

Sıçanlarda Subkonjonktival ve İntravitreal Uygulanan 5-Flurourasil ve Mitomisin-C'nin Oküler Toksitesi

Mustafa Kemal Arıcı (*), Dilek Sema Arıcı (**), Haydar Erdoğan (*), Hatice Özer (***), İlker Toker (****)

ÖZET

Amaç: Filtran cerrahide postoperatif başarıyı arttırmak için kullanılan 5-flurourasil (5-FU) ve mitomisin C (MMC)'nin subkonjonktival ve intravitreal uygulaması ile göziçi dokulara toksik etkisinin olup olmadığı deneysel olarak araştırıldı.

Metod: Çalışmaya her grupta 8 adet olmak üzere 3 grupta toplam 24 sıçan alındı. 1. gruba sağ gözlere (8 göz) intravitreal MMC (0.4mg/ml, 0.05ml), sol gözlere (8 göz) subkonjonktival MMC (0.4mg/ml, 0.05ml), 2. gruba sağ gözlere (8 göz) intravitreal 5-FU (50mg/ml, 0.05ml), sol gözlere subkonjonktival 5-FU (50mg/ml, 0.05ml) ve 3. gruba kontrol amacıyla sağ gözlere (8 göz) intravitreal (0.05ml), sol gözlere subkonjonktival dengeli tuz solüsyonu (0.05ml) injekte edildi. 4 hafta sonra gözler enükle edilip histopatolojik değişiklikler ışık mikroskopisi ile değerlendirildi. Ayrıca mikrometrik yöntemle santral kornea kalınlığı ölçüldü.

Bulgular: Histopatolojik incelemede subkonjonktival MMC, intravitreal ve subkonjonktival 5-FU verilen gruplar ile kontrol grubunda kornea, iris, siliyer cisim ve retinayı içine alan tüm göziçi yapılar normaldi. İntravitreal MMC verilen 8 gözün 6'sında (%75) göziçi dokularda patolojik değişiklikler saptandı. 4 gözde (%50) kornea endotelinde vakuolizasyon, 6 gözde (%75) ise retina pigment epiteli ile sensöriyel retina arasında kanama, retinal tabakalarda disorganizasyon, koroid ve siliyer cisimde polimorfonükleer lökosit ve lenfositten oluşan yangısal reaksiyon saptandı. Gruplar arası kornea kalınlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoku ($p>0.05$).

Sonuç: İntravitreal ve subkonjonktival 5-FU ve subkonjonktival MMC'nin göziçi yapılarla toksik etkisinin olmamasına rağmen intravitreal MMC'nin verilen doza bağımlı olarak toksik etkisinin olabileceği sonucuna varıldı. Bu nedenle bu ajanın klinik kullanımında daha dikkatli olunması gerektiği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: 5-florourasil, mitomisin-C, histopatoloji, filtrasyon cerrahisi.

SUMMARY

Ocular Toxicity of Subconjunctival and Intravitreal Injection of 5-Fluorouracil and Mitomycin-C in a Rats

Purpose: An experimental study was performed to determine the intraocular toxic effects of subconjunctival and intravitreal injected MMC and 5FU, which are used to increase the success rate of filtering surgery.

(*) Yrd. Doç. Dr., Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları AD, Sivas

(**) Doç. Dr., Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD, Sivas

(***) Arş. Gör. Dr., Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD, Sivas

(****) Uz. Dr., Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları AD, Sivas

Mecmuaya Geliş Tarihi: 28.01.2001
Düzeltilmeden Geliş Tarihi: 31.05.2001
Kabul Tarihi: 11.06.2001

Methods: Three groups, totally 24 rats and in each group 8 rats were included the study. For first group intravitreal MMC (0.4mg/ml, 0.05ml) was injected to right eyes (8 eyes) and subconjunctival MMC (0.4mg/ml, 0.05ml) to left eyes (8 eyes). For 2nd group, intravitreal 5FU (2.5mg/ml, 0.05ml) was injected to right eyes (8 eyes) and subconjunctival 5FU (2.5mg/ml, 0.05ml) to left eyes (8 eyes). For 3rd group as control, intravitreal BSS (0.05ml) was injected to right eyes (8 eyes) and subconjunctival (0.05ml) to left eyes (8 eyes). After 4 weeks eyes were enucleated and histopathologic examination by light microscopy was performed. Also the central thickness of the cornea was measured by micrometer.

