المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٢، العدد ١، ٢٠٠٨ (١١-١٧)

تأثير خل التفاح على شفاء الجروح المخمجة تجريبيا بجرثومة *Pseudomonas aeruginosa*

ذكرى سليم علي، سمية ياسين الدباغ و أسماء حسين علاوي*

فرع الأحياء المجهرية، * فرع الجراحة والتوليد، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

(الاستلام ٢٦ كانون الأول ٢٠٠٦؛ القبول ٧ حزيران ٢٠٠٧)

الخلاصة

تم عمل جروح قياسية في منطقة الظهر لــ 18 أرنبا , اذ قسمت حيوانات التجربة الى ستة مجاميع بواقع ثلاث حيوانات لكل مجموعة وتضمنت المجموعة الاولى جروح نظيفة عوملت بالمحلول الملحي الفسلجي كمجموعة سيطرة لغرض المقارنة, المجموعة الثانية جروح مخمجة عولجت بالمضاد الحيوي Cefotaxime بتركيز 500 mg , والمجاميع الثالثة والرابعة والخامسة عولجت بالتراكيز 5%, 3.75 %, 2.5 % من مادة خل التفاح الطبيعي على التوالي. اما المجموعة السادسة فعولجت باستعمال المضاد الحيوي Cefotaxime مع خل التفاح بتركيز 3.75 % بكميات متساوية. وقد تم تخميج الجروح باستخدام عزلات من جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* وفي نفس المدة الزمنية لجميع المجاميع. وكانت المدة الزمنية للمعالجة مرة كل 48 ساعة لحين الوصول الى الشفاء التام. بينت الدراسة ان نتائج العلاج بمادة خل التفاح الطبيعي بتركيز 3.75 % كانت مقاربة جدا للعلاج بالمضاد الحيوي, اذ اختزل عدد الجراثيم تدريجيا وبنفس المعدلات تقريبا, في حين كانت المعالجة بالمضاد الحيوي مع الخل افضل وكان الشفاء أسرع من كل منهما على حدة.

Effect of apple cider vinegar on the healing of experimentally–induced wounds infected with *Pseudomonas aeruginosa*

T. S. Ali, S. Y. Al Dabbagh and A. H. Alawi*

Department of Microbiology, *Department of Surgery and Obstetrics,
College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract

Standard wounds were made in the backs of 18 rabbits. The rabbits were then divided into 6 equal groups. Rabbits of group (1), constituted a control group and their wounds were treated with physiological saline solution. In group (2), the wounds were treated with Cefotaxime at a concentration of 500 mg. Wounds of the third, fourth, and fifth groups were treated with 5%, 3.75%, and 2.5% apple cider vinegar respectively. Wounds of the sixth groups of rabbits were treated with a combination of equal amounts of Cefotaxime and apple cider vinegar 3.75%. All of the wounds were infected with various isolates of *Pseudomonas aeruginosa* at the time of infected. Wound treatment was done each 48 hours until complete healing. Results of this study indicated that using apple cider vinegar 3.75% gave results similar to those obtained by using the antibiotic (same rates of bacterial reduction). However, using a combination of equal amounts of apple cider vinegar and the antibiotic lead to more rapid and more better healing than using each one of them alone.

المقدمة

يعد خل التفاح ناتج غير كحولي لعملية التخمر لعصير التفاح Cider بفعل جرثومة Acetobacter, اذ تعمل هذه الجراثيم على تحويل الكحول الى حامض الخليك بوساطة عملية الاكسدة (1). وان حامض الخليك واللبنيك هما ناتجان عن تخمر السكر الثنائي اللاكتيولوز Lactulose الذي يستخدم بوصفه مسهلا ارتشاحيا Osmotic laxative في القولون, وكلاهما يمنعان نمو الجراثيم التي تنتج الامونيا في الامعاء (2). كما تم استخدامه حديثا لمعالجة التهاب الجروح وخاصة لدى المرضى الراقدين في المستشفيات (3).

