المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٣، عدد إضافي ١، ٢٠٠٩ (٨١-٩٢)
وقائع المؤتمر العلمي الخامس، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

الاخصاء بالطريقة الكيميائية في الفصيلة الخيلية

عدي شهاب احمد[١] ومنير سالم البدراني[٢]

[١]المستشفى البيطري نينوى، [٢] فرع الجراحة وعلم تناسل الحيوان، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

الخلاصة

هدفت الدراسة إلى معرفة امكانية اجراء الاخصاء في الحمير بحقن مزيج من التانك أسد Tannic acid والكفائين Caffeine بجرعة ٦٠٠ ملغم + ٧٥٠ ملغم على التوالي وبمقدار ٣ مللتر. تم استخدم ستة عشر من ذكورالحمير البالغة ومن السلالات المحلية كانت سليمة ظاهرياً وخالية من الإصابات. قسمت الحيوانات إلى ثلاثة مجاميع، احتوت الأولى على (٦) ذكور حمير بالغه حيث حقنت بالمزيج، في حين حقنت المجموعة الثانية بالماء المقطر واعتبرت مجموعة سيطرة اما المجموعة الثالثة والتي شملت ٤ حيوانات ذكور حقنت إحدى الخصيتين في كل حيوان بالمزيج الكيمياوي في حين حقنت الخصية الثانية بالماء المقطر، وأجريت العمليات تحت تأثير مادة الزايلازين بجرعة ١ ملغم /كلغم من وزن الجسم والحيوان بوضع الوقوف. تم تحضير المزيج وحقنت الخصى بطريقة معقمة وباستخدام السرنجة ونيدل كيج ١٨. أما المجموعة الثانية التي شملت (٦) ذكور بالغة فقد حقنت بالماء المقطر (كمجموعة سيطرة) وبنفس الطريقة. في حين احتوت المجموعة الثالثة على أربعة حيوانات حقنت إحدى الخصيتين في كل حيوان بالمزيج الكيمياوي في حين حقنت الخصية الثانية بالماء المقطر، تركت الحيوانات في حقل كلية الطب البيطري لمدة شهر إذا تمت مراقبتها وأخذ عينة دم من حيوانات المجموعة الأولى والثانية للمجموعتين الرئيستين الأولى والثانية قبل العملية وبعدها بـ ١٥ و٣٠ يوماً لغرض قياس مستوى هرمون الشحمون الخصوي Testosterone بطريقة Radioimmuno assay أما حيوانات المجموعة الثالثة فقد أخذت منها عينات دم قبل الحقن وبعده بـ٣٠ يوماً لغرض قياس مستوى انزيمي Alanine aminotransferase (ALT) وAspartate aminotransferase (AST). أظهرت النتائج إمكانية استخدام مزيج التانك أسد والكافائين بجرعة (٦٠٠ ملغم + ٧٥٠ ملغم على التوالي) بالحقن داخل الخصية لإحداث اخصاء كيمياوي للحمير وثبت ذلك من خلال الدراسة المشاهدة السريرية والفحص الهرموني والنسيجي إذ أدى الحقن إلى تورم الخصية والذي استمر لأكثر من ثلاثة أسابيع بعدها عادت إلى حجم قريب من حجمها الطبيعي وبأشكال غير منتظمة في حين أشارت دراسة هرمون الشحمون الخصوي Testosterone الى حدوث انخفاض معنوي في مستواه عند قياسه بعد ١٥ يوماً واستمر هذا الانخفاض بعد ٣٠ يوماً عند مقارنته مع مستواه قبل الحقن.كما بينت الدراسة العيانية للخصى المحقونة بالمزيج الكيمياوي حدوث التصاقات قوية بين كيس الصفن من جهة ونسيج الخصية من جهة اخرى وعند الفحص النسيجي لهذه الخصى أظهرت وجود تنخرات حقيقية في الخلايا المبطنة للنبيبات المنوية وتنكسات فجوية شديدة في نسيج الخصية وظهرت النبيبات المنوية خالية من الحيامن تماماً. يستنتج من هذه الدراسة امكانية اجراء الخصي بالطريقة الكيمياوية في الحمير بواسطة مزيج من ٦٠ مغم تانك اسد مضافاً اليه ٧٥٠ ملغم كافائين حقناً بالخصية.

Chemical castration in equidae

O. S. Ahmed[1] and M. S. Al-Badrany[2,*]

[1]Veterinary Hospital Ninahva, [2]Department of Veterinary Surgery and Theriogenology, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq, * Corresponding author, E. mail: muneer62a@yahoo.com

Abstract

The aim of this study was to use mixture of tannic acid and caffeine in a dose of 600 mg + 750 mg as 3 ml solution injected in the testes for induce castration in donkey. Sixteen apparently healthy male local breed donkeys were used. The animals were divided in to three groups, the first one include 6 donkeys injected intratesticular with 3 ml mixture of 600 mg tannic acid and 750 mg Caffeine, the second group which include 6 donkey injected with distilled water and considered as control group, while the third group include 4 animals, one testes injected with the mixture while the second testes was injected with distilled water. All injections were done under effect of xylazine at a dose 1mg/kg, B.W, i.v. in the standing position. All animals kept

under observation one month after castration, blood was collected from jugular vein in group 1 and 2 before injection then 15, 30 days after injection to measure testosterone level by radioimmunoassay, while in the third group blood collected before injection and 30 days after injection to measure Alanine aminoransferase (ALT) and Aspirtate aminotransferase (AST) activity. Results show that chemical castration can be done in donkey by injection mixture of (600 mg tannic acid + 750 caffeine) intra testicularly. The result proved by clinical, hormonal, and histopathological study. The injection leads to swelling of scrotum for more than 3 weeks, then returns near the normal size but with irregular shapes. The hormonal analysis shown significant decrease in the testosterone level at 15 days after injection and continued even 30 days compared with the level of the hormone before injection. Necropsy findings of the first group injected with mixture show sever adhesions between scrotum and testis and histopathological examination showed sever necrosis in the epithelium cells of the somniferous tubules and the somniferous tubules appeared free from sperms. In conclusion this study showed that chemical castration can be done in donkeys by injection the testis with a mixture of (600 mg tannic acid + 750 mg caffeine), with good results.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

