**الفصل الثالث**

**المواد وطرق البحث**

**Materials and Methods**

**أولاً- الحيوانات المستخدمة Experimental animals**

|  |  |
| --- | --- |
| المملكة : الحيوانية | kingdom: Animalia |
| شعبة : الفقاريات  | phylum: Chordate |
| طائفة : الثدييات | class: Mammalian |
| رتبة : القوارض | order: Rodentia |
| فصيلة : الخنازير  | family: Cavidae |
| جنس : خنازير غينيا |  genus species: *Guinea pig* |

أجريت تجارب هذا البحث على ذكور حيوان الخنزير الغيني guinea pig وكان يبلغ وزنها التقريبي (140 جرام ) وعمرها ( 5 شهور ) والتي تم الحصول عليها من بيت الحيوانات التابع لمركز الملك فهد للأبحاث الطبية بجامعة الملك عبدالعزيز بجدة ، وقد تم تربيتها وتغذيتها في ظروف ملائمة وفي غرف خاصة جيدة الإضاءة والتهوية ( شكل 1-3 ).

****

شكل (1-3): حيوان خنزير غينيا

**ثانياً-المواد المستخدمة**  **Materials**

لقد تم استخدام اثنين من المعادن الثقيلة والموجودة كملوثات في البيئة وهي:

أ- الرصاص Lead : على صورة خلات الرصاص lead acetate .

الاسم الكيميائي: خلات الرصاص lead acetate.

الرمز الجزيئي: Pb( CH3COO )2

ولقدتم الحصول عليها من شركة سيجما الألمانية ، كما تم إذابتها في محلول فسيولوجي (%0.9 كلوريد الصوديوم ) وإعطائها بالحقن تحت الجلد بجرعة مقدارها ( 30mg / kg ) ، ( Reddy *et al.,*2007 ).

ب\_ الكادميوم :Cadmium على صورة كلوريد الكادميوم cadmium chloride.

الاسم الكيميائي: كلوريد الكادميوم cadmium chloride.

الرمز الجزيئيCdCl2

ولقد تم الحصول عليها من شركة سيجما الألمانية ، كما تم إذابتها في محلول فسيولوجي وإعطائها بالحقن تحت الجلد بجرعة مقدارها (1mg / kg )

(Ismail and Said , 2006 )

ج\_ الشعير *Hardium valgara*.

ولقد تم توفيره من الأسواق العامة بجدة ( شكل 2-3 ) ويتبع الشعير :

|  |  |
| --- | --- |
| المملكة النباتية | Plant Kingdom |
| قسم : النباتات البذرية | Division: Spermatophyta |
| تحت قسم : كاسيات البذور  | Sub division : Angiosperms |
| طائفة : نباتات ذوات الفلقة الواحدة | Class : Monocotyledoneae |
| رتبة : النجيليات | Order : Glumiflorae |
| الفصيلة : النجيلية | Family : Gramineae |
| الشعير | *Hardium valgara* |

**المواد الكيميائية المستخدمة :**

1- خلات الرصاص Lead acetate

2- كلوريد الكادميوم Cadmium chloride

3- الفوسفات الموزون phosphate buffer 0.2 M phosphate buffer PH 7.4

4- كينيورامين 1mM kynuramine

5- كبريتات الزنك ZnSo4 10%

6- هيدروكسيد الصوديوم 1N NaoH

7- رابع هيدروكسي الكينيورامين4-Hydroxyquinoramine 10mµM

8- فورمالين 15%

9- صبغة الأيوسين

10- صبغة الهيماتوكسيلين

11-kits لقياس هرمون التستستيرون

****

شكل (2-3): حبوب الشعير

**ثالثاً- الأجهزة المستخدمة في البحث:**

1. طحان أنسجة.
2. جهاز الطرد المركزي.
3. هزاز كهربائي.
4. ميزان حساس.
5. جهاز تجميد.
6. حضان.
7. أدوات تشريح.
8. زجاجيات متعددة.
9. سخان.

10.جهاز قياس الوميض الضوئي Spectrofluorometer.

 **تصميم التجارب Experimental design**

1. **المجموعة الضابطة Control group )):-**

لقد تم حقن ذكور الحيوانات ( 20 حيوان ) بمحلول فيسيولوجي متعادل تحت الجلد بجرعة مقدارها (1ml/kg ) ، ثم تم ذبح 5 حيوانات منها بعد أسبوعين وأربعة وستة وثمانية أسابيع كعينة ضابطة مصاحبة للمجاميع التالية.

