التأثير الحيوي والمناعي للاوزون المذاب في الماء ضد بعض المسببات المرضية الجلدية البكتيرية داخل الجسم الحي

ضحى سعد صالح* خالد عبد الرزاق حبيب** ندى صباح رزوقي**

تاريخ قبول النشر 18 /2 /2009

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة بهدف التحري عن تاثير استخدام الاوزون المذاب في الماء بتراكيز مختلفة على بعض الاحياء المجهرية البكتيرية المسببة لتلوث الحروق والجروح . حيث تم ولاول مرة على المستوى المحلي اختبار فعالية الاوزون تجاه بكتيريا *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* داخل الجسم الحي بعد استحداث الاصابة الجلدية تجريبياً بهذه المسببات المرضية في الفئران المختبرية والتي ظهرت عليها الاعراض السريرية للاصابة الجلدية بعد 48 ساعة وبعد ذلك عوملت فئران كل مجموعة بتراكيز مختلفة من غاز الاوزون المذاب في الماء نتج عنه انخفاض في الوقت اللازم للشفاء اعتماداً على التركيز الامثل من غاز الاوزون المذاب في الماء حيث وجد من خلال النتائج التي تم الحصول عليها ان التركيز الامثل من غاز الاوزون المذاب في الماء كان 60 مايكروغرام / مل لعلاج الاصابات الجلدية بكل من بكتيريا *S.aureus* وبكتيريا *P.aeruginosa* و مع اختلاف المدة الزمنية اللازمة للشفاء (حسب طبيعة الاصابة ونوع الكائن المجهري المسبب للاصابة) حيث كانت (5 ايام) بالنسبة لبكتيريا *S.aureus* و (7 ايام) لبكتيريا *P.aeruginosa* ، كما تضمنت الدراسة الحالية تسليط الضوء على بعض التاثيرات المناعية لغاز الاوزون المذاب في الماء في ذكور الفئران البيض السليمة والمصابة من خلال دراسة بعض المؤشرات المناعية لديها والتي هي : معامل البلعمة و تفاعلات آرثس وفرط الحساسية الآجل .

حيث اظهرت نتائج معاملة الفئران السليمة بغاز الاوزون المذاب في الماء ان لهذه المادة تاثيرا منشطا لجميع قيم الفحوصات المناعية المذكورة اعلاه عند التركيز 20 مايكروغرام / مل في حين ادت المعاملة بتركيز 60 مايكروغرام / مل الى انخفاضها ، و اختلفت الاستجابة المناعية لدى الفئران المصابة عن السليمة بالنسبة لتاثرها بالتراكيز المختلفة من غاز الاوزون المذاب في الماء عند معاملتها به حسب نوع الكائن المسبب للاصابة وطبيعة الاصابة .

كلمات مفتاحية : الاوزون المذاب في الماء, *Staphylococcus aureus* , *Pseudomonas aeruginosa* , الأخماج الجلدية

المقدمة

تعد الأخماج الجلدية البكتيرية من المشاكل الصحية المهمة التي يعاني منها المرضى لاسيما الراقدين في المستشفيات والتي تتراوح من حالات التهابية بسيطة الى حدوث مضاعفات خطيرة قد تنتهي بموت المريض خاصة عند وصول الممرض الى الدم وحصول حالات التسمم الدموي (septicemia) [2,1] . هذا بالاضافة الى ان تلوث الحروق والجروح بالبكتيريا له تأثيرات سيئة على عملية شفاء الجروح حيث ان للسموم التي تفرزها تلك الجراثيم دورا في تحطيم النسيج اللمفي والظهاري الذي على حافة الجرح المتقيح اضافة لتعطيلها عملية التئام الجرح وشفائه [3].

تعد المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* من اكثر الانواع البكتيرية المسؤولة عن الاصابات الجلدية السطحية اذ انها تشكل نسبة 60% من مجموع الاصابات الجلدية البكتيرية [4,1]. والذي يعود لامتلاكها عددا من عوامل الضراوة والتي ترتبط مع امراضيتها نظرا لقابليتها على افراز العديد من المواد خارج خلاياها كالانزيمات مثل انزيم مخثر البلازما (Coagulase) وكذلك تفرز انزيم Hyaluronidase ، والانزيم الحال للدم (Haemolysin) والمحلل للحامض النووي الدنا(DNase) ومحطم الخلايا البيض (Leucocidin) والحال للبروتين(Protease)، هذا الى جانب العديد من الذيفانات منها الذيفانات المعوية (Entertoxins) [5,2,1] فضلا عن وجود بروتين A والذي هو عبارة عن مستضد يقع على سطح الخلية يسهم في مقاومة البكتيريا لعملية البلعمة [7,6] ، تلتها في المرتبة الثانية بكتريا *P.aeruginosa* والتي تم عزلها من اغلب حالات الحروق والجروح الجلدية المنفتحة

* قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بغداد
** قسم علوم الحياة /كلية العلوم للبنات/جامعة بغداد

لكونها تعد من الأنواع البكتيرية الخطرة جدا والاصابات المتسببة عنها صعبة العلاج ومهلكة نظرا لكونها من الأنواع التي تمتاز بمقاومتها للعديد من المضادات الحياتية [5,2] ، وتصبح ممرض قوي اذا دخلت من مناطق خالية من الدفاعات كما في حالة تمزق الجلد والأغشية المخاطية (Mucous membrane) والحروق والجروح [8,5] يساعدها في ذلك امتلاكها لعدد من عوامل الضراوة المتنوعة مثل انتاجها للأنزيمات الحالة للدم (Heamolysis) والحالة للبروتين (proteinase) فضلا عن انتاجها لعدد من الذيفانات مثل Exotoxin A ، بالاضافة الى الصبغات (pigments) التي تفرزها وكذلك انتاجها للانزيم الحال للشحوم الفوسفاتية (Phospholipase) والحال للسشين (Lecithinase). وامتلاكها للطبقة الخارجية المخاطية والتي تدعى عديد السكر الخارجي المخاطي Mucoid expolysaccharide (Alginate) المضاد لعملية البلعمة (antiphagocytic) [4,2,1] مما ينتج عنه تسببها بأمراض كثيرة . بالاضافة للانواع البكتيرية الاخرى التي تم الاشارة اليهم في العديد من البحوث كمسببات لاخماج الجروح والحروق مثل : *Escherichia coli* ، *Streptococcus pyogenes* و *S.epidermidis* spp. و *Proteus* spp. و *Klebsiella* وغيرها [10,9,8,1] , فأن الاصابة بهم قد تكون واردة على الرغم من ان بعضها يكون غير مرضي يكتسب القابلية لأحداث الاصابة الجلدية من خلال امتلاكها لأنزيمات محللة للألياف والأنسجة الجسمية كالدم او بسبب توفر عوامل مهيأة لحدوث الاصابة مثل الجروح والقروح العميقة والحروق حيث تحدث عملية غزو لأنسجة الجسم السطحية مسببة الإصابة المرضية [9,8,1] .

