

Specular Microscopy Evaluation of Corneal Endothelial Cells after Intravitreal and Subconjunctival Injection of Avastin

Katbab A, MD*; Maghsudi A, MD; Jamshidian-Tehrani M, MD; Mosallaei M, MD; Obudi R, MD; Alipour A, PhD

Poostchi Eye Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

*Corresponding author: katbab@sums.ac.ir

Purpose: To evaluate corneal endothelial cell changes after intravitreal and subconjunctival injection of avastin (bevacizumab) based on specular microscopic findings.

Methods: This prospective interventional study was performed on 82 eyes of 82 patients. Forty-two cases with pterygia received a subconjunctival injection of bevacizumab (2.5mg/0.2ml) and 40 diabetic subjects with retinal neovascularization or macular edema received an intravitreal injection of bevacizumab (1.25mg/0.1ml). Specular microscopy, including corneal endothelial cell count, size and shape, was performed in all patients for the injected eye before, and one and three month after injection and the results were compared and analyzed.

Results: There was no change in the corneal endothelial cells count after one month but there was mild reduction of endothelial cells after 3 months which was not statistically significant. ($P=0.75$ and 0.29 , respectively).

Conclusion: Subconjunctival and intravitreal injection of bevacizumab (up to 1.25 mg/0.1 ml and 2.5 mg/0.2 ml, respectively) entails no harmful effect on human corneal endothelial cells up to three months following the injection.

Keywords: Corneal Endothelial Cell, Avastin (Bevacizumab), Injection

• Bina J Ophthalmol 2010; 15 (4): 274-277.

Received: 19 December 2009

Accepted: 8 March 2010

بررسی اثر تزریق زیر ملتحمه‌ای و داخل زجاجیه‌ای داروی اوستین بر سلول‌های اندوتلیوم قرنيه بر اساس یافته‌های اسپیکولار میکروسکوپی

دکتر اسداله کتباب^۱، دکتر عبدالرضا مقصودی^۲، دکتر منصوره جمشیدیان طهرانی^۳، دکتر مهناز مصلائی^۴، دکتر رضا عبودی^۵ و دکتر عباس علیپور^۶

هدف: بررسی اثر تزریق زیر ملتحمه‌ای و داخل زجاجیه‌ای داروی اوستین بر سلول‌های اندوتلیوم قرنيه، بر اساس یافته‌های اسپیکولار میکروسکوپی.

روش پژوهش: این مطالعه مداخله‌ای آینده‌نگر بر روی ۴۲ بیمار مبتلا به ناخنک و ۴۰ بیمار دیابتی مبتلا به نورگ‌زایی شبکیه یا ادم ماکولا صورت گرفت. اوستین به میزان ۱ cc ۰/۱ mg/۱، از ناحیه ۴ میلی‌متری پشت لیمبوس به داخل زجاجیه تزریق شد. در بیماران مبتلا به ناخنک نیز میزان ۲ cc ۰/۲ mg/۵، اوستین زیر ملتحمه نزدیک لیمبوس تزریق گردید. کلیه بیماران قبل و در ماه‌های اول و سوم بعد از تزریق توسط اسپیکولار میکروسکوپ، مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: در تزریق داخل زجاجیه‌ای و زیر ملتحمه‌ای اوستین، تعداد سلول‌های قرنيه پس از یک ماه تغییری نکرد اما پس از سه ماه از تعداد این سلول‌ها مختصری کاسته شد که از نظر آماری معنی‌دار نبود (میزان P به ترتیب ۰/۷۵۲ و ۰/۲۹).

نتیجه‌گیری: تزریق اوستین به صورت داخل زجاجیه‌ای و زیر ملتحمه‌ای تا مدت سه ماه پس از تزریق اثر سویی بر سلول‌های اندوتلیوم قرنيه ندارد.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۸۹؛ دوره ۱۵، شماره ۴: ۲۷۴-۲۷۷.

