

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 artırmak 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 gözlerde (8 göz) intravitreal MMC (0.4mg/ml, 0.05ml), sol gözlerde (8 göz) subkonjonktival MMC (0.4mg/ml, 0.05ml), 2. gruba sağ gözlerde (8 göz) intravitreal 5-FU (50mg/ml, 0.05ml), sol gözlerde subkonjonktival 5-FU (50mg/ml, 0.05ml) ve 3. gruba kontrol amacıyla sağ gözlerde (8 göz) intravitreal (0.05ml), sol gözlerde subkonjonktival dengeli tuz solüsyonu (0.05ml) injekte edildi. 4 hafta sonra gözler enüklee 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, lens, siliyer cisim ve retinayı içine alan tüm göziçi yapılar normaldi. Intravitreal 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 yoktu ($p>0.05$).

Sonuç: Intravitreal ve subkonjonktival 5-FU ve subkonjonktival MMC'nin göziçi yapılara 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 fibrosiz filtran cerrahi başarısızlığının en önemli nedenidir. Bu durum özellikle filtran cerrahi başarısızlık riski yüksek olan genç hastalar, daha önce cerrahi geçirmiş hastalar ve üveyitik glokom gibi sekonder glokomlu hastalarda önemlidir (1,2).

Yara yeri iyileşme cevabını değiştirek filtran cerrahının başarısını artırmak için günümüzde 5-florourasil 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 dokularda ortaya çıkabilecek histopatolojik değişikleri incelemek amacıyla yapıldı.

MATERIAL 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 gözlerde (8 göz) intravitreal MMC, sol gözlerde (8 göz) subkonjonktival MMC, 2. gruba sağ gözlerde (8 göz) intravitreal 5-FU, sol gözlerde subkonjonktival 5-FU ve 3. gruba kontrol amacıyla sağ gözlerde (8 göz) intravitreal, sol gözlerde subkonjonktival dengeli tuz solüsyonu injekte edildi.

Test ilaçı olarak MMC 0.4mg/ml konsantrasyonda, intravitreal ve subkonjonktival 0.05ml (20 μ g), 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. İnjeksiyonlar steril olamayan, fakat temiz bir ortamda yapıldı. Intravitreal 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. İnjeksiyondan sonra tüm gözlere direkt ışıyla muayene edildi ve tüm deneklerde fundus reflesinin alındığı görüldü.

Sıçanlar injeksiyondan 4 hafta sonra yüksek doz IM 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 bölündü parafin bloklara gömildi. Doku bloklarından 3 mikron kalınlığında kesitler hazırlanıp hemotoksilen eosin ile boyanıp 4x, 10x, 20x ve 100x büyütme ile ışık mikroskubunda histopatolojik inceleme yapıldı. Ayrıca mikrometre ile santral kornea kalınlığı ölçüldü. İki grubun kornea kalınlıkları aritmetik ortalama \pm SD şeklinde verilip, 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 kamaра açısı, iris, lens, siliyer cisim ve retinayı içine alan tüm gözüçü yapılarında toksiteyi düşündürecek patolojik bir bulgu saptanmadı ve bu deneklerin tümünde gözüçü dokular normaldi (Şekil 1,2). Ancak intravitreal MMC verilen 8 gözün 6'sında (%75) gözüçü 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 tabakalarında disorganizasyon, koroid ve siliyer cisimde polimorfonükleer lökosit ve lenfositten oluşan yangısal reaksiyon (Şekil 4, 5). saptandi.

