الفعالية المضادة للفطور للإبر المجهرية المحمّلة بزيت العرعر الأساسي في معالجة والتئام الجروح المخموجة بفطور الرشاشية الدخناء

الدكتور: باسم بطاح*

الملخص:

يعد استعمال الزيوت الأساسية في معالجة الأخماج الفطرية تحدياً. بذلت العديد من الجهود لجعل هذا التطبيق أكثر فعالية. تعد حالياً تقنية الإبر المجهرية microneedle طريقة ذكية لإيتاء الدواء ولزيادة توزع الدواء والمكونات الفعالة وتوافرها الحيوي عبر الجلد. هدف هذه الدراسة هو تقييم فعالية الإبر المجهرية المحملة بزيت العرعر **Juniperus Oxycedrus L. ssp** في التئام الجروح المخموجة بفطور الرشاشية الدخناء *Aspergillus fumigatus*. تم تطبيق هذه التقنية العلاجية على الجرذان بعد إحداث جروح مخموجة بفطر الرشاشية الدخناء. أظهرت النتائج تحسناً واضحاً في شفاء الجروح المخموجة والمعالجة بالإبر المجهرية المحمَّلة بزيت العرعر ابتداء من اليوم الخامس لتطبيق المعالجة ولوحظ الشفاء التام بعد 10 أيام من المعالجة بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة التي تحول فيها الإنتان إلى شكل مزمن. أثبتت الدراسة بأن الإبر المجهرية المحمَّلة بزيت الزعتر تعد طريقة فعالة وجديدة لإيتاء الزيت الأساسي عبر الجلد بطريق الأدمة. كما أثبتت فعالية في معالجة والتئام الجروح المخموجة بفطور الرشاشية الدخناء.

الكلمات المفتاحية: الإبر المجهرية، مضاد فطري، عرعر، زيت أساسي، التئام الجروح.

* قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة، كلية الصيدلة، جامعة انطاكية السورية الخاصة
basem.battah.sc@hotmail.com

Anti-fungal activity of Juniperus Oxycedrus L. ssp. Essential oil MNDs in treating and healing of *A. fumigatus* infected wounds

Author: Dr. Basem Battah *

Abstract:

Using of essential oil in treating of fungal infection is challenging. There is a lot of efforts to make this application more effective. Recently, microneedles technology considered as a smart delivering method to increase the distribution and bioavailability of the drug and the active ingredients through the skin. These technology was applied on the wound created on the rats and infected with *Aspergillus fumigatus*. The aim of this study is to evaluate the wound healing activity of Jniperus Oxycedrus L. ssp. Essential oil MNDs against wound infected with *Aspergillus fumigatus*. The obtained results demonstrated a significant improvement in the healing process of the infected wound and treated with Juniperus Oxycedrus L. ssp. Essential oil MNDs starting from the fifth day of treatment application and we observed a complete healing after 10 days of treatment respect to the control group which exhibit a chronic infection. Our results demonstrated that Juniperus Oxycedrus L. ssp. Essential oil MNDs considered as an effective methods for essential oil transdermal delivering, and confirmed efficacy in treating infected wound with *Aspergillus fumigatus*.

Key words: Microneedle، antifungal, juniper essential oil, wound healing

***Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Pharmacy, Antioch Syrian Private University.

basem.battah.sc@hotmail.com

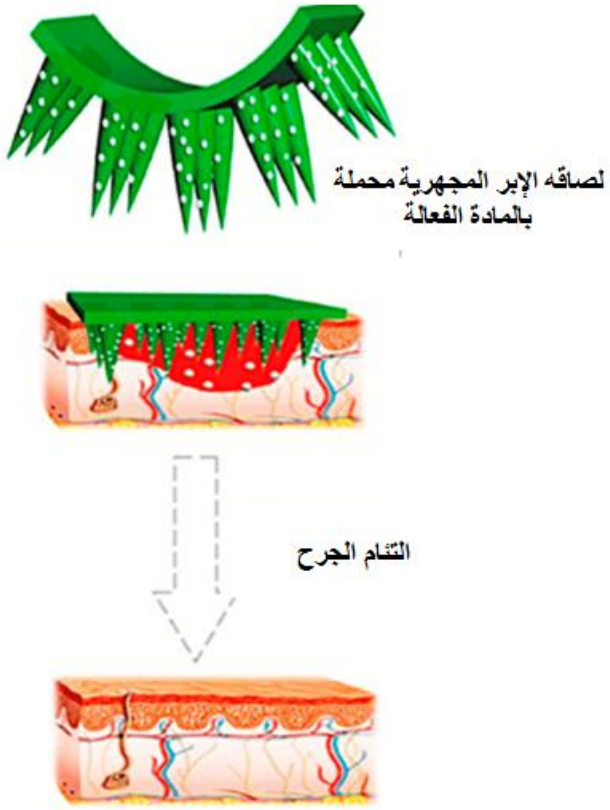
1. المقدمةintroduction:

