

*Viyana Veteriner Yüksek Okulu Fizyoloji Enstitüsü Ord. Prof. Dr.  
Alfred Kment ve A.Ü. Veteriner Fakültesi Fizyoloji Kürsüsü  
Prof. Dr. Ahmet Noyan*

---

## **İNSAN VE EVCİL HAYVANLARDA TROMBOSİT SAYIMI İÇİN DİREKT YENİ BİR METOD**

**Talât Konuk\***

### **Summary**

#### **A New Method For Thrombocyte Count In Human And Domestic Animals**

In this investigation a new diluting fluid for direct thrombocyte count has been presented. The composition of this solution is given below. Additionally, the thrombocyte counts which determined by this new method in 5 men and 25 animals from different species have been reported.

Propylene glycol .....	50 ml.
Distilled water .....	40 "
Malachite green (1 % solution) .....	2 "
Sodium carbonate (1 % solution) .....	1 "

The cells in this solution keep their normal shapes and the aggregations of thrombocytes are inhibited. Propylene glycol renders the erythrocytes invisible and non refractile. Counting field is clean and free of salt crystals, stains and cell particles which interfere with thrombocytes. It is also possible to count the leucocytes in the same dilution.

According to our findings the thrombocyte counts per cubic millimeter are  $282.200 \pm 22.890$  with a range from 200.000 to 341.000 in men,  $262.400 \pm 34.377$  (200.000-396.200) in horses,  $432.000 \pm 35.215$  (348.000-556.000) in cattle,  $354.800 \pm 19.921$  (282.000-404.000) in sheep,  $371.200 \pm 32.819$  (304.000-456.000) in dogs and  $438.000 \pm 21.122$  (384.000-496.000) in rabbits.

This new method seems to be practical and has the abilities of being easily applicable in every laboratory and of giving reliable counts.

---

\* A.Ü. Veteriner Fakültesi Fyizoloji Kürsüsü Doçenti, Ankara-Türkiye.

## Zusammenfassung

### Eine neue Methode zur direkten Blutplättchenzählung bei Menschen und Tieren

In dieser Arbeit wird eine Lösung, deren Zusammensetzung unten angegeben ist, zur direkten Zählung von Blutplättchen entwickelt. Danach wurden mit dieser neuen Methode bei 5 Menschen und 25 verschiedenen Tieren Blutplättchen-Zählungen durchgeführt und die daraus ermittelten Ergebnisse hier aufgeführt.

Propylen glykole .....	50 ml.
Aqua dest .....	40 "
Malachitgrün (1 %-ig) .....	2 "
Natriumcarbonat (1 %-ig) .....	1 "

In dieser Lösung konnten die Zellen ihre normale Form bewahren und eine Aggregation der Blutplättchen verhindert werden. Propylen glykole macht roten Blutkörperchen unsichtbar und dadurch verlieren sie ihre Lichtreflektionsvermögen. Die Zählfläche war sauber wiederum waren keine Salzkristalle, Farbstoff- und Zellpartikelchen vorhanden, die man mit Blutplättchen hätte verwechseln können. Mit derselben Lösung konnte man auch weisse Blutkörperchen zählen.

Anhand unserer Untersuchungen konnten wir Pro ml. Blut folgende Ergebnisse erzielen: Beim Menschen  $282.200 \pm 22.890$  (200.000–341.000), beim pferde  $262.400 \pm 34.377$  (200.000–396.000), beim Rind  $432.000 \pm 35.215$  (348.000–556.000), beim Schaf  $354.800 \pm 19.921$  (282.000–404.000), beim Hund  $371.200 \pm 32.819$  (304.000–456.000) und beim Kaninchen  $438.800 \pm 21.122$  (384.000–496.000).

Wir sind der Meinung, dass diese neue Methode praktisch, in jedem Labor leicht durchführbar ist und zuverlässige Ergebnisse bringt.

## Özet

Bu çalışmada direkt trombosit sayımında kullanılmak üzere aşağıda bileşimi verilen yeni bir sulandırma eriyiği taktim edilmiştir. Ayrıca yeni metodla 5 insan ve çeşitli türlere ait 25 hayvan üzerinde yapılan sayımlardan elde edilen sonuçlar kaydedilmiştir.

Propilen glikol .....	50 cc.
Damıtık su .....	40 "
Malahit yeşili .....	2 "
Sodyum karbonat (%1 eriyiği) .....	1 "

Eriyik içinde hücreler normal şekillerini korumakta ve trombositlerin aggregation'larına engel olunmaktadır. Propylen glycol alyuvarları görünmez ve ışığı yansıtma bir duruma sokmaktadır. Sayım alanı temiz olup trombositlerle karıştırılabilecek tuz kristalleri, boya ve hücre partikülleri bulunmamaktadır. Aynı eriyikle akyuvarlar da sayılabilmektedir.

Bulgularımıza göre 1 mm<sup>3</sup>. kanda insanlarda 200.000-341.000 arasında değişmek üzere ortalama olarak  $282.200 \pm 22.890$ , atta  $262.400 \pm 34.377$  (200.000-396.000) sığırdada  $432.000 \pm 35.215$  (348.000-556.000), koyunda  $354.800 \pm 19.921$  (282.000-404.000), köpekte  $371.200 \pm 32.819$  (304.000-456.000) ve tavşanda  $438.000 \pm 21.122$  (384.000-496.000) trombosit saptanmıştır.

Kanımızca yeni metod pratik olup, her laboratuvarıda kolaylıkla uygulanabilecek ve doğru sonuçlar verebilecek niteliktedir.

## Giriş

Genellikle kan muayeneleri, hemopoetik sistemin fonksiyonunu u. u. yoklanmasında ve kanın katımını değiştiren çeşitli nedenlerin söz konusu olduğu durumlarda baş vurulan bir laboratuvar metodudur. Ayrıca homatolojik muayeneler fizyopatolojik ve klinik yönden bir canlının biyolojik olarak incelenmesinde önemli bir yer tutar. Bu nedenle son zamanlarda rutin laboratuvar muayenelerinde ve çeşitli bilimsel araştırmalarda, özellikle atom enerjisine ilişkin olanlarda, büyük ölçüde kullanılmaktadır.

