

تجارب على الدم

عدّ الكريات الحمراء:

تشكل الكريات الدموية الحمراء الكتلة الأساسية لخلايا الدم، وهي عند الثدييات صغيرة الحجم، وتظهر تحت المجهر على شكل أقراص مدورة خالية من النواة ومقعرة من الجانبين أما عند الطيور والأسماك والبرمائيات والزواحف تبدو الكريات الحمراء على شكل خلايا كبيرة بيضوية الشكل ومحدبة من الجانبين ولها نواة.

يشكل اختبار عدّ الكريات الحمراء أحد أهم الاختبارات أثناء تحليل الدم للكشف عن وجود فقر دم أو نقص في الكفاءة التنفسية للكريات الحمراء أو غير ذلك من الاضطرابات الدموية. وتتم عملية عدّ الكريات الحمراء في الوقت الحاضر بواسطة أجهزة حديثة مثل جهاز عد الخلايا التلقائي (Auto cytometer) وهي أجهزة تعطي عدد كل ممن الكريات الحمراء والبيضاء إضافة إلى بعض عناصر الدم الأخرى، وتعتبر الاختبارات في هذه الأجهزة سريعة ودقيقة ولكنها كثيرة التكلفة في الاستعمال المخبري التعليمي. لذا يستعاض عنها بالطريقة التقليدية في عد الكريات الحمراء وذلك باستخدام المجهر وعداد نيوباور المعدل.

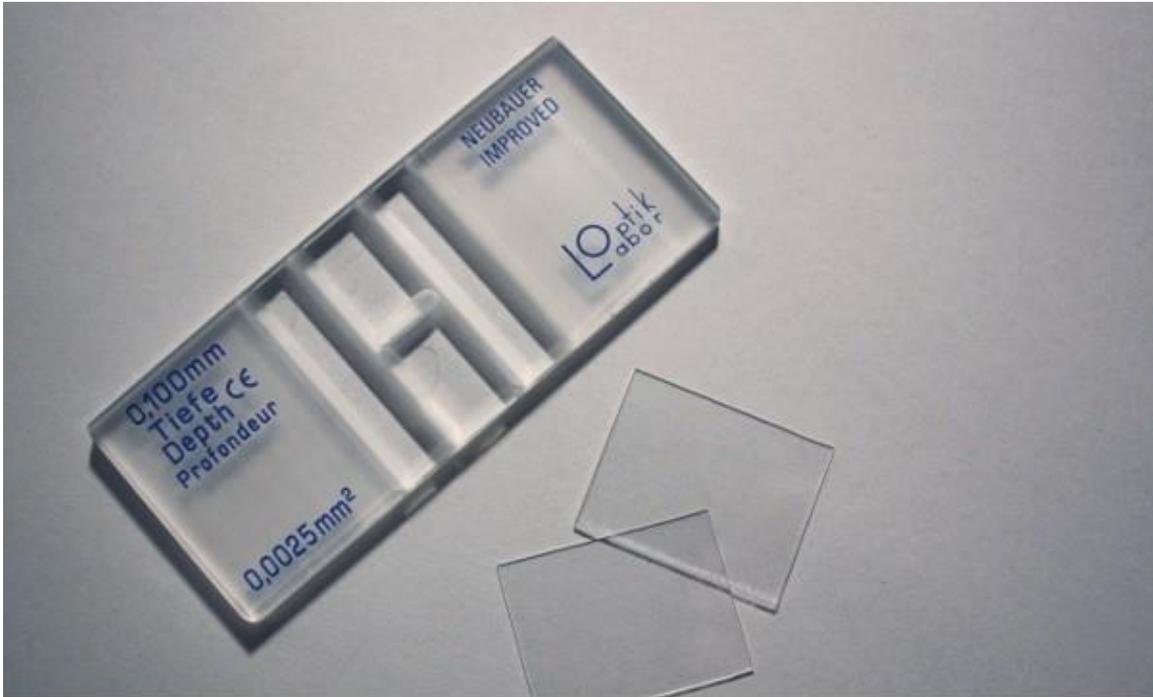
الأجهزة والأدوات المطلوبة لعدّ الكريات الحمراء:

- 1- عداد نيوباور Hemocytometer.
- 2- ماصة الكريات الحمراء R.B.C dilution pipette.
- 3- محلول التمديد (محلول هايمز Hyems Solution).
- 4- كحول.
- 5- قطن.
- 6- واخذات معقمة.
- 7- ساترات زجاجية.
- 8- شاش معقم.
- 9- مجهر جيد.

