

## Stem Cell Deficiency in Patients with Chronic and Delayed-Onset Mustard Gas Keratopathy

Baradaran-Rafii AR, MD\*; Javadi MA, MD; Rezaie Kanavi M, MD; Jabarpour-Bonyadi MH, MD; Aslani M, MD; Jamali H, MD; Karimian F, MD

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

\*Corresponding author: alirbr@gmail.com

**Purpose:** To evaluate stem cell deficiency using impression cytology (IC) in patients with chronic and delayed-onset mustard gas keratopathy (MGK).

**Methods:** A consecutive series of patients with MGK underwent IC. Thirty-five eyes of 18 patients (all male) with mustard gas keratopathy were included in this observational case series. Presence of goblet cells on the corneal side of specimens was considered to indicate stem cell deficiency. Corneal involvement was graded as mild, moderate and severe. Relation between IC findings and clinical grading was evaluated.

**Results:** There was limbal stem cell deficiency in at least one quadrant of the cornea in all 35 eyes (100% of cases). No differences were found between impression cytology findings (positive versus negative for corneal goblet cells) among different quadrants ( $p=0.378$ ). Clinical grading was the same between nasal and temporal quadrants ( $P=0.266$ ) and between superior and inferior quadrants ( $P=0.263$ ). Combining the superior and inferior quadrants (vertical zone) and also the nasal and temporal quadrants (horizontal zone) together, clinical grading was more severe in horizontal versus vertical zones ( $p<0.001$ ). There was no correlation between stem cell deficiency and clinical corneal severity ( $p=0.893$ ).

**Conclusion:** Varying degrees of stem cell deficiency was demonstrated in all patients with chronic or delayed-onset MGK using IC. Clinical corneal manifestations are more severe in nasal and temporal quadrants. We found no correlation between stem cell deficiency and clinical manifestations. Other factors such as perilimbal conjunctival ischemia might play a role.

**Key words:** Mustard Gas, Limbal Stem Cell Deficiency, Keratopathy

• Bina J Ophthalmol 2010; 15 (3): 177-185.

Received: 20 October 2009

Accepted: 2 January 2010

### کاهش سلول‌های بنیادی لیمبوس در کراتوپاتی مزمن و دیررس ناشی از گاز خردل

دکتر علیرضا برادران رفیعی<sup>۱</sup>، دکتر محمدعلی جوادی<sup>۲</sup>، دکتر مژگان رضایی کنوی<sup>۳</sup>، دکتر محمدحسین جبارپور بنیادی<sup>۴</sup>، دکتر مهدی اصلانی<sup>۵</sup>، دکتر حسین جمالی<sup>۱</sup> و دکتر فرید کریمیان<sup>۱</sup>

**هدف:** ارزیابی سلول‌های بنیادی لیمبوس با استفاده از ایمپرسیون سیتولوژی (IC) در بیماران مبتلا به کراتوپاتی مزمن و دیررس ناشی از گاز خردل.

**روش پژوهش:** در این مجموعه موارد توصیفی، ۳۵ چشم از ۱۸ مرد مبتلا به کراتوپاتی مزمن و دیررس ناشی از گاز خردل به روش پی‌درپی تحت IC قرار گرفتند. وجود سلول‌های جامی در سمت قرنی‌های نمونه‌ها به عنوان کمبود سلول‌های بنیادی در نظر گرفته شد. شدت درگیری به سه گروه خفیف، متوسط و شدید و برحسب مناطق مختلف قرنی‌ه تقسیم‌بندی شد. رابطه بین طبقه‌بندی بالینی و یافته‌های IC تحت بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** حداقل در یک ربع قرنی‌ه در تمام ۳۵ چشم تحت بررسی، کمبود سلول‌های بنیادی لیمبوس مشاهده گردید. شدت درگیری قرنی‌ه در ربع نازال و تمپورال ( $P=0.266$ ) و ربع فوقانی و تحتانی ( $P=0.263$ ) مشابه بود. شدت درگیری بالینی نواحی افقی (ربع نازال و تمپورال) نسبت به نواحی عمودی (ربع فوقانی و تحتانی) شدیدتر بود ( $P<0.001$ ). رابطه آماری بین شدت

کمبود سلول بنیادی و شدت درگیری بالینی یافت نشد ( $P=0.1893$ ). از نظر نتایج IC (وجود یا عدم وجود سلول‌های جامی) نواحی مختلف قرنیه تفاوت معنی‌داری نداشتند ( $P=0.378$ ).

**نتیجه‌گیری:** درجات متفاوتی از کمبود سلول‌های بنیادی در بیماران مبتلا به کراتوپاتی مزمن و دیررس ناشی از گاز خردل وجود دارد. علائم بالینی در نواحی نازال و تمپورال شدیدتر است. در این مطالعه شدت کمبود سلول‌های بنیادی و تظاهرات بالینی، رابطه معنی‌دار آماری نداشتند.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۸۹؛ دوره ۱۵، شماره ۳: ۱۸۵-۱۷۷.

• پاسخ‌گو: دکتر علیرضا برادران رفیعی (email: alirbr@gmail.com)

دریافت مقاله: ۲۸ مهر ۱۳۸۸

تایید مقاله: ۱۲ دی ۱۳۸۸

۱- دانشیار- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۲- استاد- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۳- استادیار- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۴- دستیار- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۵- پزشک عمومی

۶- فلوشیپ قرنیه- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تهران- پاسداران- بوستان نهم- خیابان پایدارفرد (خیابان امیر ابراهیمی)- پلاک ۲۳- مرکز تحقیقات چشم

## مقدمه

یکپارچگی لایه سطحی قرنیه به عملکرد سلول‌های بنیادی ناحیه لیمبوس با ویژگی تجدید و تکثیر مکرر وابسته است. این سلول‌ها منشا اصلی تجدید بافت اپی‌تلیوم قرنیه در موارد طبیعی یا آسیب می‌باشند<sup>۱-۵</sup>. کمبود غیرطبیعی سلول‌های بنیادی به علت تخریب بافت اپی‌تلیال ناحیه لیمبوس یا اختلال در محیط استرومایی اطراف سلول‌ها اتفاق می‌افتد<sup>۱۰-۱۵</sup>. علائم کمبود سلول‌های بنیادی شامل ایجاد بافت سطحی ملتحمه (conjunctivalization) در سطح قرنیه، التهاب مزمن چشم و نورگزایی می‌باشد. نقص اپی‌تلیالی سطح قرنیه به طور شایع توسط بافت ملتحمه پوشانده و در برخی موارد منجر به زخم، بافت جوشگاهی و از دست رفتن بینایی می‌شود<sup>۱۱-۱۴</sup>.