Results: Histopathologic examination revealed normal intraocular structures including cornea, iris, lens, ciliary body and retina in subconjunctival MMC, subconjunctival and intravitreal 5-FU injected group and control group. 6 eyes of 8 intravitreal injected MMC had pathologic changes. 4 of 8 eyes revealed hemorrhage between retinal pigment epithelium (RPE) and sensory retina, disorganization in retinal layers, inflammatory reaction with leukocyte and lymphocyte infiltration in choroidea and ciliary body. Statistically there was not significant difference in corneal thickness between 3 groups.

Conclusion: It is concluded that although intravitreal and subconjunctival 5-FU and subconjunctival MMC are not toxic to intraocular structures, intravitreal MMC may have toxic effects related with dosage. It is thought that while using MMC clinically we must be more careful.

Key Words: 5-fluorouracil, mitomycin-C, histopathology, filtering surgery.

GİRİŞ

Trabekülektomi, maksimum tolere edilebilir medikal tedaviye karşın göziçi basıncı (GİB)nda azalmaya ihtiyacı olan veya glokomatöz hasarın devam ettiği hastalarda, GİB kontrolünü sağlamak için başvurulan filtran cerrahi yöntemidir. Fibroblast proliferasyonu, kollajen sentezi ve glikozaminoglikan depolanması sonucu ortaya çıkan subkonjonktival fibrozis filtran cerrahi başarısızlığının en önemli nedenidir. Bu durum özellikle filtran cerrahi başarısızlık riski yüksek olan genç hastalar, daha önce cerrahi geçirmiş hastalar ve üveitik glokom gibi sekonder glokomlu hastalarda önemlidir (1,2).

Yara yeri iyileşme cevabını değiştirerek filtran cerrahinin başarısını arttırmak için günümüzde 5-fluorourasil ve mitomisin C gibi bazı antimetabolit ajanlar sıkça kullanılmaktadır (3-8). Her tedavi yönteminde olduğu gibi bu ilaçlara bağlı çeşitli komplikasyonlar görülmektedir. Bu komplikasyonlar kornea epitel defekti, geç dönemde blebde sızdırma, infeksiyon, hipotoniteye bağlı makulopati, retina pigment epiteli (RPE) değişikliği gibi yan etkilerdir (9-13). Bu deneysel çalışma 5-FU ve MMC'nin subkonjonktival ve intravitreal uygulaması ile göziçi dokularında ortaya çıkabilecek histopatolojik değişiklikleri incelemek amacıyla yapıldı.

MATERYAL ve METOD

Çalışmada ağırlığı 220-250 gr arasında değişen 24 adet, erkek Wistar albino sıçan kullanıldı.

Her grupta 8'er adet olmak üzere sıçanlar 3 gruba ayrıldı. 1. grup MMC, 2. grup 5-FU ve 3. grup ise kontrol grubu olarak alındı. Her sıçanın iki gözü kullanıldı. Sağ gözler intravitreal sol göz ise subkonjonktival injeksiyon için kullanıldı. 1. gruba sağ gözlere (8 göz) intravitreal MMC, sol gözlere (8 göz) subkonjonktival MMC, 2. gruba sağ gözlere (8 göz) intravitreal 5-FU, sol gözlere subkonjonktival 5-FU ve 3. gruba kontrol amacıyla sağ gözlere (8 göz) intravitreal, sol gözlere subkonjonktival dengeli tuz solüsyonu injekte edildi.

Test ilacı olarak MMC 0.4mg/ml konsantrasyonda, intravitreal ve subkonjonktival 0.05ml (20µg), 5-FU ise 50mg/ml konsantrasyonda intravitreal ve subkonjonktival 0.05ml (2.5mg) verildi. Kontrol amacıyla ise intravitreal ve subkonjonktival 0.05ml dengeli tuz solüsyonu verildi.

Sıçanlara Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi hayvan laboratuvarında intramüsküler (İM) 20mg/kg ketamin hydrochloride (Ketalar®) ve 3mg/kg Xylazin hydrochloride (Rompun®) ile anestezi uygulandı. İnjesiyonlar steril olamayan, fakat temiz bir ortamda yapıldı. İntravitreal injeksiyon 28 G insülin enjektörü ile saat 12 hizasından, limbustan 1.5-2 mm geriden yaklaşık 2mm kadar göz içine girilip yapıldı. Subkonjonktival injeksiyon ise saat 12 hizasından limbusun 1-1.5 mm geriden yapıldı. İnjesiyondan sonra tüm gözlere direkt ışıkla muayene edildi ve tüm deneklerde fundus reflesinin alındığı görüldü.