ونظرا للاهمية المتزايدة بالأخماج الجلدية البكتيرية على الصعيد الطبي فقد استخدام العديد من المستحضرات لعلاجها والتي يقع ضمنها المضادات الحياتية الا ان هذه الاصابات لا زالت تعد من المشاكل المرضية المهمة حيث ان اغلب هذه المستحضرات ذات طبيعة كيميائية صرفة ولذا تعد سامة عند استخدامها بتراكيز عالية فضلا عن ازدياد مقاومة الجراثيم المرضية وظهور السلالات المقاومة بحيث اصبحت المقاومة للمضادات الحياتية احدى المشاكل الشائعة عالميا نتيجة لسوء الاستخدام [8,1] . لذا تركزت جهود الباحثين على ايجاد البديل لعلاج مثل هذه الاصابات المرضية في محاولة لتقليل الاعتماد على الادوية الكيميائية المنتجة صناعيا ومن هنا جاءت تقنية العلاج بالاوزون بعد ان اشارت الدراسات العالمية الى فعله المضاد لمدى واسع من الاحياء المجهرية الممرضة وبالتالي امكانية استخدامه في مجال العلاج الطبي فيما يتعلق بكثير من الامراض [14,13,12,11].

على ضوء ذلك ونظرا لعدم وجود دراسة محلية تتضمن التحري عن الفعل التثبيطي لغاز الاوزون المذاب في الماء ضد الاحياء المجهرية البكتيرية المسببة لبعض الاخماج الجرثومية التي تصيب الجلد و بهدف الوصول الى بديل علاجي مناسب لمثل هذه الحالات المرضية اجريت الدراسة الحالية والتي تضمنت دراسة الفعل التثبيطي والعلاجي لغاز الاوزون المذاب في الماء ضد بعض المسببات المرضية البكتيرية المسببة لتلوث الجروح والحروق التي تعود الى بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و بكتيريا *Staphylococcus aureus* لكونهما من المسببات الشائعة لاخماج الجروح والحروق بعد استحداث الاصابة تجريبياً بهما في الحيوانات المختبرية لمعرفة التأثيرات العلاجية للاوزون المذاب في الماء عند استخدامه بتراكيز مختلفة على هذه الحيوانات مقارنة بحيوانات السيطرة بالاضافة الى دراسة تاثيره على بعض المؤشرات المناعية للفئران السليمة والمصابة عند معاملتها به من خلال قياس معامل البلعمة(Phagocytic Index) واجراء اختباري تفاعل آرثس(Arthus reaction) وتفاعل فرط الحساسية الآجل (Delayed type- Hypersensitivity) .

المواد وطرائق العمل :

1- العزلات المرضية البكتيرية

استخدمت العزلات البكتيرية العائدة الى بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و بكتيريا *Staphylococcus aureus* والتي تم عزلها من المرضى المصابين بجروح وحروق مختلفة في مستشفى الكاظمية التعليمي ومستشفى الكرامة وتم اجراء التشخيص البكتيريولوجي لهذه العينات المعزولة اعتماداً على ما مذكور في المصادر [15,9] . ولحفظ العزلات البكتيرية فقد استخدم وسط الاغار المغذي المائل وحفظت في درجة حرارة 4مْ مع مراعاة تجديد المزارع كل 3-4 اسابيع ، لاستخدامها في هذه الدراسة .

2- احداث الاصابة في الحيوانات المختبرية

استعمل 68 فأراً سويسرياً ذكراً ابيض اللون ، بحيث قسمت الى عدة مجاميع بواقع 3 فئران في كل مجموعة وتم حلق الشعر عن جلد جميع الفئران في منطقة الظهر، ولاحداث الجروح استخدم مشرط معقم وكالآتي :

أ.المجموعة الاولى مجموعة السيطرة والتي تضمنت :

1. مجموعة فئران سليمة
2. مجموعة فئران مصابة بجروح غير ملوثة بالعالق الجرثومي .
3. مجموعة فئران مصابة بجروح ملوثة بالعالق الجرثومي .

ب. المجموعة الثانية

تضمنت فئران لوثت جروحها بالعالق البكتيري *P.aeruginosa* وبعمر 18 ساعة بتركيز 1×10^8 خلية بكتيرية / مل بعد مقارنتها مع عكورة المحلول القياسي لانابيب ماكفرلاند .

ج.المجموعة الثالثة

تضمنت فئران عوملت بنفس طريقة المجموعة الثانية باختلاف واحد هواستخدام العالق البكتري *S.aureus* لاحداث الاصابة .

بعد ذلك عوملت فئران كل مجموعة بتراكيز مختلفة من الاوزون المذاب في الماء وتم تسجيل مدة شفائها مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة والموجبة.

3- معالجة الحيوانات المختبرية

عولجت مجاميع الفئران المصابة وحسب نوع الكائن المجهري المسبب للإصابة وذلك بتعريضها للاوزون المذاب في الماء بتراكيز مختلفة (40،20، 60 مايكروغرام/مل) وبمعدل 3 أيام في الاسبوع لمدة 30 دقيقة (مع مراعاة الفترة الزمنية اللازمة لظهور الاعراض المرضية والتي هي 48 ساعة)أضافة الى مجموعة السيطرة .