المقدمة

يعتبر الاخصاء من العمليات الشائعة والتي يتم إجراءها بكثرة في الفصيلة الخيلية لأغراض عديدة منها: جعل الحيوان هادي وسهل الإدارة والانقياد، التخلص من السلالات الرديئة وعلاج حالات احتباس الخصية Cryptorchidism. يتم اجراء الاخصاء في الفصيلة الخيلية بالطريقة الجراحية فقط (الطريقة الدموية Bloody method) وتحت تأثير المخدر العام (1). إن عملية الاخصاء في الفصيلة الخيلية تكون مصحوبة على الأغلب بمضاعفات خلال إجراء العملية أو بعدها، ومن أهمها: النزف Haemorrhage، الكزاز Tetanus، التهاب الخلب Peritonitis الفتوق التقبب بالإضافة إلى خطورة التخدير العام حيث أنه يعتبر رحلة إلى عالم مجهول قد يؤدي في بعض الأحيان إلى موت الحيوان (2).وبسبب المضاعفات الكثيرة والخطرة التي ترافق عملية الاخصاء الجراحي في الفصيلة الخيلية عمل الباحثون على ايجاد طرق حديثة لإجراء الاخصاء بمستوى منخفض من الاثار الجانبية والاختلاجات. ومن هذه الطرق المستخدمة هي الطريقة الكيميائية والتي تعني حقن مواد كيمياوية في داخل نسيج الخصية مما يؤدي الى إحداث تلف Damage غير راجع (غير قابل للشفاء) ومن ثم إيقاف الخصية عن اداء وظيفتها الأساسية (انتاج الحيامن وافراز هرمون الشحمون الخصوي Testosterone) بشكل نهائي (3). ان هذه الطريقة تحتاج إلى خبرة في كمية المواد المستخدمة في الحقن وتركيزها (4). لقد استخدمت العديد من المواد الكيمياوية لغرض إجراء الإخصاء في ذكور الحيوانات وذلك بحقن هذه المواد في داخل نسيج الخصية ومنها مستخلص القنب Cannabis extract (5)، زنك آرجنين Arginine بجرعة ٥٠ ملغم مذابة في نصف مل من الماء المقطر (6)، مادة السولاسوداين Solasodine (7) أما الباحث (8) فلقد استخدم مادة الكالسيوم كلورايد Calcium chloride بجرعة ١٥مل بتركيز ٣٠٪ من المادة والإيثانول Ethanol كل على حدى من المواد الكيمياوية الأخرى التي إستخدمت لإجراء الإخصاء الكيمياوي ومنها لاكتيك أسيد Lactic Acid (4)، فيرك كلورايد Ferric chloride (9)، الكليسيرول Glycerol (10)، صوديوم كلورايد Nacl (11)، زنك سلفايت Zinc sulphate (12) الفورمالين Formalin (13)، الكادميوم كلورايد Cadmium chloride (14) والدانازول Danazol (5). يهدف البحث لمعرفة مكانية مزيج التانك اسد والكافائين في احداث تحطيم للنسيج الخصوي بحيث يؤدي إلى توقف إنتاج الحيامن وإفراز هرمون الشحمون الخصوي Testosterone ومعرفة المدة الزمنية التي يحتاجها مزيج التانك أسد والكافائين لإحداث الخصي في الحمير.

المواد وطرائق العمل

الحيوانات

شملت الدراسة (١٦) حيوانا" من ذكور الحمير من السلالات المحلية البالغة والسليمة ظاهريا التي تم فحصها سريريا للتأكد من سلامتها من الأمراض وللتأكد من سلامة الخصيتين لديها من الناحية الشكلية ووجودها في موقعها داخل كيس الصفن. تراوحت أعمار الحيوانات بين (١,٥– ٣) أعوام، وأوزانها بين (٥٠ – ٨٠) كغم، وقد وضعت الحيوانات خلال مدة التجربة مع إناث حمير في الحقل الحيواني بكلية الطب البيطري / جامعة الموصل، وتمت تغذيتها بالعلف الجاف المكون من التبن والنخالة والشعير.

تحضير المادة الكيمياوية

تم تحضير المادة الكيمياوية من مزج مادة التانك أسد والكفائين، وتم وزن 600 mg ملغم من التانك أسد Tannic acid بميزان حساس ووضعت هذه المادة في قنينة زجاجية سعة 5 مللتر نظيفة ومعقمة وأضيفت إليها مادة الكفائين ٢٥ % السائلة بمقدار 3 مللتر تحتوي على 750 mg، تم رج الزجاجة جيدا لإذابة حبيبات التانك أسد الى أن أصبح المحلول رائقا، وهذه الكمية تكفي لخصية واحدة. أعيدت نفس الخطوات لتحضير نفس

الجرعة للخصية الثانية. إذ تم تحضير المزيج لخصية واحدة على انفراد في كل مرة.

تحضير الحيوان وإعطاءه المادة المهدئة

تم أعطاء الحيوان مهدئ الزايلزين ٢٪ وبجرعة 1 ملغم/كغم من وزن الجسم بالوريد، ثم حضرت منطقة كيس الصفن وذلك بغسلها جيدا" بالماء والصابون ثم حلاقتها لإزالة الشعر منها، بعد ذلك يتم تطهير المنطقة باستخدام الكحول الاثيلي ٧٠٪، كما تم سحب عينة دم 10 مللتر من الوريد الوادجي للحيوان قبل اجراء الحقن بالمادة الكيمياوية.

حقن المادة الكيمياوية (عملية الحقن)

يتم مسك خصية الحيوان وتشد نحو الأسفل لإبراز الحبل النطفي وبعد بروزه فان أصابع اليد سوف تضغط عليه بقوة، تبرز الخصية بالضغط عليها من الأعلى قدر الامكان، يتم حقن المزيج الذي سبق تحضيره وبواقع 3 مللتر تحتوي (التانك أسد Tannic acid 600 ملغم والكفائين Caffeine 750 ملغم) بواسطة سرنجة 5 مللتر ونيدل كيج ١٨ وتوزع الكمية على أكثر من مكان داخل نسيج الخصية وبعد أتمام عملية الحقن، تحقن الخصية الأخرى للحيوان وبالطريقة نفسها (للمجموعة الاولى). اما في المجموعة الثانية (مجموعة السيطرة) والتي شملت (٦) ذكور، تم فيها أجراء الخطوات نفسها التي أجريت في المجموعة الأولى، باستثناء أن المادة المحقونة كانت 3 مللتر من الماء المقطر. ويتم أيضاً أخذ عينة دم من الوريد الوداجي للحيوان. في المجموعة الثالثة والتي شملت (٤) ذكور، فقد تم حقن المادة الكيمياوية في الخصية اليمنى بينما تم حقن الماء المقطر في الخصية اليسرى وقد استخدم اسلوب التبادل في الحقن، إذ تم عكس الحقن في الحيوان الذي يليه وهكذا، و كان الهدف من أجراء هذه التجربة هو معرفة هل أن تأثير المادة الكيمياوية المحقونة كان موضعيا" أم أنه كان جهازياً.

متابعة الحيوانات

تمت مراقبة الحيوانات كافة (في المجاميع الثلاثة) بعد عملية الحقن وبشكل يومي لمدة ٣٠ يوماً سجلت فيها جميع التغيرات السريرية والسلوكية التي طرأت على الحيوان خلال هذه المدة، إذ تمت مراقبة التغير الحاصل في حجم الخصى وشكلها وكذلك شهية الحيوان للأكل وتصرفاته والفعالية الجنسية، علما" بان هذه الحيوانات موجودة مع إناث بالغة وفي الحظيرة نفسها، أعطيت الحيوانات المضاد الحيوي بنسلين – ستربتومايسين بجرعة 10000 IU/kg من وزن الجسم من البنسلين و 10mg/kg من وزن الجسم ستربتومايسين ولمدة (٣) أيام بعد العملية.

أخذت عينات دم من حيوانات المجموعة الأولى والثانية بعد ٢، ٤ أسابيع من حقن المادة الكيمياوية لغرض قياس مستوى هرمون الشحمون الخصوي Testesterone في حين أخذت عينات دم من المجموعة الثالثة بعد ٤ أسابيع من حقن المادة الكيمياوية فقط لغرض قياس مستوى أنزيم ALT (Alanine amino transferase ومستوى أنزيم AST (Alanine amino transferase).

أجراء الاخصاء الجراحي (جمع العينات)

تم إجراء الاخصاء الجراحي بعد ٣٠ يوماً من حقن المادة الكيمياوية تحت تأثير المنوم العميق Deep narcosis باستخدام مادة الكلورال هيدريت ١٠٪ وبجرعة 5 gm/50 kg من وزن الجسم، حضرت منطقة العملية بغسلها جيدا" بالماء والصابون وتمت حلاقتها باستخدام ماكنة حلاقة يدوية لإزالة الشعر منها، بعد ذلك عقمت بمادة الكحول الاثيلي ٧٠٪. ثم مسكت الخصية بواسطة أصابع اليد لغرض إبرازها، حيث عمل شق طولي على كيس الصفن بطول 5cm تقريبا" بواسطة مشرط جراحي لغرض الوصول الى الخصية بعدها حررت الخصية وسحبت الى خارج كيس الصفن حيث تم أجراء عقد للحبل ألنطفي Spermatic cord بواسطة خيط سلك رقم (٢) وعلى منطقتين منه، إذ تم القطع بين منطقتي العقد، وأزيلت الخصية ووضعت في محلول البفر المتعادل ١٠ % لغرض أجراء التقطيع النسيجي. وبالطريقة نفسها أزيلت الخصية الثانية للحيوان.

