الاختبارات الفيزيولوجية لجهاز الدوران

1- أخذ عينات الدم من الحيوانات وتحضيرها للاختبارات العملية:

إنّ ســـحب الدم من الحيوان ذو أهمية كبيرة في دراســـة مكونات الدم الكمية والاختبارات الفيزيولوجية النوعية، لذلك لابد من معرفة طرق جمع عينات الدم من الحيوانات، نذكر من هذه الطرق:

- **سحب الدم من الوريد الوداجي:** وتعتبر من أفضل الطرق وتستخدم عندما يراد الحصول على كميات كبيرة من الدم (كما في المجترات والخيول).
- **سحب الدم من الذيل أو من الأذن:** تستخدم عندما يراد الحصول على كمية قليلة من الدم (كما في الأرنب والخنازير).
- **سحب الدم من وريد الجناح** أو من **العرف** أو **الداليتين** في الطيور.

2- أهم المضادات المانعة لتخثر الدم:

في بعض الأحيان نضـــطر لتحليل عينة الدم التي حصـــلنا عليها بعد فترة زمنية معينة، لذلك نضيف مواد مانعة لتخثر الدم قبل عملية أخذ العينات ثم تحفظ هذه العينات في البراد على درجة حرارة +4°م.

إنّ إختيار المادة المانعة للتخثر وتحديد الكمية الكافية منها له أهمية كبيرة في دراســـة مكونات الدم.

من أهم المواد المانعة لتخثر الدم نذكر مايلي:

أولاً: مادة الــ (E.D.T.A): ملح جيد وفعال في منع تخثر الدم، ويوجد من هذه المادة ثلاثة أملاح هي:

1- ثنائي البوتاسيوم وهو سهل الانحلال في الماء.

2- ثنائي الصوديوم.

3- ثنائي الليثيوم والذي ينحل بصعوبة في الماء.

ويعود التأثير المانع لتخثر الدم للـ E.D.T.A لاتحادها الجيد مع كاتيونات الكالسيوم. ويتم تحضير المحلول المانع لتخثر الدم بإذابة 9 غ من NaCl في ليتر واحد ماء مقطر، ثم يذاب فيه 100 غ من بودرة (E.D.T.A).

ثانياً: أوكزالات الأمونيوم والبوتاسيوم:

يتألف هذا المحلول من 12غ أوكزالات الأمونيوم و8غ أوكزالات البوتاســـيوم، تذاب في الماء المقطر ثم يكمل الحجم الى (1) ليتر ماء مقطر.

ثالثاً: محاليل السيترات:

ونذكر منها سيترات الصوديوم الثلاثية التي توجد بأحد التركيبين:

التركيب الأول: ($Na_3C_6H_5O_2.2H_2O$)

والتركيب الثاني: ($Na_3C_6H_5O_7.11H_2O$).

ويتم تحضير المحلول المانع لتخثر الدم بإذابة 31.3 غ من المركب الاول أو38.1غ من المركب الثاني في الماء المقطر، ثم يكمل الحجم إلى (1) ليتر ماء مقطر. بالإضـــافة لذلك يوجد محلول سترات الدكستروز الحامضي الذي يعتبر أفضل من سترات الصوديوم الثلاثية حيث أنه يحافظ على شكل كريات الدم الحمر لفترة طويلة، ويحضر هذا المحلول كما يلي:

يذاب 1.32 غ من سترات الصوديوم الثلاثية و0.48 غ من حمض الليمون و1.40 غ ديكستروز في الماء المقطر، ثم يكمل الحجم إلى (1) ليتر ماء مقطر.

4- الهيبارين Heparin: وتعتبر الهيبارين مادة مانعة للتخثر وذات فعالية في منع تخثر الدم، لكنه يعتبر غالي الثمن.

بشكل عام يضاف حجم واحد من المحاليل المانعة لتخثر الدم إلى من (4-5) حجوم من الدم.

أسباب انحلال عينة الدم:

من المهم التعرف على أسباب انحلال عينة الدم، لتجنب خسارة العينة المأخوذة من جهة ولتفادي هذه الأسباب من جهة ثانية.