ایمپرسن سیتولوژی (IC) یک روش تشخیصی غیرتهاجمی است که در آن یک یا دو لایه خارجی اپی‌تلیوم چشم جهت بررسی سطح ملتحمه‌ای برداشته می‌شود. این آزمون بهترین روش تایید conjunctivalization قرنیه به شمار می‌آید. یافتن سلول‌های جامی در سطح قرنیه نشانگر ایجاد بافت ملتحمه‌ای و کمبود سلول‌های بنیادی می‌باشد. هم‌چنین از این روش جهت طبقه‌بندی شدت متاپلازی سنگفرشی استفاده گردیده است<sup>۱۵-۲۰</sup>.

در جنگ ایران و عراق، گاز خردل به صورت گسترده بر علیه سربازان ایرانی استفاده شد و بیش از ۱۰۰۰۰۰ نفر با آن تماس داشتند<sup>۲۱-۲۵</sup> و ۸-۶ درصد از افراد تحت تماس گاز

خردل مبتلا به عوارض چشمی دیررس خواهند شد که این عوارض دایمی و پیش‌رونده بوده و منجر به کاهش دید و حتی کوری قرنیه‌ای می‌شود. علائم دیررس ممکن است پس از یک دوره نهفته (شروع تاخیری) یا بدنال ضایعات زودرس و به صورت التهاب مزمن تظاهر نماید. در موارد مزمن و دیررس علائم اصلی به علت درگیری ملتحمه، لیمبوس و یا قرنیه ایجاد می‌گردد<sup>۲۵</sup> و ۸-۶.

تظاهرات کراتوپاتی ناشی از گاز خردل علاوه بر کاهش حس قرنیه، خراش راجعه یا دایمی اپی‌تلیوم و آسیب عروق لیمبال و نورگزایی، سبب نامنظمی و نازکی سطح قرنیه می‌شود که ممکن است به لایه‌های عمقی قرنیه نیز گسترش یافته و موجب دسماتوسل و گاهی پارگی قرنیه گردد<sup>۲۶</sup> و ۸-۲۴.

به نظر می‌رسد برخی از تظاهرات قرنیه‌ای گاز خردل مربوط به کاهش پیش‌رونده سلول‌های بنیادی ناحیه لیمبوس باشد. بر اساس اطلاعات ما این مطالعه اولین موردی است که کاهش سلول‌های بنیادی لیمبوس را در بیماران مبتلا به کراتوپاتی مزمن و دیررس ناشی از گاز خردل با استفاده از IC مورد بررسی قرار می‌دهد.

## روش پژوهش

در این مجموعه موارد توصیفی (descriptive case series) جانبازان مبتلا به کراتوپاتی مزمن و دیررس ناشی از گاز خردل در بیمارستان لبافی نژاد تهران مورد بررسی قرار گرفتند. این مطالعه

دکتر علیرضا برادران رفیعی- سلول‌های بنیادی لیمبوس در کراتوپاتی گاز خردل

IC از آزمون رگرسیون لجستیک و ordinal و جهت بررسی ارتباط نواحی متفاوت قرنیه از آزمون رگرسیون مارژینال استفاده شد. به تمام بیماران توصیه گردید یک فرد بدون سابقه بیماری چشمی همراه داشته باشند که سلامت چشم آنان توسط معاینه کامل اثبات شد. نمونه تهیه شده از قرنیه این افراد جهت کنترل کیفی آزمایشگاه مورد استفاده قرار گرفت.

#### نحوه آزمون ایمپرشن سیتولوژی

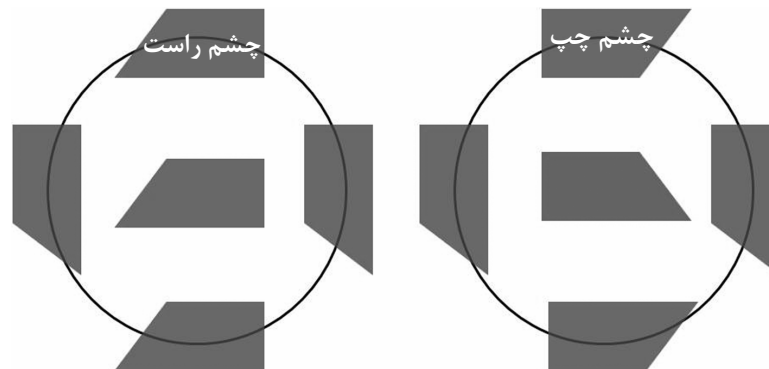
جهت القای بی‌حسی از قطره تتراکاین ۰/۵ درصد استفاده شد و اشک اضافی با کمک سوآپ پنبه‌ای برطرف گردید. سپس ۴ قطعه کاغذ استات سلولز به روش استاندارد و به شکل دوزنقه به صورت نوار باریک با ابعاد ۵×۵ میلی‌متر از فیلتر ۴۷ میلی‌متری (Schleicher & Schuell Microscience GMBH, Germany) تهیه و به ترتیب برای چند ثانیه در لیمبوس فوقانی، تحتانی، نازال و تمپورال به نحوی بر سطح چشم قرار گرفت که نیمی از آن روی قرنیه و نیم دیگر روی ملتحمه را بپوشاند<sup>۲۶-۳۳</sup>. یک قطعه کاغذ فیلتر استات سلولز نیز جهت نمونه‌برداری از مرکز قرنیه تهیه گردید (تصویر ۱). پس از وارد کردن فشار مختصر توسط سوآپ، کاغذها با ملایمت از سطح قرنیه برداشته شدند.

براساس اصول بیانیه هلسینکی تدوین و مورد تایید کمیته اخلاق مرکز تحقیقات قرار گرفت. مواجهه با گاز خردل توسط بازخوانی پرونده پزشکی افراد و علایم بالینی آشکار مورد تایید قرار گرفت و سابقه جراحی بر روی چشم، ملاک حذف بیمار از مطالعه محسوب گردید.

پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی، تمام بیماران تحت معاینه کامل چشم شامل اندازه‌گیری حدت بینایی و فشار چشم، معاینه با اسلیت‌لمپ و فوندوسکوپی قرار گرفتند. پس از آن فتوگرافی دیجیتال (imagnet, Topcon SL-8Z Tokyo, Japan) از هر دو چشم تهیه شد و توسط دو نفر فلوشیپ قرنیه (ب ر ع، ج م ع) بررسی و طبقه‌بندی بالینی صورت پذیرفت. در مرحله بعد نمونه IC از تمام بیماران توسط (ب ر ع) تهیه و رابطه اطلاعات بالینی و یافته‌های IC بررسی شد.

