# التأثيرات المرضية النسجية للراشح الخام لانزيمي الـ LasA والبروتيز القاعدي المنتجان من بكتريا *Psudomonas aeruginosa* على قرنية عيون الارانب المختبرية

**ايمان جواد كاظم**

*الكلية التقنية المسيب*

Imanprof9@gmail.com

الخلاصة

تم عزل بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بنسبة 12% من 50 عينة (66.6% لها القابلية على انتاج انزيم الـــ Elastase. واشارت النتائج ان جميع العزلات البكتيرية لها القابلية على انتاج انزيمي الـــ LasA والبروتيز القاعدي. درس تأثير الراشح الخام لهذين الانزيمين ( LasA و البروتيز القاعدي ) على قرنيات عيون الارانب ( in vivu ) كلاً على حدة حيث اشارت النتائج الى وجود تأثيرات مرضية واضحة لكلا الانزيمين. واظهرت نتائج المقاطع النسجية لقرنيات عيون الارانب وجود اضرار نسجية مرضية واضحة عند التركيز 12 وحدة / ملیلتر لانزيم البروتيز القاعدي والتركيز 7 وحدة / ملیلتر لانزيم الـــ LasA حيث سبب التركيزان انسلاخ الظهارية مع تلف نسيج السدى وتكون الخزب.

**الكلمات المفتاحية** : بكتريا Pseudomonas aeruginosa

## Apstract

The species of *Pseudomonas aeruginosa* was isolated from keratitis. We found that 12% were isolated. The production of elastase were tested. Four isolated (66.6%) had the ability to producing elastase. The production of LasA and alkaline protease were tested, all isolates had the ability to production both the enzymes. The results of the enjection of alkaline protease crude and LasA enzyme crud in eye corneal rabbits (in vivu) showed that both enzymes had the obvious effect on the cornea. Histopathological effects on eyes corneal of these experimental rabbits, were seen at concentration of 12 unit\ milliliter of alkaline protease crude and concentration of 7 unit\ milliliter of LasA enzyme crude. Both enzymes caused epithelium detachment with damage of stromal tissue and formation of oedema.

**key words**: species of pseudomonas aeruginosa

## المقدمة

يعد التهاب القرنية البكتيري واحد من اهم الافات الخطرة في علم الامراض وذلك بسبب تكرار حدوثها والمضاعفات الناتجة منها، وتشير احدى الدراسات الى ان هناك عين واحدة تخسر يوميا في العالم وذلك بسبب استخدام العدسات اللاصقة، وتعد بكتريا *P.aeruginosa* واحدة من اهم العوامل المسببة لالتهاب القرنية الميكروبي الذي يقود الى تقرح القرنية الذي اذا لم يعالج ممكن ان يؤدي الى فقدان البصر (Matsumoto, 2004) . ويمكن ان يحدث ثقب القرنية في اقل من 24 ساعة خلال اصابتها ببكتريا *P.aeruginosa* ومن المضاعفات الاخرى عتمة القرنية التي تؤدي الى قلة حدة البصر ويتم التخلص من هذه المضاعفات فقط في حالة زرع رقعة جديدة للقرنية . وان اصابة القرنية بالبكتريا تكون سريعة وغالبا ما ينتج منها تلف الرؤيا بسبب الندب التي تحدث في القرنية، وعادة تتصف الاصابة بالنخر السائل Liquefative Necrosis المقترن مع التقرح الشديد وثقب القرنية( Ayelet *et al*., 2006; Lin *et al*., 2006 ).

وقد وجد ان العزلات البكتيرية المعزولة من التهاب القرنية تكون ذات فعالية عالية لانزيم الـ Elastase ، والبروتيز القاعدي، و ExoenzymeU الذي يكون ساماً للخلايا. وتشير العديد من المصادر الى ان العزلات البكتيرية المعزولة جميعاً من التهاب القرنية تكون منتجة لانزيمات Proteases جميعاً التي تلعب دوراً مهماً في الامراضية ( Preston *et al*., 1997 ;Estrellas *et al*., 2000) . وهناك دراسة تشير الى ان العزلة البكتيرية ذات الضراوة للقرنية تستطيع انتاج على الاقل ثلاثة من انزيمات Proteases المختلفة خارج الجسم الحي بحيث يكون لهذه الانزيمات القابلية على احداث التلف السريع والشامل لقرنية الارانب (Kreger & Griffin, 1974) . وتسهم انزيمات البروتيزات في عملية الالتصاق وذلك بوساطة تحليل الـ Fibronectin مما يساعد على الكشف عن مستقبلات عديدة موجودة تحته على اسطح الخلايا الظهارية (Lomholt *et al*., 2001) . ان الغشاء الدمعي يعد هو الحاجز الاول بين البيئه الخارجية والخلايا الظهارية للقرنية تحت الغشاء، وعليه يعد تحلل المخاطين (Mucin) والذي هو المكون الرئيس للغشاء الدمعي بوساطة البكتريا هو من عوامل الضراوة التي يجب ان تمتلكها العزلات التي تسبب الاصابة للعين، حيث تكون نتيجة ازالة المخاطين من القرنية هو زيادة التصاق البكتريا الى سطح القرنية، اذ ان العزلات البكتيرية غير المنتجة لانزيمات Proteases لاتتمكن من تحليل المخاطين، أي ان قابلية البكتريا على استهلاك المخاطين مقترنة مع قابلية العزلات البكتيرية على انتاج انزيمات Proteases (Aristoteli & Willcox, 2003 ). وتعمل انزيمات البروتيزات سوية في تحطيم المواد الاساس للقرنية وتراكيب اخرى مسانده والمكونة من الفايبرين، و الايلاستين Elastin (Fleiszig *et al*.,1997) . نظراً لازدياد نسبة اصابات العيون بهذه البكتريا وزيادة الاهتمام بها في مختلف انحاء العالم، ولعدم توفر دراسة محلية تتناول التأثيرات المرضية لانزيمات البروتيز المنتجة من هذه البكتريا على قرنية الحيوانات المختبرية. لذا تهدف الدراسة الى عزل وتشخيص هذه البكتريا من حالات تقرح القرنية والكشف عن امراضيتها من خلال انتاجها للانزيمات المحللة للبروتين وملاحظة التأثيرات المرضية النسيجية لهذه الانزيمات على قرنية الارانب المختبرية.

