

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

156957

**DENEYSEL TAVŞAN MODELİNDE İNTRAVİTREAL
METOTREKSAT ENJEKSİYONUNUN FARMAKOKİNETİĞİ
VE OLASI RETİNA HARABİYETİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

EBRU (BENER) ÖZKAN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
YARD.DOÇ.DR. ALTAN ATAKAN ÖZCAN

Bu çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Destekleme Fonu tarafından desteklenmiştir
Proje No. TF2003LTP3

ADANA – 2004

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında bana birikimleri ile yardımcı olan Prof Dr Nazan Alparslan, Prof Dr Semra Paydaş, Prof Dr Sait Polat, Vet Dr Kenan Dağlıoğlu ve Merkez Laboratuvar ile Histoloji ABD çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Dr.Ebru (BENER) ÖZKAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ	IV
ŞEKİL LİSTESİ	V
ÖZET ve ANAHTAR SÖZCÜKLER	VII
ABSTRACT – KEY WORDS	VIII
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1 İntraoküler Tümörler	3
2.1.1 Primer İntraoküler Tümörler	3
2.1.1.1 Melanositik Tümörler	3
2.1.1.2 Damarsal Tümörler	5
2.1.1.3 Retinoblastom	5
2.1.1.4 Pigmentsiz Siliyer Epitel Tümörleri	6
2.1.1.5 Miyojenik - Nörojenik ve Osseöz Tümörler	6
2.1.2 Metastatik İntraoküler Tümörler	6
2.1.3 İntraoküler Lenfoid Tümörler	8
2.2 Kemoterapi Uygulama İlkeleri	11
2.2.1 Kemoterapinin Zamanlaması	11
2.2.2 Kombinasyon Kemoterapisi	12
2.2.3 Tümör Büyümesinin Biyolojisi ve Kemoterapiye Cevap	12
2.2.4 Hücre Döngüsü ve Terapötik Hedefler	13
2.2.5 Bölgesel Antineoplastik Ajan Salıverme Prensipleri	13
2.2.6 İntratekal Kemoterapi	14
2.3 Oftalmolojide Lokal Tedavi	15
2.3.1 İntravitreal İlaç Uygulamaları ve Farmakokinetik	15
2.3.2 Metotreksat (amephopterin, MTX)	17
MATERYAL METOD	19
3.1 İntravitreal Metotreksat enjeksiyonunun Farmakokinetiği	19

3.2 İntravitreal Metotreksat Enjeksiyonunu Takiben Erken Dönemde ve Tekrarlayan Enjeksiyonlardan Sonra Uzun Dönemde Retinada Oluşabilecek Değişikliklerin Tesbiti	21
BULGULAR	24
4.1 İntravitreal Metotreksat Enjeksiyonunun Farmakokinetiği	24
4.2 İntravitreal Metotreksat Enjeksiyonunu Takiben Erken Dönemde ve Tekrarlayan Enjeksiyonlardan Sonra Uzun Dönemde Retinada Oluşabilecek Değişiklikler	27
4.2.1 İntakt Tavşan Retinası	27
4.2.2 Kontrol Grubundaki Tavşan Retinası	33
4.2.3 İntravitreal Metotreksat Enjeksiyonunu Takiben Birinci Günde Tavşan Retinası	37
4.2.4 İntravitreal Metotreksat Enjeksiyonunu Takiben İkinci Günde Tavşan Retinası	42
4.2.5 İntravitreal Metotreksat Enjeksiyonunu Takiben Üçüncü Günde Tavşan Retinası	45
4.2.6 Tekrarlayan Metotreksat Enjeksiyonlarından 30 Gün Sonra Tavşan Retinası	49
TARTIŞMA	54
SONUÇLAR	63
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	69

TABLO LİSTESİ

Tablo No

Sayfa No

Tablo 1 Saatlere göre vitreusda belirlenen metotreksat konsantrasyonları
(μM)

25



ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Saatlere göre vitreusda belirlenen metotreksat konsantrasyonları.	26
Şekil 2. Saatlere göre vitreusda metotreksat düzeylerini belirten eğri ile üssel eşleştirme ile bulunan formülün logaritmik eğrisi.	26
Şekil 3. İntakt tavşan retinasının ışık mikroskopik görünümü.	27
Şekil 4. İntakt tavşan ratinasının elektron mikroskopik görünümü.	29
Şekil 5. intakt tavşan retinasının elektron mikroskopik görünümü.	30
Şekil 6. İntakt tavşan retinasında iç nülear tabakada yer alan hücreler.	31
Şekil 7. İntakt tavşan retinasında sinir lifi tabakası ve iç limitan membran.	32
Şekil 8. Kontrol grubundaki tavşan retinasının ışık mikroskopik incelemede normal izlenen kesiti.	33
Şekil 9. Kontrol grubundaki tavşan retinasının ışık mikroskopik incelemede iç nüklear, gangliyonik ve sinir lifi tabakalarında ödem görülen kesiti .	33
Şekil 10.Kontrol grubundaki tavşan retinasının elektron mikroskopik incelemesi .	34
Şekil 11.Kontrol grubuna ait retinada dış nüklear tabaka.	35
Şekil 12.Kontrol grubunun elektron mikroskopik incelemesinde sinir lifi tabakası	36
Şekil 13.İntravitreal metotreksat enjeksiyonunu takiben 1. günde ışık mikroskopik inceleme.	37
Şekil 14.Metotreksat enjeksiyonunun birinci gününde tavşan retinasının elektron mikroskopik incelemesi.	38
Şekil 15.Metotreksat enjeksiyonunu takiben birinci günde incelenen tavşan retinasının ultrastrüktürel incelemesi.	39
Şekil 16.Metotreksat enjeksiyonunun birinci gününde ultrastrüktürel inceleme.	40
Şekil 17. Metotreksat enjeksiyonunun birinci gününde elektron mikroskobi ile inceleme.	41

Şekil 18. Metotreksat enjeksiyonunu takiben ikinci günde tavşan retinasının elektron mikroskopik incelemesi.	43
Şekil 19. Metotreksat enjeksiyonunun ikinci gününde iç nükleer tabaka.	44
Şekil 20. İntravitreal metotreksat enjeksiyonunu takiben üçüncü günde retinada ışık mikroskobu ile gözlenen hücreler arası aralıkta genişleme.	45
Şekil 21. Metotreksat enjeksiyonunu takiben üçüncü günde tavşan retinasının ultrastrüktürel incelemesi.	46
Şekil 22. Metotreksat enjeksiyonunun 3. gününde tavşan retinasında dış nükleer tabaka, dış limitan membran ve fotoreseptör hücreler.	47
Şekil 23. Metotreksat enjeksiyonunun 3. gününde; iç nükleer tabaka.	48
Şekil 24. Dört kez intravitreal metotreksat enjeksiyonu yapılarak 30 gün sonra ışık mikroskop ile incelenen tavşan retinası.	49
Şekil 25. Tekrarlayan metotreksat enjeksiyonlarından sonra uzun dönem takiplerde tavşan retinasının elektron mikroskopik incelemesi.	50
Şekil 26. Uzun dönem etkilerin incelendiği tavşan retinası.	51
Şekil 27. Uzun dönem takiplerde incelenen tavşan retinası.	52
Şekil 28. Metotreksat enjeksiyonlarının kümülatif uzun dönem etkilerinin elektron mikroskopik incelemesi.	53

ÖZET

Deneyisel Tavşan Modelinde İntravitreal Metotreksat Enjeksiyonunun Farmakokinetiğinin ve Olası Retina Toksisitesinin Belirlenmesi

İntravitreal metotreksat enjeksiyonunun farmakokinetiği ile erken ve uzun dönemde retinada oluşturabileceği histopatolojik değişikliklerin araştırılması planlandı.

Çalışmanın birinci bölümünde; 25 beyaz Yeni Zelanda tavşanının 21'ine intravitreal 800 µg/0.1 ml metotreksat enjeksiyonu yapıldı. Enjeksiyon sonrası 30 dakika ile 72 saat arasında, farklı yedi zaman diliminde vitreusdaki ilaç konsantrasyonları floresan polarizasyon immünassay ile belirlendi. İkinci bölümde ise intravitreal metotreksatın birinci, ikinci ve üçüncü günlerde retina üzerindeki erken dönem yan etkileri ile 2 tavşanda yedişer gün arayla dört kez intravitreal metotreksat enjeksiyonu yapıldıktan 30 gün sonra retinadaki histopatolojik değişiklikler ışık ve elektron mikroskopi ile incelendi. Kontrol grubu olarak iki tavşan kullanıldı.

İntravitreal 800µg enjeksiyonu takiben metotreksatın tavşan gözünde dağılım hacminin 1,33 ml olduğu belirlendi. İlacın vitreusdaki konsantrasyonlarının; ilaç düzeyi= $1426,73 e^{-0,1182(\text{zaman})}$ matematiksel bağlantısıyla tamamen uyumlu olarak azaldığı, 81 saat vitreusda etkin düzeyini koruduğu ve yarılanma ömrünün 5,9 saat olduğu bulundu. İkinci bölümde ise erken dönemde retinal hücrelerde yer yer ödem ve vakuolizasyon ile bazı mitokondrionlarda iç membran kayıpları izlendi. Uzun dönem etkisi olarak ışık mikroskopik incelemede; fotoreseptör hücreler, iç nüklear ve gangliyonik hücre tabakalarında ödem ile gangliyonik tabakada yer yer hücre kaybını düşündüren hücresel düzensizlik, ultrastrüktürel incelemede ise; hücrelerde yer yer vakuol oluşumu, dış nüklear tabakada az sayıda hücre çekirdeğinin dejenere olduğu, fotoreseptör hücre uzantılarında miyelin figürler ve sinir lifi tabakasında membranöz yapıların yer aldığı görüldü.

Sonuç olarak; 800µg intravitreal metotreksat enjeksiyonunu takiben ilacın vitreus konsantrasyonlarının saatlere göre hesaplanabileceği, enjeksiyonu takiben erken dönemde retinada belirgin histopatolojik değişiklik oluşmazken tekrarlayan intravitreal metotreksat enjeksiyonlarının ise retinada minimal hücresel hasara yol açtığı tesbit edildi.

Anahtar Sözcükler: Elektron mikroskopi, İntravitreal, metotreksat, farmakokinetik.

ABSTRACT

Evaluation Of Pharmacokinetics And Possible Retinal Toxicity Of Intravitreal Injection Of Methotrexate In Experimental Rabbit Model

Pharmacokinetics and possible retinal damage due to intravitreal injection of methotrexate were investigated at early and late periods.

In the first stage of the study intravitreal injection of 800 µg/0.1 ml methotrexate was done to twentyone of twentyfive New Zealand white rabbits. Vitreous concentrations of the drug was measured by fluorescein polarization immunoassay at 7 different times within a period of 30 minutes to 72 hours. In the second stage; early effects of injections on retina were evaluated at 1st, 2nd and 3rd days following the injection. Histopathologic changes in retina were evaluated 30 days after four injections with 7 days intervals by light and electron microscopy in two rabbits. The control group consisted of two rabbits.

Volume of distribution was calculated 1,33ml following intravitreal injection of 800µg methotrexate. Vitreous concentrations of the drug was found to be decreasing related to the mathematical equation; drug concentration= $1426,73 e^{-0,1182(\text{time})}$ and remained over effective dose by 81 hours with a half life of 5,9 hours. In the second stage; edema, vacuolization and loss of internal mitochondrial membrane of some retinal cells were observed as early changes. Long term effects after serial injections were edema in photoreceptor cells, inner nuclear and ganglionic cell layers. Cellular disorganization was observed resembling cellular loss in ganglionic cell layer in light microscopic examination. Electron microscopic examination revealed vacuole formation in cells, degeneration of nucleus in several cells in outer nuclear layer, myelin figures on photoreceptor cell processes and membranous structures in nerve fiber layer.

In conclusion; these findings evidenced that vitreous levels of methotrexate after 800µg intravitreal injections can be calculated by a mathematical equation at each time point. At early stages no major change was observed in cellular layers of the retina and minimal retinal damage was seen after serial injections of methotrexate.

Key Words: Electron microscopy, intravitreal, methotrexate, pharmacokinetics.

1. GİRİŞ

Lösemi, reaktif lenfoid hiperplazi, non-Hodgkin primer santral sinir sistemi lenfoması ve sistemik non-Hodgkin lenfoma gibi çeşitli lenfoproliferatif hastalıklar göz tutulumu ile seyredilmektedir. Sistemik non-Hodgkin lenfomasında üveal tutulum genellikle orbital tutulumla birlikte görülürken, izole vitreoretinal tutulum non-Hodgkin primer santral sinir sistemi lenfomasında daha sık görülür. Hastalar sıklıkla kortikosteroid tedaviye yanıt vermeyen vitritis ya da üveit ile başvururlar. Bu olgularda sıklıkla vitreus, retina veya subretinal pigment epitel infiltrasyonu izlenir.¹⁻⁴

İzole oküler tutulumlu santral sinir sistemi lenfoması radyoterapiye iyi cevap verir ancak hastaların %60 ile %80'inde zaman içerisinde santral sinir sistemi tutulumu da görüldüğü için oküler radyoterapi tek başına yeterli olamayabilmektedir. Yapılan çalışmalarda kemoterapi + radyoterapi kombinasyonlarının yalnızca radyoterapi içeren tedavi protokollerine oranla daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir.^{3,5,6,7,8}

Blay ve arkadaşlarının çalışmasında oküler tutulumlu santral sinir sistemi lenfomasının sistemik kemoterapi protokollerinde en etkin cevabın metotreksat içeren kombinasyonlarla elde edildiği ve tedavinin en azından metotreksat içermesi gerektiği belirtilmektedir.⁹ Sistemik kemoterapi ve oküler radyoterapi ile yapılan tedavilerde de oküler radyoterapinin belirli bir dozdan sonra tekrarlanabilir olmaması, izole oküler relapslarda yüksek doz sistemik antineoplastik ajan kullanımını gerektirmektedir. Kranial kemoradyasyon, oküler radyasyon kombinasyonu ile sistemik yan etkilerden uzaklaşılırken bu kez de lokal yan etkiler daha fazla görülmeye başlanmıştır.¹⁰

Oküler tutulumlu primer santral sinir sistemi lenfoması (OTPSSSL) nadir görülen bir hastalıktır. Yayınlanan serilerin az sayıda hasta içermesi ve klinik seyrinin hastadan hastaya değişkenlik göstermesi sebebi ile OTPSSSL'sının ve metastatik intraoküler lenfomanın tedavi protokolü konusunda fikir birliği sağlanamamıştır. Günümüzde özellikle tedaviye dirençli, yüksek dozda radyoterapi almış OTPSSSL'li hastaların oküler relapslarında lokal oküler kemoterapi ve intratekal kemoterapi ile ilgili klinik çalışmalar denenmekte ve olumlu sonuçlar verdiği bildirilmektedir.¹¹⁻¹⁷

Bir ilaç grubunun intravitreal enjeksiyon yöntemi ile klinik uygulamaya girmeden önce ilacın toksik olmayan dozunun ortaya konması için; klinik gözlem, ERG, elektron ve ışık mikroskobu ile yapılacak histopatolojik araştırmalar, ilacın yarılanma ömrü ve vitreusdan uzaklaştırılma sürecinin belirlenmesi çalışmalarının tamamlanması gereklidir.

Klinik alışmalarda OTPSSSL'sında etkili olduğu belirtilen, ancak uygulanan hastalarda mevcut olan oküler patolojiye ya da önceden aldıkları tedavilere bağlı retinal harabiyet varlığı sebebiyle bu lokal tedavi yönteminin neden olabileceği toksisite belirlenemediğinden; bu çalışmada, deneysel tavşan modelinde intravitreal metotreksat enjeksiyonu sonrasında ilacın vitreusdaki dağılımı, etkin düzeyini koruma süresi ve yarı ömrü ile birlikte retinada sebep olabileceği ultrastrüktürel değişikliklerin araştırılması planlandı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 İntraoküler Tümörler

Tümör; bir doku fenotipinin hücrel kontakt inhibisyonunu kaybederek stereotipik ve monoton olarak büyümesidir.¹⁸

Hayat kaybına ve görmede azalmaya sebep olabilen selim ve malign intraoküler tümörler geniş bir yelpazede incelenirler. Etkin bir tedavi ancak doğru tanı ile uygulanabilir. Birçok intraoküler tümörde tanı oftalmolojik muayene ve radyolojik görüntüleme yöntemleri ile koyulabilmektedir.

Oküler Melanom Çalışma Grubu'nun araştırmaları, son zamanlarda yanlış tanı oranının %0.2'den az olduğunu göstermiştir.¹⁹ Oftalmik patoloji laboratuvarlarından gelen sonuçlar da klinik olarak gözden kaçan oküler tümör oranlarında önceki yıllara göre azalma olduğunu bildirmektedir.²⁰

Erişkinlerde en sık görülen malign primer intraoküler tümör koroideal melanom, çocukluk çağında ise retinoblastomdur.^{1,2,20}

Primer ve metastatik olmak üzere başlıca iki grupta toplanabilen intraoküler tümörlerden lenfoid doku kaynaklı olanlar, primer intraoküler tümör olabileceği gibi metastatik de olabilirler. Bu nedenle ayrı bir kategoride incelemek.

2.1.1 Primer İntraoküler Tümörler

Melanositik tümörler, damarsal tümörler, retinoblastom, pigmentsiz siliyer epitel tümörleri, miyojenik nörojenik ve osseöz tümörler bu grupta yer alır.

2.1.1.1 Melanositik Tümörler

İris, siliyer cisim ve koroidin selim nevüsleri veya melanomları olabilir. Selim lezyonlar genellikle herhangi bir şikayete yol açmayıp rutin oftalmolojik muayenede tanı koyulur. Bu lezyonların mutlaka takip edilip malign melanom olmadığından emin olunmalıdır.

İntraoküler melanomların %10'undan azını oluşturan, amelanotikden koyu kahverengiye kadar geniş bir renk yelpazesinde karşımıza çıkan iris melanomları genellikle alt 3/4 kadranda yerleşir, nadiren diffüz büyüme eğilimi gösterir. İris melanomlarının ayırıcı tanısında iris nevüsleri, primer iris kistleri, essansiyel iris atrofi, iris yabancı cisimleri, periferik ön sineşi, irisin metastatik karsinomları, juvenil ksantogranülom, pigment epitel hiperplazi veya migrasyonu, medüloepitelyom düşünülmelidir.^{1,2,20,21,22}

Yaygın ektropion iridis, belirgin vaskülarizasyon, sektöryel katarakt, sekonder glokom, açığa hücre çökmesi ile invazyon, sklera dışına yayılım, lezyonun büyüklüğü ve dökümente edilebilen büyümesi malignite düşündüren bulgular olup zaman zaman klinik bulgular ve girişimsel olmayan tekniklerle tanı koymak mümkün olmayabilir. Bu durumda ince iğne aspirasyon biyopsisi, belirgin büyüme ve glokom varlığında tanısall ve tedavi amaçlı eksizyonel biyopsi yapılabilir.²⁰⁻²⁵

Tedavide eksizyon ve brakiterapi kullanılmaktadır. İris melanomlarında hücrelerin biyolojik davranışı koroid ve siliyer cisim melanomlarından farklı olduğu için prognoz çok iyidir.^{1,20,22-25}

Erişkinlerde en sık görülen primer intraoküler tümör olan koroid ve siliyer cisim melanomlarının Amerikada görülme insidansının milyonda 6 ile 7 arasında olduğu belirtilmektedir.²⁰ Genellikle 6. ve 7. dekada sık görülür ancak 3. dekada da görülme sıklığı artar ve bimodal dağılım gösterir. Kesin kanıtlanmış bulgular olmasa da, displastik nevüs sendromu gibi genetik yatkınlık, oküler melanoz ve okülodermal melanoz gibi oküler melanotik durumlar, açık renkli iris ve sigara içimi risk faktörleri arasında sayılabilir.^{1,20}

Siliyer cisim melanomları lokalizasyonlarından dolayı büyük hacme ulaşana kadar semptom vermeyebilir. İlk belirti genellikle tümöre uyan kadranda episkleral damarlarda dilatasyondur. Tümör büyüdükçe hasta, sektöryel veya diffüz katarakt, lens subluksasyonu, sekonder glokom, retina dekolmanı, görme alanı defekti veya iris neovaskülarizasyonu ile karşımıza çıkar.^{1,2,20-25}

Koroid melanomları tipik olarak hafif kabarık, oval, kahverengi subretinal lezyonlar olarak karşımıza çıkarlar. Pigmentasyon derecesi koyu kahverenginden beyaza kadar değişik düzeylerde olabilir. Bruch membranını delerek büyümeye devam eden tümörler mantar görünümü verir.

Geniş bir anamnez, oftalmolojik muayene ve radyolojik görüntüleme yöntemleri, posterior üveal melanomların % 95'inde tanı koydurucudur. Tanısal amaçlı ince iğne aspirasyon biyopsisi yapılabilir ancak hücresel dökülme ile yayılıma sebep olabileceğinden dikkatli olmak gereklidir. Ayırıcı tanıda, koroideal nevüs, diskiform maküler ve ekstra maküler lezyonlar, konjenital retina pigment epitel hipertrofisi, koroideal hemanjiom, melanositom, koroid veya retina pigment epitelinin hemorajik dekolmanları, metastatik tümörler, koroid osteomu ve retina pigment epitel hamartomları ilk akla gelenlerdir. Tanıda hala en önemli nokta hekimin tecrübesidir.^{1,2,20,21,24,25,}

Posterior üveal melanomların tedavisinde, sistemik yayılım yoksa brakiterapi, enükleasyon, enükleasyon ve lokal radyoterapi, yüklü partikül radyasyonu uygulanmaktadır. Geliştirilmekte olan yöntemler arasında ise brakiterapi ve lazer hiperterminin kombine kullanımı, transpupiller termoterapi, üveoskleral rezeksiyon, transvitreal rezeksiyon ve fotodinamik terapi sayılabilir.^{1,2,20,21,24,25,26}

2.1.1.2 Damarsal Tümörler

Histopatolojik olarak selim seyreden damarsal tümörler başlıca iki gruba ayrılır, hemanjiomlar ve arteriovenöz malformasyonlar.

Hemanjiomları; koroideal hemanjiom, retinal kapiller hemanjiom (anjiomatozis retina) ve kavernöz hemanjiomlar olarak sınıflayabiliriz.

Ayırıcı tanıda; amelanotik koroideal melanom, koroideal osteom, metastatik tümör ve koroideal granülomlar düşünülmelidir. Radyolojik görüntüleme yöntemleri, klinik muayene ve fundus florescein anjiografisi genellikle kesin tanıda yeterlidir. Yer kaplayıcı etkilerinden dolayı retina dekolmanı, glokom ve görme alanı defektlerine yol açabilirler. Hemorajiye bağlı ani görme azalması gelişebilir.

Tedavide fotokoagülasyon, kriyoterapi, penetran diyatermi tümörün boyutlarını küçülterek kitleye bağlı komplikasyonların gelişimini önlemek için kullanılmaktadır.^{1,2,20,24}

2.1.1.3 Retinoblastom

En sık görülen çocukluk çağı göz içi tümördür. Ülkeden ülkeye değişmekle birlikte ortalama 14000 ile 20000 canlı doğumda bir görülür. Belirgin bir cins ve ırk dağılımı olmayıp, %30- 40 bilateral tutulum gösterir.^{20,27}

Retinoblastomlu olguların %6'sında aile öyküsü mevcuttur, otozomal dominant geçiş gösterir. Sporadik görülen vakaların ise %15'inin ebeveynlerinin retinoblastom gen taşıyıcısı oldukları bilinmektedir.²⁰

En sık semptom lökokori, strabismus ve oküler inflamasyon olup nadiren hastalar heterokromi, spontan hifema ve selülit ile başvurabilir.

Oftalmolojik muayenede küçük lezyonlar saydam, gri-beyaz, etrafı dilate besleyici damarlarla çevrili kitleler olarak görülür, daha büyük lezyonlarda ise beyaz, peynirimsi bir madde göz içini kaplamış olarak görülebilir. Optik sinir ve orbita tutulumu ile kranial yayılım, lenfatik yolla ise sistemik yayılım görülebilir. Tanıda bilgisayarlı tomografide karakteristik kalsifiye lezyonların görülmesi yardımcıdır. Sistemik taramada kemik iliği

aspirasyon biyopsisi ve nörolojik bulgusu olan çocuklarda lomber ponksiyon gereklidir.^{1,2,20,27,28}

Ayırıcı tanıda; tüberosklerozda görülen retinal astrositik hamartomlar, eksudatif depozitler gösteren lezyonlar (Coats hastalığı, retinal kapiller hemanjiomatozis vb.), periferik ve arka kutup granülomlarına sebep olan hastalıklar (örn.nematod endoftalmisi), lökokori yapan diğer patolojiler (Coats hastalığı, persistan hiperplastik primer vitreus, prematür retinopatisi vs.) düşünülmelidir.^{1,2,20,24,27}

Tedavisinde brakiterapi, radyoterapi, kemoterapi, krioterapi, fotokoagülasyon ile ablasyon ve hipertermi ile bunların kombinasyonları uygulanmaktadır.