Ortalama kornea kalınlığı intravitreal MMC verilen

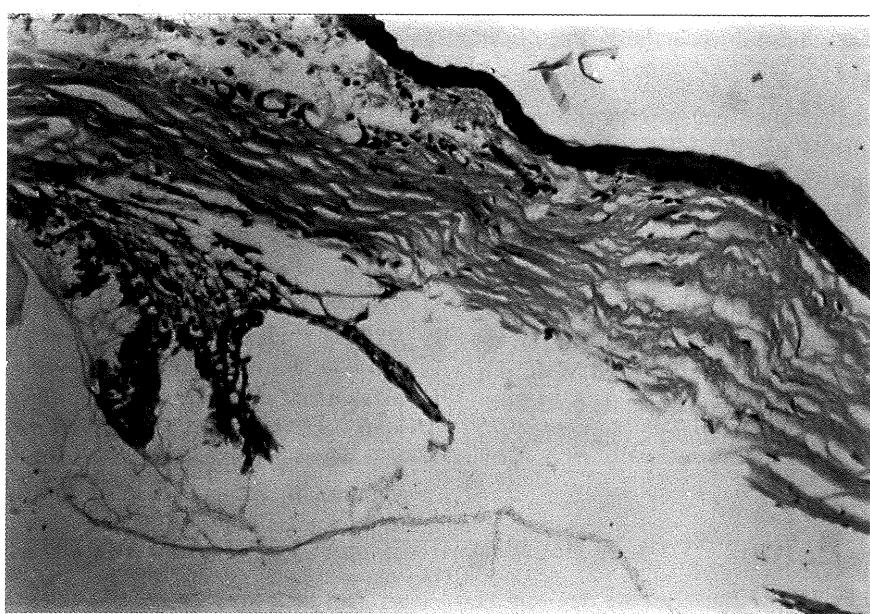
Şekil 1. Intravitreal 5-flourourasil uygulanan gözde normal yapısını korumuş kornea, iris ve silyer cisim (HEx50).

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. Intravitreal 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 ($p > 0.05$).

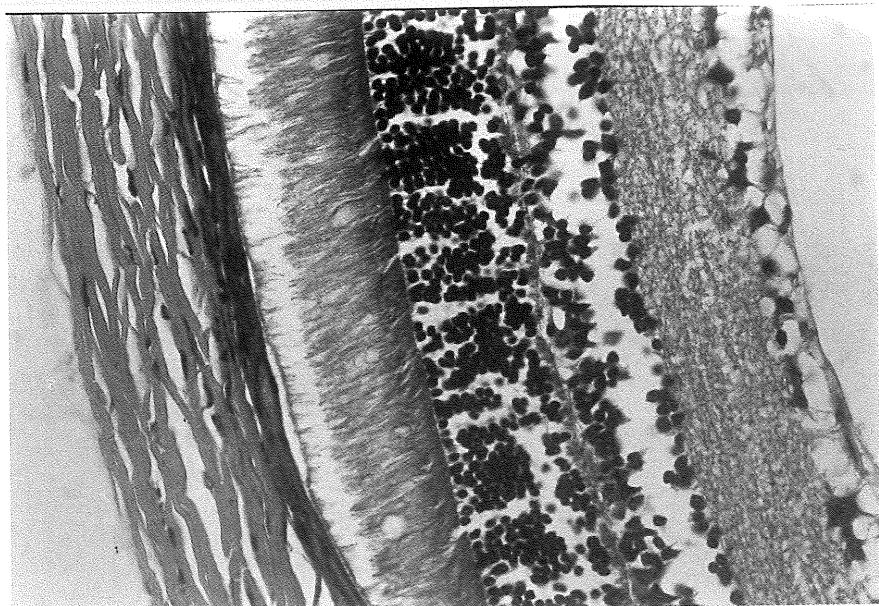
TARTIŞMA

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 artırdığı saptanmıştır (14-15). Diğer bir antimetabolit olan MMC Streptomyces caespitosis 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.

