

玻璃体腔注射伏立康唑缓释微球对兔烟曲霉菌性 眼内炎的抗感染作用

杨丽娜, 辛 萌, 吴祥根*, 姜皓然

(山东省眼科研究所, 山东省眼科学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 山东 青岛 266071)

摘要: 评价玻璃体腔内注射伏立康唑缓释微球 (voriconazole microspheres, VCZ-MS) 对兔烟曲霉菌性眼内炎的治疗作用, 为治疗真菌性眼内炎开辟新途径。制备 VCZ-MS 并对其理化性质进行考察。采用新西兰大白兔右眼玻璃体腔内注入 1×10^3 CFU·mL⁻¹ 烟曲霉孢子悬液建立烟曲霉菌性眼内炎模型, 建模成功的动物随机分为 A 组 (空白对照组)、B 组 (玻璃体切除联合 100 μ g·0.1 mL⁻¹ 伏立康唑眼内注射)、C 组 (玻璃体切除联合 0.5 mg VCZ-MS 注射)、D 组 (玻璃体切除联合 1.0 mg VCZ-MS 注射) 和 E 组 (玻璃体切除联合 1.5 mg VCZ-MS 注射)。术后不同时间点观察前房闪辉、房水细胞及玻璃体混浊程度, 评价治疗效果, 并进行组织病理学检查。制备的微球球形圆整, 微球载药量和包封率分别为 29.94% 和 73.5%, 具有显著的体外缓释特性。药效结果表明, A 组眼内炎发生率为 100%, 迅速发展为全眼球炎, 导致眼球萎缩。B、C、D、E 组炎症反应均较 A 组轻 ($P < 0.05$)。B 组玻璃体混浊度较 C、D、E 组重 ($P < 0.05$)。C 组有 2 只眼在接种烟曲霉菌后 3~5 d 出现后极部积脓, 失去控制。D 和 E 组接种烟曲霉菌后 8 周, 所有炎症控制眼的眼底清晰, 无复发。组织病理学结果表明, 治愈眼结构正常; 炎症未控制眼多萎缩, 球壁结构破坏。该研究证实玻璃体腔内注射 VCZ-MS 明显优于传统制剂玻璃体腔注射给药, 玻璃体腔注射 VCZ-MS 能安全有效地抑制烟曲霉菌性眼内炎的发展, 以含伏立康唑 1.0 mg VCZ-MS 较佳。

关键词: 伏立康唑; 微球; 烟曲霉菌; 眼内炎; 眼感染; 真菌性

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 06-0778-07

Anti-infectious activity of intravitreal injectable voriconazole microspheres on experimental rabbit fungal endophthalmitis of *Aspergillus fumigatus*

YANG Li-na, XIN Meng, WU Xiang-gen*, JIANG Hao-ran

(State Key Laboratory Training Base, Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Shandong Eye Institute, Qingdao 266071, China)

Abstract: The therapeutic effect of sustained intravitreal injectable voriconazole microspheres (VCZ-MS) on an experimental endophthalmitis of *Aspergillus fumigatus* was investigated. VCZ-MS was prepared successfully and its physico-chemical property was also evaluated. Right eyes of albino rabbits were infected with an intravitreal injection of 1 000 CFU·mL⁻¹ of susceptible *Aspergillus fumigatus*. All fungal endophthalmitis models were randomly divided into five groups 48 hours later: Group A is control group with no treatment; in group B, vitrectomy was performed combined with intravitreal 3 times injections of 100 μ g·0.1 mL⁻¹ voriconazole every other day. In group C, D and E, vitrectomy was performed combined with intravitreal injection of 0.5 mg, 1.0 mg and 1.5 mg VCZ-MS respectively. The treatment effect was assessed by slit lamp and indirect ophthalmoscope funduscopy examination, using clinical grading system of inflammation in the anterior chamber and the vitreous opacity. The optical microscopy revealed that microspheres obtained from the experiment

收稿日期: 2010-02-03.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-532-85899351, E-mail: wuxianggen@126.com

design were opaque, discrete and spherical particles with smooth surfaces. The drug content and encapsulation efficiency of microspheres were 29.94% and 73.5%, respectively. Endophthalmitis occurred in all eyes of group A, and rapidly developed to panophthalmitis. The inflammation grade of group B, C, D or E was lower than that of group A ($P < 0.05$). The grade of vitreous opacity in group C, D, E is lower than group B ($P < 0.05$). Two eyes in group C developed to panophthalmitis. But in group D and E, all eyes whose inflammation was controlled had no recurrence with vitreous clear. Histopathological examination showed normal structures in the cured eyes, while most uncured eyes were atrophic and with eyeball destroyed. So, it can be safely concluded that the curative effect of intravitreal VCZ-MS is significantly better than that of routine intraocular injection of voriconazole. The optimal dose is the one containing 1.0 mg voriconazole.