## المواد وطرائق العمل

**عزل وتشخيص البكتريا**

جمعت 50 عينة من مسحات العيون ( مرضى التهاب القرنية ) من مستشفى ابن الهيثم للفترة من 3-12-2011 الى 29-12-2011. زرعت العينات على وسط اغار الدم ووسط اغار ماكونكي واغار pseudomonal وحضنت الاطباق عند درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، فضلاً عن تنمية البكتريا على وسط اغار ثلاثي السكريات الحديدي وتنمية البكتريا عند درجة حرارة 42م. بعد زرع العينات على وسط Pseudomonal agar تم اخذ العزلات النامية على الوسط واعيدت على وسط king A باستخدام الناقل المعقم الى ان تم الحصول على عزلات نقية، بحضانتها عند درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة. تم تشخيص العزلات البكتيرية اعتماداً على الفحوصات المظهرية والكيموحيوية ( Holt *et al.,* 1994; Collee *et al*., 1996).

**الكشف عن انتاج انزيم Elastase واستخلاصه بشكل خام**

لقحت الاطباق الزرعية الحاوية على وسط Elastin agar بالعزلات البكتيرية وبواقع ثلاث' مكررات لكل عزلة بكتيرية وحضنت عند درجة حرارة 37 م لمدة 24-72 ساعة وتم قياس انتاج الانزيم بقياس منطقة التحلل الممتدة من حافة شريط النمو (1.5) سنتيمتر (Ohman *et al*., 1980) لغرض استخلاص الانزيم الخام لقحت دوارق حاوية على وسط L broth بحجم 20 مليلترآ وحضنت عند درجة حرارة 37 م في حاضنة هزازة بسرعة 130 دورة / الدقيقة لمدة 24 ساعة. تم النبذ المركزي المبرد بسرعة 3500xg لمدة 30 دقيقة وعند درجة حرارة 4 م. وعد الطافي البكتيري انزيماً خاماً (Diggle *et al*., 2002) .

**الكشف عن انتاج انزيم البروتيز القاعدي واستخلاصه بشكل خام**

لقحت الاطباق الزرعية الحاوية على وسط اغار الحليب المقشود Skim Milk Agar بالعزلات البكتيرية وبواقع ثلاثة مكررات لكل عزلة بكتيرية وتم التلقيح في مركز الطبق وبشكل دائري بقطر 1 سنتمتر ثم حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة، ظهور المنطقة الشفافة حول النمو البكتيري دلالة على النتيجة الموجبة. ولغرض استخلاص الانزيم الخام لقحت دوارق حاوية على وسط Casein broth بحجم 20 مليلترآ . وتم تلقيح الدوارق بلقاح بكتيري بعمر 18 ساعة بحجم 0.2 مليلتر لكل دورق وتمت الحضانة في حاضنة هزازة 130 دورة/ الدقيقة عند درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة. وبعد مدة الحضانة تم عمل النبذ المركزي المبرد للمزروع البكتيري عند 3500xg بدرجة حرارة 4 م لمدة 20 دقيقة. وعد الطافي البكتيري انزيماً خاماً ( Sharma *et al*., 2006) .

## قياس فعالية انزيم LasA

تم أخذ 100 ميكرولتر من الانزيم الخام لكل عزل بكتيرية واضيف الى عالق خلايا بكتيريا *S.aureus* بحجم 500 ميكرولتر وحضنت عند درجة حرارة 37 م لمدة نصف ساعة ثم قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي 600 نانومتر. انخفاض قيمة الامتصاصية مقارنة مع خليط التفاعل عند الوقت 0 دلالة على النتيجة الموجبة وبواقع ثلاثة مكررات لكل عزلة بكتيرية (Diggle *et al*., 2002) . وتعرف وحدة الفعالية للانزيم انها كمية الانزيم التي تعطي انخفاض مقداره 0.01 في الامتصاصية بطول موجي (600) نانومتر لكل دقيقة تحت الظروف القياسية. وعينت فعالية الانزيم باستخدام المعادلة الاتية

$$\text{فعالية انزيم LasA (وحدة / مليلتر)} = \frac{\text{الامتصاصية 600 نانومتر}}{\text{انخفاض الامتصاصية 0.01 X الزمن 30 دقيقة X الحجم 0.1 مليلتر}}$$

## قياس فعالية انزيم البروتيز القاعدي

تم قياس فعالية الانزيم بالاعتماد على الطريقة الموصوفة من قبل Sharma *et al* (2006)، وبواقع ثلاثة مكررات لكل عزلة بكتيرية حيث تم اضافة 0.1 مليلتر من الانزيم الخام لكل عزلة بكتيرية الى 1 مليلتر من محلول الكازئين (0.5%) ذي الاس الهيدروجيني 8 وحجم 1.9 مليلتر من دارئ Tris-HCL بتركيز 0.2 مولر واس هيدروجيني 8 عند درجة حرارة 37 م لمدة 30 دقيقة. وتم ايقاف التفاعل باضافة 2 مليلتر من TCA بتركيز 5% . كما حضر المحلول السيطرة بالخطوات نفسها ولكن بدون اضافة الانزيم الخام، بعد ذلك تم النبذ المركزي المبرد لكلا محلولي التفاعل والسيطرة عند 3500xg لمدة 30 دقيقة.