Kanın şekilli elementlerinin durumlarının tesbitinde öncelikle fizyolojik normal değerlerin bilinmesi gereklidir. Fizyoloji alanına giren hematolojik muayenelerin başında, kan hücrelerinin sayımı gelir. Bu amaçla alyuvar, akyuvar ve retikülositler için Hayem, Türk ve Rees-Ecker gibi pratik ve doğru sonuçlar veren ve her laboratuvar tarafından benimsenen metodlar bulunmuştur. Trombosit sayımında durum farklıdır. Bu hücrelerin şekillerinin düzensiz oluşu (22, 25) adhesion, aggregation ve aglutination gibi önemli özellikleri nedeniyle sayımları güçtür (12, 23). Trombositler için direkt ve indirekt olmak üzere 20 den fazla metod ve modifikasyonları tanımlanmış olduğu halde her duruma elverişli kusursuz bir metod bulunamamıştır (17, 24). Bugün elektronik olarak kan hücreleri sayımı yapan aletler (The Electronic Coulter Counter for Blood Cells, Vickers Blood Cells Counter) satılmaktadır (21). Fakat bunlarda çoğunlukla sadece alyuvar ve akyuvar sayılabilmektedir.

Trombosit sayımının güç oluşu nedeniyle, fizyolojik değişiklikler ve değişim sınırları kesin olarak saptanamamıştır. Aynı nedenle trombositlerin normal sayılarını bildiren literatür değerler, kullanılan metodlara ilişkin olarak birbirinden çok farklıdır (24). Değişik bildirimlerin gerekçesinde, trombositlerin dayanıksız küçük hücreler oluşu, hava temasında çabucak parçalanmaları ve hemopoetik sistemin özellikle trombositler yönünden labilesi gibi nedenler yer almaktadır. Wintrobe'a (24) göre trombositlerin çeşitli zamanlarda aynı damar içindeki dağılımları bile farklıdır. Yukarıda sayılan faktörlerin, sonuç-

ların değişik oluşunda etkili olabilecekleri kabul edilebilirse de, kanımızca henüz yeterli bir metodun mevcut olmayışı farklı bildirimlerin temel nedenini teşkil etmektedir.

Ayrıca insanlarda kullanılan metodlardan bazıları çoğu zaman hayvanlarda aynen uygulanmakta ve değişik hayvan türlerinde elverişlilik derecesi tam olarak araştırılmamış bulunmaktadır. Nitekim Behrens (2) indirekt bir sayım olan Neuman Monreal çabuk boyama metodunda insanlarda 5 dakikalık boyama süresinin atlarda yetersiz olduğunu, bu sürenin 20 dakika olması gerektiğini bildirmiştir.

Travma, asfeksi, akut kan kayıpları ve kemik kırıklarında trombositosis oluşur (24). Uzun süren kronik kanamalarda aplastik ve pernisiyöz anemi (13), lenfatik lösemi (23), agranülositoz, üremi, difteri, pnömoni, grip ve dizanteri gibi infeksiyöz hastalıklarda trombopeni görülür (13, 24). Hemorajik trombositemi, trombopenik purpura olayları kliniklerde rastlanan önemli bozukluklardır. Bunlara benzer bir çok patolojik durumlarda hastalıklara eşlik eden ve trombosit sayılarında meydana gelen değişiklikler bildirilmiştir. Fakat normal değerler ve sayım metodlarına olan güvensizlik nedeniyle bu bildirimlerden ve yapılan çeşitli araştırmaların sonuçlarından pratikte gereği kadar fayda sağlanamamaktadır. Bu nedenle ancak çok büyük sayı değişiklikleri kliniklerde önemli olabilmektedir (23, 24). Bu düşünceler ve halen trombosit sayımı için yeterli bir metodun mevcut olmayışı (17, 24) bizi trombosit sayımında güvenle kullanılabilir yeni bir sulandırma eriyiğinin bulunması üzerinde çalışmaya yöneltti. Daha önce yaptığımız bir araştırmada (11) hayvanlarda eosinophil ve reticulocyte sayımında kullanılan Pilot eriyiğinin tarafımızdan tavşanlarda ilk defa neutrophil'lerin direkt sayımında başarı ile kullanılmış olması bu yeni travay için cesaret ve ilham kaynağı oldu. 1967 yılında araştırma ve incelemelerde bulunmak üzere gitmiş olduğumuz Viyana Veteriner Yüksek Okulu Fizyoloji Laboratuvarında bu konu ele alındı. Değişik bileşimlerde hazırladığımız 100'e yakın eriyikten boyama yetenekleri, pH dereceleri vb. özellikleri yönünden en elverişli olanı üzerinde yapılan modifikasyon ve geliştirme çalışmaları sonunda yeni bir sulandırma eriyiği elde edildi. İnsan ve evcil hayvanlarda direkt trombosit sayımında kullanılan bu solüsyonun bileşimi ve avantajı 488. ve 489. sayfalarda kaydedildi.

Yurda döndükten sonra bu çalışmanın devamı olarak yeni bulunan eriyikle *insan, at, sığır, koyun, köpek ve tavşanlarda* 1 mm<sup>3</sup>. kanda trombosit sayıları saptanarak yeni metodun insan ve çeşitli evcil hayvanlarda elverişlilik derecesi araştırıldı. Elde edilen değerler ve değişim sınırları literatürle karşılaştırılıp tartışmaları yapıldı.

## Materyal ve Metod

Çalışmamız iki bölümü kapsamaktadır. 1. bölümde direkt trombosit sayımında kullanılmak üzere yeni bir sulandırma eriyiğinin elde edilmesi; 2. bölümde, bulunan yeni eriyiğin insan ve evcil hayvanlarda elverişlilik derecesinin kontrolü yer almaktadır.