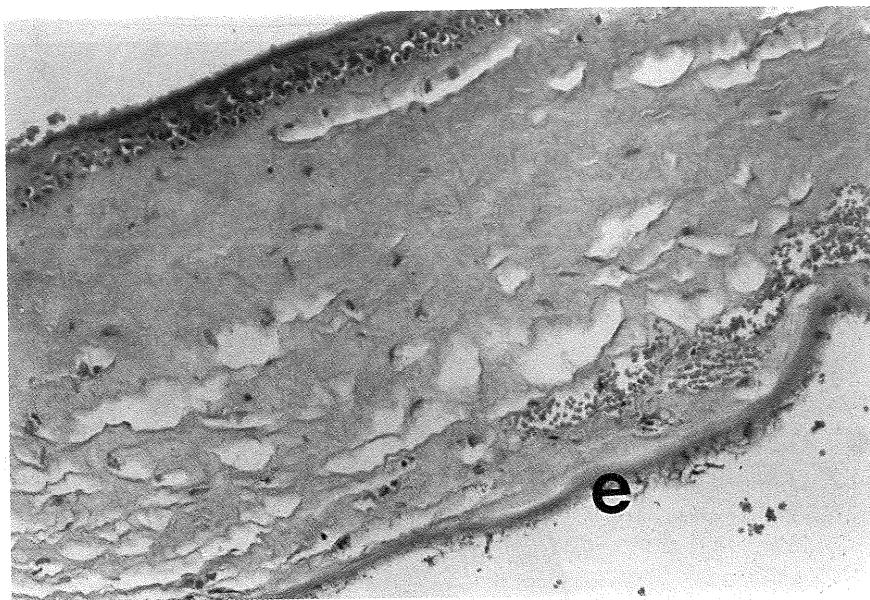
Daha önce yapılan çalışmalarda 5-FU'nun lokal kullanımına bağlı olarak kornea epitel defektı, blebde inceleme ve rüptür gibi komplikasyonlar bildirilmiştir (11,13).



Sekil 2. Intravitreal 5-florourasil uygulanan gözde normal görünümde retina (HEx50).



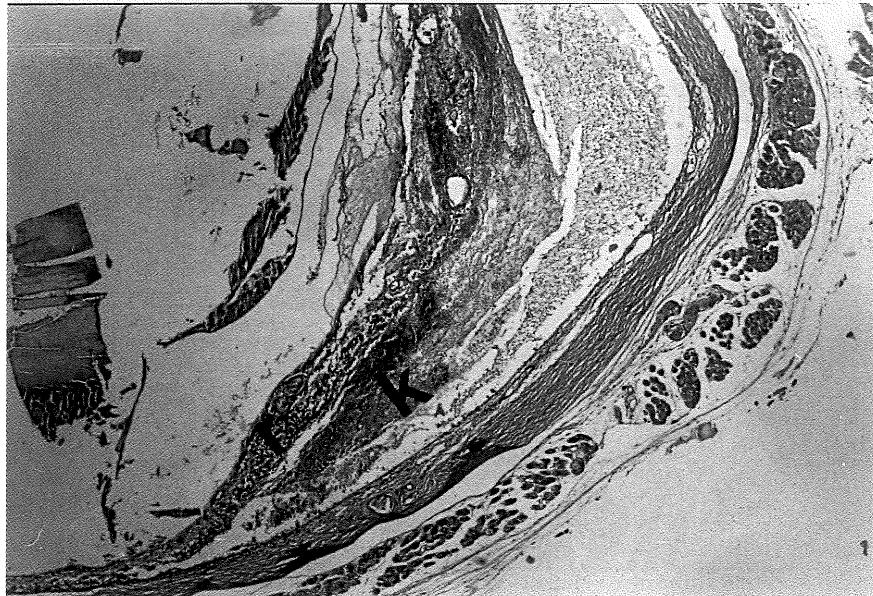
Sekil 3. Intravitreal mitomisin C uygulanan gözde, kornea endotelinde vakuololizasyon (e) (HEx50).



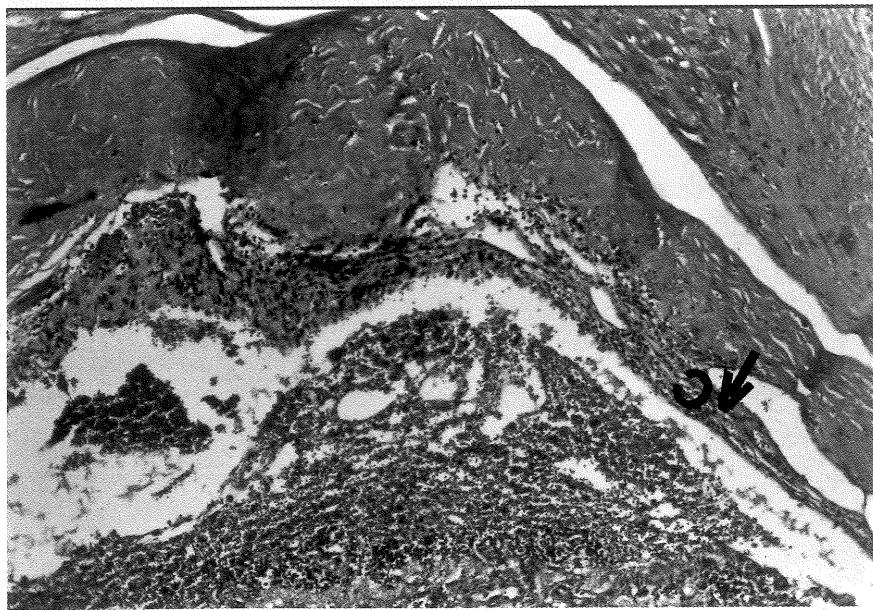
Tavşanlarda yapılan histopatolojik bir çalışmada ise 5-FU'nun 10mg/ml dozunda sadece intravitreal, ön kamaraya veya hem intravitreal hem de ön kamaraya injeksiyonu ile histopatolojik olarak toksite bulgusu saptamadıklarını bildirmişlerdir (16). Barada ve arkadaşları ise maymunlarda 750 µg 5-FU'nun intravitreal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