العديد من الأســـباب يمكن أن تؤدي لانحلال الدم قبل أخذ العينة أو أثناء أخذ العينة أو حتى بعد أخذ العينة.

أ- قبل أخذ العينة:

1- وجود أمراض أو نتيجة التحسس لبعض الأدوية.

2- شذوذ في بنية كريات الدم الحمراء.

3- أمراض الهيموغلوبين الوراثية (كالمنجلية والتلاسيمية).

4- نقص بعض الأنزيمات.

ب- أثناء أخذ العينة:

1- وجود أثر من الماء أو الكحول في المحاقن أو الأنابيب.

2- بزل الدم بسرعة يؤدي إلى تكوين زبد وتفجير الكريات الحمر.

ت- بعد أخذ العينة:

1- ضخ الدم بقوة من المحاقن إلى الأنابيب.

2- عدم نزع الإبرة قبل ضخ الدم.

3- وجود أثار من الماء والكحول في أنابيب الجمع.

4- وضع عينات الدم في مكان بارد وتركه يتجمد أو وضعه في مكان ساخن.

رابعاً: دواعي أخذ عينات الدم :

يتم أخذ عينات الدم من الحيوان في عدة حالات نذكر منها الحالات التالية:

1- ظهور اضطرابات غذائية وهضمية.
2- الكشف عن بعض الأمراض غير معروفة الأسباب.
3- تلون الأغشية المخاطية بلون غير صحيح.
4- تورم العقد الليمفاوية.
5- تضخم الكبد والطحال.
6- تلون البول باللون الأحمر المدمى.
7- الاشتباه بطفيليات الدم.
8- أخذ فكرة عامة عن حالة الحيوان الصحية.

خامساً: الأدوات اللازمة لأخذ عينات الدم:

1- أنابيب اختبار مع حواملها وسدادات لقفلها.
2- إبر معقمة لسحب الدم.
3- كحول 70% وقطن قطبي ومقص.
4- مادة مانعة لتخثر الدم مثل الهيبارين.
5- وعاء يحتوي على ثلج مبشور وملح الطعام لنقل عينات الدم.

سادساً: الطريقة العملية لسحب الدم:

إذا كان الحيوان يمتلك غطاء صـــوفي أو شـــعري كثيف كالأغنام والماعز أو كان يمتلك ريشـــاً كالطيور، فيتم قص أو إبعاد هذا الغطاء عن مكان أخذ العينة الذي قد يشـــكل عائقاً للرؤية الجيدة، والوصول الصحيح للوريد الوداجي.

أما إذا كان الوريد الوداجي واضحاً (كما في الأبقار والخيول) فيتم مسح الجلد بقطن مبلل بالكحول، ثم يوخز الجلد بالإبرة المعقمة ويتم ثقب الوريد الذي نشعر به نتيجة مقاومته الضعيفة عند اختراق الإبرة له بزاوية 45 ° م.

بعد الحصـــول على عينة الدم المطلوبة يطهر مكان الوخز، ثم تقفل الأنابيب بســـدادة أو بالقطن ويدون عليها جميع البيانات المطلوبة مثل رقم العينة رقم الحيوان وجنســه وســلالته وتاريخ أخذ العينة... ثم توضـــع العينات مع حواملها في الوعاء المخصـــص لذلك وتنقل بهدوء إلى المخبر خلال (1-2) يوم كحد أقصـى لإجراء الاختبارات اللازمة أو تحفظ في البراد على درجه حراره +4°م.

سابعاً: دراسة بعض الاختبارات الفيزيولوجية الجهاز الدوري:

من المعلوم أن الدم يتكون من المصـورة (البلازما) وخلايا دموية. المصـورة عبارة عن سـائل عديم اللون كما في القطط والكلاب أو أصـــفر في بعض الحيوانات الأخرى، وهذا يتوقف على سماكة طبقة البلازما.