Sıçanlar injeksiyondan 4 hafta sonra yüksek doz İM sodyum tiopental (Pentothal® (80 mg/kg) ile sakrifiye

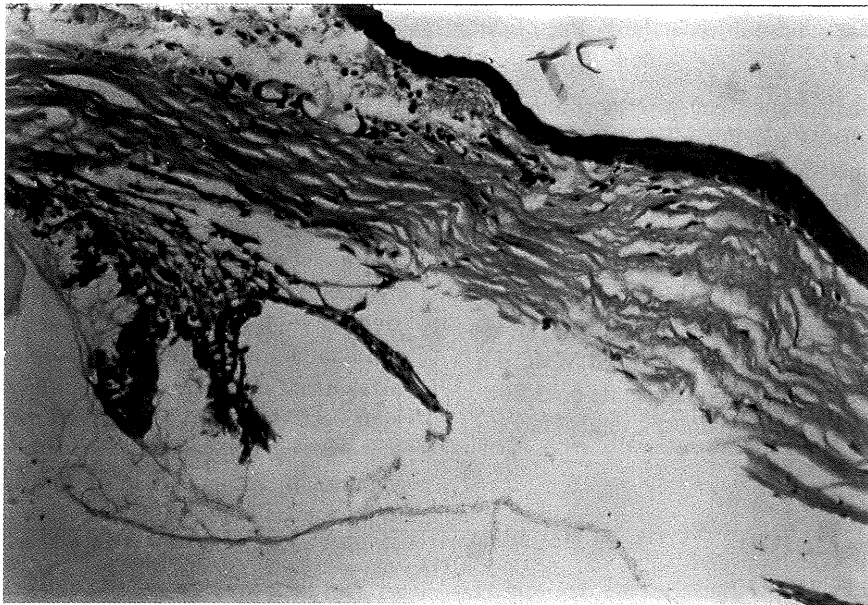
edilerek gözleri enükle edildi. Enükle gözler bir gün süre ile % 10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildikten sonra ikiye bölünüp parafin bloklara gömüldü. Doku bloklarından 3 mikron kalınlığında kesitler hazırlanıp hemotoksilen eosin ile boyanıp 4x, 10x, 20x ve 100x büyütme ile ışık mikroskobunda histopatolojik inceleme yapıldı. Ayrıca mikrometre ile santral kornea kalınlığı ölçüldü. İki grubun kornea kalınlıkları aritmetik ortalama \pm SD şeklinde verilir, istatistiksel değerlendirilmesi Mann-Witney U testi kullanıldı.

BULGULAR

Yapılan histopatolojik incelemede subkonjonktival MMC verilen gözlerde, intravitreal ve subkonjonktival 5-FU verilen 2. grup ile kontrol grubunda kornea, ön kamara açısı, iris, siliyer cisim ve retinayı içine alan tüm göziçi yapılarında toksiteyi düşündürecek patolojik bir bulgu saptanmadı ve bu deneklerin tümünde göziçi dokular normaldi (Şekil 1,2). Ancak intravitreal MMC verilen 8 gözün 6'sında (%75) göziçi dokularda patolojik değişiklikler saptandı. 4 gözde (%50) kornea endotelinde vakuolizasyon (Şekil 3), 6 gözde (%75) retina pigment epiteli ile sensöriyel retina arasında kanama (hemorajik retina dekolmanı), retinal tabakalarda disorganizasyon, koroid ve siliyer cisimde polimorfonükleer lökosit ve lenfositler oluşan yangısal reaksiyon (Şekil 4, 5) saptandı.

Ortalama kornea kalınlığı intravitreal MMC verilen

Şekil 1. İntravitreal 5-florourasil uygulanan gözde normal yapısını korumuş kornea, iris ve silyer cisim (HEx50).