Key words: voriconazole; microsphere; *Aspergillus fumigatus*; endophthalmitis; eye infection; fungal

真菌性眼内炎 (fungal endophthalmitis) 是由浅部、深部病原真菌或条件致病真菌引起的眼内感染, 真菌性眼内炎的发病率仅次于细菌性, 是高致盲性眼病之一, 具有发病隐匿, 病程长及易复发等特点, 可引起眼组织严重破坏, 以致视力丧失、眼球萎缩^[1]。其中烟曲霉菌是致病力最强的菌株^[2]。伏立康唑 (voriconazole) 是第二代三唑类广谱抗真菌药物, 对多种眼部常见致病真菌具有抗菌活性, 尤其对镰刀菌属、曲霉属和念珠菌属抗菌活性更为有效^[3], 但是伏立康唑的玻璃体半衰期只有 2.5 h, 需连续玻璃体腔注射给药, 这又导致玻璃体出血、增生机化和视网膜脱离等并发症^[4]。而生物降解型微球制剂, 混悬后直接进行玻璃体内注射, 不需要如植入剂等制剂的手术植入, 同时具有缓释作用。随着载体材料的降解, 不要再次手术取出等优点, 在玻璃体给药中日益受到重视^[5]。本实验制备伏立康唑缓释微球 (voriconazole microspheres, VCZ-MS), 并模拟外源性烟曲霉菌性眼内炎模型, 观察对玻璃体腔注射不同剂量 VCZ-MS 烟曲霉菌性眼内炎的治疗效果。

材料与方 法

仪器 NIKON/C1 PLUS 激光共聚焦显微镜 (尼康公司); Agilent 1100 HPLC (美国 Agilent 公司); Genesis-D 型手持眼底照相机 (日本 Kowa 公司); 900BQ 裂隙灯显微镜, MD6002 型玻璃体切割仪 (科林公司); S4 型手术显微镜 (ZEISS 公司); DSC204F1 型差示扫描量热分析仪 (德国耐驰公司); VERTEX70 型傅立叶变换红外光谱仪 (德国布鲁克公司)。

药品与试剂 伏立康唑 (深圳海滨制药有限公司提供, 纯度 $\geq 99.8\%$, 批号: 20080701); 乳酸-羟乙酸共聚物 (PLGA, 乳酸与羟乙酸聚合比 75 : 25, 黏均分子量 15 000, 中国科学院成都有机化学研究所); 聚乙烯醇 (PVA, Sigma 公司, 平均摩尔分子量 30 000~70 000); 二氯甲烷为分析纯, 甲醇、乙腈为色谱纯,

水为蒸馏水。

菌株与动物 烟曲霉菌菌株 (*Aspergillus fumigatus* 3.772) 由中国医学科学院微生物研究所中国医学真菌保藏管理中心提供。在无菌条件下将烟曲霉菌标准菌株接种于沙氏低糖琼脂培养基, 28 °C 温箱培育 7 d, 菌种生长良好后用塑料薄膜包裹于 4 °C 冰箱冷藏保存备用。真菌孢子悬液制备: 接种前一周从 4 °C 冰箱中取出烟曲霉菌的保藏培养基, 28 °C 培养 2 d 后转种于沙氏葡萄糖琼脂平板上, 28 °C 培育 4 d, 观察菌落生长良好后在无菌条件下用 1 mL 生理盐水冲洗菌面, 震荡均匀, 制成生理盐水悬液, 红细胞计数板进行分生孢子计数, 调整真菌孢子浓度为 1×10^3 CFU (colony forming unit)·mL⁻¹。

健康成年新西兰大白兔, 体重 2.0~2.5 kg, 雌雄不限, 购自山东省农业科学院 (许可证号: SCXK (鲁) 20040013), 于山东省眼科研究所动物房喂养并用于实验。

微球的制备 采用 O/W 型乳化溶剂挥发法, 精密称取伏立康唑 80 mg 和 PLGA 20 mg, 溶于 1 mL 二氯甲烷作为油相, 在搅拌下将油相缓慢滴入 2% PVA 水溶液 20 mL (外水相), 1 500 r·min⁻¹ 搅拌 10 min, 加入水 80 mL, 将转速降至 1 000 r·min⁻¹, 25 °C 继续搅拌 10 h 以固化微球, 离心收集微球, 用水反复洗涤后, 冷冻干燥 72 h 即得 VCZ-MS。

