

# 兔眼球后 Tenon 囊下灌注 Bevacizumab 的眼内通透性研究

邬一楠<sup>1</sup>, 周宏健<sup>2</sup>, 吴国海<sup>3</sup>, 易全勇<sup>4</sup>

基金项目:宁波市科技局自然科学基金(No. 2010A610033)

作者单位:(315040)中国浙江省宁波市眼科医院<sup>1</sup> 白内障青光眼科;<sup>2</sup> 白内障科;<sup>3</sup> 眼眶整形科;<sup>4</sup> 眼底病科

作者简介:邬一楠,毕业于温州医学院,硕士,主治医师,研究方向:眼外伤、青光眼。

通讯作者:周宏健,主任医师,院长,研究方向:葡萄膜炎、白内障。zhj560828@sina.com

收稿日期:2015-01-06 修回日期:2015-08-11

## Study on intraocular permeability of Bevacizumab after retrobulbar Tenon capsule perfusion in rabbits

Yi-Nan Wu<sup>1</sup>, Hong-Jian Zhou<sup>2</sup>, Guo-Hai Wu<sup>3</sup>, Quan-Yong Yi<sup>4</sup>

**Foundation item:** Natural Science Foundation of Ningbo Science and Technology Department (No. 2010A610033)

<sup>1</sup>Department of Cataract and Glaucoma;<sup>2</sup>Department of Cataract;

<sup>3</sup>Department of Orbital Plastic;<sup>4</sup>Department of Ocular Fundus Disease, Ningbo Eye Hospital, Ningbo 315040, Zhejiang Province, China

**Correspondence to:** Hong-Jian Zhou. Department of Cataract, Ningbo Eye Hospital, Ningbo 315040, Zhejiang Province, China. zhj560828@sina.com

Received:2015-01-06 Accepted:2015-08-11

## Abstract

• **AIM:** To compare the concentration of Bevacizumab in serum and vitreous after bevacizumab administered by retrobulbar Tenon capsule perfusion and intravitreal injection in eyeballs of rabbits and observe the fluorescence of retinal, and to investigate the intraocular permeability of bevacizumab after retrobulbar Tenon capsule perfusion feasibility of extraocular administration route.

• **METHODS:** Twenty healthy adult New Zealand rabbits were used in the study. The rabbits were randomly divided into two groups, group A received single administration of 1.25mg bevacizumab (1.25mg/0.05mL) by intravitreal injection, group B received single administration of 5mg bevacizumab (5mg/0.2mL) by retrobulbar Tenon capsule perfusion. Bevacizumab

concentrations in serum and vitreous were determined by double antibody sandwich Elisa at 1 and 3d after administration. The changes of bevacizumab concentrations in serum and vitreous of two groups were compared, and the fluorescence of retinal was observed by laser confocal microscope.

• **RESULTS:** One day after administration, intravitreal concentrations of bevacizumab in vitreous of group A and B were  $254.40 \pm 13.65$  and  $1.60 \pm 0.32 \mu\text{g/mL}$  respectively. Concentrations of bevacizumab in serum of group A and B were  $0.55 \pm 0.15$  and  $0.63 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$  respectively. The changes of bevacizumab concentrations in serum between two groups did not vary significantly ( $t = 1.168$ ,  $P = 0.277$ ). At 3d after administration, concentrations of bevacizumab in vitreous of group A and B were  $236.80 \pm 8.70$  and  $1.40 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$  respectively. Concentrations of bevacizumab in serum of group A and B were  $0.66 \pm 0.17 \mu\text{g/mL}$  and  $0.64 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$  respectively. The changes of bevacizumab concentrations in serum between two groups did not vary significantly ( $t = 0.207$ ,  $P = 0.841$ ). For two administration routes, the fluorescence distribution of retina layers could be clearly detected.