nontoksik 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-

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



Sekil 5. İntravitreal mitomisin C uygulanan gözde, koroidde (c, ↑) yangışal 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 gözici dokularda toksite bulgusunu destekleyen patoloji saptanmadı ve retina dahil tüm gözici dokuları normaldi. Bu çalışmalarla incelenmeyeceğimizde ayrıca mikrometrik yöntemle santral kornea kalınlığı ölçümleri yapıldı. Deney grubu ile kont-

rol grubu arasında santral kornea kalınlığı açısından anlamlı bir fark ortaya çıkmadığı saptandı. Çalışmamızda farklı olarak bu çalışmalarda kullanılan dozlara göre daha yüksek doz (2.5mg) ve lokal kullanım dozunda 5-FU uygulanmış olmasıdır.

Filtran cerrahide postoperatif başarıyı artırmak için kullanılan MMC'ye bağlı ortaya çıkan çeşitli komplikasyonlar bildirilmiştir (9,12). Deneysel çalışmalarında MMC'nin ekstraoküler ve subkonjonktival verilmesi sonrası elektromikroskopik incelemede siliyer epitelde toksiteye neden olduğu ve bu şekilde uzamiş oküler hipotoniye sebep olduğu saptanmıştır (21,22). Çalışmamızda ise subkonjonktival MMC verilen denekler toksiteyi düşündüren patolojik bir bulgu saptanmadı. Bununla birlikte çalışmamızda histopatolojik inceleme ışık mikroskopu ile yapıldı. Zira hücresel düzeydeki değişiklikleri saptamak için elektromikroskopik incelemeye ihtiyaç vardır. Öte yandan ülkemizde yapılan bir çalışmada ise tavşanlarda 0.2mg/ml ve 0.4mg/ml dozunda ekstraoküler uygulanan MMC'nin intraoküler toksik etkisi olmadığı gösterilmiştir (23). Bu sonuç bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Morrow ve arkadaşları subkonjonktival, ön kamara injeksiyonu veya her iki şekilde kombine olarak MMC verilmesi ile korneada inflamasyon ve nekroz, endotel hücre kaybı, hemorajik iris nekrozu gibi toksiteyi gösteren bulgular saptanmıştır (16). Kawashima ve arkadaşları ise sığanlarda yaptıkları bir çalışmada 0.4mg/ml dozunda intravitreal MMC injeksiyonu ile müller hücrelerinde selektif dejenerasyon, RPE'nde değişim, retina foreseptör ve dış nükleer tabakada irregüler dizilime neden olduğu gösterilmiştir (24). Ho ve arkadaşları ise MMC'nin doku kültüründe RPE inhibe ettiğini göstermiştir (25). Çalışmamızda intravitreal MMC verilen 8 gözün 6'sında (%75) gözü dokularda patolojik değişimler saptandı. 4 gözde (%50) kornea endotelinde vakuolizasyon, 6 gözde (%75) hemorajik retina dekolmanı, retinal tabakalarda disorganizasyon, koroid ve siliyer cisimde polimorfonükleer lökosit ve lenfositten oluşan yangısal reaksiyon saptandı. Bu bulgular intravitreal 0.4mg/ml (20 μ g) dozundaki MMC'nin gözü dokularda toksik olduğunu göstermiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar daha önce yapılan çalışma sonuçları ile uyumludur.