药物的含量测定 选用 HPLC 测定微球的载药量、包封率和释放液中药量。色谱柱 Agilent SB-C₁₈ (250 mm×4.60 mm, 5 μm), 流动相为甲醇/0.02 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液 (0.1%三乙胺, pH 6.0): 75 : 25, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 256 nm, 进样量 20 μL, 外标法定量。

称取微球约 5 mg, 用乙腈 1.0 mL 溶解, 加入甲醇 4.0 mL, 涡旋振荡 2 min, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 上清液进样。计算微球中的载药量, 同时以载药量与理论载药量的比值计算微球的包封率^[6]。

伏立康唑微球的外观形态观察及其分散状态 采用光学显微镜观察微球的外观形态,共聚焦激光扫描显微镜 (confocal laser scanning microscope, CLSM) 观察微球中药物的分布,激发波长为 488 nm。

差示扫描量热分析 分别取 PLGA、伏立康唑、PLGA 与伏立康唑的物理混合物、空白微球和 VCZ-MS 样品,在 20~160 °C 内,以 10 °C·min⁻¹ 的升温速率加热,在氮气氛 (100 mL·min⁻¹) 下进行 DSC 分析。

红外光谱 对 PLGA、伏立康唑、PLGA 与伏立康唑的物理混合物、空白微球和 VCZ-MS 样品进行红外光谱分析 (溴化钾压片)。

体外释药特性 称取 VCZ-MS 约 5 mg 于透析袋中,加入 pH 7.4 的 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (含 0.02% 叠氮化钠) 5 mL。两端扎紧后,置入装有 45 mL 释放介质的三角烧瓶中,于 (37 ± 0.5) °C 的恒温振荡器中水平振荡,频率为每分钟 72 次,定时取样 400 μL,同时补充等体积空白介质。测定释放液的药物浓度,计算微球的累积释放度。

烟曲霉菌性眼内炎动物模型构建与治疗^[7, 8] 健康成年新西兰大白兔,在无菌条件下,使用带有 30G 针头的注射器行前房穿刺抽出房水 0.1 mL,之后于鼻上方角巩膜缘后 2 mm 行玻璃体腔穿刺术,直视下将孢子浓度为 1 × 10³ CFU·mL⁻¹ 的烟曲霉菌悬液 60 μL 缓慢推入玻璃体腔中央。穿刺时针头斜面面向前,避免损伤晶状体。

兔眼成功接种烟曲霉菌悬液 48 h 后,随机数字表法分为 5 组,每组 6 只眼。A 组为空白对照组; B 组为伏立康唑 100 μg·0.1 mL⁻¹ 眼内注射,隔日 1 次,共 3 次; C 组为 0.5 mg VCZ-MS (以伏立康唑计) 组; D 组为 1.0 mg VCZ-MS 组; E 组为 1.5 mg VCZ-MS 组。A~E 组均联合玻璃体切除术。将兔麻醉后,右眼常规消毒,铺巾,开睑器开睑。沿角膜缘剪开 10 点钟至 2 点钟球结膜。角巩膜缘后 2 mm 鼻上方做穿刺口,5-0 尼龙线固定灌注管,眼内灌注平衡盐溶液 (BSS, 美国 Alcon 公司)。再于角巩膜缘后 2 mm 颞上方做穿刺口,放置 15° 斜面角膜接触镜清楚显示眼内结构后,将 20G 玻璃体切割头伸入玻璃体腔内,切速 750 r·min⁻¹,吸力 120 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa),从后向前切割玻璃体中轴部共 10 min。玻璃体切除术完成后,7-0 尼龙线缝合穿刺口,调节灌注眼至眼压正常,拉紧预置缝线关闭灌注口,复位缝合球结膜。各微球组和空白对照组用 27G 针头于角巩膜缘后 2 mm 注射微球混悬液 0.1 mL。伏立康唑眼内注射组用 30G 针头,将 100 μg·0.1 mL⁻¹ 伏立康唑缓慢

推入玻璃体腔中央。术后结膜囊涂 0.3% 氧氟沙星眼膏每天 2 次,共 3 d。

疗效观察 术后 2 周内隔天、3、4、6 及 8 周用裂隙灯和间接检眼镜观察各眼炎症情况,重点观察前房闪辉、房水细胞及玻璃体混浊程度,其分级标准如下^[9]:

前房闪辉分级 (炎性渗出物进入房水,在裂隙灯窄光带斜照下,可见闪光及渗出颗粒在浮动,这种现象称为房水闪辉): 0 级,无房水闪辉 (光束透明发亮); 1 级,轻度房水闪辉 (微弱发白光束); 2 级,中度房水闪辉 (中度乳白光束,可辨别虹膜及晶状体细节); 3 级,显著房水闪辉 (明显乳白光束,难以辨别虹膜及晶状体细节); 4 级,严重的前房闪辉,房水成凝固状态,伴有大量纤维性渗出物。

