

## Histopathologic Changes Induced by Topical Mitomycin-C in Rabbit Corneas

Katbab A, MD; Dabiri F, MD; Eghtedari M, MD; Attarzadeh A, MD

**Purpose:** To evaluate histopathological changes induced by 0.02% mitomycin-C (MMC) in rabbits corneas.

**Methods:** This study was performed on 48 corneas of 24 rabbits (Dutch type, Albino). Under general anesthesia, lamellar keratectomy was performed and either MMC 0.02 % (MMC group) or balanced salt solution (control group) was applied to the stromal bed for one minute. Sixty days later, light microscopic examination was performed on corneal buttons after authentication, corneal tissue fixation and staining with Hematoxylin-Eosin, periodic acid Schiff and Congo red as needed.

**Results:** One of the MMC cases showed decreased keratocyte count. Other findings such as interface scarring, keloid formation, stromal interface vascularization, stromal and flap edema, epithelial hyperplasia over the incision and flap occurred with the same frequency in MMC and control groups. Stromal scarring was less in the MMC group (zero vs two). There was faint eosinophilic staining in the interface in two and epithelial thinning over the flap in eyes of the control group. The endothelium was normal in all samples.

**Conclusions:** Application of MMC 0.02% to the stromal interface in rabbit corneas led to decreased stromal keratocyte count and fibrosis but apparently had no adverse effect on interface healing, epithelial cell regeneration and the endothelium.

- Bina J Ophthalmol 2007; 13 (1): 77-82.

### تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجادشده به وسیله میتومایسین در قرنیه خرگوش

دکتر اسداله کتباب<sup>۱</sup>، دکتر فرخ دبیری<sup>۲</sup>، دکتر معصومه اقتداری<sup>۱</sup> و دکتر عباس عطارزاده<sup>۲</sup>

**هدف:** ارزیابی تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجادشده به وسیله میتومایسین-C (MMC) با غلظت ۰/۰۲ درصد در قرنیه خرگوش.

**روش پژوهش:** مطالعه بر روی ۴۸ قرنیه از ۲۴ خرگوش (Albino, Dutch type) انجام شد. هر دو چشم خرگوش‌ها تحت کراتکتومی لایه‌ای به وسیله چاقوی هلالی (crescent) قرار گرفتند و سپس به طور تصادفی، در یک گروه (۲۴ چشم) یک قطره MMC با غلظت ۰/۰۲ درصد (گروه MMC) و در یک گروه (۲۴ چشم) محلول نمکی متعادل (گروه شاهد)، به مدت یک دقیقه روی استروما قرار داده شد. بعد از یک دقیقه، شستشو با محلول نمکی طبیعی انجام گردید و فلپ قرنیه به محل اولیه برگردانده شد. شصت روز بعد، نمونه‌های قرنیه در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند و اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده با همتوکسیلین-آنوزین و پریدیک اسید شیف و در صورت لزوم قرمز کنگو، تحت بررسی با میکروسکوپ نوری قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** یکی از قرنیه‌ها در گروه MMC، کاهش تعداد کراتوسیت‌ها را نشان داد. اسکار در محل فلپ، تولید کلویید، نورگ‌زایی در محل برش، ادم در محل فلپ و استروما و هایپرپلازی اپی‌تلیوم در محل برش و یا فلپ، با میزان مساوی در

دو گروه رخ دادند. اسکار استروما در گروه MMC رخ نداد ولی در ۲ مورد از چشم‌های شاهد رخ داد. در گروه شاهد، ۳ مورد نازک‌شدگی اپیتلیوم و ۲ مورد رنگ‌پذیری ائوزینوفیلیک در محل فلپ دید شد. اندوتلیوم در همه موارد نرمال بود. نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که استفاده از میتومایسین-C در محل عمل در جراحی‌های کراتورفرکتیو، اثر سویی در ترمیم اپی‌تلیوم و محل فلپ و یا سلامت اندوتلیوم ندارد. مطالعات انسانی بیش‌تر توصیه می‌شود.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۸۶؛ دوره ۱۳، شماره ۱: ۸۲-۷۷.

