فسلجة التناسل والتلقيح الاصطناعي

(عملي)

المرحلة الثالثة – قسم الانتاج الحيواني

كلية الزراعة – جامعة تكريت

الدرس العملي الثالث : طرق تقدير تركيز النطف

1- طريقة العد المباشر تحت المجهر .

2- طريقة الكثافة الضوئية : وفيها يستخدم جهاز مقياس الكدر Nephelometer أو مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer اللذين يعتمدان على مبدأ مفاده انه كلما زاد التركيز في العينة ، كانت كمية الضوء المسموح لها بالمرور اقل .

3- طريقة العد الالكتروني The Electronic particle Counter : وفيها يمدد السائل المنوي بمحلول ملحي بنسبة (1: 6000)ويسمح للمعلق بالمرور عبر دورة الجهاز . وعندما تمر النطف خلال الجهاز يظهر تغير مفاجئ في المقاومة الالكترونية . ويظهر ذلك على شكل تذبذبات يمكن قياسها لتعبر عن عدد النطف . عندها يضرب العدد بنسبة التمديد (التخفيف) فنحصل على العدد الكلي للنطف في عينة السائل المنوي .

أ - طريقة العد المباشر The Direct cell counting Method :

وفيها يتم عد النطف مباشرة تحت المجهر ويستخدم لهذا الغرض شريحة عد كريات الدم الحمراء نفسها Hemacytometer وقد عرف نوعان من هذه الشريحة : شريحة توماس Thomas وشريحة Neubaure بنموذجيها القديم والمحسن .

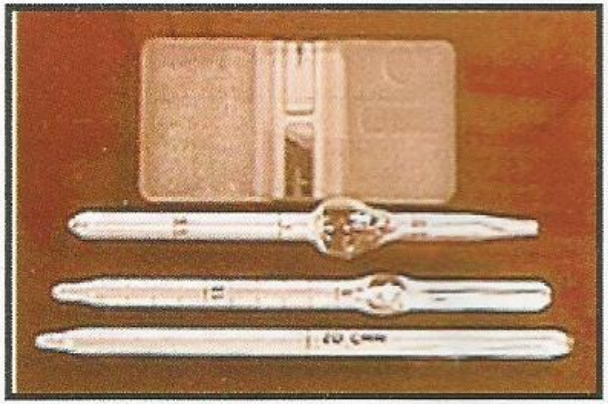
المواد والادوات اللازمة :

1- جهاز عد الخلايا الدموية Hemocytometer blood cells counting

2- سائل منوي طازج أو محدد

3- محلول الايوسين و ملح الطعام

4- مجهر ضوئي .



الشكل رقم (33) جهاز عد الخلايا الدموية

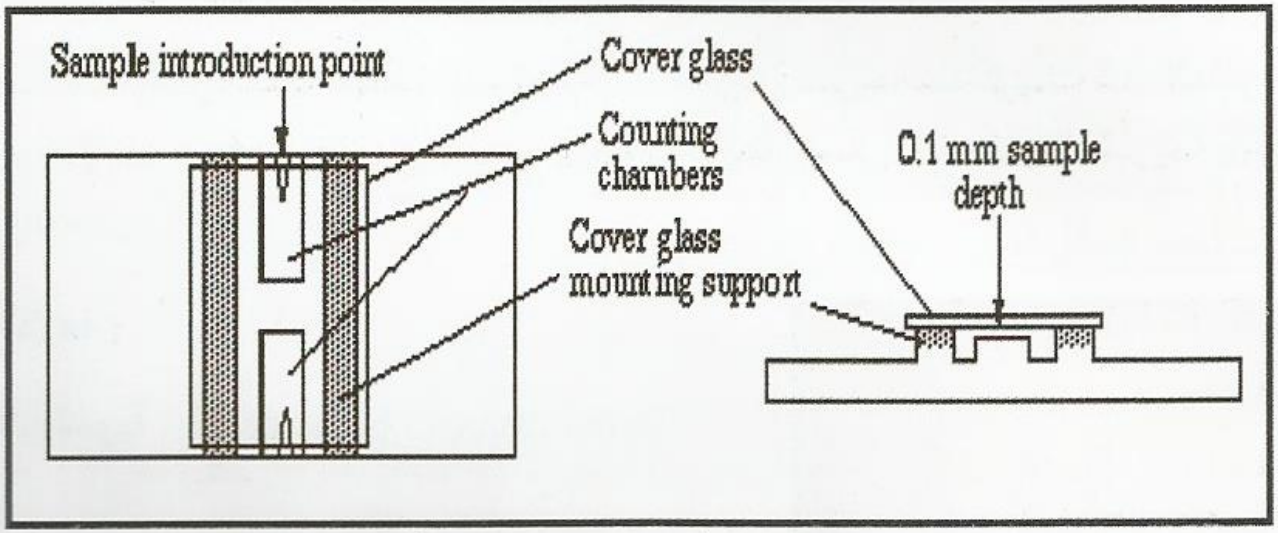
جهاز عد الخلايا الدموية Hemocytometer blood cells counting : وهي المجموعة المستخدمة في عد الكريات الدموية الحمراء والتي تتكون من الاجزاء التالية : (الشكل رقم 33)