تعد جرثومة الـ *Pseudomonas aeruginosa* من اكثر المسببات الجرثومية شيوعا في خمجات الجروح والحروق لدى المرضى الراقدين في المستشفيات (5,4) وذلك نتيجة توغلها بأنسجة الجلد المتكسرة واحداثها اضرارا" في انظمة المضيف , فضلا عن انتاج القيح, اذ ان التهابات الجروح تحدث مباشرة بعد ولوج الجرثومة الى الجرح عند اجراء العمليات او لانتشار الجرثومة الى الجروح المفتوحة كالحروق (6). كما يمكن لهذه الجراثيم من احداث اصابات واسعة مرافقة لوجود بعض الظروف المهيأة للاصابة كالجروح والضعف العام والتعرض العالي للمضادات الحيوية(7), ونتيجة الاصابة بهذه الجراثيم يحدث تحطم بالانسجة يعزى الى عدد من عوامل الضراوة التي تمتلكها هذه الجراثيم (8). يهدف البحث الحالي الى دراسة تأثير خل التفاح الطبيعي على جراثيم الـ *Pseudomonas aeruginosa* وتحديد التركيز الامثل في العلاج والمدة الزمنية لحدوث الشفاء.

المواد وطرائق العمل

الحيوانات المختبرية

تم استخدام 18 حيوانا من ذكور الأرانب البالغة والسليمة من الأمراض من السلالات المحلية بعمر (1.5-2) سنة والتي بلغ وزنها (1.5-2) كيلوغرام, وضعت الحيوانات اثناء مدة الدراسة في أقفاص منفصلة عن بعضها البعض وأبعادها (0.5 X 1 X 1) متر, في بيت الحيوانات في كلية الطب البيطري, جامعة الموصل, وتم مراقبتها يوميا. استخدم 6 ارانب لكل عزلة من العزلات المستخدمة قيد الدراسة.

المضاد الحيوي

استخدم المضاد الحيوي Cefotaxime (CF 500 mg) (بشكل مسحوق powder), تم تحليله بالماء المقطر المعقم, والذي يستخدم بشكل واسع في علاج التهابات الجروح. استخدم في الدراسة الحالية بعد استشارة الاختصاصيين في مستشفى السلام العام في مدينة الموصل.

الجراثيم

تم الحصول على جراثيم الـ *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من حالات التهابات الجروح للمرضى الراقدين في مستشفى السلام العام في الموصل والمشخصة عزلاتها باستخدام الصفات الشكلية والزرعية والكيموحيوية, فضلا عن استخدام عدة التشخيص API 20E (10,9). استخدم في الدراسة ثلاث عزلات من جراثيم *P. aeruginosa* بثلاث شفرات رقمية.

خل التفاح الطبيعي Apple cider vinegar

محضر من شركة اميركان جاردن – سيفورد نيويورك – الولايات المتحدة الامريكية والمطروح في الاسواق المحلية.

المعلق الجرثومي

تم زرع جرثومة الـ *P. aeruginosa* على وسط المرق المغذي وحضنت بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة ومن ثم رسب العالق باستخدام جهاز الطرد المركزي وبسرعة 5000 دورة في الدقيقة لمدة 20 دقيقة, أهمل الراشح وغسل الراسب باستعمال محلول الملح الفسلجي ثم اعيد تعليقه بمحلول الملح الفسلجي وتم تحديد تركيز الجراثيم بمقارنته بأنابيب ماكفرلاند القياسية (انبوب رقم 1) والذي يعادل 1.5×10^8 خلية /مل (11), تم بعدها حقن 0.1 مل من المعلق الجرثومي في جروح المجاميع المعدة للخمج مع ترك المجموعة الاولى بدون حقن للسيطرة.

التقنيات الجراحية

تم تحضير منطقة الظهر بأتباع المبادئ الأساسية للجراحة (12) وخدرت الحيوانات باستخدام كبريتات الاتروبين بجرعة قدرها 0.04 ملغم / كغم من وزن الجسم بالعضلة كجرعة مهدئة أولية وبعد مرور 10 دقائق استعمل مزيج من الكيتامين بتركيز 5% بجرعة قدرها 35 ملغم / كغم من وزن الجسم والزايلازين بتركيز 2 % بجرعة قدرها 3 ملغم / كغم من وزن الجسم وحقن المزيج بالعضلة, رقدت الحيوانات على الجهة البطنية وتم احداث جرح جلدي بطول 3 سم في ظهر الحيوان وبمسافة 4 سم عن الخط الوسطي الظهري بعد ذلك قسمت الحيوانات الى ستة مجاميع ومن ثم تم حقن المعلق الجرثومي في جميع الجروح الجلدية المحدثة عدا مجموعة السيطرة التي حقنت بالمحلول الملحي الفسلجي. تم متابعة