• پاسخ‌گو: دکتر معصومه اقتداری (e-mail: eghteradim@gmail.com)

دریافت مقاله: ۶ اردیبهشت ۱۳۸۶

تایید مقاله: ۱۰ مرداد ۱۳۸۶

۱- استاد یار- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۲- فلوشیپ سگمان قدامی چشم‌پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۳- استاد- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شیراز

📍 شیراز- خیابان پوستچی- مرکز تحقیقات چشم‌پزشکی پوستچی

#### مقدمه

(Dutch type)، با سن ۱۲-۱۰ ماه و وزن ۲-۲/۵ کیلوگرم انجام شد. خرگوش‌ها با اعمال بی‌هوشی عمومی به وسیله کتامین (۴۴ mg/kg) و زیلازین (۸ mg/kg) تحت جراحی قرار گرفتند. با حیوانات مطابق مقررات مصوب حیوانات آزمایشگاهی و تصویب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز رفتار شد. بعد از پرپ با بتادین ۱۰ درصد و درپ، در هر دو چشم، یک فلپ استروما با لولای تمپورال، به اندازه یک‌دوم مساحت قرنیه، با حفظ حاشیه‌ای ۲ میلی‌متری از لیمبوس و با عمق یک‌سوم استروما، به کمک چاقوی هلالی (Alcon, USA) ایجاد شد. به صورت تصادفی، در یکی از چشم‌ها یک قطره MMC با غلظت ۰/۰۲ درصد (گروه MMC) و در چشم دیگر (گروه شاهد) یک قطره محلول نمکی متعادل (BSS) روی استروما قرار داده شد و بعد از یک دقیقه، محل مزبور با ۱۰ میلی‌لیتر محلول نمکی طبیعی شستشو گردید. سپس فلپ به جای اولیه برگردانده شد و تارسورافی موقت برای ۵ روز انجام گردید.

بعد از ۶۰ روز، بافت قرنیه پس از ترفاین کردن، جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شد و تحت رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H-E)، پریدیک اسید شیف (PAS) و در صورت لزوم، قرمز کنگو (Congo Red) قرار گرفت. تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجادشده توسط متخصص آسیب‌شناسی چشم، از نظر تغییرات اپی‌تلیوم و استروما، تعداد کراتوسیت‌ها (در مقایسه با تعداد متوسط در قرنیه طبیعی با

میتومایسین-C (MMC) یک داروی آلکیله‌کننده ضد تومور است که برای اولین بار در سال ۱۹۵۶ از Streptomyces caseiposus جدا شد<sup>۱</sup>. MMC با ایجاد تداخل در تکثیر DNA و در نتیجه، جلوگیری از ساخت پروتئین و مهار میتوز، اثر خود را اعمال می‌کند. این ماده در همه یاخته‌ها، بدون توجه به مرحله تقسیم یاخته‌ای، اثر می‌کند اما بیش‌ترین اثر ضد پرولیفریشن خود را روی یاخته‌هایی که میتوز آن‌ها زیاد است؛ اعمال می‌کند<sup>۲</sup>. این ماده، کاربردهای متفاوتی در چشم‌پزشکی دارد. از اوایل دهه ۱۹۶۰ از MMC بعد از عمل ناخنک برای جلوگیری از عود مجدد<sup>۳،۴</sup>، همین‌طور برای افزایش موفقیت در عمل فیلترینگ<sup>۵،۶</sup> و به عنوان جایگزین در درمان نئوپلازی اپی‌تلیومی ملتحمه استفاده شده است<sup>۷،۸</sup>. MMC به عنوان روش فارماکوکینتیک موثر در تنظیم پاسخ ترمیمی، کاهش فیبروز و بهتر شدن نتیجه اعمال کراتورفرکتیو (PRK) نیز به کار می‌رود<sup>۹،۱۰</sup>. مطالعات حیوانی نشان‌دهنده کاهش تعداد کراتوسیت‌ها و کاهش کدورت به دنبال مصرف موضعی این دارو در زمان عمل جراحی PRK می‌باشند<sup>۱۱-۱۳</sup>. در این مطالعه به ارزیابی تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجادشده بعد از استعمال MMC بر روی استرومای قرنیه خرگوش پرداخته‌ایم.