الرشاشية الدخناء هي نوع من الفطريات من جنس الرشاشيات، وهو أحد أنواع الرشاشيات الأكثر شيوعاً التي تسبب المرض لدى الأفراد الذين يعانون من نقص المناعة. الرشاشيات الدخناء واسعة الانتشار في الطبيعة، توجد عادةً في التربة والمواد العضوية المتحللة، مثل أكوام السماد، حيث تؤدي دوراً أساسياً في إعادة تدوير الكربون والنيتروجين. تنتج مستعمرات الفطر آلافاً من الغُبيرات conidia ذات اللون الرمادي والأخضر (2–3 ميكرومتر) والتي تصبح محمولة جواً بسهولة. على الرغم من أن *A. fumigatus* يتواجد في مناطق ذات مناخات وبيئات مختلفة على نطاق واسع، إلا أنه يظهر تنوعاً وراثياً منخفضاً ونقصاً في التمايز الوراثي على نطاق عالمي، لكن بذات الوقت يظهر مقاومة متعددة على المضادات الفطرية عالمياً مما يجعله يندرج ضمن تحديات القطاع الصحي العالمي، وبالتالي تتدرج اليوم الرشاشيات ضمن العوامل الممرضة أو الممرضات التي تخضع لتطبيق مواد ذات فعالية مضادة من مصادر طبيعية تكون أكثر فعالية تجاه الممرضات وأقل سمية تجاه الإنسان [1]. ينمو هذا الفطر عند الدرجة 37 مئوية (درجة حرارة جسم الإنسان الطبيعية)، ويمكن أن ينمو عند درجات حرارة تصل إلى 50 درجة مئوية، مع بقاء الغُبيرات على قيد الحياة عند 70 درجة مئوية. تكمن خطورة هذا الفطر بانتشار الأبواغ في كل مكان في الغلاف الجوي، ويستنشق البشر ما يقدر بعدة مئات من الأبواغ كل يوم؛ عادة، يتم التخلص منها بسرعة عن طريق جهاز المناعة لدى الأفراد الأصحاء وتكمن المشكلة في الأفراد الذين يعانون من ضعف المناعة، مثل متلقي زرع الأعضاء والأشخاص المصابين بالإيدز أو سرطان الدم وبشكل خاص المرضى المقيمين في المستشفيات. إنَّ الرشاشيات الدخناء هي السبب الأكثر شيوعاً للعدوى

الفطرية الغازية في الأفراد الذين يعانون من نقص المناعة، والتي تشمل المرضى الذين يتلقون العلاج المثبط للمناعة لأمراض المناعة الذاتية أو الأورام، ومتلقي زرع الأعضاء، ومرضى الإيدز. يسبب *A. fumigatus* في المقام الأول عدوى غازية في الرئة ويمثل سبباً رئيسياً للمراضة والوفيات لدى هؤلاء الأفراد. بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن يسبب *A. fumigatus* التهابات رئوية مزمنة، أو داء الرشاشيات القصبي الرئوي التحسسي، أو أمراض حساسية في المضيفين ذوي المناعة الجيدة [2]. وصفت الدراسات السابقة داء الرشاشيات الجلدي إما أولي أو ثانوي. يتضمن داء الرشاشيات الجلدي مواقع من الإصابة الجلدية مثل مواقع إدخال القثاطر، الجروح الناتجة عن الحروق أو العمليات الجراحية. كذلك يمكن أن يكون ينتج داء الرشاشيات الجلدي الثانوي ناتجاً عن إنتان داخلي مثل داء الرشاشيات الرئوي [2, 3].

نظراً للزيادة الأخيرة في استخدام مثبطات المناعة لعلاج الأمراض البشرية، تشير التقديرات إلى أن *A. fumigatus* قد يكون مسؤولاً عن أكثر من 600.000 حالة وفاة سنوياً بمعدل وفيات يتراوح بين 25–90%. هذا ويتضمن العلاج الحالي لمكافحة عدوى *A. fumigatus* الأدوية التي تعرف باسم الآزولات، تؤثِّر هذه الأدوية في الرشاشيات مثل فوريكونازول، وإيتراكونازول، وإيميدازول عن طريق تثبيط إنتاج الإرغوستيرول، وهو عنصر مهم في أغشية الخلايا الفطرية، حي تعمل هذه الأدوية عن طريق تثبيط إنزيم السيتوكروم p450 الفطري المعروف باسم α–demethylase. أكدت الدرسات العالمية على أن الجين .cyp51a هو المسؤول الأول عن بدء انتشار المقاومة لهذا الزمرة من المضادات الفطرية، حيث تم تسجيل ما يقارب 40% من العزلات السريرية للرشاشية الدخانية المقاومة للآزولات اليوم مما يجعل داء الرشاشيات وبشكل أساسي الداء المسَبَّب