الحيوانات يوميا لحين حصول الخمج للجروح المحقونة بالجراثيم ثم عوملت كالاتي:
- المجموعة الاولى: جروح نظيفة حقنت بالمحلول الملحي الفسلجي (مجموعة السيطرة).
- المجموعة الثانية: جروح مخمجة عولجت موضعيا بالمضاد الحيوي Cefotaxime .
- المجموعة الثالثة: جروح مخمجة عولجت موضعيا بالتركيز 5 % من خل التفاح الطبيعي.
- المجموعة الرابعة: جروح مخمجة عولجت موضعيا بالتركيز 3.75 % من خل التفاح الطبيعي.
- المجموعة الخامسة: جروح مخمجة عولجت موضعيا بالتركيز 2.5 % من خل التفاح الطبيعي.
- المجموعة السادسة: جروح مخمجة عولجت موضعيا بالمضاد الحيوي Cefotaxime مع خل التفاح الطبيعي بالتركيز 3.75 %.

بعد معاملة الجروح المخمجة, فضلا عن مجموعة السيطرة تم تغطية الجروح بشاش طبي معقم وتم تقييد الرقبة للحيوانات لتحديد حركتها ومنعها من الاقتراب من الجرح.

العزل الجرثومي

اخذت مسحات من الجروح المخمجة والمعاملة بوساطة ماسحات قطنية معقمة موضوعة في المرق المغذي بعد (11,9,7,5,3) يوم من الحقن وتم إجراء تخافيف عشرية للجرثومة لغاية 10^{-6} وتم حساب العدد الحي من التخافيف الأخيرة بإتباع الطريقة القياسية للعدد بالأطباق (11), ولوحظ الفرق في أعداد الجراثيم نتيجة طرق العلاج المستخدمة.

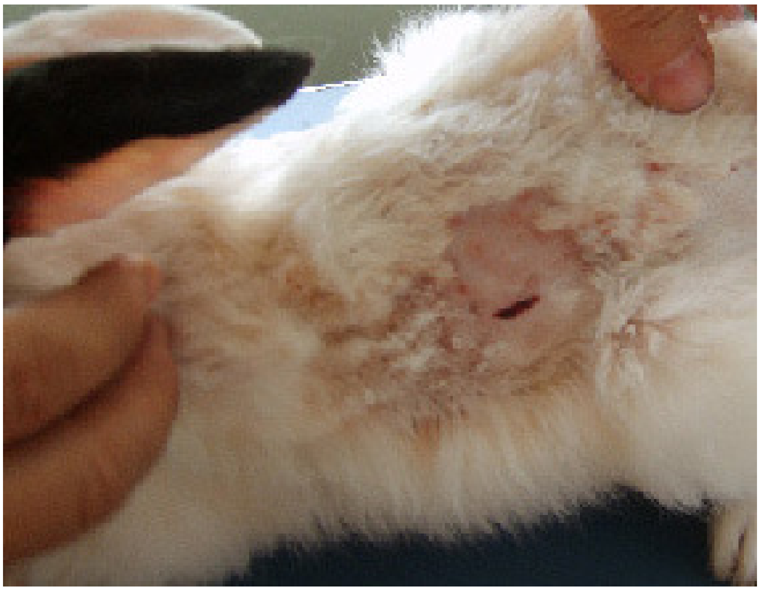
الإحصاء

تم اجراء التحليل الاحصائي باستخدام اختبار Unpaired t-test (13) للتعرف على دلالة الفروق بين مجاميع التفاعل وعند مستوى معنوية $P \leq 0.001$.