Lokelize intraoküler tümör sebebi ile tedavi edilen çocukların yaşam oranı gelişmiş ülkelerde % 95 civarındadır. Ölüm oranını arttıran en önemli faktör ekstraoküler yayılımdır. Koroideal yayılım ise yaşam oranını etkilemeyen bir faktör olarak görülmüştür.^{20,21,27,28}

Hayatta kalan bilateral retinoblastomlu çocuklarda ilerleyen yaşlarında başta osteosarkom olmak üzere, pinealom, malign melanom, Ewing sarkom ve tiroid papiller karsinom görülme sıklığı normal popülasyona oranla artmıştır. Radyoterapi almış çocuklarda ise baş bölgesinde sarkomatöz tümör görülme oranı 20 yaşındayken % 20, 50 yaşına geldiklerinde ise %58 civarında olup sekonder sarkom görülen hastaların yaşam oranı %50'den azdır.^{20,21,27}

2.1.1.4 Pigmentsiz Siliyer Epitel Tümörleri

Bu grubun en önemli tümörü konjenital medülloepitelyomdur. Öncül medüller epitelden köken alır. Habis veya selim seyirli olabilir, klinik bulguları genellikle ilk dekada ortaya çıkar, habis seyrederse de sadece lokal yayılım gösterir ve uzak metastaza sebep olmaz.^{1,24}

Reaktif hiperplazi, senil hiperplazi, adenom ve adenokarsinom ise pigmentsiz siliyer epitelin edinsel tümörleridir.²⁴

2.1.1.5 Miyojenik - Nörojenik ve Osseöz Tümörler

Bu grupta leyomiyom, nörolemmom ve koroideal osteom yer alır. Nadir görülen tümörlerdir.

2.1.2 Metastatik İntraoküler Tümörler

Göz ve adneksa tümör metastazı diğer organlara oranla az olsa da intraoküler maligniteler içinde en sık görüleni metastatik tümörlerdir.

İlk koroideal metastaz olgusu 1872’de Perls tarafından bildirilmiştir. 1936’daki derlemelerinde Lemoine ve McLeod literatürde o güne kadar yayınlanmış 230 metastatik oküler kanser olgusu olduğunu belirtmişlerdir.²⁹ Bloch ve Gartner’in metastatik karsinom sebebi ile ölen 230 hastada yaptıkları çalışmada 23’ünün gözünde (%10) metastatik odak varlığı saptanmıştır. Amerika’da bir yılda kanser sebebi ile ölen hasta sayısının 300.000 olduğu göz önüne alınırsa yılda 30.000 yeni intraoküler metastatik kanser vakasının oluştuğu sonucuna varılabilir, ki bu da her yıl tanı konan 1800 intraoküler tümörle karşılaştırıldığında çok yüksek bir rakamdır.²⁰

Erkeklerde oküler metastaza en sık sebep olan primer tümör akciğer kanseri (%40) iken kadınlarda meme kanseridir (%68), ardından kadınlarda da akciğer kanseri %12 lik oranla ikinci sırada yer alır.^{1,2,20,30}

Göze metastaz yapan kanserlerin artması, bazı kanserlerde yaşam süresinin uzaması, doktorların göz metastazı konusunda daha hassas davranması ve oftalmolojik tanı yöntemlerinin gelişmesi ile göz metastazlarının görülme sıklığı artmıştır.

Oküler metastaz genellikle hematojen yolla olur. Zengin kanlanması nedeniyle metastatik yayılım en sık arka koroide olur. Bilateral tutulum görülme oranı Ferry ve Front’un yaptıkları çalışmada %4.4 olarak bildirilirken Shields ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada %23.8 olduğu belirtilmiştir.^{29,31} Çeşitli yayınlarda vakaların %20 ila %25’inde bilateral tutulum izlendiği belirtilmektedir. Oküler metastaz gösteren hastaların büyük kısmında santral sinir sistemi tutulumu da olması hematojen yayılımın dışında subaraknoid alandan lamina kribroza yoluyla da yayılım olabileceğini düşündürmektedir.

Ön üveal metastazlarda; iridosiklit, sekonder glokom, iris neovaskülarizasyonu, hifema ve pupil düzensizliği gözlenirken, arka kutbu tutan tümörlerde görme kaybı, fotopsi ve ağrı ilk semptomlardır. Hastaların ortalama %25’inde bilateral tutulum olması diğer gözün de yakın takibinin gerekliliğini vurgular.²⁹⁻³¹

Tanısal yöntemlerden floressein anjiyografisi tümör sınırlarının belirlenmesini ve varsa, gözden kaçan odakların görülmesini sağlar. Ultrasonografi ile sekonder retina dekolmanları ve bunun altında olabilen kitleler gözlenebilir. Girişimsel olmayan yöntemlerle tanı koyulamayan durumlarda ise ince iğne aspirasyon biyopsisi yapılmalıdır. Metastatik tümörlerin tanısında özel histokimyasal ve immünohistokimyasal boyaların faydası olsa da, metastatik tümör zaman zaman orijin aldığı tümöre göre daha az differansiye olabileceğinden tümörün orijinini belirlemede yeterli olamayabilir.

Sistemik malignite öyküsü metastatik göz tümörlerinin tanısında en önemli hususdur ancak hastanın öyküsünde malignite olmaması oküler metastaz ön tanısını göz ardı ettirmemelidir. Oküler metastaz saptanan pulmoner kanserlerin %70'inin tanısı oküler kitle sebebi ile sistemik tetkikler yapılırken konmaktadır.²⁰

Tedavide primer kanserin tipine bağlı olarak kemoterapi, hormon tedavisi ve lokal radyoterapi kullanılır.

Prognozu belirleyen faktör primer metastatik kanser olduğu için bu vakalarda prognoz kötüdür. Metastatik tümörlerde oftalmolojik tedavinin asıl amacı ağrının azaltılması ile görmenin korunması veya düzeltilmesidir.

2.1.3 İntraoküler Lenfoid Tümörler

Lösemi, reaktif lenfoid hiperplazi, non-Hodgkin primer santral sinir sistemi lenfoması ve sistemik non-Hodgkin lenfoması gibi çeşitli lenfoproliferatif hastalıklar göz tutulumu ile karşımıza çıkabilmektedir. Otuziki hastalık bir seride yapılan çalışmada; intraoküler lenfomalı hastaların %56'sında santral sinir sistemi lenfoması, %16'sında sistemik lenfoma, %6'sında sistemik ve santral sinir sistemi lenfomasının birlikte görüldüğü, %22'sinde ise sadece oküler tutulumun bulunduğu bildirilmiştir.³² Oküler onkoloji ünitelerinde takip edilen vakaların yaklaşık % 1'ini oluşturmalarına rağmen immünosupresif hastalıkların artması ile görülme sıklığı ve oranının yükselmesi oküler lenfoid tümörlere daha fazla dikkat çekmiştir.³

İntraoküler lenfoma anatomik olarak başlıca iki gruba ayrılır; vitreoretinal ve üveal form.

Üveal tutulum sistemik non-Hodgkin lenfomada genellikle orbital tutulumla beraber görülürken, vitreoretinal tutulum ise non-Hodgkin primer santral sinir sistemi lenfomasında karşımıza çıkar. Primer santral sinir sistemi lenfomalı hastaların %20'sinde oküler tutulum görülürken, izole oküler lenfoma ile başvuran hastaların değişik takip sürelerine göre %60 ile %80'inde serebral lenfoma geliştiği görülmüştür.^{3,5,32}

Lenfomanın klasifikasyon sistemleri lenf bezi tutulumu olmadığından göze kolay adapte edilememektedir. Rappaport klasifikasyon sistemine göre retina ve vitreus tutulumu olan büyük hücreli non-Hodgkin lenfoması serebral tutulumla bakılmaksızın retikulum hücre sarkom veya histiyositik lenfoma olarak adlandırılmaktaydı. Bu klasifikasyon büyük retikulum hücreleri veya histiyositlerin lenfositlerin oluşumunu sağlayan pluripotent kök hücreler olduğu düşünülerek yapılmıştır. Ancak yapılan fenotipik çalışmalar undiferansiye

malign büyük lenfositlerin kaynağının küçük lenfositler olduğunu düşündürmüştür. Daha sonra intraoküler lenfoma ya da intraoküler büyük hücreli lenfoma terimleri hücre kökeni ile ilgili karışıklıkları önlemek için kullanılmıştır. Hücre yüzey işaretleyicileri ile ilgili yapılan çalışmalarda büyük kısmının B hücre işaretleyicisi, daha az sıklıkla null hücre işaretleyicisi, nadiren de T hücre işaretleyicisi taşıdıkları belirlenmiştir.^{3,5,32}

Oküler lenfomanın prezentasyonu değişkenlik gösterdiğinden hiçbir tanımlama hastalığı tam olarak tarifleyememektedir. Örneğin en sık görülen form olan primer santral sinir sistemi lenfomasının oküler tutulumunda oküloserebral lenfoma yeterli bir tanımlama gibi görünse de spinal kord ve serebrosipinal sıvı tutulumu olan vakaları kapsamamaktadır. Epidemiyolojik veriler de göz önüne alındığında en uygun tanımlamanın OTPSSSL olduğu belirtilmektedir.³

Epidemiyoloji: OTPSSSL nadir görülen bir hastalık olup yayınlanan seriler genellikle 25'den az hasta içermektedir. OTPSSSL'sı tüm non-Hodgkin lenfomaların %1'ini, tüm kranial lenfomaların %1'ini ve tüm intraoküler tümörlerin %1'inden azını teşkil eder. Hastalık genellikle yaşlılarda görülüp, yayınlanan serilerde ortalama yaş 60'dır. Kadınlarda erkeklerden iki kat fazla görülüp belirli bir ırk dağılımı izlenmemiştir.^{3,20}

İlk başvuruda tek veya her iki göz tutulumu olabilir ancak zaman içerisinde bilateral tutulum gösteren olguların oranı %80 ile %90'ları bulur primer santral sinir sistemi lenfomalı hastaların %20'sinde oküler tutulum görülürken, izole oküler lenfoma ile başvuran hastaların takip süresine göre %60 ile %80'inde serebral lenfoma gelişir.^{3,5,32,33}

Belirti ve Bulgular: Hastalar sıklıkla kortikosteroid tedaviye yanıtsız vitritis ya da üveit ile başvururlar; vitreus, retina veya subretinal pigment epitel infiltrasyonu izlenir. Malign hücrelerin retina ile retina pigment epiteli arasında olduğu ve vitreus tutulumunun sonradan geliştiği düşünülmektedir. Ön segment inflamasyon bulguları değişik düzeylerde, granülatöz veya non granülatöz olabilir. Klinik bulgular üveal metastatik karsinom, fundus flavimakulatus, akut posterior multifokal plakoid pigment epiteliopati, birdshot koryoretinopati, Vogt-Koyonagi-Harada sendromu, sempatik oftalmi, multifokal koroidit, fungal retinit, ve retina, retina pigment epiteli ve koroidi tutan diğer multifokal inflamasyonları düşündürülebilir.^{3,5,32,33}

Retinanın vasküler tutulumu nekrotizan veya hemorajik retinit, retinal vaskülit ya da retinal vasküler tıkanma şeklinde olup bu bulgularla akut retinal nekroz, sitomegalovirüs

retiniti, donmuş dal anjiiti, tüberküloz, sarkoidoz ve retinal vaskülite sebep olan diğer hastalıklarla karışabilir.¹⁻⁵

İlerlemiş hastalıkta, hastaların %75'inde tümör hücreleri ön segmentte de izlenir, iridosiklit, psödohipopiyon, sekonder iris ve aç neovaskülarizasyonu, sekonder glokom, hatta nadiren iris veya açıda kitle olarak karşımıza çıkabilir. Optik sinir veya sinir kılıfının tutulumu disk ödemi şeklinde izlenebilir.¹⁻⁵

Teşhis: Radyolojik görüntüleme yöntemleri diğer tümörlerde olduğu gibi OTPSSSL'sında da sistemik tarama açısından önemlidir. Santral sinir sistemindeki lenfoid lezyonlar bilgisayarlı tomografiye oranla manyetik rezonans görüntüleme ile daha iyi değerlendirilebilir, ancak oftalmolojik değerlendirmede her ikisinin de yeri yoktur. Vitreus opasitelerini, retinal, koroideal ve optik sinirdeki kalınlaşmayı gösterdiği için B-mod ultrasonografi, tanıda yardımcı olabilir.^{3,32}

Kesin tanı vitreus biyopsisi ile koyulur. Bunun için öncelikle pars planadan ince iğne aspirasyon biyopsisi önerilmektedir. Zira bu işlem; vitrektomi ile yapılacak biyopsiye oranla daha az travmatik olup, aspirasyon esnasında kırılğan lenfositlerin okütomla zedelemesini önlediği ve materyalin pataloğa daha hızlı ulaşmasını sağladığı için önerilmektedir. Görme düzeyi %25'in altında olan hastalar içinse biyopsi amaçlı standart üç girişli vitrektomi yapılabilir, böylece santral vitreusdaki yoğunluk temizleneceği için biyopsi materyalinin yanı sıra görme artışı da sağlanabilir.³²

Hastaların %95'inde bir kez ince iğne aspirasyon biyopsisi ile tanı koyulabilirken, tümör hücrelerinin vitreusda bulunan inflamatuvar hücrelere oranla az olması, alım ve işleme esnasında kırılğan tümör hücrelerinin zarar görmesi nedeniyle ikinci, üçüncü ince iğne aspirasyon biyopsisi ve hatta subretinal yerleşimli lezyonlarda koryoretinal biyopsi gerekebilmektedir. Işık hissi olmayan, histopatolojik tanının mutlaka gerektiği, nadir olgularda ise tanısal amaçlı enükleasyon yapılabilir.^{3,32}

İmmünofenotiplleme ile reaktif lenfoid hiperplazide gözlenen değişik immünoglobulinler üreten B hücreler ve çeşitli yüzey antijen işaretleyicileri olan T hücreleri (poliklonal), lenfomada görülen monoklonal hücreler ile ayırt edilebilir. Ancak selim lezyonların bazen az da olsa monoklonal hücre içermesi, bazı lenfoma örneklerinde monoklonallığın gösterilememesi, immünohistokimyasal boyalarla selim olarak değerlendirilen bazı tümörlerin DNA analizlerinde monoklonal bantlar izlenmesi ve malign

lenfositlerin progresyon esnasında zaman zaman hücre yüzey işaretleyicilerini kaybetmeleri sebebi ile immünofenotipleme tek başına yeterli olamamaktadır.^{32,33}

İnce iğne aspirasyon biyopsisi ile elde edilen vitreus örneklerinde sitokin düzeyleri bakılmış ve lenfomalarda IL-10 düzeyleri yüksek bulunmuştur. IL10'un IL-6'ya oranı oküler lenfomalı hastalarda 1'in üzerindeyken üveitli hastalarda 1'in altında çıkmıştır.^{4,33,34}

Klinik durumları da göz önüne alınarak oküler lenfoma düşünülen her olguda sistemik ve santral sinir sistemi değerlendirmeleri yapılmalıdır. Nörolojik muayenesi normal olsa da hastalarda kranial tutulum olasılığı yüksektir. Gadolinyumlu ince kesitli çekilmiş serebral manyetik rezonans görüntüleme ile küçük lezyonlar da görüntülenebilmektedir. İntraoküler biyopsi yanında lomber ponksiyon ve kemik iliği aspirasyon biyopsisi yapılmalıdır. Santral sinir sistemi lenfomalı hastalarda tanısall amaçlı lomber ponksiyon ile olguların ancak yarısında malign hücreler beyin omurilik sıvısında gösterilebilmektedir.³²

Tedavi; Yayınlanan serilerin az sayıda hasta içermesi ve klinik seyrinin hastadan hastaya çok değişkenlik göstermesi sebebi ile intraoküler lenfomanın tedavi protokolü klinikten kliniğe değişiklik göstermektedir. Tedavi protokolü belirlenirken hastanın tedaviden sağlayacağı yarar, hastalığın yayılımı, tedavinin göz ve santral sinir sistemine vereceği hasar göz önünde bulundurulmalıdır.^{35,36,37}

Sistemik lenfomanın oküler metastazında tedavi hastalığın yayılımına göre planlanır. Oküler tutulum ile birlikte sistemik relaps da mevcutsa genellikle sistemik kemoterapi uygulanır. İzole oküler relapslarda ise oküler radyoterapiyle olumlu sonuçlar alınmaktadır.³²

OTPSSSL'da kemoterapi + radyoterapi kombinasyonlarının yalnızca radyoterapi içeren tedavi protokollerine oranla iyi sonuçlar verdiği bilinmektedir, ancak kan beyin bariyerini geçebilecek düzeydeki uzun süreli antineoplastik ajan kullanımı da sistemik yan etkileri arttırmaktadır.^{11,12}

Kranial kemoradyasyon, oküler radyasyon kombinasyonu ile sistemik yan etkiden uzaklaşılırken bu kez de lokal yan etkiler daha fazla görülmeye başlanmıştır. Günümüzde lokal malignensilerde lokal oküler kemoterapi, kranial tutulum varlığında ise intratekal kemoterapi ile ilgili çalışmalar denenmekte ve olumlu sonuçlar verdiği bildirilmektedir.¹²⁻¹⁷

2.2 Kemoterapi Uygulama İlkeleri³⁸

2.2.1 Kemoterapinin Zamanlaması

A- İndüksiyon kemoterapisi; antineoplastik ajanların başlangıçta belirgin bir neoplastik hücre baskılanması veya remisyon sağlayacak şekilde kullanılması.

B- Pekiştirme–Güçlendirme Kemoterapisi; indüksiyon kemoterapisinde kullanılan, ya da onlarla çapraz direnç yaratmayan ajanlarla remisyonadaki hastaya uygulanan ve amacı remisyonu uzatmak olan tedavi.

C- Adjuvan Kemoterapi; Cerrahi veya radyoterapi gibi lokal bir yöntemle tümöral kitle temizlendikten sonra mikroskobik kalıntıları tedavi etmek ve lokal ya da uzak relapsları önlemek için uygulanan kemoterapi.

D- Neoadjuvan Kemoterapi; lokal tedavi öncesinde uygulanacak yöntemin etkinliğini arttırmak amacıyla verilen kemoterapi.

E- Koruyucu Kemoterapi; remisyonadaki hastalara poliklinik takibi ile ayaktan verilen, amacı tam iyileşme veya remisyonun uzatılması olan kemoterapi.

F- Kurtarıcı Kemoterapi; daha önceden denenmiş olan tedavi yöntemlerinden fayda görmeyen hastalara uygulanan kemoterapi.

2.2.2 Kombinasyon Kemoterapisi

Nadir hastalıklar dışında, standart dozlarda kullanıldığında tek bir kemoterapötik ajan kanseri tedavi etmekte yeterli olamamaktadır. Kombinasyon kemoterapisinin tek amacı toksisite en aza indirilerek olabildiğince fazla kanser hücresi öldürmek değil, daha geniş hücre grubunu etkileyerek dirençli hücre gelişimini önlemek veya yavaşlatmaktır. En etkin ilaç kombinasyonları ise aşağıdaki hususlara dikkat edilerek elde edilir.

- Bir tümöre tek başına kullanıldığında kısmen etkili olduğu bilinen ilaçlar beraber kullanılmalı.
- Çeşitli gruplardan eşit etkinliğe sahip birçok ilaç seçeneği bulunduğunda, toksisitesi kombinasyondaki diğer ilaçlarla aynı mekanizma ile olmayan ilaç seçilmeli.
- İlaçlar tek başına kullanıldıkları optimal doz ve yöntemle kullanılmalı.
- İlaç kombinasyonları belirli ve olabildiğince sık döngülerle verilmeli. Döngüler arasındaki sürenin uzaması doz hassasiyetini azaltır. Kemik iliği, hedef hücrelerin toparlanması için en kısa süreye ihtiyaç duyan dokudur.

2.2.3 Tümör Büyümesinin Biyolojisi ve Kemoterapiye Cevap

Bir tümörün en hızlı büyüme evresi, tümör maksimum büyüklüğünün %37' sine ulaştığı zamandır. Antineoplastik ajanlar aktif hücrelere etkili olduğundan, bir tümör maksimum büyüklüğüne yaklaştıkça büyümesi yavaşlayacağı için ilaç cevabı da azalacaktır. Bu bilgiler, remisyonadaki tümöre uygulanan adjuvan kemoterapinin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır.

2.2.4 Hücre Döngüsü ve Terapötik Hedefler

Ökaryotik hücre döngüsü beş basamak içerir. Faza özel etkinlikleri olan ilaçlar sadece o fazdaki hücreler üzerine etki gösterir.

- G₀ fazı; hücrelerin dinlenme devresi olduğu için kemoterapiye dirençlidir
- G₁ fazı (interfaz); özelleşmiş hücresel fonksiyonlar için hücrelerin protein ve RNA sentezi yaptığı fazdır. DNA sentezi için gerekli enzimler bu evrede sentezlenir. L-asparajinaz bu evrede etkinlik gösterir.
- S fazı; hücresel DNA'nın sentezlenip iki katına çıktığı evredir. Prokarbazin, antimetabolitler, hidroksiüre ve kamptotesinler bu evrede etkilidir.
- G₂ fazı; DNA sentezi durmuştur ancak protein ve RNA sentezi devam eder, mitotik iğlerin mikrotübüler öncüleri sentezlenir. Bleomisin, vinka alkaloidleri ve taksonlar bu döneme özgü ilaçlardır.
- M fazı (mitoz); genetik materyal yavru hücreler arasında paylaştırılırken protein ve RNA sentezi aniden azalır. Mitoz evresi bitince yeni oluşan hücreler G₀ veya G₁ fazına girer. Bu evreye etkili ilaçlar, vinka alkaloidleri ve taksonlardır.

Faz seçici olmayan ilaçlar ise hücre döngüsünden bağımsız olarak doz arttırıldıkça hücre öldürücü etkinliği artan ilaçlardır.

2.2.5 Bölgesel Antineoplastik Ajan Salıverme Prensipleri³⁹

Bölgesel antineoplastik ajan kullanımının farmakokinetik amacı, hedef dokuda sistemik yoldan güvenli olarak ulaşılamayacak ilaç düzeylerine ulaşmaktır. Bunları kısaca aşağıdaki tabloda toparlayabiliriz;

- Tümörün az veya orta derecede aktif sitotoksik ajanlarla temas süresini arttırmak.
- Tümör hücrelerinin döngü seçici ilaçlara daha uzun süre maruz kalabilmesi.
- İntravenöz ilaç salınımı ile görülebilecek sistemik toksisiteden korunmak.
- İki veya daha fazla antineoplastik ajan arasındaki konsantrasyona bağlı sinerjiyi arttırmak.

Bölgesel kemoterapinin farmakokinetik yararını arttırmak için kullanılan yöntemler şöyle sıralanabilir;

- a- Kullanılan farmatösötiğin uygulandığı organda dolaşımdan temizleniyor olması. Örneğin karaciğerden ilk geçişte metabolize olan ilaçlar hepatik arter ve portal ven yolu ile verildiğinde hepatik konsantrasyonları çok yüksek olacağı için bu organda etkin düzeylere ulaşabilmektedir.

b- İlacın bölgesel perfüzyon ile dokuya alınıp kullanılarak sistemik dolaşıma sonradan katılması ve ardından tekrar sistemik yolla dokuya ulaşarak tümörlü dokuyla ilacın daha uzun süre temasının sağlanması.

c- Lokal verilen bir ilacın sistemik dolaşıma katıldıkça görülebilecek yan etkilerini azaltabilmek için sistemik yoldan da antagonistinin verilmesi. Örn. İntratekal metotreksat uygulaması esnasında sistemik lökovorin verilmesi.

d- İlaç verilen organın kan dolaşımının yavaşlatılarak ilacın uzun süre kalmasını sağlamak. Örn. Hepatik arter yoluyla ilaç verildiğinde nişasta mikrosferler kullanılması.

2.2.6 İntratekal Kemoterapi

Leptomeninks; dura mater, araknoid zar, pia mater ve serebrospinal sıvı dolaşımının olduğu subaraknoid alanı içeren yapıdır. Leptomeninkse uygulanan bölgesel kemoterapinin amacı bilinen bir leptomenenjial kanserin tedavisi olabileceği gibi, leptomenenjial metastaz oranı yüksek olan sistemik bir kanserin yayılımının önlenmesi de olabilir.

Leptomenenjial ilaç kullanımı ilk kez enfeksiyöz menenjit tedavisinde frontal kemikte açılan deliklerden perkütan antibiyotik uygulaması ile başlamıştır.⁴⁰ Sanson ve arkadaşları 1954'de ilk intratekal kemoterapi uygulamalarını o günlerde kullanımda olan hardal gazı dışındaki tek antineoplastik ajan olan antifolatlarla yapmış ve sonuçlarını bildirmişlerdir. 1968' de ise ilk intratekal metotreksat kullanımı leptomenenjial meme karsinomatozisinde kullanılmış ve sonuçları yayınlanmıştır. Daha sonra intratekal sitozin arabinozid ve thio-TEPA kullanımları 1970'lerin başlarında denenmiş ve olumlu sonuçları yayınlanmıştır.⁴¹ İntratekal kombinasyon kemoterapileri 1980'lerde denenmiş ancak tek ajanlı tedaviye üstünlükleri gösterilememiştir.^{42,43} Subkütan Ommaya rezervuarları ise zamanla intratekal kemoterapide intraventriküler ilaç uygulaması için tercih edilen yöntem haline gelmiştir.