• **CONCLUSION:** At 1 and 3d after intravitreal injection, intravitreal concentrations of bevacizumab of group A is much higher than that of group B. Intravitreal injection of bevacizumab is the more effective route of administration for intraocular tissue. But retrobulbar Tenon capsule perfusion can also achieve the minimum concentration which can completely blocks VEGF activity ( $>500\text{ng/mL}$ ), and can remain for at least three days. Both intravitreal injection and retrobulbar Tenon capsule perfusion of bevacizumab results in high serum concentration, and the change of bevacizumab concentration in serum between two groups does not vary significantly. In both administration routes, the fluorescence distribution of retina layers can be clearly detected, and both two dosing ways can work on each layer of retina.

• **KEYWORDS:** bevacizumab; rabbit eye; vitreous cavity; Tenon capsule; injection; serum; drug concentration

**Citation:** Wu YN, Zhou HJ, Wu GH, *et al.* Study on intraocular permeability of Bevacizumab after retrobulbar Tenon capsule perfusion in rabbits. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(9):1525-1528

## 摘要

**目的:**比较兔眼球后 Tenon 囊下灌注和玻璃体腔注射 bevacizumab 后玻璃体和血清中的浓度,并观察 bevacizumab 视网膜荧光显影,探讨 bevacizumab 球后 Tenon 囊下灌注的眼内通透性和眼外给药途径的可行性。

**方法:**实验用健康成年新西兰兔 20 只,随机分为 A 组和 B 组,A 组均单眼接受单次玻璃体腔注射 1.25mg bevacizumab (1.25mg/0.05mL),B 组均单眼单次 Tenon 囊下灌注 5mg bevacizumab (5mg/0.2mL)。1、3d 后抽取玻璃体和血液,使用双抗体夹心 Elisa 检测玻璃体和血清中 bevacizumab 药物浓度,比较两组中玻璃体和血清内 bevacizumab 浓度差异,并通过激光共聚焦观察视网膜免疫荧光。

**结果:**给药 1d 后,A 组和 B 组玻璃体腔内 bevacizumab 药物浓度分别为  $254.40 \pm 13.65$ 、 $1.60 \pm 0.32 \mu\text{g/mL}$ 。A 组和 B 组血清内 bevacizumab 药物浓度分别为  $0.55 \pm 0.15$ 、 $0.63 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ ,两组血清 bevacizumab 浓度比较差异无统计学意义 ( $t=1.168, P=0.277$ )。给药 3d 后,A 组和 B 组玻璃体腔内 bevacizumab 药物浓度分别为  $236.80 \pm 8.70$ 、 $1.40 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$ ,A 组和 B 组血清内 bevacizumab 药物浓度分别为  $0.66 \pm 0.17$ 、 $0.64 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$ ,两组血清内 bevacizumab 浓度比较差异无统计学意义 ( $t=0.207, P=0.841$ ),两种给药方式视网膜各层荧光分布均能明显显现。

**结论:**给药 1、3d 后玻璃体腔注药组在玻璃体腔内 bevacizumab 药物浓度要明显高于 Tenon 囊下灌注组,玻璃体腔内注射是较为有效的给药途径,而球后 Tenon 囊下灌注也能使 bevacizumab 进入玻璃体腔而且达到完全抑制 VEGF 活动所需的浓度 ( $>500\text{ng/mL}$ ),并能至少持续 3d 以上,两种给药方法在血清中均能检测到较高浓度的 bevacizumab,且两者浓度差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),两种给药方式视网膜各层荧光分布均能明显显现,提示两种给药方式药物均能作用于视网膜各层。