بالرشاشية الدخناء للإنسان يشكل عبئاً إضافياً لقطاع الصحة يضاف إلى المقاومة الجرثومية ومقاومة المبيضات الآخذة بالازدياد العالمي [3]، مما دفع الأبحاث العالمية إلى إيجاد بدائل دوائية لمقاومة انتشار السلالات المقاومة ولاسيما في القطاعات الصحية. وبهذا المجال تبقى المملكة النباتية هي الأولى في المجال الصيدلاني والطبي نظراً للتنوع الحيوي الكبير ضمنها و منها الزيوت الأساسية التي لها تأثيرات مهمة كمضادات جرثومية وفطرية [5,6]. يحتل نبات العرعر (*Juniperus* sp) أهمية طبية عالية وقديمة تمتد منذ الحضارة الفرعونية. تتنوع فوائد العرعر الطبية من مطهر ومدر للبول وحالات عسر الهضم ومعالجة الروماتيزم المفصلي والعضلي [4]. وعلاج الأمراض الطفيلية ومضادات قوية للجراثيم ولاسيما علاج المتفطرات السلية ومن أهم الاستخدامات الطبية التقليدية والحديثة له هو علاج الجروح حيث يساعد في التئام الجروح وكما يساعد في شفاء الأمراض الجلدية المزمنة. ولذلك تتوجه هذه الدراسة لإيجاد طريقة جديدة لمعالجة الانتانات الجلدية الناتجة عن أحد أنواع الرشاشيات (*A. fumigatus*) والتي تعد صعبة العلاج وذلك باستعمال طريقة الإبر المجهرية Micronedelle المحملة بزيت نبات العرعر (*Juniperus* sp) والتي أثبتت فعالية مضادة وبفترة زمنية قصيرة لعلاج الإنتانات الجلدية الفطرية المحدثة مخبرياً والناتجة عن الرشاشية الدخناء معلومة المقاومة [8,7]، والتي تعد طريقة حديثة لإيصال المواد الفعالة عبر الأدمة كما زادت من التوافر الحيوي للمواد الفعالة بمكان الجرح. يمكن تصنيع هذه الإبر المجهرية من البوليميرات، السيليكون، المعادن والزجاج [9,10]. تعد الإبر المجهرية المصنوعة من البوليميرات القابلة للتدرك الحيوي طريقة آمنة لا يصال المادة الفعالة ومن دون أي تفاعلات مناعية، كما يمكن تحميلها بكميات كبيرة من الدواء [11] (الشكل رقم 1).



الشكل رقم (1): لصاقه الإبر المجهرية المحملة بالمادة الفعالة وتطبيقها موضعياً على منطقة الجرح

2.هدف البحثAim of the research: استعمال تقانة الإبر المجهرية المحملة بزيت العرعر (*Juniperus* sp) لمعالجة الإنتانات الجلدية الناتجة عن الرشاشيات الدخناء، حيث يحدث داء الرشاشيات الجلدي الأولي من خلال تلوث الجلد المتضرر بالأبواغ الفطرية مباشرة من البيئة المحيطة كما هو الحال في الحروق والجروح أو مناطق إدخال القثاطر البولية أو الوريدية أو الدماغية، وغالباً ما يصادف داء الرشاشية الدخناء عند

الأشخاص ضعيفي المناعة وتتجلى الإصابة بشكل ندبة سوداء مع قاعدة حمراء أو على شكل عقدة مكان الإصابة، ويتم التشخيص عن طريق الدراسة النسيجية والزراعة الفطرية وأما العلاج فيتم عن طريق Fluconazole الفموي لمدة 4 أسابيع حتى ظهور علامات الشفاء السريري.

3. مواد و طرائق البحث Materials and methods of the research:

3. 1. العينة الفطرية:

تم العمل على عينة من الرشاشية الدخناء *Aspergillus fumigatus* معزولة من عينة مشفوية من إصابة صدرية إنتانية، ومن ثم أُكد النوع الفطري بالاعتماد على الصفات المورفولوجية حيث تم العمل على مجموعة من الزروعات على وسط (سابورو آغار) لتحديد الصفات المورفولوجية للمستعمرات النامية وخواصها، ومن ثم تم التأكد من النوع الفطري تحت المجهر بتحديد الصفات المجهرية لرأس الرشاشيات لتأكيد النوع حيث تم التأكد من شكل رأس الرشاسيات و وجود الغُبَيرات conidia و حامِلُ الغُبَيرات conidiophore، كما تم التأكد من المُجَيلات sterigma حيث تكون الخيوط متوضعة بشكل حرف V .

3 .2 . اختبار التحسس الفطري:

تم إنماء فطر الرشاشية الدخناء على وسط سابورو السائل و الحضن 24 ساعة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية . تمت دراسة مدى استجابة الرشاشية الدخناء للمضادات الفطرية (Amphotericin B, Fluconazole) بطريقة أقراص كيربي باور حيث تم فرش العينات الفطرية المأخوذ من المعلق الفطري السابق على وسط موللر هنتون الصلب

المعدل (المضاف له زرقة الميتيلين و الغلوكوز) و استعمال أقراص عيارية للمضادات الفطرية الأمفوتريسين ب Amphotericin B و الفلوكونازول fluconazole و الحض لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية.

3. 3. تخضير الإبر المجهرية:

تم تحضير مزيج PVA (polyvinyl alcohol) (15% وزن/ وزن) و PVP (polyvinylpyrrolidone) (20% وزن/وزن) و من ثم إضافة 1.6غ من زيت العرعر ، 160 ملغ من التوين 80 بسرعة 3000rpm لمدة 5 دقائق للحصول على مزيج جل متجانس. ثم تمت إضافة 500 ملغ من مزيج الجل إلى قوالب سيليكون قبل أن يتم تثفيلها بسرعة 5000 دورة بالدقيقة لمدة 15 دقيقة. أخيراً تم ترك القوالب المليئة بالجل بدرجة حرارة الغرفة لمدة 48 ساعة لتتصلب [12].