وعينت كمية الناتج المتكون والذائب بـــTCA بوساطة قياس الامتصاصية للطافي عند الطول المـــوجي 280 نانومـــتر. حيث تعرف وحدة الفعالية للانزيم بانها كمية الانزيم التي تعطي زيادة 0.001 في الامتصاصـــية (280) نانومتر لكل دقيقة، تحت الظروف القياسية. وتعيين فعالية البروتيز باستـــخدام المعادلة الاتية

الامتصاصية عند 280 نانومتر

فعالية البروتيز القاعدي ( وحدة/ مليلتر ) = ————————————————

زيادة الامتصاصية0.001 x الزمن30 دقيقة x الحجم 0.1 مليلتر

**الحيوانات المختبرية**

استعملت الارانب المختبرية المحلية بعمر (2-3) اشهر ذكور وتتراوح اوزانهم ما بين (2.5-3) كغم. وضعت في اقفاص حديدية نظيفة داخل البيت الحيواني مع مراعاة توفير الظروف المثلى من درجة حرارة ونظافة ماء الشرب والعلف، وقد اخذت عينات الادرار والخروج وتم زرعها على الاوساط الزرعية للتاكد من خلو الارانب من الجراثيم.

**اصابة قرنيات عيون الارانب بوساطة الراشح الخام لانزيمي البروتيز القاعدي و LasA**

تم تحضير عدة تراكيز من كلا الانزيمين بصورة منفصلة، حيث حضر انـــزيم البروتيـــز القاعـــدي بفعالية (15,12,10) وحدة/ مليلتر. وحضر انزيم LasA بفعالية (10,7,5) وحدة / مليلتر.ثـــم حضـــرت الارانب بواقع 6 مجاميع ( كل مجموعة مكونة من 3 ارانب) وخدرت بوساطة الايثر وتم تخديش قرنيـــات عيون الارانب بوساطة ابرة معقمة (23G x1)، ثم حقن كل تركيز من كل انزيم بحجم 40 ميكرولتر داخل العيون اليسرى للارانب المخدرة بينما استخدمت العيون اليمنى للارانب المخدرة كمجموعة سيطرة.لـــوحظ تأثير الانزيمات في القرنيات المحقونة بعد مرور 24 ساعة ومن ثم قتلت الارانـــب ( Kreger & Gray, 1978) . وتم تقدير الاصابة لهذه القرنيات (Burns *et al*., 1990 ).

**الدراسة النسجية للقرنيات المصابة**

قتلت الارانب المحلية المحقونة بتراكيز مختلفة من الراشح الخام للانزيمين بعد 24 ساعة من الحقن وقلعت عيونها وفصلت القرنية عنها لعمل المقاطع النسيجية لها. وحفظـــت القرنيـــات بتركيـــز 10% مـــن الفورمالين. ثبتت القرنيات في دارئ الفورمالين 10% المتعادل pH 7 ثم حضرت منها المقـــاطع النســـجية وصبغت بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين الاعتيادية (Humason, 1972 ).

**النتائج**

العزل والتشخيص

تم الحصول على 6 (12%) عزلات بكتيرية تعود للنـــوع *Pseudomonas aeruginosa* . نمت البكتريا على وسط اغار الدم اذ بدت المستعمرات كبيرة مع ارتفاع طفيف، وتمكنت البكتريا من تحليل الدم بشكل تام (β-hemolysin) . فعند تنميتها على وسط اغار ماكونكي ظهرت المستعمرات بحجم كبير وبلون شاحب وغير مخمرة لسكر اللاكتوز. كذلك تمكنت البكتريا من النمو علـــى اغـــار Pseudomonal وظهرت المستعمرات بحجم متوسط وبلون ابيض مائل الى الصفرة. وعند تنمية البكتريا على وسط اغار TSI ظهر النمو على سطح الوسط ولم يتغير لون الوسط ولم يلاحظ وجود الغاز وH2S . كما نمت البكتريا في وسط KingA وكانت متغايرة في انتاجها للصبغة . فضلاً عن ان وسط KingA يعد وسطآ تفريقيآ لها عـــن بكتريا *Pseudomonas fluorescens* التي لا تستطيع النمو فيه. ويمكن كذلك التمييز بين

*P. aeruginosa* و*P. fluorescens* عن طريق النمو عند درجتي حرارة 42,4 م$^{o}$ ، حيث تتمكن بكتريا *P. aeruginosa* من النمو عند درجة حرارة 42 م$^{o}$ بينما لا تتمكن بكتريا *P. fluorescens* من النمو عند هذه الدرجة لكنها تتمكن من النمو عند درجة حرارة 4 م$^{o}$ في حين يتعذر على بكتريا *P. aeruginosa* النمو عند هذه الدرجة.

## قابلية البكتريا على انتاج الـ Elastase

تم التحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم الـ Elastase على وسط اغار Elastin Agar اذ اشارت النتائج الى ان 66.6 % من العزلات البكتيرية كانت لها القابلية على انتاج الانزيم حيث كانت منطقة التحلل حول النمو البكتيري واضحة جدآ، واعطت العزلة البكتيرية Pa3 قطر منطقة تحلل بلغ ( 12 مليمتر). (جدول 1). تم التحري عن قابلية البكتريا على انتاج الانزيم LasA باستعمال وسط LBroth وتم قياس كمية البروتين باستخدام طريقة (Bradford,1976) وحساب الفعالية النوعية (وحدة/مليغرام) للانزيم. تشير النتائج الى ان العزلات البكتيرية جميعها لها القابلية على انتاج الانزيم ولكن بفعالية متغايرة، وقد اظهرت النتائج ان العزلة البكتيرية Pa4 اعطت اعلى فعالية اذ بلغت الفعالية النوعية 28.662 (وحدة/مليغرام) أي ان هذه العزلة البكتيرية هي الاكثر كفاءة لانتاج الانزيم (جدول 2).