جمع عينات الدم

تم جمع عينات الدم من خلال الوريد الو داجي Jugular Vien للحيوانات بطريقة معقمة وباستخدام سرنجة 10ml مللتر ونيدل كيج ١٨، نقل الدم الى أنابيب بلاستيكية معقمة حيث أجريت عليها عملية فصل المصل Serum باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة ٢٠٠٠ دورة/ دقيقة ولمدة ١٥ دقيقة، بعد ذلك فصل المصل بواسطة انابيب ونقل إلى أنابيب بلاستيكية معقمة ثم أرسل الى المختبر لقياس مستوى هرمون الشحمون الخصوي Testosterone للمجموعة ألأولى والثانية في حين تم وضع المصل Serum للمجموعة الثالثة في التجميد (-٢٠ °م) لحين أجراء قياس مستوى أنزيم ALT، AST.

قياس مستوى هرمون الشحمون الخصوي Testosterone

تم قياس مستوى هرمون الشحمون الخصوي باستخدام عداد كاما Camma Counter وباستخدام تقنية Radioimmuno assay.

قياس مستوى الأنزيمات

تم قياس مستوى انزيم الـ ALT (Alanine amino transferase) في مصل الدم باستخدام الطريقة اللونية Colorimetric method حسب ما أورده (15) وباستخدام عدة القياس الجاهزة Kit والمصنعة في شركة Biomeriux الفرنسية وباستخدام جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer (PD , Japan 303) عند الطول الموجي 505. اما مستوى انزيم الـ AST (Aspartatamino transferase) فقد تم قياسه في مصل الدم بنفس طريقة قياس مستوى ALT. Oxoglutarate، تم قياس كلا

الأنزيمين في فرع الفسلجة في كلية الطب البيطري، جامعة الموصل.

الفحص العياني للعينات

تم فحص الخصى عيانياً بعد أن تم جمعها من الحيوانات لملاحظة أي تغير قد طرأ على حجمها، وشكلها، ولونها، وقوامها، ورائحتها و أي تغير أخر يشاهد عليها , فضلاً عن ذلك فقد لوحظت التغيرات العيانية التي ظهرت على الحويصلة المنوية وغدة البروستات في الحيوانات التي تم أجراء الصفة التشريحية عليها كما ذكر أنفاً.

الفحص النسيجي المرضي

أخذت العينات المحفوظة في محلول البفر المتعادل وأجريت عليها تقنيات التقطيع النسيجي الروتينية كما وصفت في (16). فبعد تثبيت الأنسجة تغمر في شمع البارافين، ثم تقطع بواقع ٥ – ٤ مايكروميتر وتصبغ المقاطع بواسطة صبغة الايوسين – هيماتوكسلين Eosin and hematoxiline كما وصفت في (17).

النتائج

التخدير

اثبت إعطاء الزايلازين Xylazine بجرعة ١ ملغم/كغم من وزن الجسم حقنا بالوريد كفاءة عالية بوصفها مادة مسدرة ومزيلة للألم في جميع حيوانات المجموعة الأولى والثانية والثالثة، إذ ظهرت علامات التسدير على الحيوان مباشرة بعد الحقن بحوالي ٣ دقائق وتمثلت ببروز القضيب Penis prolapsed، وتهدل الآذان والرأس، وارتخاء الشفة السفلى فضلا عن ترنح الحيوان في أثناء الوقوف إلا أن جميع الحيوانات بقيت واقفة، كما حدث تسكين جيد للألم كان كافيا لإجراء حقن مزيج التانك اسد Tannic acid والكفائين لإجراء الخصي لحيوانات المجموعة الاولى والثالثة وكذلك حيوانات المجموعة الثانية التي حقنت بالماء المقطر باقل قدر ممكن من الحركة واقل قدر ممكن من الألم، لقد استمر تأثير مادة الزايلازين لمدة ساعة واحدة بعدها استفاق الحيوان دون مضاعفات تذكر.

في حين كان إعطاء مادة الكلورالهايدريت بجرعة ٥غم/٥٠كغم مسبوقا بإعطاء مادة الزايلازين Xylazine بجرعة ١ ملغم/كغم من وزن الجسم بالوريد كافيا لإحداث نوم عميق للحيوان (Deep narcosis) إذ أدى إلى فقدان الحيوان القابلية على الوقوف واضطجاعه على الجانب مع فقدان جميع المنعكسات مثل منعكس القرنية Corneal reflex ومنعكس ملتحمة العين Congectiva reflex. ان هذا النوم العميق كان كافيا لإجراء اخصاء جراحي للحيوان (جمع عينات الخصى) من دون وجود أي إحساس لدى الحيوان في أثناء فتح كيس الصفن وقطع الحبل النطفي، استمر تأثير مادة الكلورالهايدريت لمدة ١-٢ ساعة متفاوتا من حيوان إلى آخر، بعدها بدأت الحيوانات بالصحوة بشكل تدريجي متمثلة برفع الرأس وإعادته إلى الأرض ثم الجلوس على عظم القص Sternal recumbency وبعدها النهوض والمشي المترنح.

الفحص السريري

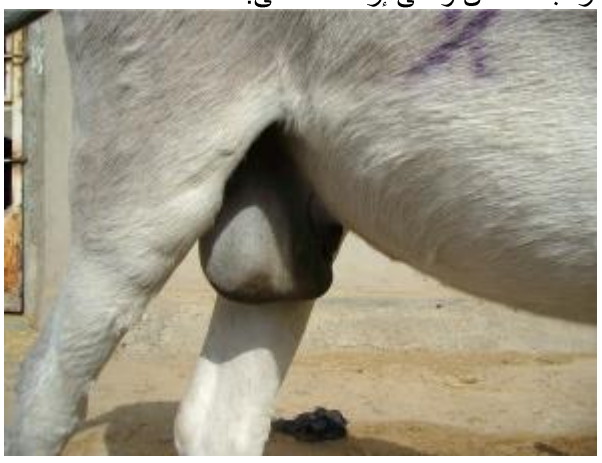
المجموعة الأولى

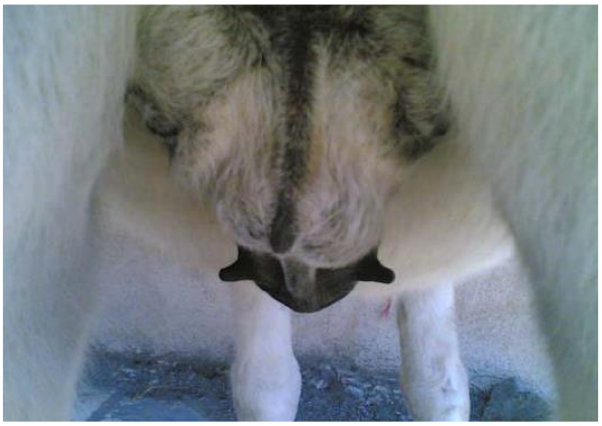
لقد أظهرت نتائج الفحوصات السريرية لحيوانات المجموعة الأولى في اليوم الأول بعد حقن مزيج التانك أسد Tannic acid والكفائين في داخل الخصية حدوث ورم في نسيج الخصية، وقلة في شهية الحيوان، ووجود علامات الم واضحة على الحيوان من خلال الخدر في المشي، وبطء الحركة، وأصبح الحيوان هادئاً ولا توجد لديه أي فعالية جنسية على الرغم من وجود هذه الذكور مع إناث بالغة في نفس القاعة. وفي اليوم الثاني والثالث بعد الحقن اخذ ورم الخصية بالازدياد وامتد في احد الحيوانات ليشمل القلفة Prepuce أيضا، صورة رقم (١).