اعتمد تقييم العلاج اساسا على اختفاء العلامات السريرية للإصابة مع ظهور الفحص السالب عند أخذ مسحات من منطقة الاصابة للكائن المسبب للإصابة.

4- قياس بعض المؤشرات المناعية في الحيوانات المختبرية

تم تقييم الاستجابة المناعية للفئران المعاملة من خلال قياس بعض المؤشرات المناعية لها وكالاتي:

1) البلعمة Phagocytosis

تعد عملية البلعمة مقياسا للاستجابة المناعية غير النوعية، واجريت هذه الطريقة بحسب الطريقة الموصوفة من قبل [16] مع اجراء بعض التحويرات :

حيث تم جمع 25 مايكروليتر من دم الفئران في أنابيب اختبار بلاستيكية معقمة وحاوية على الهيبارين كمانع للتخثر وخلط مع 25مايكروليتر من التخفيف 1×10^{-4} للعالق البكتيري *S.aureus* . وبعد مزج المحلول بلطف وضع المزيج في الحاضنة عند درجة حرارة 37°م لمدة 30 دقيقة، ثم اخذت قطرة من المزيج ووضعت على شريحة زجاجية لعمل مسحة وتركت لتجف و صبغت بصبغة لشمان لمدة دقيقتين و اضيف اليها بعد ذلك الماء المقطر وتركت لمدة 8 دقائق ، ثم فحصت الشريحة تحت المجهر على القوة (100×) وتم أيجاد معامل البلعمة كالآتي:

معامل البلعمة % = (عدد الخلايا المتبلعمة/العدد الكلي للخلايا) ×100

2) تمنيع حيوانات التجربة لفحوصات تفاعل آرثس وتفاعل فرط الحساسية الآجل Immunization Schedules

منعت كل مجاميع الفئران بعد احداث الاصابة فيها بحسب ما ذكر من قبل [17] وكما يلي:

اليوم الأول: حقنت جميع الفئران بـ 0.05مل من كريات دم الخروف الحمراء (SRBCs) في منطقة غشاء الخلب(Intraperitonial).

اليوم الرابع: تم تكرار أجراءات الحقن كما في اليوم الاول.

اليوم الثامن: اجري فحص أرثس.

اليوم التاسع: اجري فحص فرط الحساسية الأجل.

تفاعل آرثس Arthus Reaction

استعملت الطريقة المذكورة من قبل [17] لإجراء هذا الفحص وكالآتي: تم إجراء هذا الفحص في اليوم 8 بعد التمنيع في كل مجاميع الفئران المعاملة والسيطرة وذلك بحقن راحة القدم الخلفي الأيمن (Right hind foot pad) لكل فأر بـ 0.5 مل من كريات دم الخروف الحمراء المغسولة في داخل الأدمة (Intradermal) ، في حين حقنت راحة القدم الخلفي الأيسر(left hind foot pad) لكل فأر بـ 0.5مل من دارئ الفوسفات الملحي ، و سجل الفرق بين سمك راحة القدم الأيسر والأيمن بعد 4 ساعات من الحقن بكريات دم الخروف الحمراء (SRBCs) لحساب معامل تفاعل آرثس وكالآتي:

معامل تفاعل آرثس = الفرق بين سمك راحة القدمين الأيمن والأيسر

تفاعل فرط الحساسية الآجل –Delayed TypeHypersensitivity (DTH)

اجري هذا الاختبار بنفس الطريقة التي اجري بها تفاعل آرثس ولكن اخذت القراءات بعد 24 ساعة من الحقن بكريات دم الخروف الحمراء (SRBCs) أي في اليوم التاسع من التمنيع ، وتم أيجاد معامل تفاعل فرط الحساسية الآجل كالاتي:

معامل تفاعل تفاعل فرط الحساسية الآجل = الفرق بين سمك راحة القدمين الأيمن والأيسر

5- التحليل الاحصائي

تم تحليل النتائج احصائيا باعتماد النظام الاحصائي الجاهز (SPSS) وفقا للنموذج الاحصائي لتحليل التباين باتجاه واحد (ANOVA one way test) مع استخدام اقل فرق معنوي Least Significance Differences (LSD) لمعرفة وجود او عدم وجود فروق معنوية بين الجرع المختلفة وثبتت القيم على شكل (المعدل ± الانحراف المعياري).

النتائج والمناقشة :

1- احداث الاصابة في الحيوانات المختبرية

الاصابة بـ *S.aureus*

تم استحداث الاصابة الجلدية للفئران المختبرية بعالق بكتريا *S.aureus* و بعد مرور 48 ساعة لوحظت الاعراض السريرية في المنطقة المصابة والتي تميزت في بداية ظهورها بالتهاب جلدي وتورم و احمرار في المنطقة المصابة مع ظهور بقع متقيحة وخراجات في الطبقة السطحية للجلد (شكل1 a) ومع تقدم سير الخراج يحدث تبقع بنفسجي والذي يتفق مع ما ورد في الدراسات السابقة [18,5] .

وبعد المباشرة بعلاج هذه الفئران المصابة بالاوزون المذاب في الماء فانها قد تماثلت للشفاء بعد 5 ايام عند استخدام التركيز 60 مايكروغرام / مل يليه التركيز 40 مايكروغرام / ملم خلال مدة 8 ايام ومن ثم التركيز 20 مايكروغرام / مل خلال مدة 11 يوما مقارنة بمجموعة السيطرة والتي تماثلت للشفاء بعد 14 يوماً (جدول1) .

الاصابة بـ *P.aeruginosa*

تم استحداث الاصابة الجلدية للفئران المختبرية بعالق بكتريا *P.aeruginosa* حيث ظهرت الاعراض السريرية للاصابة الجلدية بعد مرور 48 ساعة والتي تميزت بظهور احمرار وتنخر في النسيج المصاب مع قيح ذي لون اخضر مزرق ومع تقدم سير الاصابة يتطور الى تقرح (ulcers) ثم اصبح على شكل ندبة او بثرة ذات مركز رصاصي او اسود اللون (شكل2a) ومع تقدم سير الاصابة قد تتطور الى منطقة ذات لون اخضر مزرق وذلك بسبب الصبغات التي تفرزها هذه البكتيريا والتي تؤدي الى تلون النسيج المصاب بها (شكل2 b) وجاءت هذه النتائج لتتفق مع ما اشارت اليه الدراسات السابقة [5] . لقد ذكرت معظم المصادران الاصابة بهذه البكتريا الممرضة من الصعب علاجها ، وبنفس الوقت فأن معظم الحالات التي تتواجد بها قد تستمر لتصبح الاصابة مزمنة والذي له علاقة بعوامل الضراوة العديدة التي تطلقها والتي تؤدي الى تنخر المنطقة المصابة وتاخر التئامها [5,4] .

