

21730

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAN HÜCRE SAYICILARININ İNCELENMESİ VE BEYAZ KAN
HÜCRELERİNİN ELEKTRONİK DEVRE YARDIMI İLE ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Müh. Cenk ALPER

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 31 Ocak 1992

Tezin Savunulduğu Tarih : 21 Şubat 1992

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Mehmet KORÜREK

Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Ahmet DERVİŞOĞLU

Prof. Dr. Ertuğrul YAZGAN

ŞUBAT 1992

ÖNSÖZ

Bu alanda ve tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen, Prof.Dr.Ertuğrul YAZGAN'a, Doç.Dr.Mehmet KORÜREK'e, Gökhan PAÇALI'ya, Jale GEDİZLİOĞLU'na, Şenol BULUT'a ve KAMED A.Ş' ye çok teşekkür ederim.

ŞUBAT 1992

Cenk ALPER



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
BÖLÜM 1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kan Üzerine Genel Bilgiler.....	1
1.1.1. Kanın Renkli Hücreleri (Eritrositler)...	2
1.1.2. Kanın Renksiz Hücreleri (Lökositler)...	4
1.1.3. Kan Plaketleri (Trombositler).....	7
1.1.4. Kan Tozları (Hemoconia).....	8
BÖLÜM 2. KAN HÜCRE SAYIM YÖNTEM VE CİHAZLARININ GELİŞİMİ	10
2.1. Kan Hücre Sayıcılarının Tarihsel Gelişimi.....	10
2.2. Hücre Sayma Teorisi ve Teknolojisi.....	15
2.2.1. Problemin Tanımı.....	15
2.2.2. Kan Hücre dedeksiyon Metodları.....	16
2.2.3. Elektriksel Direnç Prensibine	
Dayanan Kan Hücre sayıcıları.....	20
2.2.3.1. Coulter Sayıcıları.....	24
2.2.3.2. Model S-Plus Tipi Coulter	
Sayıcıları.....	26
2.2.3.3. Pikoscala Sayıcıları.....	27
2.2.3.4. ZBI Tipi Coulter	
Sayıcıları.....	31
2.2.3.5. Farklı Hücre Gruplarını	
Sayan Otomatik Coulter	
Sayıcıları.....	32
2.2.4. Optik Ölçüm Prensibine Dayanan Kan	
Hücre Sayıcıları.....	33
2.2.4.1. Technicon H6000 Kan Hücre	
Sayıcısı.....	34
2.2.4.2. Farklı Hücre Gruplarını	
Sayan Otomatik Optik	
Sayıcılar.....	35
2.2.5. Günümüzde Kullanılan Kan Hücre	
Sayıcılarında Oluşabilecek Hatalar....	37
BÖLÜM 3. CELL-DYN 900 KAN ANALİZÖR CİHAZI.....	42
3.1. Sistemin Tanımı.....	42
3.2. Örnek Hazırlanması.....	44
3.3. Örnek İletimi.....	45
3.4. Partikül (Hücre) Dedeksiyonu.....	45
3.5. Partikül (Hücre) Büyüklüğüne Göre Puls	
Dedeksiyonu.....	47

3.6.	Hücre Büyüklüğüne Göre Eşik Değerinin Belirlenmesi.....	47
3.7.	Hücre Sayım Kapısı.....	48
3.8.	Örnek Hacim Ölçümü.....	48
3.9.	Hematokrit (HCT) Ölçümü.....	50
3.10.	Hemoglobin (HGB) Ölçümü.....	51
3.11.	Tüm Kan Plateletlerinin Ölçümü.....	52
3.12.	Cell-Dyn 900 Cihazının Kapsamı.....	53
3.12.1.	Sistemin Konfigürasyonu.....	54
3.12.1.1.	RBC/PLT Analog Kuvvetlendirici Modülü.....	56
3.12.1.2.	WBC Analog Kuvvetlendirici Modülü.....	61
3.12.1.3.	Hematocrit (HCT) ve Hemoglobin (HGB) Modülü.....	63
3.12.1.4.	Trombosit (Platelet) Sayım Modülü.....	67
3.12.1.5.	Mikrobilgisayar Modülü.....	71
3.12.1.6.	Digital Buffer Modülü.....	73
3.12.1.7.	Akış Sistemi Modülü.....	73
3.12.1.8.	Gösterge Modülü.....	74
3.12.1.9.	Yazıcı Arabirim Modülü.....	75
3.12.1.10.	Ölçüm Modülü.....	75
3.12.1.11.	Klavye Modülü.....	75
3.12.1.12.	Güç Kaynağı Modülü.....	76
3.12.1.13.	Pompa Sistem Modülü.....	76
3.12.1.14.	Vakum Regülatör Modülü.....	76
3.12.1.15.	HGB Akış Hücresi Modülü.....	77
3.12.1.16.	Akış Kontrol Panel Modülü.....	77
3.12.1.17.	Seri Arabirim Modülü (Arka Panel) Açıklaması.....	78
BÖLÜM 4	BEYAZ KAN HÜCRE (LÖKOSİT) ALT GRUPLARINI SAYAN DEVRE GERÇEKLEMEŞİ.....	79
4.1.	Lökosit (Beyaz Kan Hücresi) Alt Hücre Gruplarının Sayımını Sağlayan Devrenin Blok Diyagramı.....	79
4.2.	Diskriminatör (Karşılaştırmacı) Devresi.....	81
4.3.	Zamanlama Devresi.....	84
4.4.	Resetleme (Sıfırlama) Devresi.....	87
4.5.	Sayıcı ve Gösterge Devresi.....	88
4.6.	Lökosit (Beyaz Kan Hücresi) Alt Hücre Gruplarının Sayımını sağlayan Devrenin Tüm Elemanları ile Gösterimi.....	89
SONUÇLAR.....		95
KAYNAKLAR.....		97
ÖZGEÇMİŞ.....		98

ÖZET

Bu tezde, dünyada yaygın olarak kullanılmakta olan ve insan sağılığında çok önemli rolü bulunan kan analizör cihazları üzerine bir devre tasarımı gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen bu devre ile, beyaz kan hücrelerini (lökosit) sayabilen bir kan analizör cihazının (Cell-Dyn 900), lökosit alt grup hücrelerini de sayabilmesi sağlanmıştır.

İlk olarak, insan kanına ait hücreler hakkında genel bir bilgi verildikten sonra, kullanılan kan hücre sayım metodları ve kan hücre sayım cihazlarının gelişimleri anlatılmıştır.

Kliniklerde ve hastahanelerde çok geniş bir kullanım alanı olan, CELL-DYN 900 Kan analizör cihazı incelenmiştir. Cihazın tüm mekanik ve elektronik yapısı ele alınarak, cihazda kullanılan kan hücre sayım yöntemi ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

CELL-DYN 900 Kan analizör cihazının kullandığı hücre sayım yöntemine bağılı olarak, insan kanına ait, beyaz kan hücrelerinin alt gruplarının da sayılabilmelerini sağlayan bir devre düzenegi gerçekleştirilmiştir. Böylece, CELL-DYN 900 Kan analizör cihazının eklenen devre yardımı ile, lökosit alt hücre gruplarını da sayabilmesi sağlanmıştır.

SUMMARY
THE EXAMINATION OF BLOOD CELL COUNTERS AND THE ANALYSIS
OF THE WHITE BLOOD CELLS THROUGH ELECTRONIC CIRCUIT

Blood, which has the of transporting the oxygene and the substances absorbed through stomach and intestine to the tissues, to return the carbon dioxide that has been accumulated in the tissues to the lungs and other metabolic remainings to the kidneys and to the liver, to regulate the body temperature to control the work of the cells and also which takes the role of transporting the other active substances to the tissues, is consisting of cells, shaped elements and of a liquid which is called plasma.

By an adult human being the most of the blood cells are produced by the bone marrow. The Blood Cells are separated into 2 groups according to their microscobic appearances:

- 1) Coloured Cells (Erythrocyts)
- 2) Colourless Cells (Leucocyts)

1- Erythrocyts

Red Blood Cells, with their other name Erythrocyts, constitute the majority of the shaped elements in the Blood. They include the Hemoglobin (HGB) which gives the blood its red colour and which is the transporter of oxygene and carbon dioxide. Their diameter is normally 7,5 microns and their height is at widest point 2 microns and at narrowest point 1 micron.

The red coloured blood cells which have a diameter of 7.5 microns are called " normocyts ", the 6 microns or less " microcyts " and 8.8 microns or more are called " macrocyts " In a normal male there are 5-5,5 millions and in a female 4,5-5 millions of red coloured blood cells in 1 mm³ of blood.

2- Leucocyts

These cells which are colourless are also called white blood cells. They are round cells with a nucleus. They are separated into 2 groups according to the of their nucleuses:

- a) With a nucleus made of one piece (Mononuclear Leucocyts).
- b) With a nucleus made of many pieces (Polymorphonuclear Leucocyts).

a- Mononuclear Leucocyts:

These cells are may be examined in 2 groups according to the partical availability in their cell fluids, namely as "Lymphocyts" and "Monocyts". "The Lymphocyts" constitute the 20-25 % of the whole leucocyts. The large ones are 5-8 microns. Their shape is generally very regular and round. Their nucleuses are big compared with the cell itself. "Monocyts " constitute the 4-6 % of the whole leucocytes. Their size is 14-20 microns. They are the biggest cells of the Blood. The shape of their nucleus is like a bean and a kidney.

b- Polymorphonuclear Leucocytes:

Their nucleuses are pieced and in differend shapes. They may be examined in 3 groups according to the chemical colouring characteristics of their comprising particals, namely as: " Neutrophil Leucocyts", " Eosinophil Leucocyts" and "Basophil leucocyts ".

" The Neutrophil Leucocyts " comprise the 70 % of the whole leucocyts. Their size is 10-12 microns. Their nucleuses are in many different shapes and are pieced.

" The Eosinophil Leucocyts " comprise only the 2-4 % of the whole leucocyts. Their size is 12-14 microns. Their particals get coloured with acid colours.

" The Basophil Leucocyts " comprise the 0.5 % of the whole leucocyts. Their size is approximately 10 microns. Their nucleus is quite big.

On the other hand, there blood placets in the blood of the human beings which are sizely quite smaller than the coloured and the coloureless blood cells. They are called " Trombocyts ". These placets are in irregular shapes. There are 250000-900000 " Trombocyts " in the blood of an adult human being.

Blood counting equipments are developed to count the different cells of the blood and to analyse them. The first experiment on the Blood Counting Equipments has been realized in the 17th. Century by van Leeuwerhoek. Through this developed equipment, it's enabled to count the small cells, namely the Erythrocyts.

In the 19th. century, throught the techniques based on dilution of the blood samples before counting, " the Tiny Blood Counting Rooms " could be designed in different forms

For instance, " a Tiny Blood Counting Room " in superficial rectangle form with glass protection and with diluted blood sample inside has been realized by Bulker.

In the 20th. century, through the developments in the electronics and in the optoelectronics some steps have been gained in the Blood Cell Counting (Blood Counting).

In 1934, Moldovan has developed the electrical measuring method which has been based on measuring the diluted erythrocyt suspension by photoelectrical equipment.

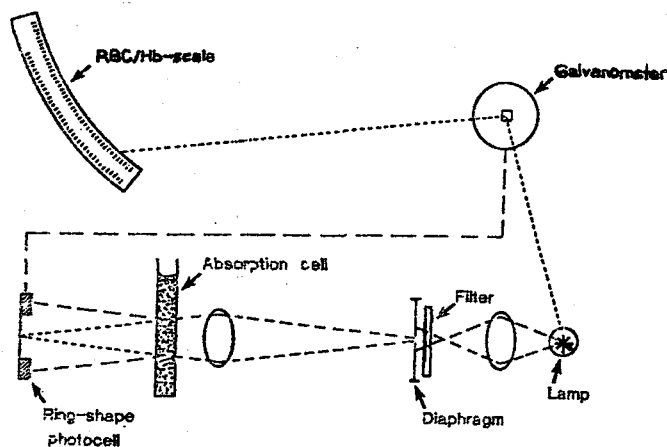


Fig.1. Schematic diagram of a device according to Kleine's light-scattering method [3].

By a method developed in 1945 's, it has been made possible to measure the erythrocyt concentration in the blood by using a turbidimeter. Besides, through the development of this method, the measuring equipment shown on Figure.1 has been constituted.

With the efforts made in 10 years, the erythrocyts of a thin layer of blood sample could be counted by a photo-electrical inspection method. The " Casella Counter " which has been developed for this purpose and that makes measurements is shown on Figure.2. Afterwards, many kinds of blood cell counting methods and equipments have been on the base of the marked point inspection method. Besides, many different sorts of errors, which could happen due the irregularity of the cell shapes and due to the overlap of the cells on each other, have been reduced on these developed machines.

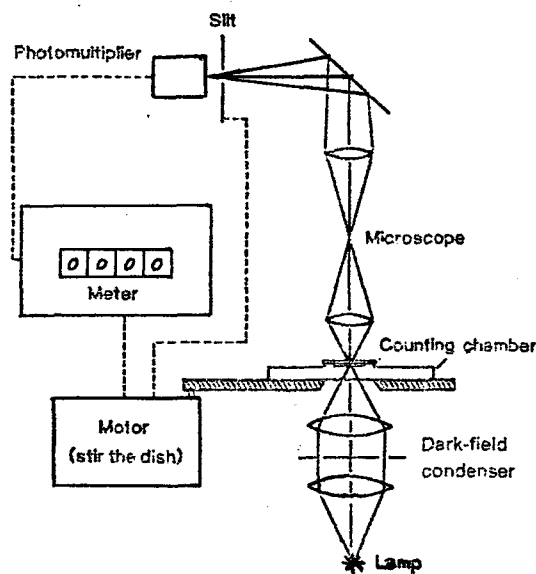


Figure.2 Schematic diagram of a device employing a photoelectric spot scanning method [3].

In 1953, to be able to count the blood cells which were in a thin liquid circulation, a method based on a principle that they are swept to an optical detection system has been developed. The "EEL" Counter based on this principle is shown on Figure.3.

In 1956, the "Coulter" type of Blood Cell Counting Device has been realized. This developed device constituted a base for the modernest Blood Counting used in our days. Furthermore, through the "Coulter" method, it became also possible to count the blood cells in different sizes by developing the systems that detect the electrical signs in balanced gravity with the cell volume.

The blood cell counting machines used nowadays generally make the measurements on and according 2 methods, and the other is the optical measuring principle method.

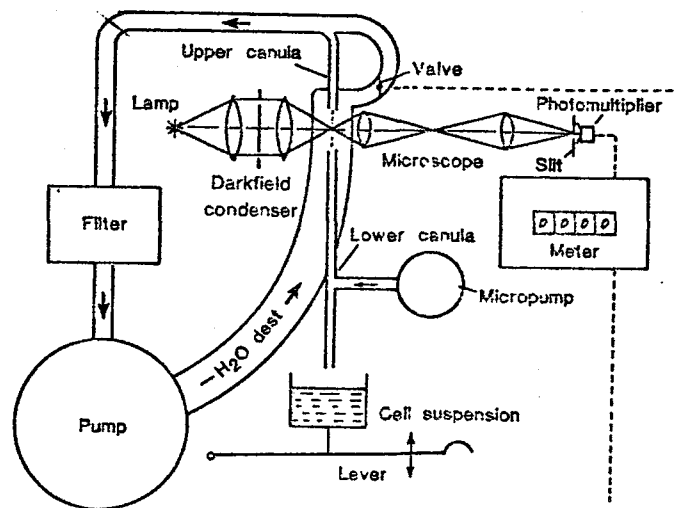


Figure.3 Schematic diagram of a device using a photoelectric method of counting cells one at a time [3].

In this Thesis, the CELL-DYN 900 Blood Analyser Machine that counts the blood cells according the electrical resistance principle has been examined. The CELL-DYN 900 Blood Annalyser Machine has been designed as system which electronically dects and counts the blood cells that are in a blood sample with a determined volume.

The CELL-DYN 900 Blood Analyser Machine has been designed to realize the following trancactions.

On a prediluted full blood sample 5 parameter measurings can be made:

- The number of the Red Blood Cells (RBC),
- The number of the White Blood Cells (WBC),
- The number of the Platelets (Trombocyts) (PLT),

- The value of the Hematocrit (HCT),
- The value of the Hemoglobin (HGB),

PLT measuring can also be made by using diluted Platelet Rich Plasma (PRP);

- Platelet measuring (Trombocyt Measuring) (PRP PLT).

The Machine can also calculate the following parameters by the help of the measured values;

- Mean Cell Volume (MCV),
- Mean Cell Hemoglobin (MCH),
- Mean Cell Hemoglobin Concentration (MCHC.)

The simplified measuring diagram of the CELL-DYN 900 Machine is show on Figure.4.

At the end of the thesis, a circuit mechanism has been realized which also enables to count the below groups of the White Blood Cells (WBC) in accordance with the system of the CELL-DYN 900 Blood Analyser Machine. Through this circuit beside the number of the white Blood Cells, the number of the following 3 main below groups can be obtained by individual measuring:

- LYMPHOCYTE (LYM),
- MIDDLE SIZE (MID),
- Monocyte
- Eosinophil
- Basophil
- NEUTROPHIL (GRAN).

If it would be necessary, the number of the White Blood Cells (WBC) can be obtained again by adding the number of these below groups.

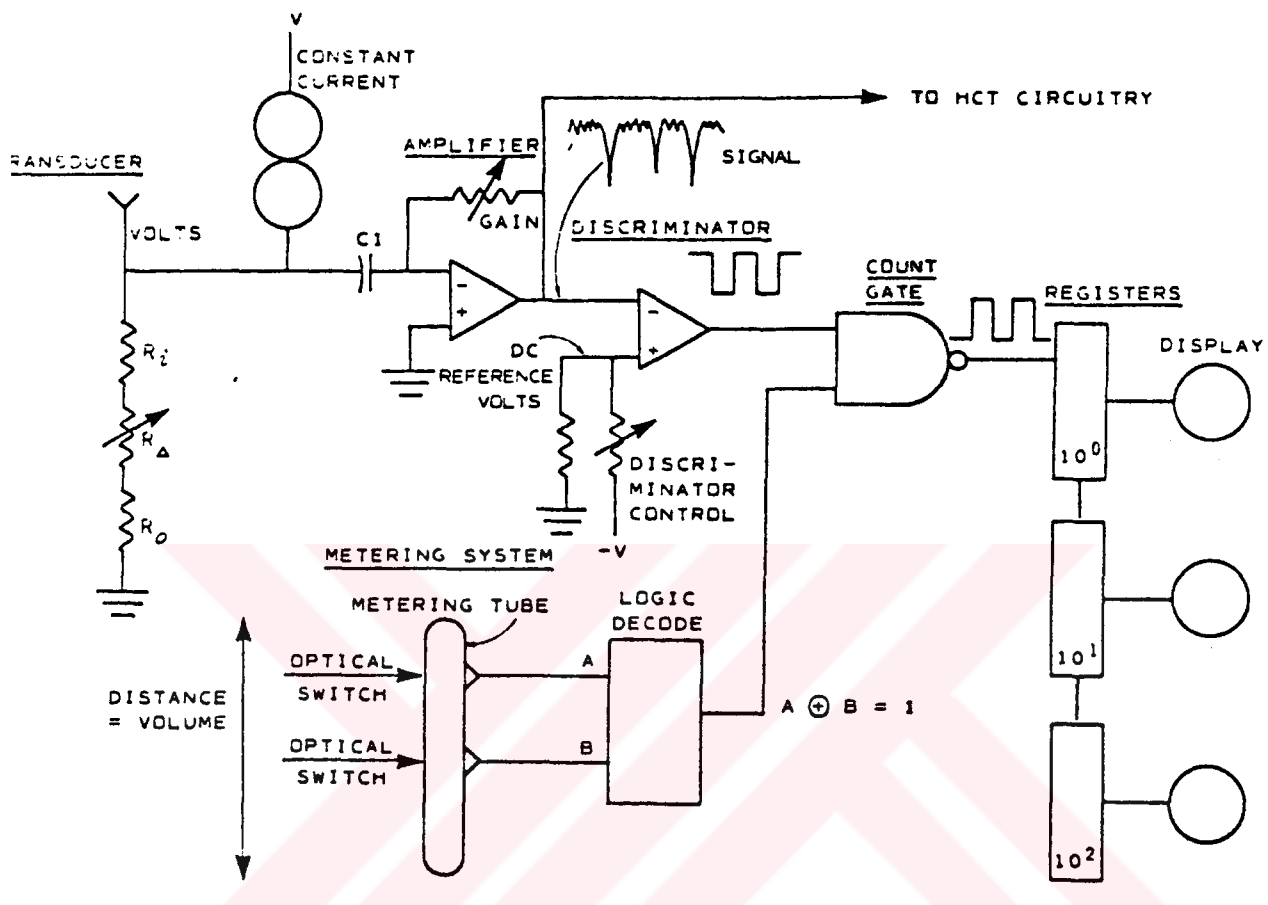


Figure.4 Simplified Particle Counter Schematic Diagram [10].

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Son yıllarda; insan sağlığı açısından oldukça önemli olan kan analizör (kan hücre sayım) cihazları üzerinde yoğun çalışmalar sürdürülmektedir. Bu alanda elde edilen gelişmeler sayesinde, insan kanı bütün parametreleri ile analiz edilebilmekte ve birçok hastalık erken teşhis ile belirlenebilmektedir.

1.1 Kan Üzerine Genel Bilgiler

Vücudumuzda mide-barsak yolundan emilen maddelerin ve oksijenin dokulara ulaştırılmasını; dokularda biriken karbondioksidin akciğerlere, diğer metabolik artıkların böbrek ve karaciğere dönüşünü; vücut ısısının düzenlenmesi ve hücre çalışmasını kontrol eden kan; hücreler, şekilli elemanlar ve plazma adı verilen sıvıdan oluşmaktadır. Kan hücreleri ve diğer şekilli elemanlar plazma içinde serbest olarak yüzmektedir. Plazmanın ise % 90'ı su ve % 7' si protein maddeleridir.

Erişkin bir insan vücudunda 5 litre kadar kan vardır. Bu miktar 70-75 kilo ağırlığında bir vücudun % 7' sini oluşturmaktadır.

Plazma, aşağıdaki şekilli elemanlardan oluşmaktadır

- Kan Hücreleri
- Kan Plaketleri
- Kan Tozları' dır.

Kan hücreleri ise iki gruba ayrılmaktadır: [1]

- 1- Kanın renkli hücreleri (erythrocytler: eritrositler)
- 2- Kanın renksiz hücreleri (leucocytler: lökositler)

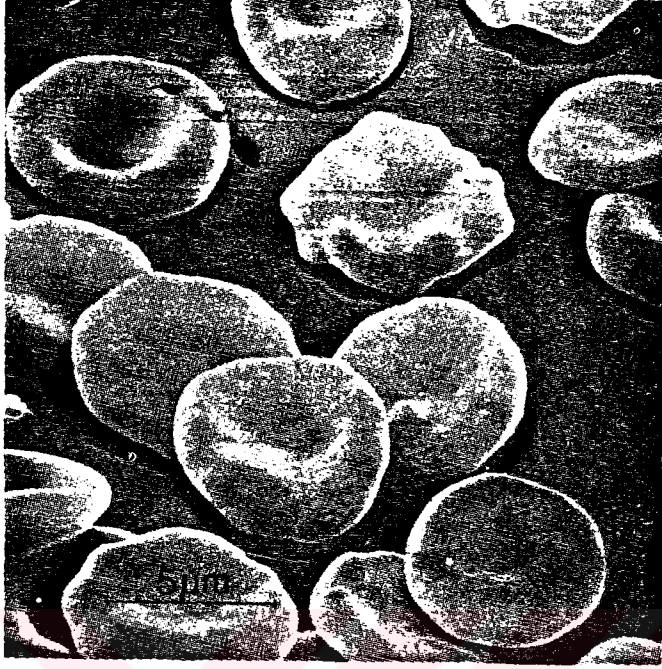
1.1.1. Kanın Renkli Hücreleri (Eritrositler)

Kanın şekilli elemanları arasında adet itibarıyla çoğunluğu teşkil ederler. Akyuvarlar adıyla da bilinen bu hücrelerin renkli görünmelerinin sebebi, bünyelerinde içerdikleri hemoglobindir. Kanın kırmızı rengi de kesif halde bulunan bu hücrelerden ileri gelmektedir.

Eritrositlerin şekilleri üstten bakıldığında muntazam toparlakmış görünümü verdiği halde, yandan bakıldığında, kenarları düzgün yuvarlak olan bikonkav mercek şeklindedir (Şekil-1.1).

İnsan eritrositlerinin % 75-80'nin büyüklüğü 7,5 mikrondur. Bunlar "Normocyt" adını alır. Bazen daha küçük 6 mikron olanlarına da rastlanır. Bunlara "Microcyt" denir. Daha büyük, 8.8 mikron olanlarına "Macrocyt" veya "megalocyt" denmektedir. Kenarlarının kalınlıkları ise 1.8-2 mikron kadardır. Eritrositler, birbiri ardına sıralanmış olarak damarların ortasında bir sütun halinde ilerlerler.

Eritrositler, hemoglobin maddesi içermektedirler. Hemoglobin demir kapsayan bir protein maddesidir. Hücre içiğinin % 90'ını kapsamaktadır. Normal bir eritrosit hücresinde 29 poligram hemoglobin maddesi bulunmaktadır. Hemoglobin miktarı eritrosit içersinde muayyen bir oranı muhafaza eder.



Şekil-1.1 Normal eritrositin "Scanning" electron mikrografı
[1].

Buna "Isochromie" denir. Hemoglobin miktarı bu oranın üstüne çıkarsa "hyperchromie", altına düşerse de "hypochromie" denir. Hemoglobin miktarı desilitrede gram cinsinden verilmektedir. Normal değer olarak ise, 14.5 gr/dl. referans alınır.

Normal bir erkekte, bir milimetreküp kanda 5 milyon eritrosit hücresi bulunmaktadır. Kadında ise bu değer 4.5 milyon'a düşer. İnsan eritrositleri çekirdeksiz olduğundan, ömürleri kısadır; 3-4 hafta kadar sonra dejenere olurlar.

Eritrositlerin vazifesi vücutta gaz değişimini sağlamaktır. İçerdikleri hemoglobin maddesi ile oksijen karbondioksit değişimini gerçekleştirirler.

1.1.2 Kanın Renksiz Hücreleri (Lökositler)

Akyuvarlar da denilen bu hücreler, hemoglobin içermedikleri için renksizdirler. Bu hücreler, yabancı maddeleri sarıp içlerine alarak onları sindirebilirler. Bu olaya 'fagositöz' denmektedir. Sayı olarak, açlık zamanlarında, sindirim zamanlarında çokça bulunurlar. Hacimleri ise, eritrositlerden daha büyüktür.

Kanın renksiz hücreleri, çekirdeklerinin özelliklerine göre iki esas gruba ayrılırlar:

- A) Tek Çekirdekli (Mononuclear) lökositler
- B) Polimorf (Çok parçalı) çekirdekli (Polynuclear) lökositler

A) Tek Çekirdekli (Mononuclear) Lökositler:

Tek çekirdekli lökositler de tanecik (granula) içerip, içermediklerine ve çekirdeklerinin özelliklerine göre ikiye ayrılırlar:

- a) Lenfosit (lymphocyt)
- b) Monosit (monocyt)

a) Lenfosit (lymphocyt):

Kanın bütün lökositlerinin % 20-25'ini teşkil etmektedirler. Büyüklükleri 5-8 mikron kadardır. Şekilleri oldukça muntazam ve toparlaktır. Çekirdekleri de hücre şekli gibi toparlaktır. Çekirdek büyüklüğü hücre büyüklüğüne o

kadar yakındır ki, bazı lenfositler hafif büyüklükte yalnız çekirdekten ibaretmiş gibi görünmektedir. Lenfositlerin bütün bu morfolojik özellikleri Şekil-1.2.d.e'de gösterilmektedir. Ölçümler esnasında, lenfositler, en küçük lökosit hücreleri olarak da adlandırılmaktadırlar. Yabancı ve zararlı cisimlere karşı vücut müdafasındaki faaliyetlerini stoplazmalarından salgıladıkları ve bu cisimleri eritebilen sitolik maddeler vasıtasıyla sağlarlar. Ayrıca patalojik hallerde, örneğin kronik iltihaplarda lenfosit sayısı artabilmektedir.

b) Monosit (Monocyt):

Bütün lökositlerin % 4-6'sını teşkil etmektedirler. Büyüklükleri 14-20 mikron kadardır. Kanın en büyük hücreleridir. Şekilleri; Şekil-1.2.f'de görüldüğü gibi köşesiz ve toparlaktır. Çekirdekleri hücrenin tam merkezinde bulunmayıp hafif eksantrik duruşludur. Ekseriyetle, fasulye veya böbrek biçimindedir.

Monositlerin vazifesi, özellikle organizmayı yabancı cisimlere karşı fagosite ederek korumaktır.

B) Polimorf Çekirdekli (Polynuclear) Lökositler:

Çok parçalı (Polimorf) çekirdekli lökositler de, içerdikleri granulaların (taneciklerin) ve çekirdeklerinin özelliklerine göre üçe ayrılırlar:

- a) Nötrofil lökosit,
- b) Eozinofil lökosit,
- c) Bazofil lökosit.

a) Nötrofil lökosit (Neutrophil leucocyt):

Kanın renksiz hücrelerinin (lökositlerinin) % 70' ini teşkil etmektedirler. Büyüklükleri 10-12 mikron kadardır. Çekirdekleri; yuvarlak, at nalı, böbrek, S harfi şeklinde toplu veya parçalı olabilmektedir. Parçalarının sayısı ise 2,-3,4,5 veya daha fazla gelebilir. Genel olarak az parçalı ve basit oluşu, hücrenin gençliğine delalet etmektedir. Şekil-1.2.a'da bir nötrofil hücrenin morfolojik yapısı görülmektedir. Hastalık amillerine ve diğer yabancı cisimlere karşı müdafada mesela iltihaplarda, ilk aktif faaliyete geçen hücreler nötrofil hücreleridir.

