الْكَشْفُ عنِ الذِّيفاناتِ الدّاخليةِ في مَحَاليلِ غَسيلِ الكِلى ودِراسةِ تَأثيرِها علَى وَظَائفِ الكَبدِ عِندَ الأَرانبْ

الدكتور فؤاد الداود *، موفق اليوسف **

***أستاذ مساعد دكتور، كلية الطب البيطري**

****طالب دراسات عليا (ماجستير صيدلة)، كلية الصيدلة، جامعة ادلب.**

الملخص

أجري هذا البحث للتقصّي عن هذه الذّيفانات الدّاخليّة في مراكز غسيل الكلى في محافظة ادلب وريفها، ولدراسة تأثير هذه الذّيفانات على وظائف الكبد، وقد شملت الدّراسة الحاليّة أربع مراكز غسيل كلى في ادلب وريفها، حيث تمّ جمع **72** عينة من محاليل غسيل الكلى على فترات متقطّعة (من شهر كانون الثاني حتى شهر أيّار) لعام **2019** وتم اجراء اختبار الذيفانات الداخلية **LPS** بطريقة تشكل الهلامة **Gel-clot method** الدستورية ، ثم أخذت عينات محاليل غسيل الكلى والتي تحوي على نسبة عالية من الذيفانات، و تم حقنها ضمن ست مجموعات من الأرانب البلدية الذكور وبأعمار وأوزان متقاربة وذلك بتراكيز مختلفة **EU/ml (5,10,15,20)** من المحاليل الملوثة بالذيفانات الداخلية، وأخذت قراءة للإنزيمات الكبدية:**(ALT,AST)** بعد مرور فترات زمنية محددة بعد الحقن **(48،24،12،6)** ساعة. أظهرت نتائج التقصي عن مستويات الذيفانات الداخلية في محاليل غسيل الكلى وجود ستة محاليل تحتوي على نسبة عالية من الذيفانات الداخلية فوق النسبة الدستورية**(0.25EU/ml)**. لوحظ ارتفاع معنوي في مستويات **ALT** فوق المستوى الطبيعي **(up to 40 IU/L)** خلال الفترات الثلاث الأولى بعد الحقن **(6,12,24)** ساعة، ثم عادت المستويات الى الحد الطبيعي بعد **48** ساعة، ولوحظ ارتفاع معنوي في مستويات **AST** خلال الفترات الأربعة من الحقن **(48،24،12،6)** ساعة.

ارتفاع مستوى الذيفانات الداخلية في محاليل غسيل الكلى كان سبباً في تخرب الخلايا الكبدية وتسرُّب الإنزيم النوعي **ALT** في بلازما الدم وعودته إلى الحدود الطبيعية بعد إصلاح هذه الخلايا، وكان سبب في ارتفاع إنزيم **AST** الذي يوجد في خلايا الكبد وغيرها وعدم عودته إلى الحدود الطبيعية.

الكلمات المفتاحية: Endotoxin، محاليل غسيل الكلى، **(ALT/AST)**، **LAL** test.

ورد البحث للمجلة بتاريخ / / 2019

قبل للنشر بتاريخ / / 2019

1- المقدمة Introduction

تتكون الكلية من قشرة خارجية **Outer cortex** ولب داخلي **Inner medulla**، وتحتوي الكلى على ما يقارب **1.4** مليون وحدة وظيفية تسمى الكليونات، تقوم الكلى بتصفية الدّم وإفراز الفضلات والسّوائل الزّائدة على شكل بول، عندما تفشل الكلى هناك خياران للعلاج: الخيار الأول هو زرع الكلى **kidney transplantation** لكنّه خيار محدود لعدم توافر الكلية البديلة بشكل دائم والتّكاليف العالية للزّرع [1] ، والخيار الثّاني: وهو الأكثر شيوعاً وهو غسيل الكلى (الدَّيال) **Dialysis**، حيث يمكن أن يتمّ تعويض الفشل أو جزء منه والعمل على مساعدة الجسم في التَّخلص من هذه السُّموم عن طريق تقنيّة الدَّيال. [2] ، إنَّ الماء هو المكون الرئيسي لمحلول غسيل الكلى ، ويقدَّر استهلاك المياه للإنسان السَّليم 2 لتر يوميا أو **14** لتر في الأسبوع ، بينما يستهلك مريض غسيل الكلى خلال جلسة واحدة مدتها 4 ساعات **192** لتر من الماء أو **576** لتر من الماء في الأسبوع.[3]

خلال عدَّة سنوات من الحرب في سوريا عامّة وفي إدلب وريفها بشكل خاصّ تأثرت الكثير من القطّاعات الصحيّة والخدميّة نتيجة العنف والقصف المتواصل، حيث ارتفعت نسبة الملوثات الكيميائيّة والجرثوميّة في المياه المستخدمة في جلسات الغسيل، وبذلك أصبحت مصدراً لنقل بعض الملوثات مثل الجراثيم وفيروسات التهاب الكبد(**B و C**) و بعض السُّموم وأهمها الذِّيفانات الداخليَّة **Endotoxin**، وهذا كان له أثر سلبي على

الصّحة العامة ومرضى الفشل الكلوي، لذلك فإن أهميَّة هذا البحث تعود للمخاطر الصّحيّة الكبيرة التي يمكن أن يسبّبها هذا الذيفان: ارتفاع الحرارة، الحمَّى، الصَّدمة الإنتانيَّة، الموت. [4]

الذِّيفَان الدَّاخلي **LPS** هو عبارة عن جزيء عديْد سكاريْد شحْمي **lipopolysaccharide (LPS)** مُزْدَوِج الأُلْفَة (عديد سكاريد محب للماء **hydrophilic** مرتبط مع شحم كاره للماء **hydrophobic**). يُشكِّل جزءًا من مُكوّنات الجِدار الخُلويّ للجَراثيمِ سلبيَّة الغرام[5] .