• پاسخ‌گو: دکتر اسداله کتباب (e-mail: katbab@sums.ac.ir)

۱- دانشیار- چشم پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۲- چشم‌پزشک- مرکز تحقیقات پوستچی- دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۳- دستیار- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۴- فلوشیپ قرنيه- مرکز تحقیقات پوستچی- دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۵- دکترای اپیدمیولوژی- مرکز تحقیقات پوستچی- دانشگاه علوم پزشکی شیراز

شیراز- خیابان پوستچی- مرکز تحقیقات چشم‌پزشکی پوستچی

مقدمه

اوستین یک آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی می‌باشد که به کلیه ایزوفرم‌های عامل رشد اندوتلیوم عروق (VEGF) متصل شده و آن‌ها را غیرفعال می‌نماید^۱. مصرف سیستمیک اوستین به عنوان درمان کمکی سرطان‌های متاستاتیک کولورکتال مورد تایید قرار گرفته است^{۲-۴}. امروزه به صورت گسترده از اوستین جهت درمان بیماری‌های چشم نظیر استحال و وابسته به سن ماکولا^{۵-۶} و رتینوپاتی پرولیفراتیو دیابتی^{۷،۸} استفاده می‌شود، البته استفاده از دارو در چشم به طور کامل مورد تایید سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) قرار نگرفته است.

تزریق داخل زجاجیه‌ای و حتی موضعی اوستین، غلظت قابل اندازه‌گیری در اتاق قدامی ایجاد می‌کند^{۹،۱۰} و با توجه به وجود گیرنده VEGF در سطح سلول‌های اندوتلیوم قرنيه، امکان ایجاد عوارض دارو بر سلول‌های اندوتلیوم قرنيه مطرح گردیده است^{۱۱،۱۲}. تاکنون تحقیقات محدودی در زمینه آثار مضر اوستین بر سلول‌های اندوتلیوم قرنيه صورت پذیرفته است. با این وجود نتایج مطالعات آزمایشگاهی حاکی از عدم تاثیر منفی اوستین بر سلول‌های اندوتلیوم کشت شده می‌باشند^{۱۳،۱۴}. در یک تحقیق صورت گرفته بر سلول‌های اندوتلیوم قرنيه چشم انسان نیز مشخص گردید تزریق داخل زجاجیه‌ای اوستین، بر ضخامت و تعداد سلول‌های اندوتلیوم قرنيه اثر سویی ندارد^۱.

با توجه به نقش قرنيه شفاف در کیفیت مطلوب بینایی و اهمیت اساسی سلول‌های اندوتلیوم در حفظ این شفافیت، در این مطالعه سعی کردیم اثر تزریق زیر ملتحمه‌ای و داخل زجاجیه‌ای داروی اوستین را بر سلول‌های اندوتلیوم قرنيه، بررسی نماییم.

روش پژوهش

این مطالعه به صورت مداخله‌ای آینده‌نگر در درمانگاه چشم‌پزشکی پوستچی، وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شیراز در سال ۱۳۸۷ انجام شد. تعداد ۴۲ بیمار مبتلا به ناخنک و ۴۰ بیمار دیابتی مبتلا به نورگ‌زایی شبکیه یا ادم ماکولا مورد مطالعه قرار

گرفتند.

بیماران با سابقه ضربه یا عمل جراحی چشم، از جمله جراحی شبکیه و آب‌مرورید از مطالعه حذف شدند. هم‌چنین بیماری‌های زمینه‌ای سلول‌های اندوتلیوم قرنيه از قبیل سندرم ایریدوکورنیواندوتلیال (ICE: iridocorneal endothelial syndrome)، بیماری فوکس و نیز سابقه پیوند، عفونت، التهاب قرنيه و عود مجدد ناخنک به عنوان معیار خروج از مطالعه در نظر گرفته شدند. در بیماران کاندید تزریق داخل زجاجیه‌ای، بعد از بی‌حسی موضعی توسط قطره تتراکائین ۰/۵ درصد و ضدعفونی پلک‌ها و فورنیکس‌ها با محلول بتادین ۵ درصد، به وسیله سوزن شماره ۲۷ میزان ۱ cc ۱/۲۵ mg از داروی اوستین به صورت داخل زجاجیه‌ای در ناحیه ۴ میلی‌متری پشت لیمبوس، تزریق گردید. در بیماران مبتلا به ناخنک نیز با روش مشابه مقدار ۲ cc ۲/۵ mg اوستین زیر ملتحمه نزدیک لیمبوس تزریق شد. در هر دو گروه به صورت کوتاه مدت قطره آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و یا سیپروفلوکساسین مورد استفاده قرار گرفت.