Preklinik deneyler, intratekal uygulamalar ile serebrospinal sıvıda ulaşılan yüksek ilaç konsantrasyonlarına rağmen, verilen antineoplastik ajanın tümör yüzeyinden ancak 2-3 mm derine ulaşabildiğini göstermiştir. Yapılan hesaplamalar, 5mm'den büyük tümörlerde lokal kemoterapi ile ilacın yeterli derinliğe ulaşamayacağını göstermiştir.⁴¹

Çeşitli araştırmacılar intratekal kemoterapide ilacın santral sinir sistemindeki etkinliğini yükseltebilmek için değişik protokoller uygulamışlardır.^{44,45} Nörotoksisiteyi azaltmak ve ilacın hücre döngüsüne özel etkinliğini daha etkili kullanabilmek için metotreksatla da bu tür çalışmalar yapılmıştır. Bir çalışmada hastaların bir grubuna 12mg/m² metotreksat intratekal yoldan haftada 2 kez verilirken diğer gruba 12 saatte bir 1mg olmak

üzere 6 doz metotreksat, ilaç konsantrasyonu lomber serebrospinal sıvıda 0.5 µmol/l nin altına düşmeyecek şekilde doz ayarlaması yapılarak intratekal uygulanmış. Sonuçta akut çok yüksek konsantrasyonlara ulaşılmadan, 1 µmol/l olan etkinlik sınırının kemik iliği baskılanması ve nörotoksisite oluşmadan sağlanabildiği görülmüştür. Bu konsantrasyon x zaman hesaplaması ile nörotoksisite azaltılabilmiş ancak etkinlik arttırılamamıştır.⁴⁶

Intratekal metotreksat uygulamasında en sık görülen yan etki % 40'lara varan görülme sıklığı ile aseptik menenjitir. Doza bağlı olarak, genellikle birkaç haftada düzelen myelopati veya ensefalopati de sık görülmektedir. Intratekal kemoterapiyle beraber kranial radyoterapi de alan hastalarda ise ilerleyici demansla seyreden gecikmiş lökoensefalopati görülebilir. Gecikmiş lökoensefalopatinin görülme sıklığının % 10 civarında olduğu düşünülürken son yapılan çalışmalarda, intratekal ve sistemik metotreksat, intravenöz sitarabin ve tüm beyine radyoterapi uygulanan HIV(-) primer santral sinir sistemi lenfomalı hastalarda bu oranın %30'lara vardığı görülmüştür.⁴¹

2.3 Oftalmolojide Lokal Tedavi

2.3.1 İntravitreal İlaç Uygulamaları ve farmakokinetik⁴⁷

Intravitreal ilaç uygulamasının ilk örnekleri 1040'larda deneysel stafilokoksik endoftalmiyi tedavi eden toksik olmayan penisilin dozunu saptayan Von Sallmann ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalardır.

Yaklaşık iki dekad sonra Dr. Peymann ve arkadaşları, intravitreal uygulanan bazı antibiyotiklerin toksik olmayan dozlarını saptayan gözlem, histolojik çalışmalar, vitreus örnekleri ve ERG takiplerine dayanan çalışma ile bu günkü endoftalmide lokal tedavi protokollerinin temelini oluşturmuşlardır

Farmakokinetik; ilaçların verildiği doku ya da canlıda *in vivo* absorpsiyon, dağılım, biotransformasyon ve atılım olaylarını inceleyen bilim dalıdır.⁴⁸

Bir ilaç grubunun klinik uygulamaya girmeden önce; ilacın toksik olmayan dozunun ortaya konması için, klinik gözlem, ERG, elektron ve ışık mikroskobu ile yapılacak histopatolojik araştırmalar, ilacın yarılanma ömrü ve vitreusdan uzaklaştırılma sürecinin belirlenmesi çalışmalarının tamamlanması gereklidir.

Oküler farmakokinetik çalışmalarda esas; doku ya da oküler sıvılardaki ilaç konsantrasyonlarının saptanması olup, insanda bu tür çalışmalar son derece kısıtlıdır. Bu nedenle insan oküler farmakokinetik çalışmaları hiçbir zaman kesin olmayıp sıklıkla hayvan

çalışmalarına, sintigrafik çalışmalara ya da katarakt ve vitreus cerrahileri sırasında alınan sıvı örneklerine dayanmaktadır.

Hayvan deneylerinde maymun ve köpek çalışmalarının sonuçları daha gerçeğe yakın olmalarına rağmen daha ekonomik ve bakımlarının kolay olmaları nedeniyle sıklıkla tavşanlar tercih edilmektedir.

Intravitreal uygulanan ilaçlar, enjeksiyonu takiben hızla yayılır ve homojen bir dağılım gösterirler. Bu nedenle enjeksiyonu takiben elde edilecek en yüksek konsantrasyon, verilen dozun vitreus hacmine bölünmesi ile hesaplanabilir.

Erişkin insanlarda 4-5 ml olan vitreus hacmi, deney hayvanlarından tavşanlarda 1.2- 1.5 ml, maymunlarda ise 3-4 ml olarak hesaplanmıştır.⁴⁹

Vitreus sıvısından ilaçların uzaklaştırılması iki ana yoldan olmaktadır:

A- Ön yol; lens etrafından, zonüller arasından ön kamaraya geçiş ve Schlemm kanalı boyunca episkleral yolla ilacın venöz dolaşıma katılmasıdır. Aminoglikozidler ve intravitreal uygulanan ilaçların büyük kısmı tamamen difüzyona dayalı bu yolla elimine olurlar ve yarı ömürleri retina yoluyla elimine olan ilaçlara göre daha uzundur.

B- Arka (retinal) yol; bu yolun temel farklılığı aktif taşıma oluşudur. Eliminasyonda en etkili iki doku ise iç ve dış kan-retina bariyerleridir. Geniş yüzey alanı, difüzyon mesafesinin kısalığı ve aktif transport pompasının varlığı nedeniyle bu yolla elimine edilen ilaçların yarı ömrü daha kısadır. Retinal yolla elimine edilen ilaçların aköz konsantrasyonları ön yolla elimine edilen ilaçlara oranla daha azdır.

İnflamasyon ilaçların yarı ömrünü ve eliminasyon zamanlarını etkileyen önemli bir faktördür. Ön yolla elimine olan ilaçlar (aminoglikozidler gibi), inflamasyon varlığında daha kısa sürede elimine olurlar. Retinal yolla elimine olan ilaçlarda (sefalosporinler gibi) ise inflamasyonun etkisi daha karmaşıktır. İnflamasyon, aktif transport pompa fonksiyonunda azalmaya ve ilaç yarı ömründe uzamaya yol açarken, inflamatuvar sızıntılar sebebiyle de eliminasyonda artış meydana gelmektedir. Buradaki net etki ise yarı ömrün uzaması şeklindedir.

İlacın farmakokinetiğini etkileyen diğer bir faktör ise anatomik bütünlüktür. Gözün vitrektomize, fakik, afakik veya psödofakik olması değişik şekillerde ilaç farmakolojisini etkileyecektir.⁵⁰

Lokal kemoterapötik ajan kullanımında tedavi edici dozun devamını tekrarlayan intravitreal enjeksiyonlarla sağlamak gerekebilir. Intravitreal enjeksiyon sırasında

gelişebilecek lens yaranmaları, retinal yırtıklar, enfeksiyon, kanama gibi komplikasyonlar enjeksiyon sonrası elde edilen en yüksek ilaç konsantrasyonunun toksisiteye yol açmasına sebep olabilirler.

2.3.2 Metotreksat (amephopterin, MTX)

Antimetabolit grubundan günümüzde kullanımı devam eden tek folat analogudur. Kimyasal yapısı N-[4-[(2,4-diamino-6-pteridinil)metil]metilamino] benzoil] -L- glutamik asid, (C₂₀H₂₂N₈O₅) olup, molekül ağırlığı 454.44 gr'dır.⁵¹

Diğer antimetabolitlerde görülen lineer olmayan doz-etki ilişkisi 5-FU ve metotreksatta görülmez; doz arttırıldıkça ilacın etkinliği artar. MTX, folik asidin 4-amino, 10-metil analogu olup, dihidrofolat redüktaz enziminin sıkı bağlanan bir inhibitörüdür. Dihidrofolat redüktaz, indirgenmiş hali ile hücre içi folat rezervlerini korumada önemli bir enzimdir. Tetrahidrofolat sentezinin inhibisyonu DNA, RNA ve ATP sentezi için gerekli pürin bazlarının sentezinin durmasına yol açar; ayrıca protein sentezinin bozulmasına neden olur. Metotreksat, S dönemindeki hücreler üzerine sitotoksik etki yapar. Metotreksatın toksik etkileri, dışarıdan ilaç olarak verilen folinik asid (N⁵ – tetrahidrofolat) tarafından antagonize edilir; folik asid bu durumda tetrahidrofolata dönüşemediğinden antidot etkinlik göstermez.^{52,53}

Metotreksatın hücre içinde dihidrofolat redüktazı indüklemesine bağlı olarak tümör hücresinde ilaca karşı direnç gelişebilir.

Oral kullanımda (0.1 mg/kg) ilacın tama yakını emilir. Plazma proteinlerine zayıf ve nisbeten düşük oranda (%50) bağlanır. Sülfonamidler ve salisilatlar beraber verildiğinde ilacın proteinlere bağlanma oranını azaltır ve toksisitesini arttırır. İntravenöz uygulandığında yarılanma ömrü 7.2 (±2,3) saatdir. Metotreksat; karaciğer, böbrek ve tümör hücrelerinde uzun süre bağlı kalır. Tümör hücrelerinde bu özellik latent sitotoksik etki yaratarak tedaviye katkı sağlar. İlaç, sistemik kullanıldığında santral sinir sistemine geçemez, itrahi ise böbreklerden olur.^{52,53}

Metotreksat antiinflamatuvar etkinliği sebebi ile non steroid antiinflamatuvar ilaçlara cevap vermeyen, enfeksiyöz olmayan kronik inflamatuvar hastalıkların tedavisinde de etkin olarak kullanılmaktadır. İlk kez 1965 yılında oküler inflamasyon sebebi ile metotreksat kullanımı denenmiş ve altı hastaya intravenöz yolla 6 hafta boyunca haftada 4 gün ilaç uygulanmıştır. Hastaların hepsinde inflamasyonun baskılanması sağlanırken dördünde geçici hepatotoksisite geliştiği bildirilmiştir.⁵⁴ Romatoloji ve dermatoloji birimlerince yapılan

Çalışmalarda daha aralıklı olarak düşük doz metotreksat kullanımının daha az toksisiteye yol açtığı bildirilmektedir.^{55,56,57} Günümüzde enfeksiyöz olmayan kronik üveitlerin ve immünolojik oküler patolojilerin tedavisinde de sistemik metotreksat kullanımı yaygınlaşmaktadır.^{58- 62}

Kemik iliğı depresyonu, ağız ve barsak mukozasında ülserasyon en sık görülen yan tesirlerdir. Hepatotoksik ve nefrotoksik etkileri vardır, akciğerlerde infiltrasyon yapabilir.^{52,53} Uzun süreli sistemik kullanımına bağı optik nöropati gelişen olgular bildirilmiştir.⁶³

Metotreksatın oral, intravenöz, intramusküler ve intratekal yollardan kullanımı rutin tedavi protokollerinde yer almakta, son zamanlarda yayınlanan intravitreal uygulama ile ilgili çalışmalar ise yakın zamanda oküler lokal uygulamaların da tedavi yöntemleri arasında yerini alacağını düşündürmektedir.



3. MATERYAL METOD

İntravitreal metotreksat enjeksiyonunun farmakokinetiği ve tekrarlayan enjeksiyonların retina üzerindeki olası toksik etkisi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde, ağırlıkları 1500 ile 2500 gram arasında değişen 25 erişkin, dişi ve erkek, beyaz Yeni Zellanda tavşanının 50 gözünde etik kurul onayı alınarak araştırıldı. 23 tavşan çalışma grubuna alınırken 2 tavşan kontrol grubu olarak değerlendirildi.

İntravitreal metotreksat enjeksiyonunun yer aldığı, insanlardaki klinik çalışmalarda genellikle en yüksek doz olarak 400µg kullanılmaktadır. Metotreksatın antineoplastik etkisinin doz arttırıldıkça arttığı bilinmektedir. Tedavi sürecinde tekrarlayan intravitreal ilaç enjeksiyonlarının sayısının ve sıklığının azaltılabilmesi amaçlanarak; tavşan gözünde yapılan bu deneysel çalışmanın daha yüksek bir dozla uygulanması planlandı. İki bölüm halinde yapılan çalışmanın birinci bölümünde 800µg metotreksatın intravitreal enjeksiyonunun farmakokinetiği, ikinci bölümünde ise ilaca bağlı oluşabilecek retinal harabiyet araştırıldı.

3.1 İntravitreal Metotreksat enjeksiyonunun Farmakokinetiği

Çalışmanın birinci bölümünde intravitreal metotreksat enjeksiyonunun vitreusdaki farmakokinetiği 21 tavşanın 42 gözünde araştırıldı. Tüm tavşanlardaki muayene ve cerrahi uygulamalar, otuzbeş mg/kg ketamin hidroklorid ve 5 mg/kg xylazin hidrokloridin intramusküler enjeksiyonu ile genel anestezi altında gerçekleştirildi. Tavşanların her iki gözüne %2.5 fenilefrin HCL (Mydfrin, Alcon Lab. Tic. A.Ş) ve % 1 tropikamid (Tropamid Forte, Bilim İlaç San. ve Tic.) içeren damlalardan birer damla damlatıldıktan 15 dakika sonra kapaklara blefarosto koyularak ön segment, vitreus ve retina muayeneleri indirekt oftalmoskop (Heine Omega 180, Almanya) ile yapıldı.

Koruyucu madde içermeyen 50 mg/ 2 ml metotreksat (Methotrexat "Ebewe", Liba Lab. A.Ş) 4.25 ml distile su ile dilue edilerek 8mg/ml metotreksat elde edildi. Genel anestezisi devam eden tavşanların her iki gözüne %0.4'lük oksibuprocaine sodyum (Benoxinate %0.4 Thilo, Liba Lab. A.Ş.) damlatıldı. Hazırlanan solüsyondan 0.1'er ml (800 µg, 1.76 µmol metotreksat) 26 gauge insülin enjektörü ile tavşanların her iki gözünde vitreus içerisine enjekte edildi. İntravitreal enjeksiyon için limbusdan 3 mm geriden üst temporal kadrant kullanıldı. Enjeksiyon sonrası tavşanların oküler basınç ölçümleri ve retina muayeneleri tekrarlandı.

İlaç enjeksiyonunu takiben 30. dakika, 4.5, 6, 9, 24.5, 53.5 ve 72.5'uncu saatlerde üçer tavşanın enjeksiyon öncesi uygulandığı şekilde genel ve topikal anestezi altında retina muayeneleri tekrarlanıp oküler basınçları ölçüldü. Cerrahi limbusdan 3 mm geriden tekrar 26 gauge insülin iğnesi ile vitreus içerisine girilip 200 µl vitreus içeriği aspire edildi.

Metotreksat düzeylerini belirlemek amacıyla aspire edilen vitreus örnekleri ependorf tüplerine alınarak ölçüm yapılana dek -70 C°'de saklandı. Vitreus sıvısında metotreksat düzeyleri floresan polarizasyon immunoassay (TDx/FLx, Abbott laboratories) yöntemi ile belirlendi.

Cerrahi işlemler sonrasında tavşanlara yüksek doz intravenöz anestezi verilerek ötenazi uygulandı.

Floresan polarizasyon immunoassay: Bu teknik aynı ortamda bulunan polarize ışığı emen floresan işaretli antijen ve düzeyi ölçülecek antijenin özgül antikor ile reaksiyona girme yarışı esasına dayanmaktadır. Kullandığımız sistem manuel dilüsyona gerek duyulmadan 1000 µmol/L ile 0.01µmol/L aralığındaki konsantrasyonlarda ölçüm yapabilmektedir. İlaç düzeyi ölçülecek örneklerden 50- 80 µl mikropipetle alınarak cihazın test küvetine aktarılır ve cihaz otomatik olarak doğru konsantrasyonu bulana dek 1:1, 1: 10, 1: 100 ve 1: 1000 dilüsyonda örnekler hazırlayarak örneğin konsantrasyonunu µmol/L cinsinden ölçer.

Çalışmamızda 1000 µmol/L' den yüksek çıkan 30 dakikalık ölçümlerde 100 µlt vitreus mayii 100 µlt distile su ile mikropipet kullanılarak manuel 1:1 oranında dilue edilip cihazın küvetine kondu ve 1:1000' lik otomatik dilüsyon programı ile ölçüldü. Çıkan rakamsal değer iki katı alınarak vitreus örneğindeki metotreksat düzeyleri µmol/L cinsinden bulundu.

İlaç düzeyi hesaplamalarında intravitreal enjeksiyondan sonra ilacın homojen dağılımının olması için beklenen ve ilk doz ölçümü yapılan 30. dakika başlangıç, yani 0,01 zaman kabul edildi. Daha sonra ölçüm yapılan saatler ise hesaplamalarda 4., 5,5, 8,5, 24, 53 ve 72' nci saatler olarak yer aldı.

İstatistiksel hesaplamalar SPSS 10.1 programı kullanılarak yapıldı.

3.2 İntravitreal metotreksat enjeksiyonunu takiben erken dönemde ve tekrarlayan enjeksiyonlardan sonra uzun dönemde retinada oluşabilecek değişikliklerin tesbiti

Çalışmanın birinci bölümünde 24., 53. ve 72. saatlerdeki ilaç düzeyi belirlemesi için vitreus içeriği aspire edilen 9 tavşandan her ölçüm grubundan 2'şer tane olmak üzere toplam 6 tavşanın 12 gözü metotreksatın erken dönem retinal toksisitesini belirlemek amacıyla çalışmanın ikinci bölümüne dahil edildi.

Vitreus aspirasyonunu takiben limbusdan 3 mm geriden saat 3 ve 9 hizasından 23 gauge iki enjektör ile vitreusa girilerek %5 lik gluteraldehid enjeksiyon-aspirasyonu ile dokulara lokal perfüzyon uygulandı. Dokular sertleşip perfüzyon tamamlanınca tavşanların gözlerine enükleasyon yapıldı.

Metotreksatın kümülatif uzun dönem toksisitesinin belirlenmesi amacı ile 2 tavşanın 4 gözüne 7 günlük aralıklarla 4 kez 800'er µg intravitreal metotreksat enjeksiyonu yapıldı. Son enjeksiyonu takiben 30. günde genel anestezi altında tavşanların gözlerine lokal perfüzyon uygulanarak enükleasyon yapıldı.

Tekrarlanan cerrahi girişime bağlı oluşabilecek retinal harabiyetin belirlenerek ilaca bağlı oluşabilecek harabiyetden ayırd etmek için kontrol grubu olarak bir tavşanın 2 gözü kullanıldı. Enjeksiyon öncesi indirekt oftalmoskop ile ön segment, vitreous ve retina muayeneleri yapılan, tonopen ile göz içi basıncı ölçülen tavşanın her iki gözüne 0,1 ml dengeli tuz solüsyonu, cerrahi limbusdan 3mm geriden üst temporal kadran kullanılarak vitreus içerisine enjekte edildi. İntravitreal dengeli tuz solüsyonu enjeksiyonu 7 gün arayla 4 kez tekrarlanıp son enjeksiyondan 30 gün sonra tavşanın gözlerine çalışma grubuna uygulanan perfüzyon ve cerrahi işlemler uygulanarak enükleasyon yapıldı. Bir tavşana ise histopatolojik inceleme ve oluşabilecek histopatolojik örnekleme hatalarının belirlenmesi amacıyla genel anestezi altında lokal perfüzyon ve enükleasyon yapılarak intakt retina preparatları hazırlandı.

Çalışma kapsamındaki tavşanlara cerrahi işlemlerin tamamlanmasından sonra intravenöz yüksek doz anestezik ajan enjeksiyonu ile ötenazi uygulandı.

Histopatolojik inceleme için enükle edilen gözler pars planadan perfore edildi. Ön segment yapıları ayrıldı. Geride kalan dokular; retina, koroid ve skleral blok iki eşit parçaya kesilerek ışık ve elektron mikroskobik inceleme için örnekler hazırlandı.

Histopatolojik sonuçlar incelenirken intravitreal metotreksat enjeksiyonunu takiben 24,5. saate hazırlanan kesitler birinci gün, 53,5. saatte hazırlanan kesitler ikinci gün, 72,5. saatte hazırlanan kesitler ise 3. gün olarak kabul edildi.

Işık Mikroskopi Yöntemleri: Doku parçaları alındıktan hemen sonra nötral %10'luk formalin içerisine konuldu. Formalin solüsyonu içerisindeki dokular iki kez solüsyon değiştirilerek 48-72 saat süreyle tespit edildi. Tespit sonrası doku parçaları alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Sıvı parafin içerisine infiltre edildikten sonra parafin içerisine gömüldü. Parafin bloklardan 4-6 mikron kalınlığında histolojik kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen-Eozin ile boyandı ve x400 büyütmede Nikon Optiphot trinoküler ışık mikroskopunda resimleri çekildi.

Elektron Mikroskopi Yöntemleri:⁶⁴

Elektron mikroskobik değerlendirme için alınan retina, koroid ve sklerayı içeren doku örnekleri hemen Milloning fosfat tamponu ile hazırlanmış %5'lik gluteraldehid solüsyonuna yerleştirildi. Bir saat kadar bekletilerek tespit edilen doku parçaları, içinde bir miktar %5'lik gluteraldehid bulunan, dibi dişçi mumu ile kaplanmış petri kutularına alındı. Jilet yardımıyla yaklaşık 1mm³ büyüklükte parçalara ayrıldı. Doku parçaları tekrar gluteraldehid solüsyonuna alınarak 3 saat kadar tespit edildi. Böylece dokular toplam dört saat tespit edilmiş oldu. Daha sonra dokular Milloning fosfat tamponuna alınıp 10 dakika çalkalandı, yeniden hazırlanan aynı tampon içerisinde bir gece bekletildi. Dokular ertesi gün Milloning fosfat tamponu ile hazırlanmış %1'lik osmium tetroksit solüsyonu ile ikinci kez tespit edildikten sonra, Milloning fosfat tamponu ile iki kez onar dakika yıkandı.⁶⁵ Tüm bu işlemler buzdolabında +4 °C'de gerçekleştirildi. Dokular daha sonra aşağıdaki sıraya göre dehidrate edildi:

1. %50 Etil alkolde +4°C'de 15 dakika
2. %70 Etil alkolde +4°C'de 15 dakika
3. %86 Etil alkolde +4°C'de 15 dakika
4. %96 Etil alkolde +4°C'de 15 dakika
5. %100 Etil alkolde +4°C'de 10 dakika
6. %100 Etil alkolde +4°C'de 10 dakika
7. %100 Etil alkolde oda ısısında 10 dakika
8. Propilen oksitte oda ısısında 15 dakika
9. Propilen oksitte oda ısısında 15 dakika

Dehidrate edilen doku parçaları daha sonra aşağıdaki solüsyonlar içerisinde immerse edildi:

Bir kısım propilen oksit + bir kısım gömme materyali: 30 dakika

Bir kısım propilen oksit + bir kısım gömme materyali: 30 dakika

Bu işlemlerden sonra doku parçaları içerisinde yeni hazırlanmış gömme materyali (resin) bulunan tüplere alındı ve bir gece süreyle rotatorda karıştırıldı.

Ertesi gün doku parçaları taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak 00 polietilen kapsüllere gömüldü ve 60°C etüvde 48 saat süre ile polimerize edildi. Daha sonra elde edilen bloklar etüvden çıkarılarak yavaş yavaş soğumaya bırakıldı. Bloklardan Reichert Ultracut S ultramikrotomu ile 500 A° kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 200-300 gözenekli bakır gridlere toplandı ve %70'lik etil alkolde doymuş uranil asetat ve Reynolds'un kurşun sitrat solüsyonları ile boyandı. Boyanan kesitler Zeiss E.M 10 B elektron mikroskobu ile incelendi. Mikrograflar Dupont filmleri ile çekildi. Resimler fohar ve fortezo kağıtlarına basıldı. Ayrıca elektron mikroskop öncesi ultramikrotomda alınan bir mikron kalınlığındaki yarı ince kesitler, toluidin mavisi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi ve elektron mikroskopik inceleme için uygun alanlar belirlendi.

4. BULGULAR

İntravitreal metotreksat enjeksiyonu öncesinde yapılan muayenede tavşanların her iki gözlerinde de kornea, ön segment ve lens yapılarının normal olduğu ve retinanın tamamen aydınlandığı görüldü. Optik diskin tavşanda hafif yukarıda yerleşimli olduğu ve derin bir çukurluğa sahip olduğu izlendi. Diskden çıkan retinal damarlar lateral ve mediyale doğru uzanıyorlardı. Göz içi basınçları 8-16mmHg arasında ortalama 11.8mmHg (± 1.8) bulundu. Metotreksat enjeksiyonunu takiben ölçülen göz içi basınçları ise 17-36mmHg arasında, ortalama 23.5mmHg (± 4.7) idi. İntravitreal enjeksiyonun ardından tavşan gözlerinin çoğunda göz içi basınç artışına bağlı korneal ödem geliştiği görüldü. Sekiz gözde ödemden dolayı retinal yapılar seçilemezken diğer gözlerde korneal ödem retinal yapıların ve optik diskin izlenmesini engelleyecek kadar yoğun değildi. Korneal ödemin dördüncü saatten itibaren azalmaya başladığı, yirmidördüncü saate ise indirekt oftalmoskopi ile fark edilmeyecek düzeye indiği görüldü. Enjeksiyon yapılan 48 gözden 11' inde enjeksiyon bölgesinde minimal retinal hemoraji izlenirken bunlardan 4' ünde hemorajinin enjeksiyon bölgesinde lokal olarak vitreusa dağıldığı görüldü. Ancak hemorajinin miktarı retinanın görülmesini engellemiyordu. Gözlerden hiçbirinde rehemoraji ve membran oluşumu izlenmedi.