3. 4. استخلاص الزيت الأساسي لنبات العرعر:

تم وزن 300 غ من النبات المطحون (القسم الهوائي) بعد أن تم تجفيفها في الهواء. نقعت في الماء المقطر لمدة ساعة وجرفت ببخار الماء حتى نفاد الزيت من العينة المدروسة. بعد ذلك تم استخلاص الزيت العطري من القطارة المائية باستخدام ثنائي إتيل إيتر، ثم بخرت القطارة الإيترية باستخدام المبخر الدوار تحت ضغط منخفض عند درجة الحرارة 30-40°C للحصول على الزيت العطري الطيار، وكانت نسبة الناتج أو الحصيل من الزيت 0.18%-0.20% . ثم جفف الزيت الناتج بكبريتات الصوديوم اللامائية sodium sulphate anhydrate . تم حفظ الزيت بدرجة حرارة -20C°.

3. 5. تحديد نسب المكونات الأساسية في زيت العرعر الأساسي:

تم تحليل الزيت وحساب نسب مكوناته باستعمال جهاز الكروماوغرافيا الغازية GC. وذلك بالمقارنة مع مركبات عيارية وذلك بتطبيق الشروط التالية [13]:

العمود الكروماتوغرافي	A fused silica capillary column HP5-MS (30 m x 0.32 mm, film thickness 0.25 µm)
الحجم المحقون	1 ميكروليتر من العينة المدروسة بعد تمديدها 25 مرة بالأسيتون
الغاز الحامل	الهيليوم
درجة حرارة الحاقن	250°C
درجة الحرارة البدئية	60° C يتم الحفاظ عليها لمدة 8 min
درجة الحرارة النهائية	180° C يتم الحفاظ عليها لمدة 5min
سرعة التسخين	3 درجة في الدقيقة ضمن المجال 60° C −180°

تم حساب النسبة المئوية للمكونات الرئيسية في الزيت العطري الطيار المدروس بتقانة الكروماتوغرافية الغازية GC بالمقارنة مع مركبات عيارية نقية.

3 . 6. اختبار الفعالية المضادة للفطريات داخل جسم الكائن الحي:

3 .6 .1 . حيوان التجربة: تم العمل على جرذان تجربة مقسمة على مجموعتين، وتم استعمال 3 جرذان ذكور لكل مجموعة، المجموعة الشاهدة (المخموجة غير المعالجة) و المجموعة المعالجة (المخموجة و المعالجة) .

3 . 6. 2 . إحداث العدوى الفطرية الجلدية: تم إحداث العدوى الفطرية الجلدية في منطقة الظهر أقرب لمنطقة الرقبة كي لا يتمكن الجرذ من الوصول إلى الجرح، تم إحداث الجرح بشكل دائري وبقطر حوالي 3سم، بعد أن تم حلق المنطقة وتنظيفها وتعقيمها، اعتمدت طريقة التلويث المباشر بأبواغ الرشاشيات العائدة لنوع *Aspergillus fumigatus*، تمت مراقبة تطور العدوى الجلدية وأخذت خزعات نسيجية Tissue Biopsy خلال فترات المراقبة على فترات زمنية (2–5–10) يوم، وتم اعتماد هذه العينة كشاهد وبذات الطريقة تم تحضير جرذ آخر وبذات الطريقة أعد الجرح مع العدوى وتم وضع الإبر المجهرية المحملة بمستخلص نبات العرعر (*Juniperus* sp) فوراً على الجرح وتم تعقيم المنطقة المحيطة بالجرح ووضع لاصقة طبية عقيمة.

3 .6 .3. اخذ العينات النسيجية وتحضيرها:

أُخذت العينات النسيجية حسب الفترات الزمنية سابقة الذكر وتم أخذ العينة الشاهدة مع العينة المعالجة في كل مرة وحُفظت العينات بالفورومول ليتم دراستها نسيجياً فيما بعد. تم تثبيت أنسجة الجلد المستأصلة من مناطق الجرح في 10٪ فورمول، ومن ثم معالجة الأنسجة بالبارافين وتقطيعها بسماكة 5 ميكرون باستخدام microtome ثم صبغها باستخدام طريقة الأيوزين – الهيماتوكسيلين Eosin – Hematoxylin. method تم فحص الشرائح المحضرة تحت المجهر الضوئي ثم تم إجراء صورة للجرح لكل مجموعة باستخدام الكاميرا الرقمية المرفقة بالمجهر في الأيام 0–2–5–10.

4. النتائج والمناقشة:

4 .1. التوصيف الكيميائي لزيت العرعر الأساسي .Juniperus Oxycedrus L ssp:

تم إجراء التحليل الكروماتوغرافي الغازي GC على زيت العرعر وذلك بالمقارنة مع مركبات عيارية نقية، حيث تميز كل مكون بزمن احتباس retention time خاص به. كما تبين أن التربينات terpens هي المكونات الرئيسية بالنسبة للمكونات الأخرى والتي بلغت نسبتها 92%، بينما بلغت نسبة الألدهيدات حوالي 5% ، كما بلغت نسبة الكحول والاسترات حوالي 1 %. بلغت نسبة المركبات العضوية الأساسية بيتا بينين (0.09 ± 13.42%) β-pinene، الألفا بينين (0.24 ± 56.63%) α-pinene والليمونين (0.114±14.66%)limonene ويبين الجدول رقم 4 النسب المئوية للمكونات الرئيسية في الزيت الأساسي للعرعر. الجدول رقم (1). و بالمقارنة مع دراسات أخرى للزيت الأساسي المستخلص من أجناس أخرى من العرعر مثل Juniperus L communis كانت نسب المكونات(5%) β-pinene ، الألفا بينين α-pinene (51.4%) والليمونين (5.1%)limonene ، بينما كانت المكونات الأساسية للزيت الأساسي لجنس Juniperus communis ssp ، الألفا بينين (13.6%) α-pinene و السابينين sabinene (25.1%) [14] .