قبل از تزریق، اطلاعات جمعیتی، حدت بینایی (بر اساس چارت اسنلن)، موقعیت و اندازه ناخنک و نتیجه معاینات چشم توسط اسلیت‌لمپ ثبت شد. در بیماران با درگیری شبکیه فوندوسکوپي نیز صورت گرفت و وجود ادم ماکولای شدید (CSME) و محل نورگ‌زایی و خون‌ریزی زجاجیه ثبت گردید. هم‌چنین کلیه بیماران قبل از تزریق و در ماه‌های یک و سه بعد از تزریق توسط دستگاه اسپکولار میکروسکوپي (ژاپن، تکیو SP3000P; Topcon)، مورد بررسی قرار گرفتند و اطلاعاتی نظیر تعداد، شکل و اندازه سلول‌های اندوتلیوم قرنيه ثبت شد.

کلیه یافته‌ها جهت بررسی آماری، وارد نرم افزار SPSS-12 شد و توسط آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه با تکرار مشاهدات (repeated measurement of ANOVA)، مدل رگرسیون خطی چند متغیره با روش گام به گام و تخمین منحنی (curve estimation) مورد ارزیابی قرار گرفت. در همه موارد مقدار $P < 0.05$ از لحاظ آماری قابل توجه تلقی شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۴۲ چشم از ۴۲ بیمار شامل ۱۸ مرد (۴۲/۹) درصد و ۲۴ زن (۵۷/۱) درصد مبتلا به بیماری ناخنک، تحت تزریق زیرملمتحمه‌ای داروی اوستین قرار گرفتند. سن بیماران از ۲۳ تا ۶۵ سال متغیر بود (میانگین 39.02 ± 9.76). در چشم‌های مورد بررسی کلیه موارد ناخنک در موقعیت نازال قرار داشت. در ۲۵ مورد، چشم راست (۵۹/۵ درصد) و در ۱۷ مورد، چشم چپ (۴۰/۵ درصد) درگیر بود.

در بررسی اثر تزریق زیرملمتحمه اوستین در بیماران مبتلا به ناخنک (جدول ۱)، تعداد سلول‌های قرنیه در ماه اول افزایش و در ماه سوم کاهش یافت. اندازه سلول‌های قرنیه در ماه اول کوچک‌تر و در ماه سوم بزرگ‌تر شد. درصد سلول‌های هگزاکونال (شکل سلول‌های قرنیه) ابتدا سیر صعودی و بعد سیر نزولی داشت که هیچ کدام از تغییرات فوق از نظر آماری معنی‌دار نبود (به ترتیب $P=0.087$ ، $P=0.498$ و $P=0.752$). هم‌چنین ۴۰ چشم از ۴۰

بیمار شامل ۱۹ مرد (۴۷/۵ درصد) و ۲۱ زن (۵۲/۵ درصد) مبتلا به رتینوپاتی دیابتی، تحت تزریق داخل زجاجیه‌ای داروی اوستین قرار گرفتند. سن بیماران از ۳۷ تا ۸۰ سال متغیر بود (میانگین 57.83 ± 10.03). چشم‌های مورد بررسی شامل ۲۲ مورد (۵۵ درصد) چشم راست و ۱۸ مورد (۴۵ درصد) چشم چپ و رتینوپاتی در ۲۸ مورد (۷۰ درصد) در سطح شبکیه (NVE) و عصب بینایی (NVD) و در ۱۲ مورد (۳۰ درصد) از نوع ادم ماکولای بارز بالینی (CSME) بود.

در بررسی اثر تزریق داخل زجاجیه اوستین بر تعداد سلول‌های قرنیه (جدول ۲)، پس از یک ماه تغییری مشاهده نشد و پس از سه ماه تعداد سلول‌ها کاهش یافت. در شکل سلول‌های قرنیه نیز در ماه اول و سوم تغییرات ناچیزی به وجود آمد. اندازه سلول‌ها در ماه اول و سوم تغییر قابل توجهی نداشت و هیچ کدام از تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبودند (به ترتیب $P=0.283$ ، $P=0.707$ و $P=0.29$).

