الفصل الرابع

إجراءات البحث

أولاً: منهج البحث

ثانياً: مجالات البحث

ثالثاً: عينة البحث

رابعاً: أدوات ووسائل جمع البيانات

خامساً: الخطوات التنفيذية لإجراء البحث

سادساً: المعالجات الإحصائية

obeikandl.com

إجراءات البحث :

أولاً : منهج البحث :

استخدمت الباحثة المنهج التجريبي باستخدام طريقه القياس القبلي – البعدى لمجموعة تجريبية واحدة نظراً لملائمته لطبيعة هذا البحث .

ثانياً مجالات البحث :

١. المجال البشرى :

أجرى البحث على عينة من الرجال كبار السن الأصحاء بنادي سموحة الرياضي بالإسكندرية .

٢. المجال الزمني :

تم إجراء التجربة الأساسية للبحث لمدة شهرين خلال الفترة من ٢٠١٠/٤/٢٨ : ٢٠١٠/٦/٣٠ .

٣. المجال الجغرافى :

- تم ممارسه النشاط البدني وإجراء القياس القبلي والقياسات البعدية ، وسحب عينات الدم داخل (الجمنيزيوم) بنادي سموحة الرياضي بالإسكندرية .
- تم إجراء التحاليل المعملية الخاصة بكل من (IL-10 , IL-2) على عينات الدم بقسم المناعة – بمعهد البحوث الطبية – جامعة الإسكندرية .
- تم إجراء التحاليل المعملية الخاصة بقياس مستوى هرمون التستوسيترون – بمعمل الدكتور/ محمد فؤاد خميس أخصائي التحاليل الطبية – الرصافة – محرم بك – الإسكندرية .

ثالثاً : عينة البحث :

تم اختيار عينة البحث بالطريقة العمدية من رواد نادي سموحة الرياضي بالإسكندرية وقد بلغ حجم العينة (٩) من الرجال كبار السن الأصحاء بمتوسط عمر(٦٦.٥٠٠±٥.٣٤٥سنة) ، والطول(١٦٥.٦٢٥±٤.٧٧٩سنتيمتر) ، الوزن(٩٣.٧٥٠±١٨.٣٧٥كيلوجرام) ، وقد أستبعد أحدهم لإصابته بفيروس بالكبد .

شروط اختيار العينة :

- أن تكون العينة من الذكور الأصحاء
- ألا يقل السن عن ٦٠ سنة
- أن يتمتع بصحة جيدة ويخلو من اي اضطرابات هرمونية او فيروسات في الكبد H.B.s (Ag – H.C.v IgG) او اي امراض مناعية مزمنة معروفة بتأثيرها على الوسائط المناعية مثل الروماتويد والحساسية . وكذلك الخلو من امراض السكر وتم استبعاد الذين خضعوا لعمليات جراحية كالقلب المفتوح .
- أن يكون جميع أفراد عينة البحث على معرفة مسبقة بفكرة البحث وأهميته والنشاط البدني المكلفين به ومدة إجراء التجربة وكذلك موافقتهم على سحب عينات الدم قبل إجراء التجربة وخلال وبعد الإنتهاء منها .

obeikandi.com

خصائص عينه البحث :

قامت الباحثة بالتأكد من تجانس جميع أفراد العينة في المتغيرات الاساسية و يوضح جدول (١) توصيف افراد عينة البحث فى المتغيرات الاساسية (العمر الزمني - الوزن - الطول)

جدول (١)

المتوسط الحسابى و الانحراف المعيارى و قيم " Z " للمتغيرات الاساسية للبحث لحساب تجانس عينة البحث بطريقة كولموجروف-سميرنوف للعينة الواحدة

المتغيرات الأساسية	وحدة القياس	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	قيمة Z
١. العمر الزمني	سنة	٦٦.٥٠٠	٥.٣٤٥±	٠.٥٠٩
٢. الوزن	كيلو جرام	٩٣.٧٥٠	١٨.٣٧٥±	٠.٥١٨
٣. الطول	سنتيمتر	١٦٥.٦٢٥	٤.٧٧٩±	٠.٤٤٩

