تأثير عسل النحل الطبيعي في شفاء الجروح الجلدية المخمجة ببكتريا *Pseudomonas aeruginosa* في الجرذان البيض

رغد محمد علي جاسم **أ. م. د جميل جري يوسف**
جامعة الكوفة / كلية التربية للبنات / قسم علوم الحياة

الخلاصة :

أجريت الدراسة للفترة من تشرين الثاني / 2010 ولغاية كانون الاول / 2011 والتي تهدف الى تقييم تأثير ضماد عسل النحل الطبيعي في اصابات الجروح في الجرذان البيض المجروحة والمخمجة ببكتريا *Ps. aeruginosa* ومقارنته مع ضماد الجنتامايسين في الجسم الحي *In vivo* . بينت نتائج الفحص العياني للإصابة التجريبية ولكافة مجاميع الجرذان المهقاء المجروحة والمخمجة ببكتريا *Ps. aeruginosa* ظهور علامات الالتهاب الشديدة المتمثلة بالاحتقان Redness والانسلاخ Swelling في الايام الاولى من اجراء الجروح لكنها بدت اقل شدة بتقدم فترة التجربة , و لم تلاحظ علامات الاصابة في اليوم السابع من المعاملة في مجموعة الجرذان المعالجة بالعسل الطبيعي مقارنة مع مجموعتي السيطرة والجنتاماسين , كذلك لم يلاحظ في اليوم السابع بعد المعاملة وجود افرازات قيحية Exudate وكانت الجروح جافة خاصة في مجموعة الجرذان المعالجة بالعسل الطبيعي مقارنة مع مجموعتي السيطرة والجنتاماسين . ولغرض متابعة تكوين النسيج الظهاري Epitheliazation وذلك من خلال قياس المساحة غير الشافية من الجرح (Unhealed area) المخمجة ببكتريا *Ps. aeruginosa* , انه لا توجد فروق معنوية بين مجاميع الجرذان المعاملة بالعسل الطبيعي والمعاملة بالجنتامايسين ومجموعة السيطرة خاصةً في اليوم السابع من المعاملة بينما في اليوم الحادي والعشرين فقد كانت المساحة غير الشافية في مجموعة السيطرة والجنتامايسين اكبر كثيراً مما هو علية في مجموعة الجرذان المهقاء المعاملة بالعسل الطبيعي .

وأظهرت نتائج الفحص المجهري لنسيج الجلد المجروح في مجاميع الجرذان البيض المخمجة ببكتريا *Ps. aeruginosa* والمعالجة بضماد العسل الطبيعي وجود ارتشاح شديد وبشكل معنوي لخلايا الدم البيض العدلة وخاصة في اليوم الاول من اجراء الجروح مقارنة بغيرها من مجاميع السيطرة والجنتاماسين , ويلاحظ ان عدد الخلايا العدلة قد تناقص في الايام اللاحقة من المعاملة واختفت تماماً في اليوم الرابع عشر من المعاملة بضماد العسل الطبيعي . كذلك لوحظت زيادة في عدد البلاعم الكبيرة في اليوم السابع من المعاملة بضماد العسل الطبيعي وعند عد البلاعم الكبيرة لوحظ وجود فروقات معنوية بين مجاميع السيطرة والجنتامايسين وبين مجاميع الجرذان المعالجة بضماد العسل الطبيعي في اليوم السابع وكان تعداد البلاعم كبيراً وبشكل معنوي في المجاميع المعاملة بضماد العسل الطبيعي خاصة في اليوم الرابع عشر . كذلك لوحظت تكوين الاوعية الدموية الشعرية واللمفاوية في اليوم السابع في حين كان تكوينها بشكل كثيف في اليوم الحادي والعشرين من المعاملة بضماد العسل الطبيعي وبشكل معنوي مقارنة بمجاميع السيطرة والجنتامايسين .كما وبينت النتائج بان نمو الياف الكولاجين قد ظهر في اليوم السابع وكان اكثر وضوحاً وبشكل كبير ومعنوي في اليوم الرابع عشر والحادي والعشرين من المعاملة بضماد العسل الطبيعي مقارنة مع مجاميع الجرذان المعاملة بالجنتامايسين ومجاميع السيطرة.

•البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الاول

المقدمة: Introduction

علاج الجروح هو طريقة ديناميكية تؤدي الى استرجاع وظيفة وسلامة الانسجة . حيث ان العناية بالجروح اليوم تعتمد على تعزيز شفاء الجروح , والشفاء هو عملية مرتبطة بالإصابة الذي هو سلسلة من التفاعلات تحدث في موقع الجرح , الغرض منها هو لتدمير وتحديد انتشار العامل الضار والسماح بإصلاح الانسجة (4). تعد الاصابة الميكروبية للجروح من أهم المشاكل التي تحدث بشكل سريع ومفاجئ في الوقت الحاضر ,إ ذ لوحظ أن بكتريا *Ps. aeruginosa* المسبب الخطير والاكثر شيوعاً في هذه الاصابة نتيجة لتلوث مواقع الجروح بها (5) , وتزداد نسبة الاصابة عند الاشخاص المصابين بالأمراض المزمنة التي تؤدي الى حدوث خلل او كبح في الجهاز المناعي كالسرطان والسكري او الايدز نتيجة تعاطي بعض ادوية الامراض المزمنة لفترات طويلة (6) . ان ظهور وانتشار المقاومة للمضادات الحيوية بين البكتريا الموجبة لصبغة كرام والسالبة لها دفع الباحثين المهتمين بمجال العلاج الى اكتشاف بدائل علاجية للمضادات الحيوية ومن بين هذه البدائل النباتات الطبية وما تحتويها من مكونات فعالة مضادة للجراثيم مثل الفينولات Phenols والقلويدات Alkaloids والفلافونويدات Flavonoids والزيوت الاساسية Essential oils والراتنجات والعفصيات وغيرها من المواد الطبيعية التي اكدت جدارتها في علاج الأخماج البكتيرية فضلاً عن أنه لا توجد بحوث تؤكد امكانية الجراثيم اكتساب صفة المقاومة لمثل هذه المكونات الفعالة (7, 8).وقد أكدت الدراسات المختبرية والسريرية أن عسل النحل الطبيعي ذات فاعلية تجاه عدد واسع من الجراثيم،

وليس له أي تأثيرات جانبية ضارة على أنسجة الجرح . إضافة إلى هذا فإنه يؤمّن تنظيفًا ذاتيًّا سريعًا للجرح ، ويزيل الرائحة منه، ويحفز نمو الأنسجة التي تُلئِم الجروح , كما ان العسل يمكن ان يحل محل الكثير من المضادات الحيوية المستخدمة في معالجة الجروح كالمراهم والكريمات المختلفة , وان استخدام العسل كوسيلة مساعدة للعلاج يزيد من عمل المضادات الحيوية (9) . لقد عُرف العسل منذ القدم باحتوائه على خصائص مقاومة للجراثيم وكان يستخدم لعلاج الجروح (10, 11). وقد أثبتت البحوث والدراسات ان للعسل دوراً فاعلاً في تثبيط نمو عدة انواع من البكتريا مثل بكتريا *Pseudomonas* و *Staphylococci* و *Streptococci* و *E. Coli* , وكذلك بعض انواع البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية مثل البكتريا المقاومة للمثسيلين MRSA (10, 12) .