Pnömoni, çiçek, difteri, kızıl ve yılançık hastalıkları ile birlikte kanda nötrofillerin sayısının artmasına "neutrophile" denir. Malarya, tifo, grip v.s. hastalıkları ile birlikte kanda nötrofillerin sayısının azalmasına da "neutropinie" denmektedir.

b) Eozinofil Lökosit (Eosinophil leucocyt):

Bütün lökositlerin % 2-4'ünü teşkil etmektedirler. Büyüklükleri 12-14 mikron kadardır. Çekirdekleri, nötrofil lökositlerin genç şekillerinin çekirdeklerine benzemektedir; yani az parçalıdır. Şekil-1.2.b'de bir eozinofil hücresi gösterilmektedir.

Eozinofil lökositlerin sayısı, Helmentiasiste, alerjik hastalıklarda, lymphogranulomasotede artmaktadır. Bu duruma "easiraphilie" denmektedir.

c) Basofil lökosit (Basophil leucocyt):

Bütün lökositlerin % 0.5'ini teşkil etmektedirler. Büyüklükleri ortalama olarak 10 mikron kadardır. Çekirdekleri, büyük yuvarlıgımsı, soluk ve hafif toplu şekildedir. Granulaları (tanecikleri) diğer lökositlerinkinden oldukça farklıdır. Onlardaki gibi eşit büyüklükte olmayıp irili ufaklı ve muntazamdır. Şekil-1.2.c'de bir bazofil lökosit hücresinin morfolojik yapısı gösterilmektedir.

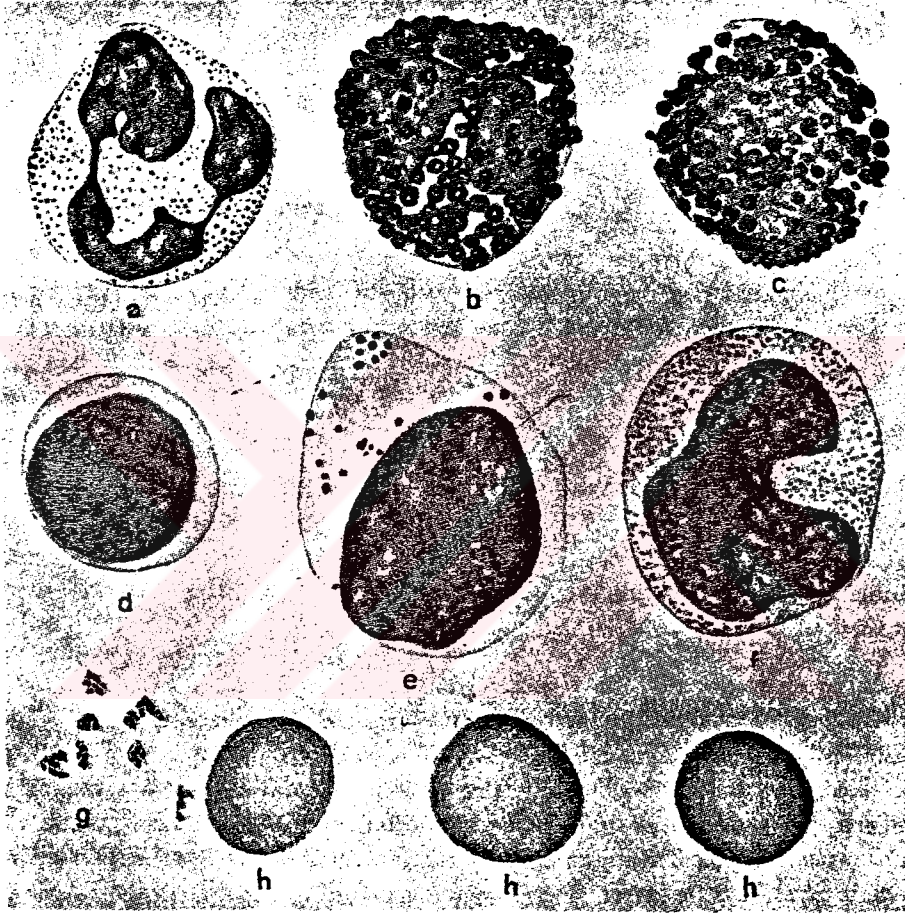
1.1.3 Kan Plaketleri (Trombositler)

Şekil- 1.2.g'de de gösterildiği gibi, yuvarlak, oval bikonveks, disk veya gayri muntazam şekiller göstermektedirler. Büyüklükleri ortalama 3 mikron kadardır. Sayıları yaklaşık olarak 250 000-900 000 (mm^3 kanda) arasında tesbit edilmiştir.

Kan plaketleri kanın pıhtılaşmasında etki edici bir bir vazife görmektedir. Buna bağlı olarak, kan plaketlerinin azaldığı vakalarda, kan koagülasyonunun da azaldığı görülmüştür. Kan plaketlerinin azalması olayına thrombopenie denir. Böyle vakalarda, dalağı çıkarınca, hastalar bazan şifa bulmaktadırlar.

1.1.4 Kan Tozları (Hemoconia)

Bunlar, toz halinde, gayet ince, hücresel olmayan elemanlardır. Genellikle nötrofil yağ damlacıklarından ibarettirler. Kan tozları beslenme durumuna göre değişmektedir. Büyüklükleri ise ortalama bir mikron kadardır.



Şekil-1.2 İnsanın kan hücreleri. Yayma preparat.

- a- Nötrofil granülosit
- b- Eozinofil granülosit
- c- Bazofil granülosit
- d- Küçük lenfosit
- e- Büyük lenfosit.
- f- Monosit.
- g- Kan plaketleri
- h- Eritrositler. [1]

Tablo 1.1 Kan Hücre sayımında bakılan değişkenler [1].

RBC :	"Red Blood Corpuscles" Milimetreküpte eritrosit sayısı (Normali:4-5.9 milyon/mm ³)
WBC :	"White Blood Cells" Milimetreküpte lökosit sayısı (Normali: 4800-10800/mm ³)
HGB :	"Hemoglobin" Desilitrede hemoglobin miktarı, gram olarak (Normali: 13-16gr/dl)
HCT :	"Hematocrit", (PCV) "Packed Cell Volume" Hematokrit; eritrositlerin plazmaya oranı, yüzde olarak (Normali:%42-50)
PLT :	"Platelet" Milimetreküpte trombosit sayısı (Normali: 250-900bin/mm ³)
MCV :	"Mean Cell Volume", Ortalama hücre hacmi; eritrositlerin ortalama hacmi. Hesaplanarak bulunur: $\frac{HCT}{RBC \times 1.000.000} = MCV$ (Normali: 84-94 femtolitre (1 femtolitre=10 ⁻¹⁵ litre))
MCH :	"Mean Cell Hemoglobin", Ortalama hücre hemoglobini; bir eritrositte bulunan ortalama hemoglobin miktarı. Hesaplanarak bulunur (Not: Katsayılar birimleri eşitlemek içindir): $\frac{HGB \times 10}{RBC \times 1.000.000} = MCH$ (Normali: 27-32 pikogram)
MCHC :	"Mean Cell Hemoglobin Concentration", Ortalama hücre hemoglobin konsantrasyonu; ortalama eritrosit hemoglobin oranı. Hesaplanarak bulunur: $\frac{HGB}{HCT} = \text{Ortalama Hücre Hgb Konsantrasyonu}$ (Normali: 33-38 gr/dl)
Formül :	Akyuvarların tiplerinin yüzde olarak belirlenmesidir. Klasik olarak mikroskopla yapılır. Bazı makinalar (CD1600 gibi) bunu otomatik olarak yapar.

BÖLÜM 2

KAN HÜCRE SAYIM YÖNTEM VE CİHAZLARININ GELİŞİMİ

2.1 Kan Hücre Sayıcılarının Tarihsel Gelişimi

Bilindiği gibi kan, hücreler, şekilli elemanlar ve plazma adı verilen bir sıvıdan oluşmaktadır. Kan hücreleri de, mikroskopik görüntülerine göre eritrosit, lökosit, (lökosit hücre grupları) ve trombosit hücreleri şeklinde incelenmektedir. Kan hücre gruplarının çeşitli özellikleri Tablo 2.1'de gösterilmektedir.

Tablo 2.1 Kan hücre gruplarının özellikleri [3].

Hücre	Hacim (fL)	Numara	Yoğunluk	Şekil	Çekirdek	Sitoplazma
RBC	80-100	$4.5 \times 10^{12}/L$	1.09-1.11	Biconcave disk	None	Hemoglobin
PLT	2-20	$2.5 \times 10^{11}/L$	1.03-1.06	Plate	None	Granular
WBC	80-200	$5.0 \times 10^9/L$	1.05-1.10	Various	Various	Various
NEUT	140-200	65% of WBC	1.08-1.10	Various	Lobed	Granular
LYMPH	30-120	25% of WBC	1.05-1.08	Round	Round	Clear
MONO	120-200	5% of WBC	1.05-1.08	Various	Round	Fine granular
BASO	140-200	1% of WBC	1.08-1.10	Various	Lobed	Granular (basic)
EO	140-200	3% of WBC	1.08-1.10	Various	Lobed	Granular (acidic)

Kan hücre sayım cihazları üzerine ilk deneme 17.y.y da Van Leeuwenhoek tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacı, bu ilk ölçüm metodunu, küçük eritrosit hücrelerinin sayılmasında kullanmıştır.

İki yüzyıl içerisinde, ölçeklenmiş saydam bir kap içerisindeki kan hücrelerinin genel mikroskop teknikleri

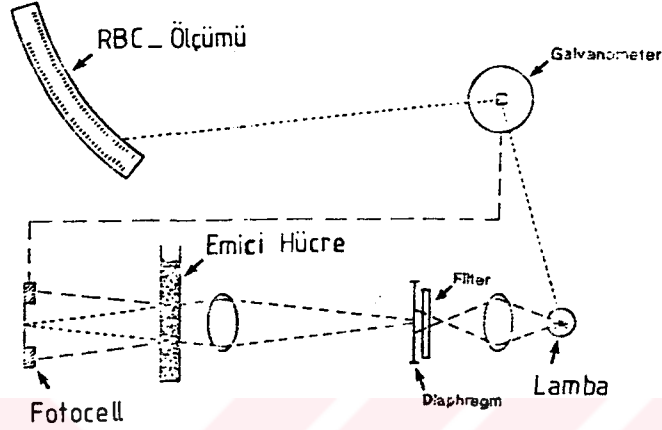
ile ölçümleri sayesinde, mikroskop ve " kan hücre sayım odacıklarında " büyük gelişmeler elde edilmiştir. Ayrıca 19. y.y'da sayımdan önce kan örneğinin sulandırılmasına dayanan teknikler de " kan hücre sayım odacıklarının "serbest olarak dizayn edilmesine olanak vermiştir. Örneğin, cam korumaya sahip, içerisinde sulandırılmış kan örneği bulunan dikdörtgen şeklindeki " kan hücre sayım odacığı" Burker tarafından gerçekleştirilmiştir. Buna bağlı olarak da daha hassas kan hücre sayım sonuçları elde edilmiştir.

20.Y.Y'da, elektronik ve optoelektronikteki olumlu gelişmelerle, kan hücre sayımlarında önemli aşamalar kaydedilmiştir. 1934 yılında Moldovan [2], sulandırılmış eritrosit süspansiyonunun bir fotoelektrik cihaz tarafından ölçülmesine dayanan elektriksel ölçüm metodunu geliştirmiştir. Ancak, fotoelektrik cihazında oluşan birtakım eksikliklerden dolayı eritrosit sayımlarında yeterli başarı elde edilememiştir.

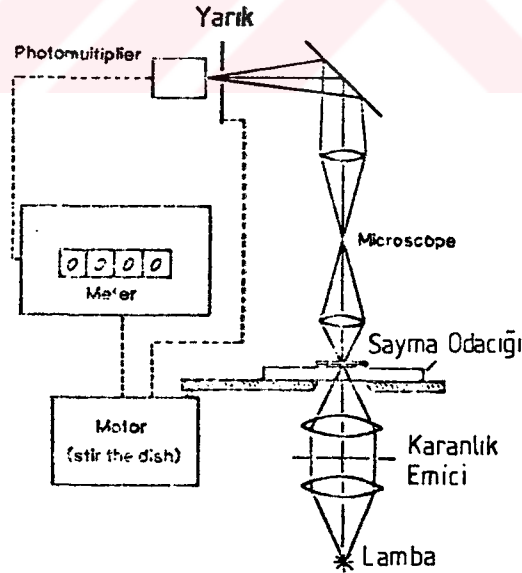
1945'li yıllarda gerçekleştirilen bir metod ile, kandaki eritrositlerin konsantrasyonunu turbidometri kullanarak ölçmek mümkün olmuştur [3]. Bu metodun geliştirilmesi ile Şekil-2.1'de gösterilen cihaz gerçekleştirilmiştir. Burada, kan hücrelerinin özellikle eritrositlerin konsantrasyonlarıyla orantılı olarak oluşturulan ışık saçınımı, bir fotodedektörde toplanmaktadır. Bu fotodedektör çıkışı da, toplanan ışık yoğunluğuna bağlı olarak, üzerinde eritrosit skalası bulunan bir galvanometreyi hareket ettirmektedir. Böylece, belirli bir kan süspansiyonunda bulunan eritrosit hücrelerini kolayca saymak mümkün olmuştur.

Aynı on yıl içerisinde, ince bir tabaka sulandırılmış kan örneğinin eritrositleri, bir fotoelektrik tarama yöntemi ile sayılabilmektedir. [3] Bu prensip ile ölçüm yapan "Casella Sayıcısı" Şekil-2.2'de gösterilmektedir.

Bu yöntem ile, hücrelerin konsantrasyonlarına bağlı olarak oluşan ışık saçılımını bir fotodedektörde toplanmaktadır. Aynı anda, bir motor ünitesi tarafından sürülen ölçüm sistemi de, fotodedektörün çıkışına göre hücre sayısını vermektedir.



Şekil-2.1 Kleine'nin ışık saçılımı metodunu kullanan cihazın şematik diyagramı [3].



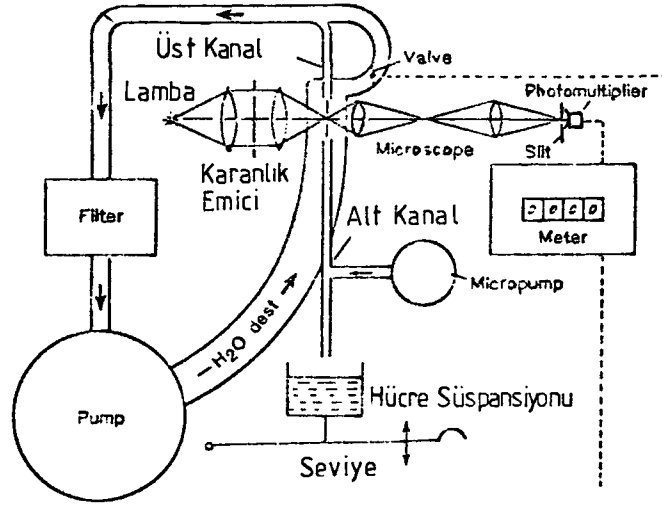
Şekil-2.2 " Casella Sayıcısı " [3].

Daha sonraki yıllarda, noktasal tarama yöntemine dayanan çeşitli cihazlar geliştirilmiştir. Yine bu amaçla hücre şekillerinin düzensizliğinden ve hücrelerin üst üste binmelerinden dolayı oluşan hataları azaltmak için de çeşitli önlemler alınmıştır.

1953 yılında [3], ince bir sıvı akışı içerisinde bulunan kan hücrelerinin sayılması amacıyla, bu hücrelerin optikal dedeksiyon sistemine sürüklenmesi prensibine dayanan bir metod geliştirilmiştir. Bu metod sayesinde, hücrelerin üst üste binmeleri önlenerek daha kolay sayılabilmeleri sağlanmıştır. Bu şekilde gerçekleştirilen bir "EEL Sayıcısı" Şekil-2.3'de gösterilmektedir. Sistemde hücre süspansiyonu, motor pompası ve valve ünitesi ile optikal ölçüm kısmına ulaştırılmaktadır.

1956 yılında, "Coulter" otomatik kan hücre sayım cihazı gerçekleştirilmiştir. Bu cihazda, bir elektrolit süspansiyonu içerisinde yer alan hücreler, ince bir safir üzerindeki deliğin içerisinde ve çevresinde bulunan elektriksel alandan geçirilmektedir. Bu çok ufak deliğin içerisinde ve çevresinde bulunan elektriksel alan, cihazın dedeksiyon kısmını oluşturmaktadır. Böylece geliştirilen bu cihaz, günümüzde kullanılan en modern kan hücre sayım cihazları için de temel oluşturmuştur.

Ayrıca, kan hücre sayım cihazlarında elde edilen gelişmeler yanında, kan hücrelerinin büyüklüklerini belirlemek amacıyla de çeşitli çalışmalar yapılmış ve aşamalar kaydedilmiştir. Hücre büyüklüklerinin ölçümü üzerine ilk çalışma "Leeuwenhoek" tarafından yapılmıştır. Bu amaçla, hücrelerin büyüklüğünün ölçülmesini sağlayan mikroskop geliştirilmiştir.



Şekil-2.3 Fotoelektrik hücre sayım yöntemini kullanan "EEL" sayıcısının şematik diyagramı [3].

20.Y.Y.'ın ilk yarısında, kana uygulanan santrifüj metodları sayesinde " Hematokrit " ölçümü başarılmıştır. " Hematokrit " (Packed Red Cell Volume = PCV) ya da diğer bir adıyla toplu kırmızı hücre hacmi, ortalama hücre büyüklüğünün belirlenmesine yarayan önemli bir parametredir. Eritrosit hücrelerinin, hematokrit ve hemoglobin parametrelerinin ölçümleri sayesinde, hücre büyüklük ve parametreleri kolayca hesaplanabilmektedir. Bu büyüklük parametreleri; ortalama hücre hacmi (MCV = Mean Cell Volume), ortalama hücre hemoglobini (MCH = Mean Cell Hemoglobin), ortalama hücre hemoglobin konsantrasyonu (MCHC = Mean Cell Hemoglobin Concentration) parametreleridir.

20.Y.Y.'ın ortalarında, geliştirilen " Coulter " metodu sayesinde, hücre hacmi ile orantılı büyüklükteki elektriksel işaretleri dedekte eden sistemler oluşturularak, çeşitli büyüklükteki kan hücrelerini saymak mümkün olmuştur. Ayrıca, son üç yılda fotoelektrik hücre sayma sistemlerinde

de çok önemli aşamalar kaydedilmiştir.

$$\text{MCV (fL)} = \frac{\text{HCT (Toplu Kırmızı Hücre Hacmi) (\%)}}{\text{RBC (Kırmızı Hücre Sayısı) (hücre /lt.)}}$$

$$\text{MCH (pikogr.)} = \frac{\text{Kan HGB (Hemoglobin) Konsantrasyonu (gr./lt.)}}{\text{RBC (Kırmızı Hücre Sayısı) (hücre /lt.)}} \quad (2.1)$$

$$\text{MCHC (gr./lt.)} = \frac{\text{Kan HGB (Hemoglobin) Konsantrasyonu (gr./lt.)}}{\text{HCT (Toplu Kırmızı Hücre Hacmi) (\%)}}$$

2.2. Hücre Sayma Teorisi ve Teknolojisi

2.2.1 Problemin Tanımı

Hücre sayımı, kavramsal olarak düşünüldüğünde basit bir işlemdir. Pratik olarak, kan hücreleri ile tüm kanın özellikleri ve sayıları, bu kavramsal olayın doğru olarak gerçekleştirilmesini sağlamaktadır. Ancak, bu işlem gerçekleştirilirken çeşitli problemlerle de karşılaşılabilir. En belirgin problemlerden birkaçı aşağıda verilmiştir;

1- Kan, sabit olmayan viskoziteli, bir sıvıdır. Bu yüzden, hücrelerin sıvıya oranını değiştirmeden kan transferi yapmak oldukça zor bir işlemdir.

2- Rutin bir kan hacimi içersindeki çok sayıda kan hücresi, hem çok doğru bir dilüsyon (seyreltme), hem de çok küçük bir dedekte etme (sayma) elemanı veya odacığı gerektirmektedir.

3- Kan hücreleri, genel olarak, serumdan daha yoğundur.

Bu durum, analiz için homojen bir süspansiyon hazırlama ve incelemede çeşitli problemler yaratabilmektedir.

4- Kan hücreleri ebat olarak oldukça küçük parçacıklardır. Bu nedenle, dedektörlerin hücreleri rastgele gürültüden ayırması oldukça zor olabilmektedir.

5- Hücre grupları arasındaki büyüklük farkları genelde ufaktır. Bu yüzden, hücre grupları arasındaki ayırımı tam ve doğru olarak yapabilmek için karmaşık algoritmalar ve programlar gerçekleştirilmelidir.

Kan hücrelerini ayırık olarak daha kolay sayabilmek amacıyla, kan örneğinin sayılmadan önce sulandırılması gerekmektedir. Farklı kan hücre tipleri ve konsantrasyonları için farklı sulandırma faktörleri kullanarak, değişik sulandırmalar yapılmaktadır. Bu amaçla da, kullanılan kan hücre sayım cihazlarına bağlı olarak çeşitli sulandırma teknikleri geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları, el pipet yöntemi, yarı otomatik ve tam otomatik sulandırma yöntemleridir.

2.2.2 Kan Hücre Dedeksiyon Yöntemleri

Kan hücre sayıcılarının temelini dedektörler oluşturmaktadır. Bu amaca uygun olarak günümüzde kullanılan iki farklı kan hücre sayım teknolojisi, elektriksel ve optik olarak yapılan dedeksiyon işlemidir. Birincisi, iletken bir sıvı ile dolu olan ölçüm tüpünde bulunan kan hücreleri tarafından oluşturulan direnç değişiklikleri esas alınarak yapılmaktadır. İkincisi ise, kan hücrelerinin çeşitli ışık yoğunluklarında oluşturduğu değişikliklere karşı düşen bir fotodedektör yardımıyla yapılmaktadır. Bu metodları

aşağıdaki şekillerde inceleyebiliriz:

1- Elektriksel Metod (Delik Direnci Metodu):

Şekil-2.4'de böyle bir ölçüm metodu şematik olarak gösterilmektedir. Elektrolit içerisinde bulunan kan hücreleri, bir yalıtıcıda bulunan ufak bir delik boyunca hareket ederek geçmektedirler. Sistemin elektrodları deliğin iki yanına, geniş bir elektrolit banyosuna yerleştirilmiştir. Kurulan bu sisteme de " Ohm Direnç Kanunu " uygulanmıştır. Delikte bulunan veya delikten geçen herhangi bir hücrenin olmadığını düşünecek olursak, deliğin direnci,

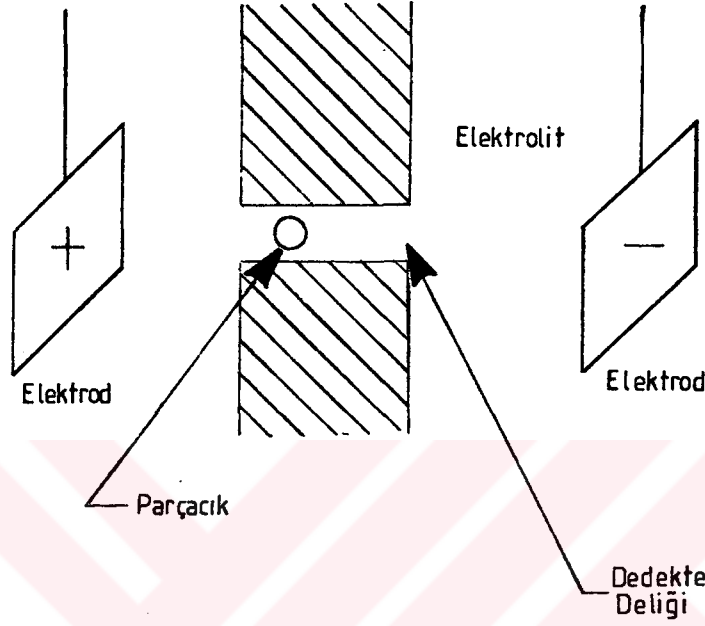
$$R = V/I = \rho(l/a) \quad (2.2)$$

formülü ile hesaplanmaktadır. V iki elektrot arasındaki gerilimi, I delikten akan akımı R deliğin direncini, ρ elektrolitin öz direncini, l deliğin uzunluğunu ve a da karşılıklı delik bölgesinin alanını göstermektedir. [3]

Elektrolitten daha yüksek direnç özelliğine sahip olan küçük bir parçacık(kan hücresi) delikten geçerken, deliğin sabit olan direncinde değişikliğe neden olmaktadır. Değişen bu direnç ise, aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanabilmektedir.

$$R = \frac{\Delta I}{V} = K \sqrt{\left(1 + \frac{4}{5}x + \frac{843}{1120}x^2 \dots \dots \dots \right)} \quad (2.3)$$

ΔI akan sabit akımda oluşan değişme miktarını, K parçacığın hacimi tarafından bölünen deliğin direncini, V hücre ya da parçacığın hacmini, X ise parçacığın karşılıklı kenarlarının deliğin karşılıklı kenarlarına oranı göstermektedir.



Şekil-2.4 Elektriksel direnç metodunun şematik diyagramı [3].

Ölçüm deliğinin çapı, hücrelerin büyüklüklerine bağlı olarak seçilmektedir. Örneğin, deliğin çapını 50 mikrometre seçtiğimiz takdirde, 10fL.'den-140fL.'ye kadar olan hacimdeki hücreler bu dedeksiyon sisteminde sayılabilmektedir. (femtolitre = 10^{-15} litre)

Zamanla, deliği, içinde akım yoğunluğu üniform(düzgün) olan silindirik şekilde düşünerek de gerçek bir model geliştirilmiştir. Ancak, bu düşünce tam olarak kesinlik kazanamamıştır. Çünkü, delik boyunca akım yoğunluğu her zaman uniform

kalmamaktadır. Deliğin merkezindeki akım yoğunluğu, deliğin kenarlarında ve çıkışındaki akım yoğunluğundan daha yüksek olabilmektedir. Böylece, deliğe eğik şekilde yaklaşan ve geçen hücreler, merkez boyunca geçen hücrelerden daha yavaş hareket ederler. Bunun sonucu olarak da daha kolay bir sayım işlemi gerçekleştirilmiş olur. Görüldüğü gibi delik yanları ve duvarlarına yakın olarak geçen hücre ya da parçacıklar problemlere neden olmamaktadır.

Ayrıca, yukarıda bahsedilen problemi çözmenin iki tane pratik yöntemi vardır. Birincisi; dedekte edilen elektriksel işaretleri (hücrelere karşı düşen) daha sonra elektronik devre yardımıyla düzeltmektir. Bu mümkün olan bir tekniktir. Çünkü, yatay yol almayan hücreler, yatay yol alanlara göre deliğin etkili dedekte etme bölgesinde daha fazla zaman kalabilmektedir. Yıllardır kullanılan bu teknik sayesinde, elektronik düzeltme devreleri yukarıda bahsedilen farklılığı tanıma yeteneğine sahiptir olmuştur.. Bunun sonucu olarak da, tipik olmayan işaretleri atarak düzeltme işlemini gerçekleştirirler. İkinci yöntem ise, deliğin merkezinde oluşturulan hidrodinamik çözüm yöntemidir. (Kılıf Akışı)

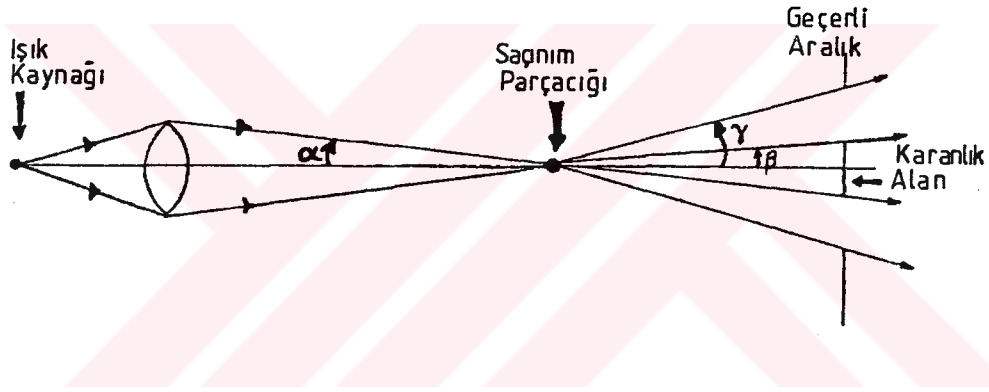
Elektriksel direnç metoduna dayanan kan hücre sayıcıları 2.2.3'de geniş şekilde anlatılmaktadır.

2- Optik Ölçüm Metodu:

Genel bir ifade ile, hücrelerin ölçülmesini sağlayan ışık saçınımı metodudur. Böyle bir metodu anlatan şematik diyagram Şekil-2.5'de gösterilmektedir. [3]

λ dalga boyuna sahip, n_0 kırılma katsayılı elektromagnetik dalga; hacim, şekil ve n_p kırılma katsayısı ile karakterize edilen hücreler üzerinde etkili olmaktadır. Bu etkileşim ile hücre, yoğunluğu θ saçınım açısı ile değişen dalgalar üretmektedir. Böylece γ - β açıları arasında kalan saçınım dalgaları dedekte edilmektedir.