يمكن تصنيف الذِّيفَان الدَّاخلي على أنَّه "مولد للحُمَّى" **pyrogen**، ومُولّدات الحُمَّى هي موادّ عندما تُحْقَن في جسم الثدييّات فإنّها تسبّب العديد من الأعْراض، وأكثرها تمييزًا هو ارتفاع درجة حرارة الجِسْم الأساسية، تُحدث عددًا من الاسْتجاباتِ الفيزيولوجيّة الضّارّة ومنْ هذه الاسْتجابات:

1. ارتفاعُ حرارةِ الجسْم **increased body temperature**.
2. شعورٌ بالقَشعْريرَة **chilly sensation**.
3. تضيق الأوعية الدموية الجلديّة **cutaneous vasoconstriction**.
4. توسعٌ في الحَدقة **pupillary dilation**.
5. ضيق في التّنفّس **decrease in respiration**.
6. ارتفاع في الضّغط الشّريانيّ **increase in arterial blood pressure**.
7. آلام عضليّة **muscular pain**.
8. شعور بالغثيان والتَوَعُّك (الدَعَث) **nausea and malaise**.

يلعب الذيفان الداخلي دورًا مهمًا في الأمراض الناجمة عن الجراثيم سلبية الغرام، ففي التراكيز المنخفضة يحفز الذيفان الداخلي العديد من التأثيرات: الحمى **Fever**، وتنشيط السبيل البديل للمتممة، وتنشيط البلاعم **activation of macrophages**، وتنشيط اللمفاويات البائية **B lymphocytes**، وفي التراكيز العالية تسبب الصدمة الإنتانية وحتى الموت.[6] ، لذلك يهدف هذا البحث إلى التقصّي عن الذّيفانات الدّاخلية في محاليل غسيل

الكلى في محافظة ادلب، تقييم محاليل غسيل الكلى من حيث المحتوى الجرثومي، دراسة التأثيرات السمية للذِّيفانات الدَّاخلية على وظائف الكبد.

1-1- اختبارات الذيفانات الداخلية الجرثومية **Bacterial endotoxin test BET**

1-2- اِخْتِبَار حُلاَلَة سَلْطعون (سرطان) نَعْل الفَرَس **Limulus (LAL) Amebocyte Lysate test**

إنَّ اِخْتِبَار الذِّيفَان الدَّاخلي الأكْثر انتشاراً هو اِخْتِبَار الـ **LAL**، ومبْدأ هذا الاِخْتِبَار هوَ التفَاعل بَين الذيفانات ومادَّة (بروتين قَابل للتخثُّر) ومحتواه من الخَلايا أميبية الشكل المسْتخْلصة من دم سَرَطان نَعْل الفَرَس، (يُعَدّ **Limulus Polyphemus** هو النوع الأكثر استخدامًا مع العلم أنَّ هناك أنواع أخرى من السلطعون تؤدي نفس الغرض مثل **Tachypleus/ Carcinoscorpius**)، عُرِّف تفاعل سلطعون نَعْل الفَرَس مع الذِّيفَان الدَّاخلي (تشكل الخثرة) عام الخمسينيات، و**LAL** هو الخلاصة المائية يتم الحصول عليها بعد تحلل خلايا الدم (الخلايا أَميبيَّة الشَّكْل).

2- المَواد وطَرَائق العَمَل

2-1- المواد Materials

2-1-1. الأجهزة المستخدمة Apparatus

1) جهاز خزانة السلامة الحيوية **Biological Safety Cabinets** (موديل الجهاز **JSCB-1200SB** صنع شركة **JSR** الصينية).

2) جهاز كيمياء الدم (بيوسيستم) اسباني **(SEMI-AUTOMATIC ANALYZER BTS-350)**

3) مثقلة **Centrifuge (Hettich)**

4) حمام مائي **Water Bath** (موديل الجهاز **TWB22** صنع شركة **Julabo** الألمانية).

5) جهاز الموصدة **Autoclave** موديل الجهاز **J.P.Selecta, s.a** صنع شركة **Selecta** الاسبانية.

6) حاضنة جرثومية **Molel 100-800** (موديل **Memmer**) المانيا.

7) ميزان تحليلي **Analytical Balance** صيني (**موديلNECK**) حساسية **102**.

8) براد **refrigerator** (**DAEWO**).

9) أنابيب اختبار **Test tubes** حجم **10 ml** خالية من مولدات الحمى.

10) بيشر **Becher** حجم **100 ml**.

11) حوجلة حجم **1000 ml** وحجم **500 ml**.

12) حامل انابيب **tubes holder**.

13) عبوات عقيمة سعة **150 ml** خالية من مولدات الحمى.

14) مِمَصّ ميكروي قابل للضّبط **Micropipette** حجم (**1 ml** وحجم **0.1 ml**).

15) رؤوس ممصّ ميكروي عقيمة **Tips**.

16) أنابيب أبندروف **Eppendorf Tubes** حجم **2ml**.

2-1-2. الكواشف والمستنبتات Reagents and Media

1) مستنبت الثيوغليكولات السائل **Fluid thioglycolate medium** (**Himedia Laboratori INDIA**)

2) مستنبت الصويا المهضومة الكازينيّ **Soya-bean casein digest medium** (**Himedia Laboratori INDIA**).

3) كاشف الذيفانات الداخلية **PYROSTERE TM ES-F** صنع شركة **Wako** الصينية حساسية **λ=0.125**.

4) عتيدة **ALT (ALT Kit)** صنع شركة **(BioSystems S.A)** الاسبانية.

5) عتيدة **AST (AST Kit)** صنع شركة **(BioSystems S.A)** الاسبانية.

2-2- العينات: Samples

تمَّ جمع عينات المياه من أربعة مراكز غسيل كلى وخلال فترات متقطعة في محافظة ادلب وريفها وكان عدد العينات المجموعة **72 (24** عينة كل اعتيان**)** عينة من المراكز المختلفة وهي:

1. مركز **A** ابن سينا.

2. مركز **B** شفق.

3. مركز **C** باب الهوى.

4. مركز **D** دركوش.

وتم جمع عينات المياه في عبوات خاصة خالية من الذيفانات **free of pyrogen** سعة **150 ml** عدد **72** عينة وتخزينها في البراد.

2-3- الاختبارات المنجزة:

2-3-1. اختبار العقامة Sterility test

إنَّ اِخْتِبَار العقامة هو اِخْتِبَار كَيفِي (نوعي) ويكشف وجود/غياب الجراثيم والفطريات بالاعتماد على نموها في نوعين من المستنبتات هي كالتالي:

مستنبت الثيوغليكولات السائل Fluid thioglycollate medium: يستخدم بشكلٍ رئيس للجراثيم اللاحيوائية، ولكنه يستخدم لعزل الجراثيم الحيوائية أيضًا، مستنبت الصويا المهضومة الكازينِيّ Soya-bean casein digest medium (TSB): لعزل الفطريات والجراثيم الحيوائية.