- قيمة (Z) الجدولية عند مستوى دلالة (٠.٠٥) = ١.٩٦
- قيمة (z) الجدولية عند مستوى دلالة (٠.٠١) = ٢.٥٨

يتضح من جدول (١) ان قيم Z المحسوبة أقل من القيمة الجدولية عند مستوى دلالة (٠.٠٥) مما يدل على عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية بين افراد العينة الواحدة فى المتغيرات الأساسية وهذا يدل على تجانس العينة في تلك المتغيرات.

رابعاً : أدوات ووسائل جمع البيانات :

استخدمت الباحثة عدة وسائل لجمع البيانات الخاصة بالبحث وتشمل :

١) المقابلات الشخصية :

بعد اطلاع الباحثة على الكتب العلمية والمراجع والدراسات السابقة العربية والاجنبية ومقابلة اعضاء هيئة التدريس بقسم الفسيولوجي بكلية الطب جامعة الإسكندرية لتحديد الإختبارات الخاصة بالهرمونات (التستوستيرون) قيد البحث ، و أستاذ المناعة بمعهد البحوث الطبية جامعة الاسكندرية لتحديد التحاليل المعملية الخاصة بمستويات الوسائط المناعية بالدم (انترلوكين-٢ ، انترلوكين- ١٠) التي يمكن من خلالها التعرف على التغيرات التي تحدث لها نتيجة لأداء النشاط البدني الخاص بالبحث ، و كذلك لتحديد كلٍ من :

- كمية الدم المطلوبة
- نوع العينة (سيرم أو بلازما)
- توقيتات سحب عينات الدم (قياس قبلي – بيني – بعدى)
- طريقة فصل وحفظ العينات وكذلك نوع أنابيب الحفظ المستخدمة

- أسلوب معالجة العينة قبل إجراء التحاليل .

ثم قامت الباحثة بإجراء عدة مقابلات شخصية مع كل من :
- اعضاء هيئة التدريس بقسم العلوم الصحية كلية التربية الرياضية للبنات جامعة الاسكندرية لمناقشة البحث وتم تحديد مدة اجراء التجربة وعدد مرات ممارسة النشاط البدني وشدته .

- مديرعام نادي سموحة الرياضي ، مدير النشاط الرياضي بنادي سموحة ، مدير أمن نادي سموحة الرياضي . وذلك لأخذ الموافقة على دخول وتطبيق التجربة الخاصة بالبحث واستخدام السير المتحرك بالجمنيزيوم بنادي سموحة الرياضي بالإسكندرية . مرفق (١)

٢) الإستمارات المستخدمة فى البحث :

قامت الباحثة بتصميم بعض الاستمارات الخاصة لجمع البيانات **و تشمل :**

- استمارة تسجيل البيانات الاولية لأفراد عينة البحث في المتغيرات الأساسية (الاسم - الطول – الوزن – العمر الزمني- الرقم الخاص بكل فرد – زمن اداء النشاط البدني)**(مرفق ٢)**
- استمارة تسجيل بيانات أفراد العينة في المتغيرات البيوكيميائية قيد البحث (هرمون التستوسيترون , IL-2 , IL-10) (مرفق ٣)
- استمارة تسجيل بيانات أداء النشاط البدني على جهازالسير المتحرك (السرعة – الزمن – المسافة – معدل ضربات القلب) قبل وبعد النشاط البدني **.(مرفق٤)**

٣) الأجهزة المستخدمة فى البحث :

- جهاز السير المتحرك (Treadmill) . **(مرفق ٥)**
- جهاز الريستاميتر (Restameter) لقياس طول الجسم (سم)
- جهاز الميزان الطبي لقياس وزن الجسم (كجم)
- جهاز الطرد المركزي لفصل عينات الدم (Centrifuge)
- جهاز قراءة الألوان (ELISA) لقراءة تحليل (IL-2 , IL-10)
- جهاز قياس ضغط الدم بالزئبق
- سماعة طبية .