وصف الأجهزة والمحاليل المستخدمة في التجربة:

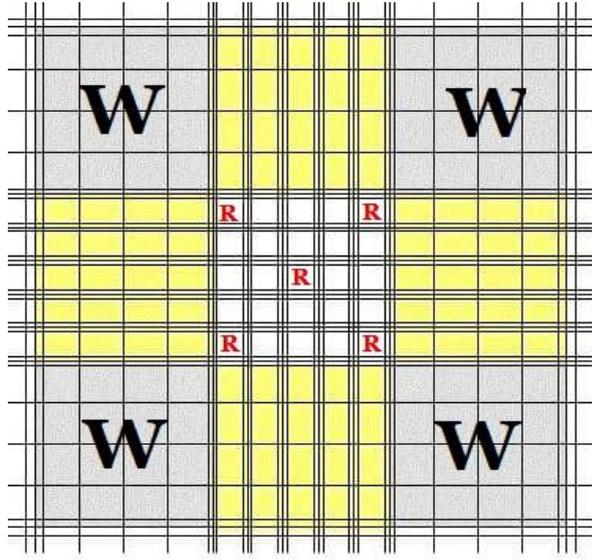
1- عداد نيوباور:

وهو عبارة عن صفيحة زجاجية سميكة في وسطها مساحة مقسمة بميزاب عرضي إلى قسمين، محفور على كل منها شبكة العدّ. يوجد على جانبي هذه المساحة ميزابان يعقبهما مصطبتان أكثر ارتفاعاً من سطح شبكة العدّ بمقدار 0.1/مم (الشكل 1).

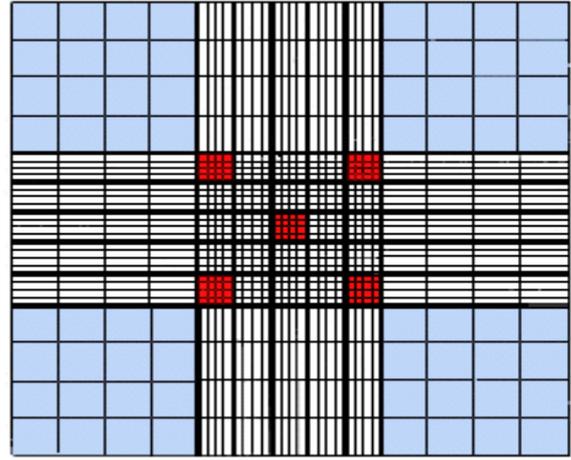


الشكل (1): عداد نيوباور

يظهر الفحص المجهرى لعداد نيوباور أن كل شبكة عد من الشبكتين الموجودتين عليه، تتألف من تسعة مربعات مساحة كل منها 1/مم² وبالتالي فإن المساحة الكلية لشبكة العد تساوي 9/مم² (الشكل 2).



■ areas of the grid where WBC are counted



■ areas of the grid where RBC are counted

الشكل (2): رسم تخطيطي لشبكة العد الموجودة على عداد نيوباور. (W) هي مكان عد الكريات البيضاء. بينما (R) مكان عد الكريات الحمراء.

ويظهر من الشكل أن كل مربع من المربعات التسعة مقسم بدوره إلى مربعات أصغر. وأن كل مربع من المربعات الثمانية الطرفية مقسم إلى $1/16$ مربعاً صغيراً طول ضلع كل واحد منها (0.25 مم) ومساحة كل منها (0.625 مم²).

أما المربع التاسع الأوسط فهو مقسم إلى $1/25$ مربعاً صغيراً، ويحتوي كل مربع $1/16$ مربعاً صغيراً جداً. وبناءً على هذا يتألف المربع التاسع من $400/$ مربعاً صغيراً جداً أبعاد كل منها 0.05 مم \times 0.05 مم/ ومساحته 0.0025 مم² أو $\frac{1}{400}$ مم²، هذا ويمكن أن تستعمل شبكة العدّ من أجل عد كل من الكريات الحمراء والكريات البيضاء. وأماكن عدّ كل منها موضحة في الشكل (2).

ويتم عد الكريات الحمراء في خمسة مجموعات في المربع التاسع (الأوسط) وذلك في الأماكن المشار إليها بحرف R (الشكل 2). أما الكريات البيضاء فيتم عدّها في المربعات الطرفية الأربع (الأماكن المشار إليها بالحرف W في الشكل نفسه).