بينت النتائج التي تم الحصول عليها فيما يتعلق بمعاملة الاصابة بالتراكيز المختلفة من الاوزون المذاب في الماء والفترات الزمنية اللازمة للشفاء والموضحة في الجدول(2) ان الفئران المعاملة بتركيز 60 مايكروغرام / مل قد تماثلت للشفاء بعد 7 ايام في حين ان الفئران المعاملة بتركيز 40 مايكروغرام / مل كان شفاؤها بعد 12 يوما يليها الفئران المعاملة بتركيز 20 مايكروغرام / مل التي شفيت خلال 16 يوماً مقارنة بمجموعة السيطرة والتي تماثلت للشفاء بعد 18 يوماً من الاصابة .

جدول (1) فترة الشفاء محسوبة بالايام لمجاميع الفئران المصابة ببكتريا S.aureus والمعالجة بالاوزون المذاب في الماء بتراكيز مختلفة.

المجموعة	عدد الفئران	التركيز المستخدم من الاوزون المذاب في الماء (مايكروغرام /مل)	فترة الشفاء بالايام
1	3	0	14
2	3	20	11
3	3	40	8
4	3	60	5

جدول (2) فترة الشفاء محسوبة بالايام لمجاميع الفئران المصابة ببكتريا *P.aeruginosa* والمعالجة بتراكيز مختلفة من الاوزون المذاب في الماء.

المجموعة	عدد الفئران	التركيز المستخدم من الاوزون المذاب في الماء (مايكروغرام /مل)	فترة الشفاء بالايام
1	3	0	18
2	3	20	16
3	3	40	12
4	3	60	7

a) اعراض بدء الاصابة ببكتيريا *S.aureus* في حيوانات التجربة .

b) تطور الاصابة في مجموعة فئران السيطرة بعد5 ايام .

c) الشفاء التام للحيوانات المصابة بعد5 ايام عند معالجتها بالاوزون المذاب في الماء بتركيز 60 مايكروغرام / مل .

شكل(1): يمثل الفئران المصابة ببكتريا *S.aureus* و معالجتها بالاوزون المذاب في الماء.

a) اعراض بدء الاصابة ببكتيريا *P.aeruginosa* في حيوانات التجربة .

تطور الاصابة في مجموعة فئران السيطرة بعد 7 ايام .

الشفاء التام للحيوانات المصابة بعد7 ايام عند معالجتها بالاوزون المذاب في الماء بتركيز 60مايكروغرام / مل .

شكل(2): يمثل الفئران المصابة ببكتريا *P.aeruginosa* و معالجتها بالاوزون المذاب في الماء.

اظهرت نتائج الدراسة الحالية التي تم الحصول عليها والموضحة في الجداول(2,1) ان التركيز الأمثل من غاز الأوزون المذاب في الماء كان 60 مايكروغرام / مل لعلاج الاصابات الجلدية بكل من بكتيريا *S.aureus* وبكتيريا *P.aeruginosa* مع اختلاف الفترة الزمنية اللازمة للشفاء حسب طبيعة الاصابة والكائن المجهري المسبب للإصابة , حيث كانت الاطول (7 ايام) بالنسبة لبكتيريا *P.aeruginosa* في حين كانت 5 ايام بالنسبة لبكتيريا *S.aureus* . وفي ضوء هذه النتائج يمكن القول أن معاملة الفئران المصابة بالأوزون المذاب في الماء نتج عنه قصر في الوقت اللازم للشفاء والذي اختلف حسب نوع الحالة المرضية والكائن المسبب للإصابة وهذا يتفق مع ما اشارت اليه بعض الدراسات [20,19] و يمكن تفسير ذلك بان التركيز الأمثل من غاز الأوزون المذاب في الماء لعلاج كل حالة قد استهلك جزء منه للقضاء على الكائن المجهري الممرض المسبب للإصابة من خلال عمله المطهر وهذا الجزء المستهلك من التركيز اختلف مقداره حسب نوع الكائن المجهري المسبب للإصابة والباقي استهلك لتحفيز الجهاز المناعي وفعالياته ولتسريع تفاعلات شفاء والتئام الاصابة [22,21] والذي يختلف ايضا حسب مقدار الضرر الناتج عن الإصابة , وهو ماذكره [12] من إن التراكيز العالية من الأوزون المنتج طبياً تستخدم عاملا منظفا ومطهرا للجروح بينما التراكيز الواطئة تسرع من عملية شفاء والتئام الجروح .

وفي ضوء ذلك يمكن القول ان نتائج هذه الدراسة تعد تاكيدا لنتائج دراسة تاثيراته المناعية كما سياتي ذكرها لاحقا ضمن هذه الدراسة , حيث وجد إن الأوزون يحفز على زيادة إفراز عوامل النمو الضرورية للالتئام مثل عامل النمو الانتقالي TGF-β والمواد الجاذبة (chemokines) للخلايا الملتهمة مثل IL-6 و IL-8 و GM-CSF هذا بالإضافة إلى فعله في زيادة تركيز البروستوكلاندينات مثل PGE2 وPGF2 [24,23] في المنطقة المعرضة للأوزون ، مما ينتج عنه تنشيط التفاعلات المناعية الموضعية كالاستجابة الالتهابية والتي تشترك فيها الخلايا الملتهمة في المنطقة المصابة ومن ثم سيتم التخلص سريعا" من الإصابة وإعادة إصلاح المنطقة المتضررة [26,25] .

