٣ / ٠ اجـــراءات البحـــث :

٣ / ١ منهجية البحـــث :

هذا البحث محاولة للتعرف على تأثير بعض الأنشطة الرياضية علـــى معدل هرموني البرولاكتين *PRL* والادرينوكورتيكوتروفين *ACTH* فـــي الدم للرياضيين ، وقد اتبع الباحث المنهج الوصفي والإسلوب المسحـــي لملاءمته لطبيعة هذا البحـــث ٠

٣ / ٢ عينة البحـــث :

أجريت قياسات البحث على عينة قوامها ٣٢ لاعباً ضمن اللاعبيـــن المسجلين بالاتحاد المصري للأنشطة المختارة (كرة سلة ـ مصارعـــة ـ ملاكمة) والخاضعين للعملية التدريبية المتبعة في كل نشاط ، والمتطوعيـــن لاجراء قياسات البحث عليهم ٠ وقد استبعد لاعبا للاصابة ، كما استبعد لاعبان لاضطرابهم أثناء سحب عينات الدم في القياس القبلي ٠ واستمـــر حتى نهاية القياسات ١٩ لاعباً ، واستبعدت عينة من عينات كرة السلـــة حتى تتساوى عينات كل مجموعة حيث قسمت عينة البحث الى ثـــلاث مجموعـــات ٠

المجموعة الأولى : تتكون من ٦ أفراد من لاعبي كرة السلة ، والمسجليـــن بالاتحاد المصري لكرة السلة للموسم ٨٧ ـ ١٩٨٨ ضمـــن فرق الدرجة الأولى الممتازة ٠

المجموعة الثانية : تتكون من ٦ أفراد من المصارعين الدوليين والمسجليـــن بالاتحاد المصري للمصارعة للموسم ٨٧ ـ ١٩٨٨ ٠

المجموعة الثالثة : تتكون من ٦ أفراد من الملاكمين الدوليين والأولمبييـــن والمسجلين ضمن الاتحاد المصري للملاكمة للهواة للموســـم ٨٧ ـ ١٩٨٨ ٠

جـــدول (١)

توصيف عينة البحث في بعض المتغيرات المختارة

المتغيرات	كـرة سلـــة		مصارعـــة		ملاكمـــة	
	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري
السـن (شهر ، سنة)	٢٣ر٤	٢ر١	٢٢ر٥	١ر٩	٢٣ر٢	٢ر٣
العمر التدريبي (شهر ـ سنة)	١٠ر٤	٢ر١	٨ر٢	٠ر٩	٩ر٤	١ر٣
ارتفاع الجسم (مم ـ سم)	١٨٣ر٨٣	٧ر٤٦	١٦٧ر٣٣	٨ر٢٣	١٧١ر١٦	٤ر٩٩
الـوزن (جرام ـ كجم)	٦٨ر٦٦	٨ر٥٧	٧٧ر٣٣	٣ر٦٦	٦٥ر١٦	٧ر٣٣
النبض (نبضة /د)	٥٣	١ر٩	٥٩	٢ر٢	٥٥	٢ر٤

٣ / ٢ اجهزة وادوات القيـــاس :

- جهاز رستاميتر لقياس الطول بالسنتيمتر ٠
- ميزان طبي مقنن لقياس الوزن بالكيلو جرام ٠
- سرنجات بلاستيك مقاس (٥ سم) للاستعمال مرة واحدة في سحب عينـات الـــدم ٠
- أنابيب اختبار لحفظ عينات الدم ٠
- جهاز الطرد المركزي لفصل السيرم (سرعة ٣٠٠٠ دورة / ق) ٠
- جهاز سبيكتروفوتوميتر لقياس الهرمونات ٠
- ماصة اتوماتيكية لسحب العصل بعد فصله من الدم ٠

- هيبارين لمنع تجلط الدم .
- قطن طبي .
- كحول أبيض (تركيز الكحول ٧٠ ـ ٧٥ ٪)
- مواد كيميائية لقياس معدل الهرمونات في الدم لكل من *ACTH*، *PRL* الأنسولين والجلكوز) .