هذا ويجب أن يكون خزان العدّ نظيفاً وجافاً قبل الاستعمال ويجب دائماً غسله بالماء المقطر ثم بالكحول وتجفيفه بعد ذلك بواسطة ورق نشاف خاص هو نفسه الذي يستعمل في تجفيف عدسات المجاهر.

2- ماصة الكريات الحمراء:

تتكون ماصة الكريات الحمراء من أنبوبة زجاجية مدرجة يظهر عليها بوضوح الأرقام /0.5-1-101/ ويوجد بعد الرقم /1/ بقليل انتفاخ واسع (حويصل) يحتوي على حبيبة حمراء وظيفتها تسهيل عملية خلط عينة الدم مع محلول التمديد. بعد الانتفاخ تضيق الأنبوبة من جديد وفي هذا المكان يوجد الرقم /101/. وتتصل الماصة من نهايتها العلوية بأنبوبة مطاطية رفيعة توضع في نهايتها قطعة بلاستيكية تسهل عملية مص الدم وسائل التمديد أثناء التجربة (الشكل 3).



الشكل (3): ماصة الكريات الحمراء.

وقبل استعمال ماصة الكريات الحمراء يجب دائماً غسلها وتجفيفها بشكل جيد, لذلك نلجأ لاتباع ما يلي أثناء تنظيف الماصة:

1. يشطف الماء المقطر إلى داخل الماصة وينفخ عدة مرات.
2. تعاد نفس العملية بشطف ونفخ محلول (1%) من حمض كلور الماء.
3. تكرر نفس العملية بشطف ونفخ الماء عدة مرات.
4. يتم شطف الكحول ثم نفخه خارج الماصة بالطريقة نفسها.
5. بعد ذلك يشطف الأسيتون إلى داخل الماصة ثم يترك ليخرج من نفسه دون نفخ وذلك لتجنب إدخال بخار الماء إلى داخل الماصة. وتعتبر الماصة جاهزة للاستعمال إذا تحركت الحبيبة الحمراء داخل الحويصل بحرية دون التصاق بجدران الحويصل. هذا ويمكن غسل ماصة الكريات الحمراء بعد نزع الأنبوبة المطاطية عنها. ولكن يفضل أن يتم التنظيف والأنبوبة المطاطية والنهاية البلاستيكية مرتبطة مع الماصة.

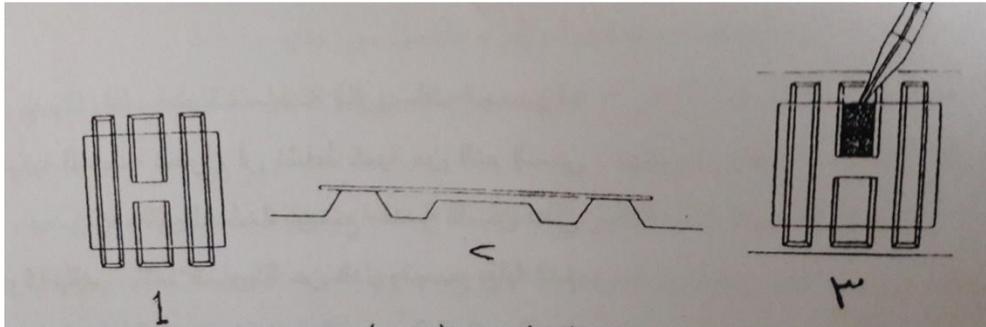
3- محلول التمديد:

يستعمل عادةً لتمديد عينة الدم محلول فيزيولوجي متعادل التوتر من كلور الصوديوم (NaCl) وغالباً يستعمل محاليل خاصة مثل محلول هاميز (H- solution) الخاص بالكريات الحمراء والذي يحضر على الشكل التالي:

يضاف 0.05 غ من كلوريد الزئبق $HgCl_2$ إلى 2.5 غ من كبريتات الصوديوم Na_2SO_4 إلى 0.5 غ كلور الصوديوم NaCl وتحل جميعها في 100 مل ماء مقطر. ويمكن استعمال 1% محلول فورمالين في 3% سترات الصوديوم.

طريقة العمل:

- ينظف خزان العدّ ويجفف، ثم ترطب المصطبتان الجانبيتان المرتفعتان لخزان العد بطرف الإصبع المبلولة بقليل من الماء، ثم توضع الساترة الزجاجية فوق شبكة العد مع الضغط قليلاً حتى تثبت الساترة في مكانها. ويجب أن تترك مسافة بين طرف الساترة والنهاية العليا للمصطبة (الشكل 4).