استمر هذا الورم مع بقاء الحيوان على هذا الحال لمدة ١٥ يوماً بعد حقن المزيج، بعدها أخذت شهية الحيوان تعود وبدأ الورم بالزوال التدريجي مع بقاء الحيوان هادئاً ولا توجد هنالك أي فعالية جنسية، في الأيام ٢٥-٣٠ بعد الحقن عادت الخصى إلى حجمها الطبيعي وهنالك ثلاثة خصى أصبحت اصغر من حجمها الطبيعي، ولكن شكل الخصى بشكل عام كان غير منتظم، صورة (٢).

المجموعة الثانية

في اليوم الثاني بعد حقن الماء المقطر Distilled water لوحظ ورم خفيف لمدة ثلاثة أيام بعدها بدأ الورم بالزوال التدريجي إلى ان عادت الخصية إلى شكلها وحجمها الطبيعي بعد أسبوع من الحقن تقريبا صورة رقم (٣). أما شهية الحيوانات، وحركتهم والفعالية الجنسية لهم فقد كانت طبيعية ولم تتغير خلال الفترة بعد الحقن وحتى إزالة الخصى.





الصورة (١) توضح احد حيوانات المجموعة الاولى بعد ٣ ايام من الحقن لاحظ التورم.

المجموعة الثالثة

إن الخصى التي تم حقنها بمزيج التانك أسد Tannic acid والكفائين ظهر عليها تورم واضح في اليوم الثاني بعد الحقن واخذ هذا الورم بالازدياد خلال الأيام الثلاثة الأولى واستمر الورم على هذا الحجم حتى اليوم ١٥ بعد الحقن تقريبا. بعدها بدأ ورم الخصية بالزوال التدريجي، وفي اليوم ٢٥-٣٠ عادت الخصى إلى حجمها الطبيعي تقريبا، أما الخصى التي حقنت بالماء المقطر Distilled water فلقد حدث فيها تورم في اليوم الثاني بعد الحقن وكان هذا الورم اقل بكثير مما هو عليه في الخصى المحقونة بمزيج التانك اسد والكفائين، بعدها اخذ بالزوال التدريجي الى ان عادت الخصى الى شكلها وحجمها الطبيعي بعد اسبوع من الحقن صورة رقم (٤) كما لوحظ انحراف في شهية الحيوانات، وغياب الفعالية الجنسية، وحذر في اثناء المشي مع علامات الم واضحة على الحيوان.

الصورة (٢) توضح حيوانات المجموعة الاولى بعد ٤ اسابيع ويلاحظ عودة كيس الصفن الى الحجم الطبيعي.

الفحص الهرموني

أظهرت نتائج الفحص الهرموني للمجموعة الأولى التي حقنت بمادة التانك أسد والكفائين انخفاضاً معنوياً بمستوى هرمون Testosterone وكان هذا الانخفاض معنويا بمستوى احتمالية ($P<0.05$) وذلك بعد أسبوعين من حقن مادة التانك أسد والكفائين واستمر هذا الانخفاض بمعدل الهرمون بعد مرور شهر من الحقن، في حين لم يسجل أي فرق معنوي بمستوى الهرمون عند المقارنة بين الأسبوع الثاني وبعد مرور أربعة أسابيع. اما مجموعة السيطرة والتي حقنت بالماء المقطر فإنها لم تظهر أي فرق معنوي بمستوى الهرمون عند المقارنة بين الأسبوع الثاني والأسبوع الرابع جدول رقم (١).

صورة (٣) أحد حيوانات المجموعة الثانية (مجموعة السيطرة) بعد ٢ يومان من الحقن ويلاحظ وجود ورم بسيط في الخصية.

جدول رقم ١: يوضح نتائج الفحص الهرموني للحمير (المعدل ± الانحراف القياسي) بطريقة Radio immuno assay.

	المجموعة الأولى المجموعة المعاملة	المجموعة الثانية مجموعة السيطرة
قبل الحقن	١,٤٧ ± ٠,٣٤	١,٥٢ ± ٠,٢٩
٢ اسبوع بعد الحقن	٠,٥٥ ± ٠,١٣*	٠,٩٤ ± ٠,٢٩
٤ اسبوع بعد الحقن	٠,١٩ ± ٠,٠٥*	٠,٦٦ ± ٠,٣٠

* معنوية ($P<0.05$) مقارنة مع الوقت قبل الحقن.

الفحص الإنزيمي

أظهرت نتائج الفحص الإنزيمي للمجموعة الثالثة عدم وجود أي فرق معنوي بمستوى إنزيم اسبارتيت أمينو ترانسفيريز Aspartate amino transferase وإنزيم أليني أمينو ترافنسفيريز Alanine amino transferase عند المقارنة بين مستوى هذين الإنزيمين قبل الحقن وبعده بثلاثين يوماً (جدول رقم ٢).

صورة (٤) احد حيوانات المجمعة الثالثة ويلاحظ ان الخصية المحقونة بالمزيج متورمة في حين ان الخصية لثانية والمحقونة بالماء المطر كانت طبيعية.

جدول رقم ٢: يوضح نتائج فحص AST , ALT لحيوانات المجموعة الثالثة.

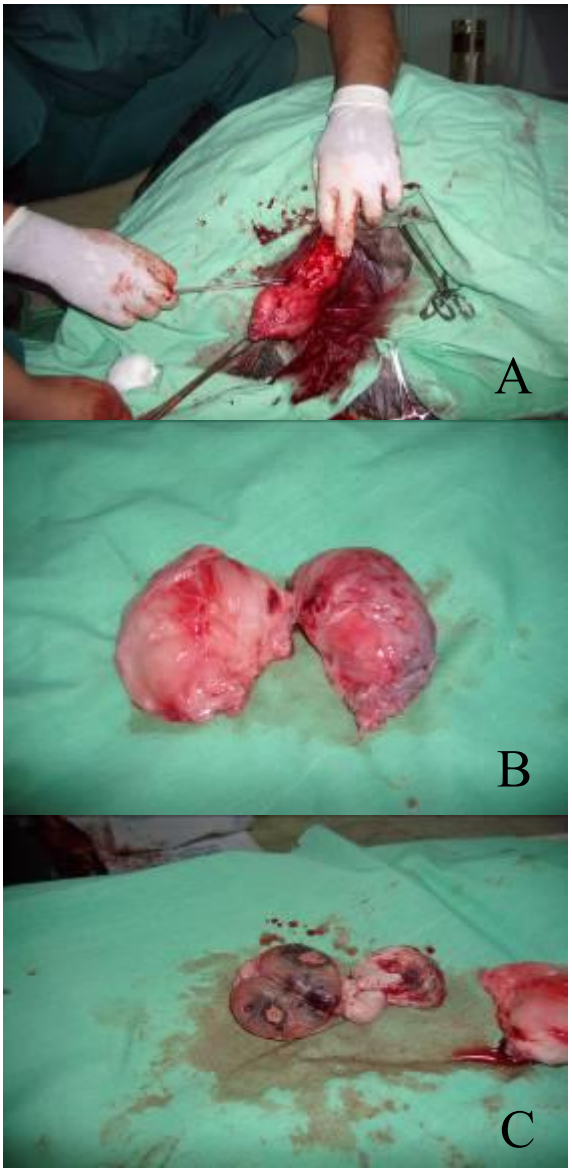
	Alanine amino transferase (ALT)	Aspartate amino transferase (AST)
قبل الحقن	٢٣,٣١ ± ٢,٤	٣٩,٦١ ± ٢,٦
بعد الحقن	١٩,٣٣ ± ٢,٠	٣٤,٢٩ ± ٢,٨

التغيرات العيانية

المجموعة الأولى

في أثناء إجراء عملية الاخصاء الجراحي لغرض جمع العينات (الخصى) لوحظ وجود التصاقات قوية بين كيس الصفن من جهة ونسيج الخصية من جهة أخرى صورة رقم (٥)، وتم فصل هذه الالتصاقات بصعوبة وذلك بعمل قطع أعمى Blunt dissection بواسطة مقص جراحي وقد أدى ذلك إلى حدوث نضح قوي للدم Ozing من الأنسجة المفصولة.