النتائج

التغيرات العيانية

اظهرت الجروح المخمجة بالجراثيم وجود قيح ونضح التهابي في مكان الجرح مع حدوث نخر للنسيج وذلك بعد 72 ساعة من التخميج , صورة (1). كما اظهرت الفحوصات العيانية للجروح
المخمجة بعد استخدام العلاجات المذكورة حدوث التئام للجروح وذلك من خلال تكون النسيج الحبيبي الناضج خلال 2-3 ايام لمجموعة السيطرة و 7-9 ايام للمجموعة الثانية و 10-12 يوم للمجموعة الثالثة و 9-10 ايام للمجموعة الرابعة واكثر من 11 يوم للمجموعة الخامسة و 8-9 ايام للمجموعة السادسة , صورة (4,3,2) .



صورة 1: جروح في جلد الأرانب في المنطقة الظهرية في مجموعة السيطرة.

صورة 2: التفاعل المحدث في الجروح للأرانب المحقونة بجرثومة الـــ *Pseudomonas aeruginosa* بعد مرور ثلاثة أيام من الخمج يوضح النضح في منطقة الجرح.

صورة 3: توضح بداية التماثل للشفاء بعد المعالجة بخل التفاح الطبيعي للتركيز 3.75 %.

صورة 4: حدوث التئام الجروح المخمجة والمعالجة بخل التفاح الطبيعي والمضاد الحيوي معا نتيجة تكون النسيج الحبيبي.

العزل الجرثومي

تغايرت أعداد الجراثيم المعزولة من الجروح المخمجة باختلاف طرق العلاج المستعملة والمدة الزمنية, إذ ظهرت فروق معنوية بين مجاميع التفاعل وكما موضح في الجداول (3,2,1).

الجدول 1: العدد الحي للجراثيم x 10^6 في طرق العلاج المستخدمة خلال مدد زمنية مختلفة لجرثومة *Pseudomonas aeruginosa* بالشفرة الرقمية 2212000 .

الوقت بالأيام	المجموعة 1 سيطرة	المجموعة 2 Cefotaxime	المجموعة 3 خل 5 % pH 2.76	المجموعة 4 خل 3.75% pH 2.82	المجموعة 5 خل 2.5% pH 2.88	المجموعة 6 Cefotaxime + خل 3.75%
3	0	144	195	150	225	130
5	0	65	118	98*	200	70
7	0	25	51	66*	106	45**
9	0	4	25	3	12	0
11	0	0	3	1	8	0

* فرق معنوي عن مجموعة المضاد الحيوي عند مستوى معنوية P≤ 0.001.

** فرق معنوي عن مجموعة الخل (3.75%) عند مستوى معنوية P≤ 0.001.

الجدول 2: العدد الحي للجراثيم 10^6 x في طرق العلاج المستخدمة خلال مدد زمنية مختلفة لجرثومة *Pseudomonas aeruginosa* بالشفرة الرقمية 2246004 .

الوقت بالأيام	المجموعة 1 سيطرة	المجموعة 2 Cefotaxime	المجموعة 3 خل 5 % pH 2.76	المجموعة 4 خل 3.75% pH 2.82	المجموعة 5 خل 2.5% pH 2.88	المجموعة 6 Cefotaxime + خل 3.75%
3	0	150	172	175	190	135**
5	0	123	89	85*	90	72*
7	0	35	46	13	20	5*
9	0	0	5	1	4	0
11	0	0	0	0	0	0

* فرق معنوي عن مجموعة المضاد الحيوي عند مستوى معنوية $P\leq 0.001$.

** فرق معنوي عن مجموعة الخل (3.75%) عند مستوى معنوية $P\leq 0.001$.

الجدول 3: العدد الحي للجراثيم 10^6 x في طرق العلاج المستخدمة خلال مدد زمنية مختلفة لجرثومة *Pseudomonas aeruginosa* بالشفرة الرقمية 2216044 .

الوقت بالأيام	المجموعة 1 سيطرة	المجموعة 2 Cefotaxime	المجموعة 3 خل 5 % pH 2.76	المجموعة 4 خل 3.75% pH 2.82	المجموعة 5 خل 2.5% pH 2.88	المجموعة 6 Cefotaxime + خل 3.75%
3	0	170	230	290*	200	160**
5	0	100	125	105	162	85
7	0	47	60	54	65	23**
9	0	0	19	2	30	0
11	0	0	0	0	3	0

* فرق معنوي عن مجموعة المضاد الحيوي عند مستوى معنوية $P\leq 0.001$.