الشكل (4-أ): رسم تخطيطي لمرحلة تحضير خزان العد أو شبكة العد: 1- طريقة وضع الساترة على منطقة الشبكة. 2- منظر جانبي يوضح المسافة بين سطح الشبكة والساترة. 3- طريقة وضع الماصة وتشكل الفلم فوق الشبكة.



الشكل (4-ب): شكل توضيحي

- تعقم طرف أذن الحيوان المراد أخذ عينة الدم منه بعد إزالة الشعر عنه بقطعة من القطن المبللة بالكحول وتترك لتجف، بعد ذلك تمسك الأذن باليد اليسرى وبحركة سريعة يعمل وخزة مناسبة بإبرة فرانك الخاصة (الشكل 5) على الحافة اللحمية للأذن.



الشكل (5): إبرة فرانك.

- ويمكن عمل وخزة مناسبة في لباب إحدى أصابع اليد عند الإنسان بواسطة واخزه معقمة جيداً. ويراعى أن تكون شدة الوخزة كافية لخروج الدم تلقائياً من مكان الوخز دون الحاجة للضغط على المنطقة الواقعة حول نقطة الوخز في محاولة لإخراج الدم بعد وخزة خفيفة.
- تمسح القطرة الأولى من الدم التي خرجت بعد الوخز بواسطة قطعة قطن معقمة.
- بعد ظهور القطرة الثانية من الدم، يغمس طرف ماصة الكريات الحمراء فيها، وبمساعدة القطعة البلاستيكية للماصة نحاول أن نشفط كمية من الدم إلى العلامة /0.5/ على الماصة. بعد ذلك تغلق الماصة بوضع مقدمة

اللسان على فتحة القطعة البلاستيكية الممسوكة بالفم. تبعد الماصة عن الدم وتمسح بقايا الدم الموجودة على السطح الخارجي لها.

إذا كانت عينة الدم المسحوبة قد تجاوزت العلامة /0.5/ نجعل طرف الماصة يلامس قطعة من الشاش إلى أن يصبح الدم بالحجم المطلوب.

إذا طالت العملية وحدث تخثر للدم في الماصة، يجب نفخه إلى الخارج فوراً وغسل الماصة وتجفيفها والبدء بالعمل من جديد حيث أنه إذا تخثر الدم وسدّت الماصة به فإن تنظيفها يصبح غاية في الصعوبة.

- يغمس رأس الماصة بسرعة في الزجاج الحاوية على محلول التخفيف هايمز. تشفط كمية من المحلول بحيث يصل مستوى السائل في الماصة تماماً إلى التدرج (101). وفي هذه الحالة تكون نسبة الدم إلى محلول التمديد $(\frac{1}{200})$.

- ننزع الأنبوبة المطاطية عن الماصة ونسد طرفي الماصة بوساطة أحد الأصابع والإبهام. ثم نقوم بخلط عينة الدم مع سائل التخفيف وذلك بتحريك الماصة بحركة دائرية تشبه حركة إشارة اللانهاية وذلك لمدة دقيقتين.

- نتخلص من محلول التخفيف الموجود في ساق الماصة وذلك بنفخة للخارج.

- قرب طرف الماصة بحذر إلى سطح مصطبة العد في المكان البارز منها وغير المغطى بالساترة. نحاول أن نضع قطرة بسيطة من المحلول الموجود في الماصة في هذا المكان، وتحت تأثير قوة التوتر السطحي يسيل المحلول تحت الساترة.

- وبذلك يتم تشكيل فيلم رقيق تستطيع رؤيته بالعين المجردة أثناء تشكله. هذا ويجب أن تتم هذه المرحلة بعناية فائقة بحيث لا تتكون فقاعات هوائية وأن لا تسيل المحلول إلى الميزاب الموجود حول شبكة العد. فإذا حدث ذلك يجب غسل الشريحة وتجفيفها والبدء بالعمل من جديد.

- ضع عداد الكريات الحمراء على مسرح المجهر وانتظر ثلاث دقائق لكي تستقر الكريات وتقف حركتها.

- استعمل العدسة ذات التكبير الضعيف مع فتحة ضيقة للحاجز وذلك لرؤية خطوط شبكة العد ولتحديد المربعات التي سيتم فيها عد الكريات الحمراء. ويجب التأكد من أن توزع الكريات الحمراء على شبكة العد متجانساً.