در این مطالعه درگیری خفیف شامل تغییرات عروق ملتحمه به صورت اتساع، تشکیل عروق مارپیچ و سگمانتاسیون تعریف شد، در این گروه قرنیه مجاور ضایعه شفاف بود. در نوع متوسط ایسکمی لیمبوس و تهاجم عروقی با یا بدون کدورت قرنیه وجود داشت و در نوع شدید نازکی و ذوب قرنیه ایجاد شده بود.

تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS۱۵ انجام شد. به منظور بررسی ارتباط شدت علایم بالینی و یافته‌های



تصویر ۱- نحوه قرار گرفتن کاغذ جهت تهیه نمونه ایمپرشن سیتولوژی

کنترل مثبت و یک لام از قرنیه به عنوان کنترل منفی از افراد همراه تهیه شد. در پایان کاغذ فیلتر استات چندین نوبت داخل محلول گزین فرو برده شد و بر روی اسلاید شیشه‌ای با استفاده از محلول DPX (ماده Depex-Polystyrene حل شده در گزین) قرار گرفت. اسلاید شیشه‌ای به وسیله میکروسکوپ نوری (Olympus BX43, Tokyo, Japan) مجهز به دوربین (Olympus DP14, Tokyo, Japan)

پس از نمونه‌گیری، کاغذ فیلتر در داخل ظرف ۲۴ قسمتی حاوی محلول تثبیت متشکل از اسید استیک، فرمالدهید، آب مقطر و اتانول به نسبت حجمی ۱۴/۶/۱/۱ قرار داده شد. در بانک چشم پس از رهیدراسیون در الکل ۷۰ درصد، نمونه‌ها تحت رنگ‌آمیزی پاپانیکولا و پرئودیک اسید شیف (PAS) قرار گرفت<sup>۳۴</sup>. هم‌زمان یک لام از ملتحمه حاوی سلول‌های جامی به عنوان

جهت تقسیم‌بندی میزان متاپلازی سنگفرشی اپی‌تلیال، تغییرات آسیب‌شناسی و پیکنوتیک، رنگ سیتوپلاسم، میزان کراتینیزاسیون و وجود سلول‌های التهابی مطابق جدول (۱) ملاک عمل قرار گرفت. نمرات ۰-۲، ۳-۵، ۶-۹، ۱۰-۱۱ و ۱۲ به ترتیب به عنوان عدم وجود، نوع خفیف، متوسط، شدید و بسیار شدید متاپلازی سنگفرشی در نظر گرفته شدند. اگر بیش از ۲ عدد نمونه ناکافی وجود داشت، نمونه‌گیری مجدد صورت پذیرفت. چشم‌هایی با حداقل ۳ نمونه کافی از ۵ نمونه وارد مطالعه شدند.

(Japan) توسط فلوشیپ پاتولوژی چشم (ر ک م) بررسی گردید. وجود سلول‌های جامی در نیمه قرنیه‌ای کاغذ فیلتر، دال بر تغییرات ملتحمه‌ای قرنیه و نقص سلول‌های بنیادی لیمبوس تلقی شد. سلول‌های جامی در ناحیه‌ای از میدان میکروسکوپ (بزرگ‌نمایی ۴۰) که حداکثر تراکم سلول‌های جامی در سمت قرنیه دارد شمارش و مقیاس درجه‌بندی عبارت بود از: ۰=فقدان سلول‌های جامی، ۱=کم‌تر از ۱۰ سلول در هر میدان، ۲=۱۱-۲۰ سلول در هر میدان، ۳=بیش از ۲۰ سلول در هر میدان.

جدول ۱- معیارهای ارزیابی شدت متاپلازی سنگفرشی

درجه	۰	۱	۲	۳
نسبت N/C	۱ به ۲	۱ به ۴	۱ به ۸	۱ به ۱۲
فشرده‌گی هسته	بدون تغییر	snakes پیکنوز، خفیف	snakes پیکنوز، متوسط	snakes پیکنوز، شدید
ارتشاح سلول‌های التهابی	بدون تغییر	خفیف	متوسط	شدید
رنگ* سیتوپلاسم و کراتینیزاسیون	رنگ آبی-سبز	صورتی (متاکروماتیک)، برخی سلول‌های حاوی فیلامان کراتین	افزایش سلول‌های حاوی فیلامان کراتین	فیلامان کراتین تجمع یافته و چروکیده شده

\* رنگ‌آمیزی گیمسا

درصد) و ۱۷ (۸۵ درصد) مورد به ترتیب در ربع فوقانی، تحتانی، نازال، تمپورال و مرکزی وجود داشت. کمبود سلول‌های بنیادی درجه دو در ۱۰ (۳۴/۵ درصد)، ۱۰ (۴۰ درصد)، ۱۷ (۵۸/۶ درصد)، ۱۹ (۶۳/۳ درصد) و ۳ مورد (۱۵ درصد) به ترتیب در ربع فوقانی، تحتانی، نازال، تمپورال و مرکزی وجود داشت. در بین نمونه‌ها موردی از کمبود سلول‌های بنیادی درجه ۳ یافت نشد. بین شدت کمبود سلول‌های بنیادی در مناطق مختلف تفاوت آماری وجود نداشت (P=۰/۷۳۴).

از نظر درجه‌بندی بالینی نیز تفاوتی بین ربع نازال و تمپورال (P=۰/۲۶۶) و ربع فوقانی و تحتانی (P=۰/۲۶۳) وجود نداشت (جدول ۳). با کنار هم قراردادن ربع فوقانی و تحتانی (ناحیه عمودی) و ربع نازال و تمپورال (ناحیه افقی)، شدت درگیری بالینی در ناحیه افقی شدیدتر از ناحیه عمودی بود (P<۰/۰۰۱). رابطه آماری بین شدت کمبود سلول‌های بنیادی و درجه‌بندی بالینی یافت نشد (P=۰/۸۹۳).

متاپلازی سنگفرشی از یافته‌های مهم آسیب‌شناسی در مطالعه ما بود (جدول ۲). متاپلازی سنگفرشی شدید تنها در ۲ مورد (۶/۶۷ درصد) در ربع تمپورال دیده شد. بین شدت متاپلازی

#### یافته‌ها

تعداد ۳۹ چشم از ۲۰ بیمار مذکور وارد مطالعه گردید که ۴ چشم از ۲ بیمار به علت مقدار ناکافی نمونه از مطالعه خارج شد و ۳۵ چشم از ۱۸ بیمار تحت بررسی گرفت. یکی از بیماران به علت آسیب زمان جنگ یک چشمی بود. میانگین سن بیماران ۴۴/۵±۳/۲ (۳۸-۴۹) سال و میانگین فاصله زمانی از تماس با گاز خردل ۲۰±۱/۷ (۱۸ تا ۲۴) سال بود.