2- تاثير غاز الاوزون المذاب في الماء على بعض المؤشرات المناعية في ذكور الفئران المصابة بانواع البكتيريا قيد الدراسة.

1. عملية البلعمة Phagocytosis

اظهرت النتائج المدونة في الجدول (3) والخاصة بمعامل البلعمة ان معاملة الفئران السليمة بالاوزون المذاب في الماء بتركيز 20 مايكروغرام / مل ادت الى رفع معدل البلعمة الى 33 % واكتسبت الزيادة فروقاً معنوية عند مقارنتها بمجموعة السيطرة عند مستوى الدلالة($p \geq 0.001$) وعند المعاملة بتركيز 40 مايكروغرام / مل و 60 مايكروغرام / مل نتج عنه انخفاض تدريجي في قدرة الخلايا البلعمية بلغ اقل قيمة له 15 % عند المعاملة بتركيز 60 مايكروغرام / مل والذي اكتسب الدلالة المعنوية عند مستوى($p \geq 0.001$) عند مقارنته بالسيطرة . اظهرت النتائج ايضا ان معاملة الفئران المصابة بغاز الاوزون المذاب في الماء عند التراكيز المختلفة ادى الى زيادة تدريجية في معامل البلعمة بلغت اعلى قيمة لها عند التركيز 60 مايكروغرام / مل حيث بلغت 42 % في الفئران المصابة ببكتيريا *S.aureus* والتي اكتسبت الدلالة المعنوية عند مستوى ($p \geq 0.001$) تلتها قيمة معامل البلعمة لدى الفئران المصابة ببكتيريا *P.aeruginosa* التي بلغت 36% والتي اكتسبت الدلالة المعنوية عند مستوى ($p \geq 0.01$) عند المقارنة بمجاميع السيطرة .

2. تفاعل آرثس Arthus Reaction

تبين النتائج الموضحة في الجدول (3) ان معاملة الفئران السليمة بالاوزون المذاب في الماء بتركيز 20 مايكروغرام / مل ادت الى زيادة قيمة معامل تفاعل ارثس الى 0.94 ملم والذي اكتسب الدلالة المعنوية عند مستوى ($p \geq 0.001$) في حين ان التراكيز الاعلى ادت الى خفضها الى 0.46 ملم و 0.25 ملم عند المعاملة بالتراكيز 40 و 60 مايكروغرام / مل على التوالي وكان الانخفاض معنوياً ($p \geq 0.001$) عند المعاملة بتركيز 60 مايكروغرام / مل .

ان معاملة الفئران المصابة ببكتيريا *S.aureus* وبكتيريا *P.aeruginosa* ادت الى رفع قيمة معامل تفاعل ارثس حتى بلغت اعلى قيمة لها وكانت 0.83 ملم و 0.77 ملم على التوالي عند التركيز 60 مايكروغرام / مل وهذه الزيادة اكتسبت الدلالة المعنوية عند مقارنتها بمجاميع السيطرة بالنسبة للاصابة البكتيرية .

3. تفاعل فرط الحساسية الآجل Delayed-TypeHypersensitivity (DTH)

توضح النتائج المبينة في الجدول (3) ان معاملة الفئران السليمة بغاز الاوزون المذاب في الماء بتركيز 20 مايكروغرام / مل ادت الى رفع قيمة معامل تفاعل فرط الحساسية الاجل الى 1.22 ملم وقد اكتسب هذا الارتفاع الدلالة المعنوية($p \geq 0.001$) في حين ان رفع تركيز الاوزون المذاب في الماء الى 40 و 60 مايكروغرام / مل ادى الى

خفض قيمة هذا المعامل الى 0.54 ملم و 0.36 ملم على التوالي والاخير اكتسب الدلالة المعنوية ($p \geq 0.001$) مقارنة بمجموعة السيطرة التي بلغت 0.58 ملم . اما الفئران المصابة ببكتيريا *S.aureus* و *P.aeruginosa* فقد اظهرت زيادة تدريجية في قيمة معامل تفاعل فرط الحساسية الاجل بزيادة تركيز الاوزون المذاب في الماء وصولاً الى اعلى زيادة لها عند التركيز 60 مايكروغرام / مل حيث اعلى قيمة لها وجدت في الفئران المصابة ببكتيريا *S.aureus* اذ بلغت قيمة هذا المعامل لديها 0.76 ملم ومن ثم الفئران المصابة ببكتيريا *P.aeruginosa* والتي بلغت هذه القيمة لديها 0.72 ملم وقد اكتسبت هذه الزيادة الدلالة المعنوية عند مستوى ($p \geq 0.001$) .

جدول (3): تاثير تراكيز مختلفة من غاز الاوزون المذاب في الماء على قيم بعض الاختبارات المناعية (المعدل ± الانحراف المعياري) في ذكور الفئران البيض المصابة ببكتيريا *S. aureus* و *P. aeruginosa*

الاختبارات المناعية	تركيز الاوزون المذاب (µg/ml)	عدد الفئران	فئران سليمة	فئران مجروحة	مصابة *S.aureus*	مصابة *P.aeruginosa*
معامل البلعمة(%)	صفر	3	1±25	1.5±26	2±30	1±29
	20	3	1±33 ***	1±28	1±32	3±30
	40	3	3±18 ○	1.5±32 ***	3±37	2±33
	60	3	1±15 ◙	2±20 ◙	2±42 ***	2±36 **
تفاعل آرثس (ملم)	صفر	3	±0.52 0.01	±0.58 0.05	±0.67 0.03	±0.63 0.03
	20	3	±0.94 0.1 ***	±0.59 0.01	±0.72 0.05	±0.65 0.05
	40	3	±0.46 0.03	±0.98 0.03 ***	±0.77 0.07 *	±0.71 0.06 *
	60	3	±0.25 0.02 ◙	±0.42 0.05 ◙	±0.83 0.04 **	±0.77 0.03 **
تفاعل فرط الحساسية الآجل (ملم)	صفر	3	±0.58 0.04	0.03±0.66	0.01±0.60	0.01±0.57
	20	3	±1.22 0.03 ***	0.04±0.73 *	0.04±0.63 **	0.04±0.59
	40	3	±0.54 0.03	0.04±1.54 ***	0.02±0.69 ***	0.01±0.65 **
	60	3	±0.36 0.03 ◙	0.01±0.49 ◙	0.02±0.76 ***	0.02±0.72 ***