Sonuç olarak deneysel olarak subkonjonktival ve intravitreal uygulanan 5-FU'in ve subkonjonktival uygulanan MMC'nin gözü dokularda değişiklik oluşturduğu saptandı. Buna karşın intravitreal uygulanan MMC'nin gözü dokularda toksik etki oluşturabileceği tespit edildi. Bu sonuçlar az sayıda sığan üzerinde ve tek dozda uygulanan ilaç ile elde edilen verileri yansımaktadır. Bu nedenle MMC'nin klinik kullanımında oluşturma-

rabileceği toksik etkileri daha kesin konuşabilmek için geniş serili daha fazla sığan kullanarak ve farklı dozlarla ilaç uygulayarak yapılacak çalışmalarla ortaya konması gerekliliğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Skuta GL, Parrish RH II: Wound healing in glaucoma filtering surgery: Surv Ophthalmol 1987; 32: 149-170.
2. Broadway DC, Grierson I, O'Brien C, Hitching RA: Adverse effects of topical antiglaucoma medication. Arch Ophthalmol 1994; 112: 1437-1445.
3. Rockwood EJ, Parrish RH II, Heuer DK, Skuta GL, Hodapp E, Palmer PF, Gressel MG, Feuer W: Glaucoma filtering surgery with 5-fluorouracil. Ophthalmology 1987; 94: 1071-1078.
4. Lachkar Y, Leyland M, Bloom P, Migdal C: Trabeculectomy with intraoperative sponge 5-fluorouracil in Afro-Caribbeans. Br J Ophthalmol 1997; 81: 555-558.
5. Skuta GL, Beeson CC, Higginbotham EJ, Lichter PR, Musch DC, Bergstrom TJ, Klein TB, Falck FY Jr: Intaoperative mitomycin versus postoperative 5-fluorouracil in high risk glaucoma filtering surgery. Ophthalmology 1992; 99: 438-444.
6. Bulut S, Akgün Ü, Duman S: Mitomisin C ile kombine trabekülektomi sonrası filtrasyon blebinin prognostik önemi. T Klin Oftalmoloji 1999; 8: 153-156.
7. Bulut S, Akgün Ü, Duman S: Yüksek riskli glokomda mitomisin C ile kombine trabekülektomi uygulamasının uzun süreli sonuçları. T Klin Oftalmoloji 1999; 8: 77-80.
8. Ünlü K, Aksünger A, Söker S, Ertem M: Primer glokomlu olgularda serbestleştirilebilen süür ve mitomisin C uygulaması. MN Oftalmoloji 2000; 7: 38-41.
9. Zacharia PT, Deppermann SR, Schuman JS: Ocular hypotony after trabeculectomy with mitomycin C. Am J Ophthalmol 1993; 116: 314-326.
10. Kapıcıoğlu Z, Avunduk AM, Erdöl H, Çetinkaya K: Mitomycin C ile kombine trabekülektomi ameliyatlarında postoperatif hipotoni. T Klin Oftalmoloji 1998; 7: 229-232.
11. Ticho U, Ophir A: Late complication after glaucoma filtering surgery with adjunctive 5-fluorouracil. Am J Ophthalmol 1993; 115: 506-510.
12. Gupta S, Basti S: Corneoscleral, ciliary body, and vitreoretinal toxicity after excessive instillation of mitomycin C. Am J Ophthalmol 1992; 114: 503-504.
13. Knapp A, Hever DK, Stern GA, Driebe WT Jr: Serious corneal complication of glaucoma filtering surgery with postoperative 5-fluorouracil. Am J Ophthalmol 1987; 103: 183-187.
14. Parrish RK: Who should receive antimetabolites after filtering surgery? Arch Ophthalmol 1992; 110: 1049-1053.
15. Fluorouracil filtering surgery study group. Three-year follow-up of the fluorouracil filtering surgery study. Am J Ophthalmol 1993; 115: 82-92.

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 thiopeta 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, Hercberg 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, Kriegelstein 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 ektraoküler 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.