#### روش پژوهش

مطالعه بر روی ۴۸ چشم از ۲۴ خرگوش آلبینو

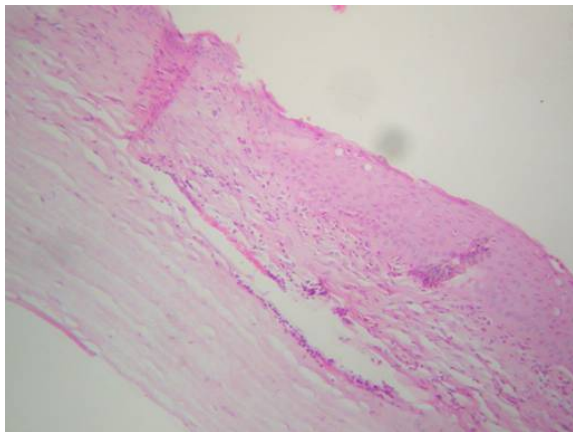
دکتر اسداله کتباب- اثر میتومايسين بر قرنيه خرگوش

استروما و فلپ، هایپریپلازی اپی تلیوم روی محل برش و یا فلپ، با میزان مساوی در دو گروه رخ دادند. اسکار استروما در گروه MMC کم تر بود. رنگ پذیری اتوزینوفیلیک خفیف PAS-مثبت در محل ایجاد برش، در دو چشم از گروه شاهد وجود داشت که با رنگ آمیزی قرمز کونگو رنگ پذیری نداشت. نازکی اپی تلیوم روی ناحیه فلپ در سه چشم از گروه شاهد دیده شد. در ۱۲ قرنيه (۹ قرنيه در گروه MMC و ۳ قرنيه در گروه شاهد)، روند ترمیم به صورت طبیعی انجام شده بود. اندوتلیوم در تمام موارد بررسی شده در دو گروه طبیعی بود. هیچ موردی از رشد نابه جای اپی تلیوم به سمت داخل (epithelial in growth) در استروما در دو گروه دیده نشد.

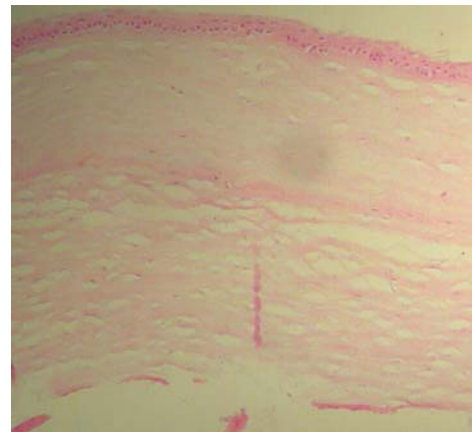
بزرگنمایی ۴۰۰ برابر)، غشای دسمه و اندوتیلیوم مورد بررسی قرار گرفتند.

#### یافته‌ها

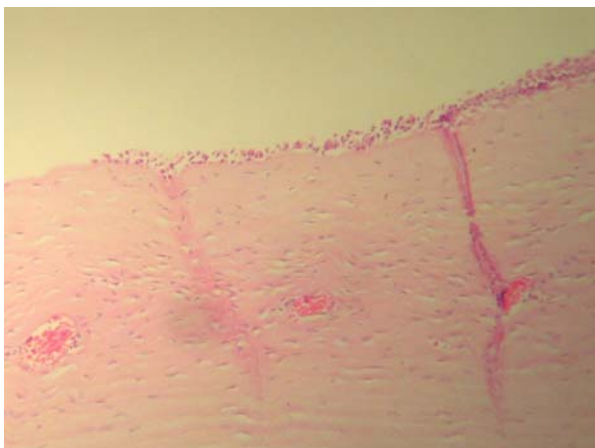
مطالعه بر روی ۲۴ چشم در هر گروه انجام شد. در همه موارد، اپی تلیوم بهبود پیدا کرده بود و فلپ به استرومای زیرین چسبندگی داشت. یافته‌های مورد بررسی، در جدول (۱) ارایه شده‌اند. در گروه MMC، یکی از قرنيه‌ها، کاهش تعداد کراتوسیت‌ها را نشان داد (تصویر ۱) و در یکی از قرنيه‌ها نیز کراتیت حاد دیده شد (ارتشاح شدید یاخته‌های چند هسته‌ای، تصویر ۲). یافته‌های دیگر شامل اسکار در محل فلپ، ایجاد کلویید (تصویر ۳)، نورگ‌زایی محل برش (تصویر ۴)، ادم در



