

Evaluation of the Safe Dose of Intravitreal Bevacizumab in Rabbit Eyes

Modareszadeh M, MD¹; Rezaie Kanavi M, MD²; Nazari H, MD¹; Ghasemi Falavarjani K, MD¹; Ghasempoor A, MD¹

¹Ophthalmic Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran; ²Ophthalmic Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Corresponding author: drghasemi@yahoo.com

Purpose: To evaluate the safety of different doses of intravitreal bevacizumab in rabbit eyes.

Methods: Twelve eyes of 6 rabbits underwent intravitreal injection of 5, 7.5 and 10 mg of bevacizumab. In each rabbit, one eye was considered for bevacizumab injection and the fellow eye served for either placebo injection or observation. All eyes were examined before and 1, 2, 3, 7, 14 and 28 days after intravitreal injections. Electroretinography (ERG) was performed before and 14 days after the injections. 28 days after the injections, all eyes were enucleated and examined with light and electron microscopy.

Results: In the clinical examination, significant vitritis was observed in one of the 10 mg injected eyes from first post-injection which was eliminated by the 7th day. Cataract was seen in the same eye. Post-injection ERGs showed no significant changes. Increase in Muller-like cells was observed in the histological examination in the injected eyes.

Conclusion: Intravitreal injection of 5 and 7.5 mg doses of bevacizumab was safe in rabbit eyes; however, the 10 mg dose was associated with intraocular inflammation.

Key words: Intravitreal Bevacizumab, Rabbits, Safety

• Bina J Ophthalmol 2010; 15 (3): 186-192.

Received: 21 September 2009

Accepted: 31 January 2010

مقدار ایمن داروی بواسیزوماب در چشم خرگوش

دکتر سیدمهدی مدرسزاده^۱، دکتر مزگان رضایی کنوی^۲، دکتر حسین نظری^۱، دکتر خلیل قاسمی فلاورجانی^۱ و دکتر عادل قاسم پور^۱

هدف: بررسی ایمنی مقادیر متفاوت داروی بواسیزوماب در مایع زجاجیه چشم خرگوش.

روش: تعداد ۱۲ چشم از ۶ خرگوش تحت تزریق داخل زجاجیه مقادیر ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌گرم از داروی بواسیزوماب قرار گرفتند. در هر خرگوش در یک چشم بواسیزوماب و در چشم مقابل یا دارونما تزریق شد و با تنها تحت نظر قرار گرفت. خرگوش‌ها قبل از تزریق و سپس در روزهای ۱، ۲، ۳، ۷، ۱۴ و ۲۸ بعد از تزریق تحت معاینه چشم قرار گرفتند. از تمام موارد قبل و ۱۴ روز بعد از تزریق آزمون الکترورتینوگرافی به عمل آمد. در روز ۲۸ تمام چشم‌ها تخلیه و به وسیله میکروسکوپ نوری و الکترونی مورد مطالعه آسیب‌شناسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در معاینه بالینی در روز اول تا هفتم یک مورد التهاب زجاجیه با مقدار ۱۰ میلی‌گرم بواسیزوماب ایجاد شد و همین چشم مبتلا به آب‌مروارید نیز گردید. چشم‌های دیگر در معاینه بالینی طبیعی بودند و الکترورتینوگرافی پس از تزریق در هیچ چشمی تغییر قابل توجهی را نشان نداد. در بررسی میکروسکوپی شبکیه، تنها افزایش سلول‌های شبه مولر در چشم‌های مورد تزریق (دارونما و دارو) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر تزریق داخل زجاجیه مقادیر ۵ و ۷/۵ میلی‌گرمی داروی بواسیزوماب در چشم خرگوش همراه با عوارض سمی نبود اما با مقدار ۱۰ میلی‌گرم علائم التهاب مشاهده گردید.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۸۹؛ دوره ۱۵، شماره ۳: ۱۹۲-۱۸۶.