**A. Sulandırma Eriyiğinin Elde Edilmesine İlişkin Çalışmalar:** Önce 493. ve 494. sayfalarda kaydedilen mevcut metodların özellikleri incelendi. Çeşitli metodlar hakkındaki eleştiriler gözden geçirilerek avantaj ve dezavantajları saptandı. Bunların başlıcaları, indirekt olanlardan *Fonio*, *Olef*, *Dameshek*; direkt olanlardan *Danilin*, *Gutstein*, *Piette*, *Brecher-Cronkite* ve *Rees-Ecker* metodları ile insan ve tavşan kanları üzerinde ön çalışmalar yapıldı. Çalışmalarımızda, her laboratuvarında kolaylıkla uygulanabilecek ve her zaman doğru sonuçlar verebilen pratik bir metod bulunması amaç edinildi. Bunun için *acridin orange*, *toluidin*, *brillantcresylblau*, *giemsa*, *malachitgrün*, *nillblau*, *violet de gentiane*, *phloxin* ve *auramin* gibi boyalarla değişik bileşimde eriyikler hazırlandı. Bu eriyiklere konservatif olarak *formaldehit*, *thymol* ve *nipagin* gibi çeşitli maddelerin eklenmesi denendi. Üzerinde çalışılan eriyikler içine giren maddelerin çeşidini, oranlarını ve eriyiklerin pH derecelerini değiştirmek suretiyle yapılan çeşitli kombinasyonlarla 100'e yakın solüsyon hazırlandı. Bunların herbiri ile tavşan ve insan kanlarında trombosit sayılarak en elverişli olanı üzerinde gerekli düzeltme ve modifikasyonlar yapıldı. Böylece insan ve evcil hayvanların trombosit sayımlarında başarı ile kullanılan ve aşağıda bileşimi verilen yeni bir sulandırma eriyiği elde edildi.

Propilen glikol .....	50 cc.
Damıtık su .....	40 "
Malachit yeşili (suda % 1 eriyiği) .....	2 "
Sodyum karbonat (suda % 1 eriyiği) ..	1 "

Bu eriyiğin pH'ı 6.8 dir. Solüsyon yukarda verilen sıraya uygun olarak nötr damıtık su ile yapıldı. Laboratuvarında bulunan damıtık suyun reaksiyonu hafif asit olduğu zaman, içine azar azar % 1 ilk sodyum karbonat eklendikten ve pH'ı 7 ye ayarlandıktan sonra kullanıldı. Eriyiğin bileşiminde bulunan propilen glikol alyuvarları görünmez ve ışığı yansıtma bir duruma getirmekte böylece sayım yapılırken mikroskop alanında sadece trombositler ile akyuvarlar kalmaktadır. Bu nedenle yeni eriyikle akyuvarların direkt sayımları da yapılabilir. Akyuvarların özel şekilleri, çekirdekli ve çok büyük hücreler olmaları nedeniyle trombositlere karıştırılması ve sayımı güçleştirmesi söz konusu değildir.

Bileşiminde bulunan propilen glikol nedeniyle sayma kamara-sında buharlaşmadan uzun süre kalabilmektedir. Eriyik insan ve evcil hayvan kanlarında trombositler için izotoniktir. Böylece hücreler eriyik içinde uzun süre normal şekillerini korumakta ve trombositlerin agregasyonlarına engel olunmaktadır. Suda erimemiş tuzların bulunmaması ve solüsyonda yeralan maddelerin belirli yoğunlukları nedeniyle sayım alanı temizdir ve trombositlerle karıştırılabilecek tuz kristalleri, boya ve hücre parçaları yoktur. Malahit yeşili trombositleri ve akyuvarları boyamak suretiyle onları belirgin duruma sokup tanınmalarını ve sayımlarını kolaylaştırmaktadır. Eriyiğin rengi sabittir. Eriyik dayanıklı olup, süzülüp sterilize edildikten sonra cam kapaklı şişelerde buz dolabında 2-4°C dereceleri arasında uzun süre (1.5-2 ay) bozulmadan durmaktadır.

**B. Yeni Metodla İnsan ve Evcil Hayvanlarda Trombosit Sayımı:** Bu bölümde, bulmuş olduğumuz yeni sulandırma eriyiği ile insan ve evcil hayvanlarda direkt trombosit sayımı yapılarak çeşitli hayvan türlerinde elverişlilik derecesi araştırıldı.

**Materyal:** Yaşları 27-37 arasında değişen 5 erkekte yeni metodla trombosit sayıldı. Evcil hayvanlar üzerindeki uygulamada at, sığır, koyun, köpek ve tavşan olmak üzere toplam 25 hayvan kullanıldı. Denemeye tabi tutulan 3 dişi, 2 erkek yerli ada tavşanının yaşları 5-12 ay arasında; 4 erkek, 1 dişi yerli köpeğin yaşları 1-2 arasında; 5 erkek arap atının yaşları 9-11 arasında; 5 jersey ineğin hepsi 5 yaşında; 5 yarımkan merinos koyunun hepsi de dişi ve 3 yaşlarında idi.

**Sayma Kamarası.** İnsan ve hayvanlarda trombosit sayımı için üzerinde iki adet sayma kamarası bulunan Thoma lâmi kullanıldı.

**Sulandırma Eriyiği ve Pipeti.** Kanın sulandırılması, bu yazıda ilk defa takdim edilen ve 488. sayfada bileşimi verilen yeni eriyikle alyuvar pipetlerinde yapıldı. Eriyik buzdolabında saklandığı için her kullanmadan önce çıkarılıp ısısının oda derecesine kadar yükselmesi sağlandı. Böylece Romies'in (20) bildirimlerine uygun olarak eriyik içinde bulunabilecek kristaller nedeniyle yüksek değerler elde edilmesi önlenmiş oldu.

**Metod:** *Kan alınması.* Çoğunlukla kan sabahleyin açkarnına be-densel ve ruhsal tam bir dinlenmeden sonra alındı. İnsanlardan sayım, parmak ucuna yapılan pikürden serbestçe çıkan kapiller kanla yapıldı. Bunun için el önce sabun ve su ile yıkandı. Aktif bir hiperemi oluşturmak için, içinde sıcak su bulunan bir kaba sokularak bir kaç dakika süre ile parmakların açılıp kapanması sağlandı. Kan alınacak parmak ucu önce alkol, daha sonra eterle silindi (24). Keskin bir Franck iğnesi

ile delindi. İlk çıkan kan damlası atılarak ondan sonraki kandan pipete çekildi. At, sığır ve koyunda v. jugularis'ten, köpeklerde v. saphena'dan kan alındı. Atta ve sığırdan steril ve pyrogen'den arı plastik bir enjektöre takılmış 7.5 cm. uzunluğunda 14 numara, koyunda 6 cm. uzunluğunda 4 numara, köpeklerde 4 cm. uzunluğunda 22 numara kan iğnesi kullanıldı. Tavşanlarda v. marginalis'e yapılan punksiyondan serbestçe çıkan kandan pipete çekildi. Hayvanların hepsinde kan alınacak bölgenin önce kılları jiletle traş edildi, kaba temizliği yapıldıktan sonra alkol ve eterle silindi.