* زيادة معنوية($p \leq 0.05$) ,** زيادة معنوية($p \leq 0.01$),*** زيادة معنوية($p \leq 0.001$)

○ انخفاض معنوي($p \leq 0.05$),◙ انخفاض معنوي($p \leq 0.001$)

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها عند دراسة الدور المناعي لغاز الأوزون المذاب في الماء عند استخدامه بتراكيز مختلفة , حصول زيادة في قيمة معامل البلعمة وتفاعل آرثس وتفاعل فرط الحساسية الأجل عند التراكيز الواطئة منه في حين إن التراكيز المتوسطة والعالية منه كان لها تأثير مثبط نتج عنه حصول انخفاض في قيم هذه المؤشرات المناعية ، والذي يوحي بان الأوزون مادة لها فعل محفز للاستجابة المناعية الخلوية والخلطية للجهاز المناعي بشكل عام عند التراكيز الواطئة منه في حين إن تراكيزه العالية لها تأثير مثبط عليها [27,11] فقد أشارت عدد من الدراسات والأبحاث إلى إن التراكيز الواطئة من الاوزون لها تأثير محفز لإنتاج عدد من السايتوكاينات مثل الانترفيرون و العامل التنخري للأورام (TNF) والانترلوكينات (IL) وبالأخص IL-2 , حتى انه قد وصف بمحفز السايتوكاينات [34,33,32,31,30,29,28,14,11] مما له علاقة بتحفيز زيادة عدد خلايا الدم بمختلف أنواعها . هذا بالإضافة لما يعرف عن هذه الوسائط المناعية في تنشيط وتنظيم عدد من التفاعلات المناعية المتسلسلة التي يحتاج إليها الجسم لمحاربة الأمراض والأورام السرطانية [35] ، والتي منها تنشيط وتحفيز وتنظيم فعالية الخلايا البلعمية والخلايا القاتلة الطبيعية Natural killer cells (NK) [36,35,8,1] . ودورها في زيادة إنتاج الخلايا اللمفاوية بنوعيها T و B وتمايزها وتحفيزها وتنظيم عدد من فعالياتها [36,35,7,4,3] مما ينتج عنه الفعل المحفز لهذا الغاز المذاب في الماء عند التراكيز المنخفضة منه على قيم تفاعل ارثس وتفاعل فرط الحساسية الأجل باعتبار أن تفاعل ارثس يمثل النمط الثالث من تفاعلات فرط الحساسية الجلدية الذي يتوسطه المعقد المناعي (Immune complex) في حين أن تفاعل فرط الحساسية الأجل (DTH) يمثل النمط الرابع من تفاعلات فرط الحساسية والذي يعد مقياس مهم للمناعة المتوسطة بالخلية (CMI) (16,7) والذي له علاقة بفعل هذا الغاز في تحفيز نمو وتمايز خلايا B بالإضافة إلى دوره في تنشيط خلايا T الذي أشارت له العديد من المصادر [38,37,34,29,27,13] .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية كذلك الفعل التثبيطي لغاز الأوزون المذاب في الماء على الاستجابة المناعية بنوعيها الخلطية والخلوية عند التراكيز العالية منه بدءا"من تأثيره التثبيطي في نقصان قيمة معامل البلعمة ، والذي قد يعود إلى تأثيره السمي الخلوي على الخلايا الطبيعية عموما" وخلايا الدم البيضاء خصوصا" . وهذا ينتج عن فعله المؤكسد ضد بعض الإنزيمات الضرورية المنظمة لنمو وتمايز خلايا الدم بالإضافة إلى فعله المؤكسد على المكونات الدهنية في الأغشية السايتوبلازمية الخلوية [31] والذي قد يفسر التأثير المثبط للأوزون المذاب في الماء عند التعرض له بتراكيز عالية على عمل الخلايا البلعمية حيث إن تأثر أغشيتها السايتوبلازمية والتي لها دور مهم في بداية عملية البلعمة من خلال عملية الالتصاق يؤثر سلبا" على عملها بسبب غلق مواقع المستقبلات (Receptors) لكل من C3b والضد IgG2 وعدم حدوث الاستساغة [16] . إضافة إلى فعله المدمر لأغشيتها السايتوبلازمية عند تعرضها له بتراكيز عالية [41,40,39,34,30] .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية كذلك حصول انخفاض في قيم تفاعل ارثس في مجاميع الحيوانات المعاملة بتراكيز عالية من غاز الاوزون المذاب في الماء والذي يتفق مع ما وجده بعض الباحثين من حصول انخفاض في عيارية الأجسام المضادة IgA ، IgG بزيادة مدة التعريض أو زيادة تركيز الأوزون المستخدم في المعاملة [38] هذا من ناحية , ومن ناحية أخرى فقد ذكر بعض الباحثين أن هناك علاقة ما بين عدد خلايا الدم البيضاء العدلة وقيم تفاعل ارثس حيث إن نقصان عدد خلايا الدم البيضاء العدلة الدائرة في الجسم يؤدي إلى تقليل قيم تفاعل ارثس [42] .

من المعروف أن المناعة الخلوية تكون مترافقة مع الاستجابة الجهازية للجسم و تتأثر بالاستجابة المناعية الخلطية في موضع الإصابة [42] , بالتالي فان التأثير المثبط لغاز الأوزون المذاب في الماء عند استخدامه بتراكيز عالية لعدد من الفعاليات المناعية والتي من ضمنها نقصان العدد الكلي لخلايا الدم البيضاء والتي من ضمنها نقصان في عدد الخلايا اللمفاوية بنوعيها T و B سوف يرافقه انخفاض في عيارية الأجسام المضادة و مستوى إنتاج السايتوكينات التي تفرزها هذه الخلايا . وهذا ما يؤدي إلى تثبيط عدد من الفعاليات المناعية التي تسهم فيها وتنظمها مثل الفعاليات المناعية المتواسطة بالخلايا . وهذا ما أشار إليه عدد من الباحثين الذين سجلوا حصول تثبيط معنوي في المناعة المتواسطة بالخلايا عند التعرض المستمر للاوزون [37] والذي يتفق مع نتائج الدراسة الحالية.