** فرق معنوي عن مجموعة الخل (3.75%) عند مستوى معنوية $P\leq 0.001$.

المناقشة

تعد جراثيم الـ *Pseudomonas aeruginosa* من الجراثيم الانتهازية (14) التي تسبب العديد من الالتهابات وخاصة لدى المرضى الراقدين في المستشفيات , وبشكل خاص لدى المرضى ضعيفي المناعة وممن يتناولون المضادات الحيوية لمدة طويلة (15), فتستعمر هذه الجراثيم الجروح المفتوحة والحروق ويحدث تحطم بالأنسجة نتيجة لعدد من عوامل الضراوة التي تمتلكها الجرثومة ومنها Exotoxin A الذي يلعب دورا مهما في تعطيل التئام الجروح (17,16), فضلا عن عوامل ضراوة أخرى كالأهداب والمحفظة والذيفان الداخلي وأنزيم البروتييز (18) والكواكيوليز والجلاتينيز والهيمولايسين (19).

ولكون هذه الجراثيم ذات مقاومة عالية للعديد من المضادات الحيوية والعوامل الكيموعلاجية (20) فتسبب مشاكل طبية, وقد تم في هذه الدراسة استخدام خل التفاح الطبيعي لمعرفة مدى تأثيره على جرثومة الـ *P. aeruginosa*, إذ أن مدى الرقم الهيدروجيني الأمثل لهذه الجرثومة يتراوح بين (7.6-7.4) (11) حيث تم علاج الجروح المحدثة باستخدام التراكيز 5 %, 3.75 %, 2.5 % والذي كانت بالرقم الهيدروجيني 2.76, 2.82, 2.88 على التوالي وقد وجد بالتحليل الكيمياوي لخل التفاح احتوائه على حامض الخليك وحامض البروبيونيك وحامض اللاكتيك وحامض الماليك (21), ووجود هذه الحوامض هو السبب بانخفاض الرقم الهيدروجيني لخل التفاح وبالتالي فأن استعماله كعلاج يسبب قتل الخلايا الجرثومية بسبب انخفاض الرقم الهيدروجيني وقد كان لهذا العامل تأثير عالي وخاصة عند التركيز 3.75 % في علاج

الجروح إذ كان تأثيره مقاربا لتأثير العلاج بالمضاد الحيوي Cefotaxime, فضلا عن أن تأثير هذا التركيز كان أفضل من تأثير الحامض المطلق بالتركيز 5 %. إن عملية خفض pH إلى 2.82 كان لها دور في تثبيط نمو الجراثيم وهذا ما بينته الدراسة من خلال متابعة عدد الجراثيم الحي في الجروح المحدثة , كما اثبت التحليل الإحصائي أن استعمال خل التفاح بتركيز 3.75 % إلى جانب المضاد الحيوي كان تأثيره أسرع في العلاج لان خفض الـ pH أدى إلى تثبيط نمو الجراثيم إضافة إلى تأثير المضاد الحيوي إذ انه من المضادات التي تعمل على منع تكوين الجدار الخلوي للجراثيم (22) لذلك حدث مؤازرة Synergism بين العاملين في قتل الجراثيم وحدث الالتئام في وقت أسرع من تأثير كل عامل على حدى.

إن المحتوى العالي لخل التفاح من العناصر الغذائية والمتمثلة بالبكتين والسكريات والفيتامينات (B_1 , B_2 , B_6) وفيتامين C و E و A والأملاح والمعادن مثل الصوديوم والكالسيوم والمغنيسيوم والألمنيوم والفسفور والنحاس والسليكون والكلور (21) , أدى عند استعماله موضعيا إلى تسريع عملية الالتئام وعودة الأنسجة إلى حالتها الطبيعية, وكما هو الحال في العديد من المواد التي تتضمن بعض هذه المكونات مثل العسل (23).

شكر وتقدير

تم دعم البحث من قبل كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

المصادر

١. دلالي , باسل كامل والركابي , كامل حمودي (1988) . كيمياء الاغذية , مديرية دار الكتب للطباعة والنشر , جامعة الموصل , صفحة 295 .