Kan alırken doku sıvısı ile olan teması minimal değere indirmek için punksiyon doğrudan doğruya venaya yapıldı ve hava kabarcığı meydana gelmemesi için kan enjektöre çok yavaş olarak çekildi (24). Ucundan iğne çıkarılarak enjektördeki kan; önceden içerisine 1 cc. kan için 2 mg. hesabiyle EDTA (Ethylenediaminetetra acetic acid' in disodium tuzu) konmuş olan ağzı plastik kapaklı 5 cc. lik şişelere boşaltıldı. Şişenin ağzı kapanarak köpük yapmadan 3 dakika süre ile elde sallanmak ve alt üst edilmek suretiyle kanla EDTA'nın iyice karışması sağlandı.

*Sayım Kamarasının Hazırlanması.* Her sayımdan önce güzelce temizlenmiş ve kurutulmuş sayma lâmları yöntemine uygun şekilde lâmelle kapatıldıktan ve yanlarda Newton çizgileri görüldükten sonra mikroskop altında boş alan incelemesi yapıldı. Bu suretle lâm üzerinde çizik, yağ vb. parçacıkların bulunup bulunmadığı kontrol edildi. Aynı işlem sulandırma eriyiği için de uygulandı. Böylece kanla çalışmaya başlamadan önce sulandırma eriyiğinde trombositlere benzeyen ve sayımı güçleştirebilecek koksiz dizileri, bakteri, mantar, boya partikülleri ve eriyiğin üst kısmında yüzen düzensiz parçalanma artıkları araştırıldı (24). Arzuya uygun olduğu saptandıktan sonra sayım yapıldı.

*Sulandırma.* Alyuvar pipetlerine, önce balon kısmın başlangıcına kadar sulandırma eriyiği çekilip boşaltıldı. Bu suretle pipetin içi eriyikle ıslatılmış oldu. Pipete şişede bulunan EDTA'lı kandan (1) çizgisine kadar alınıp üzeri (101) rakamına kadar sulandırma eriyiği ile tamamlandı ve 5 dakika süre ile elde sallandı. Karışımdan ilk 5 damla atıldı ve sayma kamarasının her iki yüzü kanla dolduruldu. Daha önce alt ve üst yarımalarına ıslak kurutma kâğıdı yerleştirilerek hazırlanmış rutubetli petri kutusu içine kondu. Alyuvarların hemolizi ve trombositlerin boyanması için 15 dakika bırakıldı. Mikroskopun tablasına konarak trombositlerin çökmesi için 10 dakika beklendi.

*Hücrelerin Sayımı ve Hesaplanması.* Sayım ışık mikroskopunda, kısım kısım ışık ve büyük büyültme ile yapıldı. Trombositleri par-

latmak için kondansör aşağı indirildi (4). Sayma lâminin her iki yüzünde ve Thoma taksimatının merkezinde bulunan büyük kareler içindeki trombositler sayıldı. Böylece her iki tarafta toplam olarak 0.2 mm<sup>3</sup>. lük bir hacim incelenmiş oldu. Bulunan rakam aşağıdaki formüle kondu veya kısaca lâmin her iki yüzünde bulunan hücre sayısı 500 le çarpılarak 1 mm<sup>3</sup>. kandaki trombosit sayısı saptandı.

$$\frac{\text{Bulunan Trombosit Sayısı} \times 100 \times 4000}{800}$$

800 . .

Sayım sırasında mikrometre döndürülmek suretiyle kritik ayar noktası elde edilerek trombositlerin tanınmaları kolaylaştırıldı.

### Sonuçlar ve Tartışma

488. sayfada bileşimi verilen yeni sulandırma criyiği ile insan ve çeşitli evcil hayvanlarda yapılan trombosit sayımlarından elde edilen sonuçlar ve standard yanlışları (1) aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

TABLO: 1

Yeni Metotla, Çeşitli Hayvanlarda Yapılan Trombosit Sayımından Elde Edilen Ortalama Değerler, Standard Yanlışları ve Değişim Sınırları.

Türü	Trombosit Sayısı (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> .)	
	Ort. Değer ve St. Yanlış	Değişim Sınırı
İnsan	282.2 ± 22.890	200 — 341
At	262.4 ± 34.377	200 — 396
Sığır	432.0 ± 35.215	348 — 556
Koyun	354.8 ± 19.921	282 — 404
Köpek	371.2 ± 32.819	304 — 456
Tavşan	438.8 ± 21.122	384 — 496

Çalışmamızdan elde edilen bulguları literatür değerlerle karşılaştıralım.

**İnsanlarda:** Sağlıklı 5 erkek üzerinde yaptığımız sayımlarda 1 mm<sup>3</sup>. kanda 200.000–341.000 arasında değişmek üzere ortalama olarak 282.2000 ± 22.890 trombosit saptandı. Wintrobe'a (24) göre Tocannius kendi metodu ile trombositleri 1 mm<sup>3</sup>. kapillar kanda 250.000, ven kanında 310.000 olarak bulmuştur. Yazarın kendisi de Brecher-Cronkite metodu ile yaptığı sayımlarda trombositleri 1 mm<sup>3</sup>. kanda 140.000–440.000 arasında değişmek üzere ortalama 250.000



olarak saptamıştır. Olef'de kendi metodu ile 514.000 (437.000–586.000) olarak saptamıştır (18). Dameshek metodu ile trombositler 716.000 (500.000–900.000) olarak bildirilmiştir (14, 24).