٤) الأدوات المستخدمة فى البحث:

- عدد مناسب من أنابيب جمع وحفظ عينات الدم (Eppendorf) .
- صندوق ثلج (Ice Box) لحفظ عينات الدم لحين نقلها إلى المعمل .
- مجموعة من الحقن البلاستيكية المعقمة (Medical Syringes) للاستعمال مرة واحدة لسحب عينات الدم حجم (٥سم^{٣}) .
- قطن طبي .
- شرائط لاصقة (بلاستر) .
- ضاغط (Tourniquet) .
- مطهر موضعي (Antiseptic Solution) .
- مواد كيميائية (Kits) خاصة للكشف على انترلوكين -٢ (IL-2) .
- مواد كيميائية خاصة للكشف على انترلوكين- ١٠ (IL-10) .

Operikan.com

٥) القياسات المستخدمة فى البحث :

- **القياسات الجسمية :**

- قياس الطول : تم استخدام جهاز الريستاميتر لقياس طول الجسم لأقرب سم .
- قياس الوزن : تم استخدام جهاز الميزان الطبي لقياس وزن الجسم لأقرب كجم .
- العمر الزمني (السن) : تم حساب العمر الزمني لأقرب شهر عند بداية القياس القبلي للبحث .

- **القياسات البيوكيميائية :**

قامت الباحثة بإجراء تلك القياسات للتأكد من خلو أفراد العينة من الأمراض متمثلة في :

- قياس مستوى السكر بالدم صائم Fasting Blood Sugar(mg/dl)
- قياس مستوى الكوليسترول Serum Cholesterol (mg / dl)
- قياس فيروسات الكبد (H.B.s Ag – H.C.v IgG)
- هرمون التستوسيترون (T)
- انترلوكين- ٢ (Interleukin- 2)
- انترلوكين- ١٠ (Interleukin- 10) .

- **القياسات الفسيولوجية :**

- قياس معدل ضربات القلب Pulse Rate
- قياس ضغط الدم Blood Pressure Measurement

خامساً : التجربة الاستطلاعية :

قامت الباحثة بإجراء التجربة الاستطلاعية يوم الاربعاء الموافق ٢٠١٠/٤/١٤ على عينة قوامها عدد ٣ من الرجال من عينة البحث الاساسية ، وتهدف هذه التجربة إلى :-

١. التأكد من صلاحية السير المتحرك و كيفية تشغيله
٢. تحديد بداية الجهد البدني على السير المتحرك
٣. التعرف على طريقة القياس وكيفية تسجيل البيانات بالإستمارات الخاصة بذلك
٤. التعرف على الصعوبات التي يمكن ان تواجه أفراد العينة أثناء تطبيق التجربة الأساسية والتعرف على كيفية التغلب عليها.

سادساً : الخطوات التنفيذية لإجراء البحث :

١. الإجراءات التمهيدية السابقة للبحث :

قامت الباحثة ببعض الإجراءات التمهيدية قبل بدء إجراء التجربة الأساسية للبحث ... وهى :-

obeikandi.com

- تم الأتصال ومقابلة بعض السادة مديري إدارة نادي سموحة ومقابلتهم شخصياً لتعريفهم بالبحث وذلك لأخذ الموافقة منهم على تطبيق التجربة ودخول النادي ودخول الجمنيزيوم والتأكد من سلامة جهاز السير المتحرك لتطبيق التجربة وتحديد ميعاد إجراءات البحث .

