الملاحق Appendixes

ملحق رقم (1) التركيب الكيميائي لـ1 كغم من بروتين الوافي هولندي المنشأ.

جدول رقم(18)

المادة	الوحدة	الكمية
M . E (C.V.B)	Kcal / Kg	2150
Protein	%	40.00
Fat	%	5.00
Fibre	%	2.00
Calcium	%	5.60
Lysine	%	3.85
Av.phosphorus	%	4.65
Sodium	%	2.30
Methionine	%	3.70
Meth +cyst	%	4.10
Vitamin A	IU/Kg	220.00
Vitamin D3	IU/Kg	60.000
Vitamin E	Mg/Kg	600.000
Vitamin K	Mg/Kg	50.000
VitaminB1 (thiamin)	Mg/Kg	60.00
Vitamin B2 (riboflavin)	Mg/Kg	140.00
Vitamin B6	Mg/Kg	80.00
Vitamin B12	Mg/Kg	700
Choline chloride	Mg/Kg	5.000
Iron (as sulfate)	Mg/Kg	1.000
Ziac (as sulfate)	Mg/Kg	1.200
Manganese	Mg/Kg	1.600
Copper	Mg/Kg	200
Selenium	Mg/Kg	1.000
Antioxidant	Mg/Kg	100

ملحق(2) التركيب الكيميائي لـ1 كغم من مخاليط الفيتامينات والمعادن إنتاج شركة Premix هولندي المنشأ

جدول رقم (19)

المادة	الوحدة	الكمية
Calcium	%	23.2
Phosphorus avail	%	9.3
Lysine	%	1.6
Methionine	%	6.0
Meth+cyst	%	8.0
Sodium	%	4.9
Vitamin A	IU/Kg	440.000
Vitamin D3	IU/Kg	120.000
Vitamin B1	Mg/Kg	120
Vitamin B2	Mg/Kg	280
Vitamin B6	Mg/Kg	160
Vitamin B12	Mcg/Kg	1.400
VitaminK	Mg/Kg	100
Biotin	Mg/Kg	4
Nicotinic acid	Mg/Kg	1.600
Folic acid	Mg/Kg	40
Vitamin K3	Mg/Kg	100
Pantothenic acid	Mg/Kg	640
Choline chloride	Mg/Kg	12.000
Copper(Cu)	Mg/Kg	400
Manganese	Mg/Kg	3.200
Iron (Fe)	Mg/Kg	2.000
Zinc	Mg/Kg	2.400
Selenium	Mg/Kg	10
Iodine	Mg/Kg	40
Antioxidant(B.H.T.)	Mg/Kg	200
Salinomycine	Ppm	2400
6-Phytase EC 3.1.3.26(4a6)	FYT/Kg	60.000

- **ملحق رقم (3)**

تحضير Natt and Herrick solution

قبل عملية قياس خلايا الدم الحمر و البيض تم تحضير لتر واحد من محلول **Natt and Herrick** من إضافة المواد في أدناه إلى لتر من الماء المقطر وحسب طريقة Natt and Herrick solution(1952) وكما يلي :

جدول رقم (20) تحضير Natt and Herrick solution

المادة الكيمائية	الكمية
Nacl	3.88 غم
Na2SO4	2.50 غم
Na2 HPO4.12H2O	2.91 غم
KH2PO4	0.25 غم
Formalin (37%)	7.5 مل
Methyl violet 2B	0.10 غم

بعد ذلك ترج بشكل جيد ومن ثم يترك المحلول إلى اليوم الثاني وقبل أن يستعمل يرشح بورق الترشيح. (1995, Campbell)

- **ملحق رقم (4)**

المحاليل المستخدمة:

1- محلول الثايوباربا تيورك (TBA –Solution)

يحضر بإذابة 0,6غم من مادة TBA في100 مل من الصودا الكاوية بتركيز 0,05 مولا لي باستخدام القليل من التسخين . ويحضر هذا المحلول عند الاستعمال .

2- محلول حامض ألخليك ثلاثي الكلور Trichloro Acetic Acid Solution (TCA) يحضر هذا المحلول بتركيزيين .

التركيز الأول 17,5٪, يحضر بإذابة 17,5 غم من مادة TCA في100مل من الماء المقطر.

التركيز الثاني (70٪) يحضر بإذابة 70غم من ماده TCA في 100مل من الماء المقطر ويحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام .

طريقة العمل:

1- يؤخذ150 مايكروليتر من مصل الدم ويضاف له1مل من محلول TCA بتركيز17,5٪ ويضاف له 1مل من محلول TBA إلى المزيج, يرج جيداً تحضن الأنابيب في حمام مائي مغلي بعد غلق فوهاتها بكرات زجاجية لمدة 15 دقيقة .

