الفصل الثالث

٣/ إجـــــراءات البحـــث

٣/١منهـــج البحث

٣/٢ عينة البحث

٣/٣ وسائل جـــمع البيانات

٣/٤ الإجراءات التمهيدية

٣/٥ خطوات تنفيذ البحث

٣/٦ المعالجات الإحصائية

٣/ إجراءات البحث :

٣/١ منهج البحث :

استخدم الباحث فى هذه الدراسة المنهج التجريبى الملائم لطبيعة هذه الدراسة وذلك بتصميم القياس (القبلى والبعدى) على مجموعات البحث الأربعة من لاعبى (سلاح المبارزة – كرة السلة – ٨٠٠م جرى – ٥٠٠٠م جرى) وذلك بسحب عينات الدم من كل مجموعة (قبل أداء النشاط الرياضى وقت الراحة) والقياس البعدى (أى بعد الانتهاء من الأداء مباشرة).

٣/٢ عينة البحث :

تم اختيار عينة البحث بالطريقة العمدية من اللاعبين المسجلين بالاتحادات المصرية فى الالعاب قيد البحث وذلك لمجموعات البحث الأربعة فى الموسم الرياضى ٢٠٠٥/٢٠٠٦م. وتم تقسيمهم إلى أربعة مجموعات متكافئة على النحو التالى:

جدول (١-٣)

المجموعات والنشاط الممارس وعدد العينة قيد البحث

المجموعات	النشاط الممارس	عدد العينة
المجموعة الأولى	المبارزة	١٠
المجموعة الثانية	كرة السلة	١٠
المجموعة الثالثة	٨٠٠مجرى	١٠
المجموعة الرابعة	٥٠٠٠م جرى	١٠

يوضح جدول (١-٣) المجموعات الأربع قيد البحث والمتمثلة فى(المبارزة – كرة السلة – ٨٠م جرى – ٥٠٠٠م جرى) .

جدول (٢-٣)

المتوسط الحسابى والانحراف المعيارى والوسيط ومعامل الإلتواء للمتغيرات الأساسية قيد البحث لإجمالى عينة البحث

ن = ٤٠

المتغيرات	وحدة القياس	المتوسط الحسابى	الانحراف المعيارى	الوسيط	معامل الإلتـــواء
الطول	سم	١٩٠,١٧	١٠,٢٢	١٨٧,٢٤	٠,٨٦
الوزن	كجم	٨١,١٢	٨,٦٣	٧٩,٣٤	٠,٦١
العمر الزمني	سنة	٢٢,١٦	٢,٤٢	٢١,٣٤	١,٠٢
العمر التدريبى	سنة	١٠,٧١	٢,٧٠	٩,٣٥	١,٥١

يتضح من جدول (٢-٣)المتوسط الحسابى والانحراف المعيارى والوسيط ومعامل الإلتواء للمتغيرات قيد البحث ، حيث يتراوح معامل الإلتواء ما بين (±٣) وهذا يعطى دلالة مباشرة على خلو البيانات من عيوب التوزيعات غير الاعتدالية .

جدول (٣-٣)

المتوسط الحسابى والانحراف المعيارى والوسيط ومعامل الإلتواء للمتغيرات الأساسية للأنشطة الرياضية قيد البحث

النشاط الممارس	المتغيرات	وحدة القياس	المتوسط الحسابى	الانحراف المعيارى	الوسيط	معامل الإلتواء
المبارزة ن=١٠	الطول	سم	١٨٩,١٧	٨,٧٨	١٨٨,٦٤	٠,١٨
	الوزن	كجم	٧٩,٦٢	٧,٥٢	٧٨,٢٥	٠,٥٤
	العمر الزمنى	سنة	٢١,١٧	٢,١٦	٢٠,٥٤	٠,٨٧
	العمر التدريبى	سنة	٩,٧٣	١,١٧	٨,٩٨	١,٩٤

تابع / جدول (٣-٣)