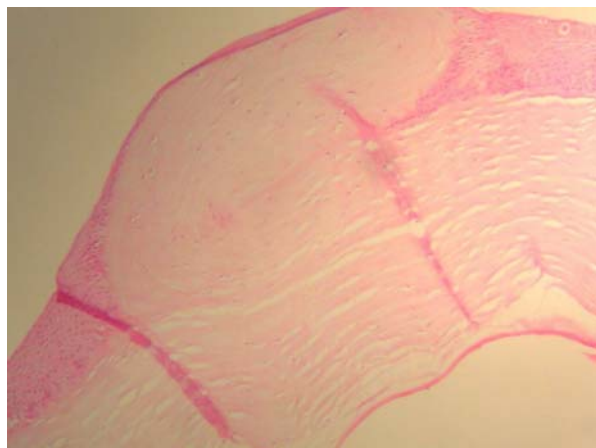
تصویر ۲- استرومای قرنيه، ارتشاح یاخته‌های التهابی فاز حاد را نشان می‌دهد (رنگ آمیزی هماتوکسیلین- اتوزین، بزرگنمایی ۱۰۰ برابر).



تصویر ۱- نمونه قرنيه نشان‌دهنده کاهش تعداد کراتوسیت‌هاست (رنگ آمیزی هماتوکسیلین- اتوزین، بزرگنمایی ۱۰۰ برابر).



تصویر ۴- استروما دچار نورگ‌زایی شده است (رنگ آمیزی



تصویر ۳- سطح قرنيه، تولید کلویید را نشان می‌دهد (رنگ آمیزی

هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر). هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر).

جدول ۱- تغییرات هیستوپاتولوژیک در قرنیه به تفکیک گروه‌های میتومايسين و شاهد

تعداد (درصد)		تغییرات
گروه میتومايسين	گروه شاهد	
۷ (۲۹٫۲)	۷ (۲۹٫۲)	هایپرپلازی اپی‌تلیومی روی برش فلپ
۴ (۱۶٫۷)	۵ (۲۰٫۸)	ادم استروما و فلپ
۲ (۸٫۳)	۵ (۲۰٫۸)	فیبروز فلپ
۲ (۸٫۳)	۲ (۸٫۳)	وسکولاریزه شدن استروما و سطح فاصل
۲ (۸٫۳)	۲ (۸٫۳)	تشکیل کلویید
۱ (۴٫۲)	۱ (۴٫۲)	تشکیل اسکار در سطح فاصل
۰	۱ (۴٫۲)	کاهش کراتوسیت‌ها
۰	۱ (۴٫۲)	کراتیت
۳ (۱۲٫۵)	۰	نازک‌شدگی اپی‌تلیوم روی فلپ
۲ (۴٫۲)	۰	تشکیل اسکار در استروما
۲ (۸٫۳)	۰	رنگ‌شدگی ائوزینوفیلیک خفیف سطح فاصل
۳ (۱۲٫۵)	۹ (۳۷٫۵)	فقدان هر گونه یافته پاتولوژیک

در استروما مشاهده کردیم؛ هر چند تفاوت دو گروه، به علت تعداد کم نمونه، از نظر آماری قابل تفسیر نمی‌باشد. یافته‌های دیگر مانند هایپرپلازی در محل برش، ادم در فلپ و استروما، نورگ‌زایی در محل برش و ایجاد کلویید، به صورت تقریباً مشابهی در دو گروه ایجاد شد. هم‌چنین رنگ‌پذیری ائوزینوفیلیک خفیف در ناحیه برش که در مطالعات انسانی نیز در محل برش فلپ دیده شده است و نشانگر بی‌نظمی بیش‌تر در ترتیب قرارگیری رشته‌ها و لایه‌های قرنیه به همراه رسوب مواد گرانولار الکترون‌دانس در این ناحیه است<sup>۲۲</sup>؛ در مطالعه ما در چشم خرگوش نیز دیده شد. این رنگ‌پذیری به دلیل رسوب آمیلوئید یا مواد مشابه نیست که در مطالعه ما نیز پس از انجام رنگ‌آمیزی قرمز کونگو، این یافته تایید شد.