• پاسخ گو: دکتر خلیل قاسمی فلاورجانی (e-mail: drghasemi@yahoo.com)

۱- استاد- چشم پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی ایران

۲- استادیار- چشم پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۳- استادیار- چشم پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی ایران

۴- چشم پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی ایران

تهران- خیابان ستارخان- خیابان نیایش- بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص)- مرکز تحقیقات چشم

دریافت مقاله: ۳۰ شهریور ۱۳۸۸

تایید مقاله: ۱۱ بهمن ۱۳۸۸

مقدمه

عامل رشد اندوتلیالی عروق (vascular endothelial growth factor) که به اختصار VEGF نامیده می‌شود، به صورت فیزیولوژیک، در فرآیندهای پیچیده سلولی نقش مهمی را ایفا می‌نماید^{۱،۲}. در حالات مرضی مانند دیابت و انسداد ورید مرکزی شبکیه که سد خونی- چشمی شکسته می‌شود تعادل این عامل در چشم مختل و اختلالات مهمی ایجاد می‌گردد که از آن جمله می‌توان به نورگ‌زایی کوروئید، ادم ماکولا، گلوکوم و رتینوپاتی دیابتی پیش‌رونده اشاره نمود^{۳-۵}.

در سال‌های اخیر جهت درمان ضایعات عروقی چشم از جمله نورگ‌زایی و افزایش نفوذپذیری، داروهای Pegaptanib، Ranibizumab و Bevacizumab وارد بازار گردیده‌اند که عملکرد اصلی این داروها مهار اثر فاکتور رشد VEGF می‌باشد^{۶-۹}. داروی بواسیزوماب که با مهار رقابتی گیرنده VEGF اثر خود را اعمال می‌نماید، با نام تجارتي اوستین (Avastin) شناخته شده و به صورت off-label جهت درمان بیماری‌های فوق استفاده می‌شود^{۱۰}. این دارو در درمان بیماری‌های چشمی به صورت داخل زجاجیه به کار برده شده است. اثرات مفید آن از جمله کاهش ادم شبکیه، جذب مایع پشت شبکیه، بهبود جداسدگی لایه حاوی رنگدانه اپی‌تلیوم، افزایش حدت بینایی و کاهش ضخامت شبکیه، مشاهده گردیده است. با این وجود تاکنون بالاترین مقدار ایمن تزریق دارو در چشم مشخص نشده است^{۱۱}.

علت این که در حال حاضر بواسیزوماب با مقدار ۱/۲۵ میلی‌گرم در تزریق داخل زجاجیه استفاده می‌شود، مطالعاتی است که جهت تعیین ایمنی داروی رانیبیزوماب (Ranibizumab) انجام شده و بالاترین مقدار ایمن دارو ۰/۳ تا ۰/۵ میلی‌گرم معرفی گردیده است. با توجه به این که مولکول بواسیزوماب سه برابر رانیبیزوماب و حاوی دو محل اتصال به VEGF می‌باشد (رانیبیزوماب تنها یک محل دارد) بنابراین به صورت نظری مقادیر ۰/۱۹ تا ۱/۵ میلی‌گرم بواسیزوماب معادل مقدار ایمن رانیبیزوماب در نظر گرفته می‌شود. اولین بار Rosenfeld^{۱۲،۱۳} با همین استدلال

مقدار ۱/۲۵ میلی‌گرم بواسیزوماب را به صورت تزریق داخل زجاجیه استفاده نمود. پس از آن مطالعات گوناگون، نتایج تزریق مقادیر متفاوت بواسیزوماب را در انسان و حیوانات گزارش نمودند که بالاترین میزان مورد استفاده، ۵ میلی‌گرم بوده است^{۱۴-۱۸}. با توجه به این که تاکنون عوارض مقادیر بالاتر داروی بواسیزوماب مورد بررسی قرار نگرفته است، مطالعه حاضر با هدف تعیین ایمنی مقدار بیش‌تر دارو صورت پذیرفت.

روش پژوهش

شش خرگوش آلبینو با وزن متوسط ۳-۲ کیلوگرم وارد مطالعه شدند. از مجموع دوازده چشم مورد بررسی، چشم راست همه خرگوش‌ها تحت تزریق سه دوز متفاوت از داروی بواسیزوماب (مقادیر ۵، ۷ و ۱۰ میلی‌گرم هر کدام در دو چشم) قرار گرفتند. از شش چشم چپ به عنوان کنترل، سه چشم تحت تزریق دارونما با حجم معادل داروی بواسیزوماب قرار گرفتند و در سه چشم هیچ‌گونه تزریقی انجام نشد.

در مطالعه حاضر جهت ارزیابی اثرات سمی داروی بواسیزوماب بر چشم خرگوش‌ها، رویکرد سه‌گانه معاینه بالینی، بررسی الکترورتینوگرافی و آسیب‌شناختی مورد استفاده قرار گرفت.

