Al-Kufa University Journal for Biology / VOL.9 / NO.1 / Year: 2017
Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544

دراسة العلاقة بين سم الاوكراتوكسين A ومرض الفشل الكلوي

أ.د. سامي عبد الرضا — كلية العلوم الطبية والتطبيقية / جامعة كربلاء

د. حيدر محمد العطار — مركز الصحة والسلامة المهنية / صحة كربلاء

د. بسعاد عبد زيد — كلية العلوم / جامعة الكوفة

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة الى التحري عن مستويات سم Ochratoxin A في عينات دم مرضى الفشل الكلوي في محافظة كربلاء ومقارنتها مع مستويات في مع عينات الدم لاشخاص لا يعانون من هذا المرض وامكانية ايجاد رابط بين التعرض للسم Ochratoxin A والاصابة بمرض الفشل الكلوي .

اظهرت نتائج التحليل الكيميائي لعينات من الدم والمأخوذة من76 شخص مصابون بالفشل الكلوي وجود سم OTA في 11 عينة (14.4%) وبمستويات عالية تراوحت بين (6-0.2) مايكروغرام/مل دم في حين لم يتم الكشف عن هذا السم في عينات دم افراد مجموعة المقارنة والبالغ عددهم 90 شخص الا في عينة واحدة (انثى) فقط وبفارق احصائي (معنوي) كبير يبين هاتين المجموعتين فضلا عن وجود علاقة ارتباط موجبة (+r)يبين وجود سم OTA والاصابة بالفشل الكلوي .واوضحت النتائج ايضا ان النساء المصابات بمرض الفشل الكلوي اكثر حساسية من الرجال للسم OTA اذ اثبتت النسبة المئوية للنساء الحاملات للسم 50% من جانب اخر اشارت النتائج الى ان الفئة العمرية (51-70) سنة هي الاكثر تعرضا للسم OTA اذ بينت النسبة المئوية للنساء المعرضة للسم 60% اثبتت النتائج ان السم OTA له دورا في حدوث الاصابة بمرض الفشل الكلوي .

المقدمة :

سم OTA هو مركب بلوري عديم اللون ينتج في الاغذية والاعلاف الحيوانية من قبل عدد من الفطريات التابعة للجنس Aspergillus و Penicillium كفطريات P.mellus, P.verdicatum , A.citricus , A.ochraceus وغيرها من الانواع الفطرية [5] .

يعمل سم OTA على تدمير انسجة الكليتين واصطباغها باللون الاسمر فضلا عن زيادة الاسهال ذو اللون الابيض الحاوي على املاح اليوريا مع زيادة حساسية المريض للإصابة بالأمراض الفايروسية اذ يسبب OTA الفشل الكلوي (renal failure) كما انه يؤثر على تمثيل الكاربوهيدرات في الجسم فضلا عن قدرته على تثبيط فعالية اغشية المايتوكوندريا , وغالبا ما يسبب هذا السم التهابات مزمنة تؤدي الى ضمور الكلى وانكماشها ومن ثم حدوث الفشل الكلوي وتأثير هذا السم يكون اشد تأثيرا على الاناث من الذكور .[2]

يعد سم OTA المسبب الرئيسي لمرض الاعتلال الكلوي المستوطن في منطقة البلقان والذي يطلق عليه (Belkan Endemic Nephropathy (BEN)) اذ يتسبب في احداث تحلل النبيبات الكلوية وتليف الكلية وينتج عن هذا المرض ارتفاع نسبة البروتين في اليوريا وفقر الدم وانخفاض الوزن كما وجدت علاقة بين مرض BEN ومرض اورام الجهاز البولي[4] وجد [3] ان سم (OTA) في دم الانسان والحيوان يعد تناول الغذاء او العليقة الملوثة بالسم بالنسبة للحيوانات في كل من فرنسا وكندا والدول الاسكندنافية والمانيا واليابان وجنوب افريقيا فضلا عن دول البلقان ,وقد وضعت المنظمة الدولية لأبحاث السرطان التابعة لمنظمة الصحة العالمية [6] مؤخرا سم OTA تحت الصنف 2B والمعروف ان المركبات التي توضع ضمن هذا الصنف هي مركبات ذات فعالية مرضية للإنسان .