الجدول (1): النسب المئوية للمكونات الأساسية للزمن و أزمنة الاحتباس لكل مكون.

I.D.[(a)]	النسبة % المئوية للمكونات	المكونات الرئيسية	زمن الاحتباس **Rt** **retention time**
RI, MS	0.05±0.01	heptane	10.38
Std	0.10±0.02	ß-thujene	21.50
Std	56.63±0.24	α-pinene	22.08
Std	0.05±0.01	α-fenchene	22.89
Std	1.50±0.02	camphene	23.01
RI, MS	0.04±0.01	benzaldehyde	23.59
Std	0.33±0.03	α-sabinene	24.14
Std	13.42±0.09	ß-pinene	24.59
Std	0.73±0.04	ß-myrcene	24.90
RI, MS	0.03±0.01	pseudolimonene	25.94
Std	0.04±0.01	α-phellandrene	26.06
Std	0.66±0.02	γ-3-carene	26.22
Std	0.30±0.02	α-terpinene	26.64
Std	0.51±0.03	p-cymene	27.06
Std	14.66±0.11	limonene	27.36
RI, MS	3.41±0.05	benzyl alcohol	27.46
Std	1.37±0.03	1,8-cineole	27.59
Std	0.16±0.02	γ-terpinene	28.88

30.39	γ-terpinolene	0.14±0.01	Std
32.46	*cis*-allo-ocimene	3.00±0.07	RI, MS
33.16	*trans*-allo-ocimene	0.25±0.03	RI, MS
33.59	*trans*-sabinol	0.06±0.01	RI, MS
35.17	endo-borneol	0.03±0.01	RI, MS
35.50	terpinen-4-ol	0.13±0.02	Std
35.67	p-cymen-8-ol	0.02±0.01	RI, MS
36.13	α-terpineol	0.08±0.02	Std
39.99	bornyl acetate	0.08±0.01	RI, MS
42.39	α-cubebene	0.03±0.01	Std
42.73	α-longipinene	0.02±0.01	RI, MS
45.06	ß-caryophyllene	0.40±0.08	Std
46.17	humulene	0.07±0.02	Std
46.58	γ-muurolene	0.03±0.01	RI, MS
46.89	germacrene D	0.05±0.01	Std
47.78	δ-cadinene	0.10±0.02	Std
47.93	calamenene	0.02±0.01	RI, MS
49.81	caryophyllene oxide	0.07±0.02	Std

4 .2. تأثير المعالجة بالإبر المجهرية المحملة بزيت العرعر الأساسي داخل جسم الكائن الحي:

سجلت الرشاشية الدخناء المعزولة من عينة إنتان صدري مشفوي مقاومة تامة تجاه المضادات الفطرية (Amphotericin B, Fluconazole)، ولم تبدِ أي استجابة تجاه هذه المضادات الفطرية المطبقة وبأقطار هالات 0 ملم. أُحدثت العدوى الجلدية للجرذ الشاهد والمعالج وبدأت مراقبة تطور الإصابة على الفترات الزمنية (2-5-10) أيام وتم تسجيل الملاحظات التالية : بعد 48 ساعة من إحداث العدوى وكما وضح بالشكل رقم2 بدء تشكل الندبة السوداء مع قاعدة حمراء اللون، وأكدت الدراسة النسيجية في هذه الفترة الزمنية بدء انتشار الإصابة الالتهابية في طبقات البشرة، بالمقارنة مع جرح الجرذ المعالج بالإبر المجهرية بزيت العرعر حيث لوحظ عدم تشكل الندبة السوداء عيانياً، استمر تسجيل ذات الملاحظات ومقاطعة مع الدراسة النسيجية على الفترات الزمنية المختلفة 2-5-10 أيام متتالية مع أخذ المقاطع النسيجية وبالعودة دائماً للمقاطع النسيجية التي تم أخذها من الجرذ السليم من طبقة البشرة قبل البدء بإحداث العدوى الجدول رقم2.مما يثبت تأثيرات زيت العرعر الأساسي ضد فطور الرشاشية الدخناء و مساهمته في التئام الجروح المخموجة بها. تناولت العديد من الدراسات الأخرى التأثيرات المضادة للميكروبات لزيت العرعر الأساسي يعد زيت العرعر الأساسي من الزيوت المعروفة بتأثيراتها المضادة للجراثيم مثل جراثيم العُنْقودِيَّةُ الذَّهَبِيَّة *staphylococus aureus* و جراثيم الزَّائِفَةُ الزِّنْجارِيَّة*Pseudomonas aeruginosa* و فطور المُبْيَضَّةُ البَيضاء *candida albians*[15] .