أ- شريحة العَد Improved Neubauer chamber :- عبارة عن شريحة زجاجية سميكة حفر فيها اخدودان عرضيان يحصران بينهما منصة مركزية ضيقة مقسومة بدورها الى نصفين ، وذلك بواسطة ميزاب متعامد مع الاخدودين وقد حفر بشكل تخطيطي ، ودقيق على سطح كل قسم من المنصة ، وعلى عمق(0.1 ملم) شبكة عد ابعادها (3×3 ملم) وبالتالي مساحتها (9 ملم^2). تنقسم هذه المساحة الى(9 مربعات كبيرة) مساحة كل منها(1 مم^2)، ينقسم كل من المربعات الثمانية الخارجية بدورها الى (16 مربعا) بحيث تكون ابعاد كل مربع(0.25 × 0.25 ملم) اما المربع التاسع ، وهو المركزي فينقسم الى (25 مربعا صغيرا) ، ابعادها (0.2 × 0.2 ملم) ، وكل مربع فيها ينقسم بدوره الى (16 مربعا اصغر) ، لهذا يصبح عدد المربعات الكلية في هذا المربع الوسطي هو (400) مربع ، ابعاد كل منها هو (0.05×0.05 مم) أي (400/1 ملم) . ولما كان ارتفاع الفراغ فوق المربع الواحد هو (0.1 ملم) فان حجم كل مربع صغير ضمن المربع الوسطي هو (4000/1 م^3) . (الشكل رقم 35)

اما في النوع القديم لشريحة عد نيوباور فان المربعات الـ (400) الموجودة في المربع التاسع المركزي موزعة على (16) مجموعة من المربعات في كل منها (25) مربعا صغيرا نتجت من وجود خط وسطي اضافي يمر في وسط كل مربع خامس . اما شريحة عد توماس فانها تحوي على شبكة عد من النموذج القديم نفسه لشريحة عد نيوباور . (الشكل رقم 34)

ب- غطاء الشريحة .