ذكرت عدد من الدراسات إن فاعلية العسل المضادة للأحياء المجهرية تعود الى احتوائه على محتوى مائي قليل ولهذا فأنه يسهل الاثر التناضحي الذي يترك جزيئات قليلة من الماء لنمو المكروبات ومع ذلك تختلف نسبة كبح نمو البكتريا طبقاً لصنف ونوع البكتريا وفاعلية النشاط المقاوم لها (10) وعلى مصدر العسل (13). كذلك فأن العسل يحتوي على قيمة PH منخفضة بين (3.2-4.5) وهذه الحامضية تثبط نمو اغلب الكائنات الحية المجهرية (14) .كما ان انتاج بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 كنتيجة لفعالية اكسدة الكلوكوز الذي له فاعلية قوية على مقاومة البكتريا , تلك المقاومة مشابهه لما تنتجها البلاعم الكبيرة Macrophages . وهذه القدرة الفعالة تحدث بعد ان يوضع العسل على الجروح , حيث يتحرر بيروكسيد الهيدروجين تدريجياً ليكّون مقاومة شديدة ضد البكتريا دون احداث أي ضرر للخلايا الطبيعية (15) .فضلاً عن ان الابخرة الطيارة , الحوامض العضوية , الفلافونيد , شمع النحل , الرحيق, حبوب اللقاح والبروبولس هي العناصر الكيمائية المهمة التي تزود العسل بخاصيته المقاومة للبكتريا. ان المواد الكيمائية النباتية لا تفقد قدرتها وفعاليتها المقاومة للبكتريا , ولذلك فهي من الممكن ان تعمل في المراحل الاخيرة عند التهاب الجرح .ان تجمع النشاط المقاوم للبكتريا يجعل من العسل منتوجاً طبيعياً خاصاً اثبت جدارته بمرور الزمن , فضلاً عن ذلك فأن الاستعمال المطول للعسل لا يؤدي الى تطور قدرة الجراثيم على مقاومة العقار كما يحدث عند الاستعمال المطول للمضادات الحيوية الصناعية , بسبب فعالية العسل التي لا تعمل عن طريق آلية منفرده لحدود معينة , بل تحدد قدرة عوامل المقاومة للنجاح بالسيطرة على نمو الجراثيم (16). لذا اقترحت الدراسة الحالية والتي تهدف الى دراسة تأثير ضماد عسل النحل الطبيعي على الجروح المصابة ببكتريا *P.aeruginosa* .

المواد وطرائق العمل

التصميم التجريبي للدراسة داخل الجسم الحي *In Vivo*

اختير (44) جرذ من الذكور الاصحاء بشكل عشوائي التي تتراوح اعمارها بين (6-8) أسابيع لغرض عمل الجروح الجلدية , قسمت هذه الجرذان الى مجاميع وحسب الآتي :-

- ❖ المجموعة الاولى (12) جرذان: مجروحة وغير مخمجة وضمدت بضماد الشاش المعقم (سيطرة سالبة).
- ❖ المجموعة الثانية (32) جرذ : قسمت على ثلاثة مجاميع ثانوية (12جرذان لكل مجموعة ثانوية) وحسب الآتي :-
  - ♦ مجموعة مجروحة ومخمجة ببكتريا *Ps. aeruginosa* ومضمدة بضماد الشاش المعقم (سيطرة موجبة).
  - ♦ مجموعة مجروحة ومخمجة ببكتريا *Ps. aeruginosa* ومضمدة بضماد يحوي على مرهم المضاد الحيوي Gentamycine (تركيز 0.3%).
  - ♦ مجموعة مجروحة ومخمجة ببكتريا *Ps. aeruginosa* ومضمدة بضماد العسل الطبيعي.

عمل الجروح : Wound creation

حُضرت حيوانات التجربة لغرض اجراء عملية جرح الجلد إذ تم تخديرها وذلك بحقنها عن طريق العضلة بجرعة 10 mg/kgمن مادة Xylazine وجرعة40mg / kg من مادة Hcl Ketamine, بعدها اختيرت المنطقة الظهرية الخلفية لكل حيوان , حيث غسلت جيداً بالماء المقطر ,ثم عقمت بالايودين ,بعدها حلق الشعر في المنطقة المختارة واعيد تعقيم المنطقة المختارة بالايودين . تم القطع باستعمال ملقط ومبضع معقمين وشمل القطع طبقات الجلد (البشرة , الادمة والشحمية تحت الجلدية) وكانت ابعاد الجرح 1.5× 1.5 سم , وتمت السيطرة على النزف الحاصل بواسطة الضغط على منطقة الجرح بأستعمال شاش معقم. اعطيت الجرذان المجروحة مادة Acetaminophen بجرعة 0.25mg/mlعن طريق ماء الشرب كمسكن للآلام وبعد (30) دقيقة لقحت الجروح باللقاح البكتيري وبكمية 100 مايكروليتر لكل جرذ , باستثناء جرذان السيطرة السالبة فلم تعطى لقاح بكتيري . ومن ثم اجريت عملية المعالجة للجروح بطريقة الضماد Dressing, واستعمل المرهم الذي يحوي على المضاد الحيوي Gentamycine (تركيز 0.3%) وكذلك الضماد الذي يحوي على مادة عسل النحل الطبيعي في ضماد جروح حيوانات المجموعتين الثانية والثالثة ماعدا حيوانات المجموعة الاولى (السيطرة) والتي ضمدت بالشاش المعقم فقط (17) .

الفحص العياني للإصابة التجريبية

تم مراقبة جرذان التجربة لملاحظة حالتها الصحية وكذلك تغير ضماد الجروح وبشكل يومي . اذ فحصت الجروح واخذت لها الصور الفوتوغرافية , ويتم قياس الجرح باستخدام ورق شفاف ومسطرة ضمن المدة (0, 7 , 14 , 21) يوم واستعملت بعد اجراء الجروح العلامات (+ و-) لتقيم احتقان الجرح Hyperemia , تقييح الجرح Suppuration وكذلك جفاف الجرح Dryness of wound وتظهرن الجرح Epitheliazation (18)
وهذه العلامات ما يأتي :-
- تمثل لا يوجد (Non) , + تمثل معتدل (Mild)
++ تمثل متوسط (Moderate) , +++ تمثل شديد (Severe)

الفحص المجهري للالتهاب التجريبي

بعد الفحص العياني للجروح (المعاملات والسيطرة) , خدرت جرذان التجربة ثم قطع نموذج فحص العينة Biopsy من حافة الجرح لكل جرذ بطول (5 مللمتر) وضمن الفترات (0 , 7 , 14 , 21) بعد اجراء الجرح , حفظت النماذج في 10% فورمالين , بعدها اجريت عليها عمليات تحضير المقاطع النسجية (19).