المتوسط الحسابى والانحراف المعيارى والوسيط ومعامل الإلتواء للمتغيرات الأساسية للأنشطة الرياضية قيد البحث

النشاط الممارس	المتغيرات	وحدة القياس	المتوسط الحسابى	الانحراف المعيارى	الوسيط	معامل الإلتواء
كرة السلة ن=١٠	الطول	سم	١٩١,١٦	٩,٦٣	١٩٠,٦٤	٠,١٦
	الوزن	كجم	٨٣,٥٤	٨,٠٦	٨٢,٦٤	٠,٣٣
	العمر الزمنى	سنة	٢٢,٠٦	٣,٥٢	٢١,٥٨	٠,٤١
	العمر التدريبى	سنة	١٠,١٢	٢,٠١	٩,٨٦	٠,٣٨
٨٠٠م جرى ن=١٠	الطول	سم	١٩٢,١٧	٩,٧٨	١٩١,٣٤	٠,٢٥
	الوزن	كجم	٨٤,٥٢	٧,١٦	٨٣,٦٤	٠,٣٦
	العمر الزمنى	سنة	٢٢,٥١	٢,٥٣	٢١,٥٨	١,١٠
	العمر التدريبى	سنة	١٠,٦١	٢,٥٩	٩,٦٤	١,١٢
٥٠٠٠م جرى ن=١٠	الطول	سم	١٨٩,١٨	٨,٧٨	١٨٨,٧٤	٠,١٥
	الوزن	كجم	٨١,٥٣	٧,٩٨	٨٠,٥٤	٠,٣٧
	العمر الزمنى	سنة	٢١,٩٢	٢,٨٧	٢٠,٧٥	١,٢٢
	العمر التدريبى	سنة	٩,٨٧	٢,٩١	٨,٩٤	٠,٩٥

يتضح من جدول (٣-٣) المتوسط الحسابى والانحراف المعيارى والوسيط ومعامل الالتواء للمتغيرات الأساسية لدى الأنشطة الرياضية قيد البحث ، حيث تراوحت معاملات الالتواء ما بين (±٣) وهذا يعطى دلالة مباشرة على خلو البيانات من عيوب التوزيعات غير الاعتدالية.

جدول (٤-٣)

تحليل تباين القياسات القبلية للمتغيرات الأساسية

لدى الأنشطة الرياضية قيد البحث

ن=٤٠

المتغيرات	مصادر التباين	د.ج	مجموع المربعات	متوسط المربعات	ف
الطول	بين المجموعات	٣	٦٧,١٠	٢٢,٣٧	٠,٢٦
	داخل المجموعات	٣٦	٣٠٨٣,٠٦	٨٥,٦٤	
	المجموع	٣٩	٣١٥٠,١٦		
الوزن	بين المجموعات	٣	١٤٢,٤١	٤٧,٤٧	٠,٨٨
	داخل المجموعات	٣٦	٢١٢٨,١٤	٥٩,١١	
	المجموع	٣٩	٢٢٧٠,٥٥		
العمر الزمنى	بين المجموعات	٣	٩,٣٠	٣,١٠	٠,٣٩
	داخل المجموعات	٣٦	٢٨٥,٢٤	٧,٩٢	
	المجموع	٣٩	٢٩٤,٥٥		
العمر التدريبى	بين المجموعات	٣	٤,٤٩	١,٥٨	٠,٢٩
	داخل المجموعات	٣٦	١٨٥,٢٧	٥,١٥	
	المجموع	٣٩	١٨٩,٧٦		

* معنوية عند مستوى ٠,٠٥ = ٢,٨٦

يتضح من جدول (٤-٣) عدم وجود فروق دالة إحصائياً عند مستوى معنـــوى ٠,٠٥ بين القياسات القبلية للمتغيرات الأساسية لدى الأنشطة الرياضية قيد البحث ، وهذا يعطى دلالـــة مباشرة على تكافؤ الأنشطة قيد البحث فى تلك المتغيرات .