Vitreusda metotreksat düzeyi belirlenen ve ilk 3 günde takipleri tamamlanan gözlerde katarakt oluşumu izlenmedi. Ancak dörder kez intravitreal enjeksiyon yapılarak 30 gün beklenen grupta; kontrol grubundaki bir tavşanın bir gözünde ve deney grubundaki iki tavşandan birinin her iki gözünde katarakt geliştiği görüldü. Lens opasifikasyonunun arka subkapsüler ve enjeksiyon bölgesine yakın kortikal segmentten başladığı dikkat çekti.

4.1 İntravitreal Metotreksat enjeksiyonunun Farmakokinetiği

Çalışmanın birinci bölümünde intravitreal uygulanan 800 μ gr metotreksatın farmakokinetiğini incendi. Metotreksatın molekül ağırlığı 454.5 gr baz alınarak hesaplamalar yapıldığında uygulanan miktarın 1.76 μ mol olduğu belirlendi. İlaç miktarı tayininde kullanacağımız ölçü birimi mol/L, yani molarite (M) olduğundan ilk ölçümümüzü başlangıç zamanı (0,01 saat) kabul ettik. Otuzuncu dakika ölçümümüz 1105.58 μ M ile 1598.28 μ M arasında olup ortalama 1321.9033 μ M ($\pm 185,5879$) idi. Otuzuncu dakika ölçümleri başlangıç kabul edilerek;

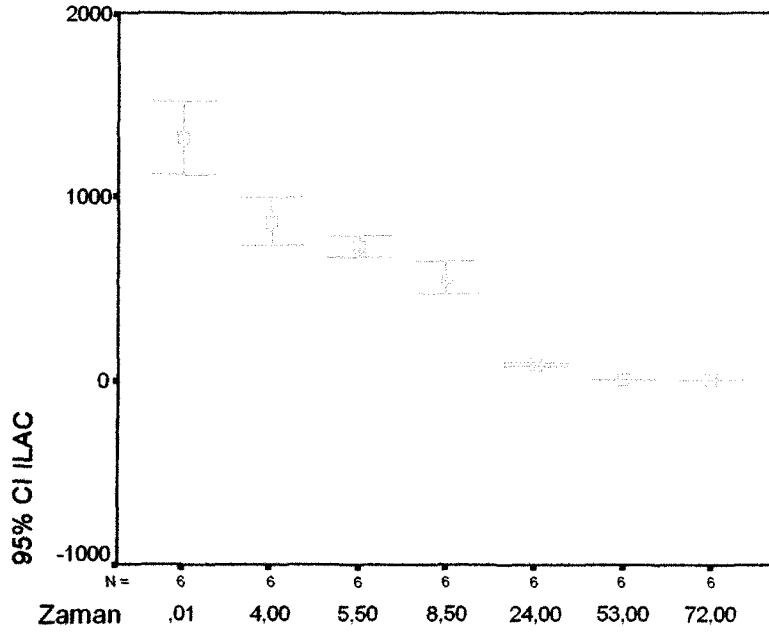
V_d = uygulanan ilaç miktarı / tesbit edilen konsantrasyon

formülü ile sanal dağılım hacmi hesaplandı. Metotreksatın intravitreal enjeksiyon sonrası tavşan gözündeki ortalama dağılım hacminin 1.33 cc olduğu saptandı.

Enjeksiyon sonrası otuzuncu dakika başlangıç kabul edilerek yapılan ölçümlerde vitreus mayiinde metotreksat konsantrasyonları; 4'üncü saatte 669.80 μ M ile 977.16 μ M arasında, ortalama 865.1100 μ M ($\pm$ 124,8974), 5,5'üncü saatte 657.61 μ M ile 816,54 μ M arasında, ortalama 729,7667 μ M ($\pm$ 59,0386), 8,5'üncü saatte 477,89 μ M ile 689,31 μ M arasında, ortalama 562,4767 μ M ($\pm$ 82,9266), 24'üncü saatte 74,65 μ M ile 99,30 μ M arasında, ortalama 85,3967 μ M ($\pm$ 9,5098), 53'üncü saatte 2,16 μ M ile 4.69 μ M arasında, ortalama 3,1483 μ M ($\pm$ 0,9953), 72'nci saatte ise 0,09 μ M ile 0.35 μ M arasında, ortalama 0,2533 μ M ($\pm$ 0,070) bulundu (Tablo 1, Şekil 1).

Tablo 1. Saatlere göre vitreusda belirlenen metotreksat konsantrasyonları (μ M)

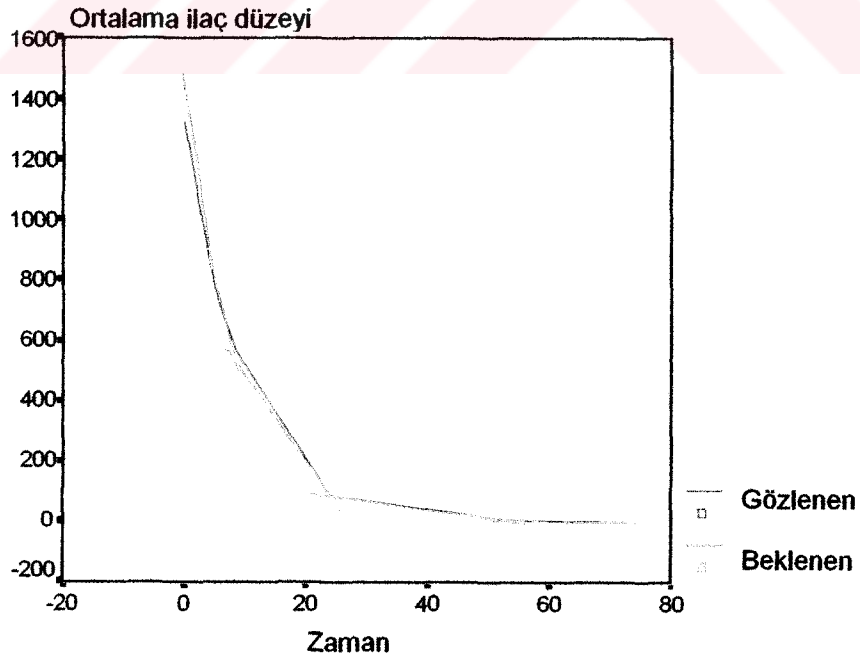
Zaman	Veri sayısı	En düşük (μ M)	En yüksek (μ M)	Ortalama (μ M)	Standart sapma
0,01 saat	6	1105,58	1598,28	1321,9033	185,5879
4. saat	6	669,80	977,16	865,1100	124,8974
6. saat	6	657,61	816,54	729,7667	59,0386
5,5. saat	6	477,89	689,31	562,4767	82,9266
24. saat	6	74,65	99,30	85,3967	9,5098
53. saat	6	2,16	4,69	3,1483	0,9953
72. saat	6	0,09	0,35	0,2533	9,070E-02



Şekil 1. saatlere göre vitreusda belirlenen metotreksat konsantrasyonları.

Üssel eşleştirme yapılarak ilaç düzeyleri ile zaman arasındaki matematiksel bağlantı bulundu (Şekil. 2).

$$\text{İlaç düzeyi} = 1426,73 e^{-0,1182(\text{zaman})}$$



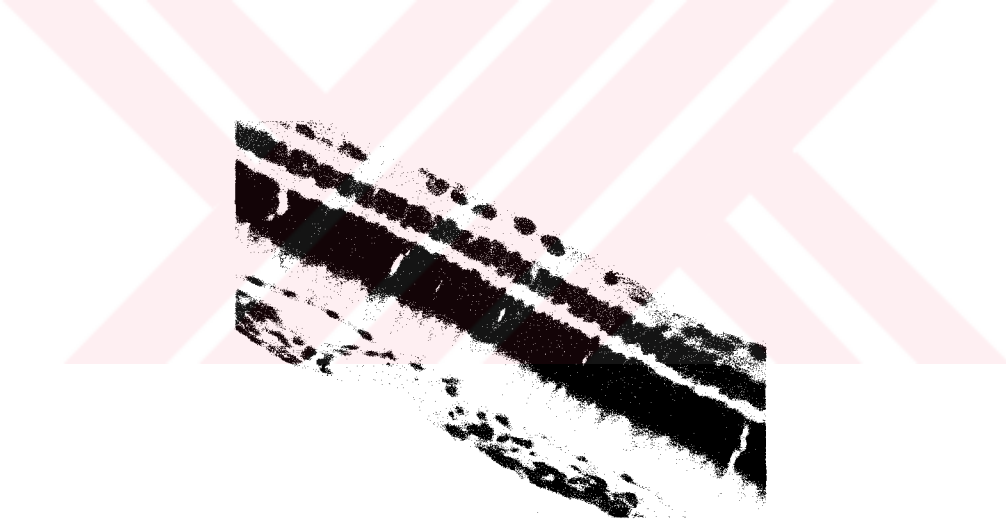
Şekil 2. saatlere göre vitreusda metotreksat düzeylerini belirten eğri ile üssel eşleştirme ile bulunan formülün logaritmik eğrisi.

Bulunan matematiksel bağlantı kullanılarak yapılan hesaplamada metotreksatın intravitreal uygulamasında vitreusda yarılanma ömrünün $5,8629 \approx 5,9$ saat olduğu belirlendi.

4.2 İntravitreal metotreksat enjeksiyonunu takiben erken dönemde ve tekrarlayan enjeksiyonlardan sonra uzun dönemde retinada oluşabilecek değişiklikler

4.2.1 İntakt tavşan retinası

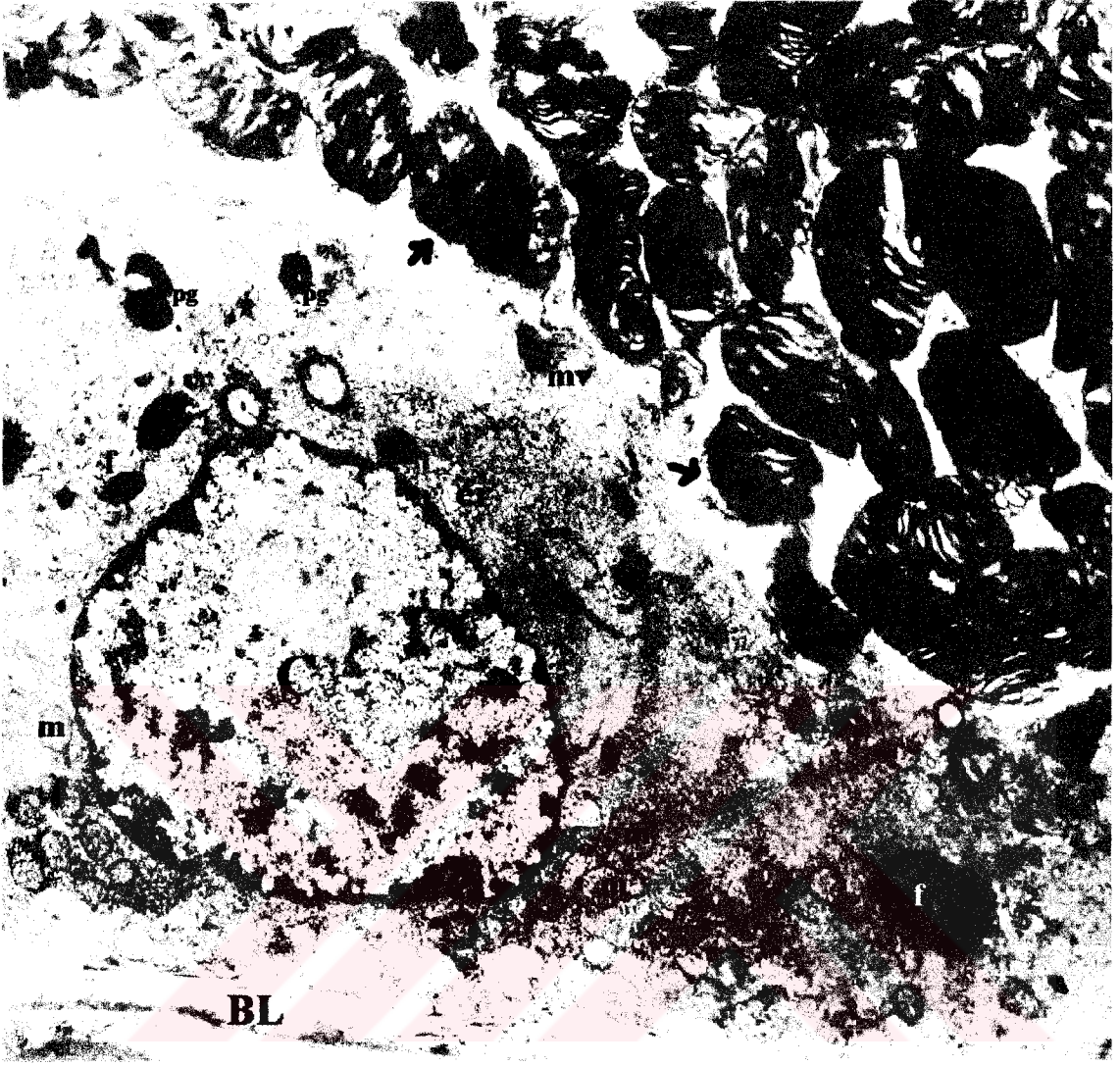
Kullandığımız lokal perfüzyon uygulamasının ardından enükleasyon yönteminin normal tavşan retinasında oluşturabileceği değişiklikleri kontrol edebilmek amacıyla hazırlanmış olan intakt tavşan retinasının ışık mikroskopik incelemesinde; retina pigment epiteli, dış nüklear tabaka, dış pleksiform tabaka, iç nüklear tabaka, iç pleksiform tabaka, gangliyonik tabaka ve sinir lifi tabakaları belirgin olarak görülmekteydi. Dış nüklear tabakada yer alan koni ve rod hücrelerinin retina pigment epiteline doğru uzantıları normal şekilde izlendi. Retina pigment epiteli alt kısımda Bruch membranı üzerine oturmaktaydı, devamında koroideal dokuda kan damarları belirgin olarak görüldü (Şekil 3).



Şekil 3. İntakt tavşan retinasının ışık mikroskopik görünümü. x400.

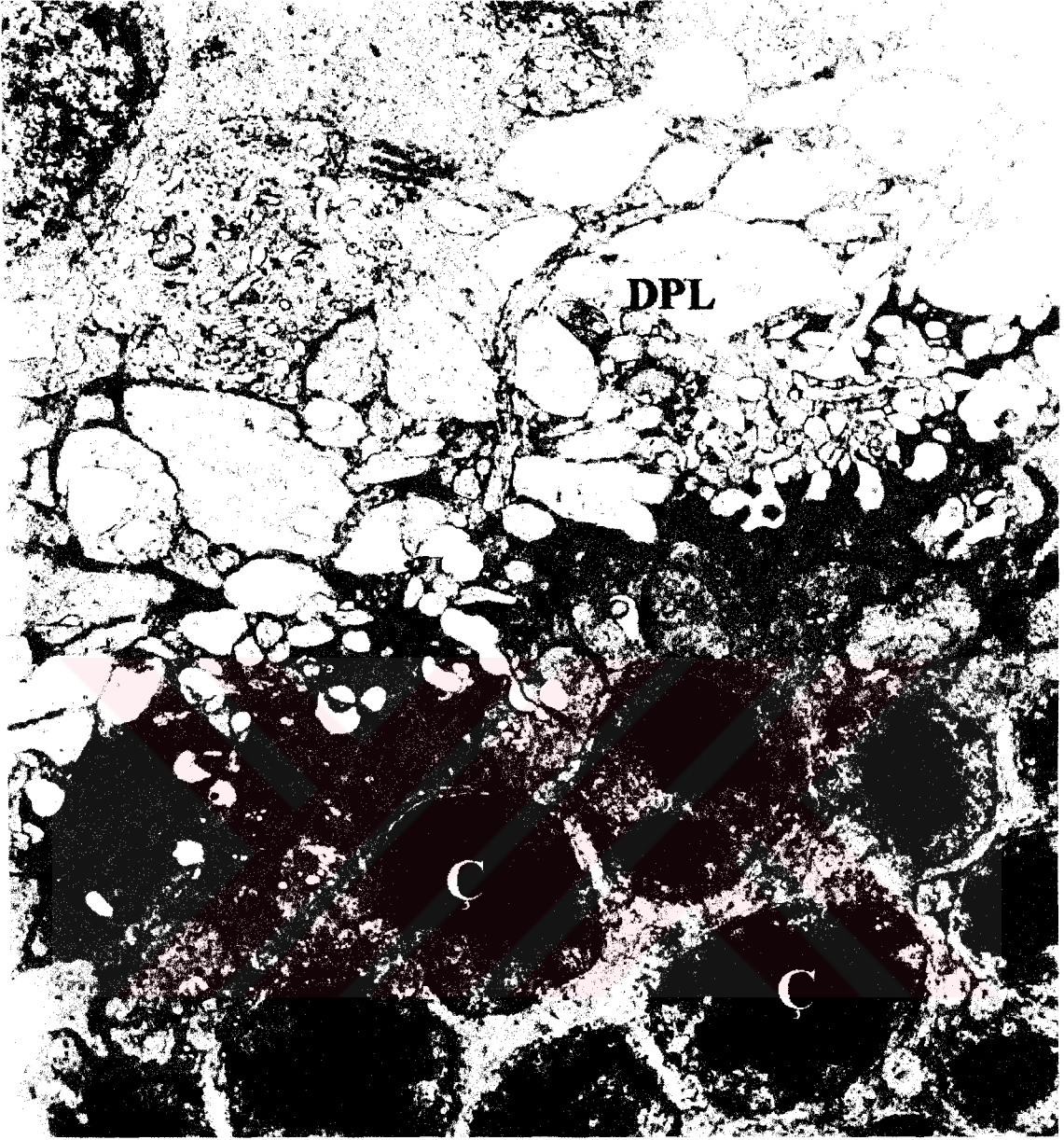
Ultrastrüktürel incelemede ise; retina pigment epiteli, Bruch membranı üzerinde yerleşen tek sıralı hegzagonal hücrelerden oluşmaktaydı. Epitel hücrelerinde çekirdek, oval ya da yuvarlak şekilde hücrenin tabanında yer alıyordu. Hücre sitoplazmasında; agranüler endoplazmik retikulum, mitokondrionlar, granüler endoplazmik retikulum, serbest ribozomlar, lizozomlar, golgi kompleksi ve hücrenin apikal sitoplazmasında az sayıda pigment granülleri de izlendi. Hücreler bir bazal lamina üzerine oturmuştu, hücrelerin apikaline koni ve rod hücrelerinin dış segmentlerinin gömülü olduğu izlendi (Şekil 4).

Koni ve rod hücrelerinin dış segmentlerinin retina pigment epiteli ile birleştikleri ve düzenli bir organizasyon sergiledikleri görüldü. Koni ve rodlarda ultrastrüktürel yapı normaldi ve bu tabakanın üzerinde dış sınırlayıcı membran varlığı izlendi. Dış sınırlayıcı membranın iç kısmında dış nüklear tabakada, hücrelerin çekirdek ve etrafında ince bir sitoplazmanın varlığı ile karakterize oldukları, sitoplazmalarında az sayıda organel içerdikleri gözlemlendi. Hücre çekirdeklerinde kromatinin daha çok merkezi kısımlarda toplandığı, periferik kısımların ise ökromatik bir görünümde olduğu izlendi. Dış nüklear tabakanın iç kısmında yer alan dış pleksiform tabakadaki hücrelerin sitoplazmik uzantılarında, organellerin normal yapıda oldukları gözlemlendi (Şekil 5). Dış pleksiform tabakanın iç kısmında yer alan iç nüklear tabakadaki hücrelerde çekirdek ve sitoplazmik organellerin normal yapıda olduğu görüldü (Şekil 6). İç pleksiform tabaka da normaldi. Gangliyonik tabakada hücrelerin yuvarlak veya oval bir çekirdek ve etrafında büyük bir sitoplazmaya sahip oldukları ve ultrastrüktürel yapılarının normal olduğu izlendi. Hücrelerin ultrastrüktürel özellikleri normaldi. Sinir lifi tabakası ve iç limitan membran da normaldi (Şekil 7).



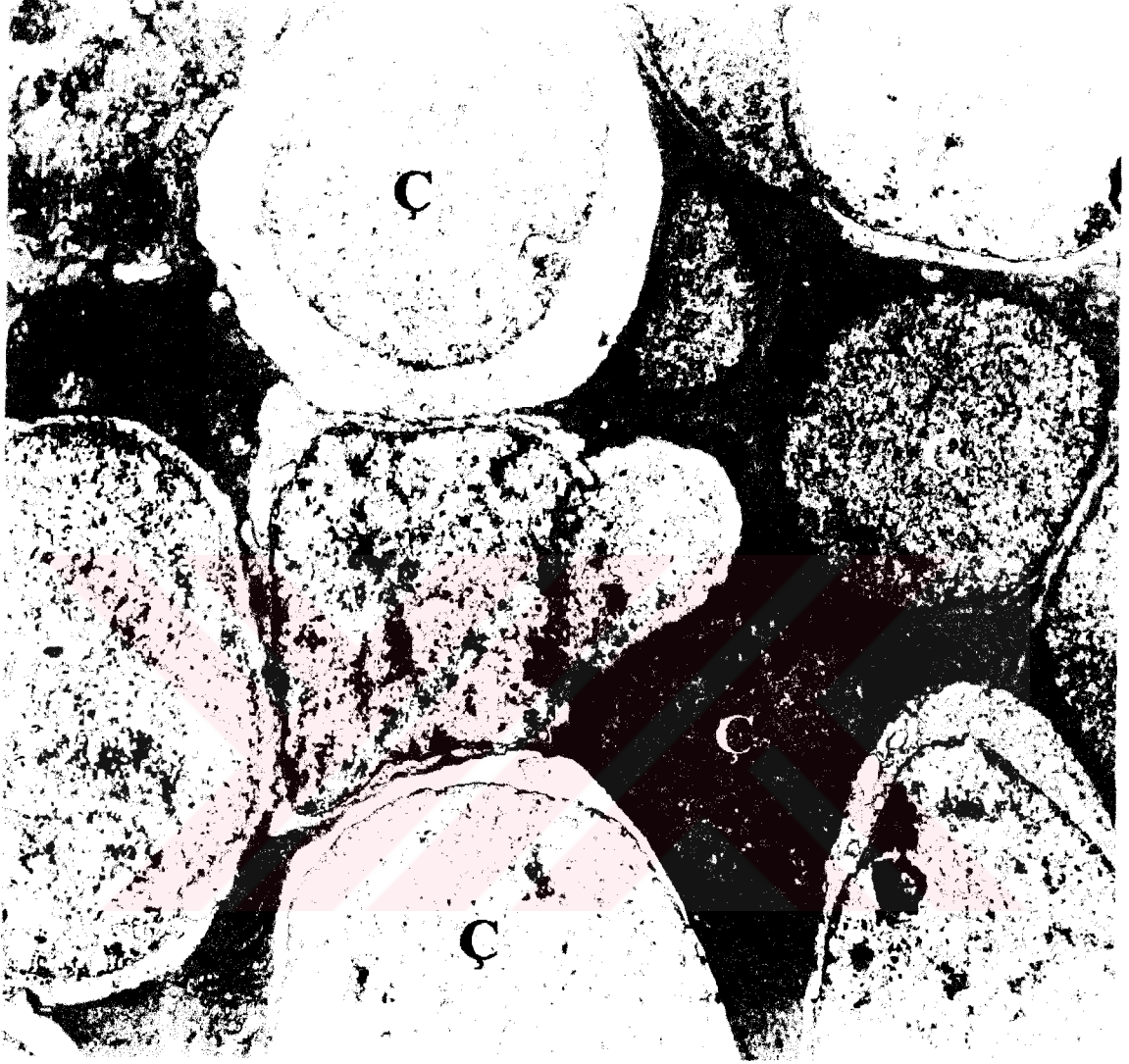
Şekil 4. İntakt tavşan ratinasının elektron mikroskopik görünümü.

Retina pigment epitelinin belirgin bir çekirdek (Ç) ve normal yapıda sitoplazmik organelle sahip olduğu görülmektedir. Mitokondrion (m), endoplazmik retikulum (er), mikrovilluslar (mv), pigment granülü (pg), fagozom (f), bazal lamina (BL), fotoreseptör hücrelerin dış segmentleri (oklar). x12400.