در طول مدت پی‌گیری خرگوش‌ها ۱۲ ساعت در تاریکی و ۱۲ ساعت در روشنایی قرار می‌گرفتند و مواد غذایی و آب کافی همیشه در دسترس آنان بود. قبل از تزریق، بخش قدامی چشم خرگوش‌ها به وسیله اسلیت‌لمپ و بخش خلفی توسط افتالموسکوپ غیرمستقیم معاینه شد که در تمام موارد طبیعی بود. خرگوش‌ها، قبل از هر اقدامی به وسیله تزریق عضلانی مخلوطی از کتامین هیدروکلراید (۵۰ mg/kg) و زیلازین (Xylazine) هیدروکلراید (۵۰ mg/kg) و مجموع تقریبی ۱ cc بی‌هوش می‌شدند. قطره بی‌حسی موضعی آنستوکایین نیز در زمان معاینه استفاده می‌شد و مردمک با استفاده از قطره فنیل‌افرین (۲/۵ درصد) و تروپیکامید (۰/۵ درصد) موضعی متسع می‌گردید.

قبل از تزریق دارو، از هر دو چشم خرگوش‌ها الکترورتینوگرافی

تشیت‌کننده Karnovsky (متشکل از گلو تار آلدیید ۳ درصد در پارافرمالیدید ۱ درصد و بافر ۰/۱ درصد مولار کاکودیلات سدیم با PH ۷/۴) به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. سپس کره چشم تحت برش قدامی- خلفی قرار گرفت و بخشی از آن طی روند آماده‌سازی بافت، به صورت بلوک پارافینی درآمد. بعد از تهیه مقاطع ۳-۵ میکرونی و رنگ‌آمیزی هماتوکسین و ائوزین (H&E) و پرئودیک اسید شیف (PAS)، توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی کامل قرار گرفت و تغییرات ایجاد شده ثبت گردید. بخش دیگر کره چشم تحت برش نیمه‌نازک و فراناژک قرار گرفت و رنگ‌آمیزی تولوئیدین‌بلو و اورانیل استات جهت بررسی میکروسکوپ الکترونی Transmission صورت پذیرفت.

یافته‌ها

یکی از خرگوش‌ها که تحت تزریق ۵ میلی‌گرمی بواسیزوماب قرار داشت به علت نامشخص از بین رفت. در خرگوش دیگر با تزریق ۵ میلی‌گرم و نیز دو موردی که ۷/۵ میلی‌گرم بواسیزوماب دریافت کرده بودند، در معاینه بالینی هیچ‌گونه علامتی از التهاب و عفونت مشاهده نشد و در همه چشم‌ها شبکه کاملاً طبیعی بود. در یکی از چشم‌های تحت تزریق ۱۰ میلی‌گرم دارو، در روز اول بعد از تزریق التهاب شدید زجاجیه ایجاد شد به نحوی که شبکه به سختی قابل رویت بود. این عارضه در روز هفتم بدون درمان تقلیل یافت و در روز چهاردهم به طور کامل از بین رفت. در عدسی همین چشم در روز سوم بعد از تزریق غلایم کاتاراکت کپسول خلفی مشاهده شد که در روز چهاردهم، این عارضه به طور کامل مشخص شد. در خرگوش دیگر با ۱۰ میلی‌گرم دارو مشکل خاصی مشاهده نشد. در همه موارد چشم مقابل فاقد غلایم سمی و یا التهاب و عفونت بود.

همان‌طور که در جدول (۱) مشاهده می‌شود، در هیچ کدام از مقادیر تزریق کاهش بیش از ۳۰ درصد در دامنه امواج a و b در پاسخ‌های فتوپیک و اسکوتوپیک ایجاد نگردید.

در هر دو روش رنگ‌آمیزی PAS و H&E و مشاهده با میکروسکوپ نوری (Olympus BX 41, Tokyo, Japan) در تمامی چشم‌ها هیچ‌گونه شواهدی از ارتشاح، خون‌ریزی، التهاب، آتروفی شبکه و یا هیپرتروفی اپی‌تلیوم رنگدانه‌دار دیده نشد و کلیه لایه‌های شبکه طبیعی بود (تصویر ۱). در یک چشم با تزریق ۱۰ میلی‌گرم بواسیزوماب، کاتاراکت کپسول خلفی رویت گردید.