تحضير المقاطع النسجية

حضرت المقاطع النسيجية اعتمادا على طريقة : (1)

1. التثبيت Fixation : ثبتت خزع من جلد الجرذان المستعملة في جميع مراحل التجربة في محلول الفورمالين المنظم المتعادل (Buffered Neutral Formalin) بتركيز 10% وتراوحت مدة التثبيت ما بين 12 ساعة –عدة اسابيع .
2. الغسل Washing : غسلت العينات بعد تثبيتها بالماء الجاري لإزالة أكبر قدر ممكن من المثبت.
3. الانكاز Dehydration : جرت عملية الإنكاز بتمرير العينات بسلسلة متصاعدة من تراكيز الكحول الأثيلي (30-70-95-100%) ولمدة ساعة لكل تركيز عدا الكحول المطلق لمرتين كل مرة لمدة ساعة .
4. الترويق Clearing : مررت العينات بثلاث مراحل من الزايلين Xylene لمدة ساعة لكل مرحلة .
5. التشريب Infiltration : مررت العينات بثلاث مراحل من شمع البرافين Paraffin wax درجة انصهاره ، (56-68) مْ ولمدة (2) ساعة ، وضعت في فرن كهربائي بدرجة (60) مْ لمدة ساعتين ساعة أو اكثر.
6. الطمر Embedding : طمرت العينات بنوعية الشمع نفسها المستعملة في التشريب ، إذ وضع الشمع في قوالب مناسبة ، ثم ينقل النسيج الى الشمع باستعمال ملقط غير حاد .
7. التشذيب والتقطيع Trimming and Sectioning : تم تشذيب قوالب الشمع الحاوية على العينات تشذيبا دقيقا باستعمال شفرات حادة مثبتة بجهاز المشراح الدوارRotary microtome المتكون من شفرات حادة لغرض الحصول على مقاطع نسجية متسلسلة بسمك (10) ماكروميترا ، حملت الاشرطة المقطوعة بوساطة ملقط على شريحة زجاجية نظيفة مع الاحتفاظ بتسلسلها وتركت لتجف لمدة (10) دقائق وبعدها نقلت الى الفرن الكهربائي بدرجة حرارة (30-35) مْ لمدة (15-30) دقيقة .
8. الصبغ Staining : استعملت صبغة ديلافيد الهيماتوكسلين Delfied Hematoxyline وصبغة الايوسين Eosinالجاهزة، وطبقت طريقة الصبغة كما يأتي :

a. أزيل الشمع من المقاطع النسيجية بالزايلين على مرحلتين لمدة (5-10) دقائق لكل مرحلة ، ومررت بسلسلة تنازلية لتراكيز من الكحول الأثيلي ابتداء من تركيز 100% الى تركيز 70% ولمدة دقيقتين لكل تركيز ثم غسلت بالماء المقطر .
b. صبغت المقاطع بوضعها في وعاء حاوي على صبغة الهيماتوكسلين لمدة (5) دقائق ، وغسلت بماء الحنفية الجاري لمدة (10) دقائق حتى تزرق .
c. صبغت المقاطع بالايوسين الكحولي لمدة دقيقة ثم غسلت بالماء المقطر ، ومررت بسلسلة تصاعدية بتراكيز من الكحول الأثيلي ابتداء من 70% الى 95% لمدة دقيقتين لكل تركيز ، ثم مررت مرتين في الكحول الأثيلي المطلق 100% ولمدة (5) دقائق ، نقلت بعدها الى الزايلين لغرض الترويق وبمرحلتين لكل مرحلة (5-10) دقائق .
d. التحميل Mounting : حملت الشرائح بوسط التحميل دسترين – بلاسترز – زايلين (Distrene - Plasticizer - Xylene D.P.X) وضع الغطاء الزجاجي ، ووضعت الشرائح على الصفيحة الساخنة لتسريع عملية جفافها .

الفحص الامراضي النسجي Histopathological Examination

اجري الفحص المجهري للمقاطع النسجية باستخدام مجهر ضوئي مركب نوعOlympus/ Japan تحت قوة تكبير 40X وايضاً استخدمت كاميرا SONY يابانية المنشأ لغرض تصوير وتقييم التفاعل الالتهابي اعتماداً على شدة ارتشاح العدلات Neutrophils والبلاعم الكبيرة Macrophages وكذلك تكون الاوعية الدموية جديدة New blood vessels وتكاثر في الخلايا المكونة للألياف Fibroblastas وترسب مادة الكولاجين Collagen ولغرض تبويب نتائج الفحص المجهري, استخدمت العلامات التالية:- (Peh & Khan, 2003)

علامة (0) تمثل عدم وجود (Non) , علامة (1) تمثل معتدل (Mild)

علامة (2) تمثل متوسط (Moderate) وعلامة (3) تمثل شديد (Severe)

التحليل الإحصائي

حللت النتائج احصائياً لإيجاد الانحراف المعياري والفروقات المعنوية بين مجاميع الدراسة وذلك باستخدام نظام التحليل الاحصائي SPSS (2).

النتائج

التقييم العياني للالتهاب التجريبي Macroscopic Examination of Inflammation علامات الالتهاب

من خلال الفحص العياني للالتهاب التجريبي لكافة مجاميع الجرذان البيض المجروحة والمخمجة بنوعي البكتريا *P.aeruginosa* في الجدول (1) . لوحظت علامات الالتهاب الشديدة المتمثلة بالاحتقان Redness والورم Swelling بعد عملية اجراء الجروح مباشرة لكنها بدت اقل شدة بتقدم فترة التجربة , او لم تلاحظ علامات الالتهاب في اليوم السابع من المعاملة في مجموعة الجرذان المعالجة بالعسل الطبيعي مقارنة مع مجموعتي السيطرة والجنتاماسين , كذلك لم يلاحظ في اليوم السابع بعد المعاملة وجود قيح Exudate وكانت الجروح جافة خاصة في مجموعة الجرذان المعالجة بالعسل الطبيعي مقارنة مع مجموعتي السيطرة والجنتاماسين .

جدول (1) الفحص العياني للالتهاب التجريبي في الجرذان البيض المجروحة والخمجة ببكتريا *Ps .aeruginosa*

المعيار	المجموعة	ايام المعاملة			
		0	7	14	21
الاحتقان Rednesse	السيطرة	+++	++	++	+
	جنتاماسين	+++	++	+	-
	عسل طبيعي	+++	+	-	-
الورم Swelling	السيطرة	+++	++	++	+
	جنتاماسين	+++	++	+	-
	عسل طبيعي	+++	-	-	-
الجفاف Dryness	السيطرة	-	-	-	+
	جنتاماسين	-	-	+	++
	عسل طبيعي	-	+	+++	+++

(+++)= شديد ,(++) =متوسط , (+)= معتدل , (-)= لا يوجد

تكوين النسيج الظهاري Epithelialization

من خلال قياس المساحة غير الشافية من الجروح (Unhealed area) المخمجة ببكتريا *Ps. aeruginosa*, المبينة في الجدول (2) , وجد انه لا توجد فروق معنوية بين مجاميع الجرذان المعاملة بالعسل الطبيعي والمعاملة بالجنتامايسين ومجموعة السيطرة خاصةً في اليوم السابع والرابع عشر من المعاملة بينما في اليوم الحادي والعشرين فقد كانت المساحة غير الشافية في مجموعة السيطرة والجنتامايسين اكبر كثيراً وبشكل معنوي مما هو عليه في مجموعة الجرذان البيض المعاملة بالعسل الطبيعي .