- تم مراعاة أخذ موافقة أفراد عينة البحث بحيث يكون لديهم الرغبة الأكيدة في المشاركة في تجربة البحث بدافع شخصي دون إجبار من الباحثة ، مع استعدادهم لسحب عينات الدم منهم لأكثر من مرة ، وذلك لكي تضمن الباحثة أن يؤدي كل فرد من أفراد العينة أقصى جهد على السير المتحرك وضرورة التزامه بالتواجد فترة تطبيق التجربة ليعود ذلك على الدراسة بنتائج أفضل

- تم حصر أفراد عينة البحث ومقابلتهم لإجراء التحاليل المعملية الخاصة بضبط العينة ، وكذلك جمع البيانات الخاصة بكل فرد (الاسم – العمر الزمني – تاريخ الميلاد – الطول – الوزن) وتسجيلها في الاستمارات **(مرفق ٢)**

- تم التنسيق مع إحدى الشركات المتخصصة في الخدمات العلمية وتم تحضير المواد الكيميائية (Kits) الخاصة للكشف على كلٍ من انترلوكين-٢ ، انترلوكين -١٠.

- تم التنسيق مع إحدى المعامل للتحاليل الطبية وذلك لأجراء التحاليل الخاصة بمستوى تركيز هرمون التستوسيترون وبعض التحاليل الأخرى الخاصة لضبط العينة (قياس مستوى السكر – مستوى الكوليسترول – الكشف عن فيروسات بالكبد)

- قامت الباحثة بإلقاء محاضرة على أفراد عينه البحث تناولت خلالها النقاط الآتية :

- توضيح فكرة البحث وأهدافه وأهميته التطبيقية بالنسبة لهم .
- توضيح طبيعة النشاط البدني المطلوب منهم القيام به (المشي على جهاز السير المتحرك) .
- شرح طريقة أخذ عينات الدم وتوقيتاتها قبل وبين وبعد أداء العمل البدني
- الإتفاق مع أفراد العينة بالإلتزام بالتواجد في ميعاد إجراء التجربة . وأهمية الأستمرار حتى نهاية التجربة
- توضيح إلتزام الباحثة بإعطاء كل فرد من أفراد العينة تقارير معتمدة وشاملة لجميع نتائج التحاليل التي أجريت فترة تطبيق التجربة وذلك ليكون بمثابة حافز يزيد من حماسهم تجاه أداء التجربة وبذل أقصى جهد يعود بالنفع على نتائج البحث
- الإجابة على أي إستفسارات وأسئلة مطروحة من قبل أفراد العينة خاصة بالدراسة .

٢. تطبيق البحث والتجربة الأساسية :

- تم إجراء التجربة الأساسية خلال الفترة (٢٠١٠/٤/٢٨) إلى (٢٠١٠/٦/٣٠) والتي اشتملت أداء النشاط البدني (المشي على السير المتحرك) ، وقد راعت الباحثة بعض الشروط عند تحقيق النشاط البدني ألا وهي :
  ١) مراعاة الفروق الفردية بين افراد عينة البحث
  ٢) مراعاة عوامل الأمن والسلامة لعينة البحث (وذلك من خلال إيقاف المشي على السير المتحرك في حالة الشعور بأي أعراض للتعب)
  ٣) تم تحديد الفترة الزمنية لإجراء تجربة البحث ومدتها (٨) اسابيع
  ٤) تم تحديد عدد الوحدات الاسبوعية بواقع (٣) مرات / الاسبوع وقد بلغ حجم الوحدات الكلية (٢٤) وحدة
  ٥) تم تحديد زمن الوحدة في المرة الواحدة من (٢٠:٤٠ دقيقة)
  ٦) تم التدرج في شدة النشاط البدني على الاسابيع التدريبية خلال فترة اجراء التجربة بشدة حمل متوسط تتراوح بين (٥٠-٧٠ %) من اقصى حدود لقدرة الفرد حيث تراوحت السرعة من (١.٦-٦.٥ كم/ساعة) .

٧) تم مراعاة مبدأ التدرج في زيادة الحمل طبقاً لقدرة كل فرد على حدة .