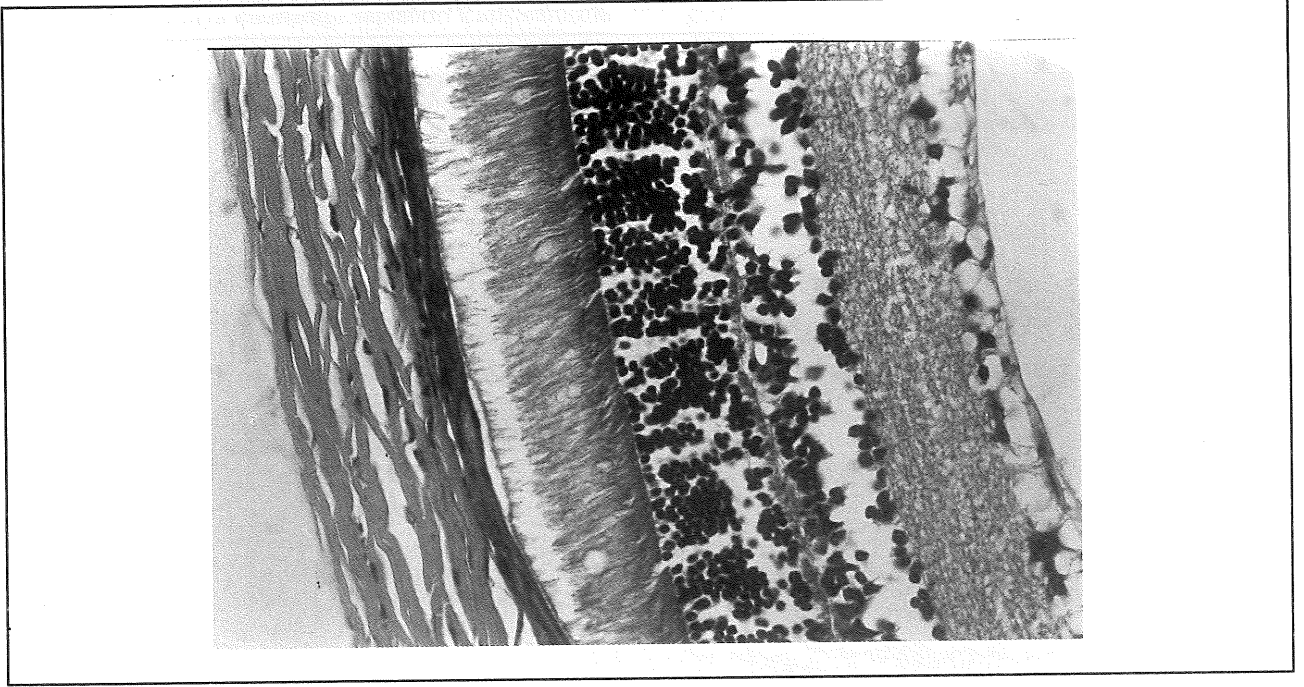
gözlerde $278.75 \pm 67.28 \mu\text{m}$ (180-400), subkonjonktival MMC verilen gözlerde $237.14 \pm 67.51 \mu\text{m}$ (140-300), intravitreal 5-FU verilen gözlerde $241.25 \pm 74.92 \mu\text{m}$ (140-320), subkonjonktival 5-FU verilen gözlerde $265.00 \pm 66.33 \mu\text{m}$ (140-320) idi. İntravitreal injeksiyon yapılan kontrol grubunda $295.00 \pm 57.32 \mu\text{m}$ (190-390), subkonjonktival injeksiyon yapılan kontrol grubunda ise $287.50 \pm 62.28 \mu\text{m}$ (170-390) idi. Çalışma grupları ile kontrol grubu ortalama kornea kalınlığı açısından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.05$).