Bilindiği gibi, elektromagnetik saçınım teorisi, homojen küre şeklindeki parçacıklar için de geliştirilmiştir. Buna bağlı olarak da hücre büyüklüklerine bağlı saçınım farkları eğrileri Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



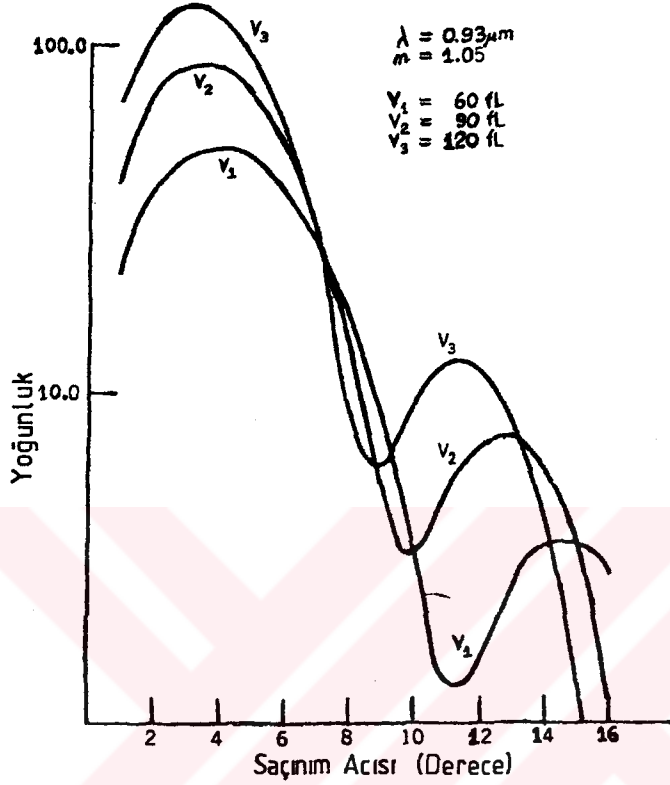
Şekil-2.5 Optik ölçüm sistemi şematik diyagramı [3].

Optik ölçüm metoduna dayanan kan hücre sayıcıları 2.2.4'de tüm yönleriyle anlatılmaktadır.

2.2.3 Elektriksel Direnç Prensibine Dayanan Kan Hücre Sayıcıları

Günümüzde, Gulati, Hyun ve Ashton'a göre, "Coulter Electronics", "Baker Instruments", "TOA Medical

Electronics", "SEQUOIA TURNER", "Clay-Adams", "Mallinckrodt" ve "Angel Engeneering" tarafından üretilen kan sayıcıları elektriksel direnç prensibine göre sayım yapmaktadır. [4]



Şekil-2.6 Kırmızı kan hücreleri referans alınarak hazırlanmış saçınım farkları eğrileri. λ = Dalga boyu, m = Hücrelerin dilüsyona oranı, $V_1 - V_3$ = Hücre hacimleridir [3].

Elektriksel direnç ölçümüne dayanan kan hücre sayıcıları, kan hücrelerinin sahip olduğu elektriksel direnciyle ilişkili kullanımından yararlanmaktadırlar. Bu yüksek hücresel direnç, yüksek iletkenliğe (düşük direnç) sahip olan dilüsyonun, kan örneği ile dikkatli şekilde karıştırılması ile azaltılabilmektedir. Daha sonra bu sulandırılmış kan örneği, tek bir akış odacığına (dedekte etme kısmına) gönderilmektedir. Bu akış odacığı, hücrelerin tek tek sayılabilirlerini sağlayan bir de ölçüm deliğine sahiptir. Aynı

zamanda, bu ölçüm odacığının (akış odacığı) yanlarında, oluşan elektriksel direncin ölçülmesini sağlayan platin elektrodlar da bulunmaktadır. Şekil-2.7'de böyle bir ölçüm sistemi gösterilmektedir. Burada görülen sistem üç ana kısımdan oluşmaktadır:

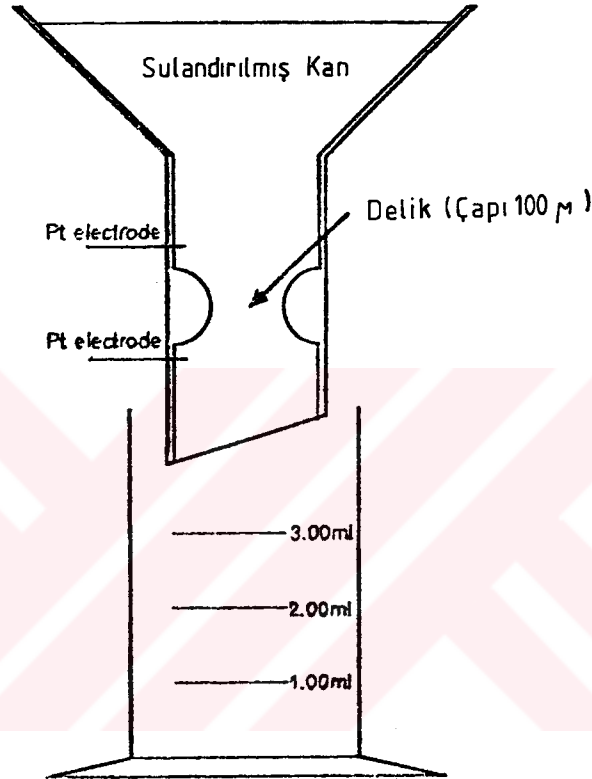
- 1- İçinde sulandırılmış kan örneği bulunan bir rezervuar,
- 2- İki elektrot arasında, ölçüm deliği bulunan yüksek iletkenli sayım odacığı,
- 3- Sulandırılmış kan hacmini ölçen silindirik bir kap.

Sulandırılmış kan örneğine ait olan kan hücreleri delikten belirli bir zamanda geçerler. Bu geçiş sırasında, elektrolit direncinden daha büyük bir dirence sahip olan kan hücreleri, işgal etkileri hacim ile orantılı olarak direnç değişimine neden olurlar. Hücre geçtikten sonra da sabit akımın akışı devam ederek, direnç değeri ilk konuma dönmüş olur. Bu arada, direnç değişimleri, her iki yanda bulunan elektrodlarla da gerilim değişimlerine dönüşür. Herbir hücreye karşılık düşen bu değişimler, elektronik sayım devresine gönderilerek, kan hücre sayım işlemi gerçekleştirilmiş olur. Sonuç da Litre/Cells olarak verilir.

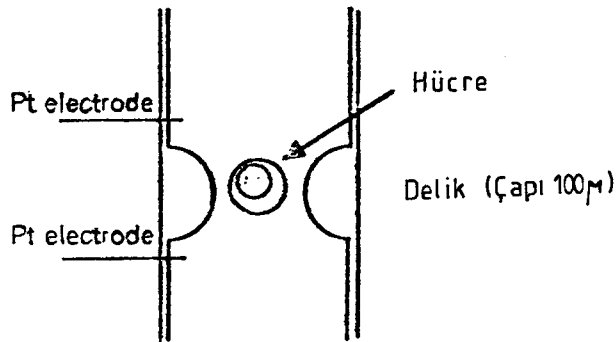
En iyi sonuçları elde edebilmek için, aynı anda iki veya daha fazla hücrenin de delikten geçebileceğini göz önüne almak gerekir. Bu rastlantı durumunu (aynı anda iki ya da daha fazla hücre geçişi) yok etmek amacıyla, istatistiksel düzeltme işlemi yapılabilmektedir. Coulter'in "ZBI sayıcılarına " uygulanan düzeltme eğrileri grafiği Şekil-2.9 'da gösterilmektedir [4].

Kan hücre grupları, büyüklük ve hacim olarak birbirlerinden farklı oldukları için, farklı büyüklükte direnç değişikliklerine neden olmaktadır. Böylece, her hücre

grubuna karşılık düşen elektriksel işaretin genliği birbirinden farklı olmuş olur. "İşte kan sayım cihazları, diskriminatörleri (karşılaştırıcıları) vasıtası ile bu farklı genlikleri dedekte ederek, her hücre grubuna ait olan kan sayım işlemlerini gerçekleştirmiş olur.



Şekil-2.7 Elektriksel direnç prensibi ile ölçüm yapan basit bir sayım sistemi [4].



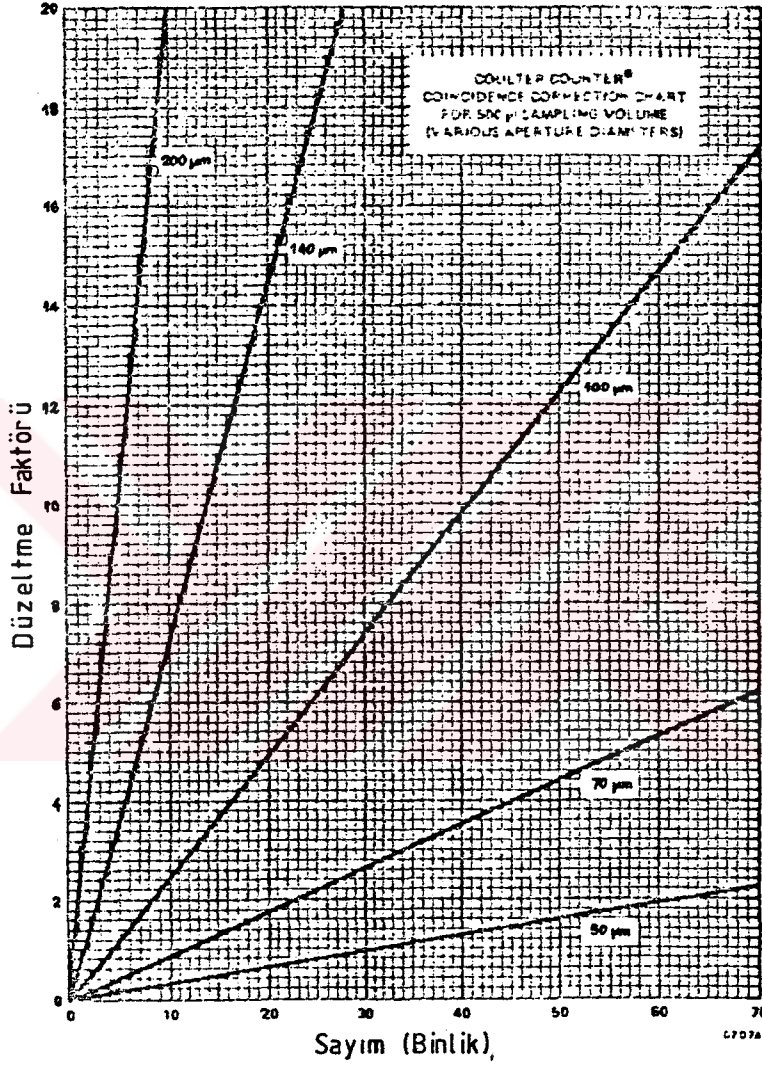
Şekil-2.8 Hücrelerin geçişini sağlayan ölçüm deliği [4].

içerisine, diğeri ise, sulandırılmış kan hücreleri içeren kabın içerisine yerleştirilmiştir. Böylece, iki elektrod arasında sıvının iletkenliğine bağlı olarak sabit elekt-triksel bir akım oluşturulmuştur. Basınç farklılıklarına bağlı olarak, ölçüm deliğinden geçmekte olan kan hücreleri, sıvı iletkenliğine sahip olan elektrolit hacimlerini işgal ederek çeşitli direnç değişmelerinin oluşmasına neden olmaktadır. Sistem tarafından dedekte edilen bu ani direnç değişmeleri; bunları oluşturan hücrelerin büyüklükleri ile orantılı olarak gerilim (genlik) değerlerine çevrilir ve kuvvetlendirilirler. Kuvvetlendirilen bu işaretler, belirli büyüklükteki hücreleri saymak amacıyla ayarlanan eşik devrelerine (diskriminatörler) gönderilir. Bu eşik devreleri aynı zamanda sistemde bulunan bir gürültüyü yok etmek amacıyla de kullanılmaktadır. Diskriminatörlerin alt seviyesi, sayılacak pulsun aşabileceği bir gerilim seviyesine ayarlanır. Üst eşik seviyesi ise, belirli bir seviyeye kadar olan işaretlerin sayılabilmelerini sağlayacak şekilde ayarlanmaktadır. Böylece, belirli bir eşik seviyesini aşan işaretler tekrar kuvvetlendirilerek digital işaret işleme ünitelerine gönderilir. Sonuç olarak da, sayım işlemi bu ünitelerde yapılarak tamamlanmış olur.

Şekil 2.10'da gösterilen sistemde, sulandırılmış kan süspansiyonu, ölçüm deliğine civa manometresi yardımıyla emilmektedir. Bu manometre, A ve B noktalarında bulunan iki adet kontakt teline, cam bir tüp vasıtası ile bağlanmıştır. Monometrede bulunan civa yardımı ile A noktasında bir kontakt oluştuğunda sayım işlemi otomatik olarak başlamış olmaktadır. B noktası ise, ölçüm deliğinden tam olarak 0.5 ml. kan süspansiyonu geçtiği zaman, tekrar oluşan kontakt ile sayım işlemini durdurmaktadır. Böylece, sabit bir kan süspansiyon hacmi içerisindeki kan hücrelerinin tam bir sayımı gerçekleştirilmiş olmaktadır [4].

2.2.3.1 Coulter Sayıcıları

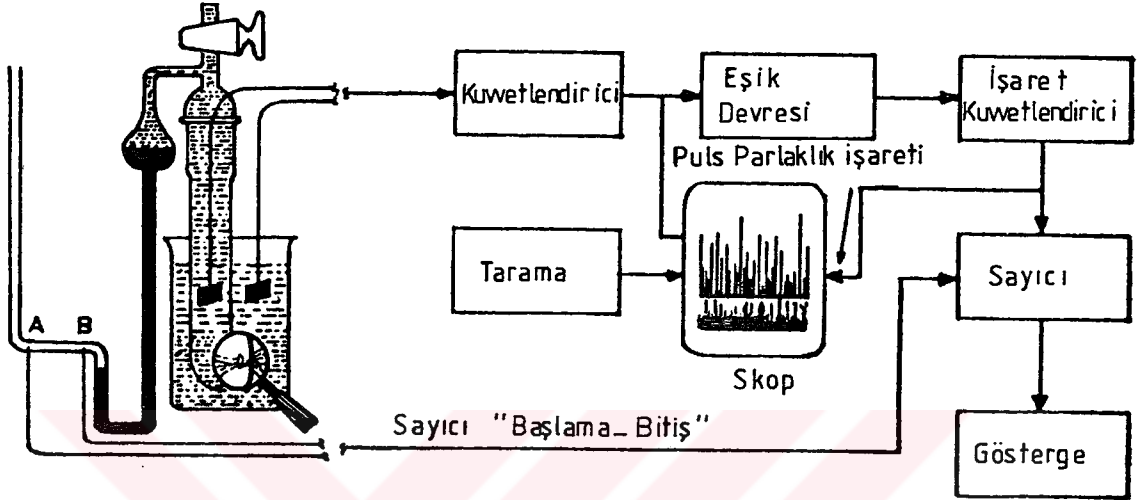
"Coulter sayıcıları" günümüzde, hastahane ve kliniklerde yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil-2.9. "Coulter Electronics" düzeltme eğrileri grafiği [4].

Şekil-2.10 "Coulter sayıcılarının" genel prensiplerini açık biçimde göstermektedir. Sistemde kullanılan iki elektrottan biri üzerinde ölçüm deliği bulunan tüpün

Ayrıca, " Coulter sayıcıları " , deliğin tıkanması gibi ani şekilde oluşabilecek fonksiyonları, sayım esnasında kontrol etmek ve görüntülemek amacıyla, bir skop sistemi-ne de sahiptir. Yine bu sistem sayesinde, hücre büyüklük de-ğişimleri ve performanans kontrolleri de yapılmaktadır.



Şekil-2.10 "Coulter Sayıcılarının" prensip blok diyagramı [4].

2.2.3.2 Model S-Plus Tipi Coulter Sayıcıları

"Model S-plus" Coulter sayıcıları, Coulter tipi sayıcıların en son ve en gelişmiş modellerinden biridir. Genellikle, kırmızı hücre sayımı, beyaz hücre sayımı, hematokrit, hemoglobin, ortalama hücre hacmi, ortalama hemoglobin konsantrasyonları hakkında oldukça doğru sonuçlar veren bir cihazdır. Bunların yanında, trombosit (platelet) sayısı, kırmızı hücre dağılım genişliği, ortalama platelet hacmi, platelekrit, platelet dağılım genişliği gibi parametreleri de ek olarak verebilmektedir. [4]

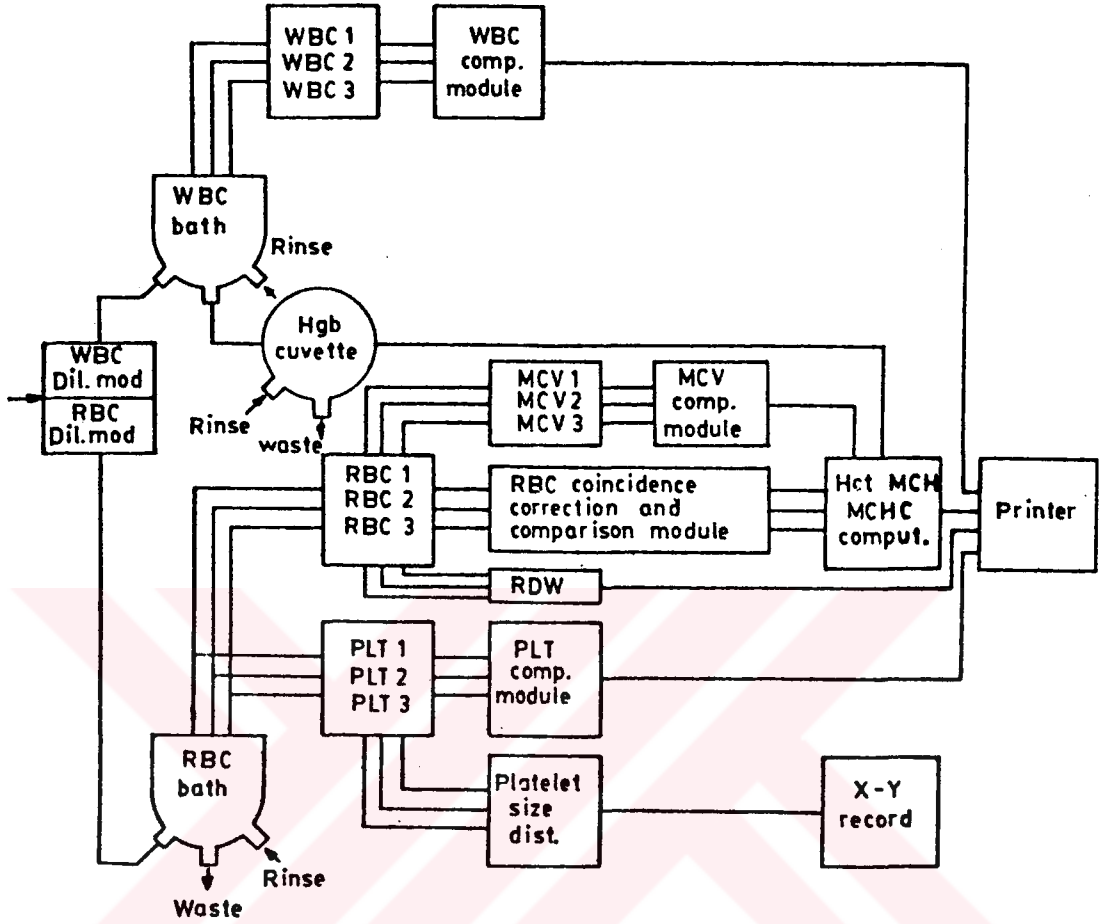
Bu cihaz tamamen mikroişlemci kontrollü olup, değişik formlardaki sayım ve büyüklükleri hafızasında saklayarak, bu değerleri daha sonra çeşitli işlemlerde kullanabilmektedir. Şekil-2.11'de bu cihaza ait bir blok diyagram gösterilmektedir. [4]

Cihazda elde edilen bütün direkt sonuçlar, üçer adet olarak ölçülerek, ortalama alınır ve göstergelerde belirtilir. Cihazın ölçülebileceği 14 parametrenin tamamı, 34-50 sn. içerisinde, 1 ml. kan örneğinden ölçülebilmektedir. Ölçülecek olan kan örneklerinin sulandırılma ve karıştırılma işlemi, cihazın mikroişlemcisi tarafından, cihazın içerisinde yer alan bir sulandırıcıda otomatik olarak yapılmaktadır. Ayrıca, cihaz görüntülenerek tüm elektronik devrelerin kontrolü ve fonksiyonların doğruluğu da tesbit edilmektedir. Elde edilen tüm ölçüm sonuçları, cihaza bağlanan özel bir yazıcı da rapor halinde alınmaktadır. Şekil 2.12'de görüldüğü gibi, ölçüm ile ilgili tüm bilgiler, tarama yoluyla elde edilen grafiklerde görüntülenmektedir [5].

2.2.3.3 Pikoscala Sayıcıları

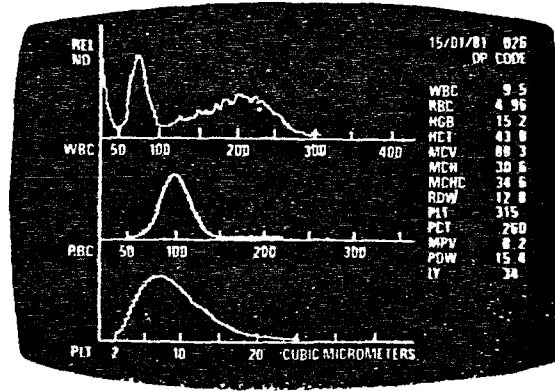
Elektriksel direnç metodunu kullanan " pikoscala sayıcılarda", civa manometresi kullanılmadığı için hacim sabitleştirmek amacıyla çeşitli problemlerle karşılaşılabilir. [5].

Bu tip cihazlar ilk defa "MEDICOR (Budapeşte)" firması tarafından başarıyla üretilmiştir. Buna bağlı olarak, eritrosit (RBC), lökosit (WBC) ve platelet (PLT) hücrelerini saymak amacıyla Şekil- 2.13'deki sistem gerçekleştirilmiştir [5].



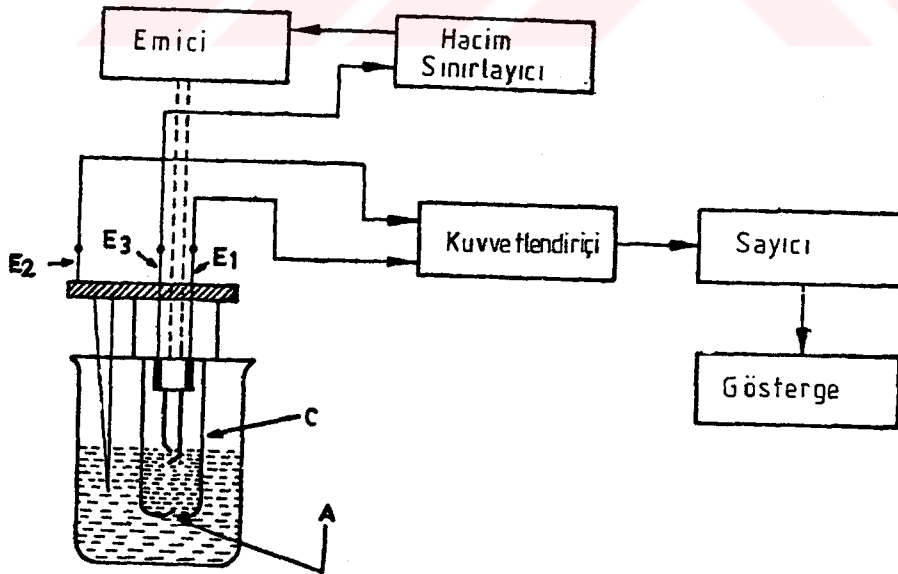
Şekil-2.11 "Model S-Plus" Coulter Sayıcısının Blok Diyagramı [4].

Şekil-2.13'de gösterildiği gibi " C " ile gösterilen ve üzerinde " A " deliği bulunan cam ölçüm tüpü, içinde kan örneği süspansiyonu bulunan kabın içerisine batırılmıştır. Kan süspansiyonunun deliğin içerisinden geçmesini sağlamak için, ölçüm deliğinin her iki yanında basınç farkı yaratılmaktadır. Bu basınç farkı, şırınga, bir röle ve çeşitli parçalardan oluşan basit mekanik bir pompa yardımı ile sağlanabilmektedir.



Şekil-2.12 Beyaz kan hücreleri (WBC), kırmızı kan hücreleri (RBC) ve plateletlerin (PLT) dağılım eğrilerinin Model S-Plus Coulter sayıcılarda gösterimi [5].

Sistemi inceleyecek olursak, E1 ve E2 elektrodları arasında sabit bir akım bulunmaktadır. Elektrolit iletkenliğinden farklı bir iletkenliğe sahip olan kan hücresi ölçüm deliğinden (A) geçtiği takdirde, deliğin direncinde ani bir



Şekil-2.13 "Pikoscola" kan hücre sayıcılarının blok diyagramı [5].

değişikliğe neden olur. Akımın sabit kalması istendiği için, bu ani direnç değişikliği bir gerilim değeri olarak dedekte edilir. Böylece, delikten geçen her bir kan hücresine karşılık olarak bir işaret genliği (puls) üretilmiş olur. Daha sonra bu işaret, yüksek kazançlı ve düşük gürültü seviyeli bir ön kuvvetlendiricide istenen seviyeye ayarlanabilir.

Kuvvetlendirici çıkışında belirli bir seviyeye getirilen işaret, karşılaştırılmak üzere sistemin diskriminatörüne gönderilir. Burada, işaretin genlik seviyesinin belirli bir eşik değerini aşıp aşmadığı kontrol edilir. Eğer işaret bu eşik değerini aşıyorsa, diskriminatör çıkışında sabit şekil ve genlikli pulslar üretilir. Daha sonra her bir kan hücresine karşılık düşen bu işaretler, işlenmek ve sayılmak amacıyla de sistemin işaret işleme ünitesine gönderilir. Sonuç olarak, kan hücre gruplarına ait sayım işlemleri burada tamamlanarak, sayım sonuçları göstergelerde belirtilir.

Kan hücre sayım cihazlarında, hazırlanan kan örneği süspansiyonunun hacmi ölçümleri direkt etkilediği için oldukça önemli olmaktadır. Şekil-2.13'deki sistemde, " C " ile gösterilen ölçüm tüpü, E3 elektrodu yardımı ile çekilen süspansiyonun hacminin sınırlandırılmasını sağlamaktır. Çekilen sıvı seviyesi, E3 elektroduna ulaştığı zaman, sıvının çekilmesini sağlayan basınç pompası, aniden vakum (emme) fazından basınç (itme) fazına geçerek süspansiyonun hacmini ayarlamaktadır. Kan hücrelerinin sayılma işlemi de basınç (itme) fazında gerçekleşmektedir. Çekilen bu kan süspansiyonu, ölçüm işlemi tamamladıktan sonra ölçüm tüpünün dışına itilerek, atılmaktadır. Kan hücre sayım işlemi başladıktan sonra durdurma işlemi de E1 elektrodu vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Çekilen sıvı seviyesi, E1 elektrodunun seviyesine düştüğü zaman, kan hücre sayımı otomatik olarak durdurulur ve cihaz tekrar sayım yapmak amacıyla " standby " konumuna getirilir.

Yapılan bütün bu işlemleri göz önüne aldığımız zaman, bütün bir kan hacminde bulunan kan hücrelerinin sayısı " N " aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanmaktadır.

$$N = H \times L \times E / V \quad (2.4)$$

(2.4) eşitliğinde;

H = Sulandırma faktörü,

L = Sayıcının skala faktörü,

V = Üzerinde ölçüm yapılacak olan hacim miktarı,

E = Dijital göstergede gösterilen sonuç değeridir.

Örneğin sulandırma faktörü 63.000 (cihazda ölçülen kırmızı kan hücresi için tipik olarak) göstergede görülen, değer 520, L = 60 ve V = 0.378 cm³ ise

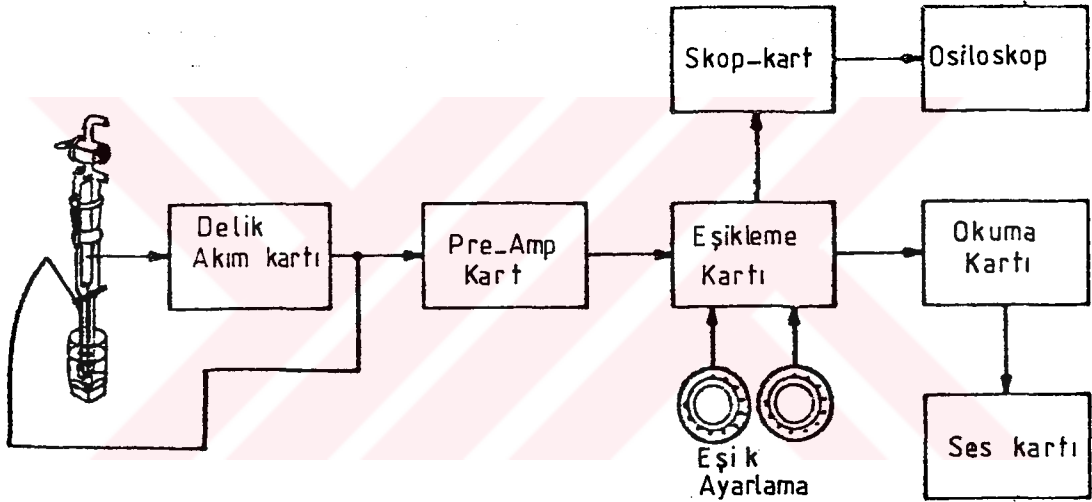
$$N = (6.3 \times 10^4) \times (60) \times (5.20 \times 10^2) / (3.78 \times 10^2) = 5.20 \times 10^6 / \text{mm}^3 \quad (2.5)$$

olarak hesaplanmaktadır. Bu sonuç da gösteriyor ki, hazırlanan kan süspansiyonunun milimetre küpünde 5.2 milyon adet kırmızı kan hücresi bulunmaktadır.