房水细胞分级 (在暗室内,将光源和裂隙灯显微镜的角度调整为 45°~60°,光束为 1 mm × 0.5 mm,将光束通过瞳孔区计算所有光束内的细胞数): 0 级,无细胞; 1 级,5~10 个细胞; 2 级,11~20 个细胞; 3 级,21~50 个细胞; 4 级,>50 个细胞。

玻璃体混浊分级: 0 级,玻璃体清晰无混浊; 1 级,轻微混浊,视神经、视网膜血管和神经纤维可分辨; 2 级,轻度混浊,视神经、视网膜血管可以辨认,但神经纤维模糊难辨; 3 级,中度混浊,视神经、视网膜血管可以辨认,但很模糊; 4 级,重度混浊,后极部结构不能看到。

组织病理学检查 A~E 组玻璃体腔接种烟曲霉后第 8 周,各组随机数字表法选取 2 只兔,过量麻醉致死,摘除实验眼,浸入 10% 甲醛溶液固定 24 h 后取材,梯度乙醇脱水,60 °C 二甲苯透明处理 30 min,浸蜡过夜,石蜡包埋。切片后苏木素-伊红 (HE) 染色,观察烟曲霉对眼内组织结构的影响。

统计学方法 应用 SPSS11.5 统计软件进行数据统计分析,其中呈正态分布的数据采用 One-way ANOVA 检验,呈非正态分布的数据采用 Mann-Whitney 检验,以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

结果

1 微球的理化性质

制备所得的微球呈类白色粉末状,流动性良好,光学显微镜下均光滑圆整,呈良好的分散状态,粒径约在 10~40 μm,通针性良好 (图 1)。微球的实际载药量为 29.94%,包封率为 73.5%,CLSM 扫描结果表明伏立康唑在微球中均匀分布。

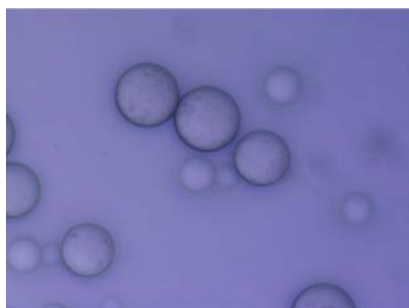


Figure 1 Optical micrograph of voriconazole microspheres (VCZ-MS). ($\times 400$)

2 微球的体外释放

微球体外释药特征见图 2, 1 d 内的释放量约 20.5%, 具有一定突释效应, 这有利于微球注入玻璃体后, 快速释放出药物且达到烟曲霉菌的 MIC, 起到快速的抑制甚至直接杀灭病原菌的作用, 有利于真菌性眼内炎的有效控制和治疗。由曲线可知该微球具有显著的缓释特性, 28 d 的累积释放达 93.61%。微球的体外释放曲线可用一级方程描述, 释放百分数 (Q) 与时间 (t) 的关系为 $\ln(100-Q) = -0.093t + 4.283$ ($r=0.987$)。在体外释放条件下, 不同时间点用显微镜观察微球的形态变化如下: 微球开始数天可保持完整球形, 7 d 后边缘呈现锯齿状, 随时间延长, 微球不断溶胀, 形态越来越不规则, 2 周后出现较明显的溶蚀, 粒径明显增大, 微球与界面的边缘越来越模糊, 28 d 后成为一团胶状物。

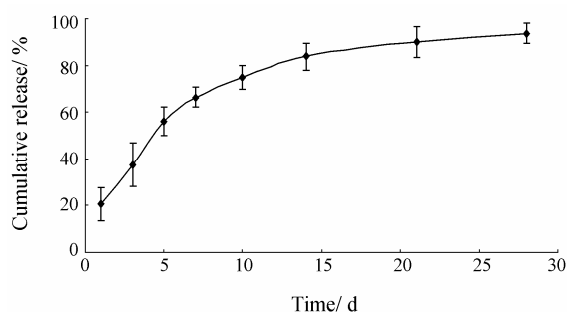


Figure 2 *In vitro* drug release profile of voriconazole from microspheres ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

3 伏立康唑与 PLGA 的相互作用及伏立康唑在微球中的分散状态

通过分析 PLGA、伏立康唑、PLGA 与伏立康唑的物理混合物、空白微球和 VCZ-MS 的 DSC 图谱可知, PLGA 和伏立康唑的吸热峰分别在 $52.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $133\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处, 二者的物理混合物在对应的熔点处也有吸热峰。与伏立康唑和二者物理混合物比较, VCZ-MS 中伏立康唑的熔点下降至 $122.8\text{ }^{\circ}\text{C}$, 熔程也明显延