الجدول رقم 2: يوضح نتائج العلاج بتقانة الإبر المجهرية مقارنة مع العينة الشاهد للإصابة بالرشاشية الدخناء والعينة السليمة للجلد.

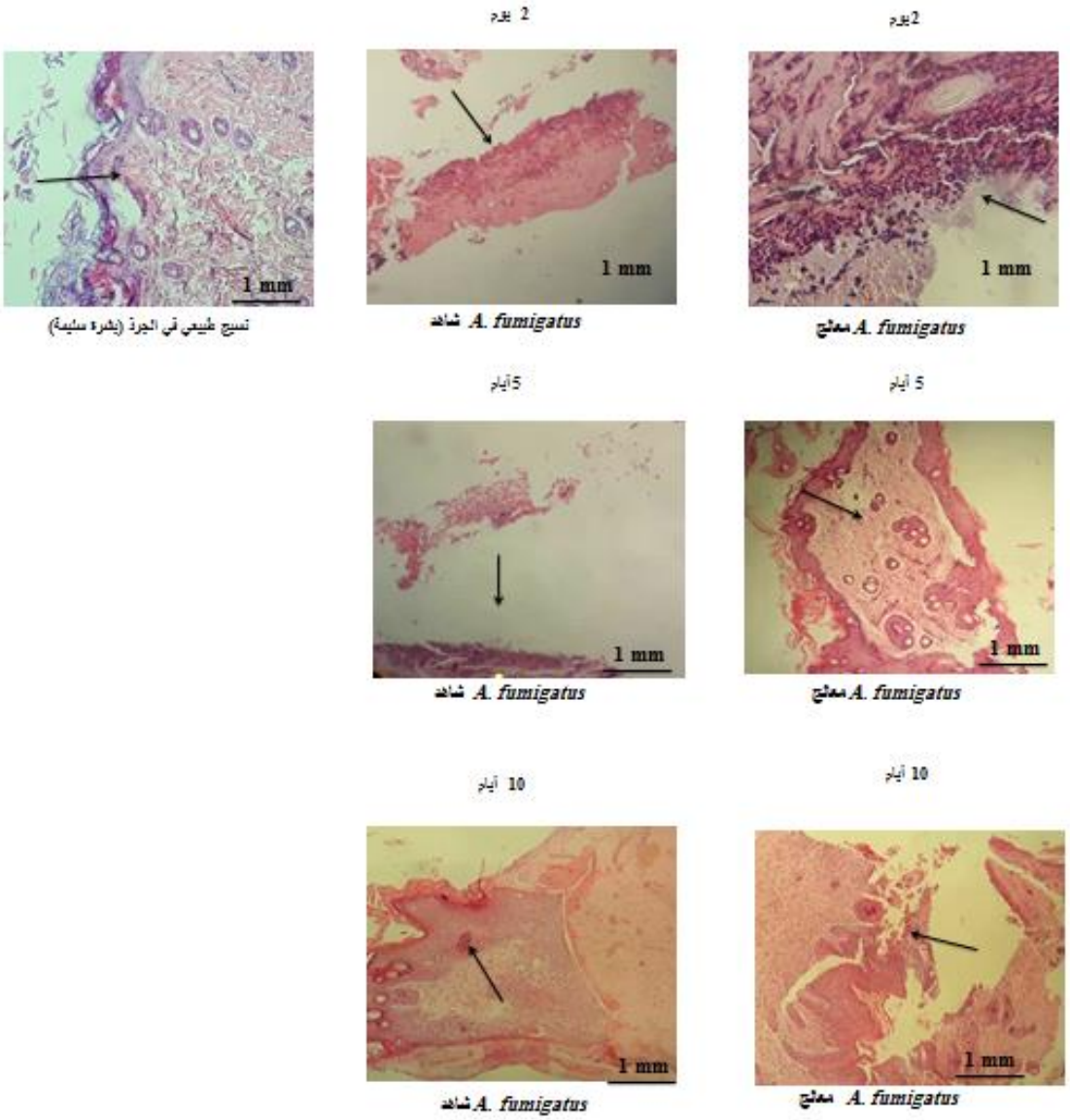
العينة السليمة\ بنية البشرة	الفترة الزمنية (يوم)	العينة الشاهدة دون علاج / عيانياً	العينة المعالجة / عيانياً	العينة الشاهدة دون علاج/ نسيجياً	العينة المعالجة / نسيجياً
بشرة متقرنة- طبقة الأدمة وتحتوي على ملحقات الجلد أجربة شعرية وغدد دهنية	2	بداية تشكل النديه السوداء الدالة على الإصابة	عدم ظهور الندبة السوداء الدالة على الإصابة/ التحام الإبر المجهرية مع الجرح	نتحة قيحية وليفينية- التهاب حاد	نتحة قيحية وليفينية-
	5	ظهور ندبة سوداء كاملة مع قاعدة حمراء	تناقص واضح بقطر الإصابة وبداي تشكل طبقة ليفية واضحة على التئام الجرح	بقايا الالتهاب الحاد وتناقص في النتحة الليفينية – خلايا التهاب حاد	اختفاء النتحة الليفية و بقايا من خلايا التهابية مع بداية شفاء
	10	بقاء الندبة السوداء \ مع تناقص قطر الجرح	التئام كامل للجرح مع بداية زوال الطبقة الليفية	التهاب بالمستوى الأدنى وتحول إلى مزمن	شفاء تام

الشكل رقم 2: مراحل العلاج بالإبر المجهرية المحملة بزيت العرعر مقارنة مع العينة الشاهد. تبين البيانات نتائج ثلاثة تجارب مكررة ثلاثة مرات.