2.2.3.4 ZBI Tipi Coulter Sayıcıları

Şekil 2.14'de "ZBI tipi" Coulter sayıcılarının blok diyagramı gösterilmektedir. [5]

Sistemin ölçüm deliğinin yanlarında bulunan elektrod- lar arasında sabit bir akım akmaktadır. Hücrelerin geçişi sırasında oluşturdıkları direnç değişiklikleri, bu hücrele- re karşılık düşen işaret genlikleri olarak kuvvetlendiril- mektedir. Kuvvetlendirilen bu işaretler, eşik seviyesi is- tenen değerlere ayarlanabilen diskriminatör devresinde ay- rıştırılmaktadır. Bu arada sistemin osiloskop kısmında da, direnç değişimlerinden oluşan spike'lerin görüntülenmesi sağlanmaktadır. Sonuç olarak, ayrıştırılan bu işaretler sayım ünitesinde sayılarak, hücre gruplarına ait değerler de belirlenmiş olmaktadır.



Şekil-2.14 "ZBI Sayıcılarının" blok diyagramı [5].

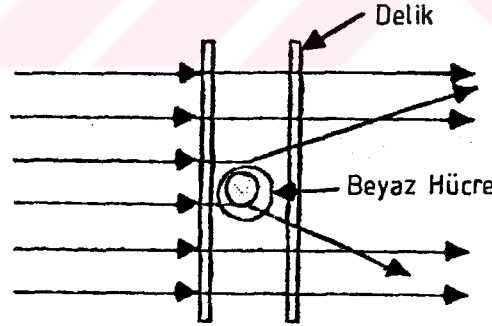
2.2.3.5 Farklı Hücre gruplarını Sayan Otomatik Coulter Sayıcıları

Bilindiği gibi, çeşitli hastalıklar kan hücre sayıla- rına çeşitli şekillerde etki etmektedir. Özellikle günümüz- de lökosit alt hücrelerinin oranlarının bilinmesi, hastalığın erken teşhisinde önemli rol oynamaktadır.

Bu amaca uygun olarak ilk defa (1974 "Coulter Sayıcı" ile birlikte kullanılan ve lökosit alt hücrelerini ayıran bir darbe yükseklik analizörü gerçekleştirilmiştir. Bu darbe yükseklik analizörü sayesinde, her bir lökosit alt hücresine karşılık düşen genlikler ayırıştırılarak, sayım işlemi gerçekleştirilmektedir. Böylece de, lökosit alt hücre gruplarının sayım ve dağılımları belirlenerek, istenen sonuçlar elde edilmiş olmaktadır [5].

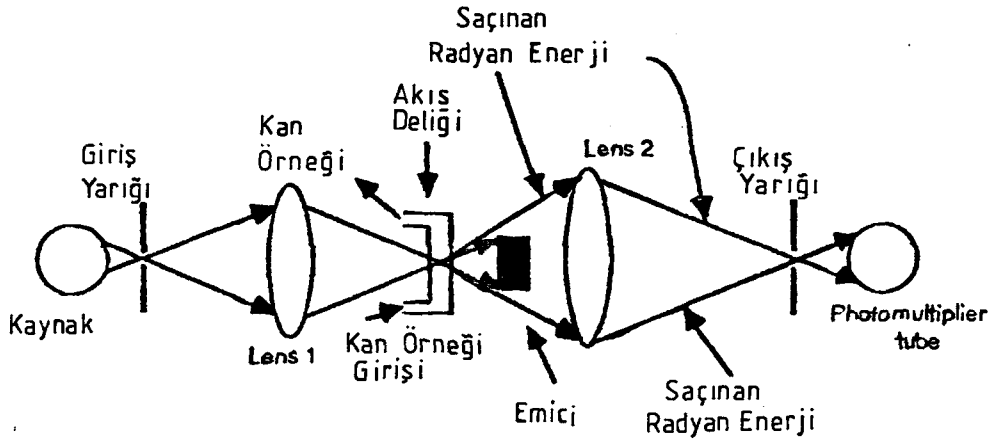
2.2.4 Optik Ölçüm Prensibine Dayanan Kan Hücre Sayıcıları

Bu tip cihazlar, günümüzde "Ortho Diagnostik Sistemler" ile "Technicon Instruments" firmaları tarafından üretilen ve elektromagnetik radyasyon saçınımı ilkesine dayanan kan sayım cihazlarıdır. Ancak, saçınım işleminin mekanizmasında birkaç ufak problemle de karşılaşilmektedir. Örneğin, saçılan enerji büyük açılı salınımlarla dağılıp gidebilmektedir. Bu durum Şekil-2.15'de açık şekilde gösterilmektedir. [6]



Şekil-2.15 Saçılan enerjinin dağılımı [6].

Ancak, kan hücrelerinin oluşturdukları düşük açılı salınımlar sayım işlemlerinde kullanılmaktadır. Şekil-2.16'da optik ölçüm sistemi gösterilmektedir [6].



Şekil-2.16 Düşük açılı ışık saçınım fotometresi [6].

Bu ölçüm sisteminde, bir ışık kaynağından gönderilen ışınlar mercek sistemi ile hücrelerin üzerine düşürülmektedir. Daha sonra, hücrelerden dolayı oluşan düşük açılı saçınımlar bir mercek sistemi ile fototoplayıcı tüpde toplanmaktadır. Bu fototoplayıcı tüpün çıkışı da, üzerinden ışık saçınımı olan hücrelerin konsantrasyonları ile yakından ilgilidir. Böyle sistemlerde genellikle, lazer ya da Tungsten kaynaklar kullanılmaktadır. Ayrıca, sistemin girişinde bulunan "giriş yarığı" da, ışının ince bir demet şeklinde geçişini sağlamaktadır.

2.2.4.1 Technicon H6000 Kan Hücre Sayıcısı

Şekil-2.16'da gösterilen ölçüm sistemini kullanan H6000 sayıcısının akış kısmı Şekil-2.17'deki gibi dizayn edilmiştir [7].

Şekil-2.17'de gösterilmekte olan akış kısmı ya da ölçüm odacığı aynı anda iki solüsyonu iletebilme özelliğine

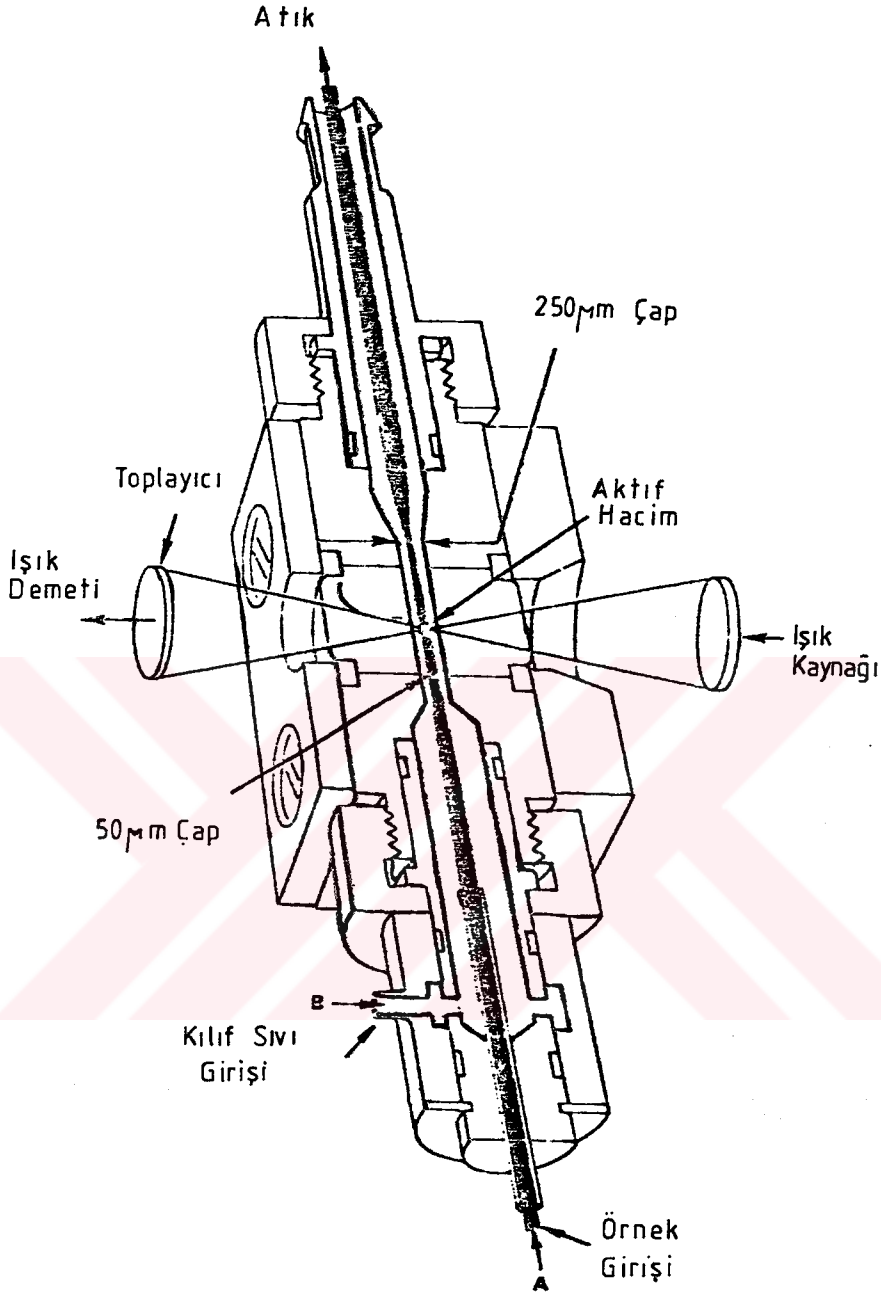
sahiptir. Kılıf sıvısı olan dilüsyon ölçüm odacığının büyük kısmı doldurmaktadır. Bu arada, sulandırılmış kan süspansiyonu, bu yoğun kılıf sıvısının merkezinden geçecek şekilde akmaktadır. Ölçüm odacığının tam merkezinde, ölçümün yapıldığı aktif bir hacim mevcuttur. Tüpün iç çapının 250 mikrometre olduğunu düşünecek olursak, bu aktif hacimin çapı da 20 mikrometredir. Ancak, bu aktif hacimin çok küçük olması nedeniyle, kırmızı kan hücreleri ve plateletler sayılabilmektedir. Beyaz kan hücreleri ise, sulandırılmış kan süspansiyonunun içersine parçalayıcı damlatıldığı taktirde sayılabilmektedir.

Kan hücrelerinin, bu aktif hacimden geçişi esnasında, Şekil-2.16 ile ilgili olarak, çeşitli ışık saçınımları oluşmaktadır. Saçınmayan ışınlar ise, karanlık kısım olarak adlandırılan absorblayıcıda bloke edilmektedir. Ayrıca saçınan ışınlar, lens 2 vasıtasıyla fototoplayıcıya iletilmektedir. Fototoplayıcı tüpün çıkış süresi ve yoğunluğu, küçük aktif hacimden geçen hücrenin karakteristiğine bağlı olmaktadır. Bu bilgiye dayanarak da, kan hücrelerini saymak ve tiplerini belirlemek kolayca gerçekleştirilmektedir.

2.2.4.2 Farklı Hücre Gruplarını Sayan Otomatik Optik Sayıcılar

Daha önce de belirtildiği gibi, lökosit alt hücre grupları gibi farklı hücre gruplarının sayılması ve belirlenmesi oldukça önemlidir.

Bu amaca uygun olarak ilk defa Miller tarafından, beyaz kan hücre (lökosit) gruplarını belirlemek amacıyla üç farklı renk geliştirilmiştir. Miller'in kullandığı bu teknik, bilgisayarda yüksek hızda üretilen ışık saçınımı



Şekil-2.17 Technicon H6000 kan hücre sayıcısının akış bölümü [7].

ile geometrik olasılık prensiplerine dayanan tanıma parametrelerinden yararlanmaktadır. Ayrıca bu teknikte, bilgisayarda odaklama yapan ve hareket edebilen bir mikroskop da

kullanılmıştır. Daha sonra, otomatik olarak hücre tanıma ve sayma işlemlerini yapan ve çok yaygın olarak kullanılan "Diff-3" sistemi geliştirilmiştir. (Perkin-Elmer, USA) [8]

"Diff-3 " sistemi kırmızı kan hücrelerini 7 önemli sınıfa, beyaz kan hücrelerini de en önemli 10 sınıfa ayırmıştır. Ayrıca sistem, platelet hücrelerini de tanıma ve sayma yeteneğine sahiptir.

" Diff-3 " sistemi, kan lekelerini mikroskop ile inceleme ve optik örnek tanıma tekniklerini kullanmaktadır. Böylece sistem oldukça doğru ve hassas ölçümler yapabilmektedir.

2.2.5 Günümüzde Kullanılan Kan Hücre Sayıcılarında Oluşabilecek Hatalar

Günümüzde kullanılan elektronik kan hücre sayım tekniklerinde birtakım problem ve hatalar ile karşılaşılabilir [9]. Bunlardan belli başlıları şunlardır.

1- Ölçüm Deliği Tıkanıklığı:

Ölçüm deliğinin kısmi olarak tıkanması, kan sayım işlemi üzerinde olumsuz yönde etki yaratmaktadır. Bu sırada, delik çapı daralmaya başlar ve buradan geçebilecek hücrelerin bir kısmı ufak çapta olduğu için sayım işlemine tabii tutulamaz. Buna bağlı olarak da zorlanmadan dolayı ölçüm süresi uzayabilir. Oluşan bu delik tıkanıklığı problemi, sistemde bulunan bir pompa yardımıyla ortadan kaldırılabilmektedir.

2- Diskriminatör Eşik Seviyesinin Belirsizliği:

Diskriminatör eşik seviyesindeki tetiklemenin belirsizliği ve eşik histerizisi, aynı büyüklükteki hücrelerin bazen sayılıp bazen atılabilmelerine neden olmaktadır. Ayrıca, kılcal ölçüm deliğinin çapının normalden büyük olması da eşik belirsizliğine neden olmaktadır. Çünkü normalden büyük bir delikten geçen küçük hücrelerin oluşturdukları direnç değişiklikleri dedekte edilememektedir.

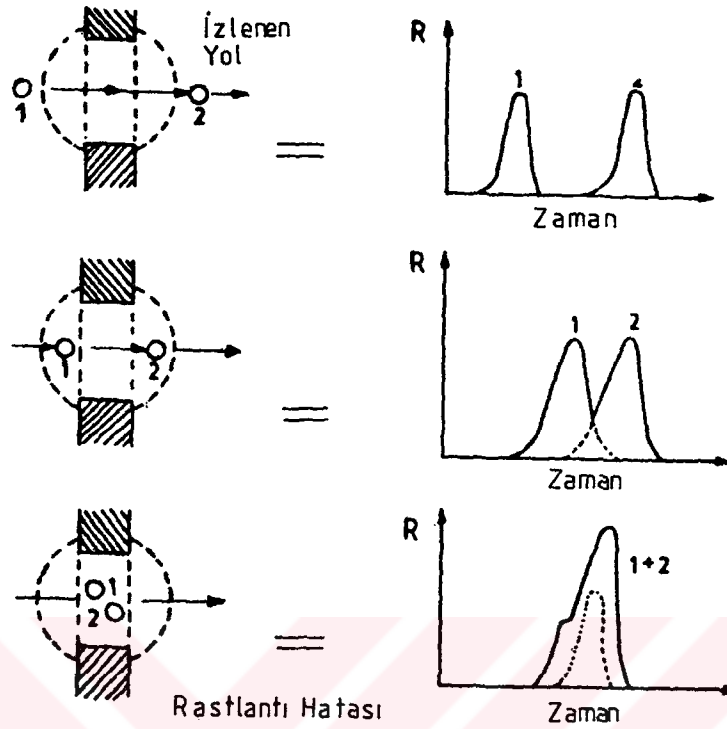
3- Raslantı Hatası:

Raslantı hatası, ölçüm deliğinden aynı anda birden fazla hücrenin geçişi sırasında meydana gelmektedir. Böyle bir durumda, cihaz normalden daha az sayıda hücre sayabilmektedir.

Böyle bir durumda cihaz, Şekil-2.18'de görüldüğü gibi, uzun tek bir plus halinde üst üste işaretler oluşturmaktadır. Bu hatayı hesaplayabilmek için de Poisson dağılımı göz önüne alınmalıdır. Raslantı kaybı ya da hatası, ölçüm deliğinin çap ve uzunluğuna, toplam ölçüm hacmindeki hücre hacmine ve sulandırma oranına bağlıdır. Bu raslantı hatasını düzeltmek amacıyla, kan hücre sayıcılarına bir elektronik düzeltme devresi eklenmektedir.

4- İstatistiksel Hata:

Belirli bir "t" zamanında dedekte edilen parçacıkların sayısını "n" olarak düşünelim. Daha sonra eklenen bir "t" zamanında, dedekte edilen parçacıkların sayısı



Şekil-2.18 Rastlantı hatası [4].

$n\pm n$ şeklindedir. Gauss dağılımını ele alacak olursak, ortalama istatistiksel hata, ölçümlerin % 67'si $n\pm n$ aralığına, % 33'ü de daha büyüğüne düşüyor demektir. Bu hatayı düzeltmek için ise, cihazda alınan ölçüm değerleri sayıcının skala faktörü ile çarpılmaktadır. Bu da bize "n" değerini vermektedir.

5- Örnek Hacmi Hatası:

Kan hücrelerinin sürekli doğru olarak ölçülebilmele-ri için, hazırlanan kan örnek hacminin oldukça doğru ve sabit olması gerekmektedir. Çünkü, bu hacim ölçüm sonuçlarına direkt olarak etki etmektedir.

6- Isı Değişikliğinden Dolayı Oluşan Hatalar:

Kan sayım cihazlarında, ölçüm elektrodları arasındaki elektrolitin iletkenliği ısıyla doğru orantılı olarak artmaktadır. Buna bağlı olarak da, ısının değişmesiyle elektrolitin direncinde oluşan azalma, ölçüm deliğinden geçen kan hücresinin oluşturduğu işaretin genliğinde de bir azalmaya neden olabilmektedir. Bu yüzden ölçüm sonuçlarının doğru olabilmesi için, elektrolitin (kan süspansiyonu) sıcaklığının sabit kalması gerekmektedir.

7- Biyolojik Faktörler:

Ölçüm deliğinden geçen ve sulandırılarak hazırlanan kan süspansiyonunda bulunan hücreler, herhangi bir deformasyona uğramış olabilirler. Ya da ölçüm sisteminde, elektriksel alanın hemoliz etkisi ve bakterilerin varlığı vuku olabilir. İşte bütün bu biyolojik faktörler sayıcılar da çeşitli hatalara neden olabilmektedirler.

8- Sulandırma Hataları:

Kan hücrelerinin ayrı ayrı, daha kolay sayılabilmesi için kan örneği sulandırılmaktadır. Belirli miktardaki kan örneği yine belirli miktardaki bir solüsyon ile karıştırılmaktadır. Bu sulandırma oranlarında oluşabilecek bir hata sonuçlara direkt olarak etki etmektedir. Bu yüzden sulandırma işlemlerinin mümkün olduğu kadar doğru yapılması gerekmektedir.

9- Dış Karışıklıklardan Doğan Hatalar:

Kan hücre sayım cihazlarının bulundukları ortamın etkilerinden dolayı doğabilecek hatalardır. Örneğin, kan hücre sayım cihazlarının elektromagnetik bir ortamda olması, sayım sonuçlarında çeşitli hatalara neden olmaktadır.



BÖLÜM 3

CELL-DYN 900 KAN ANALİZÖR CİHAZI

3.1 Sistemin Tanımı

Cell-Dyn 900 Kan analizör cihazı, belirli bir hacim içerisindeki kan hücrelerini elektronik olarak dedekte eden ve sayan bir sistem olarak dizayn edilmiştir [10].

Cell-Dyn 900 yarı otomatik ,kan analizörü aşağıdaki işlemleri yapabilecek şekilde tasarlanmıştır:

Önceden sulandırılmış tüm kan örneğinden 5 parametre ölçümü yapmaktadır;

- Kırmızı kan hücreleri sayısı (Red Blood Cell=RBC)
- Beyaz kan hücreleri sayısı (White Blood Cell=WBC)
- Platelet Sayısı (Trombosit Sayısı) (PLT)
- Hematokrit Sayısı (HCT)
- Hemoglobin Sayısı (HGB)

Sulandırılmış Platelet Zengin plazma (platelet Rich Plasma =PRP) kullanarak PLT ölçümü yapmaktadır;

- Platelet Ölçümü (PRP PLT)
(Trombosit)

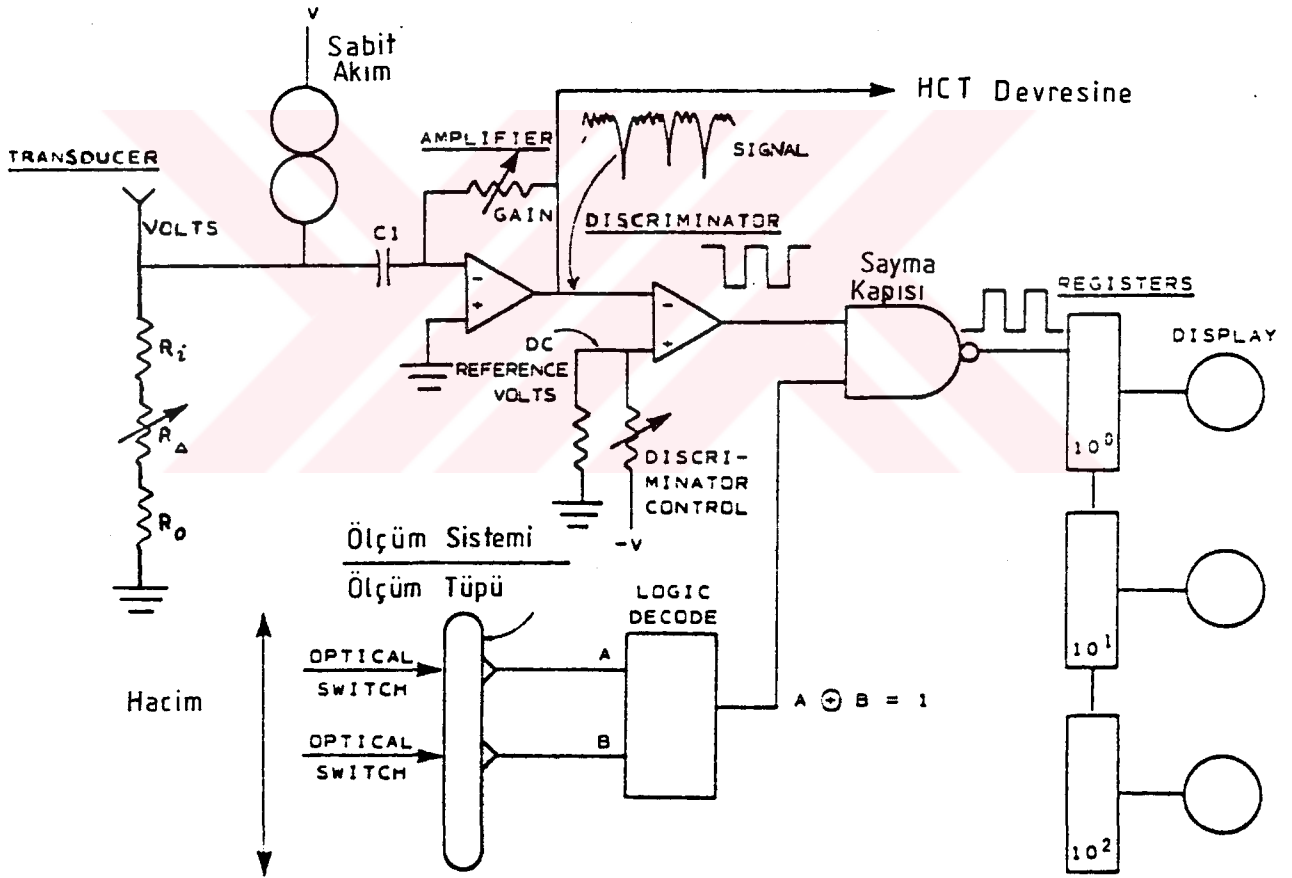
Aşağıdaki parametreleri de, cihaz ölçülen değerler yardımı ile hesaplamaktadır;

- Ortalama hücre hacmi (Mean Cell Volume = MCV)
- Ortalama hücre hemoglobini (Mean Cell Hemoglobin = MCH)

- Ortalama hücre hemoglobin konsantrasyonu (Mean Cell Hemoglobin Concentration = MCHC)

Cell-Dyn 900 cihazı, kan hücrelerini saymak ve boyutlarını belirlemek amacıyla elektronik direnç prensibinden yararlanmaktadır.

Cell-Dyn 900 cihazının basitleştirilmiş ölçüm sistemi diyagramı Şekil-3.1'de gösterilmektedir.



Şekil-3.1 Cell-Dyn 900 cihazının basitleştirilmiş ölçüm sistemi diyagramı [10].

Şekil-3.1'de de gösterildiği gibi, sistemin ana fonksiyonları aşağıdaki şekilde sıralanmaktadır:

- 1- Örnek İletimi (Akış Sistemi)
- 2- Partikül (Hücre) dedeksiyonu (Transduser Sistemi)
- 3- Partikül (Hücre) büyüklüğüne göre puls dedeksiyonu (Kuvvetlendirme)
- 4- Hücre büyüklüğüne göre eşikleme (Diskriminatör)
- 5- Partikül (Hücre) sayımı (Bilgi Kütükleri)
- 6- Örnek hacim ölçümü (Örnek Ölçüm Sistemi ve Sayma Kapısı)

3.2 Örnek Hazırlanması

Bir kan örneği içerisindeki hücrelerin, tek tek daha kolay sayılabilmeleri için, kan örneğinin sulandırılması gerekmektedir. Kan örneği sulandırılmadan ölçülecek olursa, ölçülecek hücrelerin konsantrasyonlarının oldukça yüksek olmasından dolayı, dedeksiyon kısmında iki ya da üç hücre aynı anda bulunabilmektedir. Bu durum da, bu kadar hücrenin tek bir hücre gibi sayılmasına, dolayısı ile sayım hatalarına neden olmaktadır.

Bu yüzden kan örneğini, her hücre tipine göre ayrı ve bilinen oranlarda sulandırarak, sayım işlemini çok daha doğru ve kolay yapmak mümkündür. Bu amaçla, Cell-Dyn 900 kan analizör cihazı için, sayılacak hücre tiplerine göre genel sulandırma oranları aşağıdaki gibidir;

- RBC : 1:25.000.
- WBC : 1:250
- Whole Blood PLT: 1:25.000
- PRP PLT : 1:10.000/1:25.000.

Böylece, sulandırıcılar, kan sayımlarındaki rastlantı hatalarını (aynı anda iki ya da fazla hücrenin aynı anda tek bir hücre gibi sayılması) oldukça azaltmaktadır. Cihazlarda ölçülen değerler de, sulandırma oranları bilindiği için, tüm kan değerleri ile orantılı olarak verilmektedir.

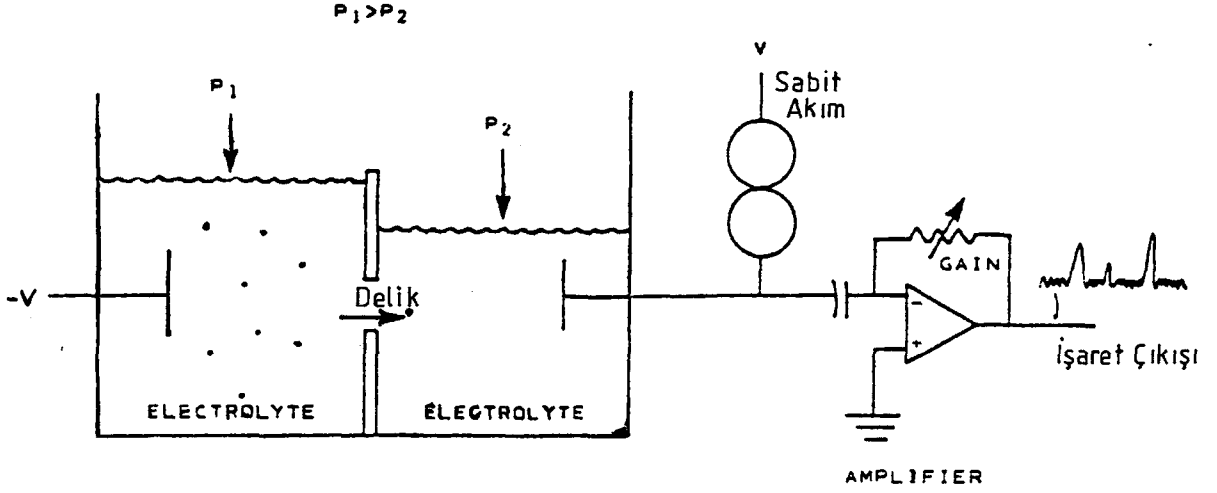
3.3 Örnek İletimi

Sistemin ya da cihazın içersinde bulunan vakum ve basınç pompa sistemi sayesinde örnek iletimi sağlanmaktadır. Bu sistem ile, kan hücrelerini içeren sulandırılmış kan örneği transduserin dedekte etme bölgesine çekilmektedir. Çekilen bu örnek ölçüm tamamlandıktan sonra ölçme tüpünden geçerek atık şişelerine atılır. Ölçüm tübü, içersinde hücreleri bulunan belirli bir hacimdeki sulandırılmış kan örneğinin ölçülmesini sağlamaktadır.

3.4. Partikül (Hücre) Dedeksiyonu

Bu amaçla, elektronik direnç prensibine göre dedeksiyon yapan transduserler kullanılmaktadır. Böylece, dedekte edilen hücrelerin fiziksel özellikleri ile ilgili olarak çeşitli elektriksel işaretler elde edilmektedir.