لقد كانت الخصى غير منتظمة الشكل Irregular shape، واصغر من حجمها الطبيعي في أربع عينات (خصى) صورة رقم (٥). ولقد قطعت الخصى إلى نصفين بشكل طولي ولوحظ فيها وجود تنخر قوي جدا في المكان الذي حقنت فيه المادة الكيمياوية داخل النسيج الخصوي وحدوث تليف واضح في جميع أجزاءه.



صورة (٥) الخصية لأحد حيوانات المجموعة الأولى (المجموعة المعاملة بالمزيج) A اثناء عملية الخصي B بعد الازالة، C بعد ان تم قطعها طولياً لاحظ التغيرات والاسوداد في مناطق مختلفة من الخصية.

المجموعة الثانية

في أثناء عملية الاخصاء الجراحي لغرض جمع العينات (الخصى) لوحظ أن الخصية كانت طبيعية ولا توجد هنالك أي التصاقات صورة رقم (٦)، وبعد رفع الخصى تم قطعها إلى نصفين وبشكل طولي وكان النسيج الداخلي للخصية طبيعياً وخالياً من أي تغيرات عيانية).

صورة (٦) توضح الخصية لأحد حيوانات المجموعة الثانية المحقونة بالماء المقطر بعد ان تم قطعها طولياً الخصية تبدو طبيعية في الشكل والحجم ولا توجد أي التصاقات مع كيس الصفن.

المجموعة الثالثة

بعد إجراء العملية الجراحية لجمع العينات لوحظ بان الخصى المحقونة بمزيج التانك أسد Tannic acid والكفائين أظهرت تغيرات عيانية مشابهة للتي لوحظت في خصى المجموعة الأولى (الالتصاقات تغير في شكل الخصى وحجمها)، أما الخصى المحقونة بالماء المقطر Distilled water فلم يلحظ فيها

وجود التصاقات أو أي تغيرات عيانية على نسيجها الداخلي وكانت طبيعية الحجم والشكل كما هو الحال في خصى المجموعة الثانية.

التغيرات النسجية المرضية

المجموعة الأولى

أشار الفحص المجهري لخصى حيوانات هذه المجموعة والتي تم إعطاؤها حامض التانيك Tannic acid والكافئيين Caffeine إلى أن هذا المزيج قد سببّ تغيرات مرضية واضحة كان من ابرزها حدوث تغير تنكسي فجوي لمعظم الخلايا المكونة لجدار النبيبات المنوية Seminiferous tubules، الخلايا الساندة Sustentacular cells أو خلايا سرتولي Sertoli cells والخلايا المكونة للنطف spermatogenic cells والخلايا النطفية الابتدائية والثانوية Primary and secondary spermatocytes cytes. وهذا التغير التنكسي أدى إلى غياب الحيامن وفي مراحلها المبكرة والمتأخرة Early and late stages of spermatids وكانت النبيبات المنوية المصابة محاطة بكميات كبيرة من نسيج ليفي مكون من أرومة ليفية وألياف غراوية وأوعية دموية. وفي مقاطع أخرى لوحظ وجود نخر حقيقي Frank necrosis للنبيبات المنوية وارتشاح إعداد كبيرة جدا من الخلايا الالتهابية متعددة أشكال النواة (Polymorphanuclear cells=(PMNS بين النبيبات المنوية مع وجود أنقاض خلوية ممزوجة مع الخلايا الالتهابية، (صورة رقم ٧).

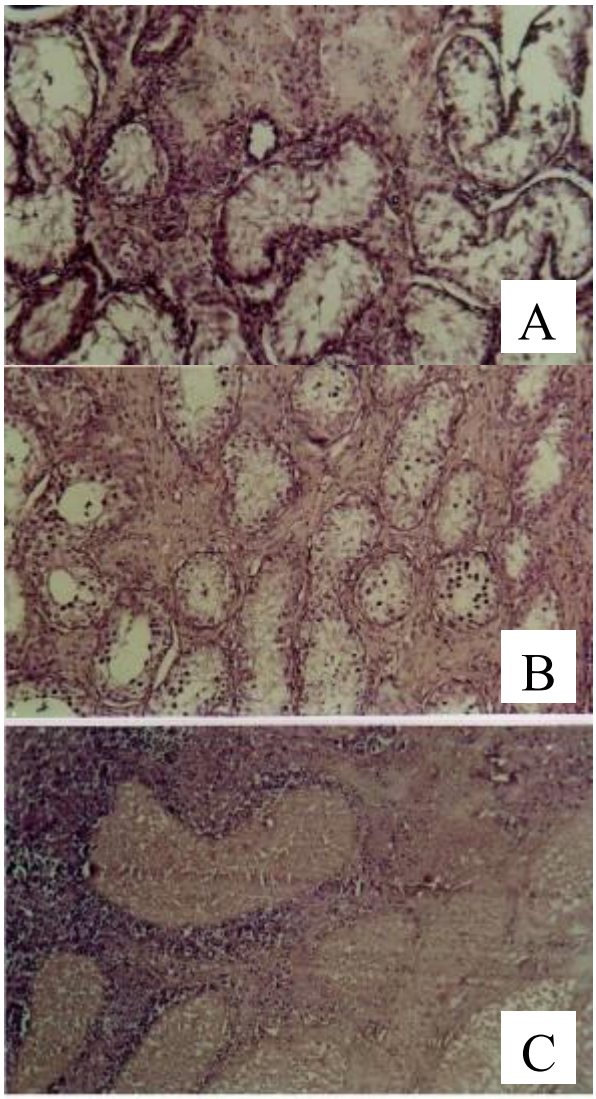
لوحظ فرط تنسج للخلايا الظهارية المبطنة للبربخ Ducts epididymis والقناة الصادرة Ducts deferens وامتدادها على شكل بروزات حليمية إلى جوف القنوات. وفي البربخ لوحظ حدوث حالة انحشار الحيامن Sperm impaction ممزوجة مع انقاض خلوية. ولوحظ تثخن جدران الحويصلات المنوية Seminal vesicles، والغدة الحويصلية Vesicular gland نتيجة لتليف الجدران. ولوحظ احتواء القنوات الصادرة Ducts deferens على خليط من الحيامن والانقاض الخلوية (صورة رقم ٨).