1. **المجموعة المعاملة بخلات الرصاص ( Lead acetate) :-**

 تم تقسيم هذه المجموعة إلى أربع تحت مجموعات تشتمل كل مجموعة منها على 5 حيوانات :

**تحت مجموعة أ :**

شملت حيوانات تم حقنها يوميا لمدة أسبوعين بجرعة من خلات الرصاص مقدارها (30ml/kg.bw) ثم تم ذبحها بعد 24 ساعة من آخر جرعة.

**تحت مجموعة ب :**

شملت حيوانات تم حقنها يوميا لمدة أربعة أسابيع بجرعة من خلات الرصاص مقدارها (30ml/kg.bw) ثم تم ذبحها بعد 24 ساعة من آخر جرعة.

**تحت مجموعة ج :**

شملت حيوانات تم حقنها يوميا لمدة ستة أسابيع بجرعة من خلات الرصاص مقدارها (30ml/kg.bw) ثم تم ذبحها بعد 24 ساعة من آخر جرعة.

**تحت مجموعة د :**

شملت حيوانات تم حقنها يوميا لمدة ثمانية أسابيع بجرعة من خلات الرصاص مقدارها (30ml/kg.bw) ثم تم ذبحها بعد 24 ساعة من آخر جرعة.

3- **المجموعة المعاملة بكلوريد الكادميوم ( Cadmium chloride):-**

تم تقسيم هذه المجموعة إلى أربع تحت مجموعات تشتمل كل مجموعة منها على 5 حيوانات :

**تحت مجموعة أ :**

شملت حيوانات تم حقنها يوميا لمدة أسبوعين بجرعة من كلوريد الكادميوم مقدارها (1ml/kg.bw) ثم تم ذبحها بعد 24 ساعة من آخر جرعة.

**تحت مجموعة ب :**

 شملت حيوانات تم حقنها يوميا لمدة أربعة أسابيع بجرعة من كلوريد الكادميوم مقدارها (1ml/kg.bw) ثم تم ذبحها بعد 24 ساعة من آخر جرعة.

**تحت مجموعة ج :**

 شملت حيوانات تم حقنها يوميا لمدة ستة أسابيع بجرعة من كلوريد الكادميوم مقدارها (1ml/kg.bw) ثم تم ذبحها بعد 24 ساعة من آخر جرعة.

**تحت مجموعة د :**

 شملت حيوانات تم حقنها يوميا لمدة ثمانية أسابيع بجرعة من كلوريد الكادميوم مقدارها (1ml/kg.bw) ثم تم ذبحها بعد 24 ساعة من آخر جرعة.

1. **المجموعة المعاملة بخليط من خلات الرصاص (Lead acetate ) و كلوريد الكادميوم ( Cadmium chloride ):-**

 تم تقسيم هذه المجموعة إلى أربع تحت مجموعات تشتمل كل مجموعة منها على 5 حيوانات:

**تحت مجموعة أ :**

 شملت حيوانات تم حقنها يوميا لمدة أسبوعين بجرعة من خلات الرصاص مقدارها (30ml/kg.bw) ومن كلوريد الكادميوم مقدارها (1ml/kg.bw) ثم تم ذبحها بعد 24 ساعة من آخر جرعة.

**تحت مجموعة ب :**

 شملت حيوانات تم حقنها يوميا لمدة أربعة أسابيع بجرعة من خلات الرصاص مقدارها (30ml/kg.bw) ومن كلوريد الكادميوم مقدارها (1ml/kg.bw) ثم تم ذبحها بعد 24 ساعة من آخر جرعة.

**تحت مجموعة ج :**

 شملت حيوانات تم حقنها يوميا لمدة ستة أسابيع بجرعة من خلات الرصاص مقدارها (30ml/kg.bw) ومن كلوريد الكادميوم مقدارها (1ml/kg.bw) ثم تم ذبحها بعد 24 ساعة من آخر جرعة.

**تحت مجموعة د :**

 شملت حيوانات تم حقنها يوميا لمدة ثمانية أسابيع بجرعة من خلات الرصاص مقدارها (30ml/kg.bw) ومن كلوريد الكادميوم مقدارها (1ml/kg.bw) ثم تم ذبحها بعد 24 ساعة من آخر جرعة.