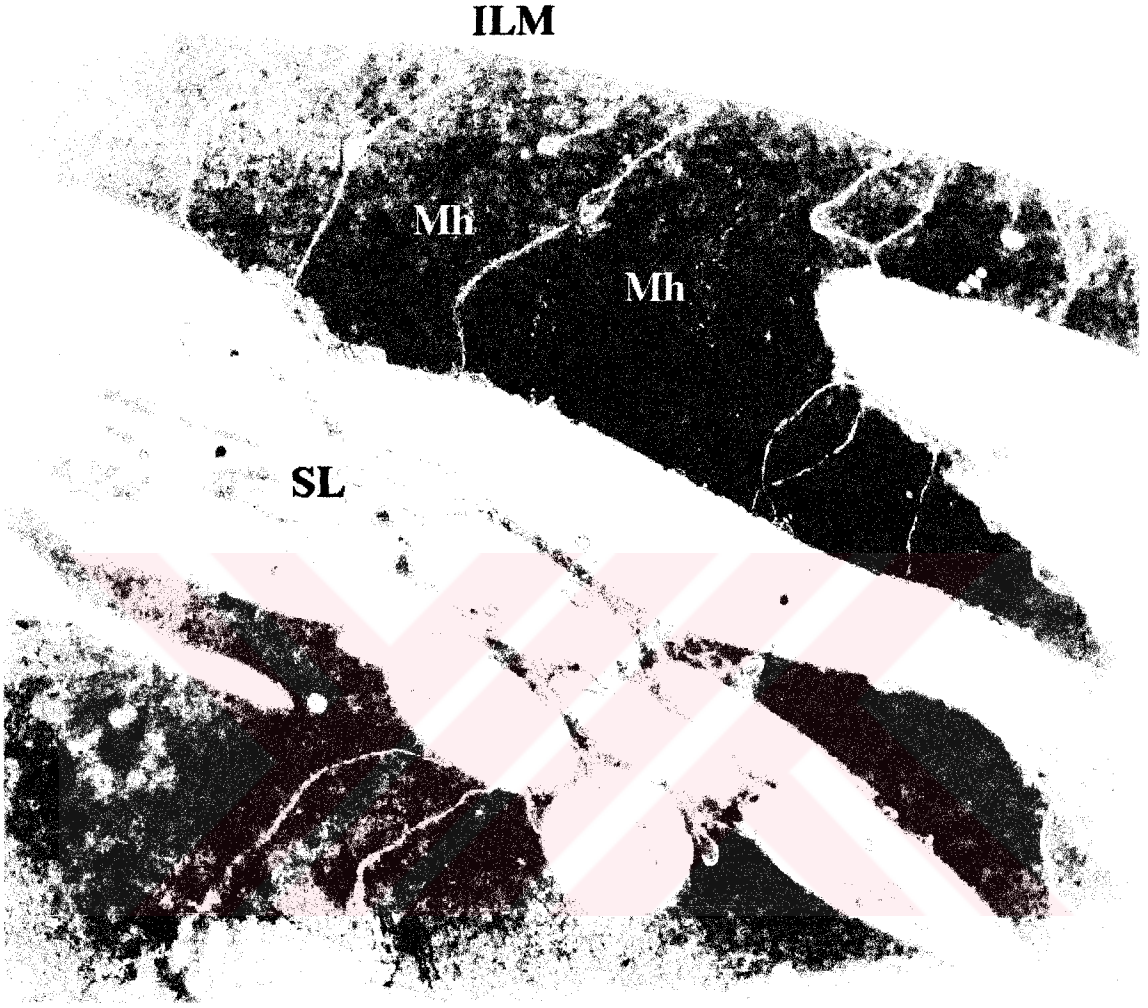


Şekil 5. intakt tavşan retinasının elektron mikroskopik görünümü.

Dış nükleer tabakada hücrelerin normal yapıda çekirdek (Ç), ve sitoplazmaya sahip olduğu görülmektedir. Dış pleksiform tabakada da (DPL) hücre uzantıları normal yapıda izlenmekte. İç nükleer tabaka (INL). x10100.



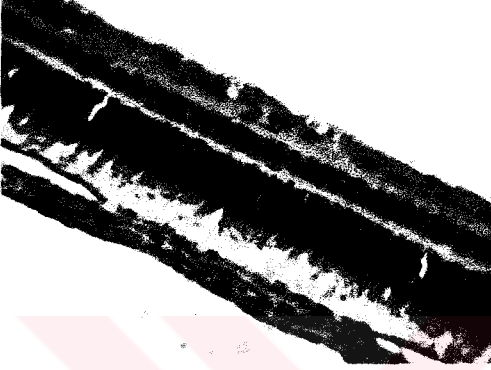
Sekil 6. İntakt tavşan retinasında iç nülear tabakada yer alan hücrelerin çekirdek (Ç) ve sitoplazmik özellikleri ile normal yapıda oldukları görülmektedir. X10100.



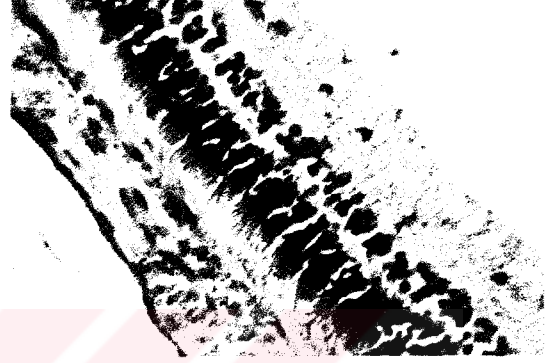
Sekil 7. İntakt tavşan retinasında sinir lifi tabakası (SL) ve iç limitan membranın (ILM) normal yapıda olduğu izlenmekte. Müller hücresi (Mh) sitoplazmik uzantısı. X10100.

4.2.2 Kontrol grubundaki tavşan retinası

Işık mikroskopik incelemede; Retina tabakalarında intakt gruba benzer bir organizasyon izlenmekteydi (Şekil 8). Bazı alanlarda ise retina tabakalarından özellikle, iç nüklear tabaka, gangliyonik ve sinir lifleri tabakalarında intersellüler ödeme temsil eden hafif vakuolizasyon varlığı bu grupta dikkati çekti (şekil 9).



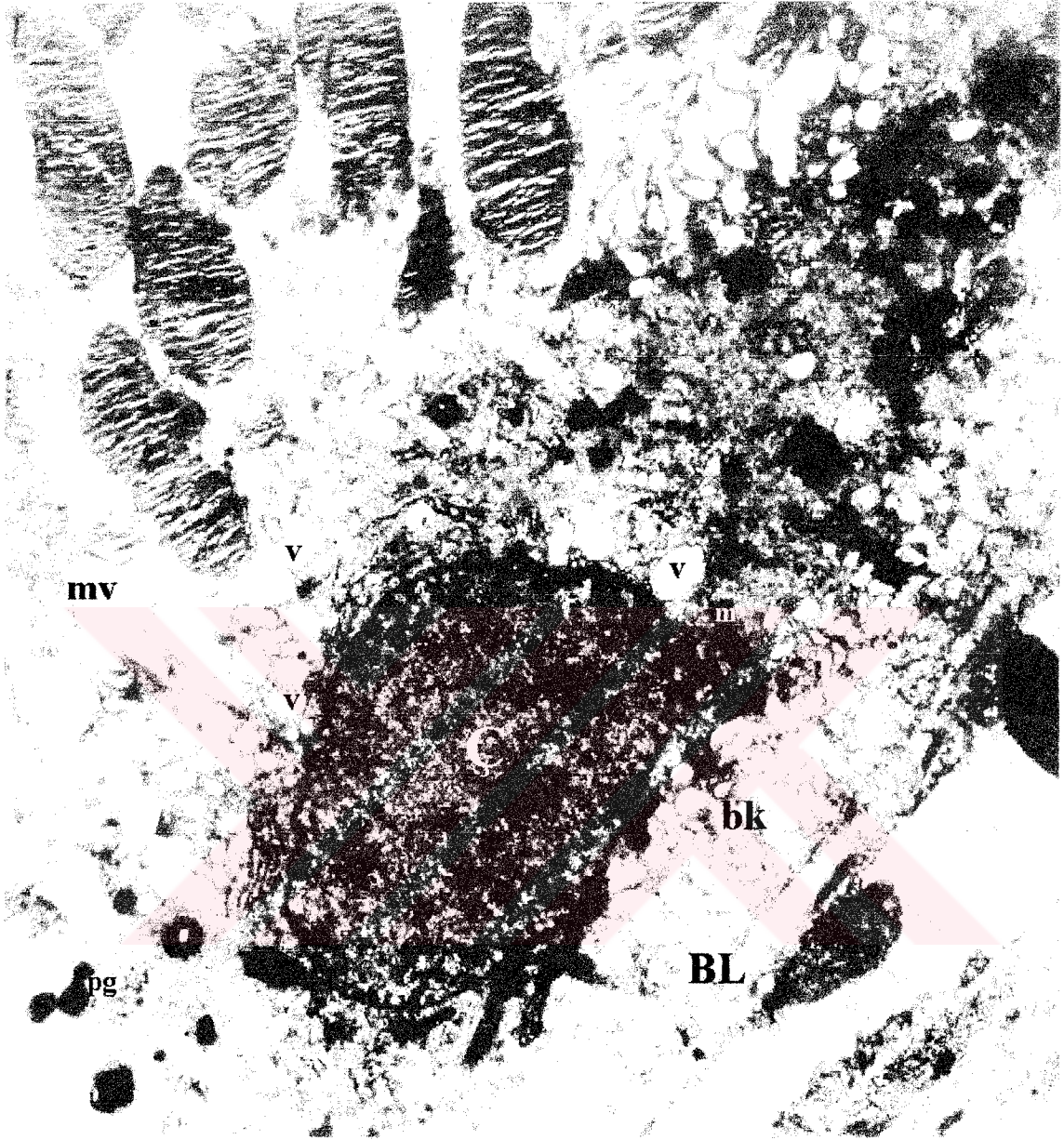
Şekil 8. Kontrol grubundaki tavşan retinasının ışık mikroskopik incelemede normal izlenen kesiti. X400



Şekil 9. Kontrol grubundaki tavşan retinasının ışık mikroskopik incelemede iç nüklear, gangliyonik ve sinir lifi tabakalarında ödem görülen kesiti . x400

Ultrastrüktürel incelemede; retina pigment epitelinde çekirdeğin normal yapıda olduğu izlendi. Hücre sitoplazmasında mitokondrionların iç ve dış membranları ve endoplazmik retikulumlar normaldi. Hücrelerin apikalinde, rod ve konilerle birleşim bölgelerinde değişik büyüklüklerde içleri boş vakuollerin varlığı izlendi (Şekil 10).

Koni ve rod tabakasının dış segmentleri, dış sınırlayıcı membran, dış nüklear tabaka, dış pleksiform tabaka, iç nüklear tabaka ve iç pleksiform tabakada genellikle normal yapı korunmuştu. Gangliyonik tabakada yer alan hücrelerin, çekirdek ve sitoplazmik organelleri ile normal olduğu görüldü. Ancak iç nüklear tabakada bazı hücrelerde sitoplazmada, özellikle mitokondrionlarda belirgin olmak üzere organellerin yapılarının bozulduğu ve sonuçta hücre içerisinde vakuolizasyonun meydana geldiği izlendi (Şekil. 11). Sinir lifi tabakasında hücreler arası ödeme temsil eden ve içlerinde membranöz yapılar bulunan geniş boşluklar izlendi ve iç limitan membran normaldi (Şekil 12).



Şekil 10. Kontrol grubundaki tavşan retinasının elektron mikroskopik incelemesinde, retina pigment epitelinde çekirdeğin (Ç) normal yapıda olduğu izlenmektedir. Hücre sitoplazmasında mitokondrionlar (m), endoplazmik retikulum (er), mikrovilluslar (mv), fagozom (f) ve pigment granülleri (pg) görülmekte. Sitoplazmada çekirdek yakınında ve apikal bölgede hafif vakuolizasyon (v) varlığı dikkati çekmekte. Bazal katlantılar (bk) ve bazal lamina (BL) görülüyor. X10100.



Şekil 11. Kontrol grubuna ait retinada dış nükleer tabakada (DNL) yer alan hücrelerde çekirdek (Ç) ve sitoplazmanın normal olduğu izlendi. İç nükleer tabakada (INL) yer alan hücrelerde sitoplazmada yer alan mitokondrionların (m) genişlemesine bağlı oluşan vakuoller (v) görülmektedir. X8100.



Sekil 12. Kontrol grubunun elektron mikroskopik incelemesinde, sinir lifi tabakasında hücreler arası aralıklarda genişleme ve içlerinde membranöz yapıların varlığı izlenmektedir (*). Müller hücresi (Mh), iç limitan membran (ILM). X12400.

4.2.3 İntravitreal metotreksat enjeksiyonunu takiben birinci günde tavşan retinası

Işık mikroskopik incelemede; Bu grupta da retina tabakaları kontrol grubuna benzer şekilde izlendi. Özellikle iç nüklear tabakada ve sinir lifleri tabakasında belirgin olan ve ödem alanlarını temsil eden, hücreler arası aralıklarda genişleme gözlemlendi (Şekil 13).

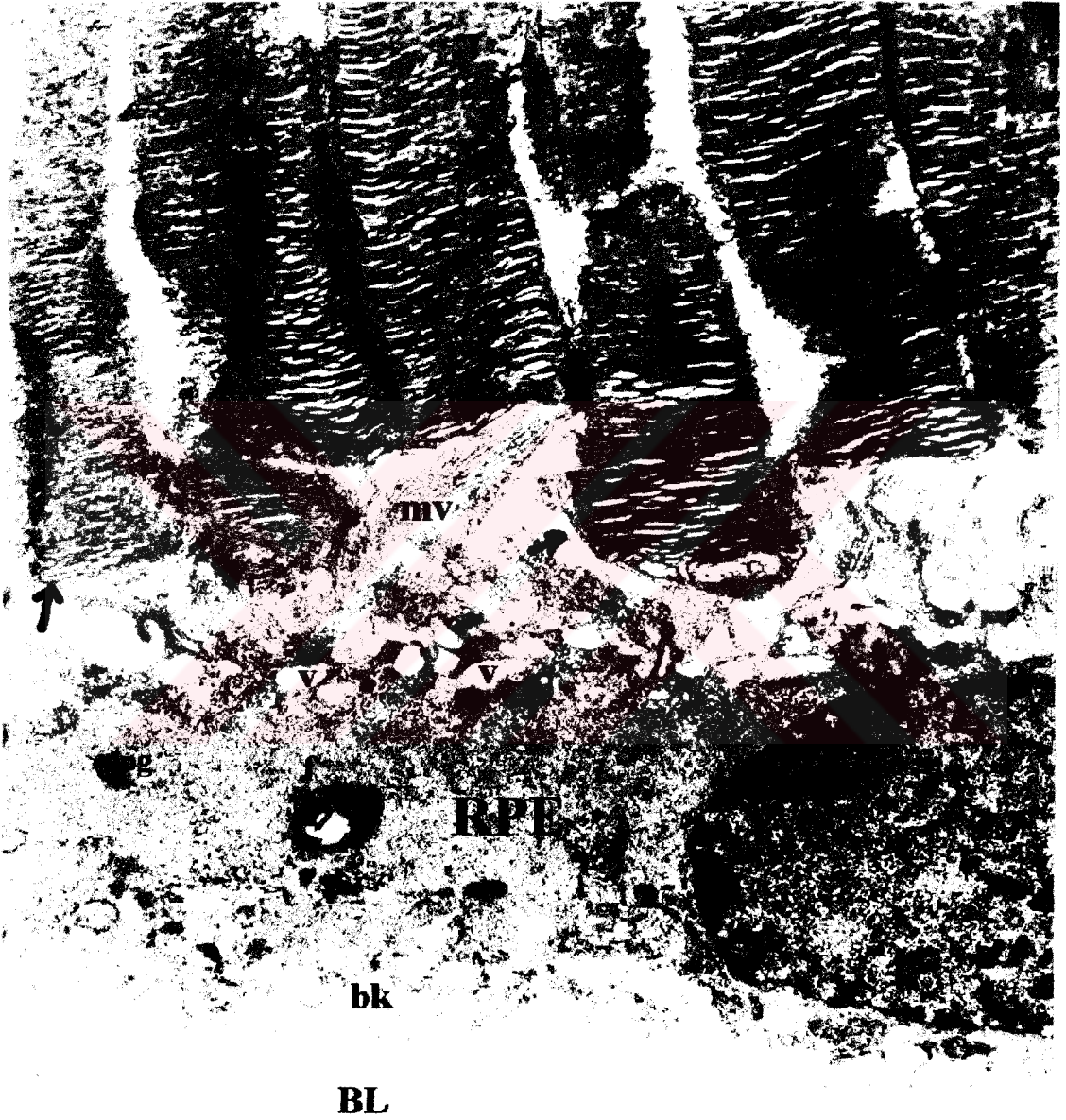


Şekil 13. İntravitreal metotreksat enjeksiyonunu takiben 1. günde ışık mikroskobu ile iç nüklear ve sinir lifi tabakalarında ödem izlenen tavşan retinası. X400

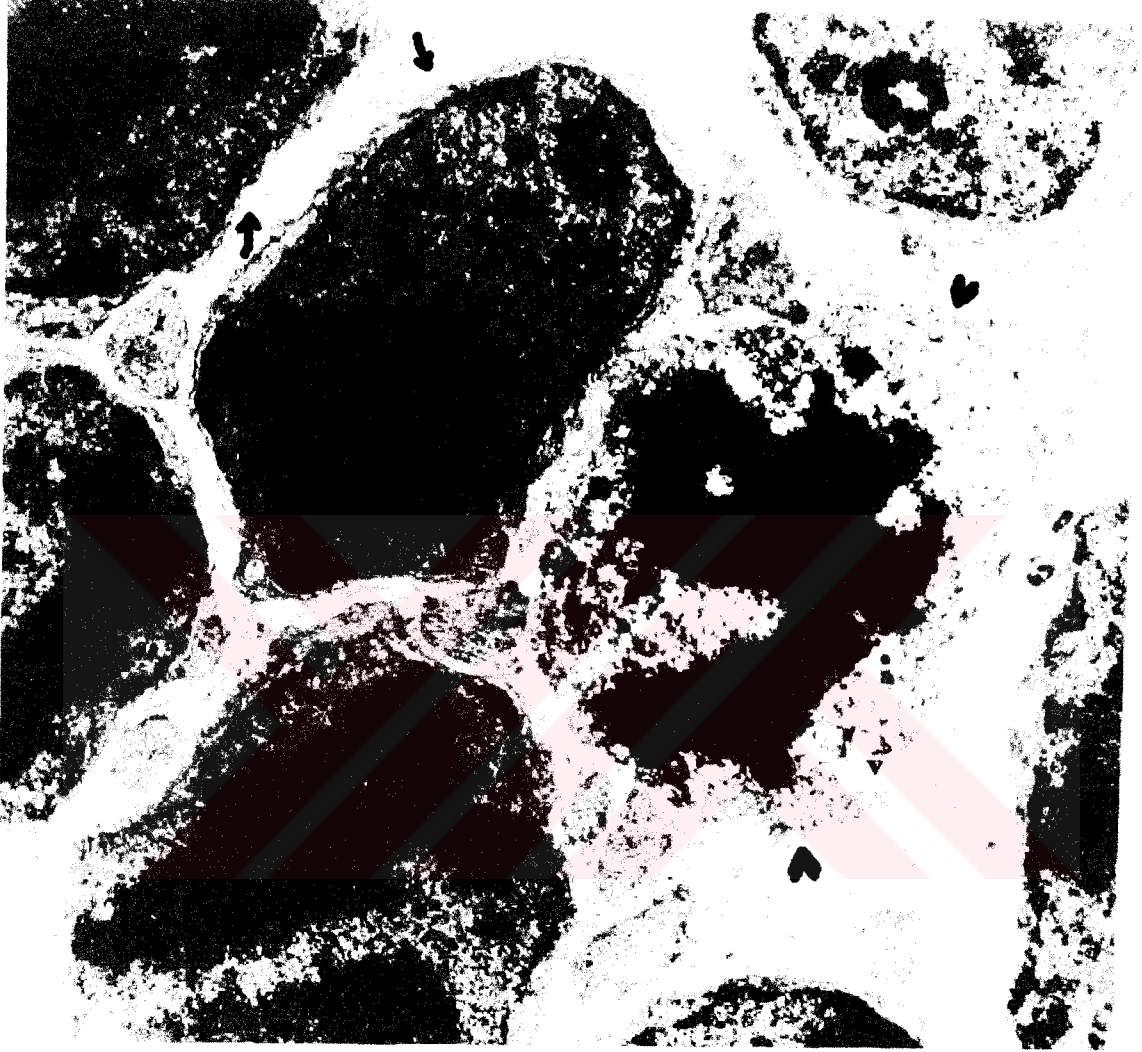
Ultrastrüktürel incelemede; retina pigment epiteli ile rod ile konilerin birleşme bölgelerinde, hücrelerin apikalinde yerleşimli az miktarda sitoplazmik vakuolizasyon varlığı dışında pigment epitel hücreleri normal olarak izlendi (Şekil 14).

Dış sınırlayıcı membran normaldi. Dış nüklear tabakada hücrelerden bazılarında çekirdekte hiperkromatin artışı, sitoplazmanın elektron dansitesinde azalma ve bazı hücrelerde vakuolizasyon dikkat çekti (Şekil 15). Hücrelerin çoğunluğunda çekirdeklerin normal yapıda oldukları, bazı hücrelerin sitoplazmalarında ise az sayıda içleri boş vakuollerin olduğu gözlemlendi. Dış pleksiform tabakada yer alan hücre uzantılarının bazılarında mitokondrionların hafif genişledikleri ve iç membranlarının kaybolmasına bağlı olarak organellerin vakuoler bir görünüm aldıkları dikkati çekti. İç nüklear tabakada yer alan hücrelerin genellikle normal yapılarını korudukları gözlemlendi. Bazı hücrelerde çekirdeğin normal yapısını korumasına rağmen sitoplazmada özellikle mitokondrionlarda belirgin olan organel kayıplarına rastlandı (Şekil 16). İç pleksiform tabakada hücre uzantılarının görünümü dış pleksiform tabakaya benzemekle beraber vakuolizasyon oluşumu dikkat çekiciydi. Gangliyonik tabakada nöron çekirdeklerinin normal kromatin dağılımına sahip

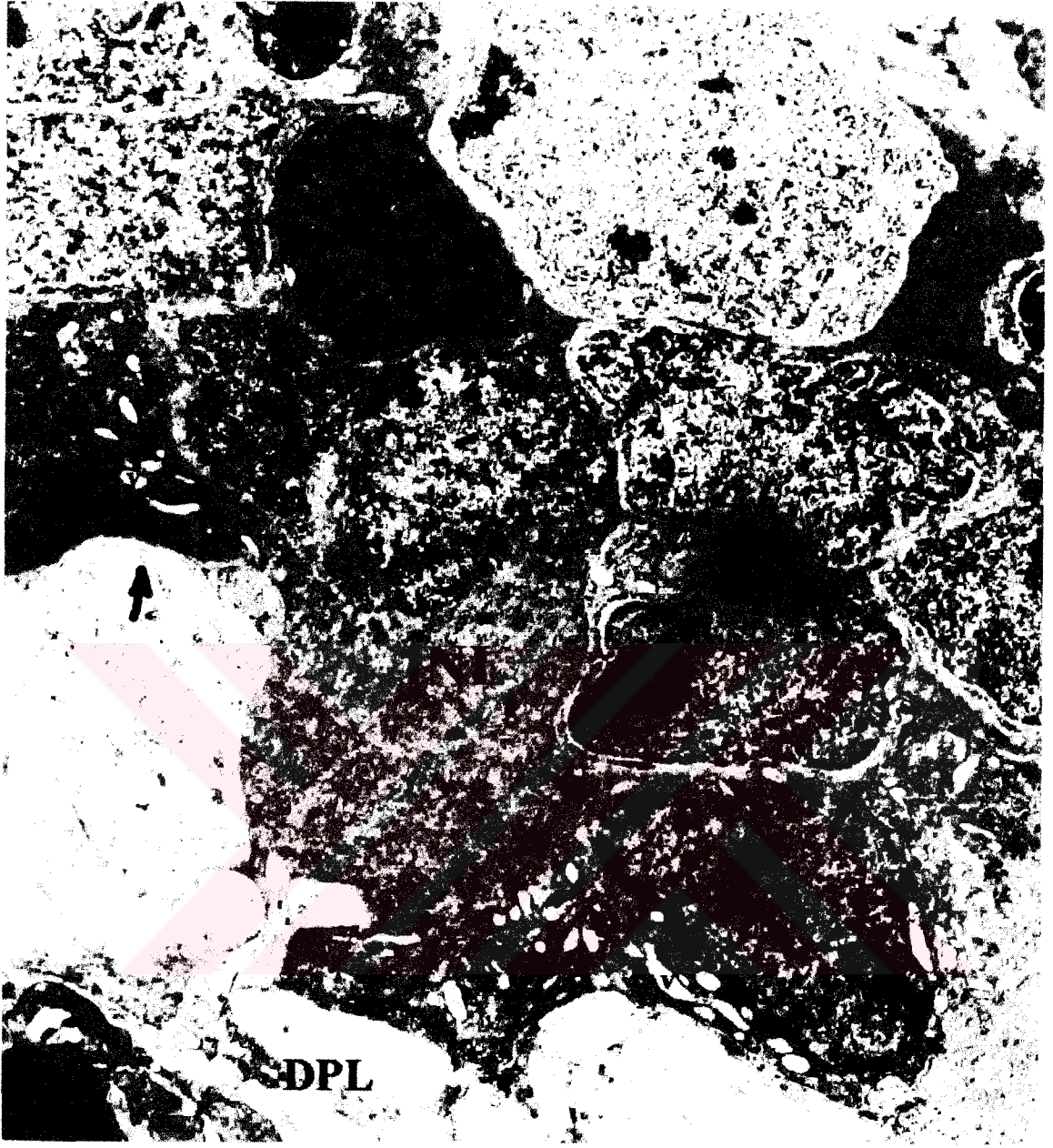
olduğu, hücre sitoplazmalarında çok sayıda elektron dens cisimciklerin bulunduğu görüldü. Ayrıca sitoplazmada mitokondrionlarda hafif genişleme ve iç membran kayıpları ile organel harabiyetine bağlı olarak oluşan vakuolizasyona rastlandı. Sinir lifi tabakası ve iç limitan membran normaldi (Şekil 17).