١/٢/٣ شروط اختيار عينة البحث :

أ. تم اختيار عينة البحث من لاعبى الدرجة الأولى فى مجموعات البحث الأربعة (سلاح المبارزة - كرة السلة - ٨٠٠م جرى - ٥٠٠٠ م جرى) والمسجلين فى الاتحاد المصرى لعام (٢٠٠٥-٢٠٠٦).

ب. تم أخذ موافقة أفراد العينة على أن يكونوا من المتطوعين ولديهم الرغبة فى المشاركة فى البحث من حيث إتمام الإجراءات والاستعداد لسحب عينات الدم بدافع شخصى دون إجبار من الباحث والمدرب وذلك حتى يضمن الباحث أن يخرج كل منسابق أقصى ما عنده من جهد لضمات الوصول إلى أفضل النتائج الممكنة فى هذه الدراسة مع مراعاة شرح الباحثة لأفراد عينة البحث الأهمية العلمية للبحث والتطبيقية فى الحياة العامة والمجال الرياضى بوجه الخصوص .

ج. التأكد من عدم بذل مجهود سابق يؤثر فى هذه الدراسة عند أخذ القياس القبلى.

د. أن يتوافر المستوى البدنى والرياضى العالى وأن يكون هناك تجانس بين أفراد المجموعة الواحدة من مستوى الأداء والمستوى الرقمى والسن وعدد سنوات الممارسة وذلك لايجاد منافسة بينهم أثناء أداء المجهود البدنى.

ه. أن يوجد تجانس بين مجموعات البحث الأربعة من حيث السن فهو ينحصر بين (٢٠-٢٨) سنة ، وبين عدد سنوات الممارسة من (٨-١٢) سنة.

و. سلامة الحالة الصحية والبدنية للاعبين قبل تطبيق إجراءات البحث (بالكشف الطبى بواسطة طبيب متخصص) للتأكد من ضغط الدم ومعدل ضربات القلب ونسبة السكر فى الدم .

٢/٢/٣ شروط الحصول على عينة الدم :

أ. التهدئه النفسية قبل التجربة.

ب. عدم القيام بأى مجهود بدنى قبل التجربة.

ج. الاسترخاء أثناء أخذ عينة الدم وعدم شد عضلات الرقبة أثناء سحب الدم.

د. السرعة فى نقل عينات الدم لضمان سلامة النتائج.

ه. يفضل تدفئة المكان بالماء أو وسيلة أخرى .

و. يدلك مكان التجميع بـ(٧٠٪) إيثانول دون ضغط .

ز. يجب تجنب الضغط على مكان التجميع حيث يؤثر ذلك على مكونات الخلايا .

٣/٣ وسائل جمع البيانات :

حتى يمكن إجراء تلك الدراسة فقد قامت الباحثة بالاستعانة بمجموعة من وسائل وأدوات جمع البيانات ، واستخدام الأجهزة والأدوات المختلفة التى ساعدت الباحثة والمساعدين على إجراء القياسات والمتغيرات الفسيولوجية وسحب عينات الدم من اللاعبين وإجراء التحاليل المختلفة وإخراج النتائج لهذا البحث. وفيما يلى الوسائل والأدوات والأجهزة المستخدمة.

١/٣/٣ المراجع والدراسات السابقة:

تم الاستعانة بالدراسات والبحوث والمراجع العربية والأجنبية وذلك بغرض جمع بيانات ومعلومات نظرية مرتبطة بهذه الدراسة.

٢/٣/٣ استمارة جمع وتسجيل بيانات اللاعبين:

قام الباحث بتصميم استمارة فردية خاصة لكل لاعب على حده لتسجيل البيانات الخاصة بهم بيانات القياسات القبلية مستوى (Il-6) فى الدم لمجموعات البحث الأربعة مرفق (١).