٣ / ٤ الدراسات الاستطلاعية :

قام الباحث باجراء بعض الدراسات الاستطلاعية وتم ذلك قبل كل منافسة من المنافسات التي حددت لاجراء قياسات البحث لتحديد واعداد المكان الذي سيتم فيه سحب عينات الدم ، والأجهزة والإدوات اللازمة لذلك ـ على ان يتم سحب عينات الدم من عينة البحث بعد المنافسة مباشرة .

٣ / ٥ قياسات البحث :

أجريت قياسات البحث خلال موسم المنافسات ١٩٨٧ ـ ١٩٨٨ خلال الفترة من ١٩٨٧/١١/١٧ الى١٩٨٨/٣/٢٢ وقام الباحث باجراء القياسات القبلية والبعدية في بداية موسم المنافسات وفي منتصف موسم المنافسات وفي نهاية موسم المنافسات ، وتم تقسيم موسم المنافسات للمراحل الثلاث طبقاً لعدد المباريات والفترة الزمنية التي تبدأ وتنتهي فيها هذه المباريات ، وطبقا لكل نشاط على حدة من الأنشطة قيد البحث (كرة سلة ـ مصارعة ـ ملاكمة) وذلك من خلال جداول المباريات المعتمدة من الاتحاد المصري لكل نشاط .

وتم تطبيق قياسات البحث على لاعبي كرة السلة والمصارعة والملاكمة قيد البحث بالطريقة التالية :

٣ / ٥ / ١ القياس القبلي في بداية موسم المنافسات :

تم إجراء القياس القبلي قبل المنافسة باربعة وعشرين ساعة لكل نشاط من

الانشطة المختارة على حدة ، وطبقا لميعاد المناقسات الخاصة بكل نشاط ، وذلك باتباع الاجراءات التالية :

- الكشف الطبي على اللاعبين ·
- تم سحب ٥ سم^{٣} من الدم من كل فرد على حدة باستخدام السرنجات البلاستيك الخاصة للاستعمال مرة واحدة ·
- تم تفريغ الدم من السرنجات في انابيب اختبار بها مادة الهيبارين لمنع تجلط الدم ، ومرقمة بارقام تطابق ترتيب افراد العينة عند سحب عينات الدم منهم ويراعى نزع الابرة من السرنجات قبل تفريغ الدم في الانابيب وذلك للمحافظة على مكونات الدم اثناء عملية التفريغ ·
- تم وضع انابيب عينات الدم في ثلاجة خاصة لنقلها الى المعمل ·
- تم فصل البلازما عن مكونات الدم باستخدام جهاز الطرد المركزي لمدة (٢٠) دقيقة وبسرعة ٣٠٠٠ دورة / دقيقة ·
- تم سحب البلازما من الأنابيب بعد عملية الفصل باستخدام الماصة الاتوماتيكية ·
- وتفرغ كل انبوبة في انبوبتين صغيرتين من البلاسيتك ذات غطاء محكم ومرقمتين بنفس رقم الانبوبة الاولى · (أي لكل عينة انبوبتان ، حتى تحصل على نتائج اكثر ثباتا)·
- ثم تحفظ العينات في مبرد عند درجة ـ ٢٠^{٥}م (تحت الصفر) لحين اجراء عملية التحليل ·

٢ / ٥ / ٢ القياس البعدي في بداية موسم المنافسات :

- تم سحب عينات الدم من أفراد النشاط الذي يجري عليه القياس بعد انتهاء المنافسة مباشرة · (وتم ذلك على مجموعات البحث الثلاث)

اجراءات القياس : تتبع نفس اجراءات القياس القبلي في بداية موسم المنافسات ·

٣ / ٥ / ٣ القياس القبلي في منتصف موسم المنافسات :

- تم سحب عينات الدم من أفرا د النشاط الذي يجري عليه القياس ، قبل المنافسة باربعة وعشرين ساعة . (وتم ذلك على مجموعات البحث الثلاث) .

اجراءات القياس : تتبع نفس اجراءات القياس القبلي في بداية موسم المنافسات .