长。这一变化可能与伏立康唑晶体有序状态被打乱有关。此外, 伏立康唑熔融焓为 $106.3\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$, PLGA 与伏立康唑的物理混合物为 $51.15\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$, VCZ-MS 中伏立康唑为 $33.21\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ 。微球中药物的熔融焓明显降低, 这说明伏立康唑的有序状态在微球中被进一步破坏。以上两点反映出伏立康唑在微球中的分散状态。

而 IR 图谱中, PLGA 表现在 $3\ 650\text{ cm}^{-1}$ 及 $3\ 508\text{ cm}^{-1}$ 为 -OH 伸缩振动峰、 $2\ 996\sim 2\ 948\text{ cm}^{-1}$ 为饱和 C-H 伸缩振动峰、 $1\ 747\text{ cm}^{-1}$ 为 C=O 伸缩振动峰等红外特征峰。伏立康唑表现在 $3\ 191\sim 3\ 046\text{ cm}^{-1}$ 为 C-N 伸缩振动峰、 $1\ 587\sim 1\ 451\text{ cm}^{-1}$ 为芳香族 C=C 伸缩峰、 $1\ 497\sim 1\ 451\text{ cm}^{-1}$ 为 C-F 伸缩振动峰等红外特征谱图。由 PLGA 与伏立康唑的物理混合物的红外谱图可看出, 各物质特征峰明显, 没有发生变化, 表明二者仅是物理混合。而空白微球的红外谱图与 PLGA 的红外谱图基本一致, 表明将 PLGA 制备成微球, 其化学结构并无明显变化。但 VCZ-MS 的红外谱图特征峰与空白微球基本一致, 无明显的伏立康唑特征峰检出。以上特征说明伏立康唑以非晶体状态存在于微球中。

4 术后疗效观察

A 组 (空白对照组): 接种烟曲霉菌后 3~4 d 前房和玻璃体开始出现炎症反应并逐渐加重, 第 5~6 天时, 虹膜中/重度充血水肿, 眼前房大量纤维素性渗出, 玻璃体浑浊度 3~4 级。其中 2 只眼第 7~10 天时出现角膜浑浊并迅速变为白色 (已无法观察玻璃体), 第 14 天后角膜混浊最重, 大量新生血管自边缘长入, 约 1~4 mm, 眼内不能窥入, 失去观察价值, 4 周后至观察期结束, 受累角膜水肿逐渐消退, 但仍残留少量新生血管达角膜中央, 余处轻度浑浊, 虹膜亦见新生血管, 瞳孔闭锁。其余 4 只眼角膜未受累, 但在第 7~10 天玻璃体浑浊度继续加重, 第 14 天后, 前房炎症开始消退, 晶状体后脓液开始机化, 第 4 周后前房炎症均消失, 角膜尚透明, 前房极浅, 虹膜新生血管, 晶状体不同程度混浊。至观察期结束, A 组所有眼均发生萎缩。

B 组 (注射剂组): 2 只眼在接种 5 d 内仅有轻微前房炎症反应, 1~2 级, 之后消退未复发。但在第 14 天时发生视网膜脱离, 至观察期结束, 未见明显玻璃体混浊。其他 4 只眼接种真菌后 3 d 均出现不同程度前房及玻璃体炎症反应, 5~6 d 前房炎症反应较明显, 前房闪辉 0~3 级, 房水细胞 0~2 级, 虹膜充血水肿, 晶状体前、后囊膜均可见散在白色点状沉着物, 前段玻璃体内亦可见白色细点状或细颗粒状漂浮物, 甚

至晶状体后半透明脓液层, 玻璃体浑浊度 0~3 级不等。其中 2 只眼在第 10 天及第 4 周时分别于角膜重度水肿浑浊, 至观察期结束, 与 A 组角膜受累眼炎症发展相似; 第 3 只眼至第 4 周前房炎症消退, 玻璃体无明显混浊; 而第 4 只眼虽至第 4 周前房炎症也消退, 但晶状体混浊, 眼底视不入。

C 组 (0.5 mg VCZ-MS): 6 只眼在 2 周内前房反应为 1~2 级, 之后逐渐消退。有 2 只眼在接种烟曲霉菌后 3~5 d 出现后极部积脓, 其中 1 只眼于第 7 天时局限为白色块状, 另 1 只眼积脓逐渐增多, 并于第 3 周时出现大片新生血管长入玻璃体腔。其余 4 只眼 8 周内玻璃体无明显炎症反应。所有眼注射给药后玻璃体腔内均见药物颗粒贴附于晶体后囊, 4~8 周后逐渐消失。