تعداد نمونه ناکافی در ربع فوقانی، تحتانی، نازال، تمپورال و مرکزی به ترتیب ۶ (۱۷/۱ درصد)، ۱۰ (۲۸/۶ درصد)، ۶ (۱۷/۱ درصد) و ۵ (۱۴/۳ درصد) و ۱۵ (۴۲/۹ درصد) بود. کاهش سلول‌های بنیادی لیمبوس حداقل در یک ربع قرنیه در تمام موارد تحت بررسی وجود داشت. پس از حذف نمونه‌های ناکافی، تعداد ۱۳ (۴۴/۸ درصد)، ۸ (۳۲ درصد)، ۱۵ (۵۱/۷ درصد)، ۱۵ (۵۰ درصد) و ۵ (۲۵ درصد) نمونه مثبت سلول‌های جامی به ترتیب در ربع فوقانی، تحتانی، نازال، تمپورال و مرکزی ارزیابی شد (جدول ۲). تفاوتی از نظر یافته‌های IC در مناطق مختلف قرنیه یافت نشد (P=۰/۳۷۸). کمبود سلول‌های بنیادی درجه یک در ۱۹ (۶۵/۵ درصد)، ۱۵ (۶۰ درصد)، ۱۲ (۴۱/۴ درصد)، ۱۱ (۳۶/۷ درصد)

سنگفرشی و وجود سلول‌های جامی در سطح قرنیه تفاوت معنی‌دار یافت نشد ( $P=0/727$ ). هم‌چنین تظاهرات بالینی با شدت متاپلازی سنگفرشی رابطه‌ای نداشتند ( $P=0/917$ ).

جدول ۲- نتایج ایمپرشن سیتولوژی در بیماران مبتلا به کراتوپلازی مزمن و تاخیری گاز خردل

نواحی قرنیه	سلول جامی (درصد)		متاپلازی سنگفرشی (درصد)		
	دارای سلول	فاقد سلول	عدم متاپلازی	ضعیف	متوسط
فوقانی	۱۳ (۴۴/۸۳)	۱۶ (۵۵/۱۸)	۱۰ (۳۴/۴۸)	۱۰ (۳۴/۴۸)	۹ (۳۱/۰۳)
تحتانی	۸ (۳۲/۰۰)	۱۷ (۶۸/۰۰)	۸ (۳۲/۰۰)	۷ (۲۸/۰۰)	۱۰ (۴۰/۰۰)
نازال	۱۵ (۵۱/۷۲)	۱۴ (۴۸/۲۷)	۱۵ (۵۱/۷۲)	۱۱ (۳۷/۹۳)	۳ (۱۰/۳۴)
تمپورال	۱۵ (۵۰/۰۰)	۱۵ (۵۰/۰۰)	۷ (۲۳/۳۳)	۱۳ (۴۳/۳۳)	۶ (۲۰/۰۰)
مرکزی	۵ (۲۵/۰۰)	۱۵ (۷۵/۰۰)	۵ (۲۵/۰۰)	۹ (۴۵/۰۰)	۶ (۳۰/۰۰)

درصدها پس از حذف نمونه‌های ناکافی محاسبه شده است.

جدول ۳- شدت علائم بالینی در نواحی متفاوت قرنیه در بیماران مبتلا به کراتوپاتی مزمن و تاخیری گاز خردل

شدت علائم بالینی	نواحی قرنیه			
	فوقانی	تحتانی	نازال	تمپورال
عدم درگیری	۸ (۲۲/۹)	۹ (۲۵/۷)	۳ (۸/۶)	۳ (۸/۶)
خفیف	۱۶ (۴۵/۷)	۱۴ (۴۰/۰)	۹ (۲۵/۷)	۶ (۱۷/۱)
متوسط	۱۰ (۲۸/۶)	۹ (۲۵/۷)	۱۴ (۴۰/۰)	۱۵ (۴۲/۹)
شدید	۱ (۲/۹)	۳ (۸/۶)	۹ (۲۵/۷)	۱۱ (۳۱/۴)

اعداد داخل پرانتز درصد هستند.

در نواحی فوقانی، تحتانی و مرکزی چشم چپ، سلول‌های جامی را مشخص نمود (تصویر ۲ د و ج).