- **<u>الخطوات التنفيذية لإجراء تجربة البحث الاساسية :</u>**

١- القياس القبلى :

- تجمع أفراد عينة البحث يوم الأربعاء الموافق (٢٠١٠/٤/٢٨) في تمام الساعة الثامنة صباحاً وذلك بمقر الجمنيزيوم بنادي سموحة الرياضي .
- قامت الباحثة بإعطاء إستمارات التسجيل لمساعد أخصائي التحاليل المعملية مدون بها أسماء أفراد العينة ورقم خاص لكل فرد وتوقيتات سحب عينات الدم .
- تم إجراء القياس القبلي قبل بدء التجربة وقد تضمن القياس سحب عينات دم وريدي (٥سم^{٣}) لكل فرد على حده قبل وقت أداء النشاط البدني مباشرة .
- تم اداء المشى على السير المتحرك وذلك بتحديد الجهد البدني لكل فرد على حده من حيث السرعة (٦.١-٦.٥ كم/ساعة) والزمن من(٢٠:٤٠ دقيقة) ثم الإنتهاء من الأداء وأخذ البيانات الخاصة بكل ٍ من (معدل ضربات القلب – المسافة) .
- تم إجراء القياس البعدى الأول لكل فرد بعد الانتهاء من أداء النشاط البدني مباشرة وسحب عينة دم وريدي (٥سم^{٣}) .
- تم جمع عينات الدم التي تم سحبها داخل صندوق ثلج Ice Box وتم نقلها إلى المعمل لقياس مستوى تركيز هرمون التستوسيترون (T) و إجراء عملية فصل عينات الدم تمهيداً لإجراء القياسات الخاصة بالوسائط المناعية (انترلوكين- ٢ ، انترلوكين- ١٠) بمعمل وحدة المناعة بمعهد البحوث الطبية – جامعة الإسكندرية .

٢- القياس البيني :

- تم إجراء القياس البيني بعد شهر من إجراء القياس القبلي في يوم الأربعاء (٢٠١٠/٥/٢٦) وذلك بعد الانتهاء من أداء النشاط البدني مباشرة وسحب عينات دم وريدي من كل فرد على حده .
- تم جمع عينات الدم التي تم سحبها داخل صندوق الثلج Ice Box وتم نقلها إلى المعمل لإجراء عملية فصل عينات الدم وحفظها ونقلها إلى معمل وحدة المناعة بمعهد البحوث الطبية لحين إجراء القياسات الخاصة بالوسائط المناعية المتمثلة في (انترلوكين- ٢ ، انترلوكين-١٠) .

٣- القياس البعدى:

- تم إجراء القياس النهائي في يوم الأربعاء الموافق (٢٠١٠/٦/٣٠) وأشتمل القياس على أخذ عينة دم وريدي (٥سم^{٣}) بعد أداء النشاط البدني مباشرة لكل فرد من أفراد العينة وذلك لقياس مستوى تركيز هرمون التستوسيترون ومستوى انترلوكين- ٢ ، انترلوكين -١٠ ، وتم تسجيل البيانات الخاصة بالبحث .
- تم جمع عينات الدم داخل صندوق الثلج وتم نقلها إلى المعمل لإجراء القياس الخاص بمستوى تركيز هرمون التستوسيترون ، وتم إجراء عملية فصل عينات الدم تمهيداً لنقلها إلى معمل وحدة المناعة بمعهد البحوث الطبية وإجراء القياسات الخاصة بالوسائط المناعية (IL-2 – IL-10) .
-

٦ . ٣ . طريقة سحب عينات الدم و تفريغها :