جدول ( 1): قابلية عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* على انتاج انزيم الـ Elastase على وسط اغار Elastin عند درجة حرارة 37م لمدة 24-72 ساعة.

| رقم العزلة | قطر منطقة التحلل (ملم)* |
|---|---|
| Pa1 | 0 |
| Pa2 | 6 |
| Pa3 | 12 |
| Pa4 | 9 |
| Pa5 | 0 |
| Pa6 | 10 |
| * القراءات تمثل معدل ثلاثة مكررات | |

جدول (2): قابلية عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* على انتاج انزيم الـ LasA باستخدام وسط LBroth عند درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة.

| رقم العزلة | تركيز البروتين (مليغرام/مليلتر) | الفعالية الانزيمية (وحدة/مليلتر)* | الفعالية النوعية (وحدة/مليغرام بروتين) |
|---|---|---|---|
| Pa1 | 0.635 | 2.250 | 3.543 |
| Pa2 | o.488 | 6.390 | 13.094 |
| Pa3 | o.375 | 5.980 | 15.947 |
| Pa4 | 0.299 | 8.570 | 28.662 |
| Pa5 | 0.250 | 6.670 | 26.680 |
| Pa6 | 0.333 | 4.350 | 13.063 |
| * القراءات تمثل معدل ثلاثة مكررات | | | |

قابلية البكتريا على انتاج انزيم البروتيز القاعدي

تم التحري عن قابلية البكتريا على انتاج الانزيم على وسط اغار الحليب المقشود Skim milk agar لوحظ ان العزلات البكتيرية جميعها لها القابلية على انتاج الانزيم وقد اظهرت العزلة البكتيرية Pa5 اكبر قطر منطقة تحلل بلغ (20 مليمتر) (جدول 3).

جدول (3): قابلية عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* على انتاج انزيم البروتيز القاعدي على وسط اغار Skim milk agar عند درجة حرارة 37م لمدة 24-48 ساعة.

| رقم العزلة | قطر منطقة التحلل (ملم)* |
|---|---|
| Pa1 | 15 |
| Pa2 | 10 |
| Pa3 | 17 |
| Pa4 | 16 |
| Pa5 | 20 |
| Pa6 | 13 |
| * القراءات تمثل معدل ثلاثة مكررات | |

تم التحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم البروتيز القاعدي في وسط مرق الكازئين Casein broth وتم قياس كمية البروتين باستخدام طريقة (Bradford,1976) وحساب الفعالية النوعية (وحدة/مليغرام) للانزيم. وتشير النتائج الى ان جميع العزلات البكتيرية لها القابلية على انتاج الانزيم ولكن بفعالية متغايرة حيث اعطت العزلة البكتيرية Pa5 اعلى فعالية انزيمية وكانت ذات فعالية نوعية 105.556 (وحدة/مليغرام). أي انها الاكثر فعالية لانتاج الانزيم (جدول 4).

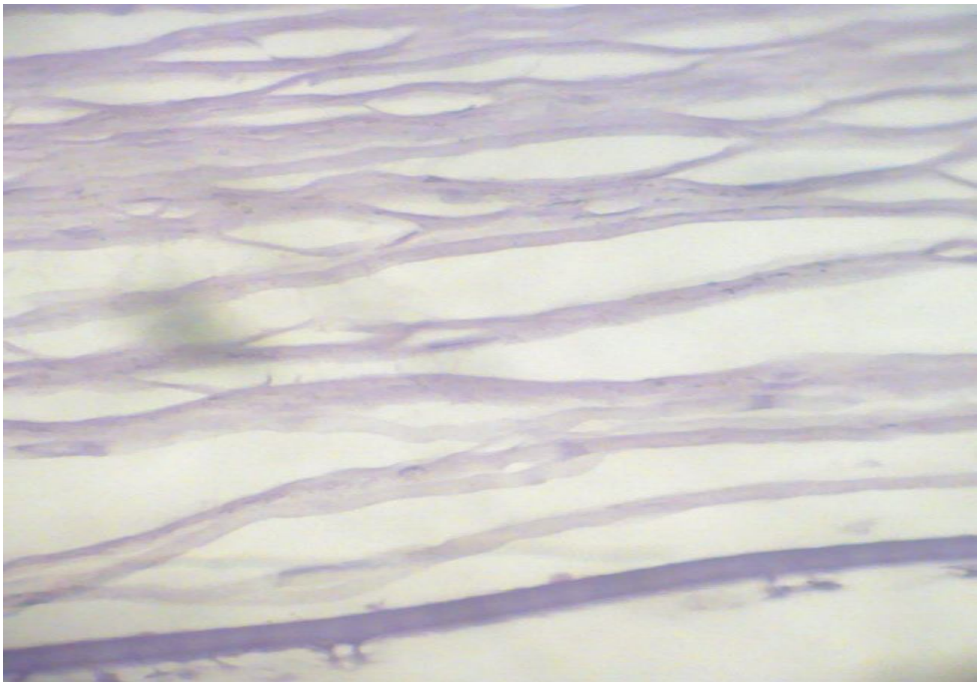
جدول (4): قابلية عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* على انتاج انزيم البروتيز القاعدي في وسط مرق الكازئين عند pH7 و درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة.

| رقم العزلة | تركيز البروتين (مليغرام/مليلتر) | الفعالية الانزيمية (وحدة/مليلتر)* | الفعالية النوعية (وحدة/مليغرام بروتين) |
|---|---|---|---|
| Pa1 | 0.411 | 5.386 | 13.105 |
| Pa2 | 0.506 | 9.566 | 18.905 |
| Pa3 | 0.554 | 11.438 | 20.646 |
| Pa4 | 0.323 | 15.211 | 47.093 |
| Pa5 | 0.225 | 23.750 | 105.556 |
| Pa6 | 0.375 | 17.399 | 46.397 |
| * القراءات تمثل معدل ثلاثة مكررات | | | |