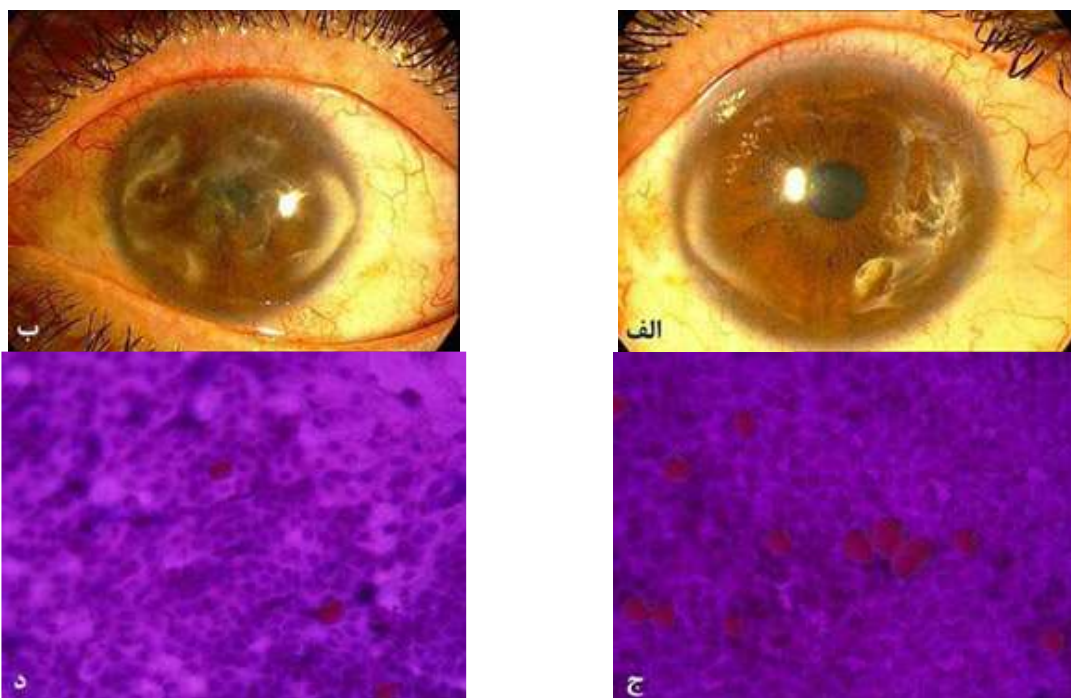
#### مورد دوم

آقای ۴۸ ساله با سابقه مواجهه با گاز خردل ۲۱ سال قبل با شکایت احساس جسم خارجی، فتوفوبی و کاهش دید هر دو چشم ارجاع شد. دید اصلاح نشده چشم راست ۲۰/۸۰ و چشم چپ ۲۰/۱۶۰ بود. در معاینه نازکی چشم راست به همراه رسوب آمیلوئید و تهاجم عروق متسع به نواحی تحتانی دیده شد (تصویر ۳ الف و ب). در بررسی IC کمبود سلول‌های بنیادی در نواحی تحتانی، نازال و تمپورال چشم راست و نواحی فوقانی، تمپورال و مرکزی چشم چپ وجود داشت (تصویر ۳ ج و د).

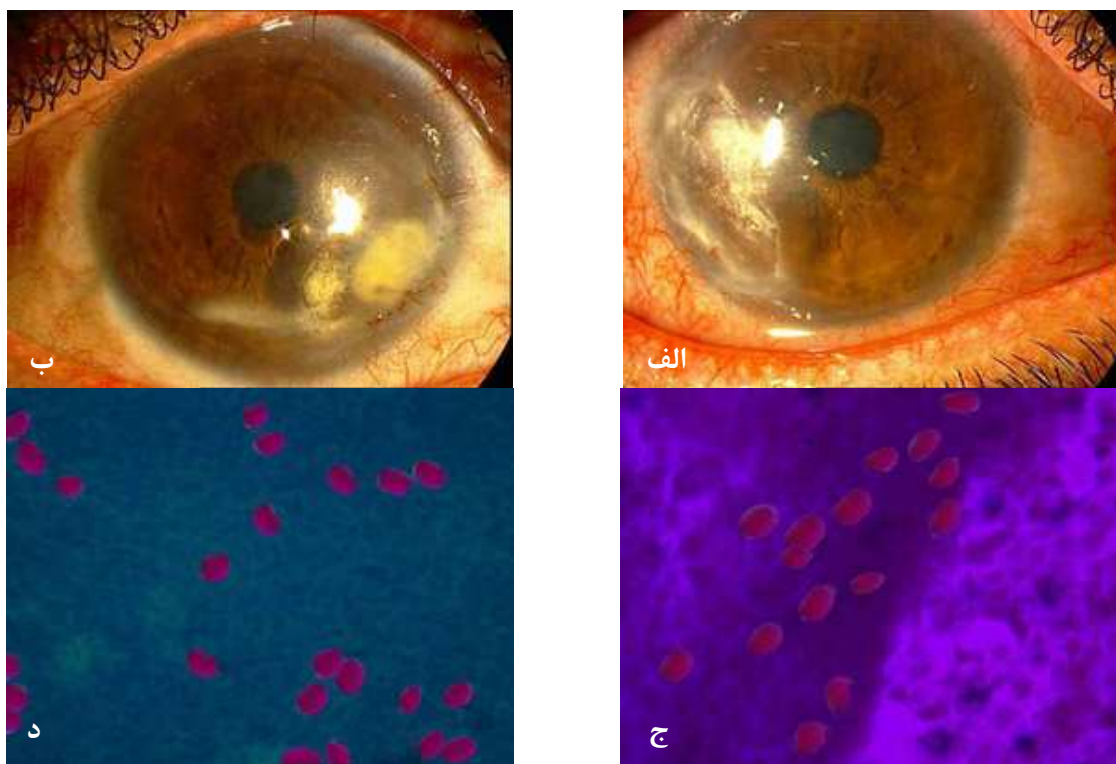
#### معرفی بیمار

#### مورد اول

آقای ۴۲ ساله با سابقه تماس با گاز خردل ۲۱ سال قبل، با قرمزی چشم، فتوفوبی، بلفارواسپاسم، احساس جسم خارجی و کاهش دید هر دو چشم مراجعه کرد. دید اصلاح نشده چشم راست ۲۰/۲۰۰ و چشم چپ ۲۰/۱۶۰ بود. در معاینه نازکی و رسوب چربی - آمیلوئید در نواحی نازال و تمپورال قرنیه و نورگزایی در نواحی فوقانی و نازال چشم راست مشاهده شد (تصویر ۲ الف). در چشم چپ نیز نازکی شدید و رسوب چربی - آمیلوئید در نواحی تمپورال، فوقانی و نازال قرنیه دیده شد. هم‌چنین نورگزایی در نواحی فوقانی و نازال مشهود بود (تصویر ۲ ب). بررسی IC در نواحی نازال، تمپورال و تحتانی چشم راست و



تصویر ۲- مورد اول الف) نازکی قرنیه و رسوب چربی-آمیلوئید در نواحی نازال و تمپورال به همراه نورگزایی در نواحی فوقانی و نازال چشم راست، ب) نازکی شدید قرنیه و رسوب چربی-آمیلوئید در نواحی نازال فوقانی و تمپورال، نورگزایی در نواحی فوقانی و نازال قرنیه چپ، ج و د) نتایج ایمپرشن سیتولوژی: سلول‌های جامی در هر دو قرنیه دیده می‌شود که کمبود سلول‌های بنیادی را تایید می‌نماید.



تصویر ۳- مورد دوم الف) نازکی شدید قرنیه در ربع تمپورال چشم راست به همراه رسوب آمیلوئید و عروق متسع در قرنیه مجاور، ب) نازکی قرنیه در ربع تمپورال به همراه رسوب چربی-آمیلوئید و عروق متسع در قرنیه مجاور با گسترش به سمت ربع تحتانی چشم چپ، ج و د) نتایج ایمپرشن سیتولوژی: سلول‌های جامی در هر دو قرنیه مشاهده می‌شود که کمبود سلول‌های بنیادی را تایید می‌نماید.



**بحث**

براساس نتایج این مطالعه سلول‌های بنیادی ناحیه لیمبوس قرنیه در بیماران مبتلا به کراتوپاتی مزمن و دیررس گاز خردل کاهش می‌یابد که با استفاده از ایمپرشن سیتولوژی این مطلب اثبات گردید. کمبود سلول‌های بنیادی در تمام بیماران از شدید خفیف تا متوسط برخوردار بود. رابطه آماری بین علایم بالینی و شدت کمبود سلول‌های بنیادی یافت نگردید. هم‌چنین تفاوت معنی‌داری بین کمبود در نواحی متفاوت قرنیه وجود نداشت، اگرچه علایم بالینی در نواحی تمپورال و نازال از شدت بیش‌تری برخوردار بود.