وبوجود شواهد معيارية كالتالي: شاهد من كل مستنبت يُترك مفتوحًا ضمن خزانة السلامة الحيوية خلال كامل فترة إجراء الاختبار ثم يخضع لشروط الحضن نفسها، يدل خلوه من العكر على أنَّ البيئة التي يجري فيها العمل غير ملوثة، وشاهد من كل مستنبت يُتْرَك مغلقًا ويخضع لشروط الحضن نفسها، يدل خلوه من العكر على أنَّ المستنبت خالٍ من التلوث.

2-3-2. اختبار الذيفانات الداخلية Bacterial Endotoxins Test (BET)

يتم استخدام اختبار الذيفانات الداخلية **(BET)** للكشف النوعي أو الكمي عن الذيفانات الداخلية وذلك باستخدام حلالة سلطعون حدوة الحصان **(Limulus Polyphemus Lysate)** أو ما يسمى ال **(LAL)** حيث تحوي هذه الحلالة على بروتينات وانزيمات تتجلط بمجرد ملامستها للذيفانات الداخلية ونسبة التجلط هذه تتناسب طرداً مع تركيز الذيفانات الداخلية.

يجب أن تكون جميع الأدوات الزجاجية المستخدمة في هذه الاختبارات خالية من الذيفانات الداخلية وذلك باستخدام فرن الهواء الجاف لمدة لا تقلّ عن 30 دقيقة بدرجة حرارة 250 درجة مئوية.

تم اجراء اختبار تحديد نسبة الذيفانات الداخلية بطريقة تشكل الهلامة **Gel-clot method** الدستورية.

2-3-2-1- طريقة العمل:

تم إجراء اختبار الذيفانات الداخلية بناءً على تعليمات الشركة المصنعة للكاشف والتي تعتمد على المعايير الدستورية لدستور الادوية الأمريكي **USP 41** وذلك باستخدام كاشف يحوي على حلالة سلطعون حدوة حصان البحر **Amybocyte lysate Limulus** وفق الطريقة التالية :

1- يتم تحضير الكاشف وذلك بإضافة **5.2** ml من الماء الخالي من الذيفان **LRW LAL Reagent Water** إلى القنينة **Vial** الحاوي على الحلالة.

2- يوضع في الأنابيب الخاصة بالمعايرة **0.1 ml** من الحلالة.

3- يوضع في أنبوب ماء خالي من الذيفان الداخلي **LRW** ويعتبر كشاهد سلبي **NC**.

4- يضاف **0.1ml** من العينات المراد فحصها .

5- تُحضَّن أنابيب العينات والشاهد السلبي في حمام مائي لمدة ساعة في درجة حرارة **37** مئوية.

6- بعد ساعة من التحضين يتم مراقبة تشكل الجيل (الهلامة) **Gelation**.

يكون الاختبار إيجابي عندما يتشكل جل متماسك يبقى ثابتًا في حال قلب الأنبوب **180** درجة مئوية

2-3-3. حيوانات التجربة (الأرانب) Rabbits

تم أخذ **30** أرنب من الأرانب البلدية الذكور والتي تتراوح أوزانها **mg (500-700)** وتم وضعها ضمن حظيرة معدنية نظيفة ومطهرة مؤلفة من **8** حجرات مخصصة لتربية حيوانات التجارب، وتم إيصال الطعام والماء بشكل سهل دون تعرض الأرانب لأي ضغط **stress**.

استخدم في التجربة **24** أرنب ووزنت الأرانب بشكل فردي، ثم وزعت عشوائيا إلى ست مجموعات بواقع

(**4** أرانب لكل مجموعة و**4** أرانب للشاهد السلبي و**4** أرانب للشاهد الإيجابي).

2-3-1-3. تصميم التجربة:

تضمن التجربة إعطاء أربع جرعات مختلفة من الذيفانات الداخلية الموجودة في محاليل غسيل الكلى، حيث قسمت التجربة إلى ست مجموعات كما يلي:

- مجموعة الشاهد: حُقنَت ماء خالي من الذيفانات وهو نفسه المحل في كاشف الذيفانات **LRW**.
- مجموعة الشاهد الإيجابي: حُقنَت محلول عياري من الذيفانات الداخلية بجرعة **500 EU/ml**.

- المجموعة الأولى: حُقنَت بمحلول غسيل كلى حاوي على **5 EU/ml** من الذيفانات الداخلية.
- المجموعة الثانية: حُقنَت بمحلول غسيل كلى حاوي على **10 EU/ml** من الذيفانات الداخلية.
- المجموعة الثالثة: حُقنَت بمحلول غســيل كلى حاوي على **15 EU/ml** من الذيفانات الداخلية في الصفاق.
- المجموعة الرابعة: حُقنَت بمحلول غسيل كلى حاوي على **20 EU/ml** من الذيفانات الداخلية.

تم حقن المحاليل المختلفة في التركيز **(5,10,15,20)EU/ml** ضمن البريتوان **IP**.

جُمِعَت عينات الدم من القلب بشكل مباشر وذلك خلال **4** مراحل زمنية بعد **(6،12،24،48)** ساعة من الحقن.

وتم الحصول على المصل **Serum** عن طريق تثفيل عينات الدم**(3000 دورة/دقيقة)** واجراء تحاليل الإنزيمات الكبدية **ALT,AST** بعد كل عملية سحب للدم.

النتائج Result

2-4- نتائج اختبار العقامة:

بعد انتهاء فترة الحضانة الفطرية والجرثومية **(14** يوم**)** للمحاليل المختبرة لوحظ عدم تشكل عكارة في المستنبتات كما هو موضح في الجدول **(1)**.

الجدول (1) نتائج اختبار العقامة لمحاليل غسيل الكلى في المراكز الأربعة.

المركز	عدد العينات	عدد العينات المخالفة	نسبة المحاليل المخالفة
A	18	0	0%
B	18	0	0%
C	18	0	0%
D	18	0	0%

2-5- نتائج اختبار الذيفانات الداخلية:

يبين الجدول رقم **(2)** نتائج تراكيز الذيفانات الداخلية في مراكز غسيل الكلى الأربعة **(A,B,C,D)** في ادلب وريفها وذلك خلال فترات سحب عينات مختلفة بين شهر كانون الثاني وايار لعام **2019**:

1- مجموعة العينات الأولى (أول **24** عينة)**:** كانت نتائج المحاليل بالنسبة للذيفانات الداخلية ضمن الحدود الدستورية، ماعدا ثلاث عينات كانت تراكيز الذيفانات **(0.28,0.4, 2.8) EU/ml**.