Flash Electroretinography, ERG, Wiesbaden, Germany, Roland) به عمل آمد. Flash ERG در دو بخش اسکوتوپیک (Scotopic) و فتوپیک (Photopic) انجام شد که در قسمت اسکوتوپیک، خرگوش‌ها حداقل به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی مطلق قرار گرفتند. در روز چهاردهم پس از تزریق نیز مطابق روش فوق از تمام خرگوش‌ها الکترورتینوگرافی مجدد به عمل آمد. دامنه (amplitude) امواج a و b در سه نوع پاسخ متفاوت سلول‌های استوانه‌ای (rod)، سلول‌های مخروطی (cone) و ترکیبی (combined) بررسی گردید که در نوع ترکیبی پاسخ مشترک سلول‌های استوانه‌ای و مخروطی هم‌زمان ثبت گردید و اختلاف این امواج قبل و بعد از تزریق محاسبه شد. کاهش بیش از ۳۰ درصد در دامنه امواج a و b بعد از تزریق معنی‌دار در نظر گرفته شد.^{۱۷}

برای هر مقدار داروی بواسیزوماب چشم راست دو خرگوش انتخاب شد. سپس در چشم چپ یکی از خرگوش‌ها تزریق محلول BSS (balanced salt solution) با حجم معادل دارو در چشم مقابل صورت گرفت و چشم چپ خرگوش دیگر تنها تحت نظر قرار گرفت. تمامی تزریق‌ها با سرسوزن ۲۸ gauge در یک میلی‌متری پشت لیمبوس و در فضای میانی زجاجیه با مشاهده سرسوزن به وسیله افتالموسکوپ غیرمستقیم انجام شد. جهت تزریق ۵ میلی‌گرم، از قسمت قدامی مقدار ۰/۱ سی‌سی از مایع زلالیه با سرسوزن ۲۸ gauge تخلیه شد. در مقدار ۷/۵ و ۱۰ میلی‌گرم، قبل از تزریق از اتاق قدامی ۰/۱ سی‌سی و از زجاجیه به ترتیب ۰/۲ و ۰/۲۵ سی‌سی مایع خارج گردید. در چشم مقابل خرگوش‌هایی که تحت تزریق دارونما (BSS) قرار گرفتند نیز متناسب با حجم دارو مایع زجاجیه تخلیه شد.

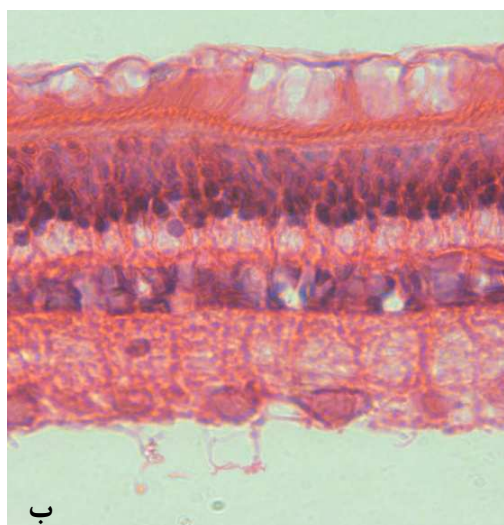
فشار چشم پس از تزریق به وسیله مشاهده قرنیه و شریان مرکزی شبکه بررسی شد که در هیچ‌کدام از چشم‌ها کدورت قرنیه و یا انسداد شریان مرکزی شبکه ایجاد نگردید. بعد از تزریق، از پماد اریترومایسین به صورت موضعی استفاده شد و خرگوش‌ها پس از به هوش آمدن کامل به قفس‌های خود بازگردانده شدند. در روزهای ۱، ۲، ۳، ۷، ۱۴ و ۲۸ بعد از تزریق معاینه کامل چشم به وسیله اسلیت‌لمپ و افتالموسکوپ غیرمستقیم صورت پذیرفت.

در روز بیست و هشتم پس از بی‌هوشی و معاینه کامل، خرگوش‌ها توسط مقدار بالای کتامین کشته و چشم آنان تخلیه شد. پس از آن چشم حیوان در شرایط استریل و در داخل ماده