- بعد انتهاء كل فرد من إفراد العينة من أداء النشاط البدني (المشي) يقوم مساعد أخصائي التحاليل الطبية بربط الذراع بالضاغط ليظهر الوريد .
- يقوم مساعد أخصائي التحاليل بسحب عينة دم مقدارها (٥سم^{٣}) من الوريد بإستخدام الحقن البلاستيكية المعقمة الخاصة للاستعمال مرة واحدة .
- يقوم مساعد أخصائي التحاليل بنزع الضاغط وتطهير مكان سحب عينة الدم وتغطيته بالبلاستر .
- يتم تفريغ الدم من كل حقنة فى ثلاثة أنابيب لحفظ الدم لكل فرد من أفراد العينة تمهيداً لعملية فصل لأجراء التحاليل الخاصة بالوسائط المناعية (٢) وهرمون التستوسيترون(١) ، وذلك منعاً لإعادة إستخدام نفس الأنبوبة لقياس متغير آخر لما لدورات الحفظ والإستخدام المتكررة من تأثير سلبي على معدلات القياسات المطلوبة.
- يتم وضع اللاصق على الأنابيب ويدون عليها (الاسم – الرقم الخاص بكل فرد – تاريخ سحب العينة – اسم القياس) .
- يتم جمع عينات الدم ووضعها بحرص داخل صندوق الثلج Ice Box حتى يتم نقلها إلى المعمل .

٦ . ٤ . طريقة فصل السيرم (المصل) Serum :

- يتم إتباع الطريقة التالية لعملية فصل السيرم داخل المعمل :

- يتم وضع أنابيب الدم فور وصولها للمعمل في حضانة ٣٧ ْ م مدة ٣٠ دقيقة لدعم تفاعلات تكون الجلطة .
- يتم وضع أنابيب الدم في ثلاجة ٢-٨ ْ م لمدة ساعة للمساعدة على تقلص الجلطة .
- يتم وضع الأنابيب في جهاز طرد مركزي (Centrifuge) سرعته (١٥٠٠لفة / دقيقة) وذلك حتى ينفصل السيرم نهائياً عن الجلطة المتكونة بحيث يكون السيرم أعلى الأنبوبة والجلطة أسفلها .
- يتم سحب السيرم برفق بإستخدام ماصة أوتوماتيكية .
- يتم وضع السيرم لكل فرد من أفراد العينة فى أنابيب (Eppendorf) ويدون عليها (الاسم – اسم القياس – الرقم – التاريخ) .
- توضع كل الأنابيب فى الفريزر عند (-٣٠ْ مئوية) للحفاظ على مستوى الوسائط المناعية حتى ميعاد إجراء الاختبارات الخاصة بكل من انترلوكين- ٢ ، انترلوكين- ١٠ محل البحث.

٦ . ٥ . طريقة قياس كل من (IL-2 وIL-10) :

- أعتمدت طريقة قياس كل من **(IL-2 وIL-10)** على تقنية الـ ELISA شكل رقم (٢) وهي طريقة معملية لتحديد وجود وقياس مستوى اي من الـ Antigen (السيتوكينات محل البحث) او الـ Antibodyعن طريق تعليم المركب المناعي الناتج عن اتحادهما بإنزيم معين ثم معالجة هذا الانزيم بالـ Substrateالخاص به .

- **تم اعتماد خطوات عمل واحدة لكل من (IL-2 وIL-10) وهي كالآتي :**

١) تم تحديد عدد الآبار Wells المطلوبة للاختيار بمعلومية عدد العينات المطلوب قياس السيتوكين فيها مضافاً إليه العينة العيارية Standard معلومة التركيز والتي تجرى بصورة متوازية مع العينات محل البحث وتستخدم في رسم المنحنى العياري ومنه يتم احتساب قيمة السيتوكين محل البحث في كل عينة من العينات المعطاه على حده .
٢) هذه الآبار Wells مصنوعة من لدائن بلاستيكية خاصة ويلتصق على جدارها اجسام مضادة للسيتوكين المطلوب قياسه .

٣) يتم اضافة العينة العيارية Standard (٥٠ ميكروليتر)بتخفيفات محسوبة (٠ : ١٥٠٠ ng/ml) في حالة IL_2 و من (٠ : ٢٥٠ pg/ml) في حالة IL_{10} في الـ Wells المحددة ، كما يتم اضافة (٥٠ ميكروليتر) من العينات محل البحث في Wells آخرى بتنسيق مرتب .