2- مجموعة العينات الثانية (ثاني **24** عينة) كانت نتائج المحاليل مطابقة للمواصفات الدستورية، ماعدا ثلاث عينات مخالفة كانت تراكيز الذيفانات الداخلية **(2.5,2.4 , 3 EU/ml)**.

3- مجموعة العينات الثالثة (ثالث **24** عينة) كانت نتائج المحاليل مطابقة للمواصفات الدستورية، ماعدا عينتين مخالفتين كانت تراكيز الذيفانات الداخلية EU/ml**(4 , 3.4)**.

تم أخذ محلول الغسيل الكلوي والذي يحوي نسبة **4 EU/ml** وحقنه ضمن حيوانات التجربة وذلك بجرعات مختلفة ومراقبة التغيرات الحيوية الحاصلة على إنزيمات الكبد.

الجدول (2) نتائج مستويات الذيفانات الداخلية في محاليل غسيل الكلى في المراكز الأربعة.

المركز	عدد العينات	عدد العينات المخالفة	نسبة المحاليل المخالفة
A	18	5	27.7%
B	18	1	5.5%
C	18	1	5.5%
D	18	1	5.5%

حيث نلاحظ من الجدول وجود 8 عينات من محاليل غسيل الكلى تحوي على تراكيز عالية من **LPS** وذلك من أصل **72** عينة أي بنسبة حوالي **11%** من المحاليل مخالفة للقيمة المسموحة عالميًا **(0.25 EU/ml)**.

2-5-1. النتائج لمستويات إنزيم ALT ضمن ساعات الحقن في جرعات مختلفة:

تم قياس التراكيز المصلية لإنزيم الكبد **ALT** خلال فترات معينة بعد **(6,12,24,48)** ساعة من الحقن

2-5-1.1. مستويات ALT المصليَّة بعد 6 ساعات من الحقن:

أظهرت النتائج وجود فرق معنوي هام بين المجموعات المختلفة في الدراسة الحالية، حيث لوحظ وجود ارتفاع معنوي بين مجموعات الدراسة بالمقارنة مع مجموعة الشاهد **NC** **(P = 0.0001)**، ولوحظ انخفاض معنوي في **ALT** في مجموعة الشاهد بالمقارنة مع المجموعات الأخرى **(P<0.05)**، لم نلاحظ فرق معنوي عند مقارنة مجموعة الجرعة **5** مع **10** وكذلك **10** مع **15** (0.05<**P**)، كما هو المخطط البياني **(1)**.

2-5-1.2. مستويات ALT المصلية بعد 12 ساعة من الحقن:

أظهرت النتائج وجود فرق معنوي هام بين المجموعات المختلفة في الدراسة الحالية، ووجد ارتفاع معنوي في مستوى **ALT** لمجموعات الدراسة مقارنة مع مجموعة الشاهد السلبي **(P = 0.0001)**، ووجد اختلاف معنوي بين مجموعات الدراسة كافة مع بعضها البعض **(P<0.05)**، كما هو مبين المخطط البياني **(2)**.

2-5-1.3. مستويات ALT بعد 24 ساعة من الحقن:

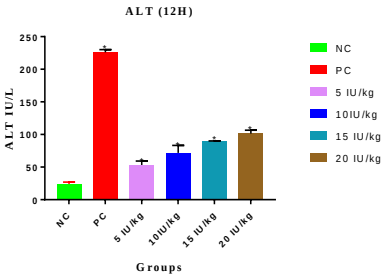
أظهرت النتائج وجود فرق معنوي هام بين المجموعات المختلفة في الدراسة الحالية، ووجد ارتفاع معنوي في مستوى **ALT** لمجموعات الدراسة مقارنة مع مجموعة الشاهد السلبي **(P = 0.0001)**، ووجد اختلاف معنوي بين

مجموعات الدراسة كافة مع بعضها البعض **(P<0.05)**، لم نلاحظ اختلاف معنوي عند مقارنة مجموعة الشاهد السلبي مع مجموعة الجرعة **10 (P>0.05)**، كما هو مبين في المخطط البياني **(3)**.

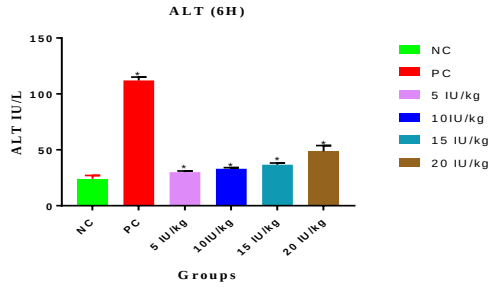
2-5-1.4. مستويات ALT بعد 48 ساعة من الحقن:

أظهرت النتائج إلى عدم وجود اختلاف معنوي هام بين مجموعات الدراسة **(P= 0.058)**، تم مقارنة المتوسطات الحسابية للمجموعات السابقة ولم يلاحظ ارتفاع معنوي في مستويات **ALT**، لوحظ وجود ارتفاع معنوي لمجموعة الشاهد الإيجابي بالمقارنة مع المجموعات **(10,5,NC) (P <0.05)**، لم نلاحظ اختلاف معنوي عند مقارنة باقي

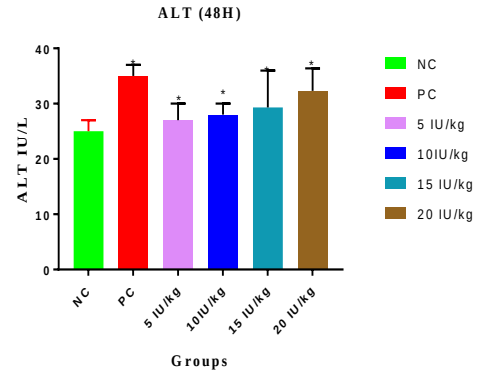
المجموعات **(P>0.05)**، كما هو مبين في المخطط البياني **(4)**.