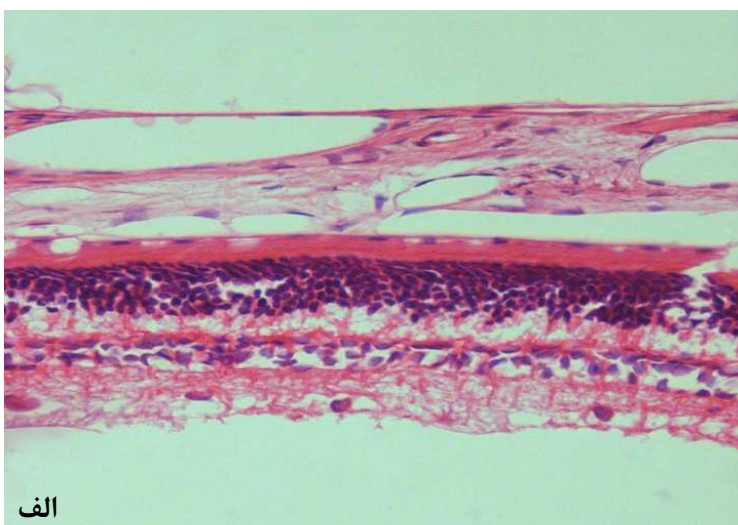
جدول ۱- درصد تغییرات دامنه امواج a و b در الکترورتینوگرافی روز ۱۴ نسبت به قبل از تزریق در ۵ خرگوش

درصد تغییرات موج b			درصد تغییرات موج a			
حداکثر پاسخ ترکیبی	پاسخ سلول مخروطی	پاسخ سلول استوانه‌ای	حداکثر پاسخ ترکیبی	پاسخ سلول مخروطی	پاسخ سلول استوانه‌ای	
۵,۶۰↑	۲۲,۱۶↓	۵,۷۰↑	۶۶,۸۴↑	۲۷,۵۰↓	۸۲,۱۱↑	۵ میلی گرم بواسیزوماب
۱۶,۵۰↓	۲۵,۴۸↓	۲۵,۴↓	۱۳,۹۱↓	۳,۷۹↓	۳,۷۰↓	۵ میلی گرم BSS
۳۲,۵۷↑	۷,۶۱↑	۴۰,۵۱↑	۹۹,۲۰↑	۱۵۳,۶۳↑	۱۳۳,۶۰↑	۷,۵ میلی گرم بواسیزوماب
۷,۶۰↓	۲۴,۰۶↓	۱۹,۸۰↓	۹۶,۸۰↑	۱۲۸,۸۱↑	۲۸,۱۰↓	۷,۵ میلی گرم BSS
۱۵۴,۹۴↑	۴۶,۴۰↑	۱۳۵,۱۹↑	۱۶,۷۴↓	۷,۰۹↑	۱۷۱,۳۰↑	۷,۵ میلی گرم بواسیزوماب
۰,۶۷↑	۲۷,۱۲↓	۵,۱۰↓	۱۴,۷۲↑	۱۷,۰۹↓	۳,۹۰↓	کنترل ۷,۵ میلی گرم
۲۲,۷۰↓	۷,۰۴↓	۲۵,۵۰↓	۲۸,۵۰↓	۴۹,۷۰↑	۲۶,۷۰↓	۱۰ میلی گرم بواسیزوماب
۲۴,۶۰↓	۱۷,۵۶↑	۳۰,۴۳↑	۵۹,۲۰↑	۱۰۰,۹۹↑	۲۷,۱۳↓	۱۰ میلی گرم BSS
۱۶,۶۷↓	۲۰,۲۶↓	۲,۵۰↓	۶,۸۱↓	۲۶,۳۰↓	۲۷,۹۲↓	۱۰ میلی گرم بواسیزوماب
۲۵,۲۹↓	۱۱,۵۰↓	۱۵,۳۰↓	۱۴۵,۵۵↑	۱۱,۸۱↑	۴۶,۵۶↑	کنترل ۱۰ میلی گرم

↑: درصد افزایش و ↓: درصد کاهش



ب

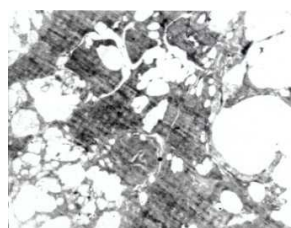


الف

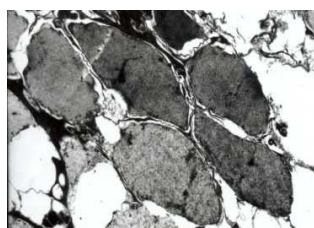
تصویر ۱- وضعیت لایه‌های شبکیه در نمای میکروسکوپ نوری الف) رنگ‌آمیزی PAS و ب) H&E: شواهدی از اثر سمی مشاهده نمی‌گردد.