4. 3. نتائج الدراسة النسيجية:

يتضح أثر العلاج بالإبر المجهرية من خلال مراقبة الشفاء خلال الفترة الزمنية للدراسة ويتضح بشكل أساسي ابتداءً من اليوم الخامس من العلاج مقارنة مع الشاهد حيث نلاحظ الإصابة بالعينة الشاهدة مازالت ضمن إطار الالتهاب الحاد مع انتشار لخلايا الالتهاب الحاد و تراجع قليل في النتحة القيحية، في ذات الفترة الزمنية نجد أن الحالة الالتهابية بتطبيق الإبر المجهرية المحملة بزيت العرعر كانت عبارة عن وجود بعض الخلايا الالتهابية وزوال تام للنتحة القيحية، ولكن يجب الذكر بأن تراجع النتحة القيحية بدأ فعلياً من اليوم الثاني في العينة المعالجة ولكن ليس بالوضوح النسيجي في اليوم الخامس، بينما نلاحظ أن العينة المصابة دون علاج استمرت في حالة الالتهاب وتحولت إلى حالة التهاب مزمن، وبالمقابل نلاحظ شفاء تام في العينة المعالجة وبذلك يتضح أن العلاج بالإبر المجهرية الرقيقة ساعد على التقليل من فترة الالتهاب الحاد وساعد على حدوث الشفاء بفترة زمنية أقصر. تبين الدراسة النسيجية أنه بدأ يلاحظ تليف بسيط مكان الإصابة في العينة المصابة دون علاج في اليوم العاشر، وبالمقابل العينة المعالجة حدث فيها شفاء تام من الإصابة الفطرية ودون حدوث تليف في مكان الإصابة وهذا ما يؤكد على المقاطعة بين الأثر الدوائي لنبات العرعر في علاج والتئام الجروح السريع وفي دور تقانة الإبر المجهرية في المساعدة لإيصال المواد الفعالة والمضادة للالتهاب إلى الطبقات العميقة من الجلد (الشكل رقم 3) . كما أثبتت دراسات أخرى بأن تطبيق الإبر المجهرية

المحملـة بخلاصـات مـن النبـات الطبيـة الصـينية مثـل السـينتيلا الآسـيوية *centella asiatica* في معالجـة الجـروح المخموجـة بجراثيم الإِشْـرِيكِيَّةُ القولونِيَّـة *Escherichia coli* و جراثيم العُنْقودِيَّةُ الذَّهَبِيَّة *staphylococcus aureus* تحسناً ملحوظاً في شفاء الجرح و تناقص مساحته بعد تسعة أيام من المعالجة [16]. تم استعمال تقنية الإبر المجهريـة المحملـة بمجموعـة مـن المضـادات الجرثوميـة و الفطريـة مثـل الأزيتروميسـين azithromycin و الإيريترمايسين erythromycin كمضادات جرثومية و الأمفوتريسين ب Amphotericin B كمضاد فطري لزيادة الإيتاء النسيجي العميق لهذه الأدوية[17، 18] . يجب على مُضادَّات المِكروبات أن تنْفُذ لتصل و تحمي الخلايا الحية في عداوى الجروح المزمنة. حيث تعد تقنية الإبر المجهرية تقنية ممتازة في تأمين نفاذ المواد الفعالة في موقع تطبيق المعالجة[19] . تعد تقنية الإبر المجهرية المستعملة في هذه الدراسة لإيتاء زيت العرر الأساسي و استعمالها في معالجة الجروح المخموجة بفطور الرشاشية الدخناء رائدة عالمياً حيث وفرت تحرر ناجح للزيت و تأثير مضاد فطري ممتاز.



الشكل رقم 3: المقاطع النسيجية التي تمثل مراحل العلاج بالإبر المجهرية المحملة بزيت العرعر مقارنة مع العينة الشاهد. تبين البينات نتائج ثلاثة تجارب مكررة ثلاثة مرات.

5. الاستنتاجات والتوصيات:

أظهرت نتائج الدراسة على حيوانات التجربة فعالية ملحوظة لزيت العرعر الأساسي الذي يحتوي بيتا بينين β-pinene، الألفا بينين α-pinene و الليمونين limonene كمركبات عضوية أساسية ضد فطور الرشاشية الدخناء . كما بينت النتائج بأن معالجة الجروح المخموجة بتقنية الإبر المجهرية المحمّلة بزيت العرعر الأساسي حسنت من التئام الجروح بشكل ملحوظ وأدت إلى شفاء نسيجي سريع. أخيراً يمكن القول بأن لصاقات الإبر المجهرية Microneedle المحملة بزيت العرعر الأساسي Juniper essential oil ، هي استراتيجية جديدة و آمنة في معالجة الجروح المخموجة بفطر الرشاشية الدخناء. و تعتبر تقنية واعدة لتحسين إيتاء الدواء عبر الجلد ومنع حدوث الخمج أو العدوى. كما يوصى بإجراء دراسات أوسع على البشر لإثبات فعالية هذه التقنية في التئام الجروح المخموجة.