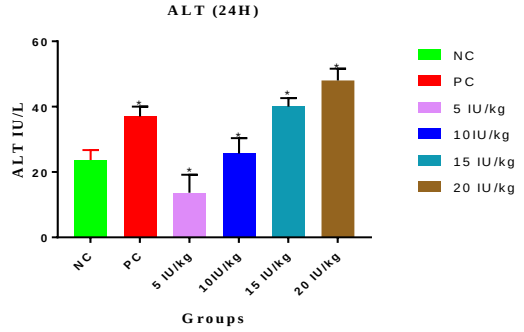
(2) تغيرات مستويات ALT عند الساعة (12) بدلالة الجرعة



(1) تغيرات مستويات ALT عند الساعة (6) بدلالة الجرعة



(4) تغيرات مستويات ALT عند الساعة (48) بدلالة الجرعة



(3)تغيرات مستويات ALT عند الساعة (24) بدلالة الجرعة

2-5-2. النتائج الإحصائية لمستويات AST ضمن ساعة معينة وفي جرعات مختلفة

تم قياس التراكيز المصلية لإنزيم الكبد **AST** خلال فترات معينة بعد **(6,12,24,48)** ساعة من الحقن.

2-5-2.1. مستويات AST المصلية بعد 6 ساعات من الحقن:

أظهرت النتائج وجود فرق معنوي هام بين المجموعات المختلفة في الدراسة الحالية، ووجد ارتفاع معنوي في مستوى **AST** لمجموعات الدراسة مقارنة مع مجموعة

الشـاهد السـلبي **(P = 0.0001)**، ووجد اختلاف معنوي بين عدد من مجموعات الدراسـة مع بعضـــها البعض **(P<0.05)**، ولم نلاحظ اختلاف ذو دلالة إحصـــائية عند مقارنة مجموعة ال **5** مع **10** وكذلك **10** مع **15** وكذلك **15** مع **20(P>0.05)**، كما هو مبين في المخطط البياني **(5)**

2-5-2.2. مستويات AST بعد 12 ساعة من الحقن:

أظهرت النتائج وجود فرق معنوي هام بين المجموعات المختلفة في الدراســـة الحالية، ووجد ارتفاع معنوي في مسـتوى **AST** لمجموعات الدراسـة مقارنة مع مجموعة الشـاهد السـلبي **(P = 0.0001)**، ووجد اختلاف معنوي بين عدد من مجموعات الدراسـة مع بعضـها البعض **(P<0.05)**، لم نلاحظ اختلاف معنوي عند مقارنة مجموعة ال **5** مع **10** وكذلك **10** مع **15 (P>0.05)**، كما هو مبين في البياني **(6)**

2-5-2.3. مستويات AST المصلية بعد 24 ساعة من الحقن:

أظهرت النتائج وجود فرق معنوي هام بين المجموعات المختلفة في الدراسة الحالية، ووجد ارتفاع معنوي في مستوى **AST** لمجموعات الدراسة مقارنة مع مجموعة الشاهد السلبي **(P = 0.0001)**، ووجد اختلاف معنوي بين مجموعات الدراسة كافة مع بعضها البعض **(P<0.05)**، كما هو مبين في المخطط البياني **(7)**.

2-5-2.4. مستويات AST بعد 48 ساعات من الحقن:

أظهرت النتائج وجود فرق معنوي هام بين المجموعات المختلفة في الدراسة الحالية، حيث لوحظ وجود ارتفاع معنوي بين مجموعات الدراســـة بالمقارنة مع مجموعة الشـــاهد NC **(P = 0.0001)**، ولوحظ انخفاض معنوي في **AST** في مجموعة الشـــاهد بالمقارنة مع المجموعات الأخرى **(P<0.05)**، لم نلاحظ فرق معنوي عند مقارنة

مجموعة الجرعة **10** مع **15** وكذلك **10** مع **20** وكذلك **PC** مع **5 (P>**0.05**)**، كما هو مبين في المخطط البياني رقم **(8)**.

3- المناقشة Discussion

إنَّ غسيل الكلى هو الخيار المفضَّل لدى مرضى الفشل الكلوي، وذلك لتعويض النقص في وظائف الكلى، حيث يتمُّ التخلص من البولة والكرياتينين والسوائل الزائدة والفضلات، وذلك عن طريق تمرير دم المريض المصاب بالفشل الكلوي المزمن عبر وصلة شريانيّة وريديّة ووصلها مع جهاز غسيل الكلى، في جهاز غسيل الكلى تتم عملية التصفية وإزالة الفضلات والسموم من الدم عبر وحدة وظيفية يشبه عملها عمل الكليون في الكلية الطبيعية وتسمى هذه الوحدة بالمديال، وتتمُّ ضمن هذا المديال عملية التصفية وفق عدّة آليَّات فيزيائية أهمّها الانتشار. [7]

عندما تكون شروط الغسيل مثالية ومحلول الغسيل مطابق للشروط الدستورية من حيث المحتوى الكيميائي والجرثومي، تحصل عملية الدَّيال بالشكل الصحيح ويكون الدم العائد عبر الوصلة الوريدية منقى من الفضلات وملائم لحياة للمريض، لكن وجد في بعض مراكز الغسيل وأثناء جلسات الغسيل أن هناك بعض الأعراض السريريَّة ظهرت لدى مرضى الغسيل، وكان أهم تلك الأعراض ارتفاع درجات الحرارة وحصول صدمات تسمَّى بالصدمة الانتانيَّة، وقد عزي سبب تلك الأعراض إلى تغير في صفات المياه الداخلة في تركيب محلول الغسيل، وخصوصًا من حيث المحتوى الجرثومي من الذيفانات الداخلية.[8]

إنَّ المياه المستخدمة في جلسات غسيل الكلى يجب أن تكون عقيمة، لكن في أغلب محطات التنقية تكون محطة غسيل الكلى عرضةً لتشكل ما يسمى الغشاء الحيوي **biofilm**، وهو عبارة عن غشاء رقيق من الجراثيم والتي تلتصق بجدران أنابيب محطة التنقية، ويمكن أن يكون مصدر هذا الغشاء الحيوي جرثومة واحدة تكيفت مع البيئة فقيرة التغذية والغنية بالمياه وعادة ما تكون جراثيم سلبية الغرام، هذا الغشاء الحيوي يمكن أن يكون مصدراً لتسرب **Leaking** الذيفانات الداخلية والسيتوكينات، التي تعبر المديال وتسبب استجابة التهابية وارتفاع حرارة.[9]

أظهرت الدراسة الحالية أنَّ المياه المستخدمة في غسيل الكلى كانت عقيمة، حيث لم تظهر عكارة في المستنبتات المغذية المستخدمَة، وهذا دليل على عدم وجود نمو جرثومي في هذه المياه، لكن اختبار **LAL** أثبت وجود مستويات غير طبيعية للذيفانات الداخلية، ويعتقد أنها كانت سبباً لظهور أعراض سريرية لدى بعض المرضى في أحد مراكز الغسيل.

