تقدير نسبة الحيامن الحية والميتة

سلامة الغشاء الذي يحيط بخلية الحيمن يمكن تقديره بعدة طرق لإعطاء نسبة الخلايا الحية و الميتة في القذفة ، نظرًا لأن الضرر لغشاء خلية الحيمن يؤدي إلى موت الخلية وعليه فأن تقدير نسبة الحيامن الحية والميتة يمكن أن يجرى باستخدام أي من الصبغات التي تمنع من الدخول من قبل غشاء الحيمن السليم أو بالعكس بأي صبغة تدخل الحيمن من خلال الثقوب في غشاء الحيمن. الخلطات المتكونة من صبغتي الأيوسين والنكروسين تعطي تمييز جيد ، حيث أن صبغة الأيوسين تلون الحيامن الميتة والمتضررة باللون الأحمر الوردي، في حين أن الخلايا ذات الغشاء السليم تكون عديمة اللون مقابل الخلفية السوداء أو الزرقاء الناجمة عن استخدام صبغتي النكروسين والأنلين الأزرق، على التوالي. نظرًا لأن خلايا حيامن الطيور صغيرة، فإن إستعمال العدسات الزيتية للحصول على قوة تكبير 1000 مرة يسهل التمييز بين الخلايا المصبغة وغير المصبغة. وتتلخص الطريقة التقليدية لتقدير نسبة الحيامن الحية والميتة بوضع قطرة صغيرة من السائل المنوي على طرف شريحة زجاجية ويوضع قربها قطرة من مزيج صبغة الأيوسين – نكروسين ويتم مزجها برفق وهدوء بواسطة حافة شريحة زجاجية أخرى وبعد إمتزاجها جيدًا يتم عمل مسحة ثم تترك الشريحة لتجف وتصبح جاهزة للقراءة حيث تتصبغ الحيامن الميتة بلون أحمر أو وردي أما الحيامن الحية فلا تتقبل الصبغة وتبقى شفافة أو بيضاء. وتحسب النسبة المئوية للحيامن الميتة بواسطة عد ما لايقل عن 200 حيمن في مناطق مختلفة على الشريحة (حساب مقطعين أو أكثر في كل شريحة) وعلى قوة تكبير x 100 للمجهر باستخدام العدسة الزيتية ، وحسب المعادلة الأتية:

$$\text{نسبة الحيامن الميتة\%} = \frac{\text{عدد الحيامن الميتة}}{\text{العدد الكلي للحيامن}} \times 100$$

تقدير تركيز الحيامن في القذفة

هناك عدة طرق لتحديد تركيز الحيامن منها طريقة الحساب المباشر باستخدام جهاز الهيموسايتوميتر haemocytometer نفسه المستخدم لحساب خلايا الدم الحمر .ويتكون الجهاز من خمسة مربعات كبيرة كل واحد منها يتكون من 25 مربعًا متوسطًا وكل واحد من المربعات المتوسطة يتكون من 16 مربعًا صغيرًا. ويتم تحضير محلول التخفيف بإذابة 0.9 غم كلوريد الصوديوم 0.01 غم كلوريد الزئبقيك Hgcl2 و0.2 غم من صبغة الايوسين Eosin الحمراء في الماء المقطر مع إكمال الحجم الى 100 مل. يتم تخفيف 0.01 مل (10 مايكروليتر) من السائل المنوي مع 4 مل من محلول التخفيف (مقدار التخفيف 1:400) ، ومن ثم توضع قطرة من السائل المنوي المخفف على حافة شريحة الهيموسايتوميتر ومن ثم يتم وضع غطاء سلايد على هذه الشريحة وتترك فترة قصيرة لكي يستقر المحلول على الهيموسايتوميتر مع مراعاة عدم زيادة حجم القطرة الموضوعة . ولقياس تركيز الحيامن يتم إختيار خمسة مربعات والتي هي المربع الوسطي والمربعان العلويان الأيمن والأيسر والمربعان السفليان الأيمن والأيسر . وبعد عملية عد الحيامن في هذه المربعات الخمسة يتم استخدام المعادلة التالية لتقدير عدد الحيامن لكل ملم3 :

تركيز الحيامن (مليون/ ملم3) = X / 80 × 400 × 400 × 10

إذ إن :

X = عدد الحيامن التي تم حسابها في 80 مربع صغير .

80 = عدد المربعات الصغيرة التي حسبت فيها الحيامن(5 مربعات متوسطة × 16مربع صغير)

400 = عدد المربعات الصغيرة الكلية (25 مربع متوسط × 16مربع صغير) .

400 = مقدار التخفيف.

10= ارتفاع المنصة.

وعادًة يشار إلى تركيز الحيامن في الطيور بالبليون/سم^3 وعليه يتم ضرب الناتج الذي تم الحصول عليه في المعادلة السابقة والذي يمثل تركيز الحيامن بالمليون / ملم3 /×1000. ولتقدير عدد الحيامن في القذفة يتم ضرب حجم القذفة (مل) × تركيز الحيامن / سم^3 (مل).