2. Katzung BG. Basic and Clinical Pharmacology. 8th ed., Lang Medical Book. McGraw-Hill Publisher, New York, 2000; p. 1073.
3. The Merck Manual Second Edition, *Pseudomonas* Infections, Http: // www.merck.com, 2006; pp.1-4.
4. Molina DN, Colon M and Bermudez-Ronda CH. Unusual presentation of *Pseudomonas aeruginosa* infections : a review. Bol. Asoc. Med. P.R., 1991; 83: 160-163.
5. Todar K. *Pseudomonas aeruginosa*. Todar`s online. Text Book of Bacteriology. www.emedicine.com, 2004; Inc., pp.1-8.
6. Giacomett A, Glrioni O, Schimizzi AM, Prete MS, Barchiesi F and Errico MM. Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. J. Clin. Micrbiol., 2000; 38: 918-922.
7. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW and Barlough JE. Hagan and Bruners. Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. 8th ed., USA, 1992; pp.36-37.
8. Dubouix A, Nieto M, Fauvel J, Chap H, Marty N, Salles JP and Gaits F.A. Simple and reliable method for rapid production and purification of *Pseudomonas aeruginosa* haemolytic phospholipase. C. Letters in Appl. Microbiol., 2004; 38: 191-196.
9. Baron EJ and Finegold SM. Diagnostic Microbiology. Bailey and Scott`s, 8th ed., C.V. Mosby Company, St. Louis, 1990; pp. 106-494.
10. Collee JG, Fraser AG, Marmion BP and Simmons A. Mackie and McCartney. Practical Medical Microbiology. 4th ed., Churchill Livingstone, New York, 1996; pp. 61- 443.
11. Cruickshank R, Duguid JP and Swain RHA. Medical Microbiology. 12th ed., Vol.2. Churchill Livingstone, Edindurgll, London and New York, 1975; pp. 34- 444.
12. James P, Toombs T, Dennist T and Crowe J. Operative Techniques in Slatter. Textbook of Small Animal Surgery. 1st ed., Philadelphia. 1985; pp. 310-340.
13. Steel RG and Torrie JH. Principles and Procedures of Statistics a Biometrical Approach.2nd ed., McGraw-Hill, Inc., Singapore, 1984; p.183.
14. Potvin E, Lehoux DE, Ibrulj IK, Richard KL and Sanchagrin F. In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. J. Environmental Microbiology, 2003; 5: 1294-1308.
15. Dale RMK, Schnell G and Wong JP. Therapeutic efficacy of newbiotics against burn wound infection by *Pseudomonas*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004; 48: 2918-2923.
16. Heggers JP, Haydon S, Ko F, Hayward PG, Carp S and Robson MC. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A its role in retardation of wound healing: The 1992 Lindberg award. J. Burn Care Rehab., 1992; 13: 512-518.
17. Werthen M, Davoudi M, Sonesson A, Nitsche DP, Morgelin M, Blomarnd K and Sclunidtchen A. *Pseudomonas aeruginosa*-induced infection and degradation of human wound fluid and skin proteins exvivo are eradicated by a synthetic cationic polymer. J. Antimicrobial Chemotherapy. 2004; 54: 772-779.
18. Bandjee MCJ, Lazbunski A, Bally M, Carrere J, Chazalette JP and GalabertC. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa* Am. Soci. Microbiol., 1995; 33: 924-929.
19. Prescott LM, Harley JP and Klein DA. Microbiology, 5th ed., McGraw Hill Higher Education, USA, 2002; pp. 61- 940.
20. Budzikiewicz H. Sidrophores of the human pathogenic fluorescent *Pseudomonas*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2001; 1: 1-6.

٢١. شريف , رفاه سامي أيوب (2003) . تأثير خل التفاح وعقار السمفاستاتين على شحوم الدم في إناث الأرانب البالغة. أطروحة دكتوراه , كلية الطب البيطري , جامعة الموصل.

22. Quinn PJ, Carter ME, Markey B and Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology. 1st ed., Mosby-Virginia Tech., Blacksburg, Virginia, USA, 2004; pp. 337-341.
23. Subrahmanyam M. Honey dressing versus boiled potato peel in the treatment of burn: a prospective randomized study. Burns. 1996; 22: 491-493.