أما الخلايا الدموية فهي:

1- الكريات الحمر:

عند الطيور والبرمائيات والأســماك والزواحف تكون خلايا بيضـــوية الشـــكل ومحدبة من الجانبين ولها نواة. أما في الثدييات فتكون الكريات الحمر عديمة النواة ولها شـــكل قرص مقعر الجانبين ماعدا الجمل واللاما فشـــكلها بيضـــوي ومحدبة من الجانبين وليس لها نواة، ويقدر عددها بالمليون في 1 مم^3 من الدم.

2- **الكريات البيض:**

تقسم الكريات البيضاء إلى:

- الكريات البيضاء المحببة: وتقسم إلى:

أ- كريات معتدلة تصـبغ بالصـبغات الحامضـية والقاعدية، وتبلغ نسـبتها (60-70%) من الكريات البيض, نواتها مقســمة إلى (2-5) فصـــوص. لها القدرة على الحركة الأميبية (الشكل 1).

الشكل (1): كرية بيضاء محببة متعادلة

ب- حامضـــية (أيوزينات): تتلون بالملونات الحامضـــية باللون الوردي (مثل صـــبغة الأيوزين)، كبيرة الحجم ونسبتها (1-4%) من الكريات البيض، نواتها ذات فصين. يزداد عددها عند الإصابة بالطفيليات والحساسية ويقل عند الاجهاد.

ت- كريات قاعدية: محبة للصـــبغات القاعدية مثل أزرق المثيلين, نواتها كبيرة ومفصصة إلى فصيصين بشكل غير واضح لا تميل للحركة الزائدة، تبلغ نسبتها حوالي (0.5-1%) من الكريات البيض.

- كريات بيض غير محببة تقسم إلى:

1- كريات ليمفاوية: وتبلغ نســـبتها (20-25%) من الكريات البيض، نواتها كبيرة تشـــغل حيزاً كبيراً من الخلية.

2- وحيدة النواة: من أكبر الكريات البيض حجماً لها القدرة على الحركة الأميبية والبلعمة.

ويقدر عدد الكريات البيض بالألاف في 1 مم^3 من الدم.

3- الصـــفائح الدموية: هي أجســـام صـــغيرة بيضـــاوية أو قرصـــية الشـــكل أما في الطيور والأسماك فتحتوي على نواة، و يقدر عددها بالألاف في 1 مم^3 من الدم.

تجدر الإشـارة إلى أنَّ المصـل أو السـيروم: عبارة عن بلازما الدم منزوع منها مولد الليفين (الفبرينوجين).

تحضير المسحة الدموية (لطاخة أو فيلم):

الهدف من تحضـــير المســـحة الدموية هو العد التمييزي (التفريقي) للكريات البيضـــاء وتحديد النسبة المئوية لأنواع الكريات البيض.

الأدوات والمواد اللازمة:

1- عينة دم.
2- مجهر
3- شرائح زجاجية.
4- كحول.
5- ماء مقطر.
6- حامل زجاجي لحمل الشرائح
7- قطارة.
8- ملون ومثبت.

طريقة التحضير:

1- نضـــع نقطة دم على طرف شـــريحة زجاجية نظيفة وجافة من طبق بتري باســـتخدام قضيب زجاجي.
2- نضع شريحة زجاجية ثانية نظيفة وجافة على الشريحة الأولى المحتوية على نقطة الدم بزاوية 45°م بحيث تجعلها تحتضن نقطة الدم.
3- نسـحب الشـريحة العلوية المائلة إلى الأمام ببطء وبخفة حتى نهاية الشـريحة الأولى مع مراعاة عدم الرجوع بالشـريحة العلوية إلى الخلف ثانية لتلافي تكسـر كريات الدم. كما يراعى أن تكون السحبة رقيقة وغير متقطعة.
4- نجفف الشريحة بتركها في هواء الغرفة وذلك بوضعها على الحامل الزجاجي.
5- عملية التلوين والتثبيت:

هناك طرق كثيرة لإجراء عملية التلوين والتثبيت، وسنتبع هنا إحدى الطريقتين التاليتين:

أولاً: طريقة صبغة May-Grunwald وصبغة جيمسا Giemsa:

1- ضـع على الشـريحة الدموية حوالي 10 نقط من صـبغة **May-Grunwald** بشـرط تغطية كامل سطح الشريحة، ثم تركها لمده (3) دقائق مع مراقبة عدم جفاف الصبغة على الشريحة.
2- أضف إلى الشريحة الدموية حوالي (10) نقط ماء مقطر وامزجها مع الصبغة.
3- جفف الشـــريحة لمدة (1-2) دقيقة، ثم تخلص من بقية الصـــبغة الممزوجة بالماء باستخدام ورق ترشيح.
4- أضف إلى الشريحة الدموية (10) نقاط من صبغة جيمسا، واتركها لمدة 10 دقائق ثم أغسل الشريحة بالماء المقطر وجففها بالهواء.

ملاحظة (1): صبغة May : عبارة عن محلول الأيودين وأزرق الميثيلين في الميتانول، دورها تثبيت وتلوين العناصر المحبة للحموضة والصبغات المتعادلة للكريات البيض.

ملاحظة (2): صـــبغة جيمســـا: عبارة عن أزرق الميتيلين مخفف يلون النواة وأقســـام الكريات البيض المحبة للقلوية.

ب- طريقة ثانية لصباغة المسحة الدموية باستخدام صبغة ليشمان:

1- نضع الشرائح على حامل الشرائح بحيث تكون طبقة الدم إلى الأعلى.
2- نضع طبقة ليشمان فوق طبقة الدم حتى تغطي الشريحة الزجاجية.
3- تترك الصبغة لمده من (1.5-2) دقيقة.
4- نضـيف كمية من الماء المقطر فوق الصـبغة بحيث تسـتطيع الشـريحة الزجاجية احتوائه دون أن يسكب من الحواف، فنحصل بذلك على تخفيف للصبغة يعادل (2:1 أو 1:1).
5- نسحب الصبغة المخففة بواسطة ماصة، ثم نعيد الصبغة إلى الشريحة مما يساعد على خلط الصـبغة بشـكل جيد مع الماء. وإذا كان التخفيف صـحيحاً يلاحظ طبقة خضـراء معدنية اللون رقيقة تغطي الصبغة المحددة.
6- تترك الصبغة الممددة على المسحة الدموية لمده من (10-15) دقيقة.
7- تزال الصبغة بعد ذلك بالماء المقطر (غسيل الشريحة) دون فرك أو حك.

8- نمسح الماء عن الشريحة بورق شفاف وندعها تجف بالهواء دون استخدام الحرارة.

ملاحظة (1): نستمر بالغسيل بالماء المقطر حتى يحدث التمييز بين الألوان وتأخذ طبقة الدم اللون الأحمر البنفسجي.

ملاحظة (2): إذا أردنا تثبيت المسحة الدموية لفترة زمنية طويلة نغطي المسحة الدموية بساترة زجاجية باستخدام بلسم كندا من أجل لصق الساترة.

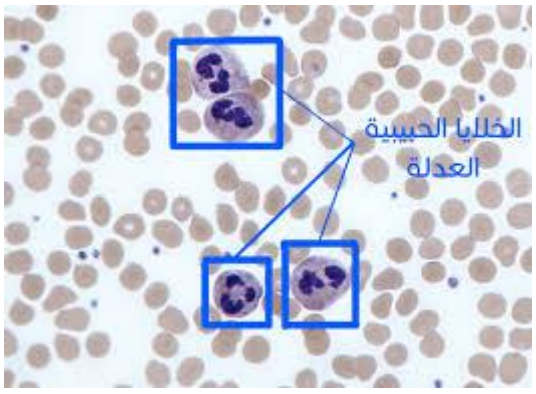
بعد صبغ المسحة الدموية نقوم بفحص الشريحة على العدسة الزيتية (X100) بحيث نخفض العدسة الزيتية حتى تغطس في نقطه الزيت، ثم نحاول إيجاد الكريات بشكل واضح.