شبه‌مولر (Muller-Like) در لایه نوکلر خارجی از یافته‌های مرضی این نما بود (تصویر ۳) که در گروه کنترل مشاهده نشد. در گروه BSS بین ۲-۰ سلول و در گروه بواسیزوماب بین ۷-۲ سلول رویت گردید.

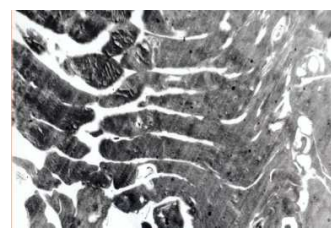
در نمای میکروسکوپ الکترونی (EM 900, Zeiss, Germany) در کلیه نمونه‌ها تمامی لایه‌های شبکیه یکپارچگی خود را حفظ کرده بودند (تصویر ۲) و هیچ گونه شواهدی دال بر وجود سلول‌های التهابی یا گلبول قرمز یافت نشد. وجود سلول‌های



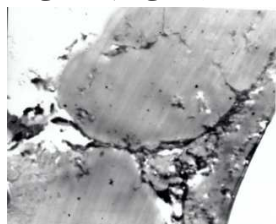
لایه پلکسی فرم خارجی



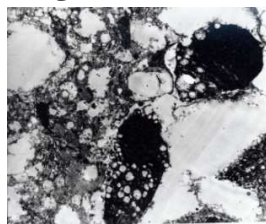
لایه نوکلتر خارجی



بخش خارجی



لایه محدودکننده داخلی



سلول گانگلیون و لایه پلکسی فرم داخلی



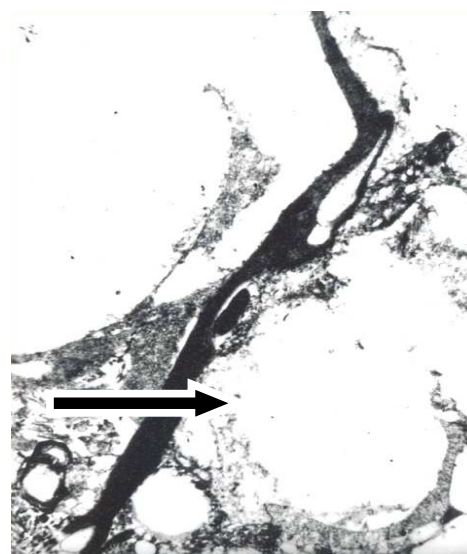
لایه نوکلتر داخلی

تصویر ۲- لایه‌های شبکیه پس از تزریق داروی بواسیزوماب در چشم خرگوش: نمای میکروسکوپ الکترونی

در زمینه اثرات سمی بواسیزوماب نیز مطالعاتی انجام شده است. Manzano و همکارانش^{۱۷}، ۱۲ خرگوش نژاد نیوزلندی را جهت بررسی اثر سمی تزریق داخل زجاجیه بواسیزوماب انتخاب کردند و از مقادیر ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم استفاده نمودند، پس از بررسی بافت شناسی و الکترونیوگرافی یافته‌ای دال بر سمی بودن دارو یافت نگردید اما در تزریق ۵ میلی‌گرم در یکی از چشم‌ها تعداد اندکی سلول التهابی در زجاجیه ایجاد شد. در مطالعه مشابه دیگر، Feiner و همکارانش^{۱۸} تا مقدار ۵ میلی‌گرم بواسیزوماب را در چشم خرگوش تزریق نمودند و شواهدی دال بر سمیت دارو در شبکیه گزارش نکردند. در مطالعه مذکور هیچ‌گونه تفاوتی در دامنه امواج a و b در پاسخ‌های اسکوتوپیک و فتوپیک وجود نداشت و از این نظر تفاوتی بین خرگوش‌های تحت تزریق دارو و گروه کنترل گزارش نگردید. در این مطالعه نیز تنها از میکروسکوپ نوری استفاده شده بود. Shahar و همکاران^{۱۴}، مقدار ۲/۵ میلی‌گرم دارو را به کار بردند و با این مقدار هیچ‌گونه اثر سمی رویت نشد. در این مطالعه آزمون الکترونیوگرافی به فواصل سه ساعت، سه روز و هفته‌های اول، دوم و چهارم بعد از تزریق انجام شد؛ علاوه بر آن در بررسی بافت‌شناسی با استفاده از اسکن کانفوکال نفوذپذیری دارو در لایه‌های مختلف شبکیه به دنبال تزریق دارو بررسی گردید و محققان نتیجه‌گیری کردند که با وجود نفوذ دارو به لایه‌های زیرین، این مقدار دارو فاقد اثر سمی بر روی چشم است. در مطالعه ما مقادیر بالاتر دارو استفاده و نمونه بافتی توسط میکروسکوپ الکترونی بررسی شد. در بررسی بافت‌شناسی