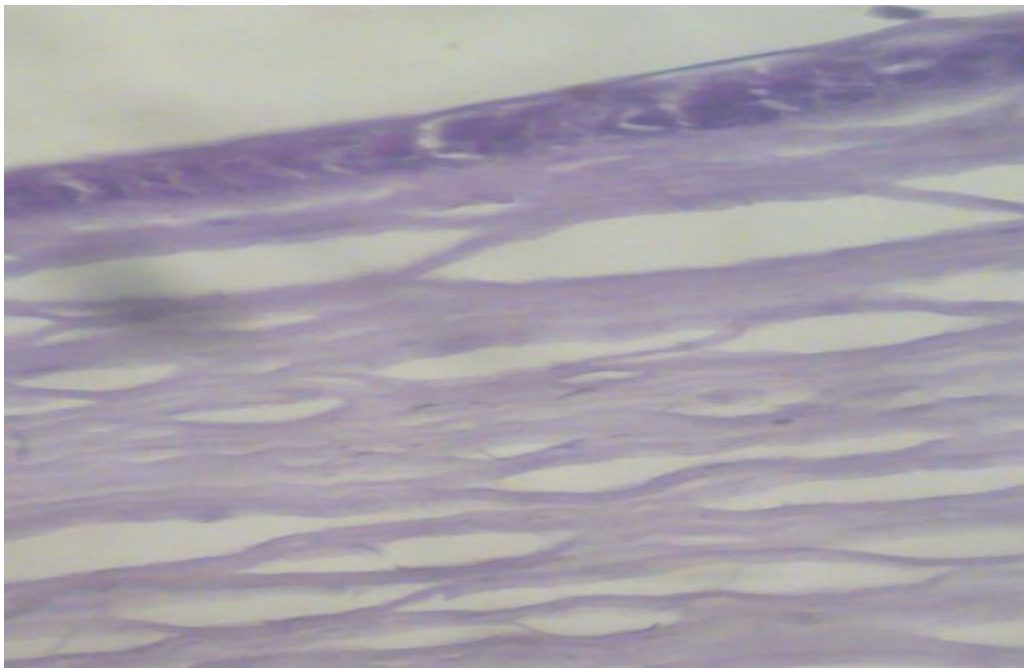
الاعراض السريرية

تم حقن تراكيز مختلفة ( 15,12,10 ) ( وحدة/ مليلتر ) بحجم 40 ميكرولترآ من انزيم البروتيز القاعدي الخام من العزلة Pa5 . كذلك تم حقن تراكيز مختلفة ( 10,7,5 ) ( وحدة/ مليلتر ) بحجم 40

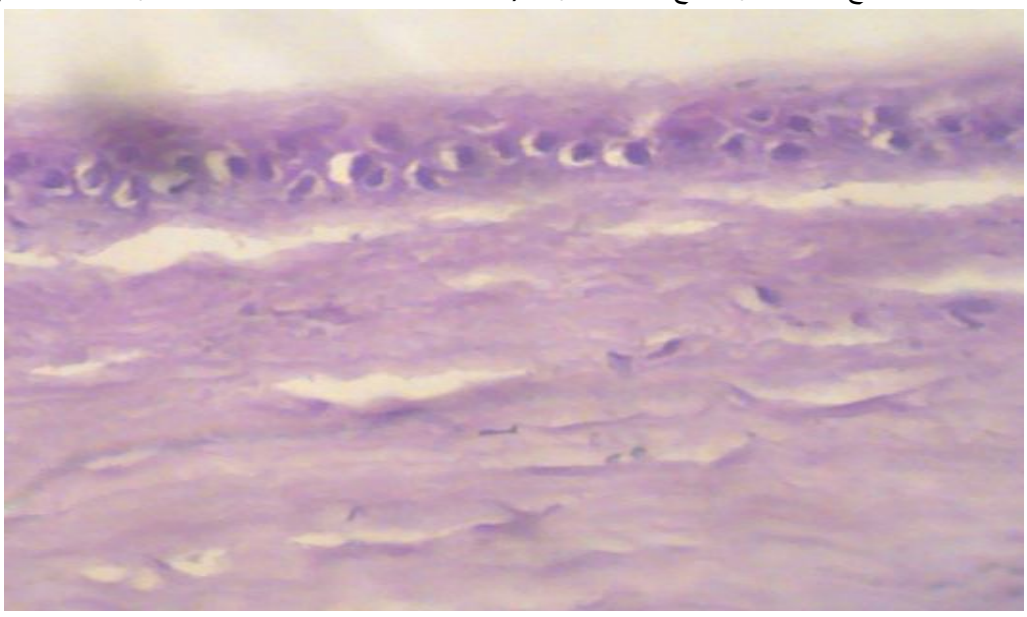
ميكرولتراً من انزيم الـــ LasA الخام من العزلة Pa4. في قرنيات عيون الارانـــب ولوحظـــت التغيـــرات السريرية على القرنيات المعاملة بعد مرور 24 ساعة من الحقن. واظهر التركيز 12 وحدة/ مليلتر من انزيم البروتيز القاعدي الخام عتمة من الدرجة الاولى (عتمة في ثلث سطح القرنية ) . بينما اظهر التركيز 7 وحدة / مليلتر من انزيم الـــ LasA الخام عتمة من الدرجة الثانية ( عتمة في ثلثي سطح القرنية و/ او انتفاخ طفيف ). وقد لوحظ ان شدة الاصابة تزداد مع زيادة التركيز لكلا الانزيمين . اظهرت نتائج الفحص النسجي للقرنية بان التركيز 12 وحدة / مليلتر من انزيم البروتيز الخام سبب انسلاخ الطبقة الظهارية مع خزب شديد في نسيج السدى للقرنية كما موضح في الشكل ( 1 ). اما التركيز 7 وحدة / مليلتر من انزيم الـــــ LasA الخام فقد سبب تلف النسيج السدى للقرنية مع تكون الخزب كما موضح في الشكل ( 2 ).بالمقارنة مـــع السيطرة الشكل ( 3 ).