جدول ۱- اثر تزریق زیر ملتحمه‌ای اوستین، بر سلول‌های اندوتلیال قرنیه بیماران مبتلا به ناخنک

میزان P	سه ماه پس از تزریق	یک ماه پس از تزریق	قبل از تزریق	
۰/۰۸۷	۲۴۲۸/۶	۲۴۴۲/۷	۲۴۲۸/۵	تعداد
۰/۴۹۸	۴۱۸/۷	۴۱۵/۳	۴۱۹/۶	اندازه (میکرون)
۰/۷۵۲	۴۷/۷	۵۳/۴	۵۱/۷	شکل (درصد هگزاکونال)

جدول ۲- اثر تزریق داخل زجاجیه‌ای اوستین، بر سلول‌های اندوتلیال قرنیه بیماران مبتلا به رتینوپاتی دیابتی

میزان P	سه ماه پس از تزریق	یک ماه پس از تزریق	قبل از تزریق	
۰/۲۸۳	۲۳۹۰/۴۳	۲۴۰۲/۷	۲۴۰۴/۷۵	تعداد
۰/۷۰۷	۴۲۴/۴۶	۴۱۸/۸۵	۴۲۰/۵۸	اندازه (میکرون)
۰/۲۹	۵۴/۲۸	۵۲/۱۳	۵۳/۵۳	شکل (درصد هگزاکونال)

آن در سلول‌های اندوتلیوم قرنیه وجود دارند^{۱۱،۱۲}. بنابراین به صورت نظری کاربرد اوستین به صورت داخل زجاجیه‌ای یا موضعی می‌تواند بر سلول‌های اندوتلیوم قرنیه اثر سمی داشته باشد و یا دست‌کم موجب تغییر آن‌ها شود.

مطالعه ما به صورت *in vivo* بر روی ۸۲ بیمار انجام شد و نشان داد که تزریق اوستین چه به صورت داخل زجاجیه‌ای (با مقدار ۱/۲۵ mg) و چه به صورت زیر ملتحمه‌ای (با مقدار ۲/۵ mg)، تا انتهای ماه سوم، تغییری در تعداد، اندازه و شکل

بحث

اوستین که نوعی آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی است به صورت *off-label* در بیماری‌های مختلف داخل و سطح چشم که همراه با ایجاد عروق جدید هستند، مورد استفاده قرار می‌گیرد و امروزه کاربرد آن رو به افزایش است^{۴-۱۵}. این دارو کلیه گیرنده‌های VEGF را مهار می‌نماید^۱. تزریق موضعی و یا داخل زجاجیه‌ای اوستین، غلظت قابل اندازه‌گیری در اتاق قدامی چشم ایجاد می‌کند^{۷،۸}. هم‌چنین نشان داده شده است که VEGF و گیرنده‌های

آسیب‌شناسی بررسی گردید که با هیچ اثر سوئی همراه نبود.^{۱۴} در سال ۲۰۰۸ مطالعه‌ای جهت بررسی اثر تزریق داخل اتاق قدامی اوستین (intracameral injection) بر سلول‌های اندوتلیوم قرنيه خرگوش صورت گرفت. در پایان محققان نتیجه‌گیری کردند که اوستین تا مقدار ۲/۵ mg/۰/۱ ml، اثر سوئی بر شکل و حیات سلول‌های اندوتلیوم قرنيه خرگوش ندارد.^{۱۵} اولین بار در سال ۲۰۰۸ در چین اثر تزریق داخل زجاجیه‌ای اوستین، بر سلول‌های اندوتلیوم قرنيه انسان مورد بررسی قرار گرفت.^۱ در این مطالعه بعد از تزریق ۲/۵ mg اوستین به داخل زجاجیه ۵۰ بیمار، افراد در طول مدت شش ماه توسط اسپیکولار میکروسکوپ پی‌گیری شدند و ضخامت مرکز قرنيه و تعداد سلول‌های اندوتلیوم اندازه‌گیری شد که هیچ‌گونه اثر سوئی در فاز حاد (روزهای اول و هفتم بعد از تزریق) و در فاز مزمن (ماه‌های سوم و ششم بعد از تزریق) مشاهده نگردید. در این مطالعه چشم مقابل (فاقد تزریق)، به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. در تایید نتیجه حاصل از تحقیق ما، این مطالعه نشان داد که تزریق داخل زجاجیه‌ای اوستین تا مقدار ۲/۵ mg/۰/۱ ml یا تزریق زیر ملتحمه‌ای با مقدار ۲/۵ mg/۰/۲ cc تا پایان ماه سوم پس از تزریق، اثر سوئی بر سلول‌های اندوتلیوم قرنيه ایجاد نمی‌نماید.