٣/٣/٣ الأجهزة المستخدمة فى البحث:

- ميزان طبى لقياس الوزن بالكجم.
- جهاز " سفيجومانوميتر Phygmomanometer " ضغط الدم الشريانى .
- جهاز الرستاميتر لقياس الطول بالسم "Restameter".
- جهاز الطرد المركزى لفصل السيرم وتصل سرعته إلى حوالى ٣٠٠٠ دورة فى الدقيقة Center Fuge.
- جهاز قراءة الألوان "Elisa" لقياس مستوى الأنترلوكين-٦ فى الدم.
- ميكرسكوب ضوئى.
- جهاز زئبقى لقياس ضغط الدم.
- أمبولات (Vacutainer) تحتوى على سوائل مانعة للتحثر (EDTA) لحفظ الدم لحين أجراء التحليل.
- جهاز للقياس الطيفى لتدفق الخلايا (Flow Cytometer).
- ماصة أتومتيكية لفصل كرات الدم البيضاء عن الحمراء.

٣/٣/٤ الأدوات:

- ساعة الإيقاف الرقمية (Stop Watch) من نوع واحد لتسجيل زمن الأداء.
- أنابيب زجاجية محكمة الغلق ومعقمة جيداً لحفظ عينات الدم.
- مواد كيميائية خاصة (Kits) للكشف عن نسبة (IL-6) فى الدم.
- صندوق به ثلج مجروش (Ice Box) لوضح أنابيب عينات الدم بعد تجميعها حتى يتم نقلها إلى المعمل .
- السرنجات البلاستيكية المعقمة للحقن وسحب عينات الدم.
- قطن طبى وكحول للتطهير وبلاستير.
- شرائح زجاجية (سلايد لفرد عينات الدم).
- صبغة خاصة لتوضيح حبيبات الكرات البيضاء.

٣/٤ الإجراءات التمهيدية:

٣/٤ /١ خطوات إجراء البحث:

قبل البدء فى إجراءات البحث الأساسية وجد الباحث أنه من الضرورى إيجاد مجموعة من الضوابط التى تكفل سير التجربة الأساسية بطريقة سليمة ولذلك قام الباحث بوضع مجموعة من الخطوات التمهيدية وهى كما يلى:

١. جمع البيانات الخاصة بالعينة.
٢. اختيار المساعدين والأطباء المشاركين.
٣. الكشف الطبى والبدنى على المشاركين.
٤. ممرض لسحب العينات القبلية والبعدية.

٣/٤/٢ ترتيب ودقة متغير البحث (قيد الدراسة) :

قام الباحث فى هذه الخطوة بتدريب نفسه والمساعدين على سرعة ودقة وترتيب إجراءات القياسات الفسيولوجية من (نبض – ضغط الدم) للتأكد من صحة اللاعبين مرفق(٢) وتم تزويد المساعدين بترتيب أو توقيت أخذ القياسات الفسيولوجية وسحب عينات الدم وكان ترتيب أخذ القياسات كما يلى:

٣/٤/٣ القياس القبلى (وقت الراحة) قبل الإحماء :

- تم قياس المعدل الطبيعى لمستوى (IL-6) فى الدم من (٢,٦) إلى (٢٠,٣) بيكوجرام / مل .
- قياس معدل النبض بطريقة الجس من عند الشريان السوباتى على جانب الرقبة لتأكد من سلامة اللاعب.
- قياس ضغط الدم الشريانى لتأكد من سلامة اللاعب.
- سحب عينات الدم (بواسطة ممرضة متخصصة فى سحب الوريد).

٤/٤/٣ القياس البعدى (بعد الأداء مباشرة):

سحب عينات الدم (٥سم) بعد أداء الحمل البدنى مباشرة بالنسبة لمجموعات البحث الأربعة (سلاح المبارزة – كرة السلة – ٨٠٠م جرى – ٥٠٠٠م جرى).

٥/٤/٣ اختيار وتدريب المساعدين:

تم تحديد المساعدين واختيارهم وتدريبهم على أداء مهامهم لمساعدة الباحث فى إجراء التجربة من المدرسين الحاصلين على بكالوريوس التربية الرياضية واستعان الباحث بممرضة متخصصة فى قسم تحاليل الدم وذلك لسحب عينات الدم وحفظها وفحصها حيث تم الاستعانة بمعمل متخصص فى التحاليل الطبية (معمل دلتالاب) تحت أشراف مشرف البحث.