**关键词:**Bevacizumab;兔眼;玻璃体腔;Tenon 囊;注射;血清;药物浓度

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.9.08

**引用:** 郭一楠,周宏健,吴国海,等.兔眼球后 Tenon 囊下灌注 Bevacizumab 的眼内通透性研究.国际眼科杂志 2015;15(9):1525-1528

## 0 引言

Bevacizumab 是全长的人源化的 VEGF 单克隆抗体,分子量为 149kD,于 2004-02 获得美国 FDA 批准用于治疗晚期结、直肠癌。虽然目前还未通过美国 FDA 批准用于眼科临床,但是该药在大量治疗各种新生血管性眼病的研究中都已显示出明显的疗效<sup>[1-2]</sup>,美国国立眼科研究所、美国国立卫生研究院和英国卫生局已经宣布资助 bevacizumab 用于治疗年龄相关性黄斑变性的 III 期临床研究。Bevacizumab 在眼科临床使用中一般采用玻璃体腔注射给药方法,此种给药方式可能会产生很多并发症,

如眼内出血、视网膜脱离、白内障形成、眼内感染等,危害严重,且该药需反复注射,风险极高。经 Tenon 囊灌注主要依靠药物对后极部巩膜的穿透而治疗眼底病,几乎无任何风险,可以频繁注射。已有实验证明,结膜下注射 bevacizumab 在眼前段可以检测到足够的药物浓度,但比眼内注射浓度要低<sup>[3]</sup>。而结膜下注射主要靠前部巩膜吸收进入眼内治疗眼前段疾病。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康新西兰白兔 20 只(宁波大学实验动物中心提供),体质量 3~3.5kg,经手持式裂隙灯和眼底镜检查排除眼部疾病。离心机:Kendro Multifuge 3s。酶标仪:BR680。激光共聚焦:LSM710 zeiss。血清和玻璃体液用  $1\mu\text{g/mL}$  rabbit anti-human IgG (H+L) (Affini Pure, Catalog No:309-005-082, Jackson Immuno Research, West Grove, PA) 作为抗体,Elisa 试剂盒 (Protein Detector, Catalog No:54-62-10; Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc, Gaithersburg, MD),可以检测的最低浓度为  $0.1\text{ng/mL}$ 。

## 1.2 方法

**1.2.1 Bevacizumab 的注射** 新西兰白兔 20 只随机分成两组,每组 10 只,A 组均单眼接受单次玻璃体腔注射 1.25mg bevacizumab (1.25mg/0.05mL),其中 5 只于 24h 后,另外 5 只于 72h 后取血液和玻璃体液,检测 bevacizumab 药物浓度;制作视网膜冰冻切片,激光共聚焦观察 bevacizumab 免疫荧光。B 组均单眼单次 Tenon 囊下灌注 5mg bevacizumab (5mg/0.2mL),其中 5 只于 24h 后,另外 5 只于 72h 后取血液和玻璃体液,检测 bevacizumab 药物浓度,制作视网膜冰冻切片。注射操作步骤:使用 20g/L 戊巴比妥钠 (20~30mg/kg) 耳缘静脉推注麻醉,局部滴 4g/L 盐酸奥布卡因滴眼液表面麻醉,单眼常规 2.5% 聚维酮碘冲洗结膜囊后用 50mL 生理盐水冲洗干净,铺巾。A 组使用 1mL 注射器自 12:00 位,距离角巩膜缘后约 3mm 处进针入玻璃体腔,进针深度约 5mm。B 组在颞上方 11:30 位角巩膜缘后约 2mm 处剪开球结膜和 Tenon 囊,切口长约 1mm,暴露出巩膜,把弯曲成弧形的钝性针头 (泪道冲洗针头自制) 沿巩膜面进入赤道后部注药,注射完成后结膜囊内涂红霉素眼膏。

**1.2.2 酶联免疫法测定 bevacizumab 的浓度** 使用 20g/L 戊巴比妥钠 (20~30mg/kg) 耳缘静脉推注麻醉,颈动脉取 5mL 血液,放置 1h,7 200r/min 离心,去上清液,立即保存于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中,待用。使用过量 20g/L 戊巴比妥钠耳缘静脉推注处死兔子,取出眼球,取 2mL 玻璃体液,立即保存在  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中,待用。血清和玻璃体液用  $1\mu\text{g/mL}$  兔抗人 IgG (H+L) 作为抗体,根据 Elisa 试剂盒说明进行操作,可以检测的最低浓度为  $0.1\text{ng/mL}$ 。

