatay duruma getirilerek iki üç kez çalkalanır. Lamelin lam üzerine kapatılması için sayma kamaralarını ortadaki dikdörtgenlerin her iki yanındaki sütunlar hafifçe ıslatılır ve lamel bunların üzerine konarak iki başparmak bastırılır, lamelin kırılmamasına dikkat edilmelidir.

Pipetin kapiller ucundaki çalkalamaya katılmayan sıvı dışarı atılır. Pipetin ucu sayma kamarası dikdörtgeni üzerindeki lamelin kenarına değdirilerek sulandırılmış kandan çok ufak bir damla lam lamel arasına bırakılır.

Bu sıvı kapillerite nedeniyle lamla lamel arasına yayılır. Kan sayımına başlamadan önce sıvı akımları ve dolayısıyla eritrosit hareketi duruncaya kadar 1-2 dakika beklemek gerekir. Bundan sonra preparat mikroskobun orta büyütmesinde incelenir. Eğer preparatta hava kabarcığı varsa veya eritrositler kamaranın her yerine eşit olarak yayılmamışlarsa lamı yenide yıkamak ve hazırlamak gerekir. Normal bir dağılım gözleniyorsa o zaman mikroskobun büyük büyütmesi köşesindeki dört büyük kare ve bir de ortadaki bir veya iki küçük karede bulunan küçük karelerdeki eritrositler sayılır. Küçük karelerdeki eritrositleri sayarken dikkat edilmesi gereken koşul şu olmalıdır. Sınır çizgilerinde bulunan yuvarların iki kez sayılmaması için her bir küçük karenin üst ve sol alt ve sağ sınır çizgilerinde bulunan yuvarları o kare içinde saymak gerekir. 80-100 küçük karedeki eritrositler sayıldıktan sonra ortalaması alınır ve tek bir küçük kareye düşen eritrosit sayısı saptanır. Her bir küçük karenin hacmi $1/4000 \text{ mm}^3$ olduğuna göre 1mm^3 lük hacimde ortalama sayının 4000 katı alyuvar vardır. Ayrıca kanın 100 veya 200 defa sulandırılmasının göz önüne alınması gerekir. Şu halde 1mm^3 lük sulandırılmamış kanda bulduğumuz değerin 100 ile 200 katı eritrosit vardır. Basit bir hesaplama ile tek küçük karedeki ortalama eritrosit sayısı sulandırma derecesine göre 400.000 veya 800.000 ile çarpılır ve bu şekilde 1mm^3 sulandırılmış kandaki eritrosit sayısı bulunur.

Rapor 6:

Kan aldığınız kişinin adı soyadı:

Bulduğunuz eritrosit değeri:

Eritrosit değerinin normal sınırları: Erkek:

Kadın:

UYGULAMA 7**KANDA LÖKOSİT HEMOSİTOMETRİK YÖNTEMLE SAPTANMASI**

Lökositlerin sayılması için kullanılan yöntem prensip olarak aynıdır. Ancak bunda kan özel pipette sulandırma çözeltisi ile en az 10 kat sulandırılır. Akyuvarlar sayma kamarasının köşelerinde bulunan ve yalnız büyük karelerden oluşan 1mm^2 'lik alanların herhangi birinde sayılabilir. Pratikte 1mm^2 'lik alandakini sayıp ortalaması alınır. Bulunan değer 1mm^3 'teki sayı hesaplanır.

Rapor 7:

Kan aldığınız kişinin adı soyadı:

Bulduğunuz lökosit değeri:

Lökosit değerinin normal sınırları: Erkek:

Kadın:

UYGULAMA 8

KANDA TROMBOSİT SAYISININ SAPTANMASI

Trombosit sayımı için özel bir sayım pipeti yoktur. Bu amaçla eritrosit sayım pipeti kullanılmaktadır. Eritrosit sayım pipeti içerisine 0.5 çizgisine kadar kan çekildikten sonra, trombosit sulandırma solüsyonu 101 çizgisine kadar çekilir. Pipet çalkalandıktan sonra Thoma lamına özel olarak damlatılır. Büyük karelerde yer alan hücrelerin sayımına özen gösterilmelidir (Dikkat! Eritrosit sayımında küçük kareler sayılmaktadır). Bu sırada toz partiküllerinin sayılmaması gereklidir.