گاز خردل مایع روغنی و قرمز رنگ با بوی مشابه سیر می‌باشد که به دو فرم N و S و با فرمول  $2(CH_2CH_2Cl)$  ساخته می‌شود. نوع گوگردار آن که به منظور نظامی بیش‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرد، مدت اثر طولانی‌تری داشته اما از سمیت کم‌تری برخوردار است<sup>۲۲،۲۴،۲۹،۳۷</sup>. سطح مرطوب چشم و قابلیت انحلال بالای خردل در چربی، منجر به آسیب شدید چشم شده و این عضو را تبدیل به حساس‌ترین ناحیه در مقابل آسیب ناشی از گاز خردل می‌نماید<sup>۲۵،۲۷،۲۹</sup>. در این میان سلول‌های اپی‌تلیال قرنیه به علت متابولیسم بالا و تقسیم سریع و تماس طولانی با لایه چربی اشک حاوی خردل، حساسیت بسیار بالایی دارند<sup>۲۹</sup>.

گاز خردل هم‌چنین منجر به آسیب اندوتلیوم به صورت آپوپتوز در غلظت پایین و آپوپتوز به همراه نکروز در غلظت بالا می‌شود<sup>۲۵،۲۹</sup>. گاز خردل تنها بافت‌های زنده را تحت تاثیر قرار می‌دهد<sup>۲۳-۳۰</sup>، نظریه مطرح شده شامل آزادسازی اسید کلریدریک در داخل سلول، ایجاد ترکیبات جدید با خصلت ایجاد ترکیبات آلكیل، آسیب عصبی از طریق واکنش آکسونی و در نهایت ایجاد مشتقات حاوی اکسیژن می‌باشد<sup>۲۵-۲۷،۲۹،۳۰،۳۸</sup>.

درجات متفاوت درگیری چشم در ۷۵ تا ۹۰ درصد افراد مواجهه یافته با گاز خردل در مراحل حاد دیده می‌شود<sup>۸</sup>. این درگیری ممکن است کاملا بهبود یابد یا به نوع مزمن یا دیررس تبدیل شود که پیش‌رونده بوده و منجر به آسیب غیر قابل برگشت و حتی نابینایی می‌گردد<sup>۸</sup>. بیماران مبتلا به کراتوپاتی مزمن یا دیررس گاز خردل از کاهش دید، فتوفوبی، احساس جسم خارجی و اشک‌ریزش رنج می‌برند. نمای بالینی مشترک در اغلب بیماران شامل بلغاریت، اختلال غدد میبومین، خشکی چشم، ایسکمی ملتحمه اطراف لیمبوس، کمبود سلول‌های بنیادی، نورگ‌زایی قرنیه، نازکی و اسکار قرنیه، نقص اپی‌تلیالی راجعه و طولانی مدت و تغییرات تحلیل‌برنده مانند رسوب چربی و آمیلوئید

می‌باشد<sup>۶،۸،۲۳،۲۴،۳۱،۳۲</sup>.

پیش از این، نمای میکروسکوپی آسیب‌شناسی قرنیه در کراتوپاتی گاز خردل از نازکی محدود قرنیه، زخم، از بین رفتن کراتوسیت‌ها و سلول‌های اندوتلیال تا ارتشاح خفیف و شدید سلول‌های التهابی به صورت حاد و مزمن، رگ‌زایی استروما، کراتوپاتی نواری شکل، رسوب چربی و آمیلوئید، خراش و فیروز خلفی قرنیه گزارش گردیده است<sup>۶،۸،۲۳،۲۴،۳۱،۳۲</sup>.

به نظر می‌رسد تظاهرات دیررس کراتوپاتی گاز خردل نتیجه سه مکانیسم متفاوت باشد<sup>۶-۸</sup>: (۱) ایسکمی مزمن، پیش‌رونده و شدید ملتحمه اطراف لیمبوس که اغلب در محل شکاف پلکی دیده می‌شود و منجر به نازکی استروما و گسستگی اپی‌تلیوم قرنیه مجاور می‌گردد. نواحی ایسکمی ملتحمه اغلب توسط عروق متسع نشد کننده احاطه شده که منجر به رسوب چربی در قرنیه مجاور می‌گردد<sup>۳۲، ۲۶، ۳۰، ۲۴-۸، ۶</sup>. (۲) کاهش پیش‌رونده سلول‌های بنیادی لیمبوس که در ابتدا نسی و غیرقرینه بوده و در نهایت منجر به کاهش کامل سلول‌های بنیادی می‌شود. این آسیب می‌تواند به علت اثر مستقیم و پیش‌رونده گاز خردل یا ایسکمی مزمن لیمبوس ایجاد گردد. ایسکمی لیمبوس ممکن است نقش مهمی در کراتوپاتی گاز خردل ایفا نماید؛ در مرحله اول به صورت مزمن و پیش‌رونده به تغییرات آتروفی قرنیه شامل نازکی، ایجاد دسماتوسل و سوراخ قرنیه منجر می‌شود و در ادامه ممکن است موجب تخریب پیش‌رونده محیط استرومایی سلول‌های بنیادی لیمبوس و کاهش پیش‌رونده این سلول‌ها گردد<sup>۳۲، ۲۶، ۳۰، ۲۴-۸، ۲۱، ۶</sup> و (۳) رسوب چربی از عروق متسع منجر به التهاب و نازکی استروما می‌شود. این حالت سبب تشدید علایم بالینی از جمله فتوفوبی و اشک‌ریزش بیمار می‌گردد<sup>۳۱</sup>. تظاهرات بالینی برخلاف سوختگی شیمیایی قرنیه، علامت مشخصه کمبود کامل سلول‌های بنیادی لیمبوس نمی‌باشد، به عبارت دیگر پانوس عروقی گسترده در سطح قرنیه در کراتوپاتی ناشی از گاز خردل تشکیل نمی‌گردد. اما نازکی قرنیه و رسوب آمیلوئید و چربی در این بیماران واضح‌تر است. در برخی نواحی عروق متسع و نشد کننده به نواحی محیطی قرنیه تهاجم می‌کنند<sup>۳۹، ۲۵، ۳۱، ۲۴، ۲۱، ۱۲، ۱۱-۸، ۶</sup>. علایم ناشی از مواجهه با گاز خردل در ربع نازال و تمپورال قرنیه شدیدتر است. علت این مساله ممکن است بازماندن شکاف پلکی در هنگام مواجهه با گاز خردل باشد. هم‌چنین ایسکمی پری‌لیمبال در این ناحیه شدیدتر است که خود می‌تواند به علت مواجهه مستقیم و واسکولیت ناشی از آن باشد. برخی معتقدند تراکم سلول‌های بنیادی در ربع نازال و تمپورال کم‌تر است، در نتیجه امکان دارد که این نواحی در معرض

آسیب بیش‌تری قرار داشته باشند ۴۳-۴۰ و ۱۰۴.