إنَّ مُولّدات الحُمَّى مصدر خطر لمحاليل غسيل الكلى والمستحضرات الصيدلانية الحقنية لأنَّها تكون على تماس مع دم الإنسان، وأكثر مُولّدات الحُمَّى خطورة هو الذِّيفَان الدَّاخلي الجرثومي.**[4]**

لوحظ في الدّراسة الحاليَّة ارتفاع في مستويات الذيفانات الداخليّة في بعض مراكز غسيل الكلى في إدلب وريفها، وتعزى هذه المستويات في محطات التنقية إلى ما يسمَّى بالغشاء الحيوي **Biofilm**.

أجريت دراسة سابقة لتقييم التلوث الجرثومي والتحقق من مستويات الذيفانات الداخلية في محطتين**(A,B)** لمياه غسيل الكلى، حيث أخذت 96 قطعة بطول **5cm** من أنابيب التوصيل للمحطات وبشروط عقيمة، وأجري لها الزرع الجرثومي

واختبار **LAL**، لوحظ بعد **9** أسابيع أن الزرع الجرثومي لأنابيب المحطة **A** كان إيجابي بنسبة **16%** بينما كانت النسبة **3%** في عينات المحطة **B**، وهذا توافق مع مستويات إيجابية (**Positive LAL**) للذيفانات الداخلية في **76%**من عينات

المحطة **A**، ومستويات سلبية (**Negative LAL**) في كافة العينات المسحوبة من المحطة **B**، وهذا يفسر العلاقة بين تشكل الغشاء الحيوي وارتفاع نسبة الذيفانات الداخلية في محاليل الغسيل.**[10]**

ويعتقد أنَّ النسب العالية للذيفانات الداخلية في محطات الغسيل الكلوي، كانت سبباً في ظهور الأعراض السريرية و التأثيرات الحيوية التي حصلت لدى مرضى الغسيل، أظهرت

الدِّراســـات السَّـــابقة والتي أجري أحدها في الجمعية اليابانية لغســـيل الكلى **The Japanese Society for Dialysis Therapy (JSDT)**، والتي أجريــت على **130871** مريض من المرضـى الذين يستخدمون تقنية غسيل الكلى، وتمَّ تقسيم المرضـى إلى عدة مجموعات في عدة مراكز في اليابان كالتالي: (مجموعة تتعرض إلى مستوى من الذِّيفانات الداخلية يتراوح **(0.001– 0.0001 EU/ml)** ومجموعة تتعرض الى مسـتوى يتراوح بين**(0.01–0.001EU/ml)** ومجموعة تتعرض لمسـتويات تتراوح بين **(EU/ml 0.05–0.01)** ومجموعــة تتعرض لمســـتويــات تتراوح بين **(0.1–0.05 EU/ml)** ومجموعة تتعرض لمسـتويات أكبر من **(0.1 EU/ml)**، وُجِدَ بعد عام من الدراسـة حتى نهاية عام 2006 أن المرضـــى الذين يتعرضــون لمسـتويات من الذِّيفانات الداخلية أكبر من **0.1 EU/ml** زاد عندهم خطر الوفاة بنسبة **28%** أكثر من المرضى الذين يتعرضون لمستويات أقل من **0.001 EU/ml**.[11]

لوحظ في الدّراســة الحاليّة ارتفاع معنوي في مســتويات إنزيم **ALT** في الفترة الأولى بعد **6** ســاعات من الحقن، وفي الفترة الثانية **بعد12** ســاعة من الحقن، وذلك في جميع الجرعات المحقونة **(PC،5،10،15،20)**، مما يدلّ على حصـــول أذيَّة كبديَّة وتموت للخلايا الكبدية، ولكن لوحظ عودة انخفاض في هذه المسـتويات في الفترة الثالثة، وعودتها إلى المســتوى الطبيعي **(up to 40 IU/L)** بعد **48** ســاعة من الحقن، أي أن الخلايا الكبدية حصــل لها تكاثر، وعادت إلى الحالة الطبيعية، لذا عادت مســتويات **ALT** إلى الحد الطبيعي، ولم تحصــل أي زيادة لمســتويات **ALT** أثناء حقن **NC** لأنه خالي من مولدات الحرارة.

يشــير ارتفاع إنزيمات الكبد غالبا إلى تعرض الكبد للضــرر، وهذا الضــرر يؤدي إلى ارتفاع أو انخفاض في مستويات الإنزيمات الكبدية ومن أهمها إنزيم **ALT** النوعي للكبد، وإنزيم **AST** المتواجد في الكبد والعضــلات، ويعتبر **ALT** من إنزيمات الكبد التي تدخل في استقلاب الحمض الأميني الألانين، ويوجد بشكل رئيسي في خلايا الكبد ويوجد بشكل ضـئيل جداً يكاد يكون مهمل في خلايا أخرى بالجسم، ويرتفع إنزيم **ALT** عند الإصـابة

بالتهاب الكبد الوبائي، وتناول الكحول، وبعض العقاقير، وأثناء السمنة، والإصابة ببعض الأمراض الوراثية، وإنتان الدم Sepsis، وذلك نتيجة افراغ الخلايا لمحتواها من هذا الإنزيم.[12]

للكبد قدرة قوية على التجدد **regeneration**على الرغم من بطء معدل تجدد الخلايا، لكنه عندما يتم استئصال جزء من الكبد أو عند تأذي خلايا الكبد أو موتها بسبب عامل ما (مثل الذيفانات الداخلية في بحثنا) فإن الخلايا السليمة تبدي مرونة وقدرة تمايزية كبيرة تحت تأثير عوامل النمو **growth factor production** وبعض عوامل التي تساعد على انقسام الخلايا **mitogens**، هذه الخلايا تبدأ بالتكاثر لتعويض النقص في الخلايا الميتة إلى أن يصل إلى حد طبيعي يتوقف فيه هذا التكاثر **proliferation**. [13]