وقد اجتمع الباحث بالمساعدين بغرض:

- إطلاع الباحثين على جوانب البحث وأهدافه.
- تعريفهم بترتيب وتوقيت أخذ القياسات الأنثربومترية والفسيولوجية وسحب عينات الدم.
- التدريب على كيفية إجراء القياسات الفسيولوجية خلال الدراسة الاستطلاعية والتأكد من إتقان تنفيذها.
- إمداد المساعدين بالمعلومات الكافية للإجابة على أى استفسارات من عينة البحث أثناء تطبيق البحث .
- التعرف على استمارة القياس الخاصة باللاعبين والتدريب على كيفية تسجيل البيانات لهم.

٦/٤/٣ الدراسة الاستطلاعية:

قام الباحث بإجراء دراسة استطلاعية فى الفترة ٢٠٠٦/٨/١٥م حتى ٢٠٠٦/٨/٢٨م على عينة البحث وتم تطبيق كل القياسات الخاصة بالدراسة وقد استهدفت هذه الدراسة ما يلى:

أ. التأكد من قدرة اللاعبين على تنفيذ الأحمال المطلوبة وعدم وجود أى صعوبات فى تنفيذ تلك الأحمال البدنى.

ب. ضبط الأدوات والأجهزة وتحديد كيفية تشغيلها والتحقق من صلاحية تلك الأدوات والأجهزة المستخدمة فى إجراءات البحث.

ج. اكتشاف الصعوبات التى قد تظهر أثناء إجراءات التجربة الاستطلاعية والعمل على إزالتها عند إجراء تجربة البحث الأساسية.

د. تحديد وتجهيز أماكن قياس المتغيرات الفسيولوجية وسحب عينات الدم داخل الملعب.

ه. التدريب على إجراءات القياسات الخاصة بكل لاعب وتحديد المدة التى تستغرقها عملية القياس لكل لاعب فى كل من القياسات القبلية والبعدية.

و. توضيح دور المساعدين فى إجراءات البحث وتحديد اختصاص كل منهم فى إجراء القياسات الفسيولوجية والأنثروبومترية وسحب عينات الدم وتسجيل البيانات فى استمارة التسجيل الخاصة بكل لاعب.

٥/٣ خطوات تنفيذ البحث:

١/٥/٣ إجراءات القياس القبلية:

- تم إجراء قياسات الطول والوزن ومعدل النبض وضغط الدم الشريانى لتأكد من سلامة صحة عينة البحث بواسطة الباحث ومعه المساعدين وذلك أثناء الراحة قبل أداء عملية الإحماء هذا بالنسبة لمجموعات البحث الأربعة كل منهم على حدى وتم ترتيب أفراد عينة البحث بإعطاء كل لاعب رقم معين (١ : ١٠) لضمان أخذ القياسات البعدية بترتيب ونظام وتم تسجيل البيانات فى الاستمارة الخاصة بكل لاعب.

- سحب عينات الدم (٥سم) أثناء فترة الراحة قبل أداء الحمل البدنى بمعرفة الممرضة المختصة لمجموعات البحث الأربعة لاعبى السلاح فى يوم السبت الموافق (٢٠٠٥/٨/٢٠م) ، ولاعبى كرة السلة فى يوم الخميس الموافق (٢٠٠٥/٨/٢٥م) ، ولاعبى ٨٠٠م جرى ، ٥٠٠٠م جرى فى يوم الاثنين الموافق (٢٠٠٥/٩/٥م) ويتم سحب العينات بسرنجات بلاستيكية معقمة مع الأخذ فى الاعتبار استخدام سرنجة لكل لاعب حيث تم تجميع نتائج جميع عينات البحث فى الاستمارة المعدة لذلك مرفق (١).