در مطالعه ما، به دلیل فتوفوبی شدید و اشک‌ریزش بیماران، با وجود کاهش نور اتاق و استفاده از قطره بی‌حسی، تهیه نمونه قرنیه جهت انجام IC بسیار دشوار بود. در برخی بیماران جهت اطمینان، نمونه‌گیری چند نوبت تکرار شد. با وجود رعایت مسایل فوق، ۴ چشم از ۲ بیمار حذف و ۴۲ مورد نیز فاقد نمونه کافی بودند. نواحی مرکزی و تحتانی از بالاترین درصد نمونه ناکافی برخوردار بودند که می‌تواند به علت تجمع اشک در ربع تحتانی و طولانی شدن زمان تهیه نمونه از ربع مرکزی باشد. عدم وجود سلول‌های جامی در برخی نواحی ممکن است به علت شستشوی ناشی از اشک‌ریزش فراوان در مراحل پیش‌رفته بیماری باشد. علاوه بر این، نازکی قرنیه، نامنظمی اپی‌تلیال و رسوب آمیلوئید- چربی در ربع نازال و تمپورال شدیدتر بوده که می‌تواند نمونه‌گیری را تحت تاثیر قرار دهد.

التهاب مزمن ملتحمه در مطالعات پیشین به صورت ایسکمی پری‌لیمبال، اتساع عروق، واسکولیت، خون‌ریزی زیر ملتحمه، کاهش سلول‌های جامی، نازکی یا ضخامت اپی‌تلیوم، ایجاد خراش در *substantia propria* به همراه ارتشاح لنفوسیتی و اتساع عروق لنفاوی مشاهده شده، ضمن آن که علامتی دال بر ایجاد دیسپلازی گزارش نگردیده است. یافته‌های قرنیه شامل تخریب اپی‌تلیوم و لایه بومن، *conjunctivalization*، نازکی، نورگ‌زایی سطحی، متاپلازی سنگفرشی، استحاله چربی و اسفروئید، کراتوپاتی نواری کلسیم و خراش استروما می‌باشد ۴۴، ۲۴، ۲۵، ۲۲، ۸-۶.

متاپلازی سنگفرشی یک پدیده انطباقی برگشت‌پذیر در برخی نواحی از جمله بافت قرنیه می‌باشد که سبب محافظت سطوح مربوطه در برابر محرک‌های آسیب‌زای محیطی می‌گردد. شدت متاپلازی عامل مهمی در تعیین شدت بیماری سطح چشم می‌باشد. به تازگی روش IC جهت اثبات پدیده متاپلازی سنگفرشی به عنوان نمای تشخیصی در موارد کمبود سلول‌های بنیادی لیمبوس مورد استفاده قرار گرفته است<sup>۱۵</sup>. در مطالعه ما، متاپلازی سنگفرشی در ۵۱/۷۲-۲۳/۳ درصد نمونه‌های تهیه شده رویت نگردید و شدت آن در اکثر موارد خفیف تا متوسط بود.

اولین بار Lopes Garcia و همکاران<sup>۱۵</sup> متاپلازی سنگفرشی اپی‌تلیوم قرنیه را به عنوان عامل تشخیصی کمبود خفیف یا تحت بالینی سلول‌های بنیادی لیمبوس پیشنهاد کردند. در مطالعه ما متاپلازی سنگفرشی اپی‌تلیوم قرنیه به عنوان پاسخ واکنشی به مواجهه با گاز خردل و پیامدهای تاخیری آن در نظر گرفته شد. متاپلازی سنگفرشی شدید در ۲ نمونه از نواحی تمپورال وجود داشت که در این موارد، تظاهرات بالینی شامل ایسکمی پری‌لیمبال و واسکولیت بود. متاپلازی با شدت خفیف یا متوسط در کنار دیگر تظاهرات کراتوپاتی گاز خردل از جمله خشکی چشم، کمبود سلول‌های بنیادی لیمبوس و ایسکمی پری‌لیمبال رخ می‌دهد. در مطالعه ما رابطه‌ای بین تظاهرات بالینی و شدت متاپلازی سنگفرشی یافت نگردید. ایسکمی و واسکولیت ملتحمه اطراف لیمبوس می‌تواند به عنوان عوامل تشدید کننده تظاهرات بالینی بیمار و تاثیر مختصر بر نتایج آسیب‌شناسی در نظر گرفته شود.

به احتمال زیاد کمبود سلول‌های بنیادی در ربع نازال و تمپورال همانند تظاهرات قرنیه شدیدتر می‌باشد اما به علت تعداد محدود بیماران و ورود پی‌درپی آنان در مراحل بالینی متفاوت، اشک‌ریزش شدید و نامنظم بودن سطح در محل مواجهه، در این مورد نمی‌توانیم قضاوت دقیق داشته باشیم. بیماران به صورت واضحی در مراحل متفاوت درگیری قرنیه به ویژه انواع متوسط و شدید وارد مطالعه شدند. بنابراین نتایج ما قابل تعمیم به مراحل مختلف کراتوپاتی گاز خردل نمی‌باشد.

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه کاهش سلول‌های بنیادی لیمبوس در کراتوپاتی مزمن و دیررس گاز خردل را اثبات نمود. تظاهرات بالینی قرنیه در نواحی نازال و تمپورال شدیدتر بود و رابطه آماری بین کاهش سلول‌های بنیادی و تظاهرات بالینی یافت نگردید. عوامل دیگر مانند ایسکمی ملتحمه اطراف لیمبوس ممکن است در این زمینه نقش داشته باشند.