Şekil-3.2'de böyle bir transduserin ölçüm yöntemi açık şekilde gösterilmektedir. Hücreleri tek tek sayabilmek için, transduserin üzerinde, hücre tipine göre bilinen bir büyüklükte (çapta), bir delik bulunmaktadır. Bu delik iç ve dış elektrodlar arasında akan sabit akım sistemini ayırır. Bu sabit akımın iletimi de, transduserin içersinde bulunan elektrolit tarafından sağlanır.

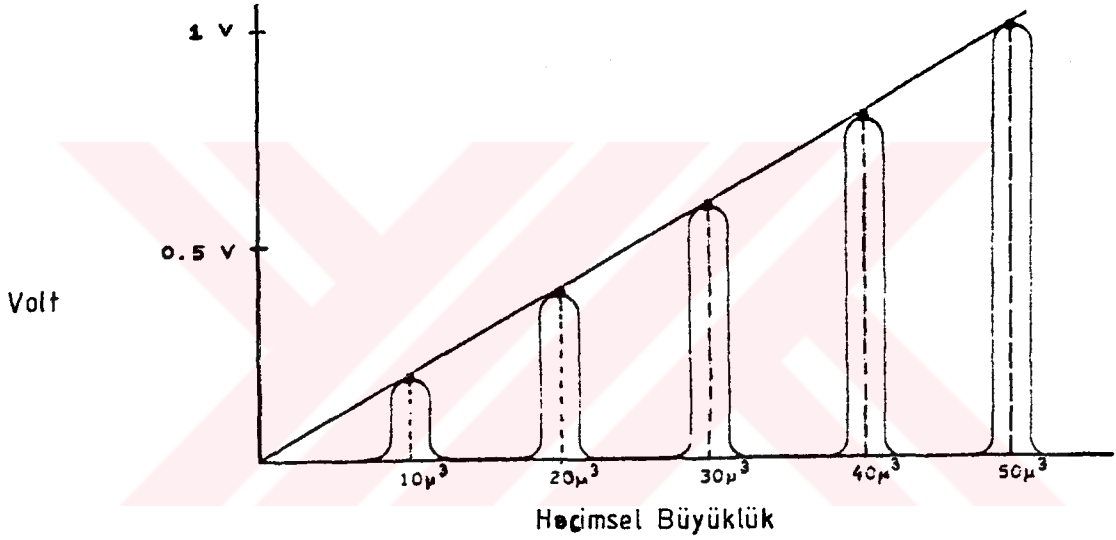


Şekil-3.2 Elektronik direnç prensibine dayanan dedeksiyon ünitesi [10].

Ayrıca, sistemdeki bu sabit akım, cihazda bulunan bir sabit akım kaynağı tarafından kaynağı desteklenmektedir. Bu delikte (ölçüm deliği) herhangi bir engel ya da partikül (hücre) bulunmadıkça sabit akımda bir değişiklik meydana gelmez ve Şekil-3.1'deki kuvvetlendirici çıkışında da herhangi bir işaret bulunamaz. Delikten geçmekte olan bir hücre ise, o anda yalıtkan vazifesi görür ve büyüklüğü ile orantılı olarak bir elektriksel direnç oluşturur. Akımın sabit olması gerektiği için, sadece gerilim değerinde bir değişiklik olur. Kuvvetlendirici girişindeki kapasitenin dolup boşalması ile de kuvvetlendirici çıkışında, delikten geçen hücrenin hacmi (büyüklüğü) ile orantılı olarak bir elektriksel işaret elde edilmiş olur.

3.5 Partikül (Hücre) Büyüklüğüne Göre Puls Dedeksiyonu

Ölçüm deliğinden bir grup halinde geçen kan hücreleri, kuvvetlendirici çıkışında bir sıra halinde elektriksel işaretler üretmektedirler. Bu kuvvetlendiricinin kalibrasyonu ortalama işaret genliği ve ortalama hücre büyüklüğü arasındaki ilişki vasıtasıyla yapılmaktadır. Bu lineer ilişki Şekil-3.3'de gösterilmektedir.



Şekil-3.3 Hücre büyüklüğünün işaret genlik cevabı [10].

3.6 Hücre Büyüklüğüne Göre Eşik Değerinin Belirlenmesi

Sayım işlemi, ancak hücrenin oluşturduğu işaretin genliği daha önce ayarlanan eşiği geçtiği anda gerçekleşmektedir. Kuvvetlendirici çıkışındaki işaret, sayılan hücrenin büyüklüğü ile orantılı olduğu için, bu eşik değeri istenen mertebelerde seçilebilmektedir. Kuvvetlendirici

çıkışı, diskriminatörün DC referans seviyesi ile karşılaştırılır. Eğer gelen işaret bu referans gerilim değeri ile aynı ya da bu değeri aşıyorsa diskriminatör çıkışı aktif duruma gelir. Şekil-3.1'de böyle bir diskriminatörün yapısı gösterilmiştir.

3.7 Hücre Sayım Kapısı

Şekil-3.1'de de gösterildiği gibi diskriminatörün çıkışı bir NAND kapısına bağlanmaktadır. Buradaki diskriminatör çıkışı, istenen büyüklükteki hücrelerin sayılarını gösterir. Ayrıca, bu sayım kapısı, ölçüm tübü (kan örnek hacmi ölçüm tübü) tarafından kontrol edilmektedir. Bu kapı sayesinde, istenen örnek hacminin geçmesi sağlanarak, sayıların kütüklerde (registerlerde) toplanması sağlanmaktadır.

Toplam sayım, bilinen örnek hacmi ile ilişkilidir ve göstericide(displayde) gösterilen sayı da örnek konsantrasyonun gösterimidir.

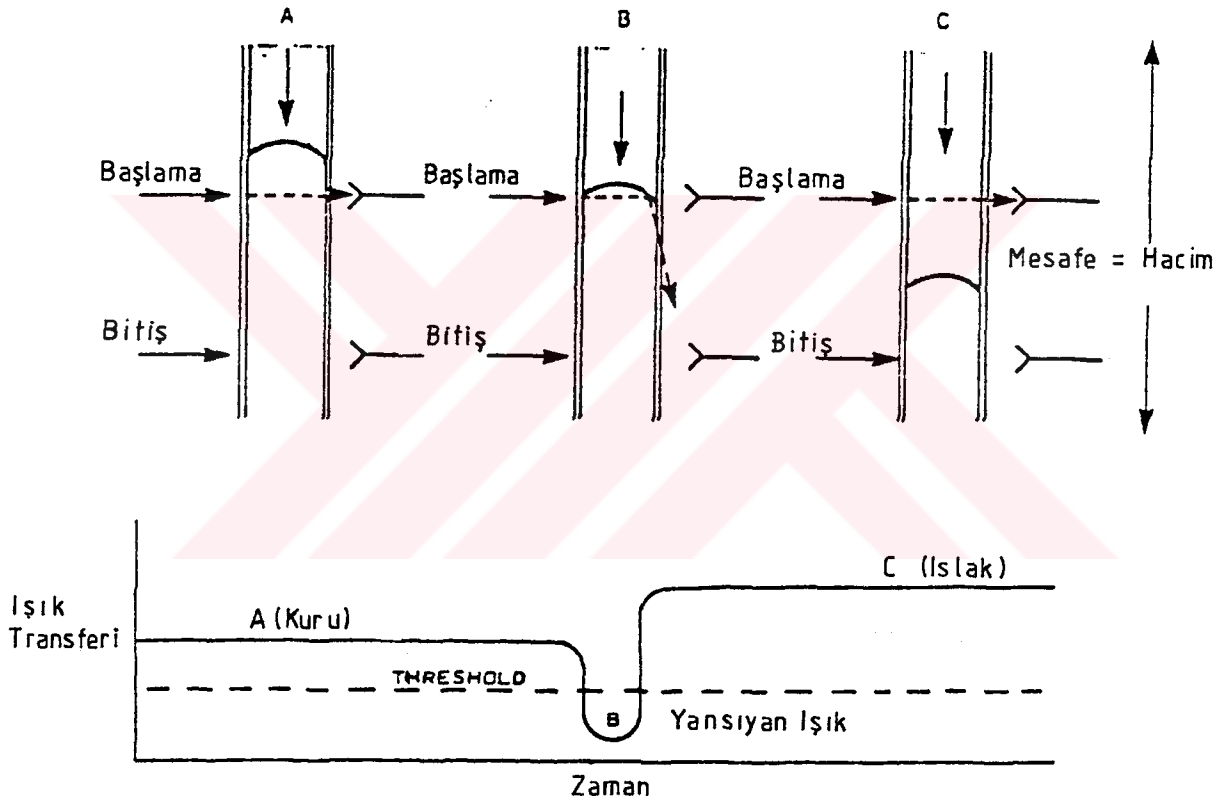
3.8. Örnek Hacim Ölçümü

Ölçüm işlemleri, her ölçüm için aynı örnek hacmi kullanımını gerektirmektedir. Cihaz bu fonksiyonu, Şekil-3.4'de gösterilen sıvı kolonun (menisküs de denir) keskin kenarının optik dedeksiyonu ile gerçekleştirmektedir.

IR ışık kaynağı ve bir fototransistör arasındaki ışık transfer verimliliği, ışık yolu üzerindeki cam ölçüm tübünün optik karakteristiği tarafından kontrol edilmektedir.

A durumunda, ölçüm tüp hava içermektedir. Böylece, cam tübün içersindeki hava ve cam duvarların kırınımı nedeniyle ışık transferi azalmaktadır.

C durumunda, ölçüm tübü sıvı ile doludur. Kırınım seviyesi, ışık transferindeki küçük bir artış ve sıvının optik yoğunluğundaki normal bir artış ile azaltılmaktadır.



Şekil-3.4 Meniscus dedeksiyonu [10].

B durumu, menisküsün ışık yolundan geçişi sırasında oluşmaktadır. Konkav menisküsün kırınım niteliği nedeniyle ışık transferinde oldukça büyük bir azalma olmaktadır. Böylece, keskin kenar dedektörü vasıtasıyla sayma işleminin " START " ve " STOP " işlemleri gerçekleştirilmektedir.

Bu amaca uygun olarak, iki adet dedektör, sabit uzunluktaki ölçüm tübü boyunca yerleştirilmiştir. Örnek hacminin ölçümü ya da sayma işlemi, ilk dedektörün menisküsü dedekte etmesi ile başlar, ikinci dedektörün dedekte etmesi ile sona erer.

3.9. Hematokrit (HCT) Ölçümü

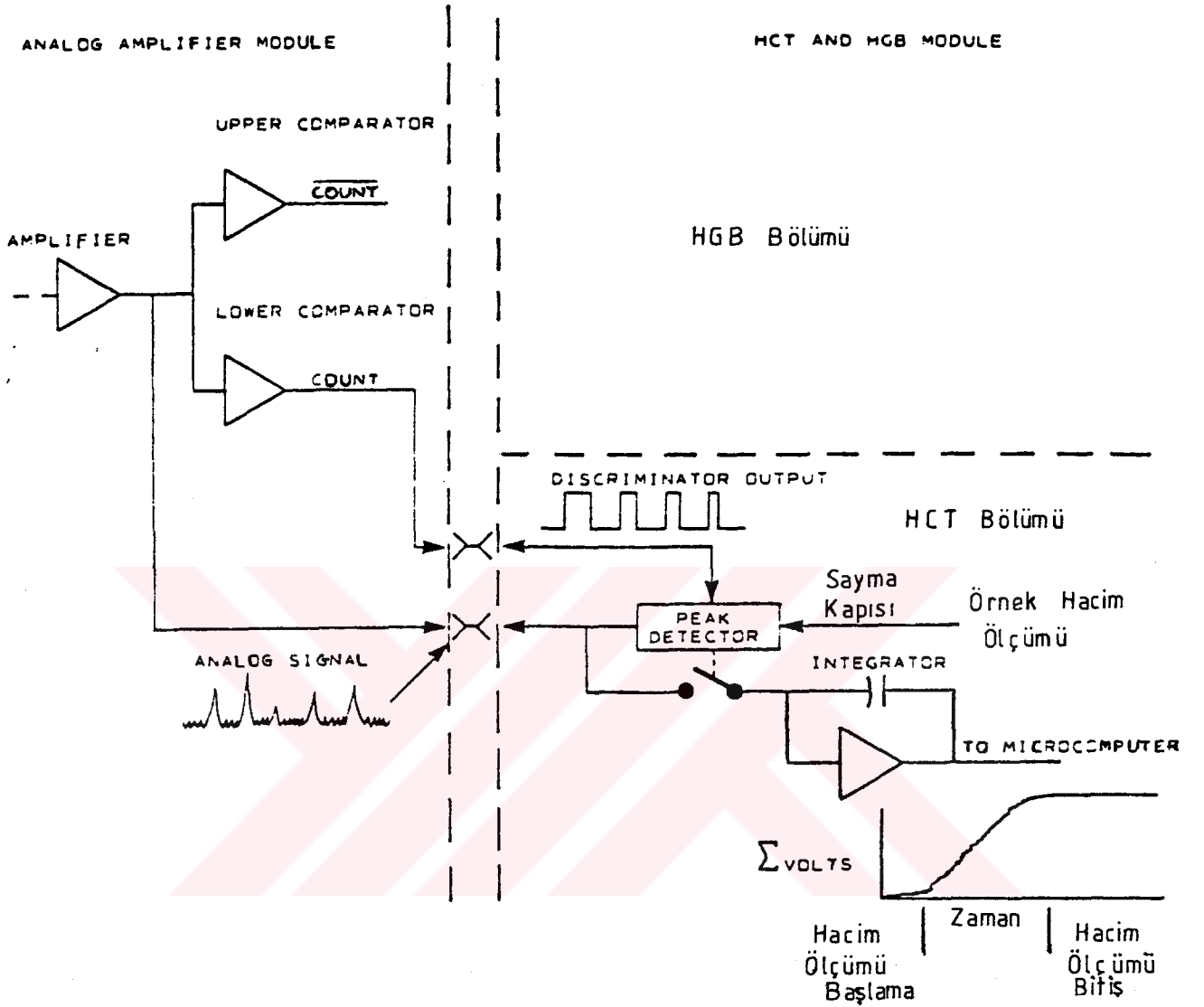
Hematokrit (HCT), kırmızı kan hücreleri haciminin, tüm kan hacimine oranıdır ve yüzde olarak gösterilmektedir.

$$\text{Hematocrit(HCT)} = \frac{(\text{RBC Sayısı}) \times (\text{Ortalama Büyüklük})}{10} = \frac{\text{RBC} \times \text{MCV}}{10} \quad (3.1)$$

(3.1)'de belirtilen $\text{RBC} = \text{hücre/mm}^3$, $\text{MCV} = \mu^3$ şeklindedir.

Şekil 3.5'de basitleştirilmiş HCT diyagramı gösterilmektedir. Kuvvetlendirici çıkışındaki işaret dizisi, ardarda sayılan hücrelere karşılık düşmektedir.

Analog işaret, anabord vasıtası ile hematokrit devresinin girişine uygulanmaktadır. Genlikler (peaks) hücre büyüklükleri ile doğru orantılıdır. Buradaki tepe dedektörü, toplama (Integrator) devresine olan işaret yolunu kontrol etmektedir. Integrator da, ölçülen örnek hacmi için genlikleri toplamaktadır. Sonuç olarak, integratorde toplanan doğru gerilim seviyesi, hematokrit değerinin analog gösterimi olacaktır.



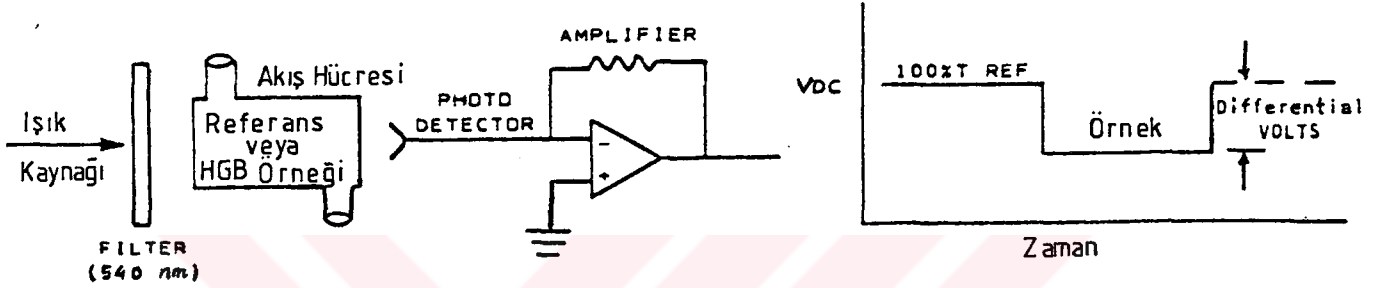
Şekil-3.5 Basitleştirilmiş hematokrit blok diyagramı [10].

3.10 Hemoglobin (HGB) Ölçümü

Basitleştirilmiş Hemoglobin (HGB) blok diyagramı Şekil-3.6'da gösterilmektedir. Bir kan örneğindeki hemoglobin konsantrasyonu gram/desilitre olarak ölçülmektedir. Bu konsantrasyon da, 540 nm'deki yeşil ışığın absorbanası ile orantılıdır.

HGB içeren sulandırılmış kan örneği ile akış hücresindeki temiz referans solüsyonu arasındaki gerilim farkı HGB konsantrasyonunu göstermektedir.

540 nm'lik bir filtre ve bir fototoplayıcı ile bu ışık transferi gerçekleştirilmektedir.



Şekil-3.6 Basitleştirilmiş hemoglobin blok diyagramı [10].

Şekil-3.6' daki fotodedektörün çıkışı, emilen ışık enerjisi ile orantılıdır. Daha sonra bu çıkış, akım-gerilim kuvvetlendiricisi ile kuvvetlendirilerek asıl çıkış işareti elde edilmektedir.

3.11 Tüm Kan Plateletlerinin Ölçümü

Çeşitli diskriminatörlerin kullanımı ile sulandırılan kan örneği içerisindeki plateletler sayılabilmektedir. Böylece, farklı büyüklükteki hücre sayılarının toplanması sonucunda Platelet (PLT) sayımı elde edilmektedir. Ayrıca cihazda bulunan " PLT STATUS " alarm göstergesi sayesinde

de, RBC/PLT karışımı önlenmiş olmaktadır.

Sayım esnasında, geri dönerek RBC/PLT transduserinin dedeksiyon bölgesine giren hücrelerden doğacak hataları önlemek amacıyla bir düzeltme devresi (Raslantı hatasını yok edici) sisteme eklenmiştir. Bu devre sayesinde, hücrelerin üst üste binmelerinden dolayı oluşabilecek raslantı hataları yok edilmiştir.

3.12 Cell-Dyn 900 Cihazının Kapsamı

Daha önce de açıklandığı gibi, Cell-Dyn 900 kan analizör cihazı, RBC, WBC, HCT ve HGB parametrelerini ölçümler sonucunda elde etmektedir. Ayrıca, PLT (trombosit) değeri de yapılan ölçüm sonucunda elde edilmektedir.

Ancak, diğer parametreler; MCV, MCH ve MCHC ise, ölçülen parametreler yardımı ile hesaplanmaktadır.

$$MCV = HCT / RBC \times 10; MCH = HGB / RBC \times 10; MCHC = HGB / HCT \times 100 \quad (3.2)$$

Böylece, RBC, HCT ve HGB değerleri ölçüldüğü zaman, MCV, MCH ve MCHC parametreleri de (3.2) formülü yardımı ile otomatik olarak hesaplanmış olmaktadır.

Cell-Dyn 900 kan analizör cihazında, RBC (eritrosit) HCT/PLT ölçümleri için 78 mikron çapında delikli bir transduser; WBC ölçümleri için de 100 mikron çapında delikli diğer bir transduser kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak, cihazda 8 parametrenin birden bulunması istendiği takdirde

(RBC, WBC, PLT, HCT, HGB, MCV, MCH, MCHC), 40 mikrolitre kan örneği gerekmektedir.

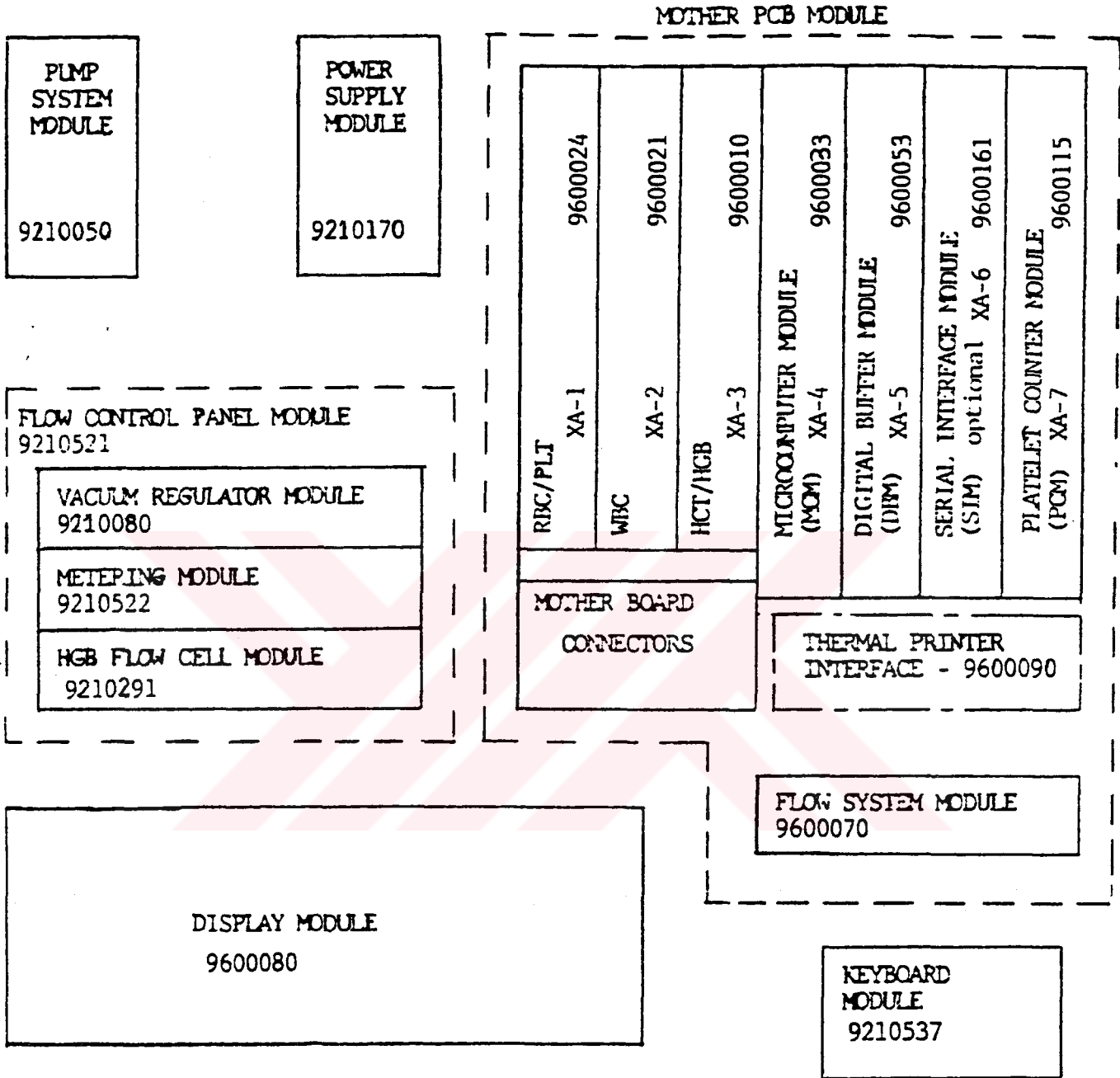
Yarı otomatik olarak yapılan 8 parametre ölçümünden sonra, sonuçta elde edilen veriler, yedi segment LED göstericileri ile verilmekte ve 20 kolonluk termal yazıcıda da basılmaktadır. Ayrıca, cihazın arka panelinde bulunan seri ve paralel portlar sayesinde cihaz, bir bilgisayara ya da yazıcıya bağlanabilmektedir.

3.12.1 Sistemin Konfigürasyonu

Kan hücrelerinin sayımı sırasında oluşan elektriksel işaretler, transduserler tarafından üretilmekte ve aşağıdaki devreler yardımıyla işlenerek sonuçlar elde edilmektedir:[10]

- a) Analog Sistem
- b) Dijital Sistem
- c) Örnek Ölçme Sistemi (Sample Metering System)
- d) Veri Gösterge ve Kayıt (Recording) Sistemi

Sisteme ait her bir modülün tanıtımı ve yerleşimine ilişkin ana devre şeması Şekil- 3.7'de gösterilmektedir. Buradan da görüldüğü gibi, Cell-Dyn 900 kan analizör cihazı kan hücrelerini sayabilmek için, komple elektronik bir sistem kullanmaktadır. Sistemi daha iyi anlayabilmek için de, tüm modüllerin yapı ve görevlerini incelemek gerekmektedir.



Şekil-3.7 Cell-Dyn 900 kan analizör cihazı ana devre şeması [10]

3.12.1.1 RBC/PLT Analog Kuvvetlendirici Modülü (9600024)

RBC/PLT Analog kuvvetlendirici modülünün başlıca görevleri; RBC/PLT transduseri için sabit akım sağlamak, RBC ve PLT hücrelerine karşılık düşen elektriksel işaretlerin kuvvetlendirilmesini ve ayarıştırılmasını gerçekleştirmek ve bu elektriksel işaretleri toplanmak amacıyla (HCT ölçümü) HCT devresine göndermektedir.

Tek bir transduserin (RBC/PLT transduseri) yardımı ile hem RBC (eritrosit) hem de PLT (platelet) hücrelerini sayabilmek için, transduser akım seviyesini uygun şekilde ayarlamak gerekmektedir. Buna bağlı olarak, düşük transduser akım seviyelerinde RBC sayımı, yüksek akım seviyelerinde de PLT sayımı gerçekleştirilmektedir.

RBC/PLT Analog kuvvetlendirici modülünün basitleştirilmiş şematik diyagramı Şekil-3.8'de gösterilmektedir. Şekil-3.8'de de görüldüğü gibi, RBC/PLT analog kuvvetlendirici modülü çeşitli bölümlerden oluşmaktadır.

1. Sabit Akım Sağlayıcı

Şekil-3.8 incelenecek olursa, güç modülünden gelen 40Vdc, U9 tarafından regüle edilerek, sistemdeki sabit akım generatörü için ayarlanabilir bir gerilim seviyesi (36V) sağlanmaktadır. RBC ölçümlerinde genellikle düşük akım seviyeleri kullanılmaktadır (0.6mA). Bu durum, kazanç seçme giriş terminalindeki lojik "low" seviyesinin U8 komparatörü tarafından dedekte edilmesi ile gerçekleşir. Ancak PLT ölçümlerinde ise, yüksek akım seviyeleri kullanıldığı için

(1.2mA) yukardaki durumun tam tersi gerçekleşmektedir. (lojik " high " seviyesi).

2. İşaret Giriş Seçimi (Röle K1):

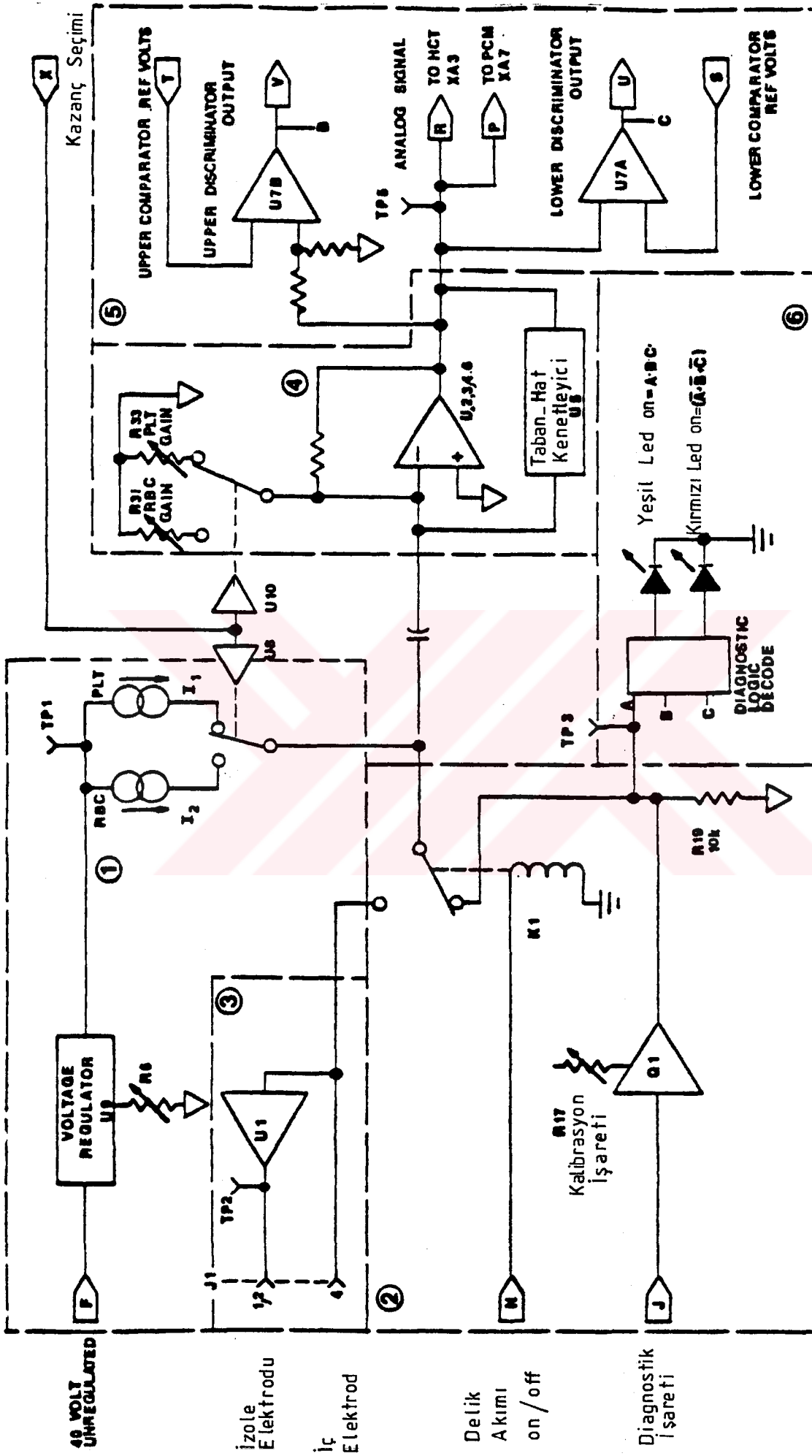
Cihazın "READY" konumunda K1 rölesi, kaskad kuvvetlendirici zincirini diagnostic işaret kaynağına bağlanmaktadır. Bu durumda R19 direnci, cihazın normal ölçümü haricinde kendini test etmek amacıyla ürettiği diagnostic test işaretlerini iletmektedir. Böylece kan hücre sayımı simüle edilebilmektedir.