Wintrobe'a (24) göre normal olarak çöktürülmüş trombosit hacmi 100 cc. kanda 0.3 cc. (hematokritte yaklaşık olarak 0.3 mm.) dir. Bu nedenle bildirilen yüksek değerler istenilen doğrulukta değildir. Heilmeyer ve Hittmair (14) trombositleri Feissly-Ludin metodu ile 292.000 olarak bildirmişlerdir.

Çalışmamızda yeni metodla erkeklerden elde edilen değerler bu bildirimlerin ortasında yer almakta ve ençok Heilmeyer ve Hittmair (14) tarafından bildirilen sonuçlara uymaktadır. İnsanlarda trombosit sayısı bakımından her iki cinsiyet arasında bir fark bulunmadığı bildirilmiştir (24).

**Atlarda:** Trombosit sayısını Dukes(10) 176.000(110.000-300.000), Wirth (25) 350.000 (200.000–500.000) ve Schalm (21) 330.000 (100.000–600.000) olarak bildirmişlerdir. Gardner'e (12) göre atlarda trombosit sayısı ortalama olarak 305.384 dür. Boschen (5) atlar üzerinde yaptığı araştırmada indirekt sayımla 1 mm<sup>3</sup>. kanda Neumann metodu ile 325.222 (180.560–545.100), Fonio metodu ile 299.332 (169.400–415.280) trombosit saptamıştır. Biz de yeni metodla safkan arap atları üzerinde yaptığımız çalışmada trombositleri ortalama 262.400 ± 34.377 olarak saptadık. Değişim sınırları da 200.000 ile 396.000 arasındadır.

**Sığırlarda:** Çalışmamızda Jersey süt ineklerinde 1 mm<sup>3</sup>. kanda trombosit sayısı 348.000–556.000 arasında değişmek üzere ortalama 432.000 ± 35.215 olarak bulunmuştur. Sığırların trombosit sayısını Wirth (25) 400.000 (260.000–700.000), Heilmeyer ve Hittmair (14) 500.000 (100.000–800.000), Coffin (9) 300.000–800.000 ve Gardner (12) 806.245 olarak bildirmişlerdir. Bulgularımız Heilmeyer ve Hittmair tarafından kaydedilen değişim sınırları içinde olduğu halde ortalama değerden düşüktür. Diğer taraftan Wirth'in (25) bildirimlerine çok yakın fakat ondan biraz yüksektir.

**Koyunlarda:** 1 mm<sup>3</sup>. kanda bulunan trombositlere ait literatür değerler şöyledir. Wirth'e (25) göre 370.000 (170.000 – 978.000), Schermer'e (22) göre 400.000 (263.000–598.000), Schalm'a (21) göre 400.000 (250.000–750.000), Coffin'e (9) göre 250.000–750.000 ve Gardner'e (12) göre 75.000–575.000 dir. Biz de, koyun kanları üzerinde yapılan sayımlarda 282.000–404.000 arasında değişmek üzere ortalama 354.800 ± 19.921 trombosit elde ettik. Schermer'in (22) bildirimine göre Klieneberger koyunlarda trombosit sayısını 82.400–

228.000 arasında saptamıştır. Bu değerler bulgularımızdan düşüktür. Fakat yukarıda görüldüğü gibi diğer yazarlar tarafından bildirilen trombosit sayıları değerlerimizden yüksektir.

**Köpeklerde :** Yeni sulandırma eriyiği ile yaptığımız direkt sayımlarda köpeklerde 1 mm<sup>3</sup>. kanda 371.200 ± 32.819 (304.000–451.000) trombosit saptandı. Wirth (25) tarafından 200.000–600.000 arasında değişmek üzere ortalama 300.000, Dukes (10) tarafından da 383.000 (120.000–190.000) olarak bildirilmiştir. Köpeklerde trombosit sayısının, Schermer (22) 165.000 ile 378.000 ve Schalm (21) 200.000 ile 900.000 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Gardner'e (12) göre brillantcresylblau metodu ile 1 mm<sup>3</sup>. kanda trombositler 127.000–428.000 arasında değişmek üzere ortalama 250.000 dir ve Cruz, Van Allen thrombocytocrit metodu ile 100 cc. kanda 0.6 cc. trombosit saptamıştır.

**Tavşanlarda:** 1 mm<sup>3</sup>. tavşan kanında bulunan trombositleri Wirth (25) 243.000 (112.000–463.000), Schermer (22) 220.000 (126.000–1.000.000), Schalm (21) 540.000 (200.000–1.000.000) olarak bildirmişlerdir. Coffin'e (9) göre ortalama değer 540.000 dir. Hueper, Landsberg ve Eskridge (15) tarafından yapılan bir araştırmada tavşanlarda trombosit sayısı 170.000 olarak bildirilmiştir. Casey, Rosahn ve Pearce (8) çeşitli ırktan tavşanlar üzerinde yaptıkları sayımlarda trombositleri Flandre ırkında 388.000, Belçika ırkında 527.000, Havana ırkında 562.000 olarak saptamışlardır. Biz de yerli ada tavşanlarında trombosit sayısını 1 mm<sup>3</sup>. kanda 384.000 ile 496.000 arasında değişmek üzere ortalama 438.800 ± 21.122 olarak saptadık. Kolb'a (16) göre evcil hayvanlarda trombosit sayıları 150.000 ile 600.000 arasında değişmekte ve yeni doğan hayvanlarda trombosit değerleri genellikle erişkin olanlardan daha düşük bulunmaktadır.

Çalışmamızda elde edilen bulguları daha iyi değerlendirebilmek için önce mevcut metodların özellikleri ve bunlara ilişkin eleştirilerin özet olarak gözden geçirilmesi faydalı olacaktır.