- ابدأ بعدّ الكريات الحمراء مستعملاً التكبير الأقوى. و تعد الكريات الحمراء في /5/ مجموعات في كل منها /16/ مربع صغير وذلك في المربع التاسع الأوسط (الشكل 2).

ولتسهيل عملية العد يمكنك أن ترسم المربع التاسع (الأوسط) على دفترتك وتسجل عدد الكريات الحمراء التي تشاهدها في كل مربع من المربعات الصغيرة الـ 16 في كل مجموعة من المجاميع الخمسة المعودة.

- يتم حساب العدد الكلي للكريات الحمراء المعدودة على الشبكة وذلك بجمع عدد الكريات الحمراء التي ظهرت على المربعات الخمس المعدودة. ولكي لا تعد الكرية نفسها مرتين عند الانتقال من مربع صغير إلى آخر يتم عد جميع الكريات الحمراء الموجودة داخل المربع وبعدها تعد الكريات الواقعة على الخطوط العلوية والخطوط اليسارية للمربع وتهمل الخلايا الواقعة على الخطوط السفلية واليمنية.
- لحساب العدد الإجمالي للكريات الحمراء في دم الحيوان أو الشخص الذي استخدم دمه في الاختبار - يتم ضرب العدد الكلي للكريات الحمراء المعدودة (الخطوة 12) $\times 10000$ فنحصل على عدد الكريات الحمراء في 1مم^3 من الدم.

يسمى الرقم /10000/ (معامل العد) ويمكن الحصول على معامل العد هذا من خلال ما يلي:

1- تشكل مساحة المربعات التي تم عد الكريات الحمراء فيها $\frac{1}{5}\text{مم}^2$ من مساحة المربع التاسع (الأوسط) 1مم^2 .

وقد تم العد في مساحة هي $\frac{1}{5}$ من مساحته الكلية.

2- نسبة تخفيف عينة الدم في الماصة = $\frac{1}{200}$.

3- ارتفاع عينة الدم الموجودة تحت الساترة $\frac{1}{10}\text{مم}$.

وبالتالي فإن حجم عينة الدم الموجودة في المنطقة التي تم عد الكريات الحمراء فيها هو: $\frac{1}{10000} = \frac{1}{10} \times \frac{1}{5} \times \frac{1}{200}$.

فإذا كان عدد الكريات الحمراء المعدودة على سبيل المثال 580 كرية موجودة في $\frac{1}{10000}\text{مم}^3$ من الدم فإن 1مم^3

الواحد من الدم سيحتوي على 580,000 كرية.

العوامل التي تؤثر في العدد الكلي للكريات الحمراء عند الحيوان:

يختلف العدد الكلي للكريات الحمراء في حجم معين من الدم اختلافاً كبيراً باختلاف الأنواع الحيوانية. وقد يختلف العدد ضمن النوع الحيواني الواحد باختلاف السلالات. وهناك العديد من العوامل التي تؤثر في عدد الكريات الحمراء: العمر- الجنس- التغذية- نوعية العمل- الحمل- الحلاية- الإثارة والتهدج الجنسي ودورة الشبق وإنتاج البيض والارتفاع عن سطح البحر. هذه العوامل جميعاً باستثناء عامل الارتفاع عن سطح البحر قد تسبب زيادةً أو

نقصاناً بسيطاً في العدد الكلي للكريات الحمراء. أما عامل الانتقال إلى مناطق مرتفعة عن سطح البحر فيسبب زيادة حقيقية في عدد الكريات الحمراء والتي قد يصل عددها في هذه الحالة إلى ضعف العدد الطبيعي أحياناً. ويوضح الجدول رقم (1) العدد الكلي للكريات الحمراء عند الإنسان وعند عدد من الحيوانات الأهلية.

الجدول (1): الأعداد الطبيعية لكريات الدم الحمراء (مليون كرية مم³ من الدم) عند الإنسان وبعض أنواع الحيوانات الأهلية:

النوع	عدد الكريات الحمراء (مليون كرية)	النوع	عدد الكريات الحمراء (مليون كرية)
الرجل	6 - 5	الخنزير	8-6
المرأة	4,800 - 4,500	الكلاب	8-6
الأبقار	8-6	القطط	8-6
الخيول	10-7	الأرانب	6,500-5,600
الأغنام	13 - 10	الدواجن	3,200-2,500
الماعز	15 - 13		