TARTIŞMA

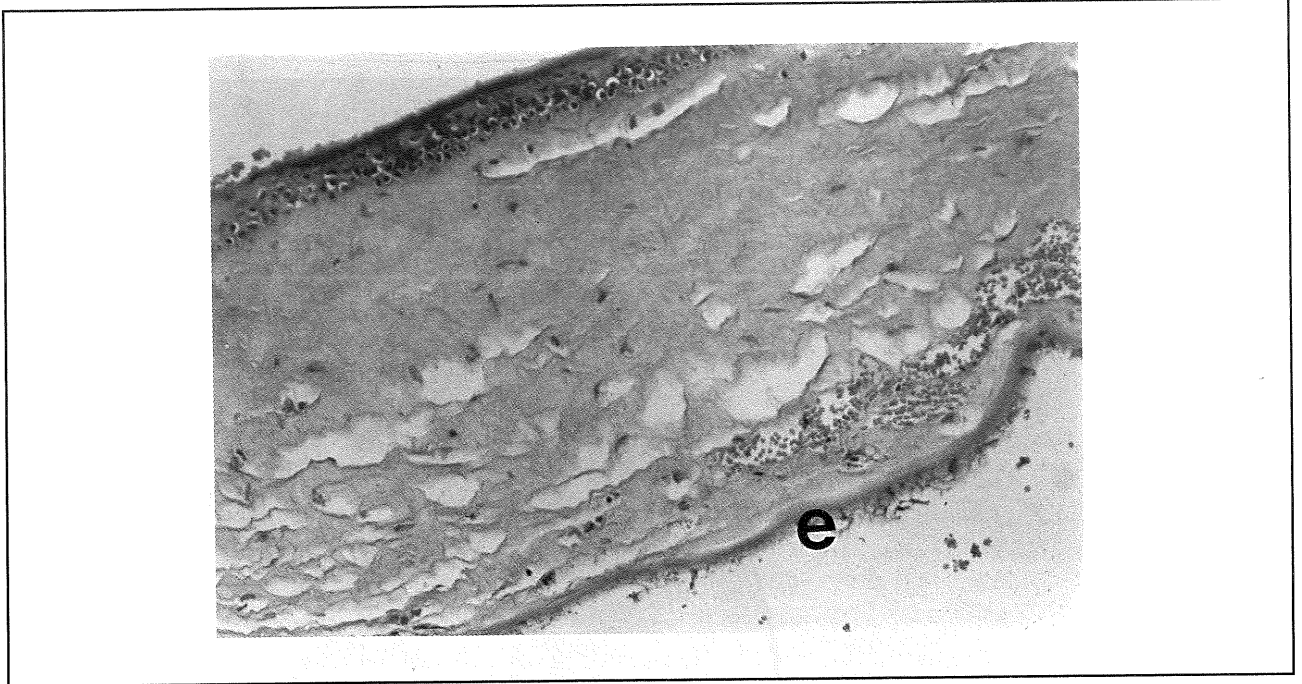
Antimetabolitler trabekülektomi blebinde skara bağlı olarak cerrahi başarısızlık riskini azaltmak için kullanılır. Bu amaçla ilk kullanılan ajan 5-FU'dur. İlk orijinal kullanımı postoperatif injeksiyon şeklinde önerilmesine karşın intraoperatif lokal kullanımının da filtrasyon başarısını arttırdığı saptanmıştır (14-15). Diğer bir antimetabolit olan MMC Streptomyces caespitosus mantarında izole edilir ve fibroblast proliferasyonunu etkili bir şekilde baskılar (5). Bu ajanların filtrasyon başarısını artırması yanında bazı istenmeyen yan etkileri olması, bu ajanların daha dikkatli kullanılması gerektiğini göstermiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda 5-FU'nun lokal kullanımına bağlı olarak kornea epitel defekti, blebde incelleme ve rüptür gibi komplikasyonlar bildirilmiştir (11,13).

Şekil 2. İntravitreal 5-florourasil uygulanan gözde normal görünümde retina (HEx50).