وبالنظر لوجود حالات من الفشل الكلوي في العراق مجهولة الاسباب وارتئينا في هذه الدراسة التحري عن مستويات سم OTAفي عينات الدم لأفراد المجتمع الكربلائي الاصحاء او الذين يعانون من مرض الفشل الكلوي وامكانية الربط بين تواجد السم في دمائهم ومرض الفشل الكلوي .

المواد وطرائق العمل

1- جمع عينات الدم من المصابين بالفشل الكلوي .تم جمع 76 عينة من المرضى الذين يعانون من الفشل الكلوي والذين يراجعون مستشفى الحسين في كربلاء وذلك بأخذ 2 مل من الدم من كل فرد ووضعها في انابيب خاصة (خالية من مادة مانع

التخثر) تسمى JEL TUBES كما تم جمع 90 عينة من الافراد الذين يراجعون الاستشاريات في مستشفى الحسين الطبية (كمعاملة مقارنة).

2- استخلاص سم OTA من مصل الدم

أ- وضعت الانابيب الحاوية على الدم في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 6000 دورة /دقيقة لغرض فصل مصل الدم والتخلص من متبقيات الدم الاخرى .

ب- اخذت عينات المصل واضيفت لكل عينة منها قطرة واحدة من محلول Proteinase K والذي تم الحصول عليه من شركة BioBasic الكندية وذلك بعد اذابته بـ 2 مل من الماء المقطر المعقم .بعد اضافة الانزيم وضعت الانابيب الحاوية على المصل والانزيم في حمام مائي بدرجة حرارية 35 م° لمدة 10 دقائق ,بعدها تم تعريض المزيج للطرد المركزي وبسرعة 8000 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق بعدها اخذ الراشح وترك الراسب .

ج- اضيف للراشح ضعف حجمه من مادة الكلوروفورم ورج جيدا اذ تكونت طبقتان طبقة الكلوروفورم وطبقة المصل سحبت طبقة الكلوروفورم بواسطة شريحة تطبيقية ومعقمة ووضعت في انبوبة صغيرة نظيفة ومعقمة .

3- الكشف عن سم Ochratoxin A

استخدمت تقنية صفائح الكروموتوغرافيا الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC) في الكشف عن السم في المصل .اذ تم الحصول على الصفائح الكروموتوكرافيا الرقيقة من شركة Chmlab الاسبانية بأبعاد 20×20 مطلية بطبقة من السليكا . نشطت الصفائح بوضعها في فرن كهربائي بدرجة حرارة 150 م° لمدة ساعة واحدة .بعدها استخرجت وتركت لتبرد بعدها تم عمل خط مستقيم (خفيف) على طبقة TLC وعلى بعد 1.5 سم من الحافة السفلية للصفيحة ثم وضع 15 مايكروليتر من السم القياسي OTA بهيئة بقع بواسطة انبوبة شعرية Capillary tube على الخط من الجهة اليسرى وتم وضع نفس الكمية من مستخلص مصل كل عينة على يمين السم القياسي وبمسافة 1.5 سم بين عينة واخرى بعدها تركت البقع لتجف ثم وضعت الصفائح في وعاء الفصل الحاوي على نظام المكون من الميثانول + ماء مقطر وبنسبة (1:9) وتركت حتى وصول الطور المتحرك الى مسافة تقارب 1.5 سم من النهاية العليا للصفائح . اخرجت الصفائح ثم فحصت تحت الاشعة فوق البنفسجية وعند طول موجي 340 نانوميتر وتم الكشف عن وجود Ochratoxin A بمطابقة موقع ولون التألق لمستخلصات المصل موضع الدراسة مع موقع ولون السم القياسي لسم Ochratoxin A [7] .

النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج تحليل الدم باستخدام تقنية صفائح الكروموتوكرافيا الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC) للأشخاص المصابين بالفشل الكلوي وجود سم Ochratoxin A في دم 11 فرد (14.4%) من بين 76 فرد خضعوا لهذا الاختبار في حين تم الكشف عن السم في دم شخص واحد فقط (1.1%) من افراد مجموعة المقارنة (غير مصابين بالفشل الكلوي)(جدول 1) والفارق بين المجموعتين (المصابون بالفشل والمقارنة)كان معنويا عند مستوى $P \leq 0.05$ (X^2 = 142.2) وتفاوتت كميات السم في دم الافراد المصابون بالفشل الكلوي اذ بينت النتائج ان اعلى مستوياته كانت في دم المريض الحامل للرقم P25 وبكمية 6 مايكروغرام /مل في حين كانت اقل مستوى للسم في دم المريض الحامل للرقم P46 وP66(0.2) مايكروغرام /مل اما كمية سم OTA في دم الفرد (انثى) العائد لمجموعة السيطرة فكانت 0.87 مايكروغرام/مل (جدول 2) .

واوضحت النتائج ان عدد الاناث الحاملة لسم OTA والمصابات بالفشل الكلوي اكبر من الذكور اذ بلغ العدد 6 اناث في حين كان عدد الذكور 5 اما في حالة المقارنة فكان (غير مصابة بالفشل الكلوي)عدد الاناث الحاملة للسم في دمائهن هي واحدة في حين لم يكشف عن السم في دماء الذكور (جدول 3). نتائج هذه الدراسة تؤكد على وجود علاقة بين وجود سمOTA في الدم والاصابة بمرض الفشل الكلوي وما يعضد هذا الاعتقاد هو ان معامل الارتباط كان موجبا (r+) وهذا يعني من الناحية الاحصائية ان لسم OTA دورا في احداث مرض الفشل الكلوي وهذا يتفق مع بعض الدراسات التي اشارت الى كون سم OTA يعد المسبب الرئيسي لمرض الاعتلال الكلوي المستوطن في دول البلقان والذي يطلق عليه مرض BEN [3] .كما ان نتائج هذه الدراسة تتماشى مع ما ذكره كل من [2] من ان سم OTA يسبب التهابات بالكلية وفي حال التعرض له يؤدي الى الفشل الكلوي .

من جانب اخر اوضحت نتائج هذه الدراسة ان الاناث اكثر حساسية من الذكور وهذا يتفق مع بعض الدراسات التي اشارت لذلك (Belicza ,krdgh .1987) , من جانب اخر بينت هذه الدراسة ان الاعمار المتأخرة هي الاكثر تأثيرا بسم OTA مقارنة ببقية الاعمار اذ بلغت نسبة المصابين بالفشل الكلوي والملوثة دمائهم بالسم من الفئة العمرية المحصورة بين (61-70) سنة 60%في حين كانت النسبة للفئتين (5-25) سنة و(26-50) سنة 20% لكليهما ولا يمكن مقارنة نتائج هذه الفقرة (الفئة العمرية وتأثيرها على حساسية الافراد للسم) لعدم توفر دراسات محلية او عالمية مماثلة بحسب المصادر المتوفرة ,مع ذلك يمكن القول ان الاعمار المتأخرة يصاحبها ضعف الجهاز المناعي وهذا يؤدي الى عدم امكانية معادلة سمية OTA وبالتالي يكون تأثيره اشد على هذه الفئة العمرية من بقية الفئات العمرية الاخرى فضلا عن كون سم OTA يؤثر سلبا على فعالية الجهاز المناعي اذ يقلل من مستويات كل من IgG و IgMو IgA في الانسجة والمصل [1] .