المجموعة الثانية

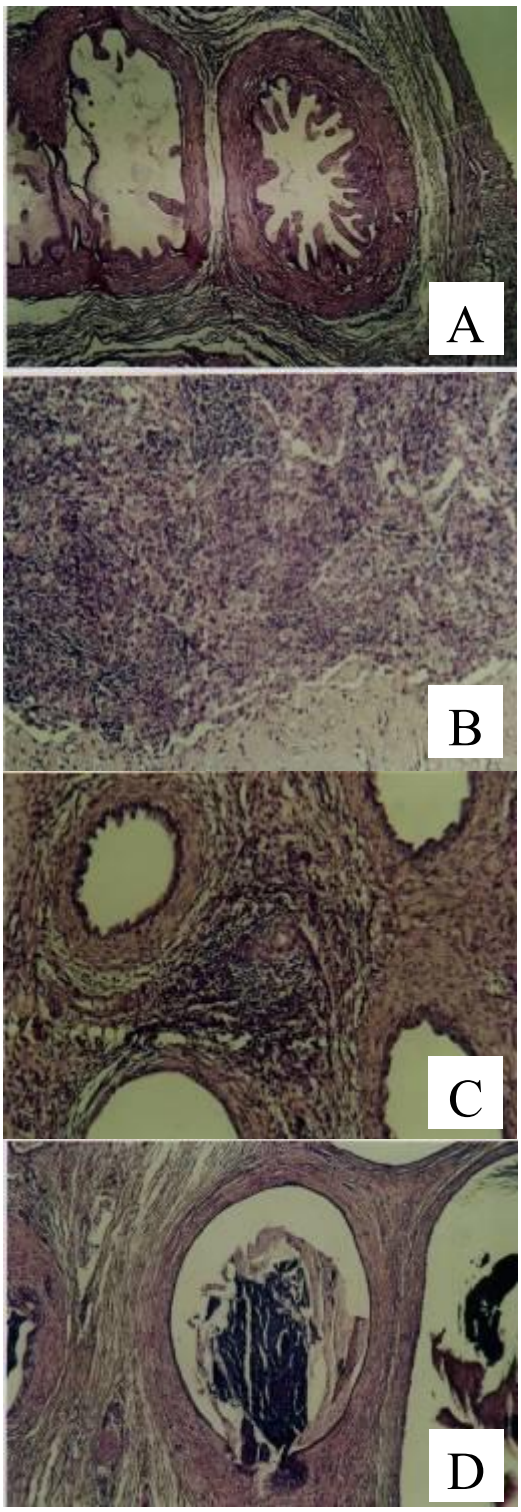
فيما يتعلق بخصى حيوانات هذه المجموعة والتي حقنت بالماء المقطر Distilled water فقد كانت النبيبات المنوية سوية واحتوت على حيامن بدت سوية مظهريا (٩) وكذلك الحال في باقي أجزاء النسيج الخصوي فقد ظهر طبيعياً وخالياً من التغيرات.

المجموعة الثالثة

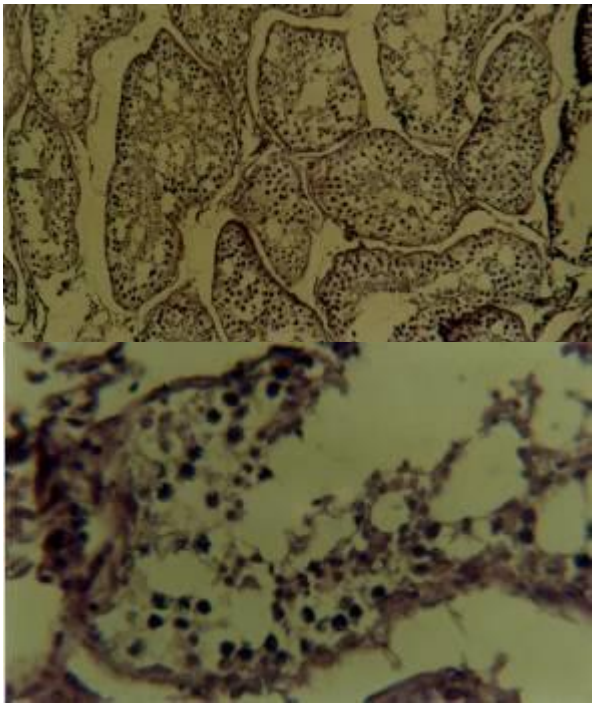
لوحظ في الخصى التي حقنت بمزيج حامض التانك Tannic acid والكفائين لوحظ حدوث نخر شديد للنبيبات المنوية (نخر اماعي Liquefative necrosis) وارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية متعددة أشكال النواة بين المناطق المتنخرة والمناطق الاقل تضرراً. ولم يلاحظ وجود أي من مكونات النسيج الخصوي ولا الحيامن. أما الخصى التي حقنت بالماء المقطر Distilled water فلم يظهر فيها أي تغير نسيجي إذ وجدت النبيبات المنوية سليمة ومحتوية على حيامن تبدو سليمة مظهريا، فضلاً عن أن خلايا ومكونات الخصية الأخرى كانت سليمة أيضاً.



صورة (٧). صورة مجهرية لخصية حمار تم حقنها بحامض التانيك والكافئيين. ويلاحظ وجود تنكس فجوي (A)، غياب الحيامن وتليف الحيز بين النبيبات المنوية (B) النخر الشديد للنبيبات المنوية وارتشاح اعداد كبيرة جداً من الخلايا متعددة أشكال النواة، (C) صبغة الهيماتوكسيلين والايوسين. X100.



صورة (٨) صورة مجهرية لخصية حمار تم حقنها بحامض التانيك والكفائين. لاحظ. فرط تنسج الظهارة المبطنة لتفرعات القنوات الصادرة في البربخ (A)، انحشار الحيامن وتجمع انقاض خلوية في البربخ (B)، تثخن جدران الحويصلات المنوية نتيجة لتليفها مع وجود بؤرة التهابية مكونة من خلايا احادية النواة (الخلايا اللمفية خصوصاً) (C)، احتواء قناة صادرة على حيامن وانقاض خلوية مع وجود بؤرة التهابية صغيرة في النسيج الخلالي (D) فرط تنسج الظهارة المبطنة لتفرعات القنوات الصادرة في البربخ فرط تنسج الظهارة المبطنة لتفرعات القنوات الصادرة في البربخ صبغة الهيماتوكسيلين والايوسين. X100.



الصورة (٩) صورة مجهرية لخصية حمار تم حقنها بالماء المقطر. ويلاحظ المظهر السوي تقريباً للنبيبات المنوية. صبغة الهيماتوكسيلين والايوسين. X100.

المناقشة

اجري الاخصاء الكيمياوي في هذا البحث باستخدام مزيج ٣ مللتر يحتوي على ٦٠٠ ملغم تانك أسد Tannic acid و٧٥٠ ملغم كافائين Caffeine ولقد تم التوصل إلى هذه الجرعة بعد عدة تجارب تمهيدية أجريت قبل المباشرة بالبحث إذ أعطت هذه الجرعة أفضل نتيجة وبأقل تركيز من المادة الكيمياوية وأدت بعد حقنها بثلاثين يوماً إلى تحطيم نسيج الخصية وإيقافها عن العمل بالكامل فأصبحت الفعالية الجنسية للحيوانات معدومة تماماً بالرغم من وجودها مع إناث بالغة في نفس القاعة. يعتقد أن تأثير التانك أسد Tannic acid والكفائين Caffeine في إحداث الأذى كان متداخلاً بحيث قوى أحدهما الآخر في تحطيم نسيج الخصية، على الرغم من عدم وجود مصادر تثبت هذا الكلام الا ان هنالك

دراسات أثبتت فعل مواد أخرى في تحطيم نسيج الخصية ومنها استخدام مادة الايثانول من قبل الباحث (8).