**İndirekt Metodlar :** Bunlarda boyalı sürme kan frotilerinden trombositlerin alyuvarlara olan oranı saptanmakta ve aynı kan örneği ile yapılan direkt alyuvar sayımından trombositlerin 1 mm<sup>3</sup>. teki sayıları bulunmaktadır (21, 25). İndirekt metodların başlıcaları şunlardır:

*Fonio M.* unda % 14 MgSO<sub>4</sub> eriyiğinden büyük bir damla, kan alınacak yere konarak pikür bunun içinden yapılır (13, 24). Wirth (25) bu metotta frotilerin çok kısa zamanda ve akmakta olan taze kandan yapılmasını, aksi halde trombositlerin yığın yapması ve pıhtılaşma nedeniyle sayımın güçleştiğini, bazen de yapılamadığını bildir-

miştir. *Kocher-Fonio M.* unda parmak ucu % 14  $MgSO_4$  eriyiği içinden derin olarak delinir. Karışımdan froti yapıp May Grünwald-Giemsa metodu ile boyanır (13). *Miyake M.* unda frotilerin boyanması için Çin mavisi, eozin ve damıtık sudan oluşan bir eriyik kullanılır. *Blacher M.* Kan sodyum sitrat ve fizyolojik tuzlu su ile sulandırılır. Karışımdan yapılan frotiler önce May Grünwald, sonra Giemsa ile boyanır. Halman (13) bu metodların Fonio metodundan % 30 kadar yüksek değerler verdiğini bildirmiştir. *Kosenow M.* Bu metodda trombositler auramin'le boyanmış frotilerde floresans ışıktta sayılır (22). *Dameshek M.* unda sulandırma eriyiği içinde brillantcresylblau vardır ve retikülositlerde aynı frotide sayılabilir (24). *Olef M.* Kan parafin bir kap içinde sulandırılır ve parafinlenmiş bir çubukla alınarak froti yapılır. Wintrobe'a (24) göre Olef metodu belki de indirekt metodların en iyisidir. Fakat bu metodda kanla eriyik, trombositlerin alyuvarlara olan normal oranını değiştirmeyecek şekilde karıştırılmış olmalıdır. Bu iş alyuvarların yüksek özgül ağırlıkları ve çökmeye olan meyilleri nedeniyle çok güçtür. Bu metodla yapılan trombosit sayımları direkt metodlardan daha yüksek değerler verir. *Frazer M.* Sığır ve koyunlarda trombosit sayımı için tavsiye edilmiştir. Kan parafinlenmiş bir iğne ile alınarak parafinli saat camı içinde sulandırılır (9).

**Direkt Metodlar:** Bu metodlarda kan örneği belirli oranlarda çeşitli sulandırma eriyikleri ile karıştırılarak doğrudan doğruya kamarada sayılır. Direkt metodlardan başlıcaları şunlardır:

*Gutstein M.* Kan önce % 3.8 sodyum sitrat ile karıştırılır. Sonra içinde nilblau 2B x bulunan  $MgSO_4$  ve damıtık sudan oluşan eriyikle sulandırılır (20). *Walker ve Sweney M.* Sulandırma eriyiği olarak % 1.1 lik sodyum oksalat kullanılır (23). *Langenhager M.* Kan alyuvar pipetinde % 3.8 sodyum sitrat eriyiği ile 1/100 oranında sulandırılır (20). Romies'c (20) göre, kan alınması 15 saniyeyi geçerse pıhtılaşmanın başlaması nedeniyle alçak değerler elde edilir. *Danilin M.* Sulandırma eriyiği olarak % 2 lik NaCl ile % 1 lik malachitgrün kullanılır. Wirth (25) Danilin ve Gutstein metodlarında trombosit olarak sayılan hücrelerin hepsinin trombosit olmadığını, bu nedenle yüksek değerler bulunduğunu bildirmiştir. *Rees-Ecker M.* unda sulandırma eriyiği olarak 3.8 gr. sodium citrate; 0.22 cc. neutral formaldehide (USP) % 38; 0.05 gr. brillantcresylb'au; 100 cc. eau dist. kullanılır. Sulandırma oranı 1/100 dür (24). Benjamin (3) bu metodda formaldehidi % 40 olarak bildirmiştir. Yazara göre sulandırma eriyiği alyuvar pipetinin balon kısmına kadar çekilip boşaltılır. Schalm'a (2) göre aynı metodda kan enjektöre alınıp hemen EDTA içine konur. Wintrobe (24) uzun zaman beklemiş Rees-Ecker eriyiğinde formaldehidin oksidas-

yonundan oluşan formik asidin alyuvarlarda hemoliz yapabildiğini bildirmiştir. *Lawrence ve Valentine M.* Küçük hayvanlarda kulak veninden çıkan kanla yapılır ve Rees-Ecker eriyiği kullanılır (9). *Brecher-Cronkite M.* unda sulandırma eriyiği olarak % 1 lik amonyum okzalit kullanılır ve sayım faz kontrast mikroskopta yapılır (6). Bigs ve Mearlane'e (4) göre, önce alyuvar pipetinde 0.5 çizgisine kadar sulandırma eriyiği, sonra eriyik 1 çizgisine çıkıncaya kadar kan çekilir. Wintrobe'a (24) göre kan silikonize deney tüpüne alınır. Yazara göre bu metodun faz kontrast mikroskop gibi özel bir alete ihtiyaç göstermesi bir dezavantajdır. *Piette M.* Bu metodda *Feissly-Ludin* sulandırma eriyiğindeki cocaine yerine chlorhydrate de procaine kullanılmak suretiyle bir değişiklik yapılmıştır (19). *Guy ve Leake M.* unda alyuvarlar parçalanmazlar. Diğer kısımlar Rees-Ecker metodunun aynıdır (9). *Van Allen Thrombocytocrit M.* Küre şeklinde sedimentasyon kamerası ve özel yapıda santrifüj tüpü gereklidir (23).

Boschen'e (5) göre kanın uzun süre santrifüje edilmesinde bile trombositlerin bir kısmı plazma içinde asılı kalırlar. Diğer bir kısmı alyuvarlara karışır. Bu nedenle hematokritle çöktürülmüş trombosit katı kalınlığından trombosit sayıları hesaplanamaz. *Flössner M.* unda parafinlenmiş malzeme kullanılır ve sulandırma eriyiği Dahlia boyasıyla karışık Tyrode eriyiği ve % 10 luk formolden oluşur. Wirth (25) Flössner ve benzeri metodlarla elde edilen trombosit sayılarının aslında canlıda bulunan normal sayıdan az olduğunu bildirmiştir.