### منابع

1. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* 2000;44:415-425.
2. Tseng SC. Concept and application of limbal stem cells. *Eye* 1989;3(Pt2):141-157.
3. Joseph A, Powell-Richards AO, Shanmuganathan VA, Dua HS. Epithelial cell characteristics of cultured human limbal explants. *Br J Ophthalmol* 2004;88:393-398.
4. Lavker RM, Tseng SC, Sun TT. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Exp Eye Res* 2004;78:433-446.
5. Sangwan VS. Limbal stem cells in health and disease. *Biosci Rep* 2001;21:385-405.
6. Javadi MA, Baradaran-Rafii A. Living-related conjunctival-limbal allograft for chronic or delayed-



- onset mustard gas keratopathy. *Cornea* 2009;28:51-57.
7. Javadi MA, Yazdani S, Rezaie-Kanavi M, Mohammadpour M, Baradaran-Rafii A, Jafarinasab MR, et al. Long-term outcomes of penetrating keratoplasty in chronic and delayed mustard gas keratitis. *Cornea* 2007;26:1074-1078.
  8. Javadi MA, Yazdani S, Sajjadi H, Jadidi K, Karimian F, Einollahi B, et al. Chronic and delayed-onset mustard gas keratitis: report of 48 patients and review of literature. *Ophthalmology* 2005;112:617-625.
  9. Dua HS, Saini JS, Azuara-Blanco A, Gupta P. Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J Ophthalmol* 2000;48:83-92.
  10. Holland EJ, Schwartz GS. Changing concepts in the management of severe ocular surface disease over twenty-five years. *Cornea* 2000;19:688-698.
  11. Chen JJ, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:1301-1314.
  12. Coster DJ, Aggarwal RK, Williams KA. Surgical management of ocular surface disorders using conjunctival and stem cell allografts. *Br J Ophthalmol* 1995;79:977-982.
  13. Dua HS, Gomes JA, Singh A. Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol* 1994;78:401-408.
  14. Huang AJ, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:96-105.
  15. Lopez-Garcia JS, Rivas L, Garcia-Lozano I. Corneal epithelium squamous metaplasia determination as diagnostic factor in limbal deficiency. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 2006;81:281-288.
  16. McKelvie P. Ocular surface impression cytology. *Adv Anat Pathol* 2003;10:328-337.
  17. Murube J, Rivas L. Biopsy of the conjunctiva in dry eye patients establishes a correlation between squamous metaplasia and dry eye clinical severity. *Eur J Ophthalmol* 2003;13:246-256.
  18. Prabhasawat P, Tseng SC. Impression cytology study of epithelial phenotype of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane. *Arch Ophthalmol* 1997;115:1360-1367.
  19. Rivas L, Oroza MA, Perez-Esteban A, Murube-del-Castillo J. Morphological changes in ocular surface in dry eyes and other disorders by impression cytology. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1992;30:329-334.
  20. Sridhar MS, Vemuganti GK, Bansal AK, Rao GN. Impression cytology-proven corneal stem cell deficiency in patients after surgeries involving the limbus. *Cornea* 2001;20:145-148.
  21. Ghasemi H, Ghazanfari T, Babaei M, Soroush MR, Yaraee R, Ghassemi-Broumand M, et al. Long-term ocular complications of sulfur mustard in the civilian victims of Sardasht, Iran. *Cutan Ocul Toxicol* 2008;27:317-326.
  22. Blodi FC. Mustard gas keratopathy. *Int Ophthalmol Clin* 1971;11:1-13.
  23. Livingston PC, Walker HM. A Study of the Effects of Liquid Mustard Gas Upon the Eyes of Rabbits and of Certain Methods of Treatment. *Br J Ophthalmol* 1940;24:67-97.
  24. Mann I. A Study of Eighty-Four Cases of Delayed Mustard Gas Keratitis Fitted with Contact Lenses. *Br J Ophthalmol* 1944;28:441-447.
  25. Safarinejad MR, Moosavi SA, Montazeri B. Ocular injuries caused by mustard gas: diagnosis, treatment, and medical defense. *Mil Med* 2001;166:67-70.
  26. Banin E, Morad Y, Berenshtein E, Obolensky A, Yahalom C, Goldish J, et al. Injury induced by chemical warfare agents: characterization and treatment of ocular tissues exposed to nitrogen mustard. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2966-2972.
  27. Dahl H, Gluud B, Vangsted P, Norn M. Eye lesions induced by mustard gas. *Acta Ophthalmol Suppl* 1985;173:30-31.
  28. Schlotzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res* 2005;81:247-264.
  29. Solberg Y, Alcalay M, Belkin M. Ocular injury by mustard gas. *Surv Ophthalmol* 1997;41:461-466.
  30. Jampol LM, Axelrod A, Tessler H. Pathways of the eye's response to topical nitrogen mustard. *Invest Ophthalmol* 1976;15:486-489.
  31. Mann I, Pullinger BD. The Pathology of Cholesterin and Fat Deposition in Mustard Gas Injuries of the Cornea. *Br J Ophthalmol* 1942;26:503-507.
  32. Pleyer U, Sherif Z, Baatz H, Hartmann C. Delayed mustard gas keratopathy: clinical findings and confocal microscopy. *Am J Ophthalmol* 1999;128:506-507.
  33. Puangsricharern V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995;102:1476-1485.
  34. Maskin SL, Heitman KF, Lawton AW, Yee RW. Diagnostic impression cytology for external eye disease. *Cornea* 1989;8:270-273.
  35. Sacchetti M, Lambiase A, Cortes M, Sgrulletta R, Bonini S, Merlo D, et al. Clinical and cytological findings in limbal stem cell deficiency. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243:870-876.
  36. Tseng SC. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. *Ophthalmology* 1985;92:728-733.
  37. Aasted A, Darre E, Wulf HC. Mustard gas: clinical, toxicological, and mutagenic aspects based on modern experience. *Ann Plast Surg* 1987;19:330-333.
  38. Borak J, Sidell FR. Agents of chemical warfare: sulfur mustard. *Ann Emerg Med* 1992;21:303-308.
  39. Shapiro MS, Friend J, Thoft RA. Corneal re-epithelialization from the conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;21(1 Pt 1):135-142.
  40. Kwok LS, Coroneo MT. A model for pterygium formation. *Cornea* 1994;13:219-224.
  41. Pajooheh-Ganji A, Ghosh SP, Stepp MA. Regional distribution of alpha9beta1 integrin within the limbus of the mouse ocular surface. *Dev Dyn* 2004;230:518-528.
  42. Pajooheh-Ganji A, Pal-Ghosh S, Simmens SJ, Stepp MA. Integrins in slow-cycling corneal epithelial cells at the limbus in the mouse. *Stem Cells* 2006;24:1075-1086.
  43. Zhao J, Mo V, Nagasaki T. Distribution of Label-retaining Cells in the Limbal Epithelium of a Mouse Eye. *J Histochem Cytochem* 2009;57:177-185.
  44. Safaei A, Saluti R, Kumar PV. Conjunctival dysplasia in soldiers exposed to mustard gas during the Iraq-Iran war: scrape cytology. *Acta Cytol* 2001;45:909-913.