يكون النسيج الكبدي المتجدد منتظماً وعلى شكل فصوص منتظمة، ويقوم بوظائف النسيج الكبدي التالف، وهذه القدرة على التجدد أعطت أهميةً كبيرةً لإمكانية التبرع بفص كبدي واحد عن طريق الجراحة الزرعية. [13]

في الدراسة الحالية ارتفعت مستويات **AST** بعد **6** ساعات من حقن الجرعات المختلفة:

(PC ،5،10،15،20)EU/ml واستمر ارتفاع المستويات بعد **12** ساعة، لكن انخفضت مستوياته بعد **24** ساعة واستمر الانخفاض بعد **48** ساعة من الحقن، لكن هذه المستويات لم تعد إلى القيمة الطبيعية:

(up to 38 IU/L)، وذلك بسبب الأذية القلبية الحاصلة أثناء سحب الدم (تم سحب عينات الدم من عضلة القلب مباشرة)، لم تحصل أي زيادة لمستويات **AST** أثناء حقن **NC** لأنه خالي من مولدات الحرارة.

بالإضافة لكون **AST** أحد إنزيمات الكبد لكنه يوجد في أماكن أخرى مثل العضلات ومن ضمنها عضلة القلب ويوجد في كريات الدم الحمراء وفى الكلية وغيرها، لذلك يعتبر

إنزيم **ALT** متخصص أكثر للكبد عن أنزيم الـــ **AST** نظراً لوجود ، **AST** في خلايا أخرى بالجسم غير خلايا الكبد، لذلك في حالة وجود ارتفاع في أنزيم الـــ **AST** وأنزيم **ALT**طبيعي فهذا يعنى أنَّ خلايا الكبد سـليمة ولكن يوجد خلايا أخرى بالجسـم تتخرب وتخرج محتواها من إنزيم **AST** في الدم مثل حالات الذبحة الصـــدرية – أمراض الكلى الحالة – تكسر الدم الانحلالي – ضمور العضلات – الكدمات والحوادث. **[12]**

توافقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة أجريت في جامعة حلوان في مصر على ثلاث مجموعـات من الفئران، والتي حُقِنـت بتراكيز **(1 mg/kg body weight, IP)** في محلول ملحي معـادل للتوتر **0.9 %** من الـذيفـان الـداخلي لثلاث أنواع من الـذيفـانـات الداخلية، ومجموعة شاهد سلبي تم حقنها بالمحلول الملحي **0.9%**، وتم مراقبة المستويات المصـــلية لإنزيمات **(ALT,AST,LDH)** الكبديّة، وســـكر الدم **Glucose** واختبار نيتروجين اليوريا في الدم **BUN**، تم سحب عينات المصل وقياسها بعد فترات **24** ساعة و **72** ساعة من الحقن، حيث لوحظ ارتفاع معنوي وفي التراكيز المصلية لإنزيمات الكبد، وفي مســتوى ســكر الدم و مســتوى **BUN** بعد فترات الاعطاء، ولم تلاحظ أي تغيرات معنوية في مجموعة الشاهد السلبي(المحلول الملحي)، حيث يفسر زيادة مستوى الإنزيمات الكبدية المصـلية إلى تخرب في الخلايا الكبدية بسـبب الذيفانات الداخلية، وبالتالي تسـرب الإنزيمات الكبدية إلى المصل، وارتفاع مستوياتها.**[14]**

أجريت دراســة ســابقة لقياس العديد من التغيرات الحيوية على مرضــى الغسـيل الكلوي **hemodialysis (HD)** والمرضـــى مـا بعـد زرع الكلى **after kidney transplantation (KT)**، حيث لوحظ ارتفاع في مســـتويات الذيفانـات الداخلية لمرضـى الغسيل الكلوي وزرع الكلى مقارنة مع الأشـخاص الطبيعيين **controls**، ولوحظ ارتفاع في مستوى

البروتينات الرابطة للذيفانات **lipopolysaccharide binding protein (LBP)**، ولوحظ ارتفاع في معدل اللمفاويات والعدلات لدى المرضـــى مقارنة مع الشـــاهد، ولوحظ ارتفاع في السيتوكينات واختلاف في مستقبلاتها:

(sIL6 R), IL8, IL10 (TNF)α, TNFR1, (IL)6, sIL6-receptor TNFR2 ، ولوحظ زيادة معنوية في مؤشرات

الاجهاد التأكسدي **Oxidative stress** المتمثلة بمنتجات اكسده البروتين المتقدمة **(AOPPs)**, البلعمة بواسطة العدلات انخفض بشكل ملحوظ لدى مرضى غسيل الكلى.**[15]**

تم دراسة تأثير **LPS** على الخلايا النجمية الكبدية **HSC** في المختبر **In vitro** ، حيث تم عزل خلايا نجمية كبدية بشرية **Human HSC** وأضيف لهذه الخلايا تركيز **(10 µg/ml)** من عياري **LPS**، وتم دراسة التأثيرات الناجمة عن الـ **LPS** ولوحظ ما يلي: **[16]**

تأثيرات سمية للذِّيفان الداخلي على الخلايا النجمية حيث ارتفع مستوى **LDH** بنسبة عالية مما يدل على تسرب هذا الإنزيم نتيجة تخرب في الخلايا الكبدية، وتأثيرات الذيفان على مستويات العوامل الداعمة للالتهاب **pro-inflammatory factors** في الخلايا النجمية البشرية، حيث لوحظ ارتفاع العوامل الداعمة للالتهاب **(IL-8,MCP-1,ICAM-1,Rantes)** بشكل واضح بعد **16** ساعة من إضافة LPS، وتأثيرات الذيفان على مستويات العوامل الداعمة للتليف factor **pro-fibrogenic** في الخلايا النجمية البشرية، حيث لوحظ ارتفاع العوامل الداعمة للتليف **(Coll-1,TGFβ-1,MMP-1,TIMP-1,MMP-2)** بشكل واضح بعد **16** ساعة من إضافة **LPS**، ودراسة تأثير **LPS** على البنية النسيجية للكبد، حيث تم أخذ مقاطع نسيجية للخلايا الكبدية ولوحظ تجمعات للخلايا المناعية بعد إعطاء **LPS** مما يدل على حدوث الالتهاب، ولوحظ موت لبعض الخلايا الكبدية **apoptosis** نتيجة التعرض للذيفانات.