الشكل ( 1 ): مقطع عرضي لقرنية عين ارنب حقنت بانزيم البروتيز القاعدي الخام بتركيـــز 12 وحـــدة / مليلتر نلاحظ انسلاخ الظهارية مع خزب شديد في نسيج السدى للقرنية. ( صبغة الهيماتوكسلين والايوســـين، التكبير للقوة x400 ).



الشكل ( 2 ): مقطع عرضي لقرنية عين ارنب حقنت بانزيم الـ LasA الخام بتركيز 7 وحدة / مليلتر نلاحظ تلف النسيج السدى للقرنية مع تكون الخزب.(صبغة الهيماتوكسلين والايوسين، التكبير للقوة x400 ).



الشكل (3 ): مقطع عرضي لقرنية عين ارنب غير مصاب ( سيطرة ).( صبغة الهيماتوكسلين والايوسين، التكبير للقوة x400 ).

المناقشة

تشير دراسات عديدة اجريت على المرضى المصابين بالتهاب القرنية البكتيري الى ان بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* هي المسبب الاكثر شيوعا وتكرارا في العزل من الحالات المرضية

(1996) Cohen و Levey اشارا الباحثان . ( Rudnex *et al*., 2000; Robertson *et al*.,2011) الى ان نسبة عزل البكتريا من المرضى المصابين بالتهاب القرنية هي 10% . اما في المملكة المتحدة فيشير الباحث Schaefer *et al.,* (2001) الى ان نسبة عزل البكتريا من مرضى التهاب القرنية هي 9% . اما في استراليا فقد اشار الباحثون الى نسبة عالية لعزل هذه البكتريا من حالات التهاب القرنية المتسبب عن استخدام العدسات اللاصقة وهي 70% (Thakur *et al*., 2004). تختلف النسب المئوية لعزل لهذه البكتريا من باحث لاخر، واسباب الاختلاف عديدة منها وقت جمع العينات وحجم العينات المأخوذة والظروف الصحية والاقتصادية والموقع الجغرافي والتباين في طرائق التشخيص المتبعة واختلاف مصادر العزل. اشار الباحث Lomholt *et al*., (2001) الى ان العزلات البكتيرية المعزولة من التهاب القرنية تكون ذات انتاجية لانزيم الـ Elastase تقدر بـ 51% وتظهر فعالية عالية له.وفي دراسة اجريت على 145 عزلة بكتيرية ( في الولايات المتحدة الامريكية ) معزولة من مصادر سريرية مختلفة وبضمنها التهاب القرنية، وجد ان هذه العزلات جميعها تمتلك الجين المسؤول عن انتاج الانزيم، ولكن اربعة منها فشلت في التعبير الجيني عنه (Caballero *et al*., 2004) . في حين تشير دراسة اخرى الى ان نسبة انتاج الانزيم من العزلات البكتيرية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة تقع ما بين ( 74-99 )% (Peters & Galloway,1990) اشارت بعض الدراسات الى ان انتاج انزيم الـ LasA بكميات قليلة (0.1 ميكروغرام) لبعض السلالات البكتيرية قد يجعلها كفوءة في سرعة تحليلها لخلايا الهدف (Vessillier *et al*., 2001 ) . كما اشار الباحث Caballero *et al*. (2004) الى ان 145 عزلة بكتيرية معزولة من مصادر مختلفة جميعها تمتلك الجين المسؤول عن انتاج الانزيم، ولكن 17 منها فشلت في التعبير عن الانزيم، وربما يعود السبب الى ان هذه العزلات البكتيرية تتطلب اشارات اضافية او تفاعلات غير موجودة في الوسط لتسهم في التعبير عن الجين المسؤول عن انتاج الانزيم. بينما اشار الباحث Lomholt *et al.* (2001) في ان 40% من العزلات البكتيرية المعزولة من التهاب القرنية تظهر فعالية الانزيم. ربما يعود سبب انتاج انزيم البروتيز القاعدي من العزلات البكتيرية المعزولة من التهاب القرنية الى دور هذه الانزيم في امراضية البكتريا. فالانزيم لا يعد فقط عاملاً مسبباً لتلف الانسجة فحسب ولكنه ايضا يعد عامل استيطان في عيون الحيوانات المختبرية عند الاصابة (Nagano *et al*., 2001 ) . وهذا يتفق مع Lomholt *et al.* (2001) التي أشارت دراستهم الى ان العزلات البكتيرية المعزولة من الجروح والتهاب القرنية والخروج والدم والرئة والادرار جميعها تمتلك فعالية عالية للانزيم. اكدت احدى الدراسات على دور انزيم LasA المنقى في اصابة القرنية وذلك عند حقن الانزيم (5 ميكروغرامات) في القرنية، اذ لوحظ وجود تأثيرات مرضية ادت الى حدوث ضرر في القرنية،كما لاحظ الباحث وجماعته حدوث ضرر في القرنية عند حقن الانزيم المنقى مع عزلة بكتيرية مطفرة ( غير منتجة للانزيم) ليس لها القابيلة على احداث الاصابة مما يدل على دور هذا الانزيم في احداث الاصابة (Preston *et al*., 1997 ). في حين تشير دراسات اخرى الى ان اضافة انزيم البروتيز القاعدي (5 ميكروغرامات) مع العزلة اليكتيرية المطفرة (غير المنتجة للانزيم) الى قرنيات عيون الحيوانات المختبرية قد ادى الى حدوث اصابة مشابه للاصابة التي تحدثها العزلة البكتيرية غير المطفرة ( أي المنتجة الانزيم) مما يدل على دور هذا الانزيم في اصابة القرنية. كذلك تشير الى ان حقن انزيم البروتيز القاعدي (20 ميكروغراماً) في قرنيات الحيوانات المختبرية قد ادى الى احداث اضرار بالغة للقرنية، حيث تشير هذه الدراسات الى ان للانزيم دوراً رئيساً في احداث اصابة القرنية ( Delden & Iglewski, 1998; Nagano *et al*., 2001). تشير الدراسات الى ان لانزيم البروتيز القاعدي دوراً فعالاً في النخر التميعي