كما أظهرت نتائج الدراسة الحالية حصول اختلاف في الاستجابة المناعية للتأثير المحفز والمثبط لغاز الأوزون المذاب في الماء مابين الحيوانات السليمة و الحيوانات المصابة بأحد المسببات المرضية ، حيث أظهرت نتائج معاملة الفئران السليمة بغاز الاوزون المذاب في الماء أن لهذه المادة تأثيرا منشطا لجميع قيم الفحوصات المناعية التي تمت دراستها عند التركيز 20 مايكروغرام / مل في حين أن المعاملة بتركيز 60 مايكروغرام / مل أدت إلى انخفاضها ، في حين

اختلفت الاستجابة المناعية لدى الفئران المصابة عن السليمة بالنسبة لتأثرها بالتراكيز المختلفة من غاز الاوزون المذاب في الماء عند معاملتها به وحسب نوع الكائن المسبب للاصابة وطبيعة الاصابة وهذا الاختلاف قد يعزى إلى استهلاك جزء من غاز الأوزون المذاب في الماء لإبادة هذه المسببات المرضية وجزء أخر في الفعاليات البنائية لتجديد الخلايا المصابة وتسريع عملية الشفاء ، وبالتالي فان تركيز الأوزون المستخدم في بدء المعاملة يختلف ويقل عما بدأ به ومن ثم فان الاستجابة لهذا التركيز تختلف مابين الحيوانات السليمة و الحيوانات المصابة .

المصادر:

1. Levinson , W & Jawetz , E . 2000 . Microbiology and immunology examination and Board review . 6th ed ., Mc Graw – Hill Companies , Inc ., USA.pp336-408.
2. Brooks , G. F. , Butel , J. S. & Morse , S. A. 2004 . A lange Medical Book- Jawetz , Melinick & Aldelberg ,s Medical Microbiology . 23rd ed . ,Mc Graw Hill companies , United States .pp133-235.
3. Walter , J. B. & Talbot , I.C. 1996 . General Pathology . 7th ed. Mosby Company. New york . USA .pp41-50.
4. Schaechter , M. ; Engleberg , N. C. ; Eisenstein , B. I. & Medoff , G. 1999 . Mechanisms of Microbial Disease . 3th ed . , Lippincott Williams & Wilkins . A wolters kluwer company, USA.pp129-286.
5. Nester , E. W. ; Anderson , D. G. ; Roberts , C. E. ; pearsall , N. N. & Nester, M. T. 2001. Microbiology - Ahuman perspective . 3ed ed . Mc Graw – Hill Companies . U S A.225-249.
6. Greenberg , P. D. ; Bayer , S. A.; Turner , D. & Word , I. J. 1990 . Antibody responses to protein A in patients with *Staphylococcus aureus* Bacteremia & Endocarditic . J. Clin . Microbiol ., 28(3) : 458 – 462 .
7. Parslow , T. G., Stites , D. P. ; Terr , A. I. & Imboden , J. B. 2001 . Medical Immunology . 10th ed . , Lange Medical Books / Mc Graw-Hill Companies , Inc .,USA.pp148-175.
8. Brooks , G. F. ; Butel , J. S. & Morse , S. A. 2001. Jawetz , Melnick & Adelberg's Medical Microbiology . 21nd ed . , Lange Medical Books / McGraw – Hill Companies . USA .pp46-109.
9. Forbes , B. A. , Sahm , D.F.& Weissfeld , A.S. 1998 . Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology. 10th ed . Mosby Company , USA .pp423-606.
10. Baron,E.J.;Peterson,L.R.& Finegold, S.M. 1994 . Bailey & scotts- Dia gnostic Microbiology . 9th ed . , Mosby- year books , Inc . st . Louis , Missouri , U S A.pp133-156.
11. Null , G. 1995 . Ozone : A wide – spectrum Healer . Ozone Science and Engineering ,9:65-72.
12. Chow , P. 2001. Healing ozone. Canadian J. of Health and Nutrition, 156:26 – 27.
13. Hansler , R. 2003. The use of ozone in medicine , Mechanisms of action . 2nd Ozone Congress(May 23-25) , European cooperation of the Medical Ozone Societies , Munich , Germany.
14. Sorge , R.H. 2004 . Introduction to ozone therapy .Ozone Science and Engineering ,8:47-55.
15. Macfaddin , J .F. 2000 . Biochemical test for identification of Medical Bacteria. 3rd ed. The Williams& wilkins-Baltimore , USA .pp57-439.
16. Metcalf,J.A.; Gallin,J.I.;Nauseef, W.M. &Root, R.K. 1986. Laboratory Manual of Neutrophil Function. Raven Press. New York.pp87.
17. مسعودان ، جمال .2002. بعض التاثيرات المناعية لنبات الشيح *Artemisia*

herbalba في الفار الابيض *Mus musculus* . رسالة ماجستير . كلية التربية ابن الهيثم . جامعة بغداد .

18. العبودي ، نسرين جاسم محمد . 2001 . حالات الدم وامراضية المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من مصادر حيوانية . رسالة ماجستير . كلية التربية . جامعة البصرة .

19. Filippi , A. 2001. The influence of ozonised water on the epithelial wound Healing process in the Oral Cavity. 5th Ozone Medical Conference(June 20-23), London. (United Kingdom) .

20. Sanchez,A.;Diaz,P.; Rodriguez, G.;Leyva ,E.;Diaz,E.& Borrego L. 1997.The Action of ozonized oil on the healing process of skin wounds and Normal animals .2nd international Symposia on Ozone Applications. Havana ,Cuba. (Abstract).

21. Xie , W. ; Zhang , L. & Yang , R. 2000. The Role of ozone solution on debridement and sterilization of burn wound. Zhonghua Shao Shang Za Zhi , 16(3):163 – 5. (Abstract) .