Şekil 14. Metotreksat enjeksiyonunun birinci gününde tavşan retinasının elektron mikroskopik incelemesinde; retina pigment epitelinin (RPE) çekirdek (Ç) ve sitoplazmik organellerinin normal olduğu izlenmektedir. Hücrelerin apikalinde hafif vakuolizasyon (v) dikkati çekmekte. Fotoreseptör hücreler (oklar), mikrovilluslar (mv), endoplazmik retikulum (er), fagozom (f), pigment granülleri (pg), bazal katlantı (bk), bazal lamina (BL). X16100.



Şekil 15. Metotreksat enjeksiyonunu takiben birinci günde tavşan retinasının ultrastrüktürel incelemesinde: dış nükleer tabakada hücrelerin genellikle normal yapılarını korudukları izlenmekte (oklar). Bazı hücrelerde (ok başları) çekirdekte (Ç) kromatin artışı, sitoplazmada organel kaybı ve vakuolizasyon (v) dikkati çekmektedir. X20 000.



Sekil 16. Metotreksat enjeksiyonunun birinci gününde ultrastrüktürel incelemede, iç nükleer tabakada (İNL) hücrelerin genellikle normal yapıda oldukları görülmekte. Hücrelerin bazılarında (oklar) sitoplazmada vakuolizasyon (v) izlenmekte. Dış pleksiform tabaka (DPL)



Şekil 17. Metotreksat enjeksiyonunun birinci gününde elektron mikroskopi ile incelemede; ganglivonik tabakada yer alan nöronlarda sitoplazmada elektron dens cisimcikler (oklar) ve mitokondrionlarda (m) iç membran kayıpları gözlenmektedir. Endoplazmik retikulum (er), golgi kompleksi (g), sinir lifi tabakası (SL), iç limitan membran (ILM) ve Müller hücreleri (Mh) görülmekte. x16100

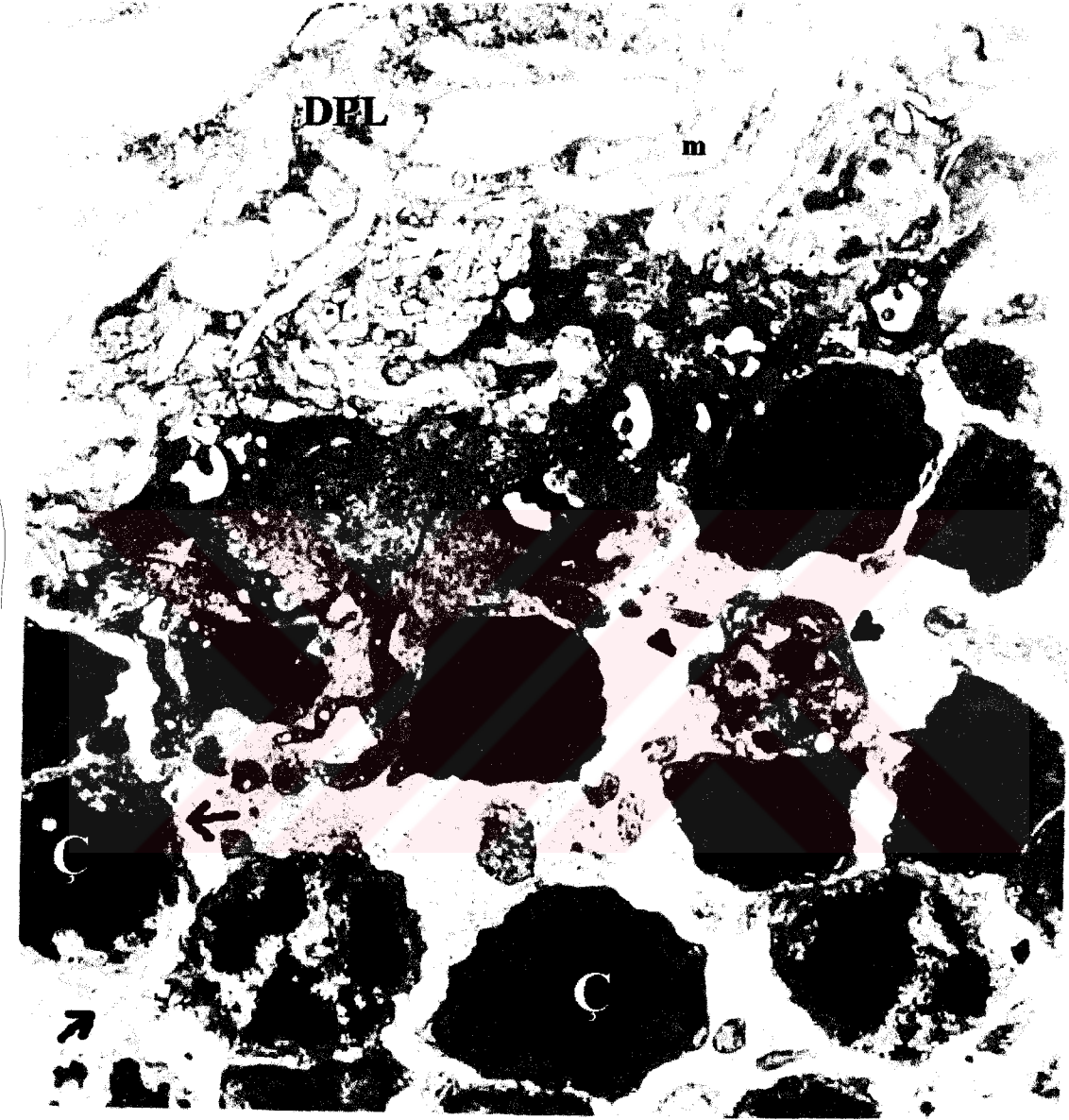
4.2.4 İntravitreal metotreksat enjeksiyonunu takiben ikinci günde tavşan retinası

Işık mikroskopik incelemede; Bu grupta da birinci günde incelenen gruba benzer şekilde, özellikle iç nükleer tabakada ve sinir lifleri tabakasında belirgin olan ve ödem alanlarını temsil eden, hücreler arası aralıklarda genişleme izlendi.

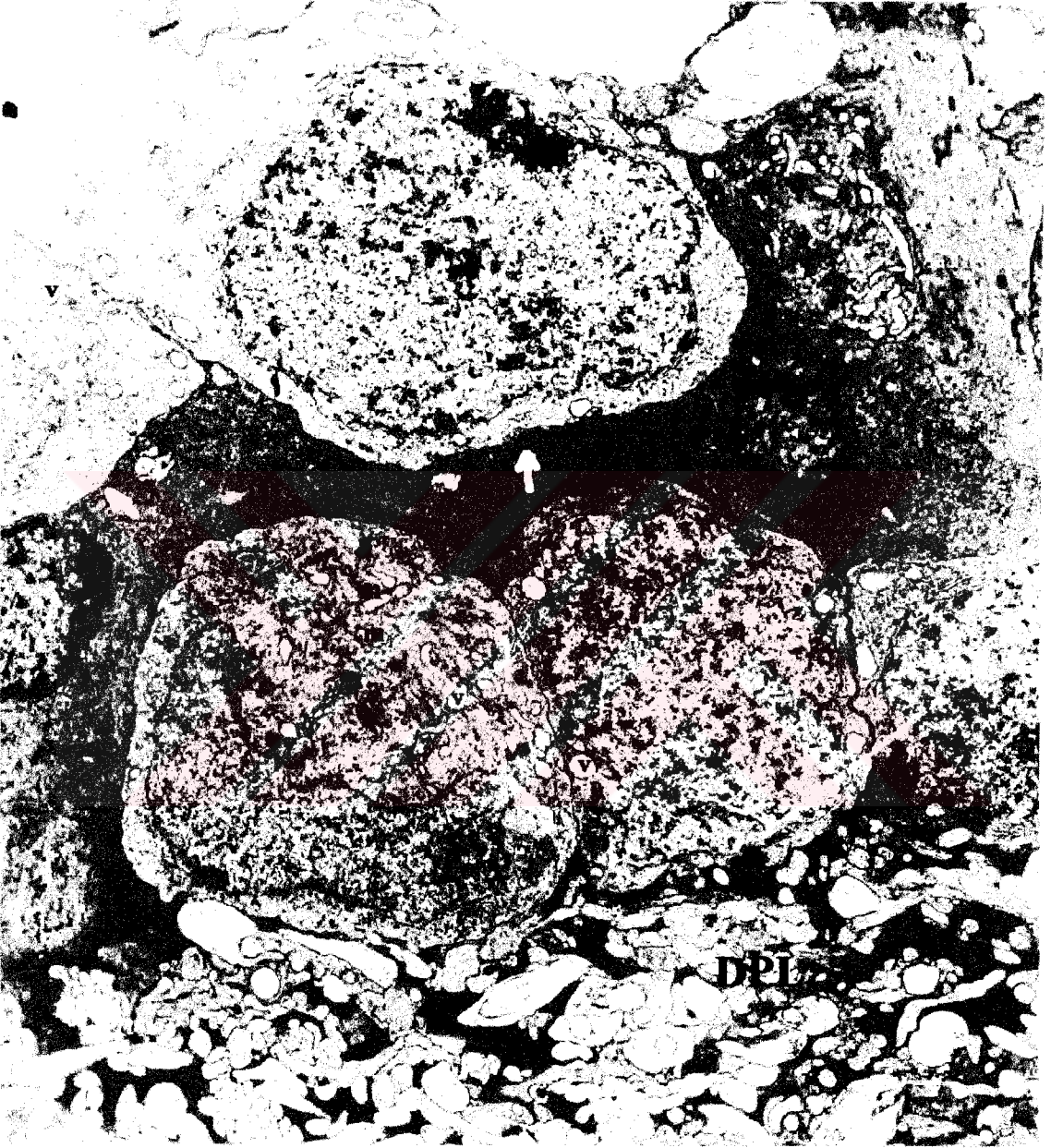
Ultrastrüktürel incelemede; Retina pigment epilelinin genellikle çekirdek ve sitoplazmik yapılarının normal olduğu izlendi. Bununla beraber bazı hücrelerde özellikle apikal sitoplazmada belirgin içleri boş vakuollere rastlandı. Koni ve rod hücrelerinin dış segmentlerinde hafif vakuolizasyon dışında normal yapı korunmuştu. Dış limitan membran belirgin olarak izlenmekteydi. Dış nükleer tabakada yer alan hücrelerin bazılarında çekirdekte kromatin artışı, sitoplazmada vakuolizasyon izlenmekle beraber, genellikle hücrelerde çekirdek ve sitoplazmanın normale yakın oldukları izlendi Dış pleksiform tabakada yer alan hücre uzantılarının bazılarında mitokondrionlarda belirgin olan yapısal bozukluklar izlenmekle birlikte genellikle uzantıların normal olduğu izlendi (Şekil 18). İç nükleer tabakada yer alan hücrelerin genellikle çekirdek ve sitoplazmik yapıları ile normal yapılarını korudukları görüldü. Bununla beraber bazı hücrelerde organellerin harabiyetine bağlı olarak oluşan sitoplazmik vakuolizasyon görüldü (Şekil 19).

İç pleksiform tabakadaki ultrastrüktürel görünüm dış pleksiform tabakaya benzemekteydi. Gangliyonik hücre tabakasında nöronlarda hafif vakuolizasyon dışında normal yapının korunduğu izlendi.

Sinir lifleri tabakası normaldi. Bununla beraber hücreler arası aralıklarda genişlemelere bağlı olarak oluşan çeşitli büyüklüklerde boşluklar izlendi. İç limitan membran normaldi.



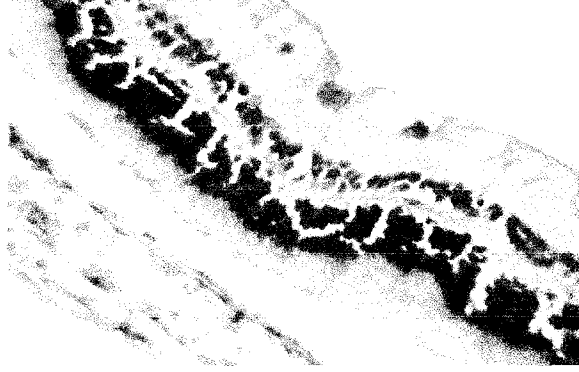
Şekil 18. Metotreksat enjeksiyonunu takiben ikinci günde tavşan retinasının elektron mikroskopik incelemesinde; dış nükleer tabakada (DNL) hücrelerin çoğunlukla normal yapıda olduğu izlenmekle beraber bazı hücrelerde (oklar) kromatin artışı dikkati çekmektedir. Hücrelerin bazılarında ise (ok başları) sitoplazmada vakuollerin (v) oluştuğu görülmektedir. Dış pleksiform tabakadaki (DPL) hücre uzantılarının bazılarında mitokondrionlarda (m) hafif yapısal bozukluklar izlenmektedir. X8100.



Şekil 19. Metotreksat enjeksiyonunun ikinci gününde iç nükleer tabakada yer alan hücrelerin normal yapılarını korudukları izlenmektedir. Bazı hücrelerde (oklar) mitokondrionların (m) iç membran kayıplarına bağlı olarak oluşan vakuolizasyon görülmektedir.

4.2.5 İntravitreal metotreksat enjeksiyonunu takiben üçüncü günde tavşan retinası

Işık mikroskopik incelemede retina pigment epiteli normal yapıda izlenmesine rağmen, dış nüklear tabaka ve iç nüklear tabakada, iç pleksiform tabaka, ve sinir lifleri tabakasında hücreler arası aralıklarda genişleme rastlandı (Şekil 20).



Şekil 20. İntravitreal metotreksat enjeksiyonunu takiben üçüncü günde retinada ışık mikroskobu ile gözlenen hücreler arası aralıkta genişleme.

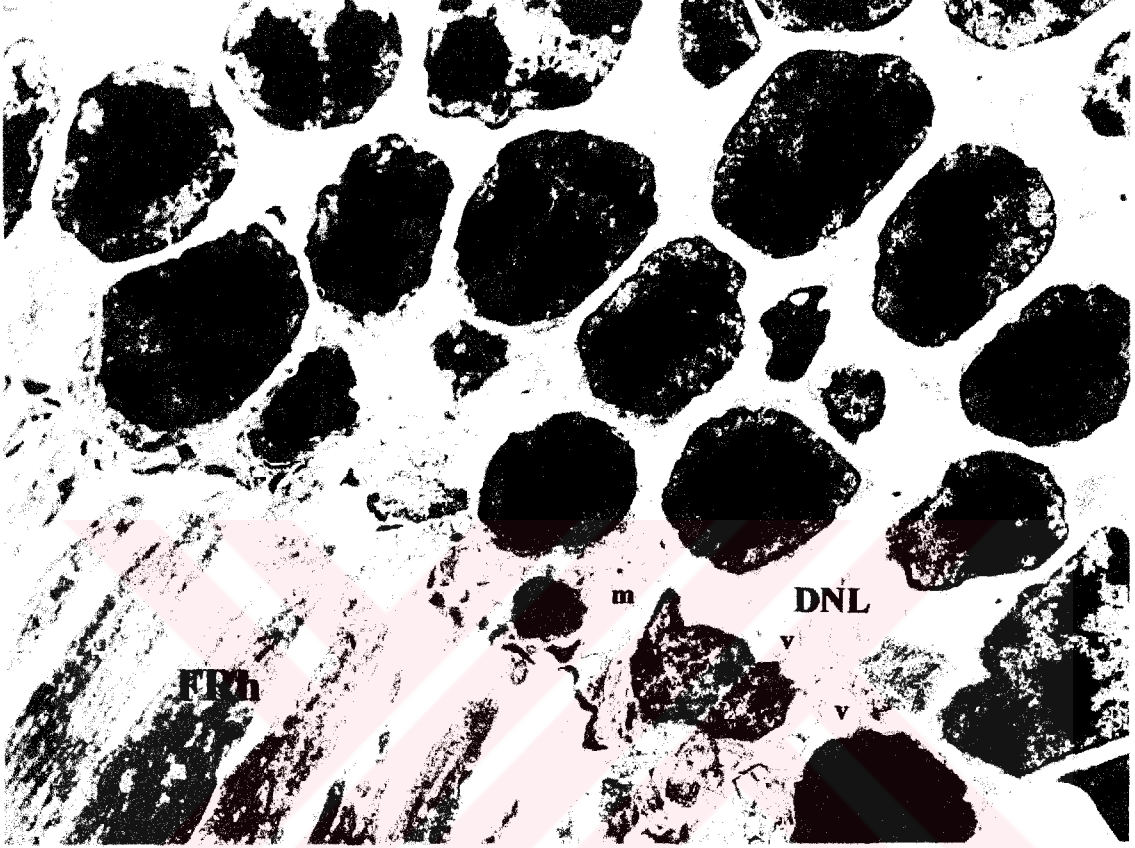
Ultrastrüktürel incelemede, retina pigment epitelinde sitoplazmada farklı büyüklüklerde çok sayıda vakuol oluşmuştu. Vakuollerin belirgin olduğu hücrelerde bazı mitokondrionlarda da hafif yapısal değişiklikler gözlemlendi (Şekil 21).

Koni ve rod tabakasında normal yapının korunduğu gözlenmekle beraber, hücre uzantıları içerisinde hafif vakuolizasyon izlendi (Şekil 22). Dış sınırlayıcı membran normal yapıdaydı. Dış nüklear tabakanın da dış sınırlayıcı membrana yakın yerleşimli hücrelerinde, mitokondrionların hafif genişledikleri ve iç membranlarında kısmi parçalanmalar olduğu gözlemlendi. (Şekil 23) Bununla birlikte hücrelerin çoğunluğunda normal yapı korunmuştu. Dış pleksiform tabaka normaldi. İç nüklear tabakada hücre çekirdeklerinin normal yapıda olduğu görüldü, bazı hücrelerde mitokondrionlarda hafif yapısal değişiklikler kaydedildi (Şekil 24). İç pleksiform tabaka normal izlendi. Gangliyonik tabakada nöronlarda hafif mitokondrial değişiklikler izlenmekle beraber, çekirdek ve sitoplazmanın normal yapısını koruduğu görüldü.

Sinir lifi tabakası ve iç limitan membranın normal ultrasütrüktürel yapısını koruduğu belirlendi.



Şekil 21. Metotreksat enjeksiyonunu takiben üçüncü günde incelenen tavşan retinasının ultrastrüktürel incelemesinde: RPE’de aşırı vakuolizasyon (v), dikkati çekmektedir. Sitoplazmada mitokondrionların (m), genişledikleri görülmektedir. Mikrovilluslar (Mv), bazal katlantılar (bk), ve bazal lamina (BL). X10100.



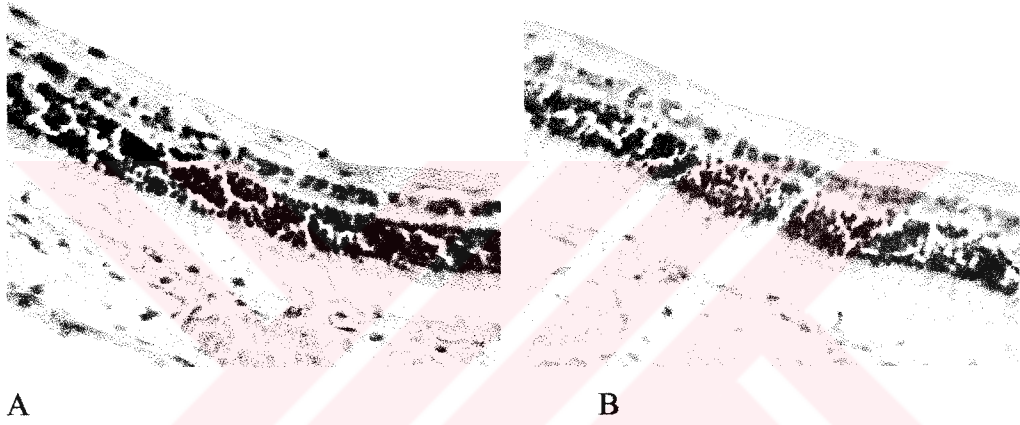
Şekil 22. Metotreksat enjeksiyonunun 3. gününde tavşan retinasında dış nükleer tabaka (DNL), dış limitan membran (DLM), ve fotoreseptörlerin (FRh), normal yapıda olduğu görülmektedir. Dış nükleer tabaka (DNL) hücrelerinden dış limitan membrana yakın yerleşimli hücrelerde sitoplazmada mitokondrionların (m), genişlemesine bağlı vakuolizasyon (v) izlenmektedir. Normal yapıda hücre çekirdeği (Ç). X6300.



Şekil 23. Metotretsat enjeksiyonunun 3. gününde; iç nükleer tabakada (İNL) hücrelerin çekirdek (Ç) ve sitoplazmik özellikleri ile normal oldukları gözlenmekte. Bazı hücrelerde (oklar) sitoplazmada hafif vakuolizasyon (v) görülmektedir. Dış pleksiform tabaka (DPL). x10100.

4.2.6 Tekrarlayan metotreksat enjeksiyonlarından 30 gün sonra tavşan retinası

Yedişer gün arayla dört kez 800 µg intravitreal metotreksat enjeksiyonu takiben 30. günde enükle edilen tavşan ratinasının ışık mikroskopik incelemesinde; normal görünümde olan retina pigment epitelinin Bruch membranı üzerine oturduğu izlendi. Koni ve rod tabakalarında belirgin ödem alanları dikkati çekti. Dış nüklear tabaka normal izlenirken, iç nüklear tabaka ve gangliyonik tabakada geniş ödem alanları bu grupta da izlendi. Bazı bölgelerde iç nüklear tabakada yer yer hücre kaybını düşündüren hücresel düzensizlik dikkat çekici bulundu (Şekil 24).



Şekil 24. Dört kez intravitreal metotreksat enjeksiyonu yapılarak 30 gün sonra ışık mikroskop ile incelenen tavşan retinası;

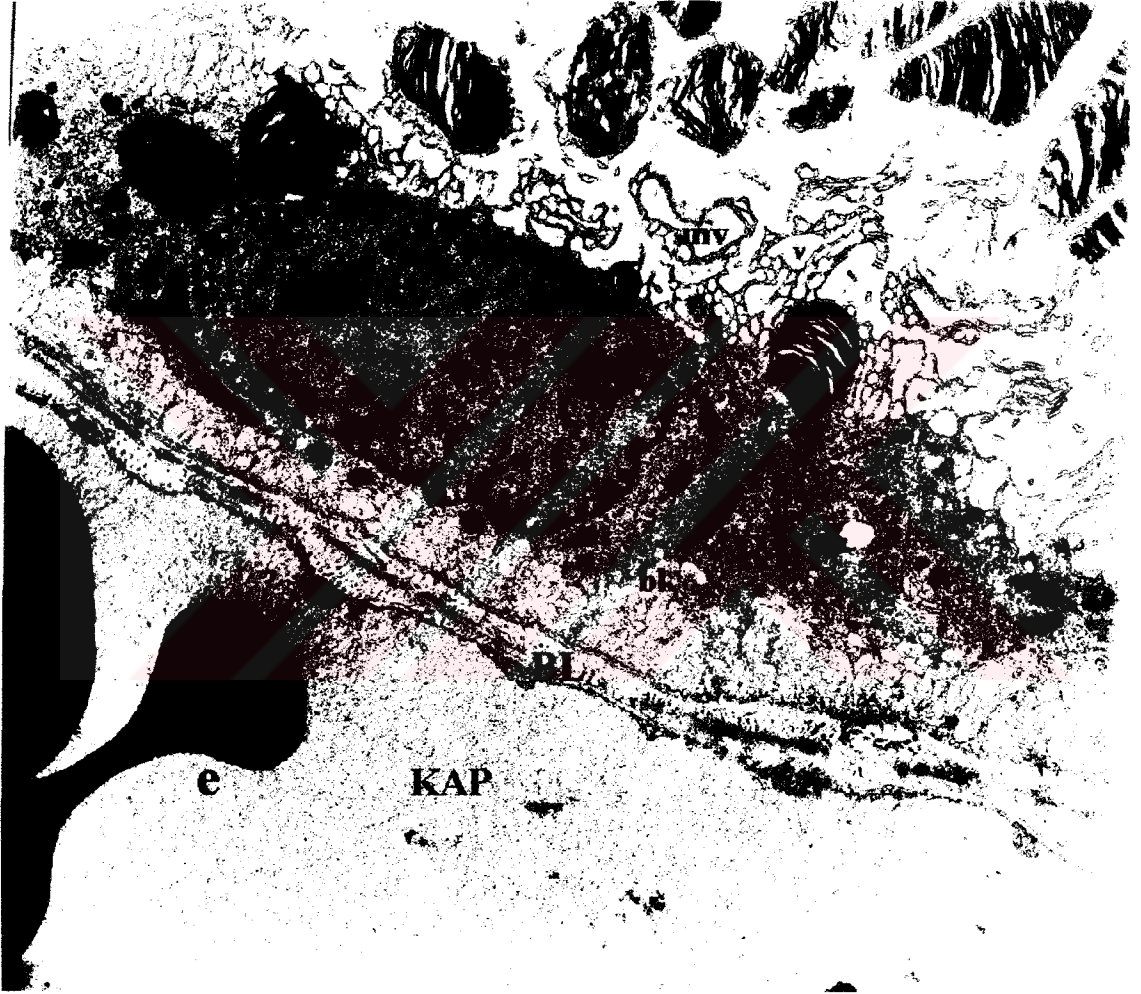
- A. Koni-rod, iç nüklear ve gangliyonik tabakalarda izlenen ödem.
- B. İç nüklear tabakada hücre kaybını düşündüren hücresel düzensizlik.

Ultrastrüktürel incelemede; retina pigment epiteli çekirdek ve sitoplazmik organelleri ile normal yapıda izlenmekle birlikte apikalinde yer alan mikrovilluslarında vakuolizasyon izlendi (Şekil 25).