جدول (2) تأثير العسل الطبيعي في معدل مساحة الجرح للجرذان البيض المجروحة والمخمجة ببكتريا *Ps. aeruginosa*

المجموعة	معدل مساحة الجرح (سم^2) في أيام المعاملة			
	0	7	14	21
السيطرة	2.25 ± 000	1.96 ± 0.4	1.44 ± 0.02	1.20 ± 0.05
جنتامايسين	2.25 ± 000	1.70 ± 0.7	1.60 ± 0.14	0.8 ± 0.10

عسل طبيعي	2.25 ± 000	1.27 ± 0.1	0.36 ± 0.4	0.00 ± 000
اقل فرق معنوي عند مستوى 0.05	0.00	0.24	0.15	0.40

الفحص المجهري للالتهاب التجريبي

أظهرت نتائج الفحص المجهري لنسيج الجلد المجروح في مجاميع الجرذان البيض المخمجة ببكتريا *Ps. aeruginosa* والمعالجة بضماد العسل الطبيعي المبينة في الجدول (3) والاشكال (1) و(5) و(9) وجود ارتشاح شديد وبشكل معنوي ($P< 0.05$) لخلايا الدم البيض العدلة وخاصة في اليوم الاول من اجراء الجروح مقارنة بغيرها من مجاميع السيطرة والجنتاماسين , ونلاحظ ان عدد خلايا العدلة قد تناقص في الايام اللاحقة من المعاملة واختفت تماماً في اليوم الرابع عشر من المعاملة بضماد العسل الطبيعي . كذلك لوحظت زيادة في عدد البلاعم الكبيرة في اليوم السابع من المعاملة بضماد العسل الطبيعي وعند عد البلاعم الكبيرة لوحظ وجود فروقات معنوية ($P< 0.05$) بين مجاميع السيطرة الموجبة والجنتامايسين وبين مجاميع الجرذان المعالجة بضماد العسل الطبيعي في اليوم السابع وبشكل معنوي ($P< 0.05$) في المجاميع المعاملة بضماد العسل الطبيعي خاصة في اليوم الرابع عشر كما مبينة في الجدول (3) والاشكال (2) و(6) و(10). كذلك لوحظت تكوين الاوعية الدموية الشعرية اللمفاوية في اليوم السابع في حين كان تكوينها بشكل كثيف في اليوم الحادي والعشرين من المعاملة بضماد العسل الطبيعي وبشكل معنوي مقارنة بمجاميع السيطرة الموجبة والجنتامايسين كما مبينة في الاشكال (3) و(7) و(11). كما وبينت النتائج بان نمو الياف الكولاجين قد ظهر في اليوم السابع وكان اكثر وضوحاً وبشكل كبير ومعنوي ($P< 0.05$) في اليوم الرابع عشر والحادي والعشرين من المعاملة بضماد العسل الطبيعي مقارنة مع مجاميع الجرذان المعاملة بالجنتامايسين ومجاميع السيطرة الموجبة كما مبينة في الجدول (3) والاشكال (4) و(8) و(12).

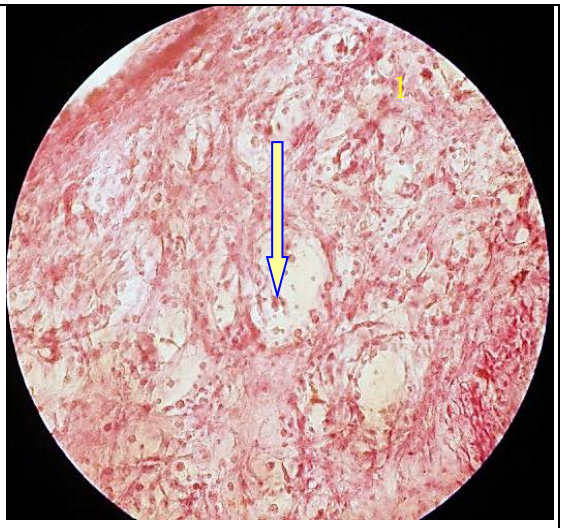
جدول (3) نتائج الفحص النسيجي للالتهاب التجريبي للجروح الجلدية للجرذان البيض المخمجة ببكتريا *Ps. aeruginosa* والمعالجة بضماد العسل الطبيعي والجنتامايسين .

المعيار	المجموعة	أيام المعاملة			
		0	7	14	21
الخلايا العدلة	سيطرة	2.60 ±0.01	2.10±0.51	1.0 ± 000	0.50±0.00
	جنتامايسين	2.50 ± 0.07	2.10±0.51	1.0 ± 000	0.60 ±0.02
	عسل طبيعي	*3.0 ± 0.05	*1.50 ±0.04	0.00±000	0.00 ± 000
خلايا البلاعم الكبيرة	سيطرة	1.10± 0.51	1.4 ± 0.02	0.50 ±0.05	0.10 ± 000
	جنتامايسين	1.10 ± 000	1.0 ± 0.51	0.60±0.02	0.30 ±0.01
	عسل طبيعي	*0.50± 000	**2.50±0.07	**3.0±000	*1.0 ± 0.51
تكوين الاوعية الشعرية الدموية واللمفاوية الجديدة	سيطرة	0.00 ± 000	0.50 ± 0.02	1.50±0.04	2.0 ± 0.51
	جنتامايسين	0.00 ± 000	0.60 ± 0.10	1.6 ±0.10	2.20 ±0.05
	عسل طبيعي	0.00 ± 000	1.50 ± 0.04	*2.10±0.51	* 3.0 ± 000
	سيطرة	0.00 ±000	0.60 ± 0.2	1.50±0.01	2.10 ± 0.51

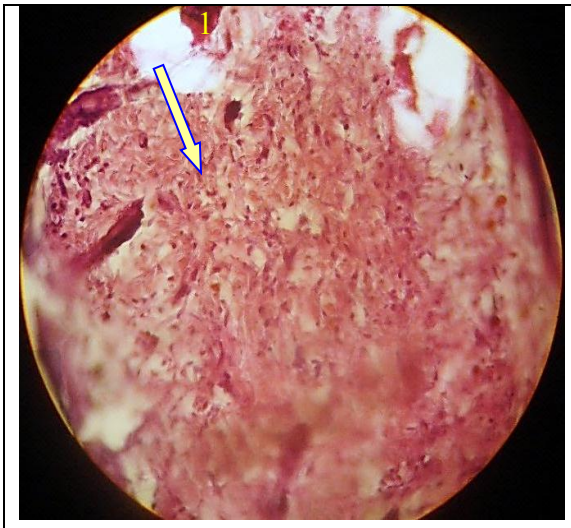
الياف الكولاجين	جنتامايسين	0.00 ±000	0.50 ± 0.01	1.40±0.03	2.10 ±0.51
	عسل طبيعي	0.20 ±000	*1.40±0.03	*2.50±0.07	* 3.0± 000

*** فرق معنوي عند مستوى الاحتمالية (0.01 = *P*)**

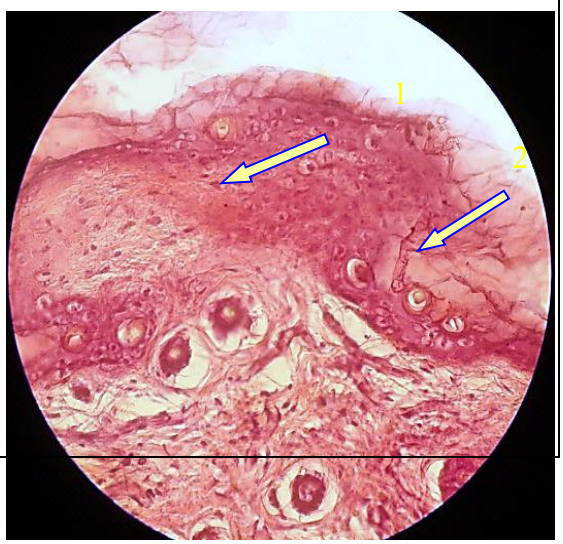
**** فرق معنوي عند مستوى الاحتمالية (0.001 = *P*)**