لقد كان تأثير مزيج التانك أسد والكفائين عند حقنه في الخصى موضعياً إذ لم ينتقل هذا التأثير إلى الخصية الثانية، كما في التجربة الثالثة عندما تم حقن المزيج في احدى الخصيتين وحقن الماء المقطر في الخصية الثانية فلم ينتقل تأثير المزيج من الخصية المحقونة به ليؤثر على الخصية المحقونة بالماء المقطر، وأكدت ذلك نتائج الفحص الأنزيمي لكل من انزيمي (ALT) Alanine amino transferase و (AST) Aspartate amino transferase فلم تحدث زيادة في مستوى الانزيمين مقارنة بمستواهما قبل الحقن مما يدل على عدم وجود تأثير جهازي لهذا المزيج.

لقد كان تأثير التانك أسد والكفائين واضحاً على الخصية إذ أدى إلى تحطم نسيج الخصية وأصبحت غير قادرة على إنتاج الحيامن وافراز هرمون الشحمون الخصوي، ويعتقد ان ذلك التحطيم تم بفعل التانك أسد أو بفعل المزيج بمادتيه. ان هذا التحطيم يتفق مع ما توصل إليه الباحث (8) عندما حقن مادة الايثانول وحصل على نتائج مماثلة في اتلاف نسيج الخصية وايقافها عن اداء وظيفتها. في حين ان موادا اخرى لم تسبب هذا التلف كما ذكر الباحث (8) الذي قام بحقن مادة الكالسيوم كلورايد لم تؤدِ إلى احداث تغيرات في نسيج الخصية وبقيت مستمرة في أداء وظيفتها بسبب عدم حدوث تحطم للنسيج الخصوي.

اما الزمن اللازم لتحطيم نسيج الخصية فعلى الرغم من عدم حصولنا على نتائج دقيقة بشأن هذا الموضوع الا اننا نعتقد ان حقن المزيج الكيمياوي أدى مباشرة إلى احداث التلف، وتؤكد ذلك العلامات السريرية التي ظهرت على الحيوانات وهذه النتيجة قد تحتاج إلى المزيد من الدراسة لتحديد الزمن الذي يستغرقه المزيج في احداث الخصي بدقة.

ان الجرعة التي استخدمت في هذه الدراسة (التانك أسد ٦٠٠ ملغم + كافائين ٧٥٠ ملغم) كانت كافية لاحداث الاخصاء في الحمير على الرغم من اننا اخترنا هذه الجرعة ضمن عدة جرع استخدمت بدراسة تمهيدية سبقت هذا البحث، وعلى الرغم من ذلك نحن بحاجة إلى المزيد من الدراسات التي يمكن أن تحدد الجرعة اللازمة والعلاقة بين الجرعة والزمن اللازم لحدوث الاخصاء. لقد تم اعطاء التانك اسد والكفائين بشكل مزيج حيث تم مزج التانك اسد بالكفائين، وقد ذاب التانك أسد بسهولة في الكفائين بدرجة حرارة الغرفة ودون الحاجة إلى التسخين ومن الجدير بالذكر ان هذا المزيج يمكن خزنه لعدة أسابيع دون حدوث أي تغير في شكله او لونه او قوامه.

أثبتت نتائج الدراسة لهذه المجموعة حدوث تورم في نسيج الخصية ومن اليوم الأول بعد الحقن وازدياد هذا التورم خلال الأيام الثلاثة الأولى بعد الحقن وهذا مطابق لما جاء به الباحث (18) الذي أكد ان حدوث أي اذى في نسيج الخصية يؤدي إلى تكوين وذمة Odema في هذه المجموعة مع وجود الم قوي لديها تمثل في الحذر الكبير في أثناء المشي مع الم قوي في أثناء جس الخصية باليد وفقدان حاد للشهية مع غياب الفعالية الجنسية بشكل كامل على الرغم من وجود الحيوانات مع إناث بالغة في نفس القاعة. وهذا يتفق مع ما أشار اليه الباحث (19) من ان سبب الألم المتكون بعد حدوث الأذى يعود إلى ضغط الوذمة المتكونة على النهايات العصبية فضلاً عن إفراز الهستامين Histamine والكنينات Kinins نتيجة الأذى الحاصل على المنطقة من خلال تحفيزها المباشر للألياف العصبية المتحسسة للألم.

بعد ١٥ يوماً من حقن المادة الكيمياوية بدا ورم الخصية بالزوال التدريجي إلى ان عادت الأحجام قريب من الحجم الطبيعي ولكن أشكالها أصبحت غير متناسقة وهذا يتفق مع ما جاء به الباحث (19) الذي أكد أن زوال الألم في العضو المصاب يعود إلى التصريف الحاصل للوذمة المتكونة مما يقلل الضغط الحاصل على النهايات العصبية إذ ان الالتهاب الذي حصل بسبب المادة الكيمياوية انتقل إلى الأطوار المتقدمة من تكون نسيج ليفي مما أدى صغر حجم الخصية.

أما الخصى المحقونة بالماء المقطر فلقد ظهر عليها تورم بسيط ثم عادت إلى شكلها الطبيعي بعد الحقن بفترة قصيرة وهو مشابه لما حدث مع حيوانات المجموعة الثانية ولقد أظهرت الحيوانات علامات الم قوية تمثلت في الحذر في أثناء المشي وفقدان الشهية ويعود السبب في ذلك إلى الأذى الحاصل في الخصى المحقونة بالمادة الكيمياوية.

ان هذه التجربة أثبتت أن تأثير المادة الكيمياوية كان موضعيا ومحددا في الخصى التي حقنت بها ولم يمتد جهازيا systemicly ليؤثر على أنسجة الجسم وعلى الخصى المحقونة بالماء المقطر ومما يعزز هذا القول ان الخصية الثانية لم تتأثر بالمزيج إذ بقيت الخصية الثانية طبيعية ولو كان هناك أي تأثير جهازي لأدى ذلك إلى تغير في الخصية الأخرى كما تم تعزيز هذه النتائج ايضاً من خلال فحص مستوى إنزيمي ALT، AST.

أظهرت نتائج التغيرات العيانيى حدوث التصاقات قوية بين نسيج الخصية من جهة وكيس الصفن من جهة أخرى، وكانت الخصى غير منتظمة الشكل والحجم مع وجود علامات تنكس Degeneration وتنخر Necrosis قوية في نسيج الخصية.

ويعود السبب في ذلك إلى الأذى الكبير الذي أصاب الخصية من جراء حقن المادة الكيمياوية وهذا يتفق مع ما جاء به الباحث (8) الذي قام بحقن مادة الايثانول المطلق في خصى ثيران فأحدثت أذى كبيراً في نسيج الخصية تمثل في التنخرات والتنكسات التي اخفت معالم الخصية الطبيعية.

أشار الفحص الهرموني لحيوانات المجموعة الاولى والتي حقنت بمزيج التانك اسد والكفائين حدوث انخفاض معنوي في مستوى هرمون الشحمون الخصوي Testosterone عن مستواه قبل الحقن عند قياسه بعد ١٥ يوماً واستمر الانخفاض عند قياسه بعد ٣٠ يوماً من حقن المادة الكيمياوية. ويعود السبب في ذلك إلى التحطم الكبير الذي أصاب نسيج الخصية وبالأخص خلايا ليغ Leydig cells إذ أن هذه الخلايا هي المسؤولة عن إنتاج هرمون الشحمون الخصوي Testosterone في الخصية (20).

وهذا يتفق مع ما جاء به الباحث (8) والذي أشار إلى حدوث انخفاض تدريجي في مستوى هرمون الشحمون الخصوي عند قياسه بعد ١٥، ٣٠، ٦٠ يوماً من حقن مادة الايثانول المطلق في داخل نسيج الخصية. ولقد عزى هذا النقصان إلى التلف الذي اصاب الخلايا المسؤولة عن إنتاج هرمون الشحمون الخصوي في داخل الخصية.