سلول‌های اندوتلیوم قرنيه ایجاد نمی‌نماید. در این مطالعه کلیه تزریقات در یک چشم (راست یا چپ) انجام شد و به علت ملاحظات اخلاقی، از تزریق دارونما (placebo) در چشم مقابل اجتناب گردید. همچنین اثر تزریقات مکرر اوستین (که به صورت معمول انجام می‌شود) و عوارض طولانی‌مدت بررسی نشد.

در گذشته تحقیقات محدود آزمایشگاهی و بالینی جهت ارزیابی اثر اوستین بر روی سلول‌های اندوتلیوم قرنيه صورت گرفته است. نتایج این تحقیقات هماهنگ با نتایج مطالعه ما می‌باشند. در یک مطالعه آزمایشگاهی که توسط Kernt و همکاران^{۱۳} در محیط کشت انجام شد، اوستین با غلظتی معادل ۱۰ برابر غلظت معمول تزریق داخل زجاجیه، بر سلول‌های اندوتلیوم قرنيه اثر مضرى نداشت و نتیجه‌گیری شد که تزریق مقدار معمول اوستین (۱-۱/۲۵mg) به داخل زجاجیه، برای سلول‌های قرنيه بی‌خطر است. در تحقیق دیگری بر روی سلول‌های کشت داده شده قرنيه انسان (سلول‌های اندوتلیوم، کراتینوسیت و فیبروبلاست)، مشخص شد که غلظتی معادل ۲۰ برابر مقادیر تزریقات مرسوم داخل زجاجیه نیز، آسیبی به سلول‌های قرنيه از جمله سلول‌های اندوتلیوم نمی‌رساند.^۱ در مطالعه دیگر بر روی مدل حیوانی، از اوستین موضعی ۵ بار در روز استفاده شد. پس از ۱۶ روز سلول‌های اندوتلیوم قرنيه خرگوش کشت داده شد و از نظر

منابع

- Chiang CC, Chen WL, Lin JM, Tsai YY. Effect of bevacizumab on human corneal endothelial cells: a six-month follow-up study. *Am J Ophthalmol* 2008;146:688-691.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-2342.
- Marshall J. The role of bevacizumab as first-line therapy for colon cancer. *Semin Oncol* 2005;32(Suppl 9):43-47.
- Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA, Giusti MJ. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2006;113:363-372.
- Spaide RF, Laud K, Fine HF, Klanclnik JM Jr, Meyerle CB, Yannuzzi LA, et al. Intravitreal bevacizumab treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Retina* 2006;26:383-390.
- Bashshur ZF, Bazarbachi A, Schakal A, Haddad ZA, El Haibi CP, Nouredin BN, et al. Intravitreal bevacizumab for the management of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2006;26:383-390.
- Spaide RF, Fisher YL. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina* 2006;26:275-278.
- Mason JO 3rd, Nixon PA, White MF. Intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) as adjunctive treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2006;142:685-688.
- Bakri SJ, Snyder MR, Reid JM, Pulido JS, Singh RJ. Pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab (Avastin). *Ophthalmology* 2007;114:855-859.
- Yoeruek E, Ziemssen F, Henke-Fahle S, Tatar O, Tura A, Grisanti S; Tübingen Bevacizumab Study Group. Safety, penetration and efficacy of topically applied bevacizumab: evaluation of eye drops in corneal neovascularization after chemical burn. *Acta Ophthalmol* 2008;86: 322-328.
- Gan L, Fagerholm P, Palmblad J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in the regulation of corneal neovascularization and wound healing. *Acta Ophthalmol Scand* 2004;82:557-563.
- Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2514-2522.
- Kernt M, Welge-Lüssen U, Yu A, Neubauer AS, Kampik A. Bevacizumab is not toxic to human anterior- and posterior-segment cultured cells. *Ophthalmologie* 2007;104:965-971.
- Yoeruek E, Spitzer MS, Tatar O, Aisenbrey S, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Safety profile of bevacizumab on cultured human corneal cells. *Cornea* 2007;26:977-982.
- Park HY, Kim SJ, Lee HB, Kim ES, Tchah H. Effect of intracameral bevacizumab injection on corneal endothelium in rabbits. *Cornea* 2008;27:1151-1155.