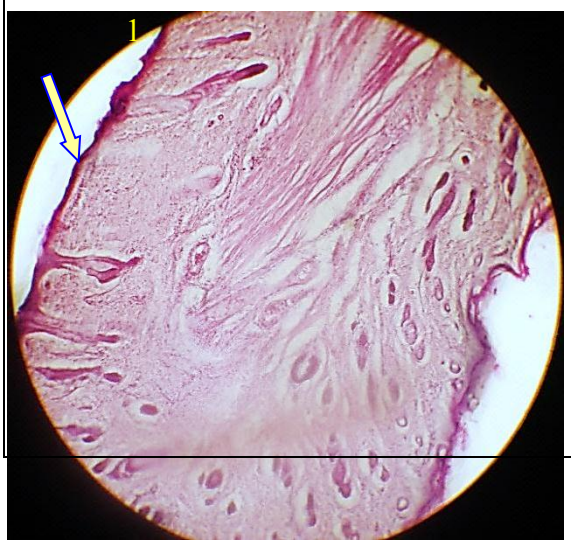


صورة (1) مجهرية لمقطع نسيجي لجرح مخمج ومعالج بضماد العسل الطبيعي في اليوم صفر , توضح ارتشاح شديد للخلايا العدلة 1 (صبغة H- E X 400).



صورة (2) مجهرية لمقطع نسيجي لجرح مخمج ومعالج بضماد العسل الطبيعي في اليوم السابع , توضح ارتشاح شديد للخلايا البلعمية الكبيرة 1 (صبغة H- E X 400).

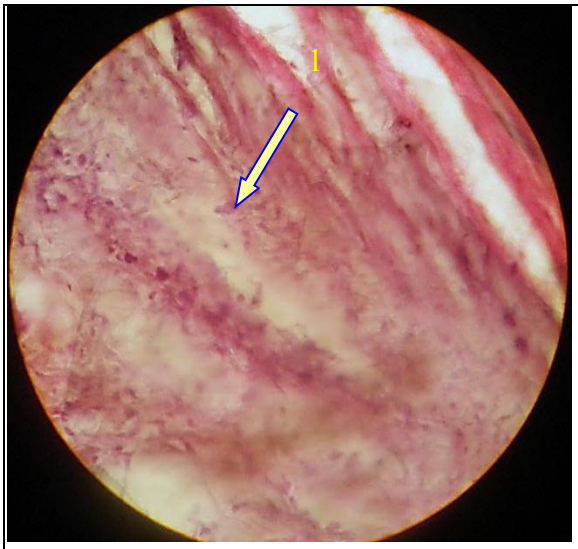




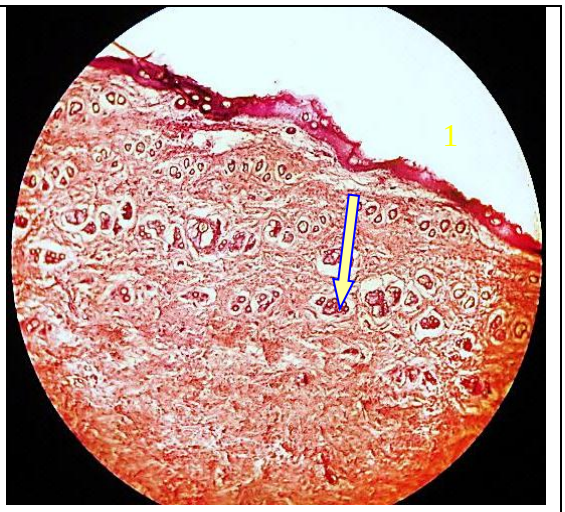
صورة (3) مجهرية لمقطع نسيجي لجرح مخمج ومعالج بضماد العسل الطبيعي في اليوم الرابع عشر , توضح ارتشاح شديد للخلايا البلعمية الكبيرة1 مع تكوين اوعية دموية كبيرة 2 (صبغة H- E X100)

صورة (4) مجهرية لمقطع نسيجي لجرح مخمج ومعالج بضماد العسل الطبيعي في اليوم الحادي والعشرين , توضح اكتمال تكوين النسيج الظهاري1 (صبغة H- E X100).

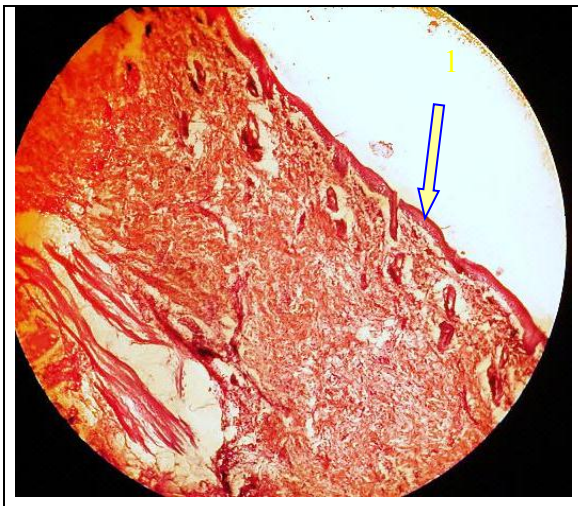
صورة (5) مجهرية لمقطع نسيجي لجرح مخمج ومعالج بضماد الجنتامايسين في اليوم صفر , توضح ارتشاح متوسط للخلايا العدلة 1 (صبغة H- E X 400).



صورة (6) مجهرية لمقطع نسيجي لجرح مخمج ومعالج بضماد الجنتامايسين في اليوم السابع , توضح ارتشاح متوسط للخلايا البلعمية الكبيرة 1 (صبغة H- E X 400).



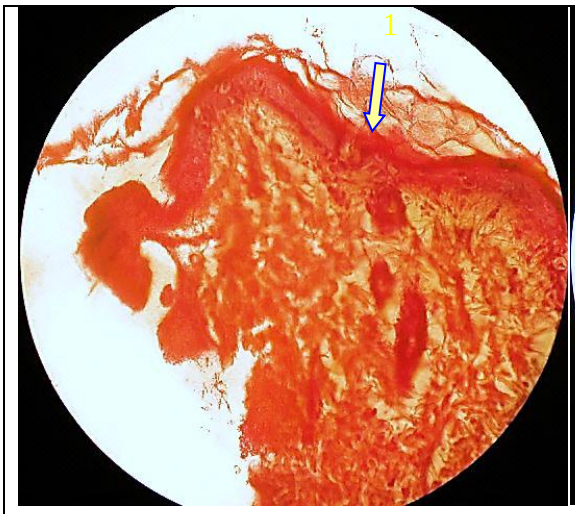
صورة (7) مجهرية لمقطع نسيجي لجرح مخمج ومعالج بضماد الجنتامايسين في اليوم الرابع عشر , توضح تكوين اوعية دموية كبيرة 1 (صبغة X100 H- E).