جدول (1): عدد ونسبة الافراد المصابين والغير مصابين بالفشل الكلوي والملوثة دمائهم بالسم OTA .

ت	حالة الافراد	العدد الكلي	عدد الافراد الملوثة دمائهم بالسم OTA	عدد الافراد الملوثة دمائهم بالسم OTA (%)
1	مصابون بالفشل الكلوي	76	11	14.4
2	غير مصابون بالفشل الكلوي (مقارنة)	90	1	1.1

X^2 =142.2

جدول (2):مستويات سم Ochratoxin A في دماء الافراد (الذكور , الاناث)المصابون وغير المصابون بالفشل الكلوي.

رقم الفئة	الجنس	كمية OTA(مايكروغرام /مل)
P 4	ذكر	0.21
P 8	ذكر	1.62
P 25	ذكر	6
P22	انثى	1.3
P38	انثى	1.87
P44	ذكر	2.5
P48	ذكر	0.37
P69	انثى	3.12
P71	انثى	2.87
CO.	انثى	0.87
P46	انثى	0.2
P66	انثى	0.2

P = مصابون بالفشل الكلوي. CO = غير مصابون بالفشل الكلوي (السيطرة)

Al-Kufa University Journal for Biology / VOL.9 / NO.1 / Year: 2017
Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544

جدول (3): عدد ونسب الافراد المصابون وغير المصابون بالفشل الكلوي والملوثة دمائهم بالسم OTA بحسب الجنس

ت	حالة الافراد	الجنس	عدد الافراد الملوثة دمائهم بالسم OTA	نسبة الافراد الملوثة دمائهم بالسم OTA (%)
1	مصابون بالفشل الكلوي	ذكر	5	41.66
		انثى	6	50.00
2	غير مصابون بالفشل الكلوي	ذكر	0	0
		انثى	1	8.33

$0.001= X^2$

جدول (4):عدد ونسب الافراد المصابون وغير المصابون بالفشل الكلوي والملوثة دمائهم بسم OTA بحسب الفئات العمرية .

الفئة العمرية	العدد	نسبة الاصابة (%)
25-5	2	20
50 -26	2	20
70-51	6	60

المصادر:

1- الجميلي , سامي عبد الرضا (2014) السموم الفطرية , دار الكتب – العراق صفحة 423 .

2- Barkai –Golan ,R. and paster , N.(2008) mycotoxin in fruits and vegetable , Academic is an imprint of Elsevier , pp 395 .

3- Belmadani ,A,Tramu , G.,Betbeder ,A.M. and Creppy .E.E.(1998) .Subchromic effect of Ochratoxin A on young adult rat brain and partial prevention by Aspartame , asweetener.Human and Experim .Toxicol .17:380-386.

4- Castegnaro ,M. and Chernozemsky,I.N.(1987) .Endemic Nephropathy and Urinary tract tumor in the Balkans .Cancer Res 47:3608.

5- Marquardt ,R.R. and Frohlich .A.A.(1992) .Are view of recent advances in understanding Ochratoxicosis .J.Anim .Sci. 70:3968-3988.

6- WHO, World Health organization .(1990).Food Additive series study of relationship between Ochratoxin A and renal failure disease .

Abstract

This study aimed to investigated levels Ochratoxin A in blood of renal failure patients in Karbala province and comparative with these level in blood of control(persons not infection)as well as ability to existence of correlation between Ochratoxin A and renal failure disease .Result of chemical analysis of blood samples which taken from 76 patients infected with renal failure

disease appearance being OTA in 11 (14.4%) sample with high levels (0.2 -6 mg / ml) while there is not detection of OTA in blood of control group (90 person) excepted only one person(female) ,to part with significant between these two groups . Also there is positive correlation (r+)between OTA existence and renal failure . The result showed that females infected with renal failure more sensitive to OTA than males ,the rate get to 50% .And the other side the result illustrated that age group (51-70)year was more sensitive to OTA compare with other groups ,the rate of persons that bearing of OTA reached to 60% .