1. **المجموعة المعاملة بنبات الشعير وخليط خلات الرصاص وكلوريد الكادميوم .**

أعطيت حيوانات هذه المجموعة المستخلص المائي للشعير بجرعة مقدارها (5 ml/kg ) لمدة أسبوعين ثم قسمت حيوانات هذه المجموعة إلى أربع تحت مجموعات تشمل كل منها 5 حيوانات وعوملت كالآتي:

**تحت مجموعة أ :**

شملت حيوانات تم حقنها يوميا بجرعة من خلات الرصاص مقدارها (30ml/kg.bw) ومن كلوريد الكادميوم مقدارها (1ml/kg.bw) لمدة أسبوعين ثم تم ذبحها بعد 24 ساعة من آخر جرعة.

**تحت مجموعة ب :**

شملت حيوانات تم حقنها يوميا بجرعة من خلات الرصاص مقدارها (30ml/kg.bw) ومن كلوريد الكادميوم مقدارها (1ml/kg.bw) لمدة أربعة أسابيع ثم تم ذبحها بعد 24 ساعة من آخر جرعة.

**تحت مجموعة ج :**

شملت حيوانات تم حقنها يوميا بجرعة من خلات الرصاص مقدارها (30ml/kg.bw) ومن كلوريد الكادميوم مقدارها (1ml/kg.bw) لمدة ستة أسابيع ثم تم ذبحها بعد 24 ساعة من آخر جرعة.

**تحت مجموعة د :**

شملت حيوانات تم حقنها يوميا بجرعة من خلات الرصاص مقدارها (30ml/kg.bw) ومن كلوريد الكادميوم مقدارها (1ml/kg.bw) لمدة ثمانية أسابيع ثم تم ذبحها بعد 24 ساعة من آخر جرعة.

**طريقة تحضير الشعير:**

 أن يؤخذ من الشعير المرضوض مقدار(10 جرام ) ومن الماء العذب الصافي خمسة أمثاله ثم تغلى على النار حتى يبقى مقدار واحد من الخليط ثم بعد ذلك يتم أخذ الراشح وتبريده ( حسن ، 2001 )

**الطرق المستخدمة في البحث:**

1- تم حساب أحادي الأمين أوكسيديز MAO داخل الجهاز العصبي المركزي تبعا لطريقة Kragil , 1965 ) ) والمعدلة بواسطة Olcese and Devalming , 1979 ) )

 \*قياس هرمون التستستيرون في المصل باستخدام ال Kits المخصصة لذلك بواسطة جهاز Immunoassay (I 2000) ( الثبيتي وقاري ،2008 ).

 \* تعيين الصورة العامة للدم وتشمل مايلي:

* عد خلايا الدم الحمراء Red blood cells count
* قياس مستوى الهيموجلوبين Haemoglobin level .
* تعين متوسط حجم خلايا الدم الحمراء Mean corpuscular volume
* عد خلايا الدم البيضاء White blood cells count

وذلك باستخدام جهاز بواسطة جهاز Complete Blood Count ( CBC )

 والذي يقوم بالعد الكلي لخلايا الدم المختلفة حيث يتم إدخال الدم إلى الجهاز عن طريق أنبوبة في مقدمة الجهاز ويسحب منها الدم أوتوماتيكيا بكمية معينة (125 ميكروليتر تقريبا) وتدخل هذه الكمية إلى الجهاز عبر أنابيب داخلية صغيرة لتصل إلى صفيحة متصلة بتيار كهربائي وحينها تنتج خلايا الدم شحنات كهربائية يقوم الجهاز بترجمتها إلى أعداد تمثل قياس وعدد مكونات الدم السابق ذكرها ( الثبيتي وقاري، 2008 ).

1. **تحضير أجزاء الجهاز العصبي المركزي**

يتم ذبح الحيوانات فجأة في الأوقات المختلفة للتجارب ثم يؤخذ المخ بحذر مع الحبل الشوكي ويوضع على لوح زجاجي مبرد ( شكل 3 - 3 ) ثم يفصل إلى تسعة أجزاء مختلفة تبعاً لطريقة

( ( Glowinski and Iversen , 1966 ويؤخذ الحبل الشوكي.

**مناطق المخ**

1. القشرة المخية Cerebral cortex
2. النواة المزيلة Caudate putamen
3. المهاد Thalamus
4. أسفل المهاد Hypothalamus
5. التليعه العليا Superior collicolus
6. التليعة السفلى Inferior collicolus
7. المخيخ Cerebellum
8. القنطرة Pons
9. النخاع المستطيل Medulla
* تم وزن كل جزء على حده في داخل كيس صغير من البلاستيك المرقم ثم يوضع في رقائق من الألمنيوم عند درجة حرارة -25oC لحين الاستخدام.