Normal sayım işareti alındığı zaman ise, bir mikrobilgisayar işareti U8 vasıtasıyla K1 rölesini aktive eder. Bu sırada da, sabit akım genaratörü tarafından RBC/PLT transduserine sabit bir akım uygulanarak, hücrelere karşılık düşen giriş işaretleri algılanır ve U2 giriş kuvvetlendiricisine gönderilir.

3. Guard Kuvvetlendiricisi (U1)

İletim sistemine yerleştirilmiş olan guard elektrodları, gürültü ve harici işaret izolasyonunu sağlamaktadır.

Bu amaçla kullanılan U1 kuvvetlendiricisi, transduser gerilimini dedekte eder ve belirli bir kazanç ile U1-6'daki guard elektrodlara izole edilmiş gerilim seviyesini uygular.



Şekil-3.8 RBC/PLT Analog Kuvvetlendirici Modülü [10].

4. Kuvvetlendirici, Kazanç Seçimi ve Taban-Hattı Kenetleyicisi

K1 rölesinin durumuna göre alınan giriş işaretleri, örnek içersindeki hücrelerin ortalama büyüklüklerine karşılık gelecek şekilde istenen seviyeye kadar kuvvetlendirilebilmektedir. Bu kazanç seviyesi de, RBC hücreleri için R31 potansiyometresi; PLT hücreleri için de R33 potansiyometresi yardımı ile ayarlanmaktadır.

İşaret Kapanı U5, toprak seviyesine referanslanmıştır. Böylece, U2 kuvvetlendiricisi de U5 tarafında sıfır taban hat seviyesine kenetlenmiştir. Ayrıca, offset gerilimi referans değerden daha pozitif olacak olursa, devre, geri beslemeli bir toplama kuvvetlendiricisi olarak çalışmaktadır.

Devrede bulunan "x " kazanç seçme terminali yardımıyla mikrobilgisayar tarafından kontrol edilmekte olan U10 elektronik anahtarı da, RBC sayımı için (düşük kazanç) R31 potunu; PLT sayımı için de (yüksek kazanç) R33 potunu aktive etmektedir. Seçilen bu potansiyometre çıkışları ise U4 toplama kuvvetlendiricisine bağlıdır.

5. Upper/Lower Büyüklük Diskriminatörler: (U7)

Kaskad kuvvetlendirici U6'nın çıkışından alınan kuvvetlendirilmiş işaretler, her iki komparatörün (diskriminatör) evirmeyen girişine uygulanmaktadır. Bu iki komparatörün referans gerilim seviyeleri, mikrobilgisayarlar tarafından belirli bir değere set edilmiştir. Gelen işaret seviyelerinin, referans gerilim seviyeleri ile aynı ya da daha büyük

olması durumunda ise, komparatör çıkışlarında lojik "high" seviyeleri oluşmaktadır.

6. Diagnostic Test Devresi:

Cihazın kendi kendini test etmesi amacıyla, bilinen ve sabit sayıda puls içeren bir diagnostic işaret grubu Q1 kuvvetlendiricisinin girişine uygulanmaktadır. Böylece, bilinen sayıdaki bu işaret grubu sayesinde cihazın sayım doğruluğu test edilmiş olmaktadır. Devrede bulunan R17 kalibrasyon potu tarafından kontrol edilmekte olan ortalama işaret genliği de, HCT devresinin toplamının " check " edilmesini sağlamaktadır.

Diagnostic sayım işlemine bağlı olarak aktive olan " yeşil " ve " kırmızı " LED'ler, bir diagnostic lojik devresi ile kontrol edilmektedir. Bu devrenin girişinde şu işaretler bulunmaktadır;

- A: RBC veya PLT transduser akımı
- B: Dijital upper-çıkış komparatörü
- C: Dijital lower-çıkış komparatörü.

Yukardaki üç girişin de lojik "1" seviyesinde olması durumunda "yeşil" LED, aksi taktirde "kırmızı" LED yanmaktadır. Görüldüğü gibi, normal bir RBC/PLT sayımı bu LED'ler vasıtasıyla da kontrol edilmektedir.

3.12.1.2 WBC Analog Kuvvetlendirici Modülü (9500021)

WBC Analog kuvvetlendirici modülünün en önemli iki görevi; WBC transduseri için gerekli olan sabit akımı sağlamak, WBC hücrelerinin büyüklük ve sayılarına karşılık düşen elektriksel işaretleri de algılayarak kuvvetlendirmektedir.

WBC hücrelerine karşılık düşen bu giriş işaretleri, WBC analog kuvvetlendirici modülünde kuvvetlendirilip ayrıştırıldıktan sonra, işlenmek ve sayılmak amacıyla mikrobilgisayar modülüne gönderilmektedir.

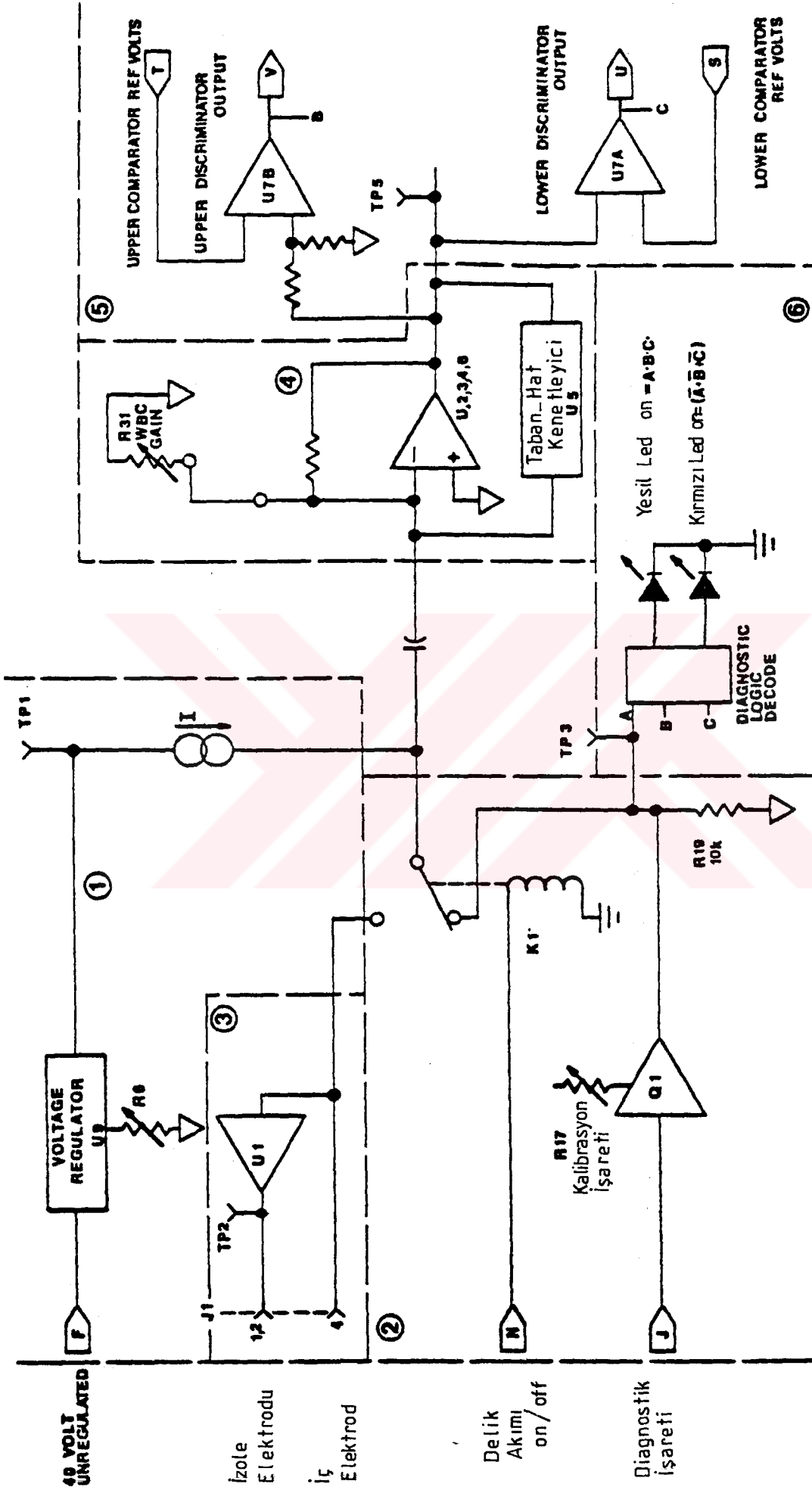
WBC Analog kuvvetlendirici modülünün basitleştirilmiş devre diyagramı Şekil-3.9'da gösterilmektedir. Buradan da görüldüğü gibi, WBC analog kuvvetlendirici modülü, RBC/PLT kuvvetlendirici modülüne benzer olarak aynı bölümlerden oluşmaktadır:

1. Sabit Akım Sağlayıcı:

Güç modülünden alınan 40Vdc gerilimi, voltaj regülatörü tarafından regüle edilerek, sistemdeki sabit akım generatörü için ayarlanabilir bir gerilim seviyesi (nominal 30V) sağlanmaktadır. Böylece, WBC transduseri için gerekli olan sabit akım seviyesi de istenen değerde tutulabilmektedir. (nominal 0.8 mA)

WBC Analog kuvvetlendirici modülünün;

2. İşaret Giriş Seçimi (K1 rölesi)
3. Guard Kuvvetlendirici (U1 rölesi)
4. Kuvvetlendiriciler ve Taban hattı kenetleyicisi (U2-U6)
6. Diagnostic Test Devresi



Şekil-3.9 WBC Analog Kuvvetlendirici Modulu [10].

bölümleri, RBC/PLT analog kuvvetlendiricisinde aynen açıklandığı gibidir. Sadece "E.upper/Lower büyüklük Diskriminatörleri" bölümü RBC/PLT analog kuvvetlendiricisinde açıklandığından farklı olmaktadır.

E. Upper/Lower Büyüklük Diskriminatörleri (U7)

WBC Analog kuvvetlendiricisinde de hem "upper" hem de "lower" komparatörleri bulunmaktadır. Ancak WBC analog kuvvetlendiricisi devresinde, RBC/PLT analog kuvvetlendirici devresinden farklı olarak, sadece "lower" diskriminatör çıkışları sayım çıkışı olarak mikrobilgisayar modüle gönderilmektedir. "Upper" diskriminatör fonksiyonları ise, yalnızca diagnostic test işlemleri amacıyla kullanılmaktadır.

WBC Analog kuvvetlendirici devresinde, WBC hücre büyüklük ve sayılarına karşılık düşen kuvvetlendirilmiş işaretler, "lower" komparatörün evirmeyen girişine uygulanmaktadır. Referans gerilim seviyesi ise, bu komparatörün eviren girişine uygulanmaktadır. Gelen işaretlerin, referans gerilim seviyesi ile aynı ya da daha büyük olduğu durumlarda, "lower" komparatör (diskriminatör) çıkışında digital sayım işaretleri oluşmaktadır. Daha sonra bu dijital işaretler, sayım işleminin tamamlanması amacıyla mikrobilgisayar modüle gönderilmektedir.

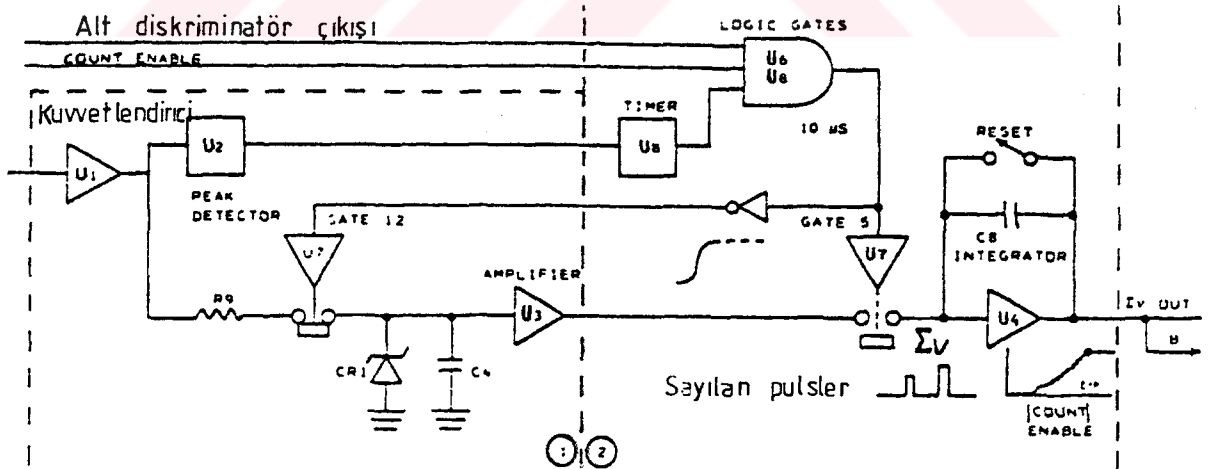
3.12.1.3 Hematocrit(HCT) ve Hemoglobin (HGB) modülü (9600010)

HCT/HGB modülü, birbirinden bağımsız olarak iki yapı içeren tek bir devre halindedir.

HCT ölçüm devresinde, RBC analog kuvvetlendirici devresinden gelen analog işaretler toplanarak belirli bir d-c seviye elde edilmektedir. Bu d-c seviye, HCT değerinin analog gösterimidir. Daha sonra bu seviye, dijital formatta işlenmek üzere mikro bilgisayar modüle gönderilmektedir.

HGB ölçüm devresinde ise, HGB akış hücresinden geçen Referans solüsyon'un ve HGB içeren kan süspansiyonunun oluşturdıkları ışık transferi ile orantılı olarak bir logaritmik gerilim seviyesi elde edilmektedir. Bu gerilim seviyesi de, HGB değerinin analog gösterimini oluşturmaktadır. Daha sonra bu seviye, dijital formatta işlenerek, hemoglobinin gram/dl'te cinsinden değerini göstermek üzere mikrobilgisayar modüle gönderilmektedir.

Şekil-3.10'da Hematokrit (HCT) devresinin basitleştirilmiş devre diyagramı gösterilmektedir. Bu devre iki bölüm halinde incelenebilmektedir [10].



Şekil-3.10 Hematokrit (HCT) Devresi [10].

Birinci bölümde; C4 kapasitesi, U7 anahtarının (Gate 12) kapanması ile her bir pulsun yükselme süresinde dolmaktadır. İkinci bölüm ise bu periodda çalışmaktadır.

Tamponlanmış olan giriş işareti U1 kuvvetlendiricisi tarafından sağlanmaktadır. U1 çıkışı ise, hem tepe (peak) dedektörüne hem de U7 (Gate 12) vasıtasıyla C4 kapasitesine bağlı bulunmaktadır. Böylece, herhangi bir "peak" geldiği zaman, U2 U7 anahtarının (Gate 12) açılmasını sağlar ve bu "peak" değeri C4 kapasitesinde depolanır.

Aynı zamanda, ikinci bölümdeki U8 Timer'i de aktif hale gelir. Buna bağlı olarak, lojik kapılardaki (U6,U8) "Sayım Enable" ve "Lower Diskriminatör Sinyal" girişleri lojik "1" seviyesinde olduğunda, elektronik U7 switchi (Gate 5) 10 ms kadar aktif hale gelmiş olur. Sonuç olarak da, C4 kapasitesinde depolanan "peak" değeri Integrator kapasitesi C8'e yüklenmiş olur.

Hazırlanan kan örneğinin Hematokrit (HCT) değerini ölçmek amacıyla, her bir puls için yukardaki işlemler tekrarlanmaktadır. Bu kan örneğinin ölçümü tamamlandıktan sonra, C8 kapasitesinde depolanan gerilim değeri, HCT (Hematokrit)'in analog gösterimini oluşturmaktadır.

Ayrıca, devrede bulunan CR4 zener diodu sayesinde gelen işaretlerin genlik sınırlaması, U8 Timer sayesinde de süre sınırlaması yapılmaktadır. Bu limitlerin dışarısına çıkan işaretler RBC sayım işaretleri olarak kabul edilmez.

Şekil-3.11'de Hemoglobin (HGB) devresinin basitleştirilmiş devre diyagramı gösterilmektedir.

Ayrıca, devredeki tüm gerilim seviye değerleri, R24 kazanç potansiyometresi tarafından kontrol edilmektedir. Diagnostic test modu'nda, HCT ve HGB modülünün diagnostik performansı ise, "AND" kapılı voltaj komparatörleri (U11, U12) tarafından gerçekleştirilmektedir. U10'un çıkışında oluşan gerilim değeri, HGB için 4.6V-5.6V arasında; HCT için 2.5V'dan büyük olduğu taktirde "yeşil" normal sayım LED'i yanmaktadır. Aksi taktirde, "kırmızı" LED yanmaktadır.

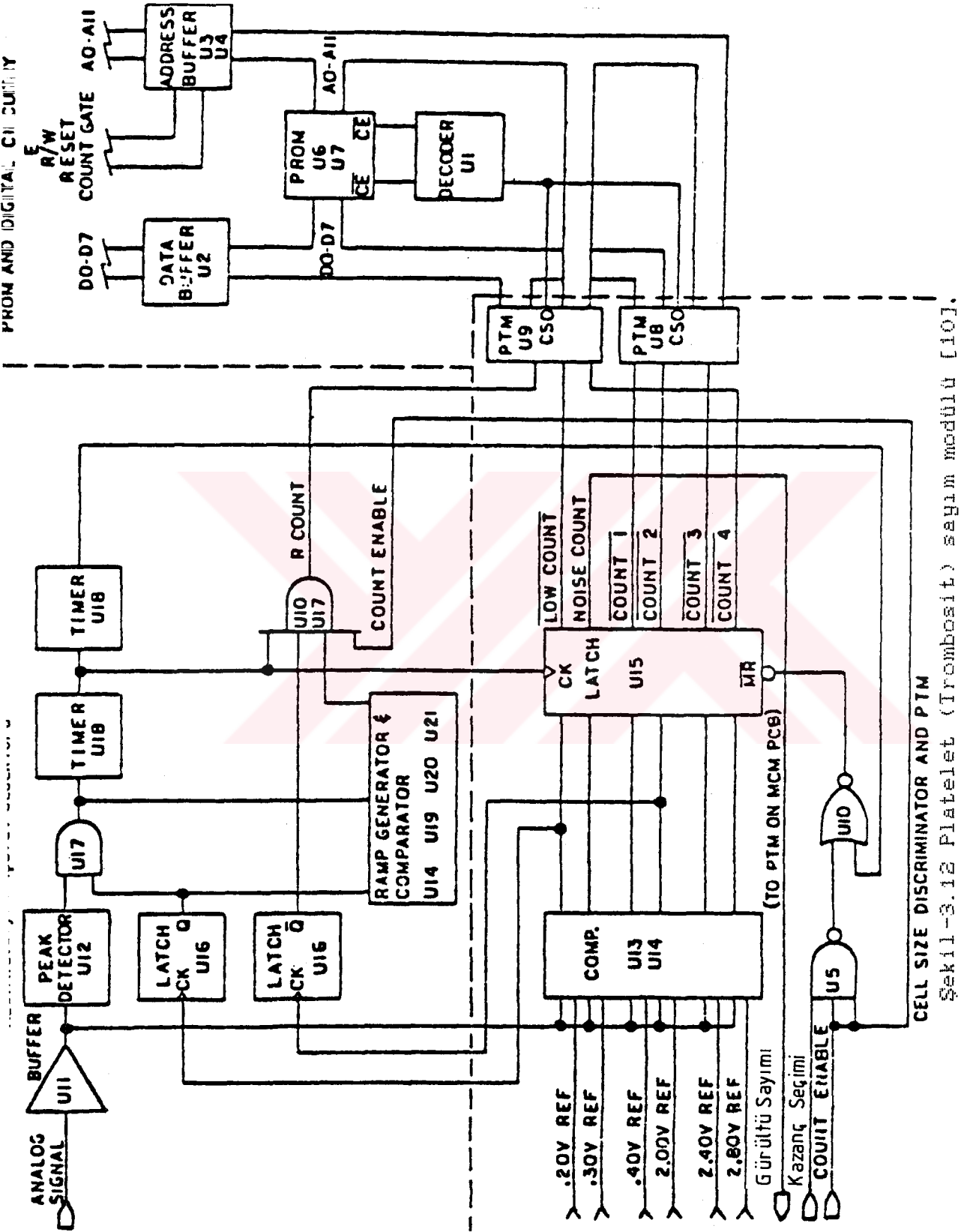
3.12.1.4. Trombosit (Platelet) Sayım Modülü (9600115)

Platelet sayım modülü, platelet (trombosit) hücrelerini saymak amacıyla, hücre büyüklük dağılımları ve geriye dönen (resirkülasyon) verileri hakkında mikrobilgisayara veri sağlamaktadır. Ayrıca, üzerinde bulunan iki adet 2732 (4kx8) EPROM sayesinde de, mikrobilgisayar modülün kapasitesini genişletmektedir.

Şekil-3.12'de platelet (trombosit) sayım modülünün blok diyagramı gösterilmektedir. Şekil-3.12'de gösterilen devre üç ana bölüm halinde incelenebilmektedir.

1. Hücre Büyüklük Diskriminatörleri ve PTM:

Tüm kan örneği içersindeki plateletler (trombositler) sayılacağı zaman, hücre büyüklük dağılım verileri, işaret işleme için mikrobilgisayarda hazır olmalıdır. Bu durum da; U13, U14 komparatörleri, U15 tutma elemanı ve U8, U9 PTM'leri (program Timer) tarafından gerçekleştirilmektedir. Sistem girişine gelen analog işaret, her biri belirli bir referans gerilim seviyesine sahip olan altı komparatörün girişine

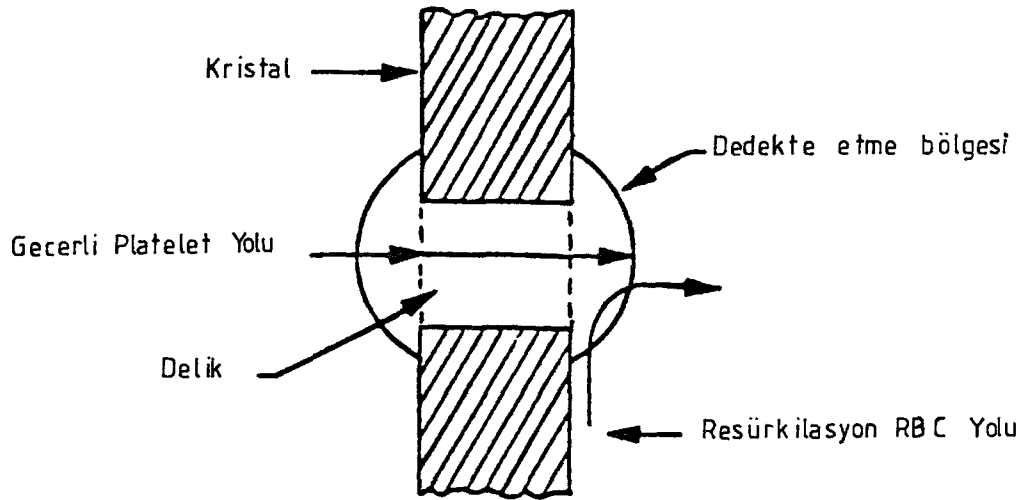


uygulanmaktadır. Böylece platelet sayma işlemi de tamamlanmış olmaktadır.

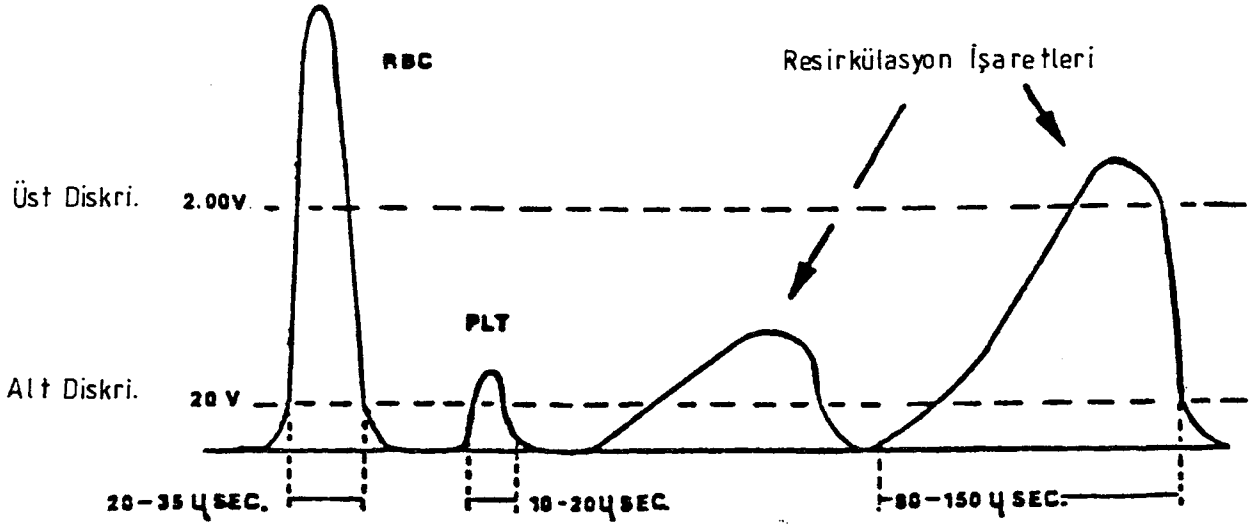
2. Resirkülasyon Pulse Dedektörü:

Transduserlerde bulunan ölçüm deliği kanalı, transduserin asıl ve ilk dedekte etme bölgesini oluşturmaktadır. Ancak, hücrelerin, delik kanalının dışarısında da dedekte edilebilmeleri mümkündür. Şekil-3.13'de bu durum açık şekilde gösterilmektedir.

Kırmızı kan hücrelerinin, genişletilmiş dedekte etme bölgesindeki resirkülasyonları (geriye dönmeleri) sonucunda oluşan analog işaretler, platelet (trombasit) sayımlarında çeşitli hatalara neden olmaktadır. Şekil-3.14'de böyle bir hücrenin resirkülasyonu sonucunda oluşturduğu işaretin genlik ve süresi gösterilmektedir. Bir RBC resirkülasyonu sonucunda üretilen işaretin yükselme süresi (0.20V genliğe), normal bir platelet işaretininkinden daha uzundur. İşte bu hatayı ortadan kaldırmak amacıyla, PLT devresinde resirkülasyon puls dedektörü kullanılmıştır.



Şekil-3.13 Resirkülasyon hücre diyagramı [10].



Şekil-3.14 Pulse genişlik diyagramı [10].

Resirkülasyon puls dedektörü, Şekil-3.12'de de gösterildiği gibi, rampa generatörü (U19,U20,U21); gerilim komparatoru (U14); birleştirilmiş zaman ve lojik devresinden oluşmaktadır. Resirkülasyon puls dedektörü ilk olarak her bir pulsun yükselme süresini incelemektedir. Eğer, herhangi bir işaretin (pulsun) yükselme süresi 50 μ sn'den büyükse ve genişliği de 2.0 V'u aşmıyorsa (platelet üst eşiği), bir R sayım işareti üretilmektedir. Bu R sayım işaretleri U9 PTM 'nde toplanmaktadır. Normal platelet sayımı tamamlandıktan sonra sayım doğrulaması için, U9 PTM 'inde oluşan toplam kullanılmaktadır. Böylece de, tam ve doğru bir platelet sayımı elde edilmiş olmaktadır.

3.PROM ve Dijital Devre :

Daha önce de açıklandığı gibi platelet sayım modülünde bulunan U6 veU7 PROM'ları, mikrobilgisayar modülünün kapasitesini genişletmektedir. Yazıcı rapolamalarına ve cihaz algoritmalarına ait çeşitli veriler bu PROM'larda depolanmaktadır.