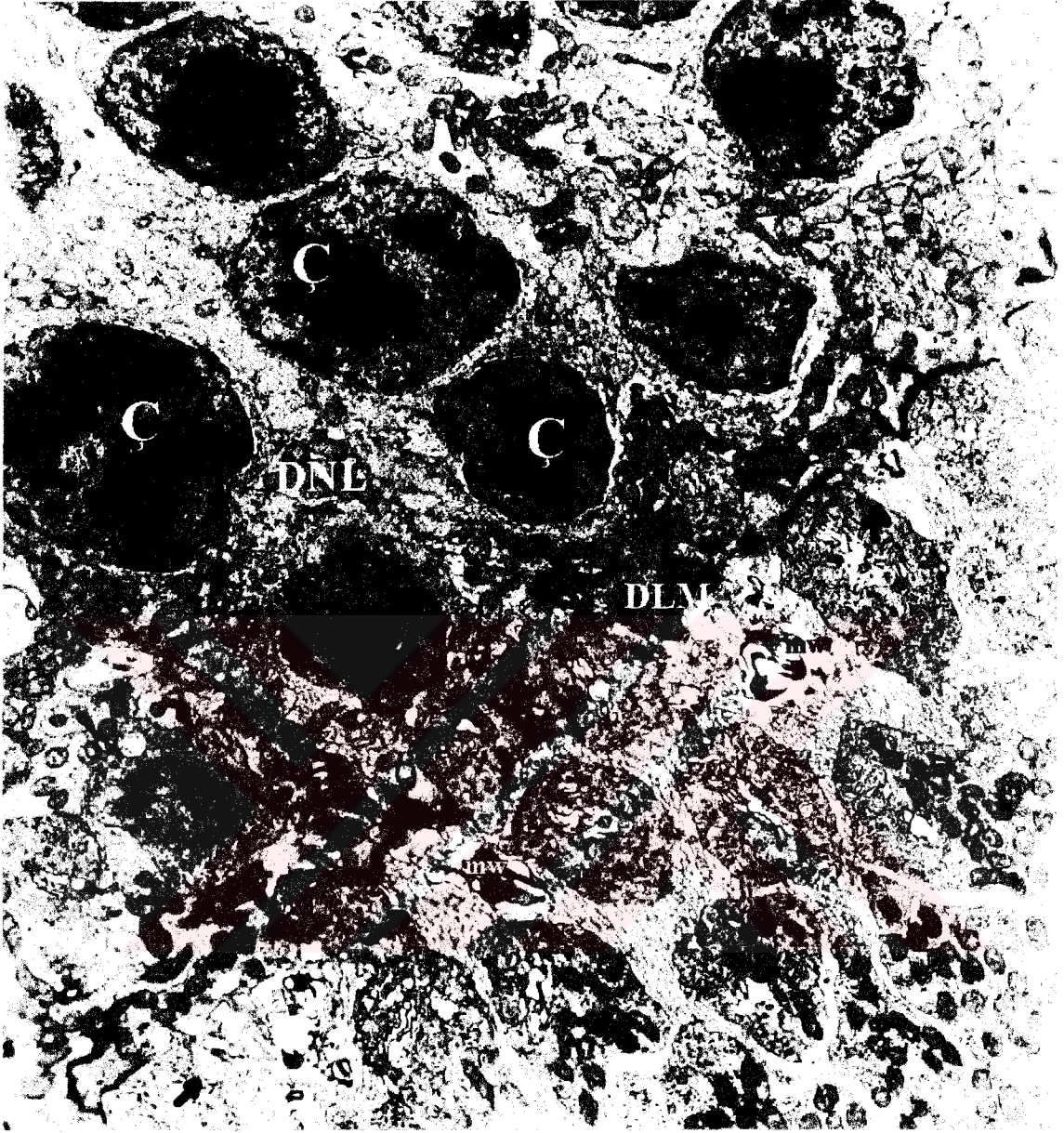
Koni ve rodlarda sitoplazmada hafif vakuolizasyon dikkati çekti. Bazı uzantılarda membranöz yapılardan oluşan miyelin figürlerin varlığı izlendi. (Şekil 26). Dış sınırlayıcı membran normaldi. Dış nüklear tabakada çoğunlukla hücreler normal yapısını korumuştur, bazı hücrelerde az sayıda vakuol oluşumu ve membranöz yapılar dikkati çekti. Dış nüklear tabakada yer alan nöronların bazılarında çekirdeğin belirgin şekilde dejenerasyona uğradığı görüldü (Şekil 27). Dış ve iç pleksiform tabakalar normaldi. Gangliyonik tabaka genelde

normaldi. Az sayıda hücrede sitoplazmik vakuolizasyon oluşumu dikkati çekti. Sinir lifi tabakasında hücreler normaldi ancak hücreler arası aralıklarda genişleme ve membranöz yapı oluşumu dikkati çekti (Şekil 28).

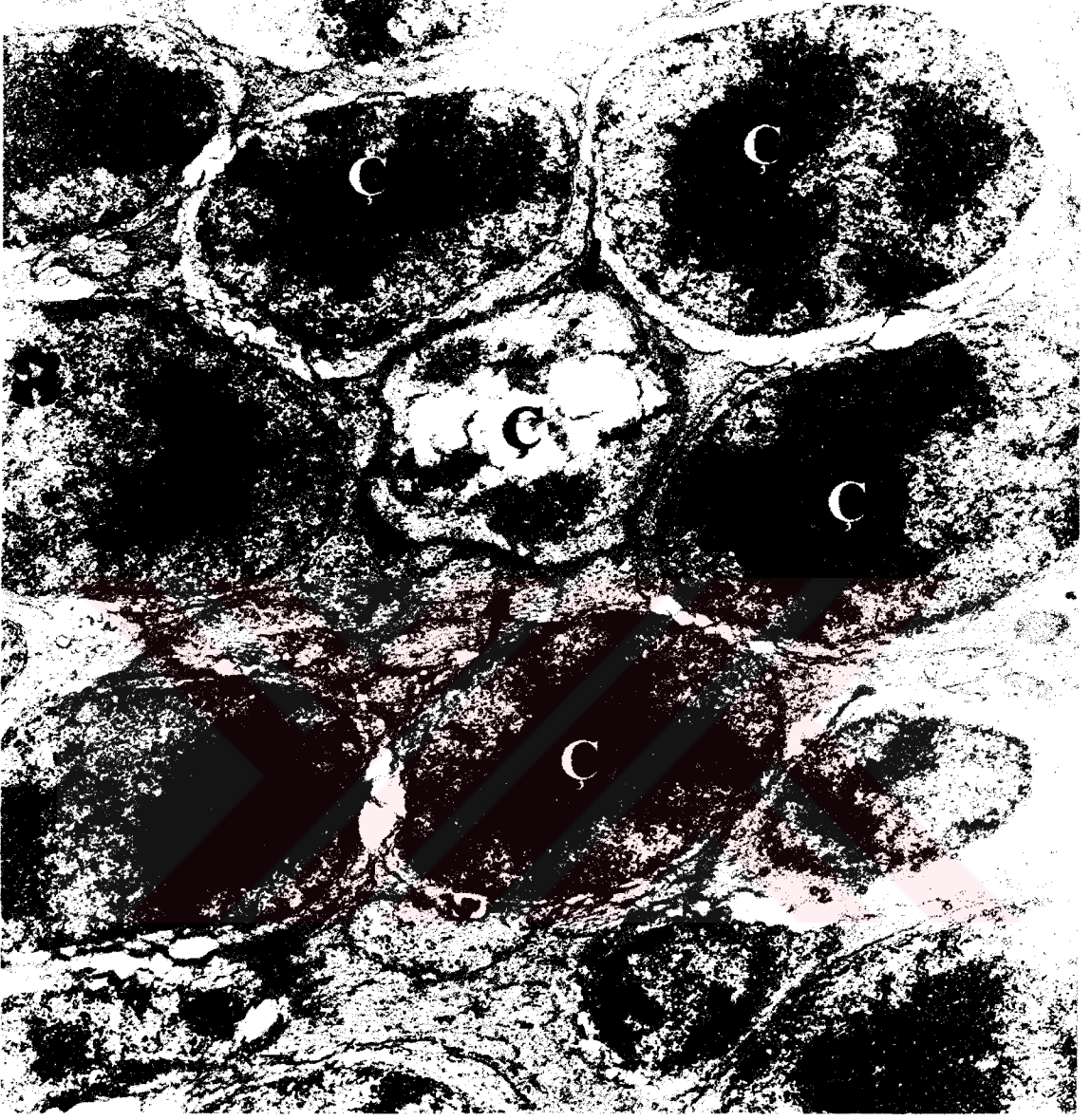
İç limitan membran normal olarak izlendi.



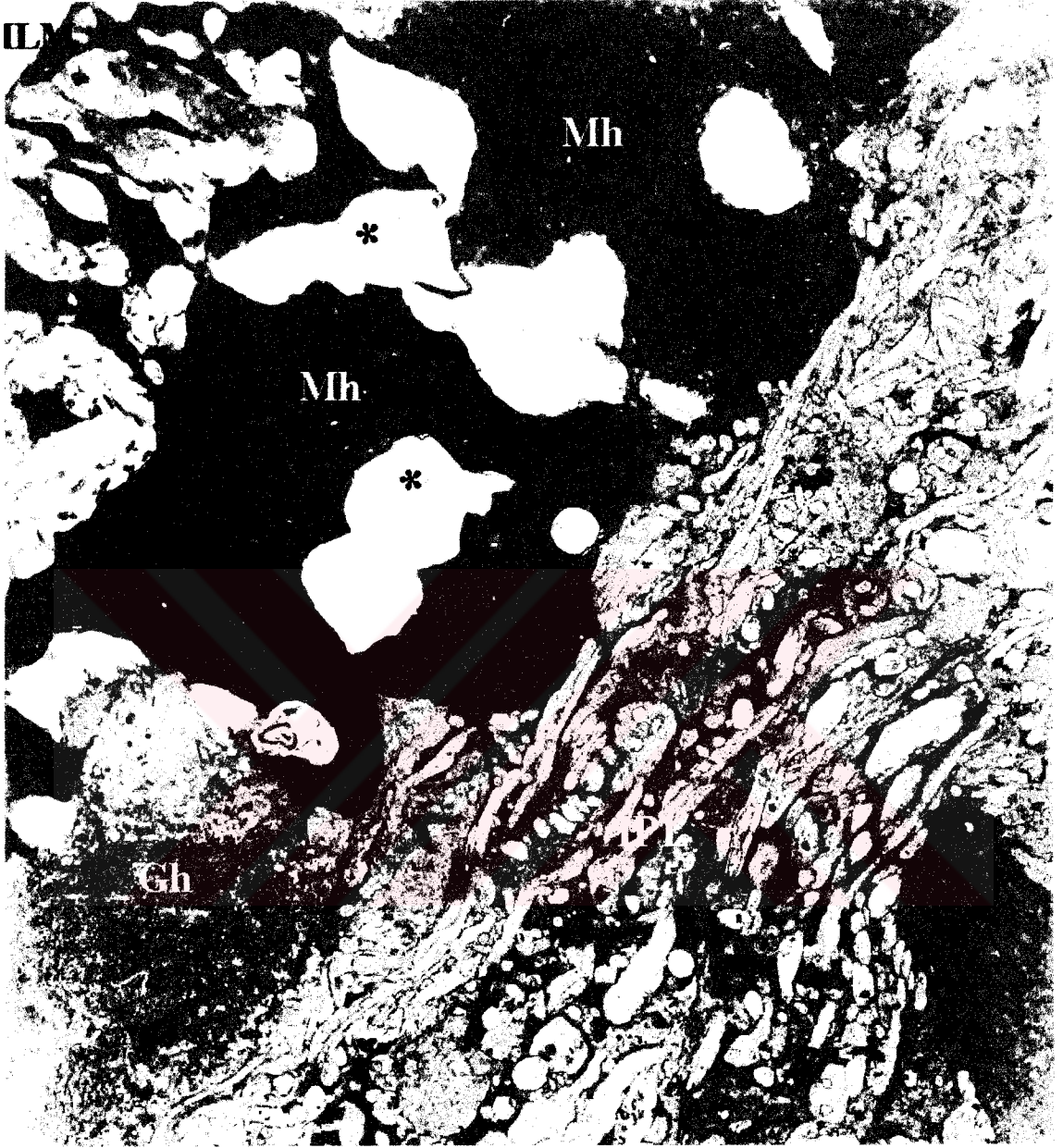
Şekil 25. Tekrarlayan metotreksat enjeksiyonlarından sonra uzun dönem takiplerde tavşan retinasının elektron mikroskopik incelemesinde: retina pigment epitelinde çekirdek (Ç) ve sitoplazmanın normal yapısını koruduğu, ancak apikalde yer alan mikrovilluslarda (Mv) düzensizlik ve hafif vakuolizasyon (v) olduğu görüldü. Fagozom (f), mitokondrion (m), bazal lamina (BL), kapiller (kap), eritrosit (e). X12400



Şekil 26. Uzun dönem etkilerin incelendiği tavşan retinasında; fotoreseptör hücre uzantılarında genellikle normal yapı korunmakla birlikte, bazı uzantılarda (oklar) sitoplazmada membranöz yapılar (mw) dikkati çekmektedir. Dış limitan membran (DLM), dış nüklear tabaka (DNL), çekirdek (Ç). X10100.



Şekil 27. Uzun dönem takiplerde incelenen tavşan retinasında; dış nüklear tabakada hücrelerin çoğunlukla normal yapıda oldukları izlenmektedir. Hücrelerin bazılarında (oklar) çekirdeğin (Ç) dejenere olduğu dikkati çekmektedir. X12400.



Şekil 28. Metotreksat enjeksiyonlarının kümülatif uzun dönem etkilerinin elektron mikroskopik incelemesi. Sinir lifi tabakası normal izlenmekle birlikte komşu Müler hücreleri arasındaki aralıkların (*) genişledikleri ve içlerinde membranöz yapıların olduğu izlenmektedir. Gangliyonik hücre (Gh), iç limitan membran (İLM), iç pleksiform tabaka (İPL). X6300.

5. TARTIŞMA

Oküler lenfomada radyoterapi tek başına hastalığın kontrol altına alınmasını sağlayabilmektedir. Ancak yapılan çalışmalar nüks oranlarının ve mortalitenin radyoterapi-kemoterapi kombinasyonlarına nazaran yüksek olduğunu göstermiştir. Hayatta kalma süreleri karşılaştırıldığında radyoterapi ile kombine veya sadece kemoterapi alan hastaların yaşam sürelerinin sadece radyoterapi alan hastalara oranla en az iki kat arttığı gösterilmiştir.³⁻⁸ Kullanılan kemoterapi protokollerinin birbirine üstünlükleri ise hastalığın az görülmesi, çalışmalarda kesin sonuçlara varılabilecek hasta sayılarına ulaşamaması ve hastalığın farklı seyirler göstermesi sebebi ile belirlenememektedir. Ancak metotreksat içeren kombinasyonların üstünlüğü Blay ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gösterilmiştir.⁹ Bu nedenle primer santral sinir sistemi lenfomasında kullanılacak tedavi protokolünün en azından metotreksat içermesi gerektiği belirtilmektedir.³

Yapılan çalışmalarda primer santral sinir sistemi lenfomasında serebrosipinal sıvı relapsının %40 ile %50 arasında olduğu gösterilmiştir. Bu durumda uygulanabilecek yöntemler kranio-sipinal radyoterapi, yüksek doz kemoterapi veya intratekal kemoterapidir. Kranio-sipinal radyoterapi yüksek oranda kemik iliği baskılanmasına yol açmaktadır. Diğer iki yöntemin etkinlikleri ve birbirine üstünlükleri açısından ise fikir birliği oluşmamıştır. İntratekal metotreksat, sitarabin ve deksametazon enjeksiyonlarının nörotoksisitede artışa ve kimyasal menenjitte neden olduğu bilinmektedir. Serebrospinal sıvı relapsı oluşan hastalar incelendiğinde bu grubun çoğunlukla ilk teşhiste de serebrospinal sıvıda hücre tesbit edilen hastalar olduğu bildirilmiş ve bazı otörler tarafından intratekal tedavinin bu grup hastalara uygulanması gereken bir yöntem olduğu bildirilmiştir.⁶⁶

Mason ve arkadaşları intratekal metotreksat ve sitozin arabinozid-C kombinasyonu ile tedavi ettikleri iki hastalık olgu sunumlarında OTPSSSL'sında en az bir gözde okuyabilecek görme keskinliği korunarak 5 yıllık remisyon sağlandığını bildirmişlerdir. Bu sonuçların başarısı intratekal metotreksatın beyin omurilik sıvısında yüksek etkinlik göstermesine karşılık parankimal lezyonlara yeterince etkili olamaması, arabinozid-C'nin ise intratekal uygulama ile parankime iyi penetre olması ile açıklanmıştır. Oküler etkinliğinin ise metotreksatın ve arabinozid-C'nin intratekal uygulama sonrasında yavaş yavaş dolaşıma katılarak uzun süre etkinlik göstermesine bağlı olabileceği belirtilmiştir.¹²

De Smet ve arkadaşları ise intratekal uygulama sonrasında göz içi sıvılarda metotreksatın ölçülebilir düzeylere ulaşmadığını bildirmektedir.⁶⁷

Sistemik yoldan uygulanan ilaçların göz içerisine geçişi kan-göz bariyerleri nedeniyle az olmaktadır. Arka üveal kapiller ve pigmentli silier cisim kapilleri fenestre tipte kapiller olup ilaçların bu lokalizasyonda nisbeten yüksek konsantrasyonlara ulaşmasını sağlasa da, iris damar endotelindeki ve silier cisim pigmentsiz epitelindeki sıkı bağlar ilaçların vitreus ve aköz sıvılarda yüksek konsantrasyonlara ulaşmasını önlemektedir.^{68,69} Bu nedenle oftalmolojik kemoterapide lokal ilaç uygulamaları tercih edilmekte ve geliştirilmektedir. Sistemik hastalıkların izole oküler tutulumlarında da lokal tedavi yeterli olabilmektedir.^{47,70}

Rootmann ve Gudauskas oküler lösemili iki hastada subkonjonktival metotreksat (12,5 mg) ve sitarabin (50 mg) enjeksiyonları ile oküler tutulumun iyileştiğini bildirmişlerdir.⁷¹

De Smet ve arkadaşları ise radyoterapi ve yüksek doz kemoterapi almış rekürren oküler lenfomalı görmeyen ve enükleasyonu reddeden bir hastada intravitreal metotreksat ve thiotepa enjeksiyonlarının farmakokinetiğini araştırmış ve 400µg intravitreal enjeksiyonu takiben metotreksatın vitreusdaki sitotoksik etkinliğini beş gün sürdürdüğünü, oküler lenfomanın ise remisyona girdiğini belirtmişlerdir.¹⁴

De Smet ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışmada 24 saatte yüksek doz intravenöz metotreksat uygulandığında yedinci saatte aközdeki metotreksat düzeyleri 55 µM bulunurken 74. saatte serum ve serebrospinal sıvıda metotreksat konsantrasyonları sitotoksik düzeyin altında bulunmuş ancak hüme aközdeki metotreksatın sitotoksik konsantrasyonun üzerinde, 1,2 µM olduğu bildirilmiştir. Metotreksatın diğer birçok kemoterapötüğün aksine sistemik uygulama ile göz içine yüksek penetransı ve aközden klerensinin kan ile serebrospinal sıvıya oranla yavaş olması inflamasyona bağlı olarak kan aköz bariyerinin bozulmuş olabileceğine bağlanmıştır. Ancak hastanın oküler patolojisinin tedaviye kısmi yanıt verdiği de belirtilmiştir.⁶⁷ Literatürde de hipertonic mannitol infüzyonu ile kan beyin bariyerinin geçici olarak bozulması sağlanarak kemoterapi protokollerinde ilacın kranial yayılımının artırılabilirdiği bildirilmiştir.^{72,73} Başka bir grubun çalışmasında ise 4 saatlik intravenöz yüksek doz (15.6g) metotreksat infüzyonunun ardından kanda metotreksat konsantrasyonunun vitreus düzeylerinin 100 katı, aközdeki metotreksat düzeyinin ise vitreusdakinin 10 katı olduğu bildirilmiş ve intravenöz yüksek doz metotreksat uygulaması ile vitreusda etkin düzeylere ulaşılamadığı bildirilmiştir. Çalışma kapsamındaki hastanın

kranial ve ön segment tutulumunun tedaviye olumlu cevap verdiği, ancak vitreus tutulumunun devam ettiği eklenmiştir⁷⁴

Literatürde 400µg metotreksatın vitreusda hücre sayısı azalana kadar haftada iki kez, ardından haftada bir, iki haftada bir ve ayda bir intravitreal enjeksiyonlarının oküler lenfomada başarılı sonuçlar verdiğini bildiren yayınlar mevcuttur.^{11,13-17} Bulabildiğimiz en geniş seri 16 hasta ile Peter ve arkadaşları tarafından bildirilmiş; bu yayında en fazla 12 enjeksiyonun ardından bütün gözlerin malign hücreden temizlendiği belirtilmiştir. Bu seride tedavi komplikasyonu olarak %69 katarakt, %56 korneal epiteliopati, %38 retina pigment epiteli defekti, %13 vitreus hemorajisi, %6 steril endoftalmi, ve %6 optik atrofi geliştiği bildirilmiştir.¹⁷ Bu komplikasyonların bir kısmı tümöre bağlı olabileceği gibi bir kısmı da metotreksata ve verilen farmasötikten bağımsız olarak sık tekrarlanan intravitreal enjeksiyonlara bağlı gelişebilmektedir.⁵³

Helbig ve arkadaşlarının enjeksiyon sıklığını azaltarak yaptıkları çalışmada ise intravitreal metotreksat (0,4 mg) ve deksametazon (0,4 mg) enjeksiyonları 4 hafta boyunca haftada bir kez, ardından göz malign hücreden temizlenene kadar ayda bir kez uygulanmış ve 2 yıllık remisyon sağlanabildiği bildirilmiştir.¹⁶

Ancak bu klinik çalışmalarda hastaların zaten intraoküler patolojileri olduğu için tedaviye bağlı olarak retinal harabiyet gelişip gelişmediği belirlenememektedir.

National Cancer Institute'de gelişimsel terapötik program çerçevesinde yapılan, metotreksatın in vitro aktivitesini belirleyen çalışmada ise 1 µM ile 0,1µM arasındaki metotreksat konsantrasyonlarının tümör hücre büyümesini ortalama %50 inhibe ettiği belirtilmektedir.⁷⁵

Çalışmamızda deneysel tavşan modelinde 800µg intravitreal metotreksat enjeksiyonunu takiben vitreusda metotreksat düzeylerinin 61,5 saat 1µM üzerinde kaldığını, 81. saatte ise 0,1µM'ın altına düştüğünü belirledik.

Velez ve arkadaşları intravitreal metotreksat enjeksiyonunun farmakokinetiğini inceledikleri çalışmada metotreksatın tavşan gözündeki dağılım hacminin 2,16 ml olduğunu bildirmişlerdir.⁷⁶ Yaptığımız çalışmada metotreksatın tavşan gözündeki dağılım hacminin 1.33 ml olduğunu bulduk. Bu sonuçlar literatürdeki tavşan göz hacminin 1,2 ile 1,5 ml arasında olduğunu bildiren yayınlarla uyumludur.⁴⁹ Velez ve arkadaşlarının çalışmasında vitreusdaki metotreksat düzeyleri enjeksiyonu takiben 1,5' uncu saatte ölçülmüş ve bu ölçümler hesaplamalarda başlangıç düzeyleri kabul edilmiştir. Biz ise ilk ölçümlerimizi

metotreksatın dağılımının olup emilimine bağlı hesaplama hatalarının en az olabileceği daha kısa bir sürede, 30'uncu dakikada yaptık. Tavşan gözünde metotreksatın dağılım hacmi ile ilgili bulduğumuz sonuçların Velez ve arkadaşlarının çalışmasındaki sonuçlarla uyumlu olmamasını bu ölçüm zamanları arasındaki farka bağladık.

Çalışmamızda bulunan ilaç düzeyleri ile tam olarak uyumlu bulduğumuz matematiksel bağlantıyı kullanarak yaptığımız hesaplamalarda intravitreal uygulanan metotreksatın tavşan vitreusunda yarılanma ömrünün yaklaşık 5,9 saat olduğunu tesbit ettik. Velez ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise metotreksatın tavşan vitreusundaki yarılanma zamanının 7,6 saat olduğu bildirilmiştir.⁷⁶ Bu yayında saatlere göre bulunan değerler belirtilmemiştir ve grafikte beklenen değer eğrisi ile alınan sonuçlar tam uygunluk göstermemektedir.

Intravenöz metotreksat uygulamasında serumdaki metotreksat düzeylerinin 24. saatte 5-10 μM 'dan, 48. saatte 0.5-1 μM 'dan, 72. saate ise 0.2 μM 'dan yüksek olmasının normal doz lökovorin destek tedavisi verildiğinde toksisiteyi arttırdığı ve yüksek doz lökovorin destek tedavi si verilmesi gerektiği literatürde yer almaktadır.⁷⁷

Yapılan ölçümler vitreusdaki ilaç düzeyini belirtmekte, sağlıklı vitreus ise bilindiği gibi hücresel eleman içermemektedir. OTPSSSL'sında ise vitreusda bulunan hücreler patolojik hücre olduğu için metotreksatın vitreusdaki düzeylerinin yüksek olması sadece hedef hücrelerin etkilenmesini sağlayacaktır. Metotreksatın vitreusdan oküler dokulara dağılımını belirlemek içinse ayrıca dokularda ilaç düzeylerinin belirlenmesi gerekmektedir. Dolayısıyla kandaki toksik olduğu bildirilen değerlerin vitreus düzeyleri ile korelasyon göstermeyeceğini düşünerek çalışmamızın ikinci bölümünde toksisitenin objektif bulgusu olarak histopatolojik incelemeyi uygun gördük.