D 组 (1.0 mg VCZ-MS): 前房 2 周内出现 0~2 级的炎症反应, 2 周后均消退。注射给药后晶体后囊及玻璃体腔可见药物颗粒, 4~8 周后逐渐消失。观察期间玻璃体腔未见明显炎症反应。

E 组 (1.5 mg VCZ-MS): 前房与玻璃体炎症表现与 D 组类似, 但注射给药后晶体后囊及玻璃体腔可见更多的药物颗粒。

不同时间点各组前房闪辉等级变化、房水细胞等级变化以及玻璃体混浊度等级变化见图 3, 玻璃体混浊度组间比较统计分析表明, 在观察期的两周内, C、D、E 组前房炎症反应普遍较 A 组轻 ($P < 0.05$), 而两周后随着 A 组前房炎症反应的消退, A 组炎症反应虽较 C、D、E 组加重, 但没有统计学差异。而 B 组在观察期的 1 周内前房炎症反应显著较 A 组轻 ($P < 0.05$), 此后的观察时间内也虽较 A 组轻, 但没有统计学差异。而玻璃体混浊度方面, 各组在术后 3 d 内都存在一定的玻璃体混浊现象, 这时的玻璃体反应主要表现的是玻璃体切除术后的正常炎症反应。手术 3 d 后, C、D、E 组玻璃体混浊度则呈现明显的好转, 而 A 组的玻璃体混浊度因真菌感染作用而快速加重 ($P < 0.05$), B 组玻璃体混浊度也呈加重趋势 ($P < 0.05$)。

而 C、D、E 组之间在玻璃体混浊度方面则没有统计学差异 ($P > 0.05$)。

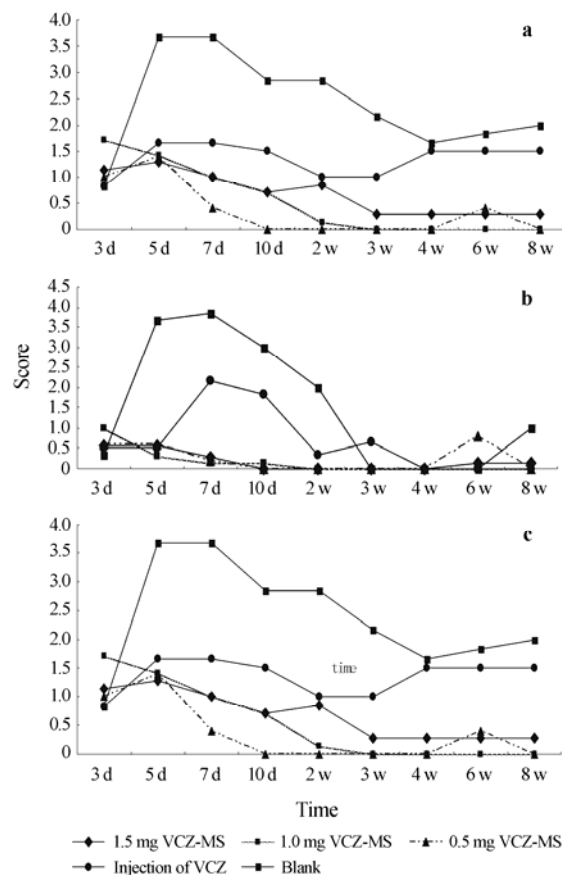


Figure 3 The grade of anterior chamber flare (a), anterior chamber cells (b), and vitreous opacity (c) of different groups in selected intervals

5 组织病理学检查

接种烟曲霉菌后 8 周, 炎症未控制眼均不同程度萎缩, 大量白色脓性固体充满前房和/或玻璃体腔, 晶状体混浊, 其周围有不同程度炎性浸润。视网膜各层结构不能辨别, 巩膜尚有部分结构可辨认, 但亦有炎症细胞浸润 (图 4a)。所有炎症控制眼玻璃体腔内洁净, 角膜结构正常 (图 4b), 视网膜各层结构清晰, 巩膜结构致密, 均无炎症细胞浸润 (图 4c)。

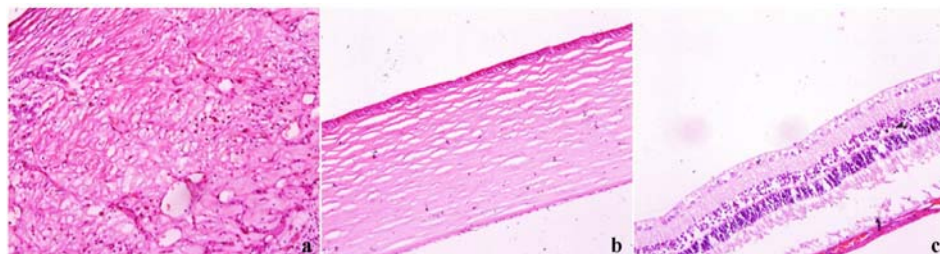


Figure 4 Histopathological examination of eyes in control group (a) and 1.0 mg VCZ-MS (b and c) ($\times 100$)