**1.2.3 眼球冰冻切片激光共聚焦显影** 先将整个眼球取出来,4% 多聚甲醛固定,30% 蔗糖脱水,包埋,然后冰冻切片,荧光标记选用  $1.0\text{mg/mL}$  DyLight 488 兔抗人 IgG (H+L)。

统计学分析:数据分析采用 SPSS 11.5 进行,计量资

料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组血清 bevacizumab 浓度的比较采用成组资料的  $t$  检验和配对样本  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两种给药方法玻璃体腔药物浓度比较** 给药 1d 后, 检测玻璃体腔内 bevacizumab 药物浓度, A 组(玻璃体腔注药组)为  $254.40 \pm 13.65 \mu\text{g/mL}$ , B 组(Tenon 囊下灌注组)为  $1.60 \pm 0.32 \mu\text{g/mL}$ 。给药 3d 后, 检测玻璃体腔内 bevacizumab 药物浓度, A 组(玻璃体腔注药组)为  $236.80 \pm 8.70 \mu\text{g/mL}$ , B 组(Tenon 囊下灌注组)为  $1.40 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$ 。玻璃体腔给药 1d 和 3d 后, 玻璃体腔内药物浓度要明显高于 Tenon 囊下灌注( $t_A = 41.576, P = 0.000; t_B = 59.665, P = 0.000$ )。

**2.2 两种给药方法血清药物浓度比较** 给药 1d 后, 检测血清内 bevacizumab 药物浓度, A 组(玻璃体腔注药组)为  $0.55 \pm 0.15 \mu\text{g/mL}$ , B 组(Tenon 囊下灌注组)为  $0.63 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ 。给药 3d 后, 检测血清内 bevacizumab 药物浓度, A 组(玻璃体腔注药组)为  $0.66 \pm 0.17 \mu\text{g/mL}$ , B 组(Tenon 囊下灌注组)为  $0.64 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$ 。在给药 1d 后两种给药方法血清内 bevacizumab 浓度比较无统计学意义( $t = 1.168, P = 0.277$ ), 给药 3d 后两种给药方法血清内 bevacizumab 浓度比较无统计学意义( $t = 0.207, P = 0.841$ )。

**2.3 两种给药方式视网膜显微共聚焦结果** 从图 1 显示情况可以看出, 两种给药方式 bevacizumab 药物均能在视网膜各层组织中显影。

## 3 讨论

经 Tenon 囊下灌注是眼科经典的给药途径, 主要用于眼后段疾病的治疗, 依靠药物对巩膜的穿透性而达眼内发挥药效。应用 Tenon 囊下灌注几乎无任何风险, 可以频繁注射, 非常适合用于抗 VEGF 药物、激素等需要重复注射的治疗。另外, 有一些情况不宜眼内注射或需要补充治疗的, 如硅油充填术后、白内障或者因角膜原因等屈光介质不清、严重玻璃体视网膜增生并广泛视网膜脱离者, 还有对眼内注射不接受或有恐惧感的患者均是非常合适的替代治疗方法。一系列研究表明, 曲安奈德不仅在眼内注射可取得较好的效果, 在巩膜外应用也显示了良好的治疗眼后段病变的作用<sup>[4-6]</sup>, 巩膜组织由胶原纤维与黏多糖交织而成, 含水量达 70%, 使许多水溶性的药物得以通过, 屏障作用主要受药物分子量和分子大小影响。有研究报道巩膜可使分子量为 150kD 的免疫球蛋白通过, 兔眼与人眼巩膜对药物的屏障作用无差异<sup>[7]</sup>。而玻璃体给药穿透视网膜的屏障来自内界膜, 内界膜对通过的物质的分子量要求不超过 70kD 大小<sup>[8]</sup>。Bevacizumab 是全长的人源化的 VEGF 单克隆抗体, 分子量为 149kD, 因此可以看出 bevacizumab 穿透巩膜进入眼内从理论上来看应该是可行的。