٤) وبدون فترة حضانة يضاف مباشرة ٥٠ ميكروليتر من محلول معد مسبقاً من اجسام مضادة للسيتوكين محل البحث مرتبطة بمادة البيوتين Biotin .

٥) يتم تغطية الـ Wells بشريط لاصق وتوضع في درجة حرارة الغرفة (١٨ : ٢٥ ْ مئوية) لمدة ساعة ونصف ويراعى عدم الرج ، وخلال هذه الفترة يتم التفاعل ويتكون المركب المناعي بين كل ٍ من السيتوكين محل البحث محاطاً من الجهتين بالاجسام المضادة احدهما به مادة البيوتين Biotin في الأتجاه الحر .

٦) بعد الانتهاء من فترة التحضين يتم التخلص من بقايا المواد غير المتفاعلة من كل عينة مستخدمة وكذلك العينة الـ Standard داخل الـ Wells .

٧) بعد ذلك يتم عمل خطوة غسيل لجميع الـ Wells (٥) مرات بـ ٣٠٠ ميكروليتر بإستخدام محلول غسيل مخفف معد مسبقاً (Wash Buffer) .

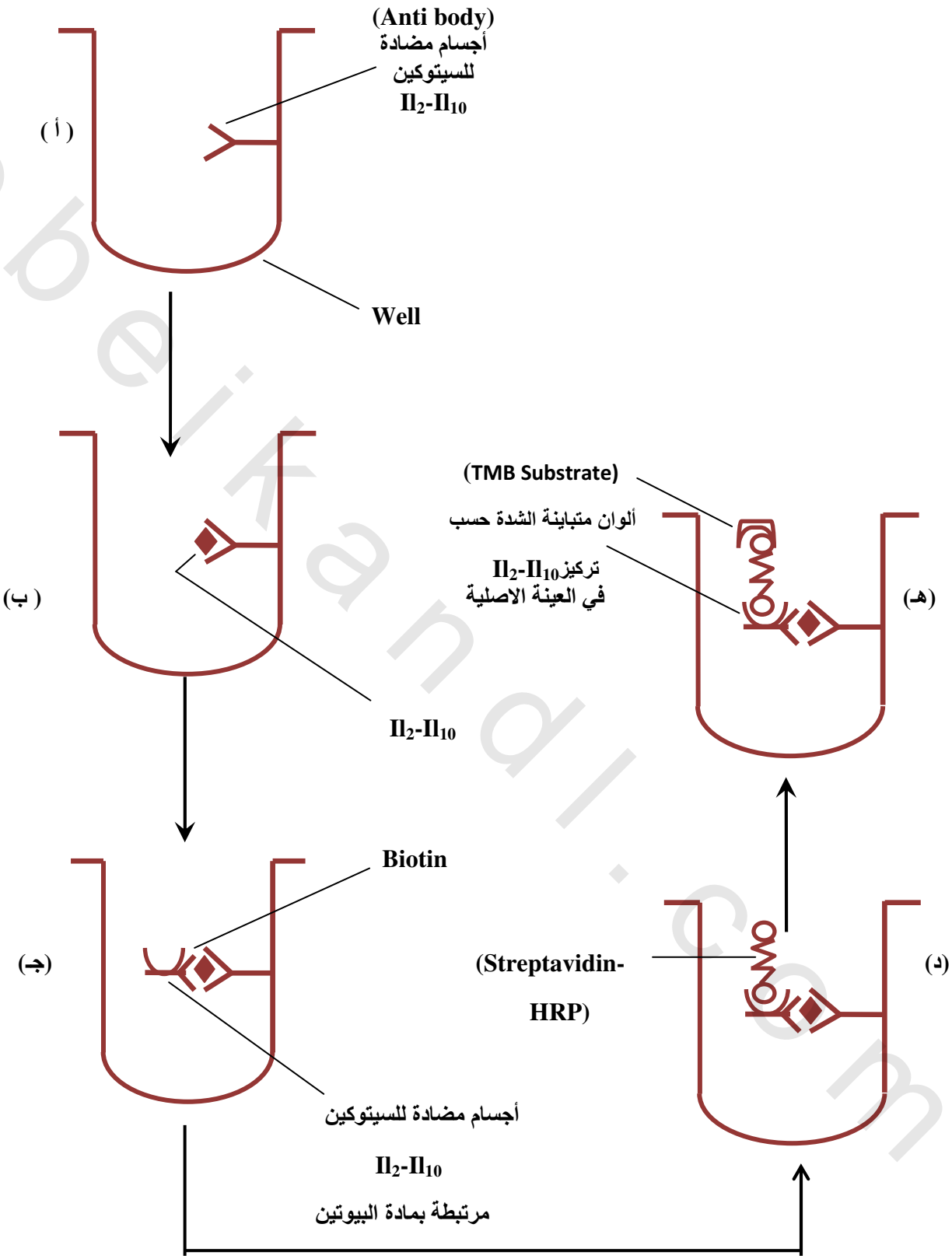
٨) ثم يتم اضافة ١٠٠ ميكروليتر من محلول معد سلفا ً من مركب الـ Streptavidin – HRP لكل الـ Wells حيث يقوم الـ Streptavidin بدور الرابط مع المركب المناعي وذلك لميله الشديد للارتباط بمادة البيوتين Biotin بيتما يقوم الـ HRP بدور الانزيم .