Not: Trombositlerin cama yapışma özelliği vardır. Thoma lamının önceden çok iyi temizlenmiş olmasına özen gösterilmelidir. İşlem sonrası Thoma lamaları yine çok iyi temizlenmelidir. Mikroskoplardaki ışık ayarı (diyafram) kapatılmalıdır.

Rapor 8:

Kan aldığınız kişinin adı soyadı:

Bulduğunuz trombosit değeri:

Trombosit değerinin normal sınırları: Erkek:

Kadın:

UYGULAMA 9

LÖKOSİT FORMÜLÜ (PERİFERİK YAYMA)

Lökositler çoğunluğu kemik iliği lenf bezi ve dalakta yapılan ve en önemli görevi vücudun enfeksiyonlara ve dış etkenlere karşı korunmasını sağlamak olan renksiz çekirdekli hücrelerdir.

Lökosit formül periferik kanın yaymasında nötrofil, eozinofil, bazofil, lenfosit ve monositler sayılarak saptanır. Genellikle 100 hücre sayılır ve bundan mutlak sayı ve oranlar hesaplanır. Periferde az hücre bulunması halinde daha az sayıdaki hücre sayılarak yüzdeleri hesaplanır.

Parmak ucundan alınan kanın veya damardan alınan kanın bir damlası lama damlatılarak başka bir lamla 45°'lik açıyla kan yayılır. Kan örneği havada kurutulduktan sonra metanol damlatılarak fikse edilir. Ardından Giemsa boyası 30 dakika süreyle uygulanır. Preparat çeşme suyuyla yıkandıktan sonra havada kurutulur , üzerine immersiyon yağı damlatılarak immersiyon objektifinde (100x) incelenir.

Boya olarak May-Grünwald boyası kullanılırsa preparat fıkse edilmeden boya ile 10 dakika süreyle boyanır ve suyla durulandıktan sonra havada kurutulur. İmmersiyon objektifinde immersiyon yağıyla incelenir.

Wright boyası kullanılarak hazırlanan preparatlarda boyama süresi 2-3 dakikayı geçmemektedir. Preparat kurutulduktan sonra immersiyon yağıyla immersiyon objektifinde incelenir.

<u>Tüm Lökositler</u>	<u>Yüzde değeri</u>
Parçalı çekirdekli Nötrofil	% 56
Çomak çekirdekli Nötrofil	% 3
Eozinofil	% 2.7
Bazofil	% 0.3
Lenfosit	% 34
Monosit	% 4

Rapor 9:

<u>Tüm Lökositler</u>	<u>Sayıdığınız hücre sayısı</u>	<u>Yüzde değeri</u>
Parçalı çekirdekli Nötrofil		
Çomak çekirdekli Nötrofil		
Eozinofil		
Bazofil		
Lenfosit		
Monosit		

Lökosit formülünde karşılaştığınız hücrelerin morfolojilerini tanımlayınız:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

UYGULAMA 10

ERİTROSİT İNDEKSLERİ

Eritrosit indeksleri ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH), ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonunu (MCHC) tesbit etmek amacıyla kullanılır. Bu sayede anemilerin mikrositer, normositer, veya makrositer; hipokrom, normokrom veya hiperkrom olduğu ortaya çıkarılır. Ancak indeks hesaplanırken basit yöntemlerle elde edilen eritrosit, hemoglobin ve hematokrit sonuçlarının kullanılması, bu yöntemlerdeki yüksek hata payları nedeniyle iyi sonuç vermez. Otomatik sayıcılar ve fotometrik yöntemlerin kullanılmasıyla elde edilen indeksler daha doğru anlam taşırlar.

MCV- Ortalama Eritrosit Hacmi:

$$\text{MCV} = \frac{100 \text{ ml kandaki eritrosit hacmi (\% Hematokrit değeri)} \times 10}{\text{Eritrosit Sayısı (mm}^3\text{te milyon)}}$$

MCH- Ortalama Eritrosit Hemoglobini:

$$\text{MCH} = \frac{\text{Hemoglobin} \times 10 \text{ (100 ml kanda, gram cinsinden)}}{\text{Eritrosit sayısı (mm}^3\text{te milyon)}}$$

MCHC- Eritrosit Ortalama Hemoglobin Konsantrasyonu

$$\text{MCHC} = \frac{\text{Hemoglobin (100 ml kanda , gram cinsinden)}}{\% \text{ Hematokrit Değeri} \times 100}$$

Rapor 10:

Önceki laboratuarlardan elde ettiğiniz değerlerden faydalanarak eritroist indekslerin hesaplayınız:

MCV=

MCH=

MCHC=

Bulduğunuz değerler normal mi?