22. Valacchi , G. ; Fortino , V. & Bocci , V. 2005. The dual action of ozone on the skin. British J. of Dermat. , 153(6) : 1096 – 1100 .

23. Arsalane,K.;Gusset,P.;Vanhee,D.; Voisin,C.; Hamid,Q.; Tonnel,A. & Wallaert,B. 1995. Ozone stimulates synthesis of inflammatory cytokines by alveolar macrophages in vitro. Am.J. Respir.Cell Mol.Biol.,13(1):60-68.(Abstract).

24. Bocci , V. ; Luzzi , E. ; Corradeschi , F. & Silvestri , S. 1994. Studies on the Biological effects of ozone : 6- production of transforming growth factor 1 by human blood after ozone treatment. J.Biol. Regul. Homeost. Agents , 8(4):108 – 112 (Abstract).

25. Sunnen , G. V. 2000 . The utilization of ozone for external medical applications .Ozonics International J.,23(2):131-141.

26. Valachi ,G.& Bocci,V. 2000. Studies on the Biological effects of ozone :11.Release of factors from human endothelial cells .Mediators inflamm ., 9(6) :271 -6(Abstract).

27. Bocci , V. 1999. Biological and clinical effects of ozone , Has ozone therapy a future in medicine ? British Journal of Biomedical Science , 56 (4): 270 – 279.

28. Bocci,V.;Aldinucci,C.;Borrelli,E.; Corradeschi, F.;Diadori,A.; Fanetti,G.& Valacchi,G. 2001. Ozone in Medicine . Ozone Science & Engineering , 23(3):207 -217.

29. Jakab ,G.J.; Spannhake ,E.W.; Canning ,B.J.;Kleeberger ,S.R.& Gilmour,M.L. 1995.The Effects of Ozone on Immune function . Environmental Health Perspectives , 103(2):77-89.

30. Bocci ,V. 1996. Ozone as a bioregulator .Pharmacology and toxicology of ozone therapy today .J.Biol.Regul.Homecst. Agents, 10(2): 31 – 53.

31. Larini , A. & Bocci , V. 2005. Effects of ozone on isolated peripheral Blood mononuclear cells. Toxicol. In. vitro , 19(1) :55 – 61.

32. Menendez, S. 2000 . Bio chemical Mechanisms present in medical ozone Applications . 2nd International symposia on ozone Applications , ozone Research center , Havana , cuba .(Abstract).

33. Paulesu , L. ; Luzzi , E. & Bocci , V. 1991 . Studies on the biological effects of ozone : 2- Induction of Tumor Necrosis Factor (TNF) on human leucocytes . Lymphokin & Cytokine Research , 10(5) : 409 – 412 . (Abstract) .

34. Shallenberger ,F. 1983. Primary Physiological effects of Ozone. Paper presented at the IOA 6th Ozone world Congress(May 15-17) ,Wash .DC.,USA.

administration . Toxicol. Lett. 18(2) : 57 – 61 (Abstract) .

40. Goldstein , E. ; Bartlema , H. C. ; ploeg , M . ; Duijn , p. ; stap , V. D. & Lippert , w. 1978 . Effect of ozone on lysosomal enzymes of alveolar macrophages engaged in phagocytosis & killing of inhaled *S . aureus* . J. infect Dis. 138(3) : 299 – 305 (Medline) .

41. Dohm , M. R. ; Mautz , W. J. ; Andrade , J. A. ; Gellert , K. S. ; Ferguson , L. J. ; Nicolaisen , N. & Fujie , N. 2005 . Effects of ozone exposure on non – specific phagocytic capacity of pulmonary macrophages from an amphibian , Bufo marinus . Environmental Toxicology & chemistry, 24 (1) : 205 – 210 (Abstract) .

42. Joshi, K. R. & Osamo , N. O. 1994 . Immunology. 4th ed ., . AGro Botanical publishers . India .pp324.

35. Goldsby , R. A. ; Kindt , T. J. & Osborne , B. A. 2000 . Kuby Immunology . 4th ed . , W. H. Freeman & company , New york , U S A.70-74.

36. Roitt , I. ; Brostoff , J. & Male , D. 2001 . Immunology . 6th ed . Mosby company . Spain .pp45.

37. Fujimaki ,H . ; Shiraishi , F . ; Ashikawa , T . & Murakami , M. 1987. Changes in delayed hypersensitivity reaction in mice exposed to O3 . Environ . Res . 43:186-190. (Abstract).

38. Gilmou , M. I. & Jakab , G. J. 1991 . Modulation of immune function in mice exposed to 0.8 ppm ozone . Inhalation Toxicol. 3(3) : 293 – 308 . (Abstract) .

39. Wenzel , D. J. & Morgan , D. L. 1983 . In – vitro inhibition of alveolar macrophage phagocytosis by ozone - Absence of role for serum or mode of ozone

Biological & Immunological Effect of Ozonated Water on Certain Skin Pathogenic Bacteria In vivo

*Dhuha S.Salih** *Khalid A.Habib*** *Nada S.Rezoqe****

*Biology Dep./College of Science/Baghdad University
**Biology Dep./College of Sciencefor women/Baghdad University

Key words: ozonated water, *Pseudomonas aeruginosa* , *Staphylococcus aureus* , skin infection

Abstract:

This *in vivo* study was conducted to investigate the effect of different concentrations of ozonated water on experimentally skin infection with some of bacterial isolates (*Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*) which Showed dermal infection in experimental animals after 48 hours of exposure to these Microorganisms.

Results revealed that ozone has the power to accelerated the healing process depending on the perfect concentration of ozonated water used and the severity of infection & nature of causative agent , in which the recovering period was 7 days for the infection caused by *P. aeruginosa* and 5 day for *S.aureus* by using the concentration 60 µg/ml .

Results also indicated in this study the stimulated effect of Ozonated water on the immune system For the healthy mice at the concentration 20µg/ml through increasing in Phagocytic index ,Arthus and Delayed Type- Hypersensitivity reaction in addition to the inhibited effect of this material on this immunological Markers when the animals treated with Ozonated water at the concentration 60µg/ml .

Different respond appear with the immune system For injured and infected mice when treated with ozonated water depending on the Kind of causing agent and the severity of infection .