في دراسة سابقة أجريت على **61** مريض يستخدمون تقنية غسيل الكلى **PHD** حيث تم قياس فعالية الذيفانات الداخلية **endotoxin activity (EA)** وذلك عن طريق اختبار مُقَايَسَةُ المُمْتَزِّ المَناعِيّ المُرْتَبِطِ بالإنْزِيْم **ELISA**، وتم قياس مستويات الانترلوكين **6 levels (IL-6)**، حيث لوحظ من خلال الدراسة الإحصائية أن نسبة

عالية من مرضى الغسيل الكلوي الذين يتعرضون لمستويات عالية من **LPS** ، وبالتالي فعالية عالية **EA** ، كان لديهم مستويات عالية من الانترلوكين **6 (IL-6)**.[**17**] تحدث عملية الموت المبرمج **apoptosis** للخلايا الكبدية نتيجة التعرض للذيفانات الداخلية، وذلك بسبب الآلية المناعية الالتهابية التي ذكرت سابقًا، حيث أن شلال الإشارة الذي ينتهي بإفراز السيتوكينات ومن ثم البروستاغلاندينات، والتي تعبتر دليل حدوث الالتهاب، يسبب موت الخلايا الكبدية وبالتالي زيادة مستويات الخمائر الكبدية، وهذا يتوافق مع دراسة سابقة أجريت على **11** مريض يعانون من المتلازمة الكلوية الوعائية، **Cardiorenal Syndrome Type 5 (CRS Type 5)** حيث تم قياس فعالية الذيفانات الداخلية **Endotoxin Activity Assay (EAA)** عن طريق معايرتها بال **ELISA**، وتم قياس تموت الخلايا عن طريق تحضين بلازما الدم لمرضى **CRS** بأنابيب خاصة **renal tubular cells (RTCs)**، وجد في نهاية الدراسة بأن المرضى الذين يمتلكون فعالية **LPS** موجبة **positive EAA** زادت لديهم موت الخلايا المبرمج **apoptosis** مقارنة مع المرضى الذين يمتلكون فعالية سالبة للذيفانات **negative EAA** ، ولوحظ أيضا ان مستويات السيتوكينات **(IL-6 and IFN-γ levels)** للمرضى الايجابيين زادت مقارنة مع المرضى السلبيين للذيفانات، وهذا يدل على أن حدوث الالتهاب والرد المناعي عند مرضى متلازمة **CRS** يعود الى المستويات العالية للذيفانات الداخلية.[**18**]

4- References

[1] C. Morath, M. Zeier, B. Döhler, G. Opelz, and C. Süsal, "ABO-incompatible kidney transplantation," *Front. Immunol.*, vol. 8**, p. 234**, **2017**.

[2] I. Masakane *et al.*, "An overview of regular dialysis treatment in Japan (as of **31** December **2013**)," *Ther. Apher. Dial.*, vol. **19**, no. **6**, pp. **540**–**574**, **2015**.

[3] Hoenich, Nicholas, Ward, Richard A, "Maintaining water quality for hemodialysis." **2015**.

[4] E. Lin and S. Lowry, "The Human Response to Endotoxin," *Sepsis*, vol. **2**, no. **3**, pp. **255**–**262**, **1998**.

[5] X. Wang and P. J. Quinn, *Endotoxins: structure, function and recognition*, vol. **53**. Springer Science & Business Media, **2010**.

[6] N. Cary Engleberg, "Mechanisms of Microbial Disease," **p. 535**, **2015**.

[7] N. S. W. Agency, *Water for dialysis A guide for in-centre , satellite and home haemodialysis in NSW*. **2016**.

[8] V. P. Sampath, "Bacterial endotoxin-lipopolysaccharide; structure, function and its role in immunity in vertebrates and invertebrates," *Agric. Nat. Resour.*, vol. **52**, no. **2,** pp. **115**–**120**, **2018**.

[9] K. Marion-Ferey, J. G. Leid, G. Bouvier, M. Pasmore, G. Husson, and R. Vilagines, "Endotoxin level measurement in hemodialysis biofilm using 'the whole blood assay,'" *Artif. Organs*, vol. **29**, no. **6**, pp. **475**–**481**, **2005**.

[10] S. Schindler, S. Von Aulock, M. Daneshian, and T. Hartung, *Development, validation and applications of the monocyte activation test for pyrogens based on human whole blood*, vol. **26**, no. **4**. **2009**.

[11] T. Hasegawa *et al.*, "Dialysis fluid endotoxin level and mortality in maintenance hemodialysis: A nationwide cohort study," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. **65**, no. **6**, **pp**. **899**–**904**, **2015**.

[12] Voet, Donald,Voet, Judith G,Pratt, Charlotte W, *Fundamentals of Biochemistry*, no. **32**. **2013**.

[13] N. Fausto, J. S. Campbell, and K. J. Riehle, “Liver regeneration,” *Hepatology*, vol. **43**, no. S1, pp. **S45**–**S53**, **2006**.

[14] R. A. El Garawany, O. A. Al Sagair, E. S. El Daly, K. A. El Shaikh, M. H. El Gebaly, and A. A. Mousa, “Effects of bacterial endotoxin on some metabolites and enzymes in rat serum,” *Med. J. Islam. World Acad. Sci.*, vol. **15**, no. **2,** pp. **65**–**72**, **2005**.

[15] S. Lemesch *et al.*, “Mode of renal replacement therapy determines endotoxemia and neutrophil dysfunction in chronic kidney disease,” *Sci. Rep.*, vol. **6**, **p**. **34534**, **2016**.

[16] A. Mahli *et al.*, “Iso-alpha acids from hops (Humulus lupulus) inhibit hepatic steatosis,

inflammation, and fibrosis,” *Lab. Investig.*, **p. 1**, **2018**.

[17] M. Bossola *et al.*, “Serum endotoxin activity measured with endotoxin activity assay is associated with serum interleukin-6 levels in patients on chronic hemodialysis,” *Blood Purif.*, vol. **42**, no. **4**, pp. **294**–**300**, **2016**.

[18] G. M. Virzì, A. Clementi, A. Brocca, M. de Cal, S. Marcante, and C. Ronco, “Cardiorenal syndrome type 5 in sepsis: role of endotoxin in cell death pathways and inflammation,” *Kidney Blood Press. Res.*, vol. **41**, no. **6**, pp. **1008**–**1015**, **2016**.