هایپرپلازی اپی‌تلیوم پس از جراحی رفرکتیو در انسان نیز گزارش شده است<sup>۲۱-۲۷</sup>. این تغییرات تحت تاثیر مدیاتورهایی مانند عوامل رشدی اپی‌تلیوم (EGF و TGF) اتفاق می‌افتند و باعث پدیده رگرشن می‌شوند<sup>۲۳</sup> و<sup>۲۴</sup>. در این مطالعه، در ۱۴ قرنیه (۷ قرنیه از هر گروه)، هایپرپلازی اپی‌تلیوم دیده شد. نازکی اپی‌تلیوم تنها در یک مورد آن هم در گروه شاهد وجود داشت و

## بحث

مطالعات قبلی بیانگر توانایی میتومايسين ۰٫۰۲ درصد در کاهش کدورت بعد از عمل کراتورفکتیو (PRK) می‌باشند<sup>۱۴</sup> و<sup>۱۵</sup>. صدمه به یاخته‌های اپی‌تلیوم طی جراحی لازک یا PRK، منشا آزادسازی سیتوکین‌ها از جمله IL-1 می‌گردد که در نهایت، فعال‌سازی روند آپوپتوز کراتوسیت‌ها از طریق Fas-Fas ligand را به دنبال دارد<sup>۱۷</sup> و<sup>۱۶</sup>. MMC می‌تواند روند آپوپتوز کراتوسیت‌ها بعد از PRK را طولانی‌تر کند<sup>۱۸</sup>. در این مطالعه، تنها یک قرنیه در گروه MMC، دچار کاهش تعداد کراتوسیت‌ها (نسبت به متوسط طبیعی در وسط قرنیه) شد. این مشاهده در زمانی بود که اپی‌تلیوم کاملاً بهبود یافته و قاعدتاً منشا تحریک اضافی به کراتوسیت‌ها در جهت آپوپتوز نبوده است. در حالت معمول، به دنبال آپوپتوز ناحیه‌ای کراتوسیت‌ها، پرولیفیریشن آن‌ها و تبدیل کراتوسیت‌ها به میوفیبروبلاست، باعث ایجاد اسکار می‌شود. فرآیند تبدیل کراتوسیت‌ها به میوفیبروبلاست، توسط کورتیکواستروئید و MMC مهار می‌گردد که منجر به کاهش تولید اسکار می‌شود<sup>۲۱-۱۹</sup>. در این مطالعه نیز ما در گروه MMC، اسکار و فیبروز کم‌تری

با استفاده از میتومايسين، اثر سویی روی یاخته‌های اندوتلیوم در مطالعه ما دیده نشد. در نتیجه به نظر می‌رسد استفاده از میتومايسين ۰/۰۲ درصد به صورت موضعی در طول اعمال جراحی کراتورفرکتیو، روی ترمیم اپی‌تلیوم و یا سلامت اندوتلیوم تاثیر سویی ندارد؛ هرچند علاوه بر مطالعات حیوانی، انجام مطالعات بیش‌تر انسانی نیز لازم است.

در گروه MMC، ضخامت اپی‌تلیوم، یا طبیعی بود و یا هایپرپلازی در آن دیده شد. در نهایت در ۹ قرنیه از گروه MMC، روند ترمیم به صورت طبیعی انجام شد؛ در حالی که این میزان در چشم‌های گروه شاهد، ۳ مورد بود. در ۵ مورد فیبروز فلپ نیز در گروه شاهد دیده شد؛ در حالی که در گروه MMC تنها ۲ مورد فیبروز دیده شد. در این تحقیق، تفاوت قابل توجهی در فرآیند ترمیم در استروما بین دو گروه مشاهده نشد؛ هر چند ایجاد فیبروز در گروه MMC کم‌تر بود.