المراجع References :

1. Jo-Anne H. van Burik, Roy Colven, David H. Spach (1998). Cutaneous Aspergillosis. *Journal of clinical microbiology*. 36(11): 3115-3121.

2.Vildan Avkan-Oğuz , Muammer Çelik , Ismail S Satoglu , Mahmut Cem Ergon , Ahmet Emrah Açan. 2020. Primary Cutaneous Aspergillosis in Immunocompetent Adults: Three Cases and a Review of the Literature. Case reports. 175-188.

3. Mercedes Romero,Fernando Messina, Emmanuel Marin, Alicia Arechavala, Roxana Depardo, Laura Walker, Ricardo Negroni, Gabriela Santiso.2019. Antifungal Resistance in Clinical Isolates of *Aspergillus* spp.: When Local Epidemiology Breaks the Norm. *journal of fungi* . 5(2): 41.

4. Spengler, G.; Gajdacs, M.; Donadu, MG.; Usai, M.; Marchetti, M. Ferrari M et al. Evaluation of the Antimicrobial and Antivirulent Potential of Essential Oils Isolated from Juniperus oxycedrus L. ssp. macrocarpa Aerial Parts. *Microorganisms.* 2022, 10.

5.Karl, Knobloch.; Alexander, Pauli.; Bernard, Iberl.; Hildegunde, Weigand.; Norbert, Weis. Antibacterial and Antifungal Properties of

Essential Oil Components, Journal of Essential Oil Research. *journal of eesential oil research.* 2011, 1, 119-128.

6.Angane, M.; Swift, S.; Huang, K.; Butts, CA.; Quek, SY. Essential Oils and Their Major Components: An Updated Review on Antimicrobial Activities, Mechanism of Action and Their Potential Application in the Food Industry. *Foods.* 2022, 11.

7. el Rodríguez, David Molinero, Enrique Valera, Trifon Trifonov, Lluis F.Marsal, Josep Pallarès and Ramón Alcubilla (2005) Fabrication of silicon oxide microneedles from macroporous silicon. *Sensors and Actuators B: Chemica* **109**, 135-140.

8. Angioni,A., Barra,A., Russo,M.T., Coroneo,V., Dessi,S. and Cabras,P. (2003) Chemical composition of the essential oils of Juniperus from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. *J Agric. Food Chem.* **51**, 3073-3078.

9. Barnum,L., Samandari,M., Schmidt,T.A. and Tamayol,A. (2020) Microneedle arrays for the treatment of chronic wounds. *Expert. Opin. Drug Deliv.* **17**, 1767-1780.

10. Brem H and Tomic-Canic M (2007)Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes . *The Journal of clinical investigation* **117**, 1219-1222.

11. Chi,J., Sun,L., Cai,L., Fan,L., Shao,C., Shang,L. and Zhao,Y. (2021) Chinese herb microneedle patch for wound healing. *Bioact. Mater.* **6**, 3507-3514.

12. Derakhshandeh,H., Aghabaglou,F., McCarthy,A., Mostafavi,A., Wiseman,C., Bonick,Z., Ghanavati,I., Harris,S., Kreikemeier-Bower,C., Basri,S.M.M., Rosenbohm,J.,Yang,R., Mostafalu,P., Orgill,D. and Tamayol,A. (2020) A Wirelessly Controlled Smart Bandage with 3D-Printed Miniaturized Needle Arrays. *Adv. Funct. Mater.* **30**.

13. Wagner H. ; Bladt S. , (1996) , " Plant drug analysis " spreinger- verlag , Berli-Heidelberg.

14.Emami, S.A.; Javadi, B.; Hassanzadeh, M.K. Antioxidant activity of the essential oils of different parts of *Juniperus communis*. subsp. *hemisphaerica and Juniperus oblonga. Pharm. Biol.* **2007**, *45*,769-776.

15.Pepeljnjak, S.; Kosalec, I.; Kalodera, Z.; Blazevic, N. Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., Cupressaceae). *Acta Pharm.* **2005**, *55*, 417-422.

16.Chi, J.; Sun, L.; Cai, L.; Fan, L.; Shao, C.; Shang, L.; Zhao, Y. Chinese herb microneedle patch for wound healing. *Bioact. Mater.* **2021**, *6*, 3507–3514.

17.Arshad, M.S.; Zahra, A.T.; Zafar, S.; Zaman, H.; Akhtar, A.; Ayaz, M.M.; Kucuk, I.; Maniruzzaman, M.; Chang, M.-W.; Ahmad, Z. Antibiofilm Effects of Macrolide Loaded Microneedle Patches: Prospects in Healing Infected Wounds. *Pharm. Res.* **2021**, *38*, 165–177.

18. Muhammad Iqbal Nasiri., Lalitkumar K. Vora., Juhaina Abu Ershaid., Ke Peng., Ismaiel A. Tekko., Ryan F. Donnelly. Nanoemulsion- based dissolving mironeedle arrays for enhanced transdermal delivery. *Drug delivery and translational research*. 2022, 12, 881-896.

19.Barnum, L.; Samandari, M.; Schmidt, T.A.; Tamayol, A. Microneedle arrays for the treatment of chronic wounds. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2020**, *17*, 1767–1780