3.12.1.5 Mikrobilgisayar Modülü (9600033)

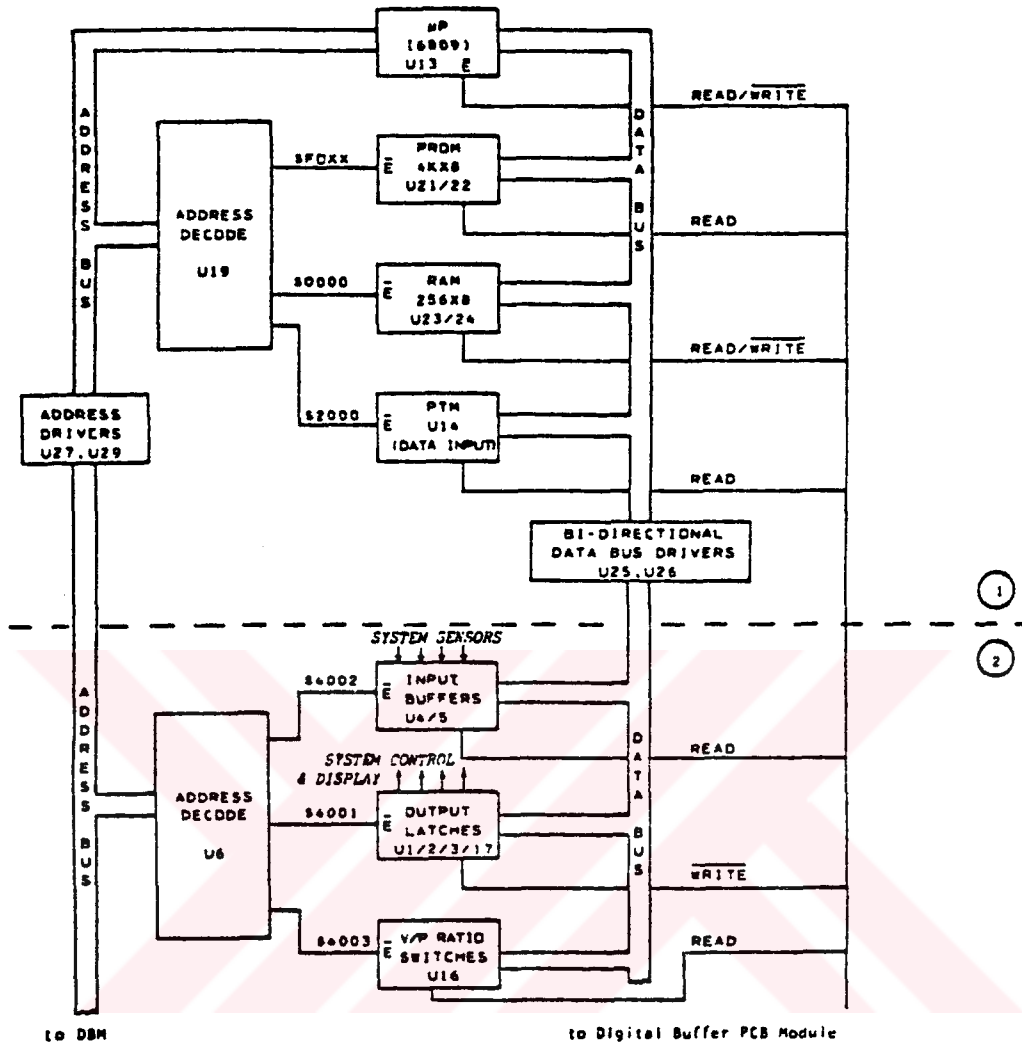
Mikrobilgisayar modülü, tüm sistemin kontrolünü giriş bufferları ve çıkış latchları vasıtasıyla sağlamaktadır. Sistem kontrolü için gereken lojik fonksiyonlarının gerçekleştirilmesinin yanında, aritmetik işlemler ve veri saklama işlemleri de (RAM) mikrokomputer modülde gerçekleştirilmektedir.

Şekil-3.15'de mikrobilgisayar modülünün blok diyagramı gösterilmektedir.

Şekil-3.15'de de gösterildiği gibi mikrobilgisayar modülü 8-bit veri yolu ile 16-bit'lik adres yolunu kullanmaktadır. Tüm sisteme ait olan operasyonel program verileri de, MCM (Mikrobilgisayar Modülü)'de bulunan PROM'da depolanmıştır. Mikroişlemci buna bağlı olarak sırasıyla, veri girişi için program timer (PTM)'i, veri depolaması için RAM 'i, program işlenmesine devam etmek için de PROM'u aktive etmektedir.

Tüm bir kan örneğinin ölçülmesi ile elde edilen parametreler RAM 'da depolanmaktadır. Daha sonra depolanan bu parametre verilerinin mikroişlemciye gönderilmesi ile gerekli aritmetik işlemlerin yapılması sağlanmaktadır.

"Örnek Hacim Ölçümü " "Atık Şişesi Dolu" "Reservoir Boş"vs. gibi sistem sensörlerinden gelen çeşitli bilgiler de , giriş bufferları vasıtasıyla adres yoluna verilmektedir. Daha sonra mikroişlemciye ulaşan bu sistem bilgileri değerlendirerek gerekli bölümlere lojik komutlar gönderilmektedir. (LED'ler, valveler, pompalar vb...).



Şekil-3.15 Mikrobilgisayar modülü blok diyagramı [10].

Şekil-3.15'de gösterilen volüme/Prescale Ratio anahtarlama Ünitesi, aritmetik bölüm faktörünün mikroişlemciye girilmesini sağlamaktadır. Mikroişlemci de bu faktörü kullanarak, tüm kan örneğinin konsantrasyonu ile displayde görülen değer arasındaki korelasyonu sağlayan, "Toplam Display (gösterge) Faktörü" nü ayarlamaktadır. Böylece, her bir kan örneği için hacim ölçümü sabit ve tekrarlanabilir bir değer halini almaktadır.

Ayrıca, MCM'de bulunan çıkış latchleri de, gerekli kontrol işlerinin harici cihazları ulaşmasını sağlamak amacıyla veri yolunu kullanmaktadır.

3.12.1.6 Digital Buffer Modülü (9600053)

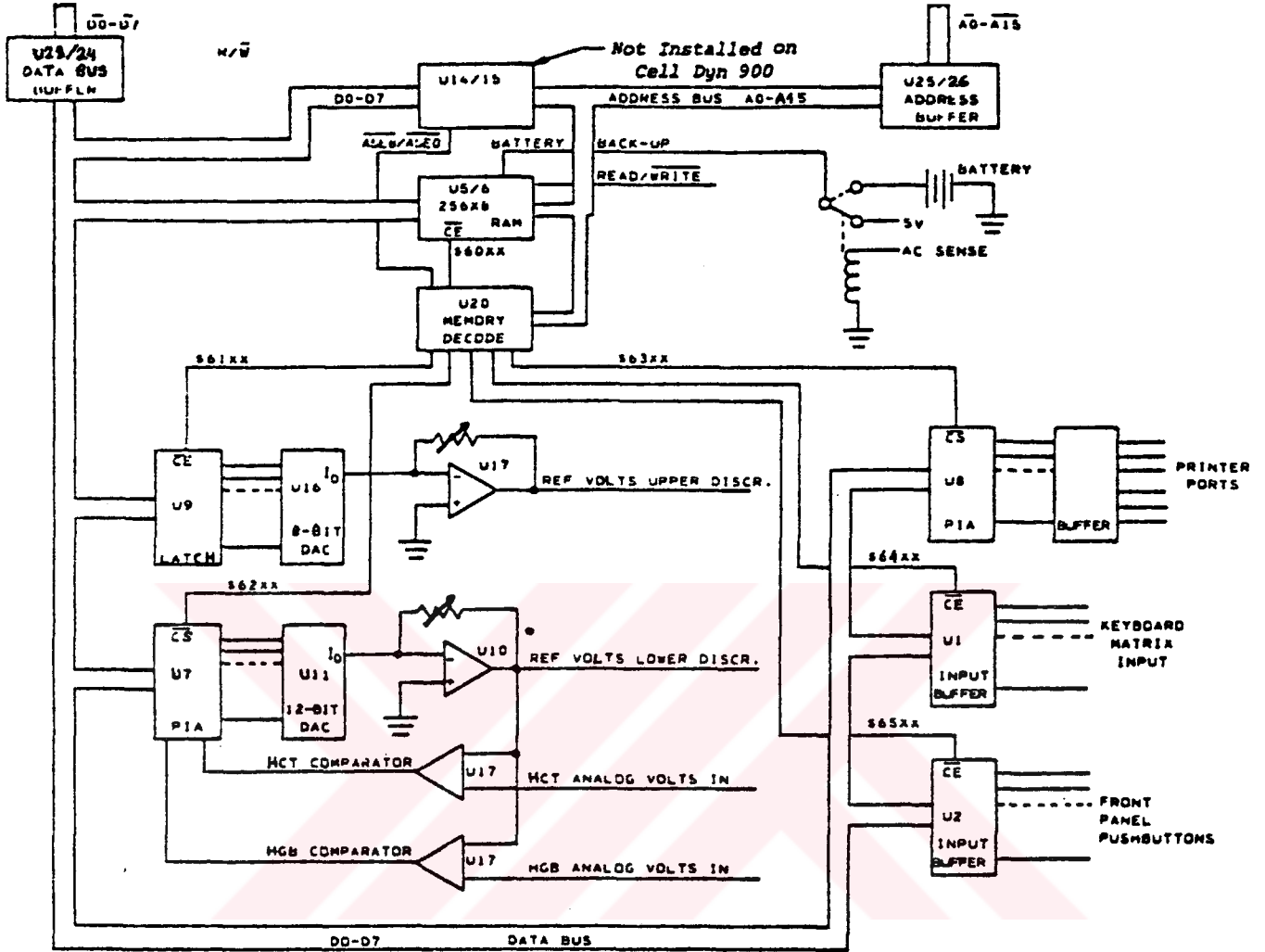
Dijital buffer modülü, mikroişlemci modülünün kapasitesini genişletmektedir. Şekil-3.16'da dijital buffer modülünün blok diyagramı açık şekilde gösterilmektedir.

Şekil-3.16'da da gösterildiği gibi, giriş bufferları vasıtasıyla klavyeden alınan giriş verileri, DBM (Dijital Buffer Modülü)' de bulunan RAM üzerine kaydedilmektedir. Eşik değerleri, HGB ve HCT ayar değerleri, zaman ve hasta ID verileri kaydedilen bilgilerden birkaçını oluşturmaktadır.

Yazıcı verileri ve kontrolü için gerekli olan arabirim işlemleri, DBM'de bulunan PIA-US (Periferal Arabirim Adaptörü) tarafından gerçekleştirilmektedir. PIA-US'de, klavye eşik değerleri; HGB ve HCT ölçümleri için D/A ve A/D çeviriciler ile gerekli olan ilişkileri sağlamaktadır.

3.12.1.7 Akış Sistemi Modülü (9600070)

Akış sistemi modülü (FSM), örnek ölçümü sırasında, tüm akış sistemini kontrol eden valflerin çalışma durumlarını MCM (Mikrobilgisayar Modülü) yardımıyla düzenlemektedir.



Şekil-3.16 Digital Buffer Modülü blok diyagramı [10].

Ayrıca, ölçüm sistem ve Akış sistem durum sensörlerinden alınan FSM (Akış Sistemi Modülü) girişleri, veri yolundan MCM'e gönderilerek gerekli lojik değerlendirmeler gerçekleştirilmektedir.

3.12.1.8 Gösterge (Display) Modülü (9600080)

Gösterge (Display) modülü, üç-digit/yedi segmentlik

LED'ler ile, sistem durum göstergelerini (alarm göstergeleri) içermektedir. Gösterge (Display) panelinde bulunan "ALTER DISPLAY" tuşu yardımıyla de göstergede görülen değerler değiştirilerek gösterilmektedir.

3.12.1.9 Yazıcı Arabilim Modülü (9500090)

Yazıcı Arabilim modülü, verilerle ilgili karakterlerin kaydedilmesi amacıyla, 7 satır ve 5 sütundan oluşan termal yazıcıya gerekli çıkış işaretlerini göndermektedir. Ayrıca, boşluk ve kağıt ilerletilmesi gibi fonksiyonlar da bu modül tarafından kontrol edilmektedir.

3.12.1.10 Ölçüm Modülü (9210522)

Ölçüm modülünün tam üzerinde, cam metering (ölçüm) tübü yer almaktadır. Ölçüm uzunluğuna göre geçen sıvı kolonun (meniscus) kenarlarını dedekte ederek, ölçüm aralığını tesbit eden optik anahtarlar, bu cam tübün her iki yanına yerleştirilmiştir. Böylece bu sistem sayesinde, her ölçüm için sabit bir süre ve hacimin kullanılması sağlanmaktadır.

3.12.1.11 Klavye Modülü (9210537)

Klavye modülü, kullanıcı tarafından cihazın tüm fonksiyonlarının kontrol edilmesini sağlamaktadır. Eşik değerleri; HCT ve HGB kalibrasyonu, RBC, WBC ve PLT sayım kalibrasyonları, klavye sistemi vasıtasıyla DBM'de bulunan RAM üzerine daha sonra kullanılmak amacıyla girilmektedir. Ayrıca, RAM'de bulunan bu giriş verileri, güç kesilmeleri esnasında bir lit-yum batarya tarafından korunmaktadır.

3.12.1.12 Güç Kaynağı Modülü (9210170)

Güç modülü, güç transformatörünü, doğrultucu ve filtreleri içermektedir. Gerilim regülasyonu ise, bu modülün girişini yerleştiren bir devre yardımıyla sağlanmaktadır. 220/110 VAC, 50/60 Hz.seçimini sağlayan ufak bir kart da, modülün tam arka girişine yerleştirilmiştir. Böylece tüm sistemin modüllerinin çalışması için gerekli olan gerilim değerleri, güç modülü tarafından oluşturulmaktadır.

3.12.1.13 Pompa Sistem Modülü (9210050)

Pompa sistemi, vakum ve basınç pompası olmak üzere iki parçadan meydana gelmektedir.

Güç modülü üzerinde bulunan AC röle optik vakum regülatör modülü yardımıyla, vakum pompası kontrol edilerek tüm sistemin vakum seviyesi istenen değere ayarlanabilmektedir. Ayrıca sistemin örnek ölçüm zamanı da bu vakum seviyesi tarafından kontrol edilmektedir.

Basınç pompası ise, ölçüm deliğinin yıkanması (backflush) ve delik birikintilerinin uzaklaştırılması gibi işlemlerin gerçekleştirilmesini sağlamaktadır.

3.12.1.14 Vakum Regülatör Modülü (9210080)

Vakum regülatör modülü, vakum pompasını kontrol edip sabitleyerek, her ölçüm için gerekli ölçüm zamanının aynı kalmasını sağlamaktadır. Vakum regülatör modülü bir körük

ile körüğün hareketlerini dedekte eden optik bir anahtardan oluşmaktadır. Bu körüğün hareketi de, ayarlanan vakum seviyesi ile değişmektedir.

3.12.1.15 HGB Akış Hücresi Modülü (9210291)

HGB akış hücresi, içerdği ışık kaynağı, 540nm.'lik ara filtre ve bir fotodiyot yardımı ile HGB ölçümünü gerçekleştirmektedir.

Işık kaynağı ve fotodiyot arasındaki, akış hücresinden geçen optik ışık yolu, sistemi çalıştırmaktadır. %100 geçirgen referans sıvısı ile HGB içeren örnek sıvısı arasındaki farklı gerilim seviyeleri, bu yoğunluklara karşı düşen farklı gerilim seviyelerini göstermektedir. İşte oluşan bu gerilim farkı da HGB değerini vermektedir.

3.12.1.16 Akış Kontrol Panel Modülü (9210271)

Akış kontrol panel modülü, tüm sistemin akış yönünü belirleyen valve ve borulama ünitesinden oluşmaktadır. Ayrıca vakum ve regülatör modülü, ölçüm modülü ve HGB akış hücresi modülü de, akış kontrol panel modülü üzerinde yer almaktadır. Görüldüğü gibi, bu modül sayesinde, bir örneğin ölçülmesi için gerekli olan tüm akış sistemi kontrol edilmektedir.

3.12.1.17 Seri Arabirim Modülü (Arka Panel Açıklaması- 9600161)

İsteğe bağlı olarak yerleştirilen bu modül sayesinde, sistem harici bir cihaz ile ilişki kurabilmektedir. Böylece, sistemler arasında gerekli bilgi alış verişi de gerçekleştirilmiş olmaktadır.



BÖLÜM 4
BEYAZ KAN HÜCRE (LÖKOSİT) ALT GRUPLARINI SAYAN
DEVRE GERÇEKLEMESİ

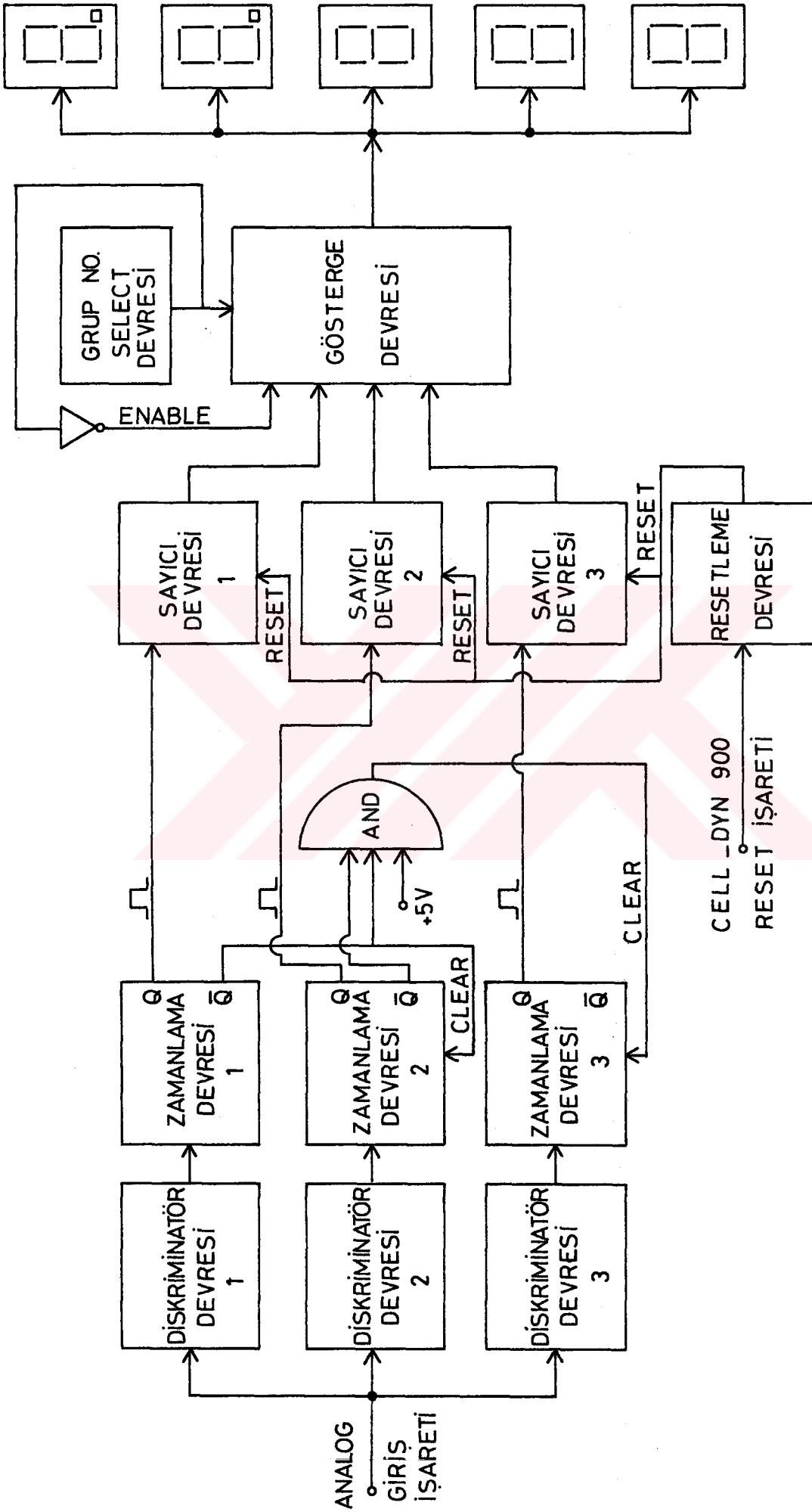
Bu bölümde, renksiz kan hücreleri ya da beyaz kan hücreleri olarak adlandırılan lökositlerin alt hücre gruplarının elektronik bir devre yardımıyla sayılması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, bir önceki bölümde geniş şekilde anlatılan Cell-Dyn 900 Kan Analizör Cihazı'nın lökosit sayım devresinden yararlanılmıştır. Cell-Dyn 900 kan analizör cihazı, lökosit sayımını gerçekleştirdiği halde, bu çalışma sayesinde sayamadığı lökosit alt hücre gruplarını da sayabilmektedir.

Böylece, aşağıda belirtilen lökosit alt hücrelerinin sayımları toplam lökosit sayımına bağlı olarak elde edilmiştir.

- 1- LENFOSİT (LYM)
- 2- MIDDLE SIZE (Orta Büyüklükteki Hücreler) (MID)
 - Monosit
 - Eozinofil
 - Bazofil
- 3- GRANULOSİT (NÖTROFİL) (GRAN)

4.1 Lökosit (Beyaz kan hücresi) Alt Hücre Gruplarının
Sayımını Sağlayan Devrenin Blok Diyagramı.

Lökosit alt hücre gruplarının Cell-Dyn 900 cihazının yardımıyla sayılabilmesini sağlayan devrenin blok diyagramı Şekil-4.1'de gösterilmektedir.



Şekil-4.1 Lökosit alt hücre grupları sayan devrenin blok diyagramı.

Ayrıca, tasarlanan bu devrenin ayrıntılı gösterimi, bu bölüm sonunda yer almaktadır.

Cell-Dyn 90 Kan analizör cihazından gelen, gerçekleştirilen sistemin analog giriş işaretleri, lökosit hücrelerinin cihazın ölçüm deliğinden geçmesi sonucunda oluşan işaretlerdir. Gelen bu analog işaretler, belirli referans gerilim seviyelerine ayarlanmış olan diskriminatör (karşılaştırma devresi) devrelerinde karşılaştırılarak aygırlanmaktadır. Burada bahsedilen referans gerilim seviyeleri; lökosit alt hücrelerinin büyüklüklerine karşılık düşen gerilim seviyeleridir. Böylece; lökosit hücreleri 3 ana alt gruba ayrılmaktadır. Her bir gruba ait olan diskriminatör çıkışları, gelen analog işaretlerin puls sürelerine bağlı olarak sayım çıkışı veren zamanlama devrelerine uygulanmaktadır. Çıkışları aktif hale gelen zamanlama devreleri, sayım yapılması amacıyla sayıcı devrelerini sürmektedir.

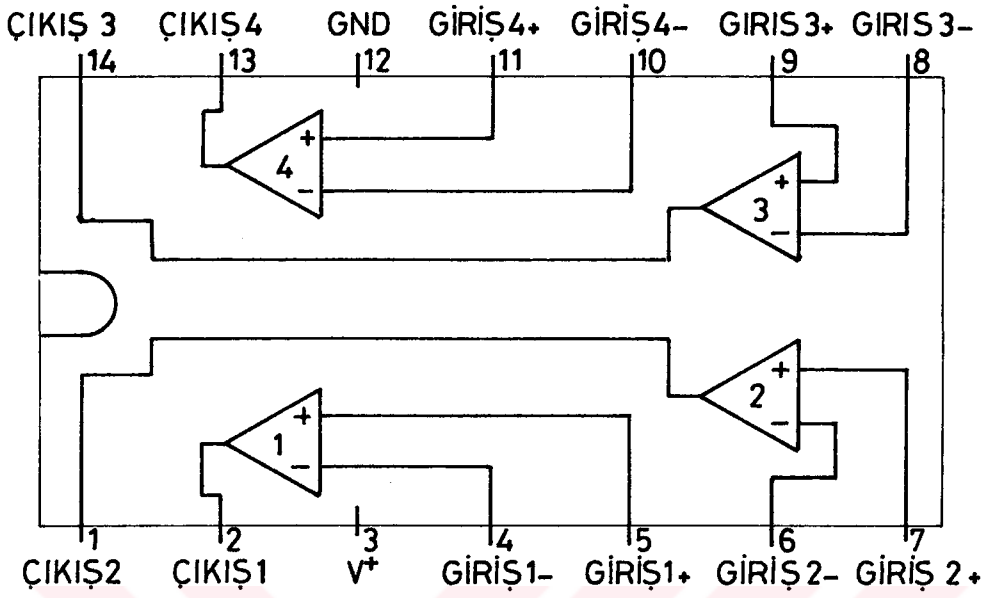
Daha sonra, herbir lökosit alt hücre grubuna ait olan sayıcı devreleri bir gösterge devresini sürmektedir.

Ayrıca, sayım işleminin cihazın yaptığı sayım işlemi ile senkronize olması için, bu sayıcı devreleri bir resetleme devresi ile kontrol edilmektedir. Resetleme devresinin girişine gelen işaret, Cell-Dyn 900 cihazında bulunan ölçüm sisteminden gelmektedir. Sonuçta da hücre gruplarının sayıları, grup numaralarına bağlı değişmeli olarak gösterilmektedir.

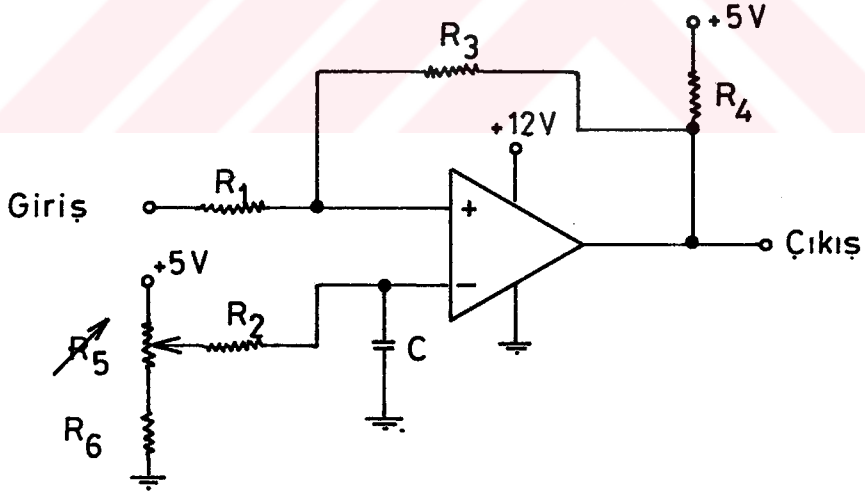
4.2: Diskriminatör (Karşılaştırıcı) Devresi

Şekil-4.1'de yer alan blok diyagramda kullanılan

diskriminatör devresinin devre açılımları Şekil-4.2 ve Şekil-4.3'de gösterilmektedir.



Şekil-4.2 Diskriminatör devreleri (LM339) [11].



Şekil-4.3 Diskriminatör devre diyagramı.

Diskriminatör devreleri, girişlerine gelen lökosit hücrelerine ait analog işaret seviyelerini kendi referans gerilim seviyeleri ile karşılaştırmaktadırlar. Bu diskriminatörlerin referans gerilim seviyeleri de, lökosit hücrelerinin ayrıştırılacak olan üç ana alt grup hücre büyüklüklerine karşılık olarak ayarlanan seviyelerdir.

Giriş Bölümü'nde de anlatıldığı gibi, lökosit hücreleri üç ana alt grup halinde incelenmektedir;

- 1- Lenfosit (LYM)
- 2- Orta büyüklükteki lökosit hücreleri (MID)
 - Monosit
 - Eozinofil
 - Bazofil
- 3- Granülosit (Nötrofil) (GRAN)

Şekil-4.1'de blok diyagramı gösterilen devre yardımıyla, yukarıda bahsedilen üç grup lökosit hücresi sayılabilmektedir. Sonuçta elde edilen bu üç grup hücrenin toplamı, Cell-Dyn 900 cihazı tarafından sayılan lökosit hücre sayısını vermektedir. Bu yüzden, lökosit alt hücre gruplarını ayırt etmeye yarayan diskriminatör devrelerinin referans gerilim seviyelerinin, bu hücrelerin büyüklüklerine göre ayarlanması gerekmektedir. Bu Bölüm'de tasarlanan devrede kullanılan diskriminatörlerin referans gerilim seviyeleri de, lökosit alt hücre gruplarının büyüklükleri esas alınarak yaklaşık olarak ayarlanmıştır. Böylece, lökosit hücreleri 3 ayrı hücre grubuna ayrıştırılmıştır.

Cell-Dyn 900 Cihazı'nın üretimini yapmakta olan firmanın, lökosit alt hücrelerine ait büyüklükleri ve bunların gerilim seviyelerini tam olarak vermek istememelerinden dolayı, bu referans gerilim seviyeleri yaklaşık olarak

hesaplanmıştır.

Şekil-4.3'de gösterilen diskriminatör devresi, ilk olarak, girişine gelen işaret seviyesini kendi referans gerilim seviyesi ile karşılaştırmaktadır. Gelen işaretin seviyesi diskriminatörün referans seviyesi ile aynı ya da daha büyük olursa diskriminatör devresinin çıkışı aktif hale gelmektedir. Aksi taktirde, diskriminatör devresi herhangi bir çıkış işareti vermemektedir.

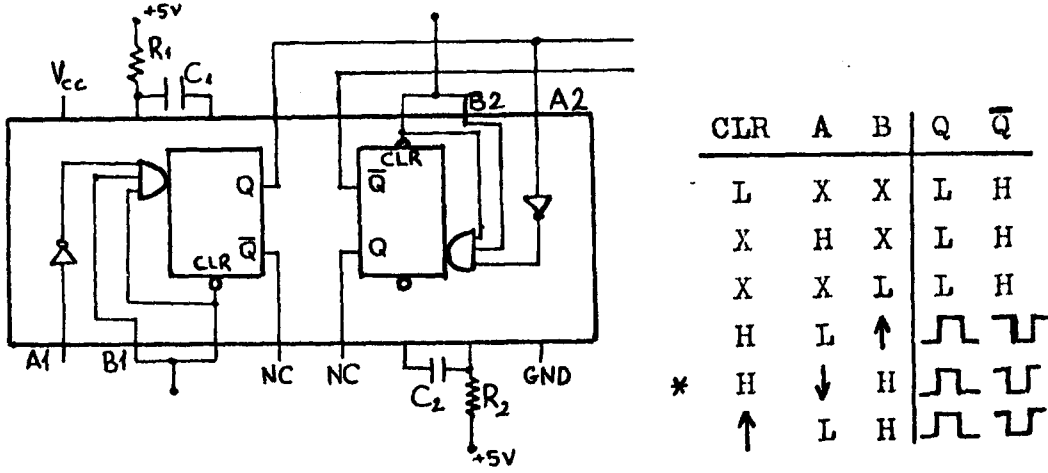
Diskriminatör devresinin referans gerilim seviyesi ayarlanabilir bir direnç (R_5) yardımı ile değiştirilebilmektedir. R_5 direnci istenen referans gerilim seviyelerini ayarlamak amacıyla Şekil-4.1'de belirtilen diskriminatör devreleri için 47K olarak alınmıştır. Devrenin daha hassas gerilim farklarını dedekte edebilmesi için de R_3 direncinin oldukça büyük olması gerekmektedir. Bu yüzden pratikte $R_3 = 2,2 \text{ M}$ şeklinde tasarlanmıştır. Diğer devre elemanları ise Cell-Dyn 900 cihazındaki diskriminatör elemanlarına benzer olarak $R_1 = 1,5 \text{ K}$, $R_2 = 12\text{K}$, $R_4 = 4,7\text{K}$, $R_5 = 220\text{K}$, $C = 0,1\mu\text{F}$ alınmıştır.