- وتم تفريغ الدم فى أنابيب اختبار زجاجية محكمة الغلق ثم فصل كرات الدم البيضاء ووضعها فى أنابيب بلاستيكية وحفظها.

٢/٥/٣ إجراءات القياسات البعدية:

- بعد الانتهاء من أداء الحمل البدنى وذلك لتعرف على مستوى (IL-6) فى الدم بسحب ٥ سم٣ من الدم من كل فرد من أفراد عينة السلاح فى يوم السبت الموافق (٢٠٠٥/٨/٢٠م) ، ولاعبى كرة السلة فى يوم الخميس الموافق (٢٠٠٥/٨/٢٥م) ، ولاعبى ٨٠٠م جرى ، ٥٠٠٠م جرى فى يوم الاثنين الموافق (٢٠٠٥/٩/٥م) ويتم سحب العينات بسرنجات بلاستيكية معقمة مع الأخذ فى الاعتبار استخدام سرنجة لكل لاعب حيث تم تجميع نتائج جميع عينات البحث فى الاستمارة المعدة لذلك مرفق (١).

- تم أخذ نقطة الدم ووضعها على الشريحة الخاصة لعد كرات الدم البيضاء.

- تم تفريغ الدم من السرنجات فى أنابيب اختبار وذلك للمحافظة على مكونات الدم مع مراعاة وضع أسم اللاعب ورقمه على كل أنبوبة يتم تفريغ الدم منها.

- توضع أنابيب الاختبار فى جهاز الطرد المركزى لمدة (٥-١٠) دقيقة لفصل مكونات الدم.

- تم سحب البلازما من الأنابيب بعد عملية الفصل باستخدام الماصة ووضعها فى أنبوبة صغيرة من البلاستيك ذات غطاء محكم وعليها أسم اللاعب وتوقيت أخذ العينة.

- ثم وضعت الأنابيب البلاستيكية وبها البلازما فى صندوق الثلج لحين نقل العينات إلى المعمل.

٣/٥/٣ طريقة قياس مستوى (Il-6) فى المصل :

تم استخدام الطريقة التى وضعها " ***Herbeline et al*** **هيربيلين** " (١٩٩١) تم إجراء عملية التحديد الكمى لمستوى (IL-6) فى المصل بواسطة طريقة Elisa عن طريق استخدام الاختبار المناعى لإنزيم (IL-6) والكيتس موردة من شركة " Diamond Diagnostocs " وتم اجراء القياسات فى معمل متخصص (دلتا لاب) تحت إشراف مشرف البحث.

أ- تحضير المواد الجافة *Regent Preparation* :

(١) المادة المضادة لـ(Il-6) antibody (Il-6) :

هذه الأجسام المضادة تعطى جاهزة للاستخدام .

(٢) HRP- Conjugated Coat anti – Rabbit IgG :

تعنى حقن بروتين (IgG) المستخرج من الأرنب فى معزة فكونت أجسام مضادة لها هذه الأجسام أخذت وتم شبكها بـ (HRP) ، وهذه المادة جاهزة للاستخدام فى المعمل .

(٣) المادة المخففة Buffer Diluent :

وهذه المادة جاهزة لاستخدام وتحتوى على :

- BSA (البومين مصل البوفين) .
- ٠,٠١٠٪ مادة حافظة تسمى Thimerosal .

وهذه المواد معدة لتكون عند وسط قلوى PH = ٧,٥ .

(٤) تخفيف المصل Serum Diluent :

وهذا التخفيف يحتوى على مصل من الإنسان البشرى مضاف عليه ٠,٠١٪ مادة Thimerosol الحافظة و ٠,٠١٪ من مادة جنتاميسين كمضاد حيوى تعمل كمادة حافظة .