**الاستخلاص والفصل Extraction and separation :**

* يتم طحن الأجزاء المختلفة في محلول الفوسفات الموزون 0.2M phosphate buffer pH 7.4
* ويؤخذ 0.1 ml من النسيج المطحون ثم يوضع 0.25 من 1mM kynuramine ثم يضاف 1.4 ml من الفوسفات الموزون.
* يتم احتضان العينات لمدة ساعة عند درجة 37oC في هزاز كهربائي.
* يتم تحضير عينات البلانك blank بالتوازي مع العينات السابقة مع إضافة الكينيورامين بعد عملية الإحتضان.
* يوقف التفاعل بإضافة 0.05 ml من 10% ZnSo4 متبوعاً بـ0.05 ml of 1N NaoH
* تغلى المحاليل لمدة دقيقتين ثم تدار الانابيب بجهاز الطرد المركزي بسرعة

300 rpm لمدة 10 دقائق.

* يتم فصل الطبقة العليا.
* تؤخذ 2ml من 1N NaoH وتضاف إلى الطبقة العليا.
* يتم قياس نشاط إنزيم أحادي الأمين أوكسيديز بجهاز الوميض الفلورنس عند طول موجة إثارة 315 nm (excitation ) وطول موجة انبعاث 380 nm (emission)

ويتم هذا القياس بواسطة جهاز Jenway 6200 spectrophoto fluoremeter



شكل (3-3): دماغ خنزير غينيا

2-تعين الصورة العامة للدم حيث تم جمع عينات الدم في أنابيب حاوية على مادة مانعة للتجلط ( الهيبارين ) بعد ذبح الحيوانات مباشرة لاستخدامها في :

1. تعين عدد كريات الدم الحمراء.
2. تعين مستوى هيموجلوبين الدم.

ج- تعين متوسط حجم كريات الدم الحراء.

د- تعين عدد خلايا الدم البيضاء.

**3 –** تعين قيمة هرمون التستستيرون حيث تم جمع عينات المصل بواسطة استخلاصه من دم جمع في أنابيب غير حاوية على مادة مانعة للتجلط بواسطة استخدام جهاز الطرد المركزي

( Centerifuge )

لقياس هرمون التستستيرون في المصل باستخدام ال Kits المخصصة لذلك بواسطة جهاز Immunoassay (I 2000).

**د -** تم استئصال الخصى لاستخدامها في عمل قطاعات عرضية للدراسة النسيجية حيث تم الحصول عليها بعد ذبح الحيوانات التي شرحت سريعا وأخذ عينات الخصى حيث قطعت إلى قطع صغيرة سمكها من2-4 ملم وحفظت في علب بلاستيكية صغيرة محتوية على 10%من محلول الفورمالين المتعادل المنظم Neutral buffered formaldehyde لمدة 24 ساعة لتثبيتها ثم جففت Dehydration العينات بتمريرها بسلسلة من التراكيز المختلفة التصاعدية Ascending من الكحول الايثيلي Ethyl Alcohol , ثم روقت Clearing باستخدام الزايلين ثم التشريب Infilteration باستخدام شمع البرافينParaffin wax وذلك باستخدام جهاز معالجة الأنسجة Tissue Procissing من 10 -30 دقيقة , ثم الطمر في شمع البرافين المنصهر عند درجة حرارة 58م في فرن درجة حرارته 60م باستخدام جهاز الطمر Tissue Embedding في قوالب معدنية خاصة Embedding moulds ثم تبريدها وبعد ذلك تقطيعها إلى قطاعات يتراوح سمكها ( 4-5 ميكرون ) بواسطة جهاز الميكروتوم ومن ثم صبغها بصبغة الأيوسين والهيماتوكسيلين.

**هـ- التحليلات الإحصائية Statical analysis**

 تم حساب متوسطات النتائج means(M) التي تم الحصول عليها لمجموعات الحيوانات المستخدمة في التجربة وحساب قيمة الخطأ المعياري لهذه المتوسطات Standard Error of means(SEM) لكل مجموعة والتعبير عنها بالقيمة (M±SEM)، وقد استخدم اختبار T test للمقارنة بين معنوية النتائج Significant للمجموعات المختلفة عند مستوى معنوية

 (˂ 0.05)و(˂0.01) تبعاً لطريقة .( Armitage ,1974 )