(Liquifactive Necrosis) السريع لسدى القرنية والذي تتصف به الاصابة البكتيرية للقرنية، اذ ان العزلات البكتيرية المطفرة للانزيم لا تتمكن من احداث مثل هكذا اضرار خلال الاصابة البكتيرية للقرنية، لذا يشار الى الانزيم بانه عامل ضراوة مهم في امراضية البكتريا للقرنية

(Lomholt et al., 2001; Hobden, 2002 ). اشار الباحثان (Kreger & Gray, 1978 ) الى نتائج الفحص المجهري بوساطة المجهر الضوئي والالكتروني للقرنيات المعاملة بالبروتيزات المنقاة من البكتريا اظهر تحلل ونخر الخلايا الظهارية (Epithelium) والبطانية ( Endothelium ) وكذلك خلايا Keratocytes، ولوحظ ارتشاح وتحلل ونخر خلايا PMNs، فقدان النمط النسيجي الطبيعي لـ Stromal Proteoglycan، تشتت التركيب الطبيعي لليفات الكولاجين، تجمع بروتينات البلازما في القرنيات المتنخرة، كما واشار الباحثان الى ان هذه التغيرات التركيبية الناتجة من اصابة القرنية ببروتيزات البكتريا مماثلة للتغيرات التركيبية الناتجة من اصابة القرنية بالبكتريا، ان هذا التشابة في التغيرات التركيبية للقرنية تؤكد الفكرة القائلة ان انزيمات البروتيزات لبكتريا *P.aeruginosa* هي المسؤولة بصورة رئيسة عن الاضرار الناتجة من التهاب القرنية المتسبب عن البكتريا

(Burns *et al*., 1990; Thakur *et al*., 2004; Tang *et al*., 2009). تشير الدراسات النسيجية المرضية الى ان حقن البكتريا في قرنيات عيون الحيوانات المختبرية ادى الى تكون بؤرة التهابية في سدى القرنية Corneal stroma بالاضافة الى تحطم نسيج السدى نتيجة تحطم الحشوة بين الخلوية Extracellular matrix والتي تظهر على شكل فراغات كبيرة بيضاء اللون ضمن نسيج السدى، مع تحطم تام للظهارية في مركز القرنية مع تكون الخزب الشديد Severe edema ( Thakur *et al*., 2002; Thakur *et al*., 2004). وفي دراسةنسيجية اخرى ادى حقن انزيم البروتيز بتركيز 10 ميكروغرام بحجم 20 ميكرولتر في قرنيات عيون الارانب الى تحطم طبقة الظهارية بالاضافة الى تحطم جزء من سدى القرنية مع ارتشاح خلايا التهابية للقرنية. تشير الدراسة الى ان البروتيزات المنتجة من البكتريا تسبب تحطم الانسجة بدون الاعتماد على حيوية البكتريا أي انها تسبب تلف الانسجة بعد قتل البكتريا بالعلاج بوساطة المضادات الحيوية، لهذا يعتبر تثبيط فعالية انزيمات البروتيز مفيد في حماية القرنية من الضرر الناتج من هذه الانزيمات ( Tang *et al*., 2009) .

المصادر

Aristoteli , L.P. and Willcox ,D.P. (2003). Mucin degradation mechanisms by distinct *Pseudomonas aeruginosa* isolates in vitro. Infect. Immun.71(10): 5565-5575.

Ayelet , P.; Aaron, G. and Irina, B.S.(2006). Severe *Pseudomonas aeruginosa* keratitis shortly after initiation of corneal refractive therapy. Eye & Cont. Lens. Sci.Clin. Prac. 32 (1): 1-2.

Bradford ,M.M. (1976). Arapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. Anal. biochem. 72: 248-254.

Burns , F.R.; Paterson, C.A.; Gray, R.D. and Wells, J.T. (1990). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and *Pseudomonas* keratitis using a thiol-based peptide. Anti. Agent Chemther. 34 (11): 2065-2069.

Caballero , A.; Thibodeaux, B.; Marquart, M.; Traidej, M. and O'Callaghan, R. (2004).*Pseudomonas* keratitis: proteaseIVgene conservation, distribution,and production relative to virulence and other *Pseudomonas* protease. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 45: 522-530.

Collee ,J.G.; Miles, R.S. and Watt, B. (1996). Test for the identification of bacteria in: Practical Medical Microbiology, by : Collee, G.; Fraser, A.G.;

Marmion, B.P. and Simmon, A. (eds), (14th ed). Churchill Living Stone New york. pp.131-146.

Delden ,C.V. and Iglewski, B.H. (1998). Cell-to- cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. Emer. Infect. Dis. 4 (4): 534-539.

Diggle ,S.P.; Winzer, K.; Lazdunski, A.; Williams, P. and Camara, M. (2002). Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa* : *mva* T and the regulation of N- acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. J. Bacteriol. 184 (10): 2576-2586.

Estrellas ,S.; Alionte, G. and Hobden, A. (2000). A *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a contact lens- induced acute red eye (CLARE) is protease-deficient. Curr. Eye. Res. 20: 157-165.

Fleiszig ,S.M.; Kronish, J.P.; Vallas, M.V.; Mostov, K.E.; Kanada, D.; Yen, T.S. and Frank, D.W. (1997). *Pseudomonas aeruginosa* – mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzymes S . Infect. Immun. 65 (2): 579-586.