ومن الجدير بالذكر إلى أن مستوى هرمون الشحمون الخصوي Testosterone لم ينخفض إلى مستوى الصفر في جميع التجارب التي أجريت، ويعود السبب في ذلك إلى أن ١٠٪ من مستوى هذا الهرمون يتم إفرازه من الغدة الكظرية (الغدة فوق الكلية) Adrenal gland (8).

في حين اظهر مستوى انزيمي (ALT) Alanine amino transferase وأنزيم (AST) Aspartate amino transferase عدم وجود تغير معنوي قبل الحقن وبعد الحقن بـ 30 يوماً لقد أشار الباحث (21) إلى أن إنزيم ALT يفرز من الكبد، ويوجد في العضلات وفي مصل الدم، إذ أنه يساعد على تحويل مجموعة الحامض الأميني Aspartate and Alpha-ketoglutaric acid الموجودة في البروتينات الى كلوتاميت glutamate والاوكزالواستيت Oxaloacetate ويرتفع مستواه عند حدوث أي أذى في نسيج الكبد والعضلات والدم، ويتم قياس هذا الانزيم سريرياً لغرض تشخيص نشاط الكبد (21) كما أشار الباحث (22) إلى أن أنزيم AST يفرز من الكبد ويوجد في خلايا الدم الحمراء Red blood والعضلات القلبية Cardiac muscle ويرتفع مستواه في الدم عند حدوث أي أذى للكبد وأنسجة الجسم الأخرى.

ان عدم تغير مستوى انزيمي ALT, AST قبل الحقن وبعده يدل على أن تأثير المزيج الكيمياوي كان موضعياً ولم ينتقل إلى الكبد وأنسجة الجسم الأخرى ومن ضمنها الخصية المحقونة بالماء المقطر، فلو انتقل تأثير المزيج جهازياً لأدى ذلك الى ارتفاع مستوى هذين الانزيمين بعد الحقن، ولقد عزز هذا الأمر كون الخصية الثانية المحقونة بالماء المقطر ظهرت سليمة وبدون تغيرات في أثناء الفحص العياني والفحص النسيجي المرضي.

أشار الفحص النسيجي لخصى حيوانات المجموعة الاولى والتي حقنت بمزيج التانك اسد والكفائين حدوث تغير تنكسي فجوي لمعظم خلايا جدار النبيبات المنوية مع وجود تنخرات حقيقية Frank necrosis للنبيبات المنوية وحدوث تليف واسع في نسيج الخصية مع ارتشاحات لخلايا التهابية متعددة اشكال النواة استجابة للاذى الكبير الذي أصاب الخصية. وهذا يتفق مع ما جاء به الباحث (8) الذي أشار إلى ان حقن مادة الايثانول أدى إلى تنخر قوي في النبيبات المنوية مع وجود علامات التهابية تمثلت بتجمع خلايا أحادية النواة ووجود وذمة في داخل النبيبات. كل ذلك حدث استجابة للأذى الناتج عن حقن مادة الايثانول. في حين لم يحدث تغير نسيجي يذكر في المجموعة لثانية والتي حقنت بالماء المقطر كما اظهرت الخصى المحقونة بالمزيج في المجموعة الثالثة تغير مشابهة لما حدث في حيوانات المجموعة الاولى في نفس لوقت لم يحدث أي تغير في الخصية التي حقنت بالماء المقطر في نفيس المجموعة وهذا يؤكد انتاثير المزيج كان موضعياً ولم ينتقل هذا التاثير على الخصية الاخرى.

نستنتج من هذه الدراسة امكانية اجراء الاخصاء الكيميائي في لحمير بحقن مزيج من لتانك اسد واكفائين وان هذا المزيج له تاثير موضعي ولم يكن له تاثير جهازي على الحيوان.

شكر وتقدير

نقدم شكرنا وتقديرنا الى كلية الطب البيطري، جامعة الموصل على دعم هذا البحث.

المصادر

1. HicKman J and Walker RG. An atlas of veterinary surgery, 2nd ed., John Wright and Sons LTD, Bristol. 1980, pp 79-84.
2. Adams S B. Complication of castration. J Am Vet Radiol Soc. 2006;19: 80.
3. Stafford K J and Mellor D J. The welfare significance of the castration of Cattle: a review. N Z Vet J 2005; 53: 271-278.
4. Fordyce G, Hodge PB, Beaman NJ.An evaluation of calf castration by intra-testicular injection of alactic acid solution. Aunt Vet J. 1989 ; 66: 272-276.
5. Dixit VP, Gupta CL, Agrawal M. Testicular degeneration and necrosis induced by chronic administration of cannabis extract in dogs. Endokrinologie. 1977;69: 299-305.
6. Fahim Z, Wang M, Sutcu MF, Fahmi MS,young quist RS. Sterilization of dogs with intra-testicular injection of zing arginine contraception, Fert Ster. 1993; 47: 107-122.
7. Dixit VP. and Gupta RS. Effects of short term treatment of solasodine on cauda epididymis in dog. Ind J exper Bio. 2002; 40:162-173.
8. Canpolat GS, Gunay C, Bulut S, Eroksuz H. An evaluation of the out come of bull castration by intra-testicular injection of elhanol and calcium chloride, Revue Med Vet. 2006; 157: 420- 425.
9. Kara AB, Kamboj VP, Goswamia A. Sterilization of male rhesus monkeys by iron salts, J Rep Fert. 1965; 9:115- 117.
10. Immegart H M, Threlfall WR Evaluation of intratesicular injection of glycerol for Non surgical sterilization of dogs. AM J Vet Res. 2000; 61: 544-549.
11. Heath E, Arowolo R. The early histopathologic effects of intatesticular injection with hypersmolar glycerol, glucose or Nacl solutions. Androl. 1987;19 : 654- 661.
12. Feher T, Bordrogi L, Makray S. Dynamics of serum testosterone levels in bulls: daily, seasonally and after chemical or surgical castration. Magyar Allatorvosok Lapja. 1985; 40: 13- 16.
13. Ijaz A, Abalkhail A A, Khamas WAH. Effect of intratesticular injection of formalin on seminiferous tubules in Awassi lambs. Pakistan Vet J. 2000; 20: 129- 134.
14. Mullet C E, Viale JP, Sagnard PE. Pulmonary Co_2 Elimination during surgical procedures using intra or extra periteal Co_2 insufflation. anasth Analg., 1993; 76: 622.
15. Tietz, NW. Fundamentals of clinical chemistry W. B. Saunders Co. 1999 USA. pp. 401.
16. Luna LG. Manual of histiolgical staining methods of armed forces institute 0f pathology. 3rd ed. New york, MGraw Hill Book Company, 1968. pp38-76.
17. Humason G L. Animal tisuue technique3rd ed. WH freman and Company. San Francisco. 1972. pp 148-167.
18. Ladds PW. The male genital system. Pathology of domestic animals.

Ed., Jubb, K.V.F. Kennedy, P.C., palmer, N. 3rd ed Vol.3, Academic press, I.N.C. New york, 1985. PP.: 409-448.
19. Anderson JR. Muir's textbook, 11th ed. Edward Amold London, U.K. 1980.
20. Garner L P, Hiatt J L. Color atlas of Histology. 4th. Ed., lippincott, Willims and Wilkins: Philadelphia, USA. 2006, pp. 369-386.
21. Paul T, Giboney, MD. Elevated liver transminase levels in the asymptomatic patient.
22. Dufour DR, Lott JA,Nolte FS, Gretch DR. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. Clin Chem. 2000 ; 46: 50- 68.