#### منابع

- Kim TI, Tchah H, Lee SA, Sung K, Cho BJ, Kook MS. Apoptosis in keratocytes caused by mitomycin C. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1912-1917.
- Kim TI, Pak JH, Lee SY, Tchah H. Mitomycin C induced reduction of keratocytes and fibroblasts after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2978-2984.
- Murakami M, Mori S, Kunitomo N. Studies on the pterygium: treatment of the pterygium by mitomycin-C instillation. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1967;71:351-358 [Article in Japanese]
- Lam DS, Wong AK, Fan DS, Chew S, Kwok PS, Tso MO. Intraoperative Mitomycin-C to prevent recurrence of pterygium after excision. *Ophthalmology* 1998;105:901-905.
- Chen CW, Huang HT, Bair JS, Lee CC. Trabeculectomy with simultaneous topical application of mitomycin-C in refractory glaucoma. *J Ocular Pharmacol* 1990;6:175.
- Kitazawa Y, Kawase K, Matsushita H, Minobe M. Trabeculectomy with mitomycin: comparative study with fluorouracil. *Arch Ophthalmol* 1991;109:1693.
- Fruncht-pery J, Rozenman Y. Mitomycin-C therapy for corneal intraepithelial neoplasia. *Am J Ophthalmol* 1994;117:164-168.
- Wilson MW, Hungerford JI, George SM, Maderperla SA. Topical mitomycin C for the treatment of conjunctival and corneal epithelial dysplasia and neoplasia. *Am J Ophthalmol* 1997;124:303-311.
- Majnudar PA, Forstot SL, Dennis RF, Nirankari VS, Damiano RE, Brenart R, et al. Topical mitomycin-C for subepithelial fibrosis after refractive corneal surgery. *Ophthalmology* 2000;107:89-94.
- Azar DT, Jain S. Topical mitomycin-C for subepithelial fibrosis after refractive corneal surgery. *Ophthalmology* 2001;108:239-240.
- Xu H, Liu S, Xia X, Huang P, Wang P, Wu X. Mitomycin-C reduces haze formation in rabbit after excimer laser photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 2001;17:342-349.
- Schipper I, Suppelt C, Gebbers GO. Mitomycin-C reduces scar formation after excimer laser (193 nm) photorefractive keratectomy in rabbits. *Eye* 1997;11:649-655.
- Rajan MS, O'Brart DPS, Patmore A, Marshall J. Cellular effects of mitomycin-C on human corneas after photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 2006;32:1741-1747.
- Zar DT, Jain S. Topical MM-C for subepithelial fibrosis after refractive corneal surgery. *Ophthalmology* 2001;108:239-240.
- Wilson SE, Li Q, Weng J, Barry-Lane PA, Jester JV, Liang Q, et al. The Fas-Fas ligand system and other modulators of apoptosis in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1582-1592.
- Wilson SE, He YG, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M, et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res* 1996;62:325-327.
- Aldwin HC, Marshall J. Growth factors in corneal wound healing following refractive surgery: a review. *Acta Ophthalmol Scand* 2002;80:238-247.
- Lia YH, Wang HZ, Lin CP, Chang SJ. Mitomycin-C alters corneal stromal non healing and corneal haze in rabbits after argon fluoride excimer laser photorefractive keratectomy. *J Ocul Pharmacol Ther* 2004;20:129-138.
- Corbett MC, O'Brart DP, Marshall J. Do topical corticosteroids have a role following excimer laser photorefractive keratectomy? *J Refract Surg* 1995;11:380-387.
- O'Brart DP, Lohmann CP, Klonos G, Corbett MC, Pollock WS, Kerr-Muir MG, et al. The effects of topical corticosteroids and plasmin inhibitors on refractive outcome, haze, and visual performance after photorefractive keratectomy. A prospective,

- randomized, observer-masked study. *Ophthalmology* 1994;101:1565-1574.
- 21- Wilson SE, Mohan RR, Hong JW, Lee JS, Choi R, Mohan RR. The wound healing response after laser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy: elusive control of biological variability and effect on custom laser vision correction. *Arch Ophthalmol* 2001;119:889-896.
- 22- Kramer TR, Chuckpaiwong V, Dawson DG, L'Hernault N, Grossniklaus HE, Edelhauser HF. Pathologic findings in postmortem corneas after successful laser in situ keratomileusis. *Cornea* 2005;24:92-102.
- 23- Zieske JD. Extracellular matrix and wound healing. *Curr Opin Ophthalmol* 2001;12:237-241.
- 24- Sivak JM, Fini ME. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteins in ocular physiology. *Prog Retin Eye Res* 2002;21:1-14.
- 25- Jester JV, Barry-Lane PA, Cavanagh HD, Petroll WM. Induction of alpha-smooth muscle actin expression and myofibroblast transformation in cultured corneal keratocytes. *Cornea* 1996;15:505-516.
- 26- Li DQ, Tseng SC. Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. *J Cell Physiol* 1995;163:61-79.
- 27- Rocha G, Schultz GS. Corneal wound healing in laser in situ keratomileusis. *Int Ophthalmol Clin* 1996;36:9-20.