(٥) معاير وطرق التحكم فى (Il-6) Il-6 Standards and controls :

عينات المصل وعينات فى المواد ذوى نسبة بروتين عالية تساوى ٥٪ فى البومين مصل بوفين (BSA) أو (٢٥٪) من (PBS) هذه النسبة تحدد عن طريق منحنى قياسى وذلك باستخدام محلول المصل المخفف ، لإعادة تجهيزها عند بدء استخدامها لتصبح فيرش يضاف (١) مليمتر فى المحلول المخفف المناسب لكل أنبوبة مع مزجها جيداً بالإضافة إلى وجود خليط معيارى بتركيز (٠ ، ٥٠ ، ١٠٠ ، ٢٥٠ ، ٥٠٠ ، ١٠٠٠ ، ٢٠٠٠) بيكو جرام / لكل مليمتر .

(٦) رباعى ميثيل البنزيدين TMB Substrate TMB :

تحتوى كل قارورة على محلول عند تركيز ٣,٣ ، ٥,٥ تيترا ميثيل بنزيدين (TMB) وأكسيد الهيدروجي الفوقى (H_2O_2) .

(٧) الغسول المركز Wash Buffer Concentrate :

بعد إعادة التجهيز كل أنبوبة تحتوى على الغسول المركز على محلول ملحى معادل ومادة خافضة للتوتر مضاف عليه نسبة ٠,٠١٪ فى الثيمرزوال كمادة حافظة وقد تم إعداد الغسول المركز بواسطة إضافة (١٠٠) مللى من الغسول بتركيز يصل إلى (٩٠٠) مللى من المياه الأيونية ومزجها معاً جيداً .

(٨) عدم الإحلال فى NHcL Stop Solution in NHcL :

تم إعداد (NHcL) من خلال إضافة (٨,٦) مللى من محلول HCL المركز و (٨٠) مللى من المياه المقطرة .

ب - إجراءات الاختبار ***Assay Procedure*** :

تم وضع كل المواد الكاشفة فى درجة حرارة الغرفة :

(١) تم خلط كل المواد الكاشفة بشكل عام دون حدوث أى رغاوى قبل الاستخدام .

(٢) تترك إحدى العينات المأخوذة دون إجراء تجارب عليها وذلك لمقارنتها بالعينات الأخرى المجرى عليها التجارب وتسمى بالمادة المقارنة .

(٣) بواسطة الماصة يؤخذ (١٠٠ميكروليتر) فى المحلول القياسى والعينات والـ (Kit) وتضاف على محلول الأجسام المضادة برج الوعاء برفق عن طريق طرقات خفيفة لمدة ١٥ثانية على الأقل للتأكد من خلطها جيداً .

(٤) يغطى كل المزيج رقم (٣) بغطاء خاص للأطباق وتوضع فى الحضانة عند درجة ٣٧°درجة مئوية لمدة ٦٠دقيقة .

(٥) تم إزالة الغطاء ، وغسلها ٤مرات بمقدار (٤٠٠ ميكروليتر) من الغسول لكل وعاء .

(٦) تترك الأطباق القياسية فارغة ويوضع (١٠٠ ميكروليتر) من الأجسام المضادة لـ(II-6) عن طريق الماصة فى كل طبق .

(٧) يغطى كل طبق بغطاء نظيف يوضع فى الحضانة عند درجة (٣٧°م) لمدة ٣٠دقيقة .

(٨) تم إزالة الغطاء مع سحب المحلول من كل الأوعية ، مع غسيل الأوعية ٤مرات بما يقرب من (٤٠٠ ميكروليتر) ملى من الغسول لكل وعاء مع سحب كامل بين عمليات الغسل وبعضها .

(٩) يترك المحلول القياسى فارغاً ويضاف (١٠٠ ميكروليتر) من الأجسام المضادة لكل طبق .

(١٠) يغطى الطبق بغطاء ويوضع فى الحضانة عند درجة (٣٧°م) لمدة ثلاثين دقيقة .

(١١) يتم إزالة الغطاء مع سحب المحلول من كل الأوعية وغسلها أربع مرات بما يقرب من ٤٠٠مل من الغسول لكل وعاء مع السحب الكامل بين عمليات الغسل وبعضها البعض .