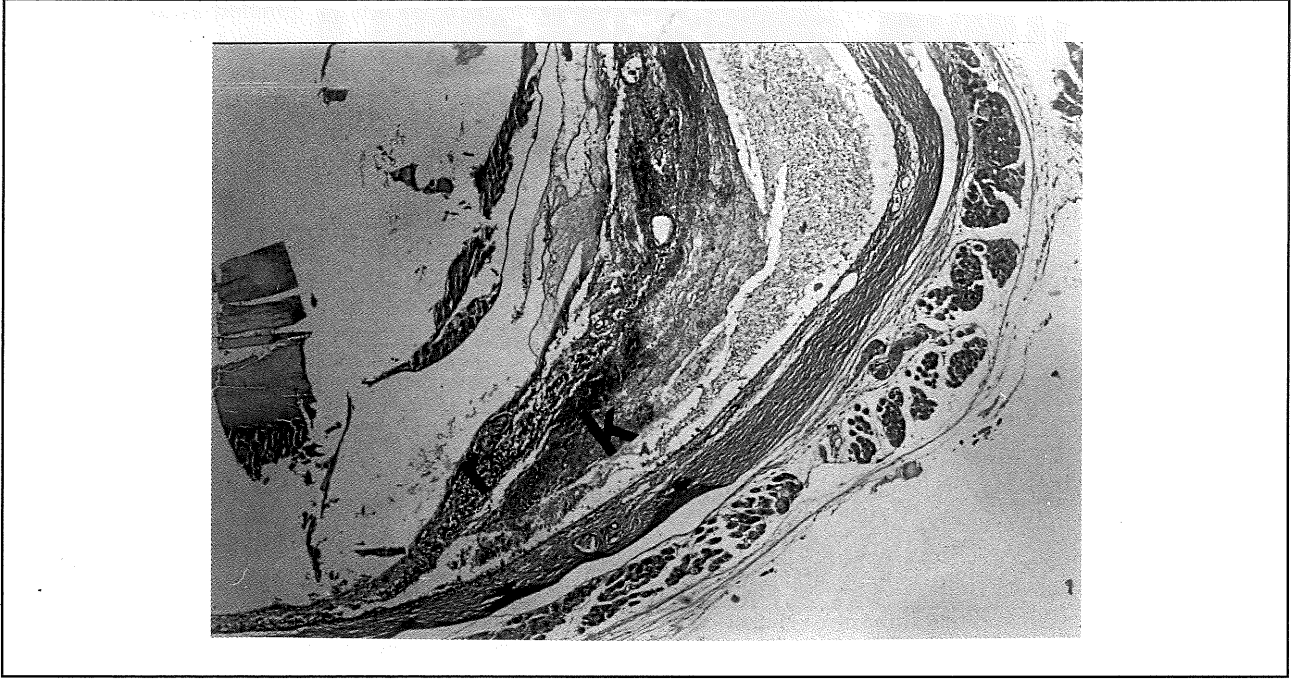
Şekil 3. İntravitreal mitomisin C uygulanan gözde, kornea endotelinde vakuololizasyon (e) (HEx50).



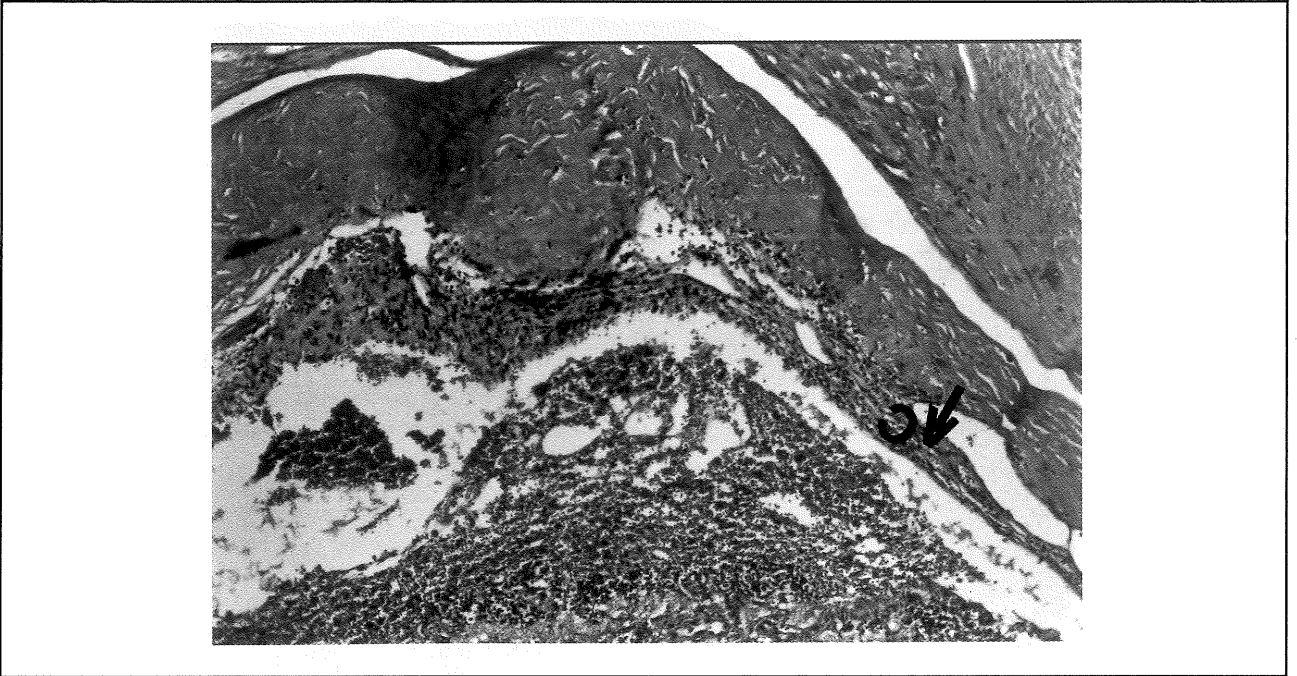
Tavşanlarda yapılan histopatolojik bir çalışmada ise 5-FU'nun 10mg/ml dozunda sadece intravitreal, ön kamaraya veya hem intravitreal hem de ön kamaraya injeksiyonu ile histopatolojik olarak toksite bulgusu saptamadıklarını bildirmişlerdir (16). Barada ve arkadaşları ise maymunlarda 750 µg 5-FU'nun intravitreal injeksiyonun