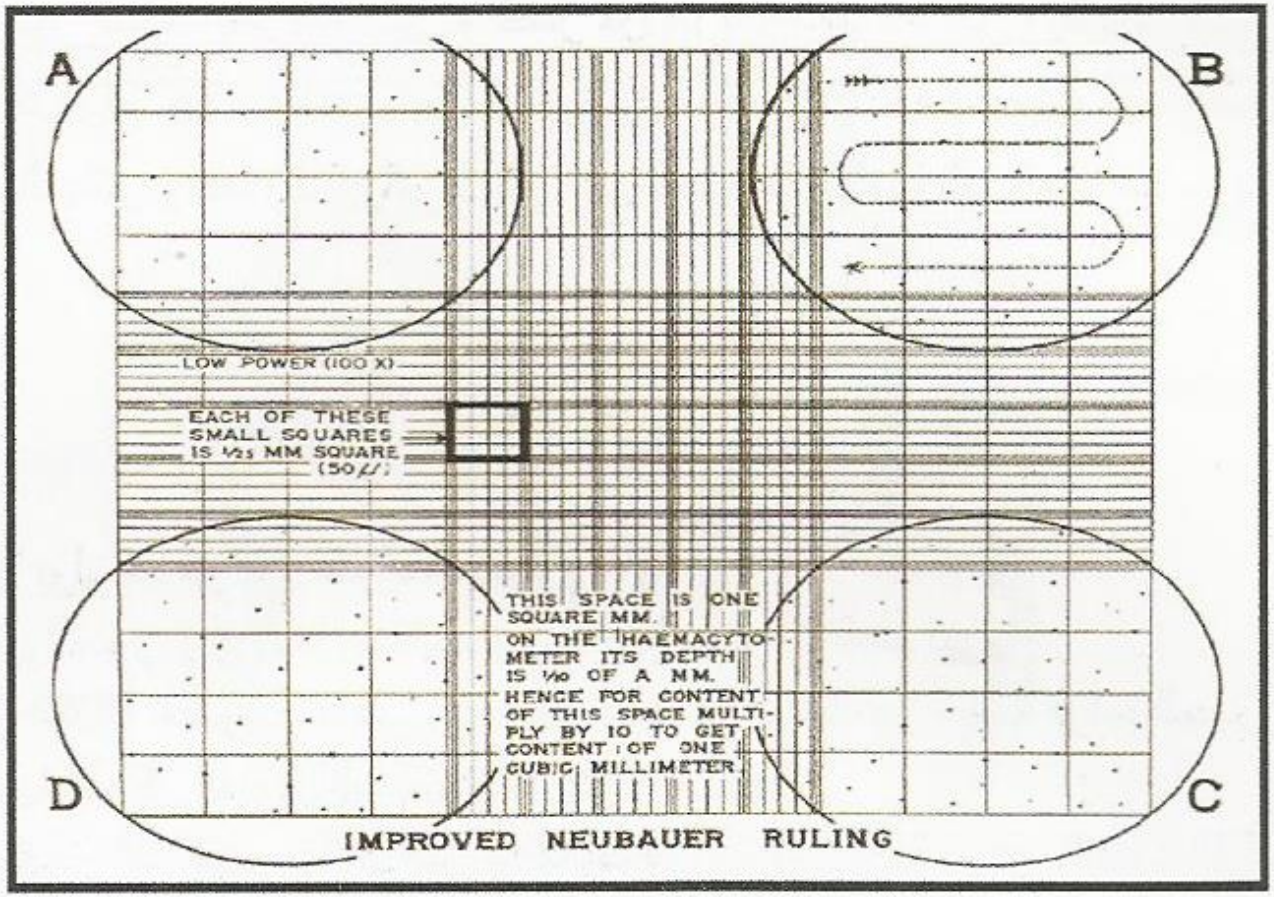
ج - ماصة سحب الدم Thoma red cell pipette :- وتتألف من جزأين ، جزء زجاجي هو جذع الماصة ومخطط بعلامتين ، العلامة(0.5) والعلامة (1) وهناك علامة أخرى مؤشرة بـ (101) بعد الانتفاخ الذي يحوي خرزة حمراء اللون بداخله والتي تساعد على مزج الدم . وجزء مطاط ينتهي بفوهة بلاستيكية .



الشكل رقم (34) شريحة العَد

خطوات العمل :-

1 - رج عينة السائل المنوي بهدف تجانس محتوياتها .
2- اسحب بواسطة انبوبة مص الخلاط سائلا منويا حتى التدريج (0.5)
3-اسحب فقاعة هواء صغيرة في انبوبة المص . و ذلك بهدف منع انسكاب السائل المنوي عند تغطيس ماصة الخلاط في المحلول الممدد.
4- جفف نهاية انبوبة المص بقطعة قطن أو نسيج ورقي .
5- اسحب بواسطة انبوبة المص محلولا ممددا ، و ذلك حتى التدريج (101) ، تذكر ان التمديد اصبح (1 : 200) .
6- هز أو حرك ماصة الخلاط لمدة ثلاث دقائق ، و ذلك بضرب الماصة على راحة كف اليد من اجل التأكد بان خلط العينة مع محلول التمديد اصبح متجانسا .
7- تخلص من النقاط الاربع أو الخمس الأولى ، وذلك من نهاية الماصة من اجل الحصول على عينة متجانسة تماما .
8- ضع ساترة الشريحة على شريحة العد فوق منطقة الشبكة ، واسمح لنقطة صغيرة ان تغادر الماصة تحت الساترة .
9- ضع شريحة العد تحت المجهر وانتظر لمدة(10 دقائق) بهدف السماح للنطف بالاستمرار .
10- قم بعملية العد تحت المجهر على التكبير(250) تقريبا .
11- عد النطف الموجودة في (80) مربعا صغيرا ، أو(5) مربعات كبيرة ولكن لاتعد النطفة اكثر من مرة عند الانتقال من مربع لآخر ، استعمل القاعدة التالية : تعد النطف الموجودة داخل المربعات والخلايا الموجودة على الخطوط العلوية واليسرى لكل مربع ، ولا تعد الحيوانات المنوية الموجودة على الخطوط السفلية واليمنى لذلك المربع .
(الشكل رقم 35)



الشكل رقم (35) شكل يوضح المربعات الخاصة بالعَد

طريقة الحساب :

بما ان حجم السائل فوق كل مربع صغير هو(1/ 4000 ملم^3) فسيكون الحجم الكلي لـ(80 مربعا صغيرا) هو (80 / 4000). وبما ان السائل المنوي قد سبق تمديده (تخفيفه) الى 200/1 بالماصة " بمحلول الايوسين " فيكون حجم السائل المنوي الذي كان يحوي هذه الخلايا هو(80 / (4000 × 200)) = 1 / 10000 ملم ^{3} .