讨论

真菌性眼内炎对眼组织破坏极大。对 282 例感染性眼内炎进行调查, 结果显示真菌感染可达 30.63%, 是导致眼内感染的主要病原体^[10]。在众多导致眼内炎真菌菌株中, 烟曲霉菌对视力及眼内组织结构破坏最大, 常有黄斑部特有的视网膜脉络膜损伤, 并易累及角膜, 预后差。在发展中国家, 曲霉菌性眼内炎多为外源性因素引起。本实验中模拟外源性眼内炎感染途径, 建立烟曲霉菌性眼内炎动物模型, 评价 VCZ-MS 的疗效, 对此高致盲性眼病的治疗具有直接的指导意义。而玻璃体切除联合玻璃体腔注射药物是公认有效的治疗方法。据此, 本研究中治疗组均联合玻璃体切除术, 以最大程度地模拟临床治疗。

真菌性眼内炎病程迁延, 易复发。为获得确切疗效, 需要反复玻璃体腔注射药物以维持药效。此外, 伏立康唑在玻璃体中的半衰期仅为 2.5 h^[4]。因此, 普通伏立康唑注射剂用于治疗真菌性眼内炎时必须反复玻璃体腔注射给药, 而这可导致玻璃体出血、增生机化、视网膜脱离等严重并发症。而本研究中的 VCZ-MS 单次玻璃体内注射后, 可有效维持药物治疗浓度达 3 周, 减少给药次数, 减少了玻璃体腔注射的严重并发症。

本研究中, 采用浓度为 1×10^3 CFU·mL⁻¹ 的烟曲霉菌孢子悬液建立眼内炎模型。A 组接种烟曲霉菌后, 眼内炎发生率为 100%, 且无自愈倾向, 说明玻璃体切除术不能干扰炎症进展。接种真菌孢子 48 h 内, 无明显的前房及眼底炎症表现, 但可观察到部分兔眼畏光、流泪, 与临床眼内炎前期患者表现相似。真菌性眼内炎病情轻重、演变及结局取决于致病菌株的毒力、是否能够早期诊断以及采取及时有效的治疗措施。对于该模型, 48 h 内是进行有效治疗的最佳时机。48 h 后, 炎症发展迅速, 尤其 72 h 后, 很快出现结膜与虹膜高度充血, 前房渗出、积脓或积血, 玻璃体腔大量积脓, 随即晶状体混浊, 角膜受累, 水肿混浊并逐渐新生血管化, 即全眼球炎。以上均证实, 烟曲霉菌对眼部组织具有极强的破坏性。

Gao 等^[11]研究表明小于 100 μg 的伏立康唑对人眼内注射是安全的, 并参考文献^[11-13], B 组采用玻璃体切除联合 100 μg·0.1 mL⁻¹ 伏立康唑玻璃体腔注射, 隔日 1 次, 共 3 次。B 组早期前房反应及玻璃体混浊度较 A 组轻, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 为炎症初期, 说明玻璃体腔内的伏立康唑药物浓度在一定程度上能够抑制烟曲霉菌的生长与繁殖。第 7 天后,

B 组前房炎症及玻璃体混浊度与 A 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 此时已停止玻璃体腔内注射药物。伏立康唑在兔玻璃体腔的药物半衰期为 2.5 h, 推测在无玻璃体眼中, 药物半衰期可能更短, 因此第 7 天后兔玻璃体腔内药物浓度不足以抑制烟曲霉菌的生长。目前该治疗方法在临床上应用逐渐增多, 并有较多治疗成功的病例^[4, 13], 但对于病情延误或者炎症发展过快的病例, 其疗效不甚确切, 预后差^[14]。B 组炎症控制较好的 2 只眼, 在第 14 天后均发生视网膜脱离, 可能是视网膜炎性渗出导致的渗出性视网膜脱离, 也可能是多次行玻璃体腔穿刺术导致的孔源性视网膜脱离, 还可能是以上两种因素共同作用的结果。因此, 多次玻璃体腔穿刺注射药物的利弊还有待进一步探讨。