Yorumlayınız.

.....
.....
.....

UYGULAMA 11**KANDA RETİKÜLOSİT SAYISININ SAPTANMASI**

Kanda retikülosit değerinin saptanması, eritropoezin ne kadar etkin olduğunu göstermek için kullanılmaktadır. Parlak krezil mavisi ve sodyum sitrattan oluşan retikülosit boyasının iki damlası ile bir miktar kan önce boyanır sonra lama yayma yapılarak, havada kurutulur. Sayım işlemi için ideal olarak 500-1000 eritrosit sayılarak, buradan % retikülosit sayısı hesaplanır. Değerlendirme yapılırken mavi granüller ve retikulum içeren hücreler retikülosit olarak sayılır. Normal değeri % 0,5-2'dir.

Rapor 11:

Saydığınız retikulositlerin özelliklerini sıralayınız. Kaç hücre sayabildiniz?

.....
.....

UYGULAMA 12

SEDİMENTASYON HIZI TAYİNİ

Antikoagülanlı bir ortama alınmış olan kanın eritrositlerinin standart bir tüp içinde çökmesi için gerekli süredir.

Bunun için 0.4 ml % 3.8'lik sodyum sitrat üzerine 1.6 ml kan ilave edilir. Bir iki kez pipetle çekip bıraktıktan sonra, antikoagülanlı kan sedimentasyon pipetinin 0 çizgisine kadar çekilir. Pipetin önce alt ucu sedimentasyon sehпасına yerleştirilir. Ardından üst ucu dikkatlice sehpanın üst desteğine sıkıştırılır. Sayımlar 0.5, 1 ve 2. saatte olmak üzere kayıt edilir. Belirlenen saatteki çökme hızı pipet üzerinden okunabilir.

Normal Değerleri:

	0.5 saat	1.saat	2.saat
erkek	2-3 mm	3-10 mm	8-20 mm
kadın	3-6 mm	6-20 mm	15-30 mm

Sedimentasyon hızı genellikle akut myokard infarktüsü, lenfoma, lösemi ve diğer habis tümörlerde, romatoid artrit, anemilerde, bazı enfeksiyon hastalıklarında, kalp yetmezliği gibi hastalıklarda önemlidir.

Rapor 12:

Kan aldığınız kişinin adı soyadı:

Bulduğunuz sedimentasyon değeri:

Bulduğunuz değer normal mi?

UYGULAMA 13

KAN GRUPLARININ SAPTANMASI

ABO Kan Grubu:

ABO kan grubu eritrositler üzerinde A ve B antijenlerinin bulunup bulunmamasına bağlı olarak 4 ana gruptan oluşmaktadır. A, B, AB ve O .

A grubu eritrositlerde A antijeni bulunur. Buna karşılık serumlarında anti-b antikorları vardır.

B grubu eritrositlerde B antijeni bulunur. Buna karşılık serumlarında anti-a antikorları vardır.

AB grubu eritrositlerde A ve B antijeni bulunur. Buna karşılık serumlarında antikorları yoktur.

O grubu eritrositlerde antijen yoktur. Buna karşılık serumlarında hem anti-a hem de anti-b antikorları vardır.

	<u>Eritrosit Antijeni</u>	<u>Serum Antikoru</u>
A Kan Grubu	A	anti B
B Kan Grubu	B	anti A
AB Kan Grubu	AB	yok
O Kan Grubu	O	anti A ve anti B

Rh Kan Grubu:

Pratik olarak en az üç çift Rh antijeni vardır. Bunlar D,d, C, c, E, e olarak isimlendirilir. Her şahıs bu antijen çiftlerinden birisini her iki ebeveyninden almıştır. Klinikte en önemli antijen D antijenidir. Anti- D serumu kullanılarak meydana çıkarılabilir. Anti D serumu ile reaksiyon veren eritrositlere Rh pozitif, vermeyenlere Rh negatif kan denir.

Rapor 13:

Kan aldığınız kişinin adı soyadı:

Bulduğunuz kan grubu nedir?