فاذا كان عدد النطف الموجودة في(80 مربعا صغيرا) هو مثلا(200 نطفة) . فان عدد النطف في كل 1(ملم^3) هو (200 × 10000) أو(2 × 10 ^{6} نطفة / ملم^3) . وبالتالي سيكون عدد النطف في كل (1) سم ^{3} أو (1) مل هو (2 ×10 ^{6} ×10 ^{3}) = (2×10 ^{9} نطفة) أو (2 بليون نطفة / مل) .

تحضير محلول التمديد (التخفيف) :

يستخدم عادة محلول الايوسين في تمديد السائل المنوي عند تقدير تركيز النطف بطريقة العد المباشر . هذا ويحضر ذلك المحلول كما يلي :

1- يحضر(50 مل) من الماء المقطر .
2- يضاف لها (1 مل) من الايوسين محضر بتركيز(2 %) . علل سبب الاستخدام ؟ .
3- يضاف (1 مل) من محلول ملح الطعام تركيز(3 %). علل سبب الاستخدام ؟ .

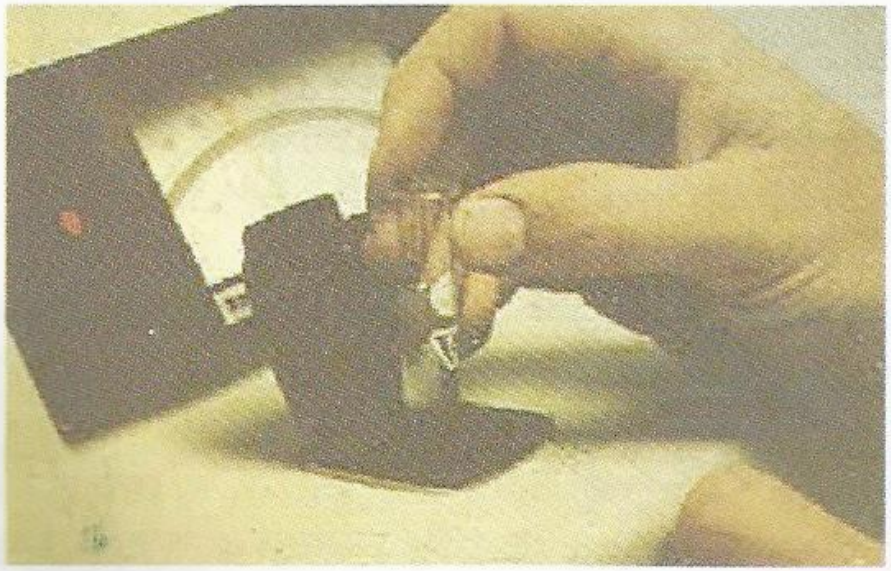
ب - طريقة الكثافة الضوئية Optical Density :

يمكن قياس تركيز النطف بطريقة اسهل واقصر من طريقة العد المباشر ويستخدم لهذا الغرض جهاز المطياف الضوئي (الشكل رقم 36) الذي يجب تنظيمه بحيث تدرج الكثافة الضوئية لنماذج معلومة التركيز سبق وان تم تحديدها بطريقة العد المباشر وكلما زاد تركيز النطف في العينة ،قلت كمية الضوء النافذة ، وبالتالي كانت القراءة اقل .

خطوات العمل :

1- حضر محلولا فيزيولوجيا من سترات الصوديوم (3 %)
2- خفف عينة السائل المنوي (0.1 مل سائل منوي : 8 مل سترات الصوديوم) .
3- املا انبوبة جهاز الكثافة الضوئية بمحلول المعايرة القياسي ، وتاكد من صحة قراءة الجهاز ودقته .
4- املا الانبوبة نفسها بالسائل المنوي الممدد، وسجل قراءة الجهاز .
5- ارجع لجدول المقياس التدريجي وقابل القراءة الماخوذة بالخطوة 4 مع تركيز النطف القياسي.
6- نظف الادوات المستخدمة بصورة جيدة ، وضعها في مكانها الصحيح .

Concentration of Sperm in Ejaculate - Spectrophotometer



الشكل رقم(36) جهاز المطياف