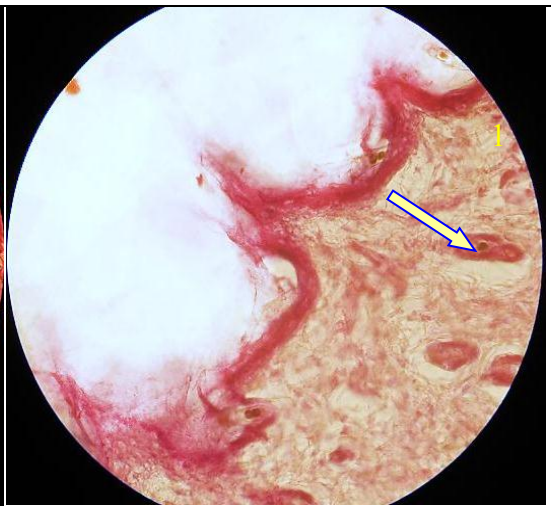
صورة (8) مجهرية لمقطع نسيجي لجرح مخمج ومعالج بضماد الجنتامايسين في اليوم الحادي والعشرين , توضح اكتمال تكوين النسيج الظهاري1 (صبغة X 100 H- E).

صورة (9) مجهرية لمقطع نسيجي لجرح مخمج وغير معالج في اليوم صفر , توضح ارتشاح للخلايا العدلة 1 (صبغة H- E X 400).

صورة (10) مجهرية لمقطع نسيجي لجرح مخمج وغير معالج في اليوم السابع , توضح قلة ارتشاح للخلايا البلعمية الكبيرة1 (صبغة H- E X400).



صورة (12) مجهرية لمقطع نسيجي لجرح مخمج وغير معالج في اليوم الحادي والعشرين , توضح بداية اكتمال تكوين النسيج الظهاري1 (صبغة H- X 100 E).



صورة (11) مجهرية لمقطع نسيجي لجرح مخمج وغير معالج في اليوم الرابع عشر , توضح بداية تكوين الاوعية الدموية الكبيرة 1 (صبغة H- X 100 E).

المناقشة

اظهرت نتائج الفحص العياني للجروح الجلدية في مجموعة الجرذان البيض المعالجة بضماد عسل النحل الطبيعي ان له فعالية كبيرة في التقليل من علامات الالتهاب المتمثلة بالاحتقان والورم والقيح والتي اختفت تماماً في اليوم السابع بعد اجراء الجروح مقارنة بغيرها من مجاميع السيطرة والجنتامايسين . حيث أكدت الدراسات على العسل الطبيعي يعجل من شفاء الجروح وذلك من خلال تأثيراته المضادة للإصابة , اذ ان كمية الافرازات القيحية للجرح مرتبطة بفعالية عملية الالتهاب الموضعي وبالبكتريا المخمجة للجروح . وعلية فأن فعل العسل المضاد للإصابة هو التقليل من الوذمة Oedema وكمية القيح عن طريق كبح عملية الالتهاب , اضافة الى ذلك فأن العسل يقوم بتقليل الالم اذ أن الالم في الجروح ناتج من التهاب النهايات العصبية التي بدورها تتحسس بوساطة البروستوكلاندينات Prostaglandins التي تنتج من العملية الالتهابية علاوة على ذلك فأن الالم ينتج من جراء ضغط الوذمة على انسجة الجرح , ونتيجة للمحتوى السكري العالي للعسل فأنه يمنع الالم اثناء تغير الضمادات حيث يجعل سطح الجرح رطب عن طريق تحريك الوذمة من الانسجة المحيطة (20, 21) .كما ذكر Molan (11) ان للعسل فاعلية في ازالة الروائح من الجروح , وتعزى فعالية احتوائه على سكر الكلوكوز الذي يؤيض من قبل البكتريا والذي تفضله البكتريا على النسيج المتنخر البروتيني الموجود في الجرح وبذلك ينتج من عملية أيض السكر حامض اللاكتيك Lactic acid وليس المركبات الكريهة والرائحة الناتجة من تحطيم البروتينات .ومما لاشك فيه ومن خلال النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية ان عسل النحل الطبيعي ذات كفاءة في ازالة سمات الالتهاب من الجروح وهذا يعني تنظيف الجروح من الخمج البكتيري , اذ ذكرت عدد من الدراسات ان للعسل الطبيعي فاعلية في ازالة علامات الالتهاب والورم والالم وشفاء الجروح خلال فترة قصيرة (22, 23, 24).

كما ان للعسل القدرة على القضاء على مسببات الالتهاب وذلك بتحفيز الخلايا الوحيدة Monocytes على انتاج وافراز السايتوكاينينات TNF- alpha وIL-1 , كما يحفز الخلايا اللمفية البائية B-Cell على انتاج الاضداد (25, 26).علاوة على ذلك فقد ذكر Molan (11) ان للعسل القابلية على تكوين مركب بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بواسطة انزيم اوكسيد الكلوكوز Glucose Oxidas الموجود في العسل والذي يعد مطهر قوي لبكتريا الجروح . وان مستوى الكلوكوز العالي في العسل يؤدي الى تحفيز البلاعم الكبيرة Macrophages على تكوين بيروكسيد الهيدروجين الذي يهاجم الغشاء الخلوي البكتيري (9) . تلعب مركبات أوكسيد النتريك No التي توجد بشكل طبيعي في العسل أو التي يتم تحفيز انتاجها بوساطة البروستوكلاندينات التي توجد بكميات قليلة في العسل تلعب دوراً مهماً في القضاء على البكتريا المخمجة للجروح (27, 28) .

يحوي العسل الطبيعي على مركبات مانعه للأكسدة Antioxidiant مثل انزيم الكتاليز Catalase وكذلك الفلافونات Flavanoids والاحماض العطرية Aromatic acids ذات المنشأ النباتي , التي لها اهمية في ازالة الجذور الحرة الأوكسجينية الناتجة من الاستجابة المناعية ضد البكتريا وهذه الجذور تسبب الالتهاب والضرر للأنسجة وتحطيم الخلايا المحيطة بالجرح (29, 30).

لوحظ من خلال نتائج قياس المساحة غير الشافية للجرح في الدراسة الحالية , التي اختزلت بشكل كبير وبفترة قصيرة في مجموعة الجرذان المعالجة بضماد العسل الطبيعي مقارنه بغيرها من مجاميع السيطرة والجنتامايسين , هذا وان اختزال المساحة غير الشافية يعطي دليل على نمو النسيج الظهاري Epithelialization . اذ اشارت الدراسات الى ان سرعة شفاء الجروح عند استعمال العسل يعود الى احتوائه على مواد فعالة تحفز نمو الانسجة الجديدة مثل انزيمات حبوب اللقاح وكذلك البروبولس (31, 32).

كما وجد ان بيروكسيد الهيدروجين الذي ينتج من قبل العسل هو المسؤول من تكوين الانسجة الجديدة وتحفيز نمو الخلايا ,حيث يعمل على تنشيط مستقبلات الانسولين مما يؤدي الى تحفيز دخول الكلوكوز الى داخل الخلية ويساعد على نموها (19, 33).