٩) بعد ذلك يتم تغطية الـ Wells بشريط لاصق وتوضع في درجة حرارة الغرفة فتره حضانة لمدة (٣٠دقيقة) ، ثم بعدها يتم غسل جميع الـ Wells كما في الخطوة (٧) .

١٠) ثم يتم اضافة ٥٠ ميكروليتر من مادة Tetra Methyl Benzidine (TMB) سابقة التجهيز والتي تقوم بدور الـ Substrate لإنزيم الـ HRP الذي يتم اضافته في الخطوة (٨) ، ثم يترك التفاعل فترة حضانة لمدة (١٥ دقيقة) في درجة حرارة الغرفة خلالها يتم ظهور الوان متباينة الدرجة في الـ Wells نتيجة تفاعل الإنزيم HRP مع الـ TMB Substrate

١١) يتم ايقاف ظهور اللون بحامض قوي ٢٥ ميكروليتر/Well ثم يتم قياس درجة اللون لكل Well على جهاز قارئ ELISA معبراً عنه بالقراءة الضوئية Optical Density (O.D) عند طول موجي (٤٥٠نانوميتر) .

١٢) تستخدم التخفيفات المتتالية للعينة العيارية Standard في رسم المنحنى العياري ويتم حساب تركيز السيتوكين في كل عينة من عينات البحث بمعلومية القراءة الضوئية ويكون الناتج تركيز معبر عنه بـ (نانوجرام/ملليلتر في حالة IL-2) و (بيكوجرام/ملليلتر في حالة IL-10).



شكل (٢) خطوات تقنية ELISA المستخدمة لتعيين الوسائط المناعية (IL-2/IL-10)

سابعا : جمع البيانات وإجراء المعالجات الإحصائية لها :

تم جمع البيانات من خلال القياسات القبلية والبعدية وتم تفريغها فى استمارات تسجيل شاملة (**مرفق ٣**) (**مرفق٤**) تمهيداً لمعالجتها احصائياً .

استخدام الباحثة الإحصاء اللابارامترى (١٥)(١٨) ، فى معالجة البيانات نظراً لصغر حجم عينة البحث ، وبإستخدام حزمة التحليل الإحصائى (spss- 20) :

- إختبار كولموجروف – سميرنوف .
- إختبار رتب إشارات المجموعات المتزاوجة ل " ولكوكسن" .
- المتوسط الحسابى.
- الإنحراف المعيارى .
- معامل الإرتباط (لسبير مان براون).
- مربع كاى للفروق.
- معادلة حجم التأثير لـ "كوهين " .

obeikandl.com