2- تبرد العينات ويضاف اليها1 مل من محلول TCA بتركيز 70٪ ويترك المزيج بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 20 دقيقة.

3- يفصل الراشح باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة / دقيقة ولمدة خمس دقائق.

4- تقرأ الامتصاصية عند طول موجي قدره (ηm532) باستخدام المطياف الضوئي (UV/Vis) Spectrophotometer/PyeUnicam PU800) ويحسب مستوىMDA حسب المعادلة الآتية :

$$\text{تركيز المالون داي الدهايد(مايكرو مول)} = \frac{\text{العينة عند 532 ηm}}{\text{EO*L}} \times \text{معامل التخفيف}$$

L=Lightpath (1cm)

EO=Extinction coefficient 1.56 * 10^{5-} mol-1 cm -1

$$\text{معامل التخفيف} = \frac{\text{1 ml vol.used in ref}}{0.15} = 6.7$$

- **ملحق رقم (5)**

تقدير الكلوتاثايون (GSH) في نسيج الخصية و الكبد:

تم قياس حالة مضادات الأكسدة في نسيجي الخصية والكبد من خلال قياس مستوى الكلوتاثايون (GSH) وفقا لطريقة Morno وآخرون(1979).

المحاليل المطلوبة :

1- محلول Tris buffer solution يحضر بإذابة 6.057 غم (50 ملي مول) منTris methyl amino methanhydroxy NH2C(CH2OH)3 في900 مل من الماء المقطر، ثم يضاف إليها 0.0292 غم (0.1 مل مول) من (EDTA) Ethalendiamine tetra chloro acetic acid ويكمل الحجم إلى لتر بالماء المقطر مع ضبط الأس الهيدروجيني عند 7.6 ويحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام .

2- محلول (25%) حامض ألخليك ثلاثي الكلور (TCA) (Trichloro acetic acid) وحضر بإذابة 25 غم من (TCA) في 100 مل من الماء المقطر وحفظ في الثلاجة .

3- محلول (0.15 مول) اميدازول (Imedizole) يحضر بإذابة 2.55 غم من مادة الايميدازول في 250 مل من الماء المقطر، مع ضبط الأس الهيدروجيني عند 7.4 ويحفظ في الثلاجة .

4- محلول (3ملي مول) 5-5Dithio bis -2(nitro benzoic acid)(DTNB)- يحضر هذا المحلول بإذابة 0.1189 غم من مادة DTNB في 100 مل من محلول دارئ الايميدازول ويحضر هذا المحلول في يوم الاستعمال ويحفظ في الثلاجة.

طريقة العمل:

1- وزن1غم من النسيج الرطب ويوضع في الأنبوبة الخاصة بجهاز المجانس (Teflon homogenizer) مع إضافة 10 مل من محلول التريس بفر البارد. وتوضع هذه الأنبوبة في المكان المخصص لها في جهاز المجانس، ثم شغل الجهاز بسرعة 400 دورة/دقيقة

ولمدة 15- 60 ثانية وحسب نوعية النسيج مع تحريك مقبضي الجهاز صعودا ونزولا مرتين كل 15 ثانية .

2- أضيف 0.25 مل من محلول TCA25% البارد إلى واحد ملي لتر من المحلول المتجانس مع المزج الجيد .

3- فصل الراشح باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق.

4- سحب 0.2 مل من الراشح إلى أنبوبة اختبار وأضيف إليه1 مل من دارئ الايميدازول وأضيف إليه 1.7 مل من الماء المقطر، وأضيف 0.1 مل من محلول DTNB البارد

5- بعد ذلك تم قراءة الامتصاصية لكل عينة بوساطة جهاز قياس الطيف الضوئي عند طول موجي قدره 412 ηm بعد ثلاث دقائق من إضافة DTNB واستخراج تركيز GSH باستخدام منحنى قياسي معد لهذا الغرض .

- **ملحق رقم (6)**

تقدير المالون داي الديهايد (MDA) في نسيج الخصية و الكبد:

استخدمت الطريقة المتبعة من Gilbert وآخرين (1984) لتقدير مستوى بيروكسيدة الدهن في الأنسجة وذلك من خلال قياس مستوى (MDA) والذي يمثل احد نواتج عملية بيروكسيدة الدهن في الأنسجة ويعتمد هذا التفاعل بين بيروكسيدات الدهن بشكل رئيسي MDA وبين حامض الثايوباربايتوريك Thiobarbituric Acid (TBA) على الأس الهيدروجيني (Ph) .

المحاليل المطلوبة :

1- محلول Tris buffer solution ويحضر كما ذكرناه سابقا

2- المحلول الملحي المؤكسد Peroxidizing(saline/azide):

حضر هذا المحلول بإذابة 130.02 ملغم من أزايد الصوديوم Sodium azide (2 ملي مول) في لتر واحد من محلول كلوريد الصوديوم الفسلجي وحفظ هذا المحلول في الثلاجة لحين الاستعمال .