وهناك ثلاث طرق من أجل تمييز (100) كرية بيضاء هي:

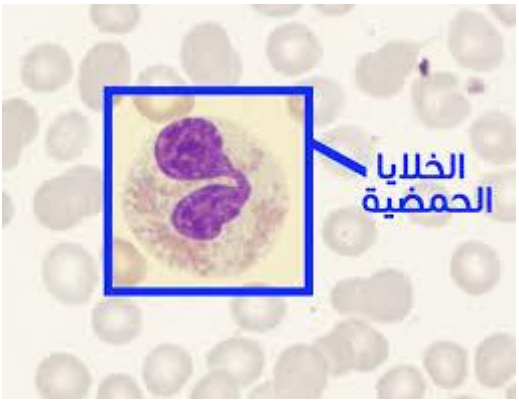
1. الطريقة الطولية.
2. الطريقة العرضية.
3. طريقة الخط المنكسر.

مثال تطبيقي:

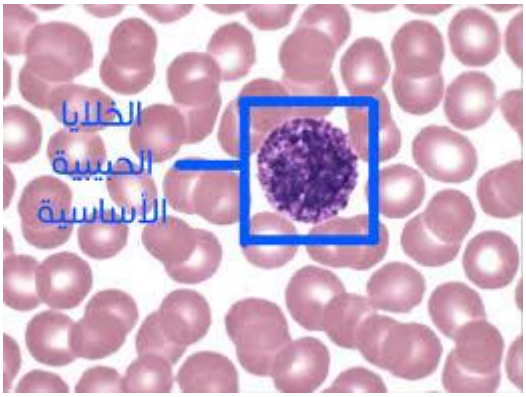
افحص الشريحة الدموية التي قمت بتحضيرها تحت المجهر وتعرف على الخلايا الدموية (الأشكال 2, 3, 4, 5 و6)، ثم ارسمها وقارن بينها وبين الأشكال التالية: وتعرف على نسبها من الجدول رقم (1).



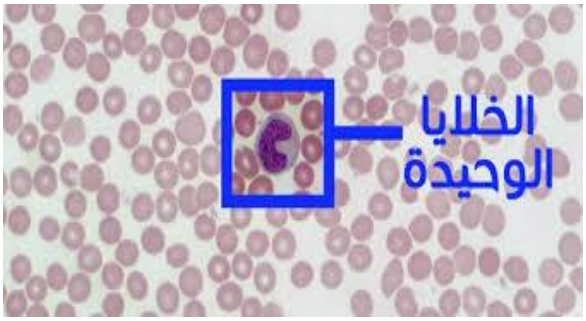
الشكل (2): رسم تخطيطي للخلايا الحبيبية المعتدلة.



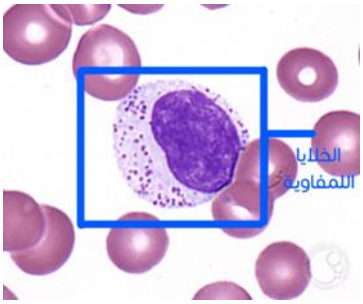
الشكل (3): رسم تخطيطي لشريحة دموية مبين فيها الكريات الحمراء وكرية بيضاء حبيبية حامضية



الشكل (4): شريحة دموية تظهرفيها كرية حبيبية قاعدية



الشكل (5): شريحة دموية تظهر فيها كرية بيضاء غير محببة وحيدة النواة



الشكل (6): رسم تخطيطي يبين الخلايا الليمفاوية.

الجدول (1): جدول يوضح الصيغة الكريوية في الحيوانات الزراعية.

نوع الحيوان الصـــيغة % لكل مل	خيول	أبقار	أغنام	ماعز	دجاج	أرانب	كلاب
معتدلة متوسط	75-35 54	45-15 28	50-10 30	48-30 36	45-20 30	50-8 30	77-60 70
حامضية متوسط	12-2 5	20-2 9	10-1 4.5	8-3 5	8-2 5	3-1 2	10-2 4
قاعدية متوسط	3-0 0.5	2-0 0.5	3-0 0.5	2-0 0.5	5-1.5 3	3-0.5 2	1-0.1 نادرة
ليمفاوية متوسط	50-15 30	75-45 58	75-40 62	75-50 55	75-45 60	72-60 60	30-12 20
وحيدات متوسط	10-2 5	7-2 4	6-1 3	4-1 2.5	4-1 2	4-1 2	10-3 5

فصل عناصر الدم:

يقصد بفصل مكونات الدم تقدير ما يسمى بحجم الهيماتوكريت، أي معرفة نسبة العناصر الخلوية في 100 مل من الدم بعد تثفيله.