4.3. Zamanlama Devresi

Lökosit alt hücre gruplarını saymak amacıyla tasarlanan devrede, hatalı bir sayım yapmayı ve işaretlerin birbirlerine girişimlerini önlemek amacıyla zamanlama devreleri kullanılmıştır. Şekil-4.4'de zamanlama devresinin devre diyagramı gösterilmektedir.

Zamanlama devresinin A (A_1 veya A_2) girişini, diskriminatör devresinin çıkış işaretinin düşen kenarı

tetiklemektedir.



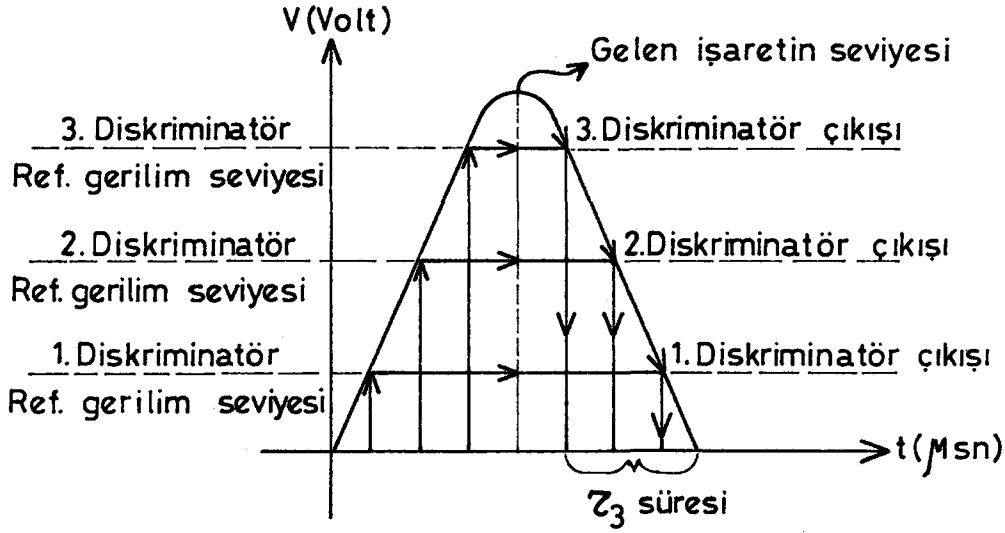
Şekil-4.4 Zamanlama Devresi (74LS123) [11].

Bu esnada, devrenin herhangi bir çıkış verebilmesi için, "Clear" (CLR) ucunun ve B (B1 veya B2) girişinin de lojik "high" seviyesinde olması gerekmektedir. Bu şartlar sağlandığı taktirde, Şekil 4.4'de gösterilen zamanlama devresi τ süreli bir çıkış darbesi (τ) oluşturmaktadır. Devrenin zaman sabiti olarak adlandırılan τ süresi, devrenin R ve C elemanları tarafından belirlenmektedir.

$$\frac{\tau}{0.69} = R1.C1 = R2.C2 = R3.C3 \quad (4.1)$$

Ayrıca, belirtilen τ süresinin , herhangi bir hatalı sayımı veya işaret girişimini engellemek amacıyla oldukça doğru seçilmesi gerekmektedir. τ süresinin neye bağlı olarak seçilmesi gerektiği Şekil-4.5'de gösterilmektedir.

Örneğin, Şekil-4.5'de gösterildiği gibi, her üç diskriminatörün de referans gerilim seviyelerini aşan giriş işaretinin düşen kenarı, tüm diskriminatörlerin çıkışlarını aktif hale getirmektedir. Halbuki bu durumda, sadece 3. diskriminatör çıkışının sayılması gerekmektedir. 1.ve 2.



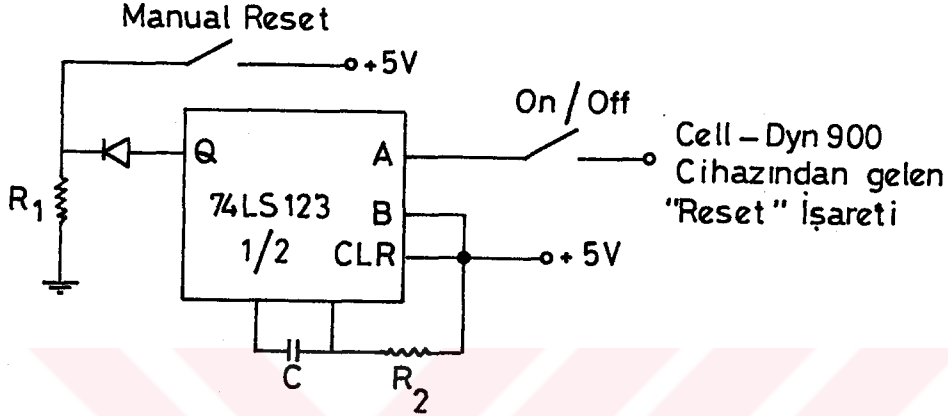
Şekil-4.5 τ Devre zaman sabitinin belirlenmesi.

diskriminatörlerden doğabilecek sayım hatalarını yok etmek amacıyla τ_3 (3. zamanlama devresinin zaman sabiti) süresinin, en fazla giriş işaretinin darbe süresinin yarısına eşit olacak şekilde alınması gerekmektedir. Böylece, 3. zamanlama devresinin τ_3 süreli sayım çıkışı sırasında, Şekil-4.1'de gösterilen lojik AND kapısı yardımıyla 1. ve 2. zamanlama devrelerinin çıkışları sıfırlanmaktadır. Ayrıca, bütün bunlara bağlı olarak, gelen lökosit işaretlerinin darbe sürelerinin de kesin olarak bilinmesi gerekmektedir. Çünkü her bir lökosit alt hücre grubunun darbe sürelerinin bilinmesi zamanlama devrelerinin zaman sabitlerinin belirlenmelerinde kolaylık sağlamaktadır (τ_1 , τ_2 , τ_3).

Sonuçta, her bir lökosit alt hücre grubuna ait olan τ süreli sayım işaretleri, yine her bir lökosit alt hücre grubuna ait olan sayıcı devrelerine gönderilmektedir.

4.4 Resetleme (Sıfırlama) Devresi

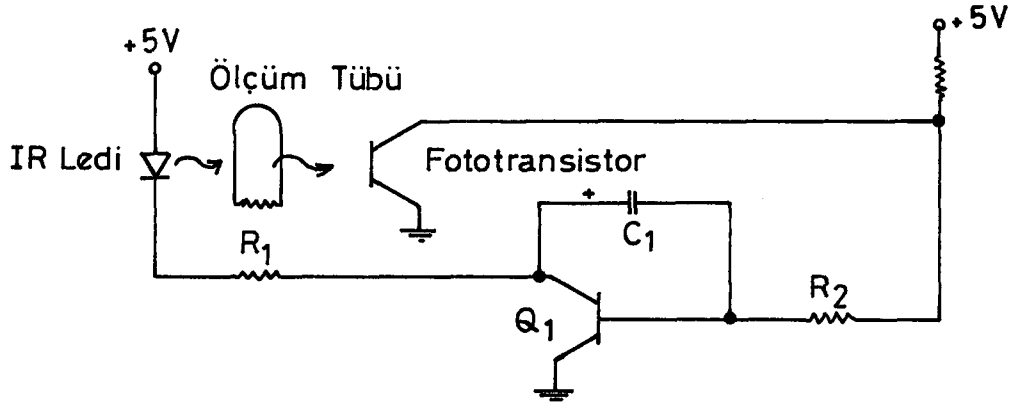
Bu bölümde tasarlanan devrede, sayım işlemlerinin sıfırlama ve başlangıç kontrolleri Şekil-4.6'da gösterilen devre yardımı ile yapılmaktadır.



Şekil-4.6 Resetleme devresi.

Şekil-4.6'da da gösterildiği gibi, devrenin "B" ve "CLR" girişleri lojik "high" seviyesindedir. Devrenin A girişine "Reset" işareti ulaştığı taktirde, o ana kadar yapılan sayımlar sıfırlanarak sayma işlemi başlatılmaktadır. Sayma işleminin başlaması için gelen "Reset" işareti Cell- Dyn 900 cihazının ölçüm sisteminden alınmaktadır. Ayrıca, Şekil-4.6'daki devrenin girişine konulan on/off anahtarı sayesinde de, sayım işlemi bittikten sonra oluşabilecek ya da gelebilecek "Reset" işaretlerini kontrol etmek mümkün olmaktadır.

Şekil-4.7'de, Cell-Dyn 900 Cihazı'ndan alınan "Reset" işaretinin alındığı devre gösterilmektedir.



Şekil-4.7 Cell-Dyn 900 "Resetleme Devresi" [10].

Cell-Dyn 900 cihazında sayım işlemini "başlatma" ve "bitirme" komutları, Şekil-4.7'de gösterilen devre yardımı ile verilmektedir. Sıvının ölçüm tüpünden geçmesine bağlı olarak ışık transferi neticesinde ölçüm tübünün alt ve üstünde bulunan fototransistör çıkışları "başlama" ve "bitiş" işaretlerini oluşturmaktadır. Ayrıca, ışık kaynağının yoğunluğunu ayarlayan bir geri besleme devresi de sisteme eklenmiştir.

4.5 Sayıcı ve Gösterge Devreleri

Lökosit alt hücre gruplarını saymak amacıyla tasarlanan devrede kullanılan sayıcılar BCD kodlama ile sayım işlemlerini gerçekleştirmektedirler. Bu amaçla onlu sayıcı (4017) ve bunların bağlandığı BCD (Binary Coded Decimal) sayıcılar (4510) kullanılmıştır.

Tasarlanan devrenin ortak katodlu ledlerden oluşan gösterge devresinde, hücre grup no'sunu gösteren bir led de

bulunmaktadır. Bu yüzden hücre grup no'sunu belirleyen bir "grup select" devresi sisteme eklenmiştir. Böylece, grup no'ları ile herbir lökosit alt hücre gruplarının sayıları değişimli olarak gösterilebilmektedir. Şekil-4.8'de, bu bölümde tasarlanan devrede kullanılan sayıcı ve gösterge elemanlarının devre diyagramları gösterilmektedir [11].

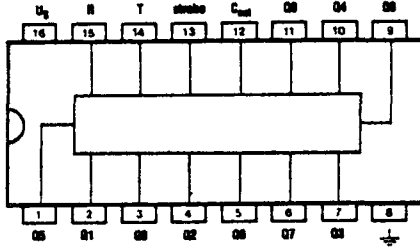
4.6 Lökosit (Beyaz Kan Hücresi) Alt Hücre Gruplarının Sayımını Sağlayan Devrenin Tüm Elemanları ile Gösterimi

Şekil-4.1'de blok diyagramı gösterilen devrenin tüm elemanları ve bunların elde edilen pratik değerleri ile gösterimi Şekil-4.9'da yer almaktadır.

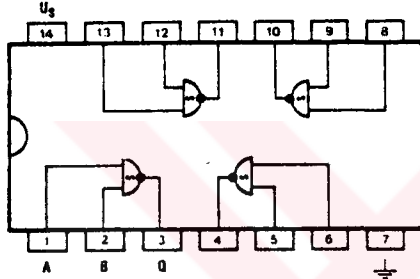
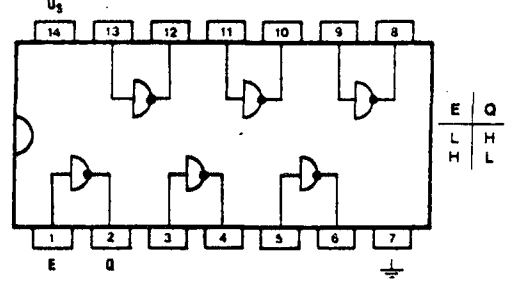
Şekil-4.9'da tasarlanan devrede, lökosit hücrelerinin Cell-Dyn 900 cihazında bulunan ölçüm deliğinden geçmesiyle oluşan analog işaretler giriş işaretleri olarak alınmaktadır. Ayrıca, bu lökosit hücrelerinin 3 ana alt gruplarını ayırmak amacıyla de 3 adet seviye diskriminatörü kullanılmaktadır. Diskriminatörlerin referans gerilim seviyeleri, bu 3 alt grup lökosit hücrelerinin büyüklüklerine göre ayarlanmaktadır. Ancak, daha önce de belirtildiği gibi, Cell-Dyn 900 cihazını üreten firma, lökosit hücrelerinin ve gerilim seviyelerinin tam değerlerini vermek istemediğinden dolayı, bu değerler yaklaşık olarak alınmıştır. Ayrıca, yine buna bağlı olarak, zamanlama devrelerinin zaman sabitleri de, lökosit hücrelerinin darbe süreleri tam olarak bilinmediği için yaklaşık olarak hesaplanmıştır. Gelen analog işaretler osiloskopta incelenerek, bu işaretlerin darbe süreleri yaklaşık olarak bulunmuştur.

Diskriminatör devrelerinin girişlerine gelen analog işaretler, referans gerilim seviyeleri ile

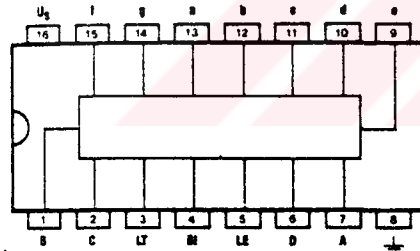
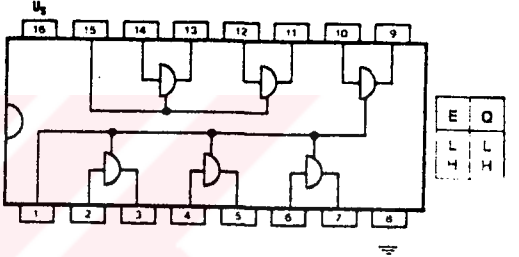
karşılaştırılmaktadır. İşaretlerin seviyeleri, referans gerilim seviyeleri ile aynı ya da daha büyük olursa, gelen işaretin referans gerilim seviyesini aştığı diskriminatör çıkışı, o lökosit alt hücre grubuna ait sayım işaretini zamanlama devresine göndermektedir.



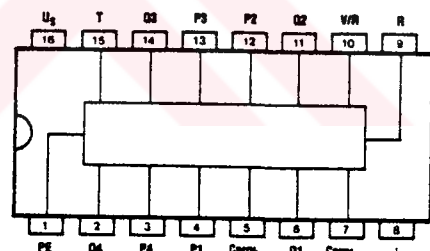
T	strobe	R	Fonksiyon
L	X	L	-
X	H	L	-
L	L	L	say
H	L	L	say
X	X	H	sıfırla



A	B	Q
L	L	H
L	H	H
L	L	H
H	H	L



LE	BI	LT	D	C	B	A	Gösterilen
X	X	L	X	X	X	X	8
X	L	H	X	X	X	X	sönük
H	H	H	X	X	X	X	tut
L	H	H	L	L	L	L	0
L	H	H	L	L	L	H	1
.	.	.	.	.	.	.	.
L	H	H	H	L	L	H	9
L	H	H	H	L	H	L	sönük
L	H	H	H	L	H	H	sönük
.	.	.	.	.	.	.	.
L	H	H	H	H	H	H	sönük



Carry-in	V/R	PE	R	Fonksiyon
H	X	L	L	dur
L	H	L	L	ileri say
X	L	L	L	geri say
X	X	H	L	yukle
X	X	X	H	sıfırla

Şekil-4.8 Soldan sağa sırasıyla; 4017, 4069, 4093, 4503, 4511, 4510 sayıcı ve gösterge devre elemanlarının devre diyagramları [11].

Diskriminatörlerin, girişteki işaret ile referans gerilim seviye farklarını en hassas şekilde sağlaması için Şekil-4.3'deki $R3/R1$ oranının oldukça büyük olması gerekmektedir. Bu yüzden $R3 = 2,2 \text{ M}$, $R1 = 1,5 \text{ K}$ olarak alınmıştır. Ayrıca, diskriminatörlerde, referans gerilim seviyelerini istenen değerlere ayarlayabilmek amacıyla 47K'lık trimpotlar kullanılmıştır.

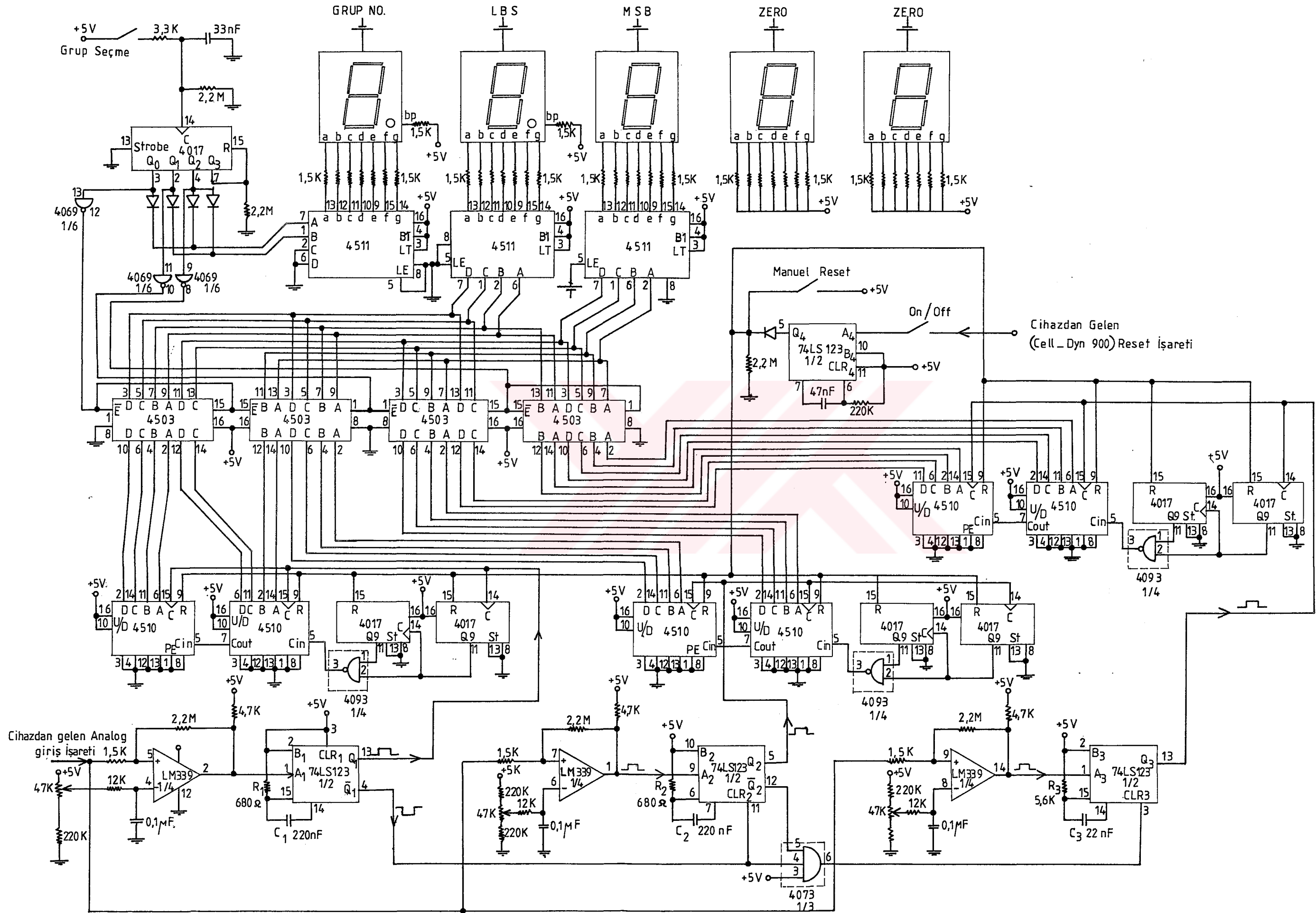
Diskriminatör çıkışları, lökosit alt hücre gruplarının doğru olarak ve girişimsiz sayılabilmeleri amacıyla zamanlama devrelerine bağlanmıştır. Girişleri diskriminatörlerin çıkış işaretlerinin düşen kenarları ($\downarrow$) ile tetiklenen zamanlama devreleri, zaman sabitleri (τ) süresince çıkış sayım darbeleri oluşturmaktadır. Zamanlama devrelerinin zaman sabitleri (τ_1, τ_2, τ_3) sırası ile $R1C1$, $R2C2$, $R3C3$ çarpımları ile belirlenmektedir. Bu yüzden, lökosit hücrelerinin analog işaretleri osiloskopta incelenerek, zaman sabitleri belirli değerler olarak alınmış (Gelen işaretin darbe sürelerine bağlı olarak) ve $R1$, $C1$, $R2$, $C2$, $R3$, $C3$ değerleri $\tau = 0,69 R.C$ 'den hesaplanmıştır. Burada, tasarlanan devrede $R1 = 680 \Omega$, $C1 = 220 \text{ nF}$, $R2 = 680 \Omega$, $C2 = 220 \text{ nF}$, $R3 = 5,6 \text{ K}$, $C3 = 22 \text{ nF}$ olarak alınmıştır. Bu arada, hatalı sayımı önlemek amacıyla bir AND kapısı kullanılmaktadır. Bu AND kapısı sayesinde, herhangi bir zamanlama devresinden τ süreli sayım darbesi çıktığında (Q çıkışı lojik "high" seviyesinde) diğer zamanlama devrelerinin çıkışları lojik "low" seviyesine çekilmektedir. Bilindiği gibi, zamanlama devresinin çıkış darbesi verebilmesi için, A girişinin düşen kenar ile tetiklenmesi, B ve CLR (Clear) girişlerinin de lojik "high" seviyesinde olması gerekmektedir. Böylece çıkışların sıfırlanması CLR (Clear) girişlerinin lojik "low" seviyesine çekilmesine bağlı olmaktadır.

Zamanlama devrelerinin çıkışları, her bir lökosit alt hücre gruplarının sayılabilmesi amacıyla o hücre grubuna ait olan sayıcı devresine gönderilmektedir. Lökosit sayımlarında birler ve onlar basamağı anlamsız hanelerdir. Çünkü, lökosit sayımları yüzlerlik sayımlar halinde değişmektedir. Bu yüzden sayıcı devrelerinde ikişer adet onluk sayıcı (4017) ve bunların sürdüğü BCD sayıcılar (4510) yer almaktadır. Her sayıcı devresinde, birinci onluk sayıcının ona kadar sayması bittikten sonra ikinci onluk sayıcının tam bir yüzlük sayması bir kapı devresi (4093) sayesinde gerçekleştirilmektedir. Böylece elde edilen yüzlük sayımlar, yüzler ve binler hanelerini belirlemek amacıyla BCD çıkışlar verebilen sayıcılara aktarılmaktadır (4510). Bu sayıcıların BCD çıkışları sürücüler (4503) ve kod çözücülerden geçilerek gösterge ledlerine aktarılmaktadır. Böylece, her lökosit hücre grubunun sayım değerleri gösterilmektedir.

Her lökosit hücre grubunun sayım sonuçlarını, değişimli olarak görebilmek amacıyla, bir "grup select devresi" (4017 ve 4069) sisteme eklenmiştir. Bu devre, evirici çıkışları vasıtası ile sürücülerini "enable" etmektedir. Girişine bağlanan bu switch tarafından, her hücre grubunun numarası ile sayım sonucu göstergelerde değiştirilmektedir.

Ayrıca, tasarlanan bu devrede, sayım işleminin sıfırlanıp tekrar başlayabilmesini sağlamak için, bir resetleme devresi bulunmaktadır (74LS123). Cell-Dyn 900 cihazından gelen sayım başlama işareti "reset" komutu vermek amacıyla kullanılmaktadır. Sayım işlemi bittikten sonra, okunan sonuç değerlerinin silinmemesi için de, girişe bir on/off anahtarı yerleştirilmiştir. Bunun yanında, sayım işleminde isteğe bağlı olarak sıfırlama yapılması, bu resetleme devresine bağlı olan bir switch ile kontrol edilmektedir.

Sonuç olarak; lökosit hücrelerinin 3 alt gruba ait hücre sayım sonuçları, her hücre grubuna ait ayrı sayıcı devreleri yardımı ile elde edilmektedir. Cell-Dyn 900 cihazı, toplam lökosit sayısını hesaplayabilmek için, istatistiksel çarpım elemanı kullanmaktadır. Bu yüzden, elde edilen lökosit alt hücre grup sayılarını topladığımızda, Cell-Dyn 900 ile hesaplanan toplam lökosit sonuçları elde edilmeyeabilmektedir. Bu sonuç doğal olarak kabul edilebilmektedir. Uluslararası standartlara göre, lökosit hücre sayım sonuçlarındaki ± 500 değişimler normal olarak kabul edilmektedir. Çünkü, lökosit hücreleri mikron mertebelerinde hücreler olduğu için, cihazın ve devrenin bulunduğu ortamdan ya da sulandırma solüsyonunun kirliliğinden dolayı çeşitli gürültüler oluşmaktadır. Ayrıca, ölçüm sistemindeki valflerin açılıp kapanmaları da çeşitli gürültülere ve sonucunda hatalı sayımlara neden olabilmektedir. Burada gerçekleştirilen ölçüm sisteminde oluşabilecek tüm hatalı ölçümler minimuma indirilmeye çalışılmıştır.



Şekil-4.9 Lökosit alt hücrelerini 3 grup halinde sayabilmek amacıyla tasarlanan devre diyagramı.

SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, kan hücrelerine ve kan hücre sayıcılarına ait olan çeşitli veriler incelenmiştir. Buna bağlı olarak, Cell-Dyn 900 kan analizör cihazının tüm ölçüm sistemi geniş şekilde ele alınmıştır.

Ayrıca, yine bu çalışmada, lökosit hücrelerinin sadece toplam sayımını yapabilen cihaz yardımı (Cell-Dyn 900) ile lökosit alt hücre gruplarının da sayılabilmesi gerçekleştirilmiştir.

Bunun için, lökosit hücrelerini 3 ana alt gruba ayırabilen bir elektronik devre tasarımı yapılmıştır. Bu devre yardımıyla; lenfosit, middle size (orta büyüklükteki lökosit hücreleri: monosit, eozinofil, bazofil) ve granülosit (nötrofil) hücre gruplarına ait sayım sonuçları elde edilmiştir. Ancak, Cell-Dyn 900 kan analizör cihazını üreten firmanın, lökosit alt hücre gruplarına ait referans değerlerini ve lökosit işaretlerinin darbe sürelerini kesin olarak vermek istememelerinden dolayı, bu değerler yaklaşık olarak hesaplanmıştır. Yapılan ölçümler neticesinde, 3 gruba ait sayım sonuçları elde edilmiş, toplandıklarında da toplam lökosit sayım sonuçları alınabilmektedir. Fakat, Cell-Dyn 900 kan analizör cihazı, toplam lökosit sayısını hesaplayabilmek için istatistiksel bir çarpım elemanı kullanabilmektedir. Bu yüzden, tasarlanan devrede elde edilen lökosit alt hücre sayım sonuçlarını topladığımızda, her zaman Cell-Dyn 900 cihazının bulduğu toplam lökosit sayımı ile aynı sonuç elde edilemeyebilmektedir.

Sonuç olarak, tasarlanan devre ile, lökosit hücrelerini sayabilen Cell-Dyn 900 cihazının, lökosit alt hücre gruplarını da sayabilmesi sağlanmıştır. Yalnız, lm sisteminin oldukça gürültüsüz ve uygun bir ortamda olması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- [1] GANONG, F. , Tibbi Fizyoloji, San Francisco, CA, (1971).
- [2] MOLDOVAN, A. , Photo-electric technic for the counting of microscopical cells, Science, 80:188, (1934).
- [3] WEBSTER, J.G. Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation, John Wiley and Sons, Vol.1, (1988).
- [4] BENDER, B.T., Principles of Chemical Instrumentation, University of Wisconsin, (1988).
- [5] COULTER, W.H., Instruction Manual to the Coulter Counter Model B, (1962).
- [6] KOEPKE, J., Laboratory Hematology, Edinburgh and London: Churchill-Livingstone, (1984).
- [7] GULATI, G.L., HYUN B.H., and ASHTON J.K., Lab.Med., 15:395-401 (1984).
- [8] WILLIAMS L.J., Cell Histograms: New trends in data interpretation and Cell classification, J. Med.Tech., 13:189-197, (1984).
- [9] MIALE J.B., Laboratory Medicine Hematology, 6th. Ed. St. Louis, G.V.Mosby, (1982).
- [10] SEQUOIA TURNER, Instruction Manual to the Cell-Dyn 900 Model, (1990).
- [11] CMOS 1 Dijital Veri Katalogu, ECA, (1985).

ÖZGEÇMİŞ

Cenk Alper, 1967 yılında Karabük/ZONGULDAK'da doğmuştur. 1984 yılında Karabük D.Ç Lisesi'nden mezun olduktan sonra, aynı yıl İstanbul Teknik Üniversitesi Elektrik-Elektronik Fakültesinin Elektronik ve Haberleşme Bölümüne girmiş, 1988 yılında da mühendis ünvanı almıştır. 1988 Güz döneminde, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Elektronik ve Haberleşme Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Öğrenimine başlamıştır.

Yüksek Lisans öğrenimi süresince, Profilo TELRA A.Ş., SESA A.Ş. gibi şirketlerde çalışmış olan CENK ALPER, halen KAVALA MEDİKAL A.Ş.'de görev yapmaktadır.