بحث

تزریق داخل زجاجیه داروها مزیت‌هایی بر تزریق وریدی دارد که غلظت بالای دارو در چشم و محدود شدن عوارض سیستمیک از آن جمله می‌باشد. با این وجود این روش می‌تواند همراه عوارض سمی بوده و حیات یا کارکرد چشم را تهدید نماید. به همین دلیل محققین قبل از انجام تزریق داخل زجاجیه، اثرات سمی مقادیر مختلف داروی مورد نظر را بررسی کرده و مقدار بی‌خطر را مشخص می‌نمایند^{۱۳و۱۲}.



تصویر ۳- سلول شبه مولر (پیکان) در چشم تحت تزریق که در گروه بواسیزوماب تعداد آن‌ها بیش‌تر از گروه دارونما (BSS) بود: نمای میکروسکوپ الکترونی

اقداماتی که در حین تزریق و پس از آن انجام دادیم این احتمال کم‌تر مطرح است. در حین تزریقات مختلف، نوک سر سوزن در فضای حفره خلفی و پشت عدسی دیده می‌شد و در هیچ تزریقی سر سوزن به کپسول خلفی بر خورد نکرد، هم‌چنین در روز سوم از میان هشت مورد تزریق فقط یک چشم مبتلا به کاتاراکت واضح گردید و در هیچ کدام از موارد تزریق BSS، این عارضه ایجاد نشد. در بررسی آسیب‌شناختی کپسول خلفی هیچ‌گونه گسستگی در این کپسول مشاهده نگردید، لذا با توجه به مطالب فوق توصیه می‌شود در مطالعات بعدی احتمال ایجاد کاتاراکت مدنظر قرار گیرد.

از محدودیت‌های عمده مطالعه حاضر کم بودن تعداد نمونه در هر گروه می‌باشد. هم‌چنین، یکی از خرگوش‌ها به علت نامشخص از بین رفت و از مطالعه خارج شد. با توجه به یافته‌های این مطالعه می‌توان نتیجه‌گیری نمود که تزریق مقادیر ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌گرم از داروی بواسیزوماب در چشم خرگوش به احتمال زیاد از ایمنی مناسبی برخوردار است و عوارض مشاهده شده در این مطالعه مربوط به تزریق است نه داروی بواسیزوماب، هر چند به علت محدودیت فوق نتایج باید با احتیاط مورد تفسیر قرار گیرند. هم‌چنین بررسی اثر تزریقات مکرر نیاز به مطالعه جداگانه دارد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه با تزریق واحد ۵ و ۷/۵ میلی‌گرم از داروی بواسیزوماب در داخل چشم خرگوش هیچ‌گونه اثر سمی در معاینه بالینی، الکترورتینوگرافی و آسیب‌شناختی یافت نگردید. جهت بررسی ایمنی مقدار ۱۰ میلی‌گرم داروی بواسیزوماب می‌بایست مطالعات بیش‌تری صورت پذیرد، زیرا یک مورد کاتاراکت کپسول خلفی و التهاب زجاجیه در این مقدار دارو مشاهده گردید.

پس از تزریق مقادیر ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌گرم بواسیزوماب، در هیچ موردی سلول التهابی در زجاجیه رویت نگردید، اگرچه در معاینه بالینی واکنش التهابی خودمحدود شونده در یکی از موارد تزریق ۱۰ میلی‌گرم دیده شد. در مطالعه ما بررسی الکترورتینوگرافی به روش مشابه مطالعات پیشین انجام شد و نتایج نیز مشابه بود. هم‌چنین نتایج میکروسکوپ الکترونی نشان داد که تعداد سلول‌های شبه مولر در چشم‌های تحت تزریق بواسیزوماب بیش از گروه دارونما (BSS) و در هر دو مورد بیش از گروه کنترل است.