Ericson ve arkadaşlarının intravitreal kemoterapötik ajan enjeksiyonu üzerine yaptıkları çalışmada metotreksatın 2.5 mg/ml dozunda 0.3 ml enjeksiyonu ile ön kamarada reaksiyon oluştuğu ancak vitreus ve retinada patoloji oluşmadığı, 10 mg/ml metotreksat içeren solüsyondan 0.3 ml intravitreal enjeksiyon yapıldığında ise 6 gözün 5'inde vitreus içerisinde membran oluşumu gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu çalışmadaki dozlardan ilk gruptaki tavşanların gözüne uygulanan ilaç miktarı bizim çalışmamıza yakın olup 750 μg 'dır. Elektrofizyolojik testlerde her iki grupta da belirgin bir patoloji saptanmadığı belirtilmiştir. Bu da vitreusdan retinaya geçen ilaç miktarının az olabileceğine bağlı bulunmuştur.⁷⁸

Vernot ve arkadaşlarının çalışmasında ise 4'er gün aralarla farklı antineoplastik ajanlar tavşan gözüne enjekte edilmiş ve 5- Fluorourasil, doksorubisin ve bleomisin enjeksiyonlarının elektrofizyolojik ve mikroskobik incelemede saptanabilen bir patolojiye yol açmadığı ancak protokole eklenen her ilaçla artarak thiotepa, ethoposid ve metotreksat enjeksiyonlarının elektrofizyolojik testlerde ve ışık mikroskobik incelemede patolojik değişikliklere sebep olduğu belirtilmiştir. Işık mikroskobik incelemede adı geçen beş antineoplastik ajanın enjeksiyonunun ardından orta derecede retinal hasarlanma olarak belirtilen bölgesel retinal inceltme ile beraber periferik katlantı oluşumu, iç nükleer tabakada belirgin vakuolizasyon ve fotoreseptör hücrelerin dış segmentlerinde yer yer kayıplar görülmüş, protokole 600 µg metotreksat eklenmesinin ardından ciddi hasarlanma olarak nitelenen retinanın bütününde inceltme, retinal hücre tabakalarında organizasyon bozukluğu ve fotoreseptör hücrelerin dış segmentlerinin tamamen kaybı izlenmiştir.⁷⁹

Velez ve arkadaşlarının intravitreal kombinasyon kemoterapisinin tavşan gözünde sebep olabileceği değişiklikleri belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada, deney grubundaki tavşanlara birinci gün 800µg metotreksat, 2. gün 1000µg fluorourasil, 4. ve 6. günlerde 800 µg metotreksat, 7. gün 1000 µg deksametazonun intravitreal enjeksiyonu yapılmıştır. Bu protokol aylık periyotlar ile üç kez tekrar edilmiştir. Son enjeksiyonu takiben 3 ay boyunca elektrofizyolojik tetkikler ile olası toksisite takip edilmiş ve 3. ayda tavşan gözleri enükle edilerek histopatolojik inceleme yapılmıştır. ERG takiplerinde istatistiksel anlamlı bir azalma saptanamadığı ve histolojik olarak da ışık mikroskobik değerlendirmelerde patolojik bulgu görülmediği belirtilmiştir.⁷⁶

Yaptığımız çalışmada intakt tavşan retinasını da inceleme amacımız preparat hazırlanması esnasında iskemiye ve olası başka sebeplere bağlı oluşabilecek retinal hasarlanmayı cerrahi müdahaleye ya da kullandığımız antineoplastik ajana bağlama hatasından uzaklaşmaktır. Bu tavşan retinasında patolojik bulgu saptamamız kullandığımız yöntemlerin preparasyon artefaktına yol açmadığını göstermektedir.

Intravitreal metotreksat enjeksiyonunun ardından ilacın vitreusda etkinliğini sürdürdüğü erken dönem histopatolojik incelemelerde; Hücrelerde yer yer ödem ve hafif vakuolizasyon görülmesi, özellikle metabolik hızı en yüksek olan hücresel organel mitokondrionlarda yer yer görülen şişme ve iç membran kayıpları, değişikliklerin bir antimetabolit olan ve purin bazı sentezini bozarak ATP oluşumunu da engelleyen metotreksata bağlı oluşabilecek bir hasar olduğunu düşündürdü. Hücre tabakalarında

incelme, kaybolma veya organizasyon bozukluğu oluşmaması ve hücre çekirdeklerinin normal yapılarını koruması ise bu hasarın minimal, belki de geri dönüşümlü olduğu izlenimini verdi.

Kontrol grubundaki dört kez intravitreal dengeli tuz solüsyonu enjeksiyonu yapılan tavşanın retinasının ışık mikroskopik incelemesinde, i nüklear tabaka, gangliyonik tabaka ve sinir lifi tabakasında hücreler arası alanda ödemi temsil eden hafif vakuolizasyon, elektron mikroskopik incelemede ise retina pigment epitel hücrelerinin apikalinde ve gangliyonik tabakadaki hücrelerde mitokondrial vakuolizasyon izlenmesi, uygulanan farmastikden bağımsız olarak retinal hücrelerde intravitreal enjeksiyonların tekrarlanması ile minimal hasar oluştuğunu gösterdi. Bu hasar enjeksiyona bağlı inflamatuvar yanıt sebebi ile oluşabileceği gibi, dört kez akut olarak artan göz içi basıncının oluşturduğu geçici retinal hipoperfüzyona da bağlı oluşabilir. Velez ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kontrol grubunda böyle bir hasar oluşmamış olması ise o grubun enjeksiyon öncesi bir miktar ön kamara sıvısı aspire ederek ve enjeksiyonda kullanılan sıvı miktarını 32 l ile sınırlayarak akut göz içi basıncı artışını engellemiş olmaları ile açıklanabilir.⁷⁶

Yedişer gün arayla 800g intravitreal metotreksat enjeksiyonunu takiben otuzuncu günde enükle edilen tavşan retinalarında ışık mikroskobu ile gözlenen; Koni ve rod tabakaları, i nüklear tabaka ve gangliyonik hücre tabakalarındaki ödem ve i nüklear tabakada yer yer hücre kaybını düşündüren hücresel düzensizlik olması. Elektron mikroskopik incelemede ise hücrelerde yer yer vakuol izlenmesi, dış nüklear tabakada az sayıda hücre akirdeğinin dejenere olması, fotoreseptör hücre uzantılarında miyelin figürler izlenmesi ile sinir lifi tabakasında membranöz yapıların yer alması, kontrol grubuna oranla deney grubunda daha fazla hasar oluştuğunu gösterdi. Kontrol grubunda görülen hasarlanma hipoperfüzyona da, inflamatuvar yanıtı da bağlı oluşmuş olsa, deney grubunda bunları daha belirgin olarak görmemiz beklenen bir sonuç olarak değerlendirildi. Intravitreal enjeksiyonu yapılan madde ne olursa olsun dengeli tuz solüsyonu kadar vitreus fizyolojisine ve biyokimyasal yapısına uygun olmayacağı için daha fazla inflamatuvar yanıt yaratacaktır, ayrıca metotreksat, bir antimetabolit olarak hipoperfüzyonun yaratacağı hücresel metabolizmadaki yavaşlamayı mutlaka bir miktar arttıracaktır.

Velez ve arkadaşları, tekrarlayan intravitreal kombinasyon kemoterapisinin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında  kr uygulama sonucunda tavşan retinalarında ışık mikroskopik inceleme ile patolojik bulgu saptamadıklarını belirtmişlerdir.⁷⁶ Deney

grubunda kontrol grubunda izlediğimizden daha fazla hasar gözlemiş olmamız, bu grup ile farklı bulduğumuz sonuçların sadece akut olarak artan göz içi basıncı ile açıklanamayacağını düşündürmektedir. Uygulama protokolleri arasındaki farklılık bunun sebebi olabilir. Velez ve arkadaşlarının çalışmasında metotreksatın bu protokolle vitreusda sekiz gün etkin düzeyde kalacağı ve bu süreçte S fazına giren birçok lenfoma hücrelerini öldüreceği belirtilmiştir. İkinci küre kadar geçen 21 günlük ilaçsız dönemde retinal hücrelerin metabolizmasının normale dönmesi, çalışmamızda gözlediğimiz hafif retinal hasarın bu çalışmada gözlenmemesinin bir sebebi olabilir. Ayrıca her kürede yedinci günde 1 mg intravitreal deksametazon enjeksiyonu ile inflamatuvar yanıtın baskılanması, buna bağlı oluşabilecek retinal harabiyetin azalmasını sağlamış olabilir.

Uzun dönem takipleri yapılan 6 gözden kontrol grubundaki tavşanın bir gözünde ve deney grubundaki bir tavşanın her iki gözünde katarakt gelişmiş olması ve lens opasifikasyonunun enjeksiyon yapılan kadrana yakın bölgede başlamış olması; katarakt gelişiminin kullandığımız farmasötikden bağımsız olarak intravitreal enjeksiyon esnasında lens kapsülünün zedelenmesiyle ilişkili olduğunu düşündürdü.

Kanser kemoterapisinde etkinliği kanıtlanmış olan metotreksat sistemik inflamatuvar hastalıkların ve bunların oküler tutulumlarının tedavisinde de uzun dönem- düşük doz sistemik uygulama ile yerini almıştır.

Messas-Kaplan ve arkadaşları 5 yıllık steroid kullanımı ile hastalığın yeterli kontrolünün sağlanamadığı üveit veya skleritli 39 olguda sistemik metotreksat kullanmışlar. Çalışma kapsamına alınan 10 hastada tedavi yan etkilerinden dolayı sonlandırılmış. Yirmiüç hastada inflamasyonun tam veya kısmi olarak baskılandığı, bunlardan onunda ortalama 20,9 aylık ilaç kullanımı sonunda tedavinin kesildiği ve nüks görülmediği bildirilmiştir. Tedaviye devam edilebilen hastalarda topikal ve sistemik kortikosteroid kullanımının belirgin ölçüde azaldığı bildirilerek metotreksat, kortikosteroidden kaçınmada ilk seçenek olarak önerilmiştir.⁶²

Samson ve arkadaşları tarafından Massachusetts Göz ve Kulak Kliniği Oküler İmmünoloji ve Üveit servisinde enfeksiyöz olmayan kronik üveit sebebiyle sistemik metotreksat kullanan hastaların dosyaları incelenmiş. Çalışma kriterlerine uyan 160 hastanın %76'sında inflamasyonun kontrol altına alındığı, %56'sında steroidden kaçınma etkisinin görüldüğü, %90'ında görme keskinliğinin korunduğu veya arttığı belirtilmiş. Hastaların %18'inde yan etkilerden dolayı tedavi sonlandırılırken %8,1'inde ise tehlikeli yan etkiler

saptanmış.⁵⁴ Bom ve arkadaşlarının kortikosteroid ile kontrol altına alınamayan, görmeyi tehdit eden üveitli 11 olguluk serilerinde de sistemik düşük doz metotreksat tedavisi ile hastaların % 50'sinde steroidden kaçınma etkisi görülerek inflamasyonun kontrolünün sağlandığı, relapsların da %45 azaldığı bildirilmiştir.⁵⁴

Dev ve arkadaşlarının sarkoide bağlı üveitli hastaların metotreksata cevabını inceleyen çalışması 11 hastanın 20 gözünü kapsamaktadır. Hastaların sekizinde sarkoid tanısı konduğu, üçünde ise laboratuvar tetkikleri negatif olmasına rağmen hastalığın kliniğinin sarkoid düşündürdüğü belirtilmiş. Metotreksat tedavisi başladıktan sonra gözlerden % 90'ında görme keskinliğinin korunduğu veya arttığı, başlangıçta oral kortikosteroid kullanmakta olan hastaların hepsinde kortikosteroidden kaçınma etkisi gözlenirken % 86'sında sistemik steroidlerin tamamen bırakıldığı, ortalama topikal steroid dozunun tedavi öncesi 26,6 mg iken tedavi sonrası 1,5 mg' a düştüğü, gözlerden % 95' inde oküler inflamasyonun azaldığı veya stabilize olduğu bildirilirken görülen yan etkilerin hafif ve geçici veya geri dönüşlü olduğu belirtilmiştir.⁶⁰

Sistemik yan etkiler, oküler inflamasyonun kontrolünde böylesine yüksek etkinlik gösteren metotreksatın kullanımını sınırlamaktadır. Ayrıca literatürde az sayıda da olsa düşük doz-sistemik metotreksat kullanımına bağlı optik nöropati olgusu yer almaktadır.

Balachandran ve arkadaşları, romatoid artrit tedavisi için haftada bir kez 15 mg metotreksat kullanan bir hastada metotreksata bağlı optik nöropati geliştiğini bildirmişler. Hastanın serum ile eritrosit folat düzeylerinin normal olması ve sistemik toksisite görülmemesinin ise optik sinirde folik asit kullanımının izole olarak azaldığını düşündürdüğünü belirtmişlerdir.⁶³

Metotreksatın izole oküler patolojilerde lokal kullanımının yolu ancak bu uygulamalardaki farmakokinetiğinin ve toksisitesinin veya güvenilirliğinin belirlenmesiyle açılacaktır. Çalışmamızda oküler lenfomayı hedef alarak yüksek doz intravitreal metotreksat uygulamalarını incelediğimizde; tavşan gözünde 800µg intravitreal metotreksat enjeksiyonunun yedi gün arayla dört kez tekrarlanması bile ancak minimal retinal hasarlanma oluştuğunu gördük. Ortalama 4-5 ml olan insan göz hacmiyle 1.2-1.5 ml arasında olan tavşan göz hacmi karşılaştırıldığında, kullanılan metotreksat miktarı çok yüksek olmasına rağmen metotreksatın intravitreal enjeksiyonunun retinal toksisite açısından güvenli olduğunu düşünmekteyiz. Yapılacak uzun dönem çalışmalarda

testlerin ışığında retinada izlenen minimal histolojik değişikliklerin görsel fonksiyonlara etkisinin ve kalıcı olup olmadığının belirlenmesi gerekmektedir.

Metotreksatın subkonjonktival enjeksiyonlarının da lösemide remisyonu sağlayabildiği belirtildiğine göre, üveit gibi nisbeten selim patolojilerde subkonjonktival veya düşük doz intravitreal metotreksat enjeksiyonlarının etkinliğinin ve farmakokinetiğinin belirlendikten sonra klinik kullanıma girebileceğini düşünüyoruz.



6. SONUÇLAR

1. İntravitreal 800µg metotreksatenjeksiyonunu takiben vitreusdaki ilaç düzeylerinin logaritmik bir eğriye uygun olarak azaldığı ve üssel eşleştirme yapılarak bu eğrinin matematiksel bağlantısı ilaç düzeyi= $1426,73 e^{-0,1182(\text{zaman})}$ olarak bulundu.

2. Bulunan matematiksel bağlantı ile metotreksatın bu dozda intravitreal enjeksiyonu ile vitreusda 81 saat etkin düzeyin üzerinde kaldığı ve yarılanma zamanının 5.9 saat olduğu belirlendi.

3. Daha önceki çalışmalarda genellikle sadece ışık mikroskopik yöntemlerle incelenmiş olan yüksek doz metotreksatın intravitreal enjeksiyonunun oluşturabileceği retinal harabiyet bu çalışmada elektron mikroskopi ile de değerlendirildi. Metotreksatın yüksek dozda tekrarlayan enjeksiyonlarının bile retinada minimal histopatolojik değişikliklere yol açtığı gözlemlendi. Bu hasarın kalıcı olup olmadığının daha uzun dönemli takipler ile belirlenmesi gerektiği düşünüldü.

4. Retinada izlenen minimal hasarın görsel fonksiyonlara yansıması elektrofizyolojik tetkiklerin yer alacağı çalışmalar ile belirlenmelidir.

5. İntravitreal metotreksat enjeksiyonu ile ilacın vitreusda uzun süre etkin düzeyde kalması ve oluşturduğu minimal retinal hasar göz önünde bulundurularak ileri aşama klinik vaka kontrollü çalışmalar sonucunda günümüzde intraoküler lenfomada ilk tedavi seçeneği olan lokal radyoterapi uygulamalarına alternatif bir yöntem olabileceği düşünüldü.

6. Metotreksatın inflamatuvar hastalıkların oküler tutulumlarında sistemik uygulamaları günümüzde yaygınlaşmaktadır. Lokal uygulamaların sistemik uygulamalara alternatif bir yöntem olarak etkinliği ve güvenilirliği kanıtlandıktan sonra tedavi protokollerinde yer alabileceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Shachat AP. Tumours of the retina, choroid and vitreous. In: Ryan JS Eds. *Retina*. 2nd. Ed, St. Louis: Mosby; 1994: 567-907.
2. Kanski JJ. Tumours of the eye. *Clinical Ophthalmology*, 3rd Ed, Oxford: Butterworth Heinemann, 1999: 280-95
3. Bardenstein DS. Intraocular lymphoma. *Cancer Control Journal* (Electronic Journal), 1998; 5(4).
Erişim: (<http://www.moffitt.usf.edu/pubs/ccj/>)
Erişim tarihi:24.11.2002.
4. Specht CS, Laver MN. Benign and malignant lymphoid tumors, leukemia and histiocytic lesions. In Albert MD. Ed. *Principles and Practice of Ophthalmology*. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 2000: 5146-5161.
5. Peterson K, Gordon KB, Heinemann MH, DeAngelis LM. The Clinical Spectrum of Ocular Lymphoma. *Cancer*, 1993; 72(3): 843-849.
6. Nelson DF. Radiotherapy in the treatment of primary central nervous system lymphoma. *J Neurooncol*, 1999; 43: 241-247.
7. DeAngelis LM, Yalahom J, Thaler HT. Combined modality therapy for primary CNS lymphoma. *J Clin Oncol*, 1992; 10: 635-643.
8. Strauchen JA, Dalton J, Friedman HA. Chemotherapy in the management of intraocular lymphoma. *Cancer*, 1989; 63: 1918-1921.
9. Blay JY, Conroy T, Chevreau C et al. High dose methotrexate for the treatment of primary cerebral lymphomas: Analysis of survival and late neurologic toxicity in a retrospective series. *J Clin Oncol*, 1998; 16: 864-871.
10. Ferreri AJ, Reni M, Pasini F et al. A multicenter study of treatment of primary CNS lymphoma. *Neurology*, 2002; 58: 1513-20.
11. Fishburne BC, Wilson DJ, Rosenbaum JT, Neuwelt EA. Intravitreal methotrexate as an adjunctive treatment of intraocular lymphoma. *Arch Ophthalmol*, 1997; 115: 1152-1156.
12. Mason JO, Fischer DH. Intrathecal chemotherapy for recurrent central nervous system intraocular lymphoma. *Ophthalmology*, 2003; 110(6): 1241-1244.
13. Velez G, Boldt HC, Whitcup SM, Nussenblatt RB et al. Local methotrexate and dexamethasone phosphate for the treatment of recurrent primary intraocular lymphoma. *Ophthalmic Surg Lasers*, 2002; 33(4): 329-333.
14. de Smet MD, Vancs VS, Kohler D, Solomon D. Intravitreal chemotherapy for the treatment of recurrent intraocular lymphoma. *Br J Ophthalmol*, 1999; 83: 448-451.
15. de Smet MD. Intraocular lymphoma with intravitreal methotrexate. *Bull. Soc. Belge Ophthalmol*, 2001; 279: 91-95.
16. Helbig H, Cerny T, de Smet MD. Intravitreale chemotherapie bei okulozerebralem lymphom. *Ophthalmologe*, 2003; 100: 145-149.
17. Peter V, Neuwelt EA, Pe'er J, Smith JR et al. Role of intravitreal methotrexate in the management of primary central nervous system lymphoma with ocular involvement. *ACSO Abstracts*, 2001: 230 (abs).

erişim:http://www.careers.jco.org/ac/1,1003,_12-002636-00_18-0010-00_19-00230,00.asp.
erişim tarihi: 25 11 2002

18. **Gerald K.** *Cell and Molecular Biology*. New York: John Willey & Sons. Inc. 1996; 695-9
19. **The Collaborative Ocular Melanoma Study Group.** Accuracy of diagnosis of choroidal melanomas in the Collaborative Ocular Melanoma Study: COMS report no. 1. *Arch Ophthalmol*. 1990; 108: 1268-1273.
20. **American Academy of Ophthalmology.** Ophthalmic Pathology & Intraocular Tumors. *Basic & Clinical Science Course, Section 4*. American Academy of Ophthalmology. 1999: 217-280.
21. **Mukai S, Reinke MH, Gragoudas E S.** Diagnosis of Choroidal Melanoma. In Albert MD. Ed. *Principles and Practice of Ophthalmology*. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 2000: 5017-5028.
22. **Marcus DM, Sahel JA, Camp MW, Jacobiec FA.** Pigmented Tumors of the Iris. In Albert MD. Ed. *Principles and Practice of Ophthalmology*. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 2000: 5005-5016.
23. **Sahel JA, Meyer LH, Marcus DM, Albert DM.** Nevus and Melanocytoma. In Albert MD. Ed. *Principles and Practice of Ophthalmology*. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 2000: 5057-5063.
24. **Lee TW.** Diagnosis of intraocular tumors.
Erişim:(<http://www.eyedoctor.snu.ac.kr/sem9918.html>)
Erişim tarihi: 30.11. 2002.
25. **Kincaid MC.** Uveal melanoma. *Cancer Control Journal* (Electronic Journal), 1998; 5(4).
Erişim: (<http://www.moffitt.usf.edu/pubs/ccj/>)
26. **Olsen KL, Murray TG, Johnson RN.** Enucleation and Plaque Treatment. In Albert MD. Ed. *Principles and Practice of Ophthalmology*. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 2000: 5028-5046.
27. **Margo CE, Harman LE, Mulla ZD.** Retinoblastoma. *Cancer Control Journal* (Electronic Journal), 1998; 5(4).
Erişim: (<http://www.moffitt.usf.edu/pubs/ccj/>)
Erişim tarihi: 27.11.2002.
28. **Petersen AR.** Retinoblastoma. In Albert MD. Ed. *Principles and Practice of Ophthalmology*. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 2000: 5095-5102.
29. **Small W.** Management of ocular metastasis. *Cancer Control Journal* (Electronic Journal), 1998; 5(4).
Erişim: (<http://www.moffitt.usf.edu/pubs/ccj/>)
Erişim tarihi: 27.11.2002.
30. **Volpe NJ, Albert DM.** Metastases to the Uvea. In Albert MD. Ed. *Principles and Practice of Ophthalmology*. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 2000: 5073-5084.
31. **Shields CL.** Survey of 520 eyes with uveal metastases. *Ophthalmology*, 1997; 104:1265-1276.
32. **Harbour J, Char DH.** Intraocular lymphoid tumors. In Guyer DR Eds. *Retina-Vitreous-Macula*. 1st Ed, Philadelphia: WB Saunders Co; 1999: 1051-1280.
33. **Whitcup SM, Stark-Vancs V, Wittes RE et al.** Association of interleukin 10 in the vitreous and cerebrospinal fluid and primary central nervous system lymphoma. *Arch Ophthalmol*, 1997; 115: 1157-1160.
34. **Wilson DJ, Brazier R, Rosenbaum JT.** Intraocular lymphoma: immunopathologic analysis of vitreous biopsy specimens. *Arch Ophthalmol*, 1992; 110: 1455-1458.

35. Ferreri AJM, Blay JY, Reni M, Pasini F, et al. Relevance of intraocular involvement in the management of primary central nervous system lymphomas. *Ann Oncol*, 2002; 13(4): 531-538.
36. Baumann MA, Ritch P, Hande KR, Williams GA et al. Treatment of intraocular lymphoma with high dose Ara-C. *Cancer*, 1986; 57: 1273-1275.
37. Freilich JR, Delattre YJ, Monjour A, DeAngelis ML. Chemotherapy without radiation therapy as initial treatment for primary CNS lymphoma in older patients. *Neurology*, 1996; 46: 435-439.
38. Papageorgio C, McLeod HL. Chemotherapy: Principles and Pharmacology. In Govindan R, Arquette MA Eds. *The Washington Manual of Oncology*. 1st Ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Co; 2002: 11-49.
39. Markman M. Principles of regional antineoplastic drug delivery. In Markman M Eds. *Regional Chemotherapy*. 1st Ed, New Jersey: Humana Press Inc; 2000: 1-4.
40. Forman AD, Levin VA. Intraventricular therapy. In Perry MC Ed. *Chemotherapy Source Book*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1992; 213-225.
41. Stevens G, Peereboom DM. Principles of intrathecal chemotherapy. In Markman M Eds. *Regional Chemotherapy*. 1st Ed, New Jersey: Humana Press Inc; 2000: 305-16.
42. Giannone L, Greco FA, Hainsworth JD. Combination intraventricular chemotherapy for meningeal neoplasia. *J. Clin. Oncol*, 1986; 4: 68-73.
43. Hitchins RN, Bell DR, Woods RL, Levi JA. prospective randomized trial of single agent versus combination chemotherapy in meningeal carcinomatosis. *J. Clin. Oncol*, 1987; 5: 1655-1662.
44. Petit T, Defour P, Korganov AS. Continuous intrathecal perfusion of methotrexate for carcinomatous menengitis with pharmacokinetic studies: two case studies. *Clin