3- المحلول المؤكسد Peroxidizing solution :

يحضر هذا المحلول يوم الاستعمال بإضافة 10مايكروليتر من H_2O_2 ذي تركيز30% إلى 9.09 مل من المحلول الملحي المؤكسد .

4- محلول ارسنيت الصوديوم المذاب في حامض ألخليك ثلاثي الكلور Trichloro acetic acid (TCA)/Sodium arsente solution :

يحضر هذا المحلول يوميا بإذابة 1.2991 غم من ارسنيت الصوديوم (0.1) مول في 90 مل من الماء المقطر، ثم يضاف أليه 28 غم من (TCA) وأكمل الحجم إلى100 مل بالماء المقطر وحفظ بالثلاجة لحين الاستعمال .

5- محلول حامض الثايوباربيتيوريك مع الصودا الكاوية :

حضر هذا المحلول بإذابة 1غم من (TBA) (1%) في100 مل من الصودا الكاوية المحضرة سابقا بإذابة 2غم من هيدروكسيد الصوديوم NaOH في لتر من الماء المقطر ويحتاج هذا المحلول إثناء تحضيره الى القليل من التسخين ويكون تحضيره يوم العمل .

طريقة العمل:

1- وزن 1غم من نسيج الخصية أو الكبد بوساطة ميزان حساس لأربع مراتب عشرية . ثم وضع النسيج في الأنبوبة الخاصة بجهاز المجانس B-Telfon homogenizer ثم يضاف إليه 10 مل من محلول التريس البارد، وبعد وضع الأنبوبة في المكان المخصص لها بجهاز المجانس يتم تشغيل الجهاز على سرعة 400 دورة/دقيقة وهي تمثل 25%من السرعة القصوى للجهاز البالغة 1600 دورة /دقيقة ولمدة 15-60 ثانية حسب نوعية النسيج مع تحريك مقبضي الجهاز صعودا ونزولا مرتين كل 15 ثانية .

2- اخذ 0.5 مل من المحلول المتجانس إلى أنبوبة اختبار وأضيف إليه 0.5 مل من المحلول المؤكسد البارد ليبدأ التفاعل مع الرج الجيد، ثم توضع في حمام مائي بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 10- 15 دقيقة .

3- تم إيقاف التفاعل بإضافة 0.5 مل من محلول ارسنيت الصوديوم المذاب في حامض ألخليك ثلاثي الكلور بعد مزجه جيدا .

4- فصل الراشح باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق ومن ثم يسحب 1 مل من الراشح، ويوضع في أنبوبة اختبار زجاجية .

5- يضاف 0.25 مل من الماء المقطر، وكذلك من محلول TBA مع الرج الجيد .

6- توضع الأنابيب في حمام مائي مغلي،بعد سد فوهاتها بكرات زجاجية لمدة 15 دقيقة.

7- قُرِئَت الامتصاصية لكل عينة بوساطة جهاز قياس الطيف الضوئي عند طول موجي مقداره 532 ηm.ثم تعاد القراءة عند طول موجي آخر مقداره 453 ηm ، وحسبت تراكيز MDA وفق المعادلة الآتية :

كمية MDA =(OD532 العينة – Blank OD 532) – 20% (OD 453 العينة – Blank OD 453).

بعد ذلك تم تقدير كمية MDA باستخدام ExtentionCofficient (1.56×10) ويحسب MDA بـــ nmol/gram tissue.

- **ملحق رقم (7)**

طريقة تحضير المقاطع النسيجية :

بعد ذبح الطيور تم استئصال ووزن خصية واحدة ونصف الكبد وحفظت بالفورمالين (10%) المبين تركيبه في الجدول رقم(21) لمدة يومين لغرض تحضير المقاطع النسيجية حسب طريقة Luna(1968).

جدول رقم (21) التركيب الكيمياوي لمحلول Buffered Neutral Formalin Solution

37- 40% formalin	100 ml
Distilled water	900 ml
Na2 HPO4	4.0 gm
Na H2PO4	6.5 gm

وبعد إتمام عملية التثبيت يتم إخراج النسيج من المثبت ومعاملته وفق الخطوات الآتية:-