يقاس الهيماتوكريت بإحدى الطريقتين التاليتين:

1- **طريقة ونتروب:** يستخدم فيها أنبوبة خاصة تسمى أنبوبة ونتروب وهي أنبوبة شعرية مدرجة من (0-10) وكل تدريجة مقسمة إلى عشر تدريجات.

طريقه العمل:

نأخذ عينة الدم مضاف إليها مانع تخثر ونثفلها في الأنبوبة حتى العلامة 10 ويجب عدم تكون فقاعات هوائية، ونثفلها لمدة (15-30) دقيقة بمعدل 3000 دورة/بالدقيقة وبعد نهاية عملية الطرد المركزي نقرأ حجم المواد الخلوية المترسبة وكذلك حجم الدم الكلي فنحصل على قيمة الهيماتوكريت بالمئة.

والجهاز القارئ الذي يعطي النسب بين خلايا الدم والبلازما عبارة عن صفيحة معدنية مستطيلة مدرجة من (0-100) ويوجد على الصفيحة حامل بلاستيكي في وسطه ميزابة توضع فيها الأنبوبة الشعرية بحيث تنطبق بداية الكريات الحمراء على الخط الأسود السفلي (خط الصفر) ثم نضع بداية البلازما من الأعلى على الخط الأسود العلوي (خط المائة). بعد ذلك نقرأ نسبة المواد الخلوية في الدم وبذلك يكون قد تم تقدير قيمة الهيماتوكريت.

2- **طريقة أنابيب الهيماتوكريت الشعرية:** تم استخدامها في الفترة الأخيرة بشكل شائع لقياس حجم الهيماتوكريت، وهي أنابيب شعرية دقيقة طولها (75) مم وقطرها (1) مم، ومفتوحة من الطرفين ومطلية جدرانها الداخلية بالهيبارين.

- طريقة العمل:

نملأ $\frac{3}{4}$ الأنبوب بالدم ويسد من أحد طرفيه بالشمع أو بالمعجونة، بعد ذلك نرقم الأنابيب ونضعها في المثفلة بحيث تكون متناظرة. بعد ذلك يتم التثفيل لمدة (3-5) دقائق بسرعة (12-14) ألف

دورة/ الدقيقة. نقرأ قيمة الهيماتوكريت على جهاز خاص يعطينا القراءة مقدرة بالمئة. وإذا قسمنا حجم الهيماتوكريت النهائي على 3 نحصل على كمية الهيموغلوبين.

القارئ في جهاز تثفيل أنابيب الهيماتوكريت:

بعد نهاية التثفيل، يفك لولب الغطاء الدوار ثم نضع قرص التقييم في الموضع الملائم من خلال مسك القرص وتدوير الصرة المركزية إلى أن يتطابق الخط (5%) مع النقطة الدنيا لعمود الكريات الحمراء، ثم نمسك الصرة المركزية والصفيحة النابذة ويتم تدوير قرص التقييم إلى أن يتطابق مع خط (100%) مع الحد الأعلى لعمود السائل. بعد ذلك نقرأ قيمة الهيماتوكريت في النهاية العليا لعمود الكريات الحمراء.

وبذلك نكون قد تعرفنا على عناصر الدم وهي الأتية:

1- طبقة سفلى ذات لون أحمر (كريات حمراء).
2- طبقة وسطى فوق الكريات الحمراء ذات لون مائل للبياض ورقيقة جداً هي الكريات البيضاء والصفائح الدموية.
3- طبقة عليا وهي عبارة عن سائل شفاف إلى أصفر.