Tenon 囊下灌注有效性分析: 实际的 bevacizumab 在人的活体眼内组织有效治疗浓度尚不明确, 且人眼和兔眼结构上也有许多的区别。有研究表明, 浓度 22ng/mL

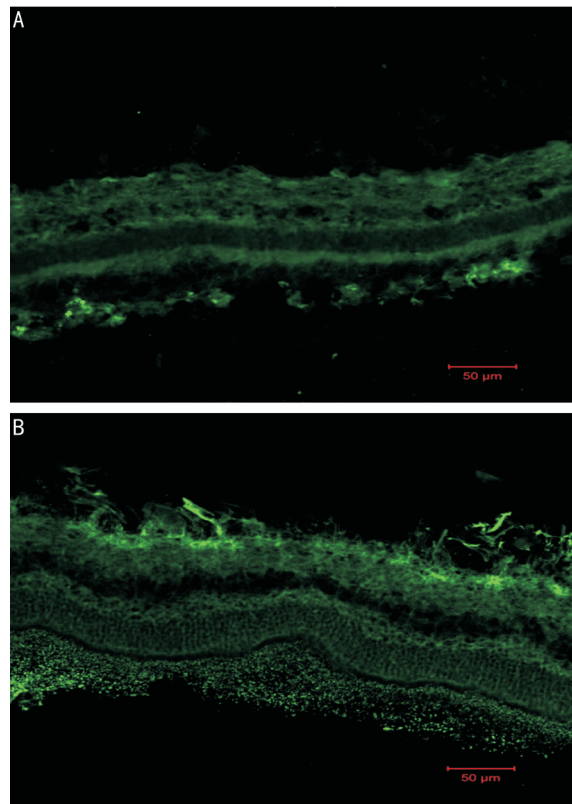


图 1 两种给药方式视网膜显微共聚焦图片 A: Tenon 囊下灌注注射 1d 后视网膜荧光; B: 玻璃体腔注药 1d 后视网膜荧光。

的 bevacizumab 可以抑制半数的 VEGF 诱导的内皮生长, 而要完全抑制 VEGF 的活动, 包括 VEGF 诱导的内皮生长、迁移、高通透性, 则至少需要 500ng/mL<sup>[9]</sup>。本次研究结果显示, 玻璃体腔给药后达到眼内玻璃体浓度要明显高于球后 Tenon 囊下灌注法, 因本次研究仅选择 1d 和 3d 两个时间点, 因此无法完整反映整个药代动力学变化。但是本次研究提示以下两点: (1) 玻璃体腔注射给药是较为有效的眼内给药途径, 能够达到较高的玻璃体腔药物浓度; (2) 两种给药方法的 bevacizumab 眼内浓度均高于 500ng/mL 有效浓度。

Tenon 囊下灌注安全性分析: 有些报道显示局部应用 bevacizumab 后会产生一些全身的副作用<sup>[10-12]</sup>。这些副作用包括系统性高血压、血管栓塞性疾病和死亡等, 这些副作用和 bevacizumab 静脉使用治疗癌症的全身副作用相同<sup>[13-14]</sup>。本次研究显示: 在给药 1d 后两种给药方法血清内 bevacizumab 浓度比较无统计学差异( $t = 1.168, P = 0.277$ ), 给药 3d 后两种给药方法血清内 bevacizumab 浓度比较无统计学差异( $t = 0.207, P = 0.841$ )。提示玻璃体腔注射给药和在 Tenon 囊下灌注在引起全身副作用上并无显著区别。