- غسل النسيج بماء حنفية هادئ لمدة 10 دقائق .
- تمرير النسيج في تراكيز تصاعدية من الكحول الاثيلي بهدف سحب الماء من النسيج إذ مرر في كحول اثيلي بتركيز 50 ٪ و70٪ و80٪ و 90٪ و 100٪ لمدة ساعتين لكل تركيز وبمقدار تمريره لكل ساعة .
- تمرير النسيج في الزايلول لغرض الترويق وعلى تمريرتين لإتمام الترويق بصورة جيدة وسحب الماء المتبقي في النسيج .
- نقل النسيج بعد ذلك إلى شمع البرافين المنصهر بدرجة حرارة 60ْ م في داخل فرن إذ وضع النسيج في وعائين من الشمع المنصهر لمدة ساعة ونصف لكل وعاء لغرض تشبيع النسيج بالبرافين .
- بعد ذلك طمر النسيج في قوالب صب الشمع بهدف الحصول على مكعبات شمعية جاهزة للقطع, بعد أن تجرى لها عملية النحت وإزالة الأجزاء الزائدة من مكعب الشمع .يثبت المكعب في المكان المخصص له في جهاز المايكرو توم الدوار , يضبط سمك القطع على4 مايكرون وتجرى عملية التقطيع ونحصل منها على شرائح رقيقة جدا وقد تكون ملتوية .

-تفرش هذه الشرائح الرقيقة على سطح ماء بدرجة حرارة 40ْ م للتخلص من الانثناءات والانطواءات .

-يتم اصطياد هذه المقاطع باستخدام شريحة زجاجية نظيفة ومدهونة بالكليسيرين وبياض البيض وبعد التثبيت وجفاف الشريحة تم التصبيغ في اليوم التالي وفقا للخطوات الآتية :

1. وضع الشرائح الزجاجية في الزايلول لمدة نصف ساعة لإزالة الشمع
2. وضع في كحول اثيلي مطلق لمدة دقيقتين .
3. وضع في كحول اثيلي 90٪ لمدة دقيقة
4. وضع في كحول اثيلي 70٪ لمدة دقيقة
5. وضع في الماء المقطر لمدة دقيقتين
6. وضع الشرائح الزجاجية في صبغة الهيماتوكسلين لمدة 15 -30 دقيقة
7. وضع الشرائح الزجاجية في الماء العادي لمدة 10 دقائق
8. تغطس الشرائح غطستين أو أكثر في الكحول الحامضي
9. وضع الشرائح في ماء حنفية جاري لمدة 10 دقائق
10. وضع الشرائح في الماء المقطر لمدة دقيقتين
11. وضع الشرائح في صبغة الايوسين لمدة 2-5 دقائق
12. وضع الشرائح في الكحول الاثيلي 70٪ عدة ثواني
13. وضع الشرائح في كحول الاثيلي90٪ نصف دقيقة
14. وضع الشرائح في كحول مطلق لمدة دقيقتين
15. وضع الشرائح بالزايلول لمدة نصف ساعة للحصول على شرائح خالية من الشوائب .ليتم في الآخر تغطية المقاطع النسيجية المثبتة على الشريحة باستعمال غطاء شريحة زجاجية عن طريق تثبيته باستخدام مادة DPX لتصبح بعد ذلك جاهزة للقراءة.

- **ملحق رقم (8)**

تحضير صبغة الايوسين 1٪:

جدول رقم (22) تحضير الايوسين 1%Stock Alcoholic Eosin

1gm	Eosin Y, water soluble
20 ml	Distilled water
80 ml	Alcohol ,95

وذلك بأخذ حجم واحد من Eosin stock solution ويضاف مقابله ثلاثة أحجام من Alcohol ,80%, يضاف لهذا المزيج بعد ذلك 0,5 مل من حامض الخليك الثلجي لكل 100 مل من خليط الصبغة وتمزج جيدا لغرض زيادة حدة الصبغة .

- **ملحق رقم (9)**

طريقة تحضير صبغة الهيماتوكسلين :

جدول رقم (23) تحضر الصبغة من المواد الآتية :

Hematoxylin crystals	5 gm
Ethanol 100%	50 ml
Potssium alum	100 gm
Distilled water	1000 ml
Mercuric oxide	2.5 gm

يذاب الهيماتوكسلين في الكحول ويذاب أل(Potssium alum) بالماء المقطر وبمساعدة الحرارة. وبعد إن يبرد يمزج المحلولان سوية ويوضع هذا المزيج على النار إلى أن يبدأ بالغليان ويفضل أن يغلي لمدة لا تقل عن دقيقة وبعد أن يرفع عن الحرارة يضاف إليهMercuric oxide ببطء ويعاد تسخين المزيج على النار حتى يصبح داكن , بعد ذلك ترفع الصبغة عن النار وتوضع في ماء بارد حتى تبرد. عند ذاك تصبح الصبغة جاهزة للعمل ويراعى إضافة 2-4 مل من حامض الخليك الثلجي لزيادة حدة الصبغة في الأنوية ويفضل ترشيح الصبغة قبل الاستعمال (Luna , 1968).