٣ / ٥ / ٤ القياس البعدي في منتصف موسم المنافسات :

- تم سحب عينات الدم من افراد النشاط الذي يجري عليه القياس بعد انتهاء المنافسة مباشرة .(وتم ذلك على مجموعات البحث الثلاث) .

اجراءات القياس : تتبع نفس اجراءات القياس القبلي في بداية موسم المنافسات .

٣ / ٥ / ٥ القياس القبلي في نهاية موسم المنافسات :

تم سحب عينات الدم من أفرا د النشاط الذي يجري عليه القياس قبل المنافسة باربعة وعشرين ساعة . (وتم ذلك على مجموعات البحث الثلاث) .

اجراءات القياس : تتبع نفس اجراءات القياس القبلي في بداية موسم المنافسات .

٣ / ٥ / ٦ القياس البعدي في نهاية موسم المنافسات :

تم سحب عينات الدم من افراد النشاط الذي يجري عليه القياس بعد انتهاء المنافسة مباشرة (وتم ذلك على مجموعات البحث الثلاث) .

اجراءات القياس : تتبع نفس اجراءات القياس القبلي في بداية موسم المنافسات .

بعد الانتهاء من جميع الاجراءات الخاصة بالقياسات القبلية والقياسات البعدية خلال موسم المنافسات (بداية ومنتصف ونهاية موسم المنافسات) للانشطة الرياضية المختارة قيد البحث (كرة السلة -

المصارعة ـ الماركمة) وتجميع كل عينات البلازما في المبرد · تم تحليل عينات الدم لقياس معدلات هرمون البرولاكتين *PRL* والادرينوكورتيكوتروفين *ACTH* والأنسولين والجلوكوز · حيث اجريت جميع التحاليل الطبية · بمعامل الكيمياء الحيوية بكلية الطب جامعة الزقازيق ، ومعمل قسم الفسيولوجي بكلية الطب البيطري جامعة الزقازيق · بالطريقة التالية :

طرق قياس الهرمونات :

تم استخدام طريقة المقايسةالمناعية الاشعاعية *R.I.A. Radioimmunoassay* لقياس معدل *ACTH* ، *PRL* مباشرة في البلازما · وهذه الطريقة لها درجة عالية من الحساسية والخصوصية ، وتعتمد على استخدام اجسام مضادة معينة تتحد مع الهرمون في العينة او الهرمون المشع اللذين يتنافسان لاتمام ذلك الاتحاد لصالح أحدهما ·

فكرة عمل طريقة التحليل :

تعتمد هذه الطريقة في اجرائها على تنافس بين البرولاكتين *PRL* او الادرينوكورتيكوتروفين *ACTH* المشع باليود المشع ١٢٥ وبين *PRL* و *ACTH* الموجودين في المحلول الثابت التركيز *Standard* (*PRL* القياسي *ACTH* القياسي) وذلك على كمية ثابتة من مضادات الاجسام (المصل المضاد للهرمون) *Antibody* وبعد فترة الحضانة (فترة معينة لاجراء التنافس واحتلال أماكن التماسك مع مضادات الاجسام والهرمونات) فان كمية الهرمون المشع تتناسب تناسباً عكسيا مع كمية الهرمون الغير مشع الموجود في العينة ·

وقد افترض ان الفصل بين الهرمون والمتحد مع مضادات الاجسام يعتمد على استخدام عامل يرسب احدهم ، وليكن المتحد مع مضادات الاجسام ويبقى الآخر حر ·

أولاً : طريقة قياس هرمون البرولاكتين PRL

خطوات التحليل لقياس معدل PRL باستخدام طريقة **اكبر وآخـــرون** Akbar et al., عام ١٩٧٥م .

- بواسطة ماصة خذ ٢ر. مل من العينة والعياري Control (العينـة الضابطـة) .
- خذ ٢ر. مل من كل في تركيز . صفر ، ٥ ، ١٠ ، ٢٥ ، ٥٠ ، ١٠٠ ، ٢٠٠ ميكرو / مل من العياري Standard (المعدلات الثابتـــة) الى انابيب جاهزة مكتوب عليها لاصقتها .
- أضف ٢ر. مل من تركيز صفر Standard الى مجموعـــة الانابيب N.S.B. Non Specific Binding
- أضف ٢ر. مل من المادة المتفاعلة (المصل المضاد للهرمون) " الخضراء" لكل انبوبة ماعدا مجموعة أنابيـــب N.S.B.
- أضف مقابل ذلك ٢ر. مل من الماء المقطر الى مجموعـة الانابيـــب N.S.B
- اخلط المحتويات بواسطة الخلاط Vortex برفق لمدة بضع ثوان .
- بعد عملية الخلط اترك الانابيب لمدة نصف ساعة عند درجة حرارة ٣٧°م
- أضف ٢ر. مل من محلول البرولاكتين النشط بالأيوديـن ١٢٥ "الاحمر" الى كل انبوبة ، ثم رج الانابيب برفق بواسطة Vortex لمدة ثـوان قليلـــة .
- اترك كل الانابيب عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٩٠ دقيقـة .
- أضف ٥ر. مل من المحلول المرسب للأجسام المضادة Antibody ، وبعد ذلك قم برج الأنابيب بشـــدة .
- ضع الانابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة ٢٠ دقيقة عند سرعة ٣٠٠٠ لفة في الدقيقـة .

- افصل الطبقة السائلة العليا (المحلول العلوي) Decant Supernatant من كل الانابيب . ثم اجعل الانابيب مقلوبة لمدة بضع دقائق قليلة .
- وبرفق امسح فوهة الإنبوبة (الانابيب) بواسطة ورق نشاف ، ثم ضعهم وضع معتدل .
- ثم قم بعملية قياس قيمة الراسب النشط اشعاعيا المتبقي في كل انبوبةعن طريق العد بواسطة عداد جاماسنتيلاشن Gamaa Seintillation Counter في فترة من الزمن لاتقل عن الفترة اللازمة لكي نأتي بـ (١٠٠٠٠) عدة من انابيب المصدر .

طريقة الحساب :

- قم بعملية حساب متوسط العدد لكل زوج من الانابيب المزدوجة .
- احسب قيمة B / Bo لكل من العينة ، كل من العياري Control & Standard

$$\% \; B / Bo = \frac{B - N.S.B.}{Bo - N.S.B} \; X \; 100$$

حيث أن

B متوسط معدل العد لكل زوج من الانابيب .

Bo متوسط معدل العد العياري Standard صفر

N.S.B متوسط معدل العد في انابيب الاتحاد غير النوعي .

- جمع رسم منحنى العياري Standard بواسطة رسم النسبة المئوية B/Bo لكل Standardمقابل تركيزه بالميكرو / مل « مستخدماً ورق نصف لوغارتمي التدريج » . (٦ : ٣٩١ ـ ٣٩٨) .

ثانياً : طريقة قياس الادريناكورتيكو تروفيك هرمون *ACTH* :

خطوات قياس *ACTH* باستخدام طريقة بيرسونيلو *Bersonyalow* عام ١٩٦٨ ·

- **اعداد وتجهيز المواد الداخلة في التفاعل :**
  - جهز المحلول العياري ٥ مع ١٠ مل من الماء المقطر ·
  - عد محلول عياري آخر مع ٥ر٠ مل من الماء المقطر ·
  - جهز مضادات المصل مع ١٠ مل من المحلول الدارئ *Buffer*
- وبعد كل هذه الاضافات يمكن ان تخزن هذا المحلول لمدة أسبوع عند درجة حرارة من ٢ ـ ٨ °م ·
- جهز المحلول الباحث *Tracer* مع ٢٠ مل من المحلول المعادل *Buffer*
- اخلط المحتويات بهدوء تام حتى يصبح الكل في صورة متجانسة ·
- بعد اعداد المحلول المكون من المحلول العياري والمحلول الباحث يمكن تخزينه لمدة ٣ أيام عند درجة حرارة من ٢ ـ ٨ °م ·

- **اعداد الانابيب :**

المجموعات الآتية تستخدم في عملية القياس :

المجموعة "*T*" وتستخدم في عملية قياس النشاط الكلي ·

المجموعة "*C*" وتستخدم في عملية حساب الاتحاد غير النوعي

المجموعة "*O*" لقياس نقطة "O" وكذلك قياس القدرة على الاتحاد ·

المجموعات " العيارية " · وتستخدم لقياس منحنى العيارية ·

مجموعات "*C X*" وتستخدم في عملية حساب الاتحاد غير النوعي · للعينة ·

مجموعات "*S X*" وذلك للعينات المجهولة ·

- **توزيع المواد المتفاعلة وفترة التفاعل (الحضانة للتجربة) :-**

- تتم عملية توزيع واضافة المواد المتفاعلة وتكـــون درجة حـرارة الغرفة حوالي ١٨ ـ ٢٥ °م .

- بعد عملية انتشار وتوزيع المواد المتفاعلة ، تخلـــط محتويـات كل انبوبة بواسطة خلاط *Vartex Mixer* يرفع ويخلـــط المواد بعملية عمودية . ثم تترك لفترة حضانة يحدث فيها التفاعل .

	مضاد السيرم	ACTH بيود ١٢٥	المحلول العياري	المحلول المعادل	مجموعات الانابيب
خلط وتحضين لمدة ١٨ ـ ٢٤ ساعة في درجة حرارة ٢ ـ ٨ °م	-	200	-	-	T
	-	200	100Std.O	100	C
	100	200	100	-	O
	100	200	100	-	المحلول العياري
	-	200	100	100	C X
	100	200	100	-	S X

تقاس الاحجام كلها بالمليلتر ، والكمية المحضنة تساوي ٤٠٠ ملليلتر .

- **اضافة** *PR Reagent*

- هذه المادة لابد وان ترج جيدا حتى تكون معلقا متجانسا . ثـــم تحفظ عند درجة حرارة ٢ ـ ٨ °م حتى وقت الاستخدام.

- يضاف هذا العامل الى كل الانابيب ماعدا مجموعة الانابيب "T" .
- يقلب ويخلط ويترك لمدة ١٥ دقيقة عند درجة حرارة ٢ـ٨ °م .

- **عملية الطرد المركزي ـ وتنقية الطبقة العليا (المحلول العلوي) وعملية العد :**
- ضع الانابيب في جهاز الطرد المركزي (ماعدا مجموعة الانابيب T) عند سرعة للجهاز من ٢٥٠٠ ـ ٣٠٠٠ لفة في الدقيقة ، وذلك لمدة حوالي ١٥ دقيقة . (ومن المفضل يكون ذلك عند درجة حرارة منخفضة تتراوح من ٢ ـ ٨ °م .

- افصل الطبقة المترسبة عن طبقة المحلول عن طريق عملية الترويق .
- وغالبا ماتكون الطريقة المتبعة بان تقلب الانابيب في اناء مناسب لتجميع المحاليل التي لها نشاط مشع .
- ثم رج الانابيب واتركها في حالة مقلوبة فوق ورق له خاصية الامتصاص .

- **طريقة تجميع النتائج :**

في كل مجموعة من الانابيب قم بعد الاعداد الرئيسية النهائية بعد طرح المتبقي .

وبالنسبة لمجموعات الانابيب T ، O العيارية ١ حتى العيارية ٥ فان تركيز الاتحاد غير النوعي سوف يطرح . وكذلك بالنسبة للمجموعة S X وكذلك الاتحاد غيرالنوعي النشط بالنسبة للعينة فانه يطرح أيضاً .

وكذلك لحساب النسبة المئوية للقابلية في الاتحاد عن طريق .

$$Bo/T = \frac{O - C}{T} \times 100$$

فان قيمة العدد النهائي لكل من العينة والعياري يعبر عنهم بالنسبة المئوية

نسبتا الى المجموعة "O"

المحلول العياري

$$B/Bo\% = \frac{Std. - C}{O - C} \times 100$$

العينة ٠

$$Bx/Bo\% = \frac{SX - CX}{O - C} \times 100$$

ثم نرسم منحنى العيارية بواسطة رسم او اخذ نقطة لتركيزات مختلفة لـ B/Bo وذلك مستخدماً ورق نصف لوغاريتمي (١٤ : ٢٧٢٥) ٠

ثالثا : طريقة قياس معدل الانسولين في الدم :

خطوات قياس معدلِ الانسولين في الدم بطريقةالتحليل الاشعاعي المناعي باتباع طريقة **فاجان وفلويد** *Fajan and Floyd* عام ١٩٧٩ ٠

- نضع المصل المبرد في درجة حرارة الغرفة حتى ترتفع حرارته لتماثل حرارة الجو قبل البدء في الاجراءات ٠
- نقوم بترقيم ٤ انابيب لاستخدامها في القياس الكلي والاتحاد غير النوعي (بالحرف *T*)
- نمص ٢٠٠ ميكرولتر من المصل بواسطة المرقم الصفري (*A*) ونضعها في انابيب الاتحاد الاقصى ٠
- اضف ٠,١ ملليلتر من المحلول المشع باليود ١٢٥. في كل أنبوبة ٠
- نحضن الانابيب في درجة حرارة الغرفة لمدة ١٨ ـ ٢٤ ساعة ٠

ويمكن ان نحضن الانابيب لمدة ٣. ساعات فقط في درجة حرارة ٣٧ ^{0}م ٠

- نقوم بالغسيل جيداً ٠
- يتم العد لمدة دقيقة واحدة باستخدام عداد اشعة جاما (٢٦ : ٢١٣) ٠

رابعاً : طريقة قياس معدل الجلوكوز في الدم :

قياس معدل الجلكوز بطريقة تريندر *Trinder* عام ١٩٦٩ *

		الثابت *Blank*	العياري *Standard*	العينة *Sample*
العياري	*Standard*	—	١٠ ميكرولتر	—
العينة	*Sample*	—	—	١٠ ميكرولتر
المحلول العامل.	*Working Sol.*	١ ملليلتر	١ ملليلتر	١ ملليلتر

تتم الاضافة والقياس بعد فترة حضانة لمدة ١٠ دقائق في درجة حرارة ٣٧ °م او لمدة ٢٠ دقيقة في درجة حرارة ٢٠ ـ ٢٥ °م .

طريقة الحساب :

$$\frac{A\ Sample}{A\ Standard}\ X\ n$$

A = Absorbance .

n = Concentration of Standard in m. Mol/l.

* Glucose was estimated using Biomerieux kits

٦ / ٣ أســـــلوب التحليل الاحصائـــي :

نظراً لوجود عاملين متغيرين (قبل المنافسة ، وبعد المنافسة) ، ولمعرفة تأثير هذين العاملين على ثلاثة عوامل متغيرة (بداية موسم المنافسات ، منتصف موسم المنافسات ـ نهاية موسم المنافسات) ، استخدم الباحث نظـــــام التجارب العاملية *Factorial Experiments Design*

واستخدم من هذا النظام ، نظام التحليل العشـــوائي الكامل (٢ × ٣)

Complete Random Design (2 x 3)

وقـد استخدم هذاالنظام لمعرفة الفروق بين المتغيرات ·

- هل توجد فروق معنوية بين المتغير الأول (قبل المنافسة ، وبعدالمنافسة)
- هل توجد فروق معنوية بين المتغير الثاني (بداية موسم المنافســـات ، منتصف موسم المنافسات ، نهاية موسم المنافسات) ·
- هل هناك تأثير للعامل الأول على العامل الثاني (التفاعل او التداخل) *Interaction.*

كما استخدم الباحث : ـ المتوسط الحسابي ·

ـ والخـــطأ المعياري ·

ـ اختبار (ت)

وقـد اتخذ الباحث مستوى الدلالة عند (٠١ر٠) ، (٠٥ر٠) ·

كما اتبع التقريب الى ثالث رقم عشري · (٨٢) ·