*İndirekt Metodların Dezavantajları:* Bu metodlarda, frotide hücrelerin düzensiz dağılımları ve kümelenmeler nedeniyle alyuvar trombosit oranı bozulmaktadır. Bu nedenle çeşitli yazarlar tarafından (22, 24) bildirildiği gibi indirekt metodla yapılan sayımlar direkt metodla elde edilenlerden daha yüksek sonuçlar vermeye meyleder. Ayrıca frotinin kalınlığı, antikoagulan maddenin bileşimi ve değide bulunduğu yüzey gibi çeşitli faktörler trombositlerin şekillerine etkiler (24).

*Direkt Metodların Sakıncalı Yönleri:* Wintrobe'a (24) göre sayma kamarasının yağlı immersiyona mücade etmemesine bağlı olarak trombositlerin diğer parçacıklardan ayırt edilmesi güçtür. Bu nedenle direkt metodların hepsinde bir handikap bulunmaktadır. Todd, Sanford ve Wells (23) direkt metodların genellikle bazı indirekt metodlardan alçak değerler verdiği halde klinik amaçlar için daha pratik olduğunu bildirmişlerdir. Wintrobe'a (24) göre genellikle yapılan yanlışlar alçak trombosit sayısı vermeye meyleder. Doğru sonuç alınmasında en önemli nokta kanın çabuk sulandırılmasıdır. Tam erimemiş alyuvar, akyuvar parçaları, sulandırma sıvısının yapımında kulla-

mlan bazı tuzların kristalleri, boya, bakteri vb. partiküller doğru olmayan yüksek değerler verir.

Wirth de (25) bazı araştırmacıların özel metodlarla yüksek değerler bulduklarını, bu metodların sadece gerçek trombositlerin teşhis edilip sayılmadığı noktasından eleştirildiklerini bildirmiştir. Yazara göre Ogorelec, kanatlılarda olduğu gibi memeli kanlarında da trombositlerle birlikte mekik benzeri hücrelerin yüksek sayıda bulunabileceğini kaydetmiştir. Ayrıca Wirth'e göre trombosit sayımı ile ilgili metodların hepsinde bir araya gelen hücreler nedeniyle yanlış sonuç alınır. Bu şekilde elde edilen değerler dolaşım kanında bulunan trombosit sayısından düşüktür.

Çalışmamızda hayvanların trombosit sayımları ven kanı ile yapılmıştır. Böylece ven kanı ile kapillar kandan daha iyi sonuçlar alınabileceği bildirimlerine uyulmuştur (7, 24). İnsanlarda venadan kan almanın sakıncaları göz önünde bulundurularak sayım, yazarların çoğu tarafından bildirildiği gibi (4, 24, 25) parmak ucundan çıkan kanla yapılmıştır. Tavşanlarda ven kanı kullanılmakla beraber daha pratik olması nedeniyle Lawrence ve Valentine (9) in küçük laboratuvar hayvanlarında salık verdikleri gibi pipet, kulak venine (kan iğnesi batırılmak suretiyle) yapılan punksiyondan serbestçe çıkan kanla dolduruldu. Gerçi tavşanlarda da büyük hayvanlarda olduğu gibi v. marginalisten iğne ile enjektöre kan alınabilirse de çoğu kez yeter miktar kan almadan damar kllabe olmaktadır. At, sığır, koyun ve köpekte kan plastik bir enjektöre alınarak içinde EDTA bulunan şişelere boşaltıldı. Bazı yazarlar tarafından bildirildiği (24) ve bizim de Viyana'da ön çalışmalarımız sırasında kullandığımız gibi kan silikonize iğnelere (ve plastik enjektörle) alınarak silikonize şişelere (Siliconierung von glaströrchen, firma R. Siebert, Garnisongasse Wien 9. Austria) veya ağız kapaklı özel plastik deney tüplerine (Plastikrörchen aus polystyrene mit deckel nach hartet, firma Fritz Hellige and Ca. Gelbergasse 84. wien 12. Austria) konabilir. Özel durumlarda ve ileri derecede duyarlı çalışmayı gerektiren bazı olaylarda plastik enjektöre tesbit edilmiş ve kan iğnesi üzerine geçirilen çok ince plastik bir boru ile damara girilerek iğne geri çekildikten sonra plastik borudan enjektör içine kan toplanabilir. Bu metod, trombositlerin parçalanmalarına veya bir araya toplanmalarına engel olunma yönünden daha faydalı olabilirse de bu malzemenin her yerde kolaylıkla sağlanması mümkün değildir. Çalışmamızda her laboratuvarında kolaylıkla uygulanabilecek pratik bir metod amaç edinildiği için, punksiyon yapılmış damardan direkt olarak pipete kan çekme yerine plastik enjektörle kan almayı, Schalm (21) ve Benjamin (3) tarafından da bildirildiği

gibi alınan kanı yukarda adı geçen silikonize şişe veya plastik tüpler yerine EDTA'lı şişelere toplamayı uygun bulduk.

Takdim ettiğimiz yeni metotta kanın sulandırılmasında Benjamin, Schalm ve Wintrobe'un (3, 21, 24) tavsiyelerine uygun olarak alyuvar pipeti kullanıldı. Fakat sulandırma bu bildirimlerde 1/200 olduğu halde sayım alanına düşen normal trombosit miktarının kolay bir sayım için elverişli seyreklikte olması nedeniyle biz 1/100 sulandırmayı uygun bulduk. Böylece fazla sulandırmanın sakıncaları bir dereceye kadar azaltılmış oldu.