Forte**,**R.; Cennamo,G. and Prete,S.( 2010). Scanning electron microscopy of corneal epithelium in soft contact lens weares.Cornea. 29:732-736.

Hobden, J.A. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* proteases and corneal virulence. DNA Cell Biol.21 (5-6): 391- 396.

Holt, J.G.; Krieg, N.B.; Stabley, J.T. and Williams, S.T. (1994). In " Bergey's manual of determinative bacteriology ".(9th ed.) Williams & Wilkins, Baltimore USA.

Humason, C.L. (1972). Animal tissue techniques (3rd edition). W.H. Freeman and Company. P. 641.

Levey, S.B. & Cohen, E.J. (1996). Perspectives in refraction: methods of disinfecting contact lenses to avoid corneal disorders. Surv. Ophthalmol. 41 (3): 245-251.

Lin, Y.C.; Lu, C.K.; Chen, K.H. & Hsu, W.M. (2006). Daytime orthokeratology associated with infectious leratitis by multiple gram- negative bacilli: *Burkholderia cepacia* , *Pseudomonas putida* , and *P. aeruginosa*. Eye & Cont. Lens. Sci. Clin. Prac. 32 (1): 19-20.

Lomholt, J.A.; Poulsen, K. & Kilian, M. (2001). Epidemic population structure of *Pseudomonas aeruginosa* : evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors. Infect. Immun. 69 (10): 6284-6295.

Kreger, A.S. & Griffin, O.K. (1974). Physicochemical fractionation of extracellular cornea- damaging proteases of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun.9 (5): 828-834.

Kreger, A.S. & Gray, L.D. (1978). Purification of *Pseudomonas aeruginosa* proteases and microscopic characterization of pseudomonal protease-induced rabbit corneal damage. Infect. Immun. 19 (2): 630-648.

Matsumoto, K. (2004). Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis. Walter de Gruyter. 385 (11): 1007-1016.

Nagano**,** T.; Long, H.J.; Nakamura, M.; Kumagai, N.; Abe, M.; Nakazawa, T. & Nishida, T. (2001). Stimulatory effect of pseudomonal elastase on collagen degradation by cultured keratocytes. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 42: 1247-1253.

Ohman, D.E.; Gryz, J.J. & Iglewski, B.H. (1980). Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. J. Bacteriol. 142 (3): 836-842.

Parks,Q.M.;Young,R.L.and Poch,K.R.(2009). Neutrophil enhancement of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development : human F-action and DNA as targets for therapy. J.Med. Microbiol. 58: 492-502.

Peters, J.E. & Galloway, D.R. (1990). Purification and characterization of an active fragment of the LasA protein from *Pseudomonas aeruginosa* : enhancement of elastase activity. J. Bacteriol. 172 (5): 2236-2240.

Preston, M.J.; Seed, P.C.; Toder, D.S.; Iglewski, B.H.; Ohman, D.E.; Gustin, J.K.; Goldberg, J.B. & Pier, G.B.(1997). Contribution of proteases and LasR to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during corneal infection. Infect. Immun. 65 (8): 3086-3090.

Robertson,D.M.; Parks,Q.M.; Young, R.L.; Malcolm,K.C.; Nichols, D.P.; Cavanagh, H.D. and Nick, J.A. (2011). Disruption of contact lens associated Pseudomonas aeruginosa biofilms formed in the presence of neutrophils. Invest. Ophthalmol.Vis.Sci. 52: 2844-2850.

Rudnex**,** X.L.; Kernacki, K.A.; Barrett, R.P. & Hazlett, L.D. (2000). Prolonged elevation of IL-1 in *Pseudomonas aeruginosa* ocular infection regulates macrophage-inflammatory protein-2 production, and corneal perforation. J. Immun. 164: 6576-6582.

Schaefer, F.; Bruttin, O.; Zagrafas, L. & Crosier, Y. (2001). Bacterial keratitis: a prospective clinical and microbiological study. Br. J. Ophthalmol. 85: 842-847.

Sharma, J.; Singh, A.; Kumar, R. & Mittal, A. (2006). Partial purification of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* AWT20 and its enhanced stabilization in entrapped ca-alginate beads. Int. J. Microbiol. 2 (2): 98-106.

Szczotka-flynn,L.B.; Lass, J.H. and Sethi, A. (2010). Risk factors for corneal infiltrative events during continuous wear of silicone hydrogel contact lenses. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 51: 5421- 5430.

Tam, C.; Mun, J.J. and Evans, P.J. (2010 ). The impact of inoculation parameters on the pathogenesis of contact lens-related infectious keratitis. Invest. Ophthalmol. Vis.Sci. 51: 3100-3106.

Tang, A.; Marquart,M.E.; Fratkin, J.D.; McCormick, C.C.; Caballera,A.R.; Gatlin, H.P. and Ocallaghan, R.J. (2009). Properties of PASP. A Pseudomonas protease capable of mediating corneal erosions. Invest. Ophthalmol. Vis.Sci. 50: 3794-3801. Thakur, A.; Barrett, R.P.; Hobden, J.A. & Hazlett, L.D. (2004). Caspase-1 inhibitor reduces severity of *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 45 (9): 3177-3184.

Thakur, A.; Yue,M.; Stapleton, F.; Hoyd,R. and Wakefield,D. (2002). Balance of pro- and anti-inflammatory cytokines correlates with outcome of acute experimental *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. Infects. Immu. 70 (4): 2187-2197.

Vessillier,S.; Delolme, F.; Bernillon, J.; Saulnier, J. & Wallach, J. (2001). Hydrolysis of glycine- containing elastin pentapeptides by LasA, ametallo elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. Eur. J. Biochem. 268: 1049-1057.

Zaidi, T.s.; Zaidi, T. and Pier, G.B. (2010).Role of neutrophils, myd 88- mediated neutrophil recruitment, and complement in antibody mediated defense against *Pseudomonas aeruginosa* keratitis.Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 51: 2085-2093.