C、D 和 E 组早期前房炎症程度及晚期玻璃体混浊度与 A 组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。三组之间前房炎症程度和玻璃体混浊度在评分上无显著性差异。但 C 组有 2 只眼在接种烟曲霉菌后 3~5 d 出现后极部积脓, 其中 1 只眼于第 7 天时局限为白色块状, 观察结束时呈后极部孤立机化团状, 其周围视神经及视网膜多可分辨, 脓块后方可见视网膜新生血管。另 1 只眼积脓逐渐增多但进展较 A、B 组缓慢, 并于第 3 周时出现大片新生血管长入玻璃体腔, 6 周后出现视网膜脱离。D 和 E 组治疗效果较好, 各眼炎症反应轻, 两组所有眼在第 14 天后角膜透明, 房水清晰, 晶状体透明, 玻璃体无混浊, 无视网膜充血、水肿、裂孔或脱离发生, 病理组织学检查视网膜各层机构清晰, 无坏死灶, 至观察 8 周结束均未见眼内炎复发倾向, 说明 VCZ-MS 具有良好的组织相容性且治疗眼内炎的效果。C、D 和 E 组均可见微球颗粒黏附于晶体后囊, 剂量越高, 黏附量越多。随着微球的降解, 晶体后囊黏附的颗粒也慢慢降解最后消失。观察期结束后, 未见晶体后囊发生病变, 但 VCZ-MS 对晶体后囊的影响还有待进一步的研究。综合考虑 VCZ-MS 治疗眼内炎疗效和微球颗粒黏附于晶体后囊可能带来视觉质量的影响, 含伏立康唑 1.0 mg 的 VCZ-MS 是较为合适的玻璃体腔注射剂量。若病情需要, 可将注射剂量适当增加, 如增加至 1.5 mg。

综上所述, 本研究显示玻璃体腔注射 VCZ-MS 明显优于传统玻璃体腔注射用药, VCZ-MS 玻璃体腔注射后能够有效控制烟曲霉菌性眼内炎的进展。实验观察期结束时, VCZ-MS 在玻璃体腔内完全降解, 未见明显的毒副作用, 有望成为安全有效的新型抗真菌药物。

References

- [1] Rao NA, Hidayat AA. Endogenous mycotic endophthalmitis: variations in clinical and histopathologic changes in candidiasis compared with aspergillosis [J]. *Am J Ophthalmol*, 2001, 132: 244–251.
- [2] Callanan D, Scott IU, Murray TG, et al. Early onset endophthalmitis caused by *Aspergillus* species following cataract surgery [J]. *Am J Ophthalmol*, 2006, 142: 509–511.
- [3] Marangon FB, Miller D, Giaconi JA, et al. *In vitro* investigation of voriconazole susceptibility for keratitis and endophthalmitis fungal pathogens [J]. *Am J Ophthalmol*, 2004, 137: 820–825.
- [4] Shen YC, Wang MY, Wang CY, et al. Clearance of intravitreal voriconazole [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48: 2238–2241.
- [5] Herrero-Vanrell R, Refojo MF. Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 52: 5–16.
- [6] Wu W, Yang X, Lu B. Intravitreally injectable poly (*D, L*-lactide) microspheres containing dexamethasone acetate for sustained release [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2001, 36: 766–770.
- [7] Yang X, Dong XG, Liu AM, et al. A pharmacodynamics study of an intravitreal amphotericin B drug delivery system for the treatment of experimental *Aspergillus fumigatus* endophthalmitis [J]. *Chin J Ophthal (中华眼科杂志)*, 2007, 43: 546–553.
- [8] Chen N, Yang YT, Dong XG, et al. Anti-infectious effect of sustained intravitreal amphotericin B drug delivery system on experimental rabbit fungal endophthalmitis of *Candida albicans* [J]. *Chin J Ophthal (中华眼科杂志)*, 2006, 42: 420–425.
- [9] Yang PZ, Li SZ. *Uveitis (葡萄膜炎)* [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 1998: 431–432.
- [10] Chen R, Xie LX, Sun SY, et al. Clinical analysis of 282 patients with infectious endophthalmitis [J]. *Chin J Ocular Fundus Dis (中华眼底病杂志)*, 2008, 24: 404–405.
- [11] Gao H, Pennesi ME, Shah K, et al. Intravitreal voriconazole: an electroretinographic and histopathologic study [J]. *Arch Ophthalmol*, 2004, 122: 1687–1692.
- [12] Zarkovic A, Guest S. *Scedosporium apiospermum* traumatic endophthalmitis successfully treated with voriconazole [J]. *Int Ophthalmol*, 2007, 27: 391–394.
- [13] Sen P, Gopal L, Sen PR. Intravitreal voriconazole for drug-resistant fungal endophthalmitis: case series [J]. *Retina*, 2006, 26: 935–939.
- [14] Tu EY, McCartney DL, Beatty RF, et al. Successful treatment of resistant ocular fusariosis with posaconazole (SCH-56592) [J]. *Am J Ophthalmol*, 2007, 143: 222–227.