总之, 本实验通过初步进行 Tenon 囊下灌注 bevacizumab 的眼内通透性研究, 初步了解了 Tenon 囊下灌注可以获得较高的眼内治疗浓度 (>500ng/mL), 且和玻璃体腔注射给药常规方法相比, 在引起全身副作用上并无显著区别, 探索应用更安全且有效的眼外给药途径, 来替代有致盲风险的眼内注射治疗眼后段新生血管性疾病, 简化治疗程序, 减少治疗费用, 扩大使用范围及适应

证,更易被患者接受,造福更多患者。通过巩膜的缓释装置可减少注射次数,使患者长期维持有用视力,避免致盲,从而减轻家庭与社会负担,节约了资源。因此对这一给药途径的可行性和安全性作进一步评价,有重要的理论价值和临床指导意义。一旦适用于临床,会产生很大的经济效益和社会效益。

#### 参考文献

- 1 Hussain N, Ghanekar Y, Kaur I. The future implication and indications of anti-vascular endothelial growth factor therapy in ophthalmic practice. *Indian J Ophthalmol* 2007;55(6):445-450
- 2 Gunther JB, Altaweel MM. Bevacizumab (Avastin) for the treatment of ocular disease. *Surv Ophthalmol* 2009;54(3):372-400
- 3 Nomoto H, Shiraga F, Kuno N, et al. Pharmacokinetics of bevacizumab after topical, subconjunctival, and intravitreal administration in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(10):4807-4813
- 4 Kawaji T, Takano A, Inomata Y, et al. Trans-Tenon's retrobulbar triamcinolone acetonide injection for macular oedema related to branch retinal vein occlusion. *Br J Ophthalmol* 2008;92(1):81-83
- 5 Kojima A, Ohno - Matsui K, Futagami S, et al. Trans-Tenon's retrobulbar triamcinolone infusion for myopic choroidal neovascularization. *Acta Ophthalmol Scand* 2006;84(6):749-754
- 6 Hayashi K, Hayashi H. Intravitreal versus retrobulbar injections of triamcinolone for macular edema associated with branch retinal vein

- occlusion. *Am J Ophthalmol* 2005;139(6):972-982
- 7 Ambati J, Canakis CS, Miller JW, et al. Diffusion of high molecular weight compounds through sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(5):1181-1185
- 8 Ambati J, Gragoudas ES, Miller JW, et al. Transscleral delivery of bioactive protein to the choroid and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(5):1186-1191
- 9 Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, et al. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody *in vitro*. *Angiogenesis* 2004;7(4):335-345
- 10 Fung AE, Rosenfeld PJ, Reichel E. The International Intravitreal Bevacizumab Safety Survey: using the internet to assess drug safety worldwide. *Br J Ophthalmol* 2006;90(11):1344-1349
- 11 Wu L, Martinez-Castellanos MA, Quiroz-Mercado H, et al. Twelve-month safety of intravitreal injections of bevacizumab (Bevacizumab®): results of the Pan-American Collaborative Retina Study group (PACORES). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246(1):81-87
- 12 Shima C, Sakaguchi H, Gomi F, et al. Complications in patients after intravitreal injection of bevacizumab. *Acta Ophthalmol* 2008;86(4):372-376
- 13 Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350(23):2335-2342
- 14 Ratner M. Genentech discloses safety concerns over bevacizumab. *Nat Biotechnol* 2004;22(6):1198

## 美国《生物医学检索系统》(PubMed) 2014年收录的中国眼科期刊及篇数

美国《生物医学检索系统》(PubMed)2014年收录中国期刊总数130种,其中大陆109种,台湾15种,香港6种,总计入库25986篇。收录中国眼科期刊3种,包括 *International Journal of Ophthalmology* 入库198篇,《中华眼科杂志》入库145篇及 *Eye Science* 入库47篇。

摘编自 中国高校科技期刊研究会网站