ايضاً يحوي العسل على عدد كبير من المغذيات مثل الفيتامينات والاحماض الامينية وتراكيز عالية من سكر الكلوكوز والفركتوز والسكروز ومعادن ومانعات أكسدة التي بمجموعها لها الاثر الكبير في الخلايا وتكاثرها (27, 34). كما يساعد العسل على افراز مادة الكلوتاثيون Glutathione الضرورية في عملية الاكسدة والترميم والتجديد الخلوي وبالتالي التئام الجروح (3) .وذكر Efem (35) ان الازموزية العالية للعسل تؤدي الى وصول كمية كبيرة من اللمف الذي يجهز المواد الغذائية الضرورية لإعادة تكوين انسجة الجرح.

كشفت نتائج الفحص النسيجي للجروح الجلدية في مجموعة الجرذان المعالجة بضماد العسل الطبيعي وجود ارتشاح شديد لخلايا الدم البيض العدلة وخاصة في اليوم الاول من اجراء الجروح واختفت تماماً في اليوم الرابع عشر فقد لوحظ ارتفاع في عدد البلاعم الكبيرة في اليوم السابع من المعاملة وازداد عددها بشكل كبير في اليوم الرابع عشر من المعاملة . حيث اشارت الدراسات الى وجود ارتشاح شديد للخلايا العدلة في الأيام الاولى للجروح المعالجة بالعسل وبسبب انجذاب هذه الخلايا بفعل عوامل الجذب الكيماوي التي تفرز من منطقة الجرح ومن ثم تختفي هذه الخلايا تدريجيا بتقدم فترة التجربة (36, 37) ودعمت النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية من قبل Nisbet (19) الذي ذكر ازدياد اعداد خلايا البلاعم الكبيرة في اليوم الرابع عشر من معاملة الجروح بالعسل الطبيعي .

كما يبدو من خلال نتائج الفحص النسيجي ان للعسل الطبيعي دور كبير ومهم في تكوين ونمو أوعية دموية ولمفاوية جديدة وكذلك التحفيز على تكوين وتكاثر اورمات الخلايا الليفية Fibroblasts المكونة لألياف الكولاجين في نسيج الجلد المجروح في الجرذان البيض التي ظهرت في اليوم السابع من المعاملة وبدت اكثر وضوحا في اليوم الرابع عشر في حين كانت اكثر كثافة من اليوم الحادي والعشرين من المعاملة مقارنة مع مجاميع السيطرة والجنتامايسين , وهذا ما أكده White (38) في ان العسل يحتوي على فيتامين (C) التي تكون كميته أكثر بحوالي ثلاث مرات مما هو علية في المصل والذي له دور اساسي في عملية تخليق وتكون الكولاجين

كما ذكرت عدد من الدراسات بعض الآليات التي بواسطتها يستطيع العسل الطبيعي من التسريع من عملية شفاء الجروح ومن هذه الآليات ان العسل يعمل من خلال تحفيز الاستجابة الالتهابية Inflammatory response leukocytes (21, 34, 39). حيث ان الخلايا الالتهابية تتحفز لإنتاج عوامل نمو وتكاثر الخلايا المكونة لألياف الكولاجين والخلايا الظهارية , وحديثاً اكتشفت Tonks (40) ان هناك مكون بروتيني موجود في العسل الطبيعي ذات وزن جزيئي 5.8 KDA الذي بدوره يحفز على انتاج TNF- alpha من قبل الخلايا البلعمية الكبيرة الذي يعد من عوامل نمو الانسجة .

ومن الآليات الاخرى التي لها دور مهم في تسريع شفاء الجروح الجلدية هي الحموضة العالية للعسل (41) التي بدورها تزيد من كمية الاوكسجين المفرغ من الهيموكلوبين في الشعيرات الدموية في منطقة الجرح وبالتالي يزداد تزويد الخلايا بالأوكسجين الضروري لفعالياتها وتكاثرها .وفي دراسة قام بها Nisbet (19) التي ذكر فيها ان عملية تكوين الاوعية الدموية واللمفاوية وكذلك نمو وتكاثر الخلايا المكونة للألياف وبشكل كبير في اليوم السابع من معاملة الجروح الجلدية للأرانب بضماد العسل الطبيعي كما وجد الباحث من خلال الفحص النسيجي ان عملية تكوين النسيج الظهاري والاوعية الدموية الجديدة وألياف الكولاجين في مستواها الاعلى في اليوم السابع من المعاملة بالعسل الطبيعي يدل على ان العسل يسرع من التفاعل الالتهابي ويبدأ بعملية الشفاء في المراحل المبكرة وهذه النتائج تتفق مع نتائج الدراسة الحالية .في حين أظهرت الدراسة التي قام بها Suguna (36) على الجروح الجلدية للجرذان ان معالجة الجروح بالعسل الطبيعي الذي ابدت كفاءة عالية في تسريع تخليق ونضج الكولاجين وبهذا تزداد قوة الشد للنسيج المشافى . أما Rozaini (42) وجماعته استعملوا الجرذان لغرض تقييم تأثير أنواع مختلفة من العسل على قوة الشد في جروح الحروق فوجدوا ان الجروح المعالجة بالعسل يزداد فيها تركيز الكولاجين وكذلك ثبات واستقرار ألياف الكولاجين .

المصادر :

1. الحاج , حميد أحمد (1998). التحفيزات المجهرية الضوئية ,الاسس النظرية والتطبيقات ,الطبعة الاولى , مركز الكتب الاردني , عمان – الاردن : 9- 72.

2. أبو سريع ، رضا عبد الله . (2004). تحليل البيانات باستخدام برنامج SPSS . دار الفكر للطباعة و النشر . الاردن . الطبعة الاولى.

3. الباشا , محمد خليل . (1983) . موسوعة في علم النحل . الطبعة الأولى . مطبعة الدار العربية للموسوعات

4. Garcia,B.(2003).Inflammation. Biotech., 2:942-1105.

5. Rateb, S. and Rifaat, A. (2001). Kaser El-Aini. 4th . Egypt

6. Bailely, A. and Loves, R. (2004). Short parctice of surgery.24th ed. Long Medical publication: India.

7. Essawi, T. and Srour, M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity, J. Ethnopharmacol. 70 : 343-349.

8. Cowan, M. M. (1999). Plant product as antimicrobial agent, Clin. Microbiol. Rev., 12(4): 564-582.

9. Molan, P. (2001) Why honey is effective as a medicine. The scientific explanation of its effects. Bee World 82:22- 40.

10. Cooper, R.; Halas, E. and Molan, P. (2002). The efficacy of Honey in inhibiting strains of *pseudomonas aeruginosa* from infected burns . J . Burn Care Rehabil., 23: 366-370.

11.Molan P. (1999). The role of honey in the management of wounds.J Wound Care. 8: 415-8

12. Natarajan, S.; Williamson, D.; Grey J.; Harding, K. and Cooper, R. (2001). Healing of an MRSA –colonized, hydroxyurea-induced leg ulcer with honey .J. Dermatol . Treat., 12: 33-36.

13. Efem, S.; Udoh, K. and Iwara, C. (1992). The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance . Infect., 20: 227-229.