ontoksik olduğunu göstermişlerdir (17). Vernot ve arkadaşları ise tekrarlayan intravitreal 0.375 mg ve 1 mg dozunda verilen 5-FU'nun hem histopatolojik olarak hemde elektroretinografik olarak toksiteye neden olmadığı göstermişlerdir (18). Öte yandan insanlarda yapılan çalışmalarda ise 5-FU'nun travma sonrası ve vitrektomi-

Şekil 4. İntravitreal mitomisin C uygulanan gözde, retina pigment epiteli ile sensöriyel retina arasında kanama (k), retinal (r) tabakalarda diorganizasyon (Hex10).



Şekil 5. İntravitreal mitomisin C uygulanan gözde, koroidde (c, ↑) yangısal reaksiyon (Hex25).



ze gözlerde intraoküler membran proliferasyonunu önlemede yararlı olduğu ve toksik hasara neden olmadığı gösterilmiştir (19,20). Çalışmamızda da bu çalışmalarla uyumlu sonuçlar elde edildi. Hem intravitreal hem de subkonjonktival uygulanan 5-FU'nun makroskopik ve

histopatolojik olarak göziçi dokularda toksite bulgusunu destekleyen patoloji saptanmadı ve retina dahil tüm göziçi dokuları normaldi. Bu çalışmalarda incelenmeyen ve çalışmamızda ayrıca mikrometrik yöntemle santral kornea kalınlığı ölçümleri yapıldı. Deney grubu ile kont-

16. Morrow GL, Stein RM, Heathcote JG, Ikeda-Douglas JV, Feldman F: Ocular toxicity of mitomycin C and 5-fluorouracil in the rabbit. *Can J Ophthalmol* 1994; 29: 268-273.
17. Barrada A, Peyman GA, Case J, Fishman G, Thomas A, Fiscella R: Evaluation of intravitreal 5-fluorouracil, vincristine, VP 16, doxorubicin, and thiotepe in primate eyes. *Ophthalmic Surg* 1984; 15: 767-769.
18. Vernot J, Peyman GA, Gailitis R, Fiscella R, Woodhouse M, Weinberg D: Effects of selected repeated intravitreal chemotherapeutic agents. *Int Ophthalmol* 1985; 8: 193-198.
19. Avni I, Belkin M, Hercbrg A, Blumenthal M: Intravitreal 5-fluorouracil in the prevention of the post-traumatic vitreous proliferation. *Ophthalmologica* 1984; 188: 5-8.
20. Blankenship GW: Evaluation of a single intravitreal injection of 5-fluorouracil in vitrectomy cases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1989; 227: 565-568.
21. Mietz H, Addicks, Diestelhorst M, Krieglstein GK: Extraocular application of mitomycin C in the rabbit model: cytotoxic effect on the ciliary body and epithelium. *Ophthalmic Surg* 1994; 25: 240-244.
22. Heaps RS, Nordlund Jr, Gonzalez-fernandez F, Redick JA, Conway BP: Ultrastructural changes in rabbit ciliary body after extraocular mitomycin C. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 1971-1975.
23. Oruç S, Orhan D, Orhan M, İrkeç M: Tavşan modelinde ekstraoküler uygulanan mitomycin C'nin toksik etkileri. *T Klin Oftalmoloji* 2000; 9: 83-86.
24. Kawashima S, Mizota A, Adachi-Usami E, Kimura T: Effects of mitomycin C on the rat retina. *Doc Ophthalmol* 1996; 92: 229-241.
25. Ho TC, Del Prore LV, Hornbeck R: Effects of mitomycin-C on human retinal pigment epithelium in culture. *Cur Eye Res* 1997; 16: 572-576.