سلول‌های مولر، سلول‌های آستروگلیال شبکه‌ها هستند که در شرایط فیزیولوژیک یکپارچگی شبکه‌ها را حفظ کرده و شبیه داربست عمل می‌کنند^{۱۹،۲۰}. این سلول‌ها در شرایط فیزیولوژیک در ایجاد سد خونی-شبکیه‌ای دخالت داشته و نقش حمایتی دارند^{۲۱}. سلول‌های مولر در حالت طبیعی دارای رشته‌های بینابینی (intermediate filament) بوده و در حفظ یکپارچگی مکانیکی شبکه‌ها و لایه‌های آن، نقش اساسی دارند. در شرایط غیرطبیعی، تعداد این سلول‌ها زیاد می‌شود^{۲۲}. در این مطالعه مشاهده سلول‌های شبه مولر در هر دو گروه دارونما و بواسیزوماب، نشان دهنده وارد آمدن استرس به دنبال تزریق داخل شبکه‌ها می‌باشد و به احتمال زیاد این نما به علت اثر داروی بواسیزوماب تشدید می‌شود و تعداد بالاتر سلول می‌تواند به عنوان شاهدی از وجود استرس بیش‌تر در این گروه تلقی گردد. البته با توجه به تعداد محدود نمونه در هر گروه نتیجه‌گیری قطعی امکان‌پذیر نبوده و اثبات و توجیه این یافته نیازمند مطالعات گسترده‌تر به ویژه بهره‌مندی از تصاویر میکروسکوپ الکترونی می‌باشد. عدم گزارش چنین یافته‌ای در مطالعات پیشین به احتمال زیاد ناشی از عدم بررسی شبکه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی بوده است.

در مورد کاتاراکت کپسول خلفی، هر چند که احتمال روش نامناسب تزریق را نمی‌توان به طور کامل مردود دانست اما با

منابع

1. Eyetech Study Group. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology* 2003;110:979-986.
2. Krzystolik MG, Afshari MA, Adamis AP, Gaudreault J, Gragoudas ES, Michaud NA, et al. Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. *Arch Ophthalmol* 2002;120:338-346.
3. Tripathi BJ, Tripathi RC, Livingston AM, Borisuth NS. The role of growth factors in the embryogenesis and differentiation of the eye. *Am J Anat* 1991;192:442-471.
4. Adamis AP, Shima DT. The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. *Retina* 2005;25:111-118.
5. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994;118:445-450.
6. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997;57:4593-4599.

7. Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, Heim W, Berlin J, Holmgren E, et al. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:3502-3508.
8. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003;349:427-434.
9. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, Feinsod M, Guyer DR. VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2004;351:2805-2816.
10. Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Marcus EN, Venkatraman AS. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration: twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* 2005;112:1035-1047.
11. Mordenti J, Cuthbertson RA, Ferrara N, Thomsen K, Berleau L, Licko V, et al. Comparisons of the intraocular tissue distribution, pharmacokinetics, and safety of 125I-labeled full length and Fab antibodies in rhesus monkeys following intravitreal administration. *Toxicol Pathol* 1999;27:536-544.
12. Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005;36:331-335.
13. Rosenfeld PJ, Fung AE, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for macular edema from central retinal vein occlusion. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005;36:336-339.
14. Shahar J, Avery RL, Heilweil G, Barak A, Zemel E, Lewis GP, et al. Electrophysiologic and retinal penetration studies following intravitreal injection of Bevacizumab. *Retina* 2006;26:262-269.
15. Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA, Giust MJ. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2006;113:363-372.
16. Spaide RF, Laud K, Fine HF, Klancnik 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.
17. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Kivilcim M. Testing Intravitreal toxicity of Bevacizumab (Avastin). *Retina* 2006;26:257-261.
18. Feiner L, Barr EE, Shui YB, Holekamp NM, Brantley MA Jr. Safety of intravitreal injection of bevacizumab in Rabbit eyes. *Retina* 2006;26:882-888.
19. Green WR. Retina: Anatomy and Histology. In: Spencer W.H. *Ophthalmic pathology, an atlas and textbook*; 4th edition, on CD Rom, Chapter 9.
20. Lundkvist A, Reichenbach A, Betsholtz C, Carmeliet P, Wolburg H, Pekny M. Under stress, the absence of intermediate filaments from Muller cells in the retina has structural and functional consequences. *Journal of Cell Science* 2004;117:3481-3488.
21. Reichenbach A, Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Wiedemann P, Bringmann A. Muller cells as players in retinal degeneration and edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:627-636.
22. Lewis GP, Fisher SK. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol* 2003;230:263-290.