Çalışmalarımızda insan, at, sığır, köpek ve tavşanlarda yeni metotla yapılan sayımlardan elde edilen sonuçlar literatür değerlere uygun olup, bazı bildirimlerden biraz yüksektir. Sadece koyunlara ait olanlar biraz düşüktür. Koyunlarla ilgili bulgularımızın literatür değerlerin değişim sınırları içinde olması, Klieneberger ve Gardner'in bildirimlerinden (sayfa 492) yüksek bulunması nedeniyle farklılığın deneye alınan hayvan sayısının azlığından ileri geldiği düşünülebilir. Ayrıca ırk farkı diğer bir faktör olabilir. Nitekim literatürde çeşitli koyun ırkları arasında bir ayrılığın bulunup bulunmadığı ile ilgili bir bildirimle rastlanamamıştır. Koyunlarda pıhtılaşma süresinin sığır ve diğer hayvanlara oranla kısa oluşu -atta 11.5', sığırdaki 6.5', tavşanda 4', köpekte 2.5', koyunda 2.5' (10), bazı yazarlara göre 1.25'-1.5' (22)- trombositlerin parçalanması ve pıhtı oluşumu düşük değerlere neden olarak ele alınabilir ise de özellikle koyunlar üzerindeki çalışmalarımız sırasında kan alınmasına ilişkin bir güçlük karşılaşılmadı. Diğer taraftan insan ve çeşitli evcil hayvanların trombosit sayılarına ilişkin literatür değerler yazar ve metodlara göre değişmek üzere çok farklıdır.

*Sonuç olarak* direkt trombosit sayımında kullanılmak üzere takdim ettiğimiz yeni sulandırma eriyiği, insan, at, sığır, koyun, köpek ve tavşanlarda başarı ile kullanılmış ve yapılan sayımlardan literatür değerlere uygun sonuçlar alınmıştır. Aynı eriyikle adı geçen hayvanlarda akyuvar sayımı da yapılabilmektedir.

**Teşekkür:** Bu travayın hazırlanmasında teşvik ve yardımlarını gördüğüm Prof. Dr. Ahmet Noyan'a, laboratuvarında çalışma izini veren ve gerekli malzemeyi sağlayan Viyana Veteriner Yüksek Okulu Fizyoloji Enstitüsü direktörü Ord. Prof. Dr. Alfred Kment'e, ilgilerini esirgemeyen Doç. Dr. Leibesider'e, Dr. Deigner'e ve enstitünün diğer elemanlarına teşekkür ve şükranlarımı sunmayı zevkli bir görev saymaktayım.

## Literatür

- 1- **Batu, S., Arıtürk, E., ve Kutsal, A.** (1962): *Evcil Hayvanlarda İstatistik Varyasyon*, Güven Matbaası, Ankara.
- 2- **Behrens, H.** (1951): *Zählung der Thrombocyten beim Pferde mit Hilfe der Methode nach Neumann und Monreal Berl.*, W. Münch. Tierärztl. Wschr., 75-76.
- 3- **Benjamin, M., M.** (1964): *Outline of Veterinar Clinical Pathology*. 2. Ed. The Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- 4- **Biggs, R., and Macfarlane, R., G.** (1962): *Human Blood Coagulation and its disorders*. 3. Ed. Blackwell. Scientific Publications, Oxford, 437.
- 5- **Boschen, H., J.** (1950): *Zählung der thrombocyten beim Pferde nach der Methode von Neumann*. Diss., Hannover.
- 6- **Brecher, G., and Cronkite, E., P.** (1950): *Morphology and Enumeration of Human Blood Platelets*. J. App. Physiol., 3, 365-377.
- 7- **Brecher, G., Schneiderman, M., and Cronkite, E. P.** (1953): *The reproducibility and Constancy of the Platelet Count*. Am. J. Clin. Path., 23, 15-26.
- 8- **Casey, A. E., Rosahn, P. D., Hu, C., and Pearce, L.** (1936): J. Exptl. Med., 64, 453.
- 9- **Coffin, D. L.** (1953): *Manuel of Veterinary Clinical Pathology*, 3. Ed., Comstock Publishing Associates, Ithaca, N. Y.
- 10- **Dukes, H. H.** (1955): *The Physiology of Domestic Animals*. 7. Ed., Bailliere, Tindall and Cox, London.
- 11- **Erkol, M., ve Konuk, T.** (1964): *Tavşanlarda Hematolojik Araştırmalar*. Vct. Fak. Der., 10, 143-157.
- 12- **Gardner, M. V.** (1947): *The Blood Picture of Normal Laboratory Animals*. Journal of the Franklin Institute, 243, 251-257.
- 13- **Hallmann, L.** (1966): *Klinische Chemie und Mikroskopie*. 10. Aufl., Georg Thiema Verlag, Stuttgart.
- 14- **Heilmeyer, L., und Hittmair, A.** (1959): *Handbuch der Gesamten Hämatologie*, 2. Band. Urban und Schwarzenberg, München, Berlin 53.
- 15- **Hueper, W. C., Landsberg, J. W., and Eskridge, L., C.** (1940): *The Effects of Intravenous and Intraperitoneal Introduction of Polyvynyl Alcohol Solutions Open the Blood*. J. Pharmacol., 70, 201-210.

- 16- **Kolb, E.** (1968): *Lehrbuch der Physiologie der Haustiere*. 2. Aufl. Veb Gustav Fischer Verlag, Jena.
- 17- **Miller, S. E.** (1960): *A Textbook of Clinical Pathology*. 6. Ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- 18- **Olef, I.** (1935): *The Enumeration of Blood Platelets*. J. Lab. and Clin. Med., 20, 416.
- 19- **Piette, M., and Piette, C.** (1959): *Numération Des Plaquettes Sanguines Utilisant Un Liquide Hypotonique A Base De Chlorhydrate De Procaine*. Sang. 30, 144-151.
- 20- **Romies, B.** (1948): *Mikroskopische Technik*, 15. Ver. Auf., Leibniz Verlag, München.
- 21- **Schalm, M., O.** (1965): *Veterinary Hematology* 2. Ed, Lea and Febiger Philadelphia.
- 22- **Schermer, S.** (1958): *Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere*. 2. Aufl., Leipzig.
- 23- **Todd, J., C., Sanford, A., H., Wells, B., B.** (1953) : *Clinical Diagnosis by Laboratory Methods. A Working Manual of Clinical Pathology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia and London.
- 24- **Wintrobe, M. M.** (1966): *Clinical Hematology*. 6. Ed. Lea and Febiger Philadelphia.
- 25- **Wirth, D.** (1950): *Grundlagen einer Klinischen Hämatologie der Haustiere*. 2. Auf., Wien und Innsbruck.

Yazı "Dergi Yazı Kuruluna" 26. 9. 1970 günü gelmiştir.