14. Molan P. (1996).Honey as an antimicrobial agent. In: Mizrahi A, Lensky Y, eds., Bee products. New York: plenum press., 27-37

15. Bogdanov, S. (1996).Non-peroxide antimicrobial activity of honey. In: Mizrahi A, Lensky Y, eds., Bee products. New York: plenum press., 39-43

16. Fakoor, M. and Pipelzadeh, M. (2007). A study on the healing ffcte Effect of honey on infected open fracture wounds . pak. J. Med .Sci., 23: 327-329.

17. Dale, R.; Schnel, G. and Wong, J. (2004). Therapeutic efficacy of "nubiotics" against burn wound infection by *Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob. Agents Chemother., 48: 2918-2923.

18. Peh, K. and Khan, T. (2003). Apreliminary investigation of chitosan film as dressing. J. pharmaceut. Sci., 6(1):20-26.
19. Nisbet, H.; Nisbet,C.; Yarim,M.; Guler, A.; Ozak, A.(2010). Effects of Three Types of Honey on Cutaneous Wound Healing . Wounds., 22(11) : 275-283.
20. Molan PC. (2006).The evidence supporting the use of honey as a wound dressing. Int J Low Extrem Wounds., 5:40-54.
21. Tonks, A., Cooper, R., Jones, K., Blair, S., Parton, J., and Tonks, A. (2003) Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. Cytokine., 21: 242-247.

22. Alizadeh, A. M.; Sohanaki, H.; Khaniki, M.; Mohaghgheghi, M. A.; Ghmami, G. and Mosavi, M. (2011). The Effect of *Teucrium Polium* Honey on the Wound Healing and Tensile Strength in rat. Iran J. Basic Med. Sci., 14(6) : 499-505.

23. Subrahmanyam M. (1996) . Addition of antioxidant and polyethylene glycole 4000 enhances the healing property of honey in burns. Ann Burns Fire Disasters.,9:93-5.

24. Ndayisaba G.; Bazira L.; Habonimana E.; Muteganya D.(1993) [Clinical and bacteriological outcome of wounds treated with honey. An analysis of a series of 40 cases]. Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot., 79(2):111-113.

25. Yakar, I., Melamed, R., Shakhar, G., Shakhar, K., Rosenne, E ,.Abudarham, N., Page, G. and Ben-Eliyahu, S. (2003). Prostaglandine(2) suppresses NK activity in vivo and promotes postoperative tumor metastasis in rats. Ann. Surg. Oncol.,10(4) : 469- 479

26. Kozlov, V., Poveschenko, A., and Gromyhina, N. (1990) Some mechanism involved in the prostaglandin E2 immunosuppressive effect in F1 mice in vivo. Cell. Immunol., 128: 242-249.

27. Al-Waili, N. ; Salom, K. ; and Al-Ghamdi, A. (2011). Honey for Wound Healing, Ulcers, and Burns; Data Supporting Its Use in Clinical Practice. Sci. J. World., 11: 766-787

28. Al-Waili, N. (2003) Identification of nitric oxide metabolites in various honeys: effects of intravenous honey on plasma and urinary nitric oxide metabolites concentrations. J. Med. Food., 6: 359-364.

29. Baghel P, Shukla S, Mathur R, Randa R.(2009). A comparative study to evaluate the effect of honey dressing and silver sulfadiazene dressing on wound healing in burn patients. Indian J Plast Surg., 42: 176-81

30. Taormina, P., Niemira, B., and Beuchat, L. (2001) Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int*.J. Food Microbiol. 69: 217-225.
31. Azeredo L.; Azeredo M.; Souza S.; Dutra V.(2003). Protein contents and physiochemical properties in honey samples of Apis mellifera of different floral origins. Food Chem. 80(2):249-254.

32. Ferreres F, Garcia-Viguera C, Tomas-Lorente F, Tomas-Barberan F. (1993). Hesperetin: a marker of the floral origin of citrus honey. J Sci Food Agric., 61(1):121-123.

33. Koshio O, Akanuma Y and Kasuga M (1988) Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin recepter and its tyrosine kinase activity in intact cells. Biochem. J., 250 :95-101.
34. Tonks, A.; Cooper, R.; Price, A.; Molan, P. and Jones, K. (2001) Honey and monocyte modulation: a possible role in wound healing. Cytokine In press.
35. Efem, S. (1988). Clinical observations of the wound healing properties of honey. Br J Surg., 75: 679-81
36. Suguna L, Chandrakasan G, Thomas J.(1992). Influence of honey on biochemical and biophysical parameters of wounds in rats. J Clin Biochem Nutr.;13:7-12
37. El-Banby M, Kandil A, Abou-Sehly G, El-Sherif ME, Abdel-Wahed K. (1989) Healing effect of floral honey and honey from sugar-fed bees on surgical wounds (animal model). Fourth International Conference on Apiculture in Tropical Climates; Cairo, Egypt : 46-49.
38 . White, J. (1975). Composition of honey. In: Crane E, ed. Honey: Acomprehensive survey. Heinemann, London: 157-206
39. Abuharfeil, N., Aloran, R. and Aboshehada, M. (1999). The effect of bee honey on the proliferation activity of human B- and T-lymphocytes and the 86 activity of phagocytes. Food and Agric. Immunol., 11: 169-177
40. Tonks, A. Dudley, E. Porter, N. (2007). component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4. Journal of Leukocyte Biology., 82(5):1147–1155
41. Rendel M, Mayer C, Weninger W, Tschachler E. (2001) Topically applied of lactic acid increases spontaneous secretion of vascular endothelial growth factor by human constructed epidermis. Br J Dermatol., 145:3-9.
42. Rozaini, M.; Zuki, A.; Noordin, M.; Norimah, Y.; Hakim, A. (2004). The effects of different types of honey on tensile strength evaluation of burn wound tissue healing. Int J Appl Res Vet Med; 2:2.

Effect of natural bee honey in the healing of cutaneous wounds infected Pseudomonas aeruginosa with in white rats

Ass.Prof.Dr. Jamel Jary Yousef **Raghad Mohammed Ali Jasim**

University of Kufa /College Education for Girls / Biology

Abstract:

The present study was conducted at the Department of Biology in the College of Education for Girls - University of Kufa / Najaf for the period from November 2010 until December 2011 and aims to study the effec of natural bee honey dressing in skin wound flammation in the wounded white rats , infected with *Pseudomonas aeruginosta* and compared with the gentamycin dressing *In vivo***.** The results of microscopic examination of wounded skin tissue in the white rat groups infected with *P. aeruginosa* and treatment with natural honey dressing showed severe infiltration of the cells neutrophil cells, especially on the first day of a wound compared to other groups of control and gentamycin, and notes that the number of neutrophil cells, has decreased in the coming days of treatment and completely disappeared in the 14th day of treatment with natural honey dressing.

Also observed an increase in the number of macrophages on the 7th day of treatment with natural honey dressing .When counting macrophages observed the existence of significant differences between groups of control and gentamycin and the groups of rats treated with natural honey dressing on the 7th day and the macrophages population is large and significant in the groups treated with natural honey dressing , especially on the 14th day. Also seemed formation of blood and lymphatic vessels on the 7th day, while the composition was heavily in 21st of treatment with natural honey dressing. and highly significant than control and gentamycin groups .The results showed that the growth of collagen fibers appeared on the 7th day and was more pronounced and significantly and moral on the 14th and 21st day of treatment with natural honey dressing, compared with the gentamycin and control groups.