(١٢) تم امتصاص (١٠٠ ميكروليتر) من مادة TMB ، إلى داخل الأوعية بما فى ذلك الأوعية الخالية مع احتضانها وتغطيتها لمدة (١٥دقيقة) فى درجة حرارة الغرفة .

(١٣) امتصاص (١٠٠ ميكروليتر) من محلول الإيقاف إلى كل الأوعية بما فى ذلك الأوعية الخالية وتغطية الوعاء بشدة لمزج السائل داخله .

(١٤) وتظهر عملية امتصاص الأوعية عند (٤٥٠) نانومتر ، يجب أن يقرأ الامتصاص أسرع ما يمكن عند الانتهاء من التجربة ولكن يمكن قراءته خلال ساعة من إضافة المحلول عند حفظ الأطباق بعيد عن الضوء فى درجة حرارة الغرفة .

ج - الحسابات :

المنحى القياسى :

(١) يقاس الامتصاص عند ٤٥٠نانو متر لكل طبق .

(٢) يحدد المتوسط ويسجل .

(٣) يوضع الامتصاص على المحور الرأسى (العادى) والتركيز لمادة (iL-6) بالبيكو جرام لكل مليمتر على المحور البينى .

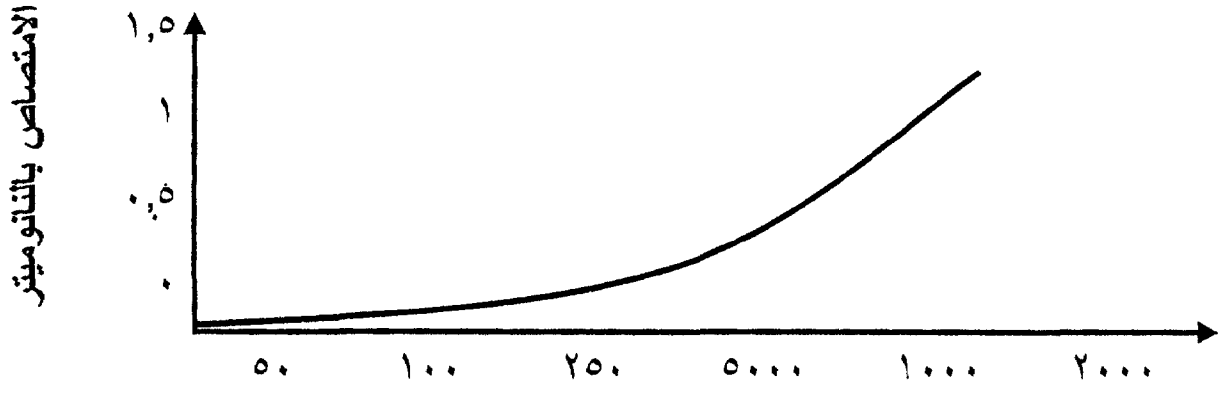
(٤) يرسم المنحنى .

مثال للقياس :

(١) الامتصاص عند ٤٥٠نانومتر يسجل لكل طبق فى العينة .

(٢) يسجل المتوسط لكل عينة .

(٣) يوضع الامتصاص المتوسط لكل عينة على الأحداثى الرأسى ثم يرسم خط أفقى يقطع المنحنى القياس ، عند نقطة الالتقاء ، تركيز هرمون (iL-6) (بيكو جرام / مل) يقرأ الأحداثى البينى ويضرب الناتج × ٥٠ .



شكل (١-٣)

التركيز بالبيكو جرام / مل

٦/٣ المعالجات الإحصائية:

تم تجميع البيانات وجدولتها تمهيداً لمعالجتها إحصائيا باستخدام برنامج الحزم الإحصائية SPSS وذلك باستخدام :

- مقاييس النزعة المركزية (الوسط- الوسيط- الانحراف المعيارى)
- معامل الالتواء.
- النسبة المئوية.
- معدل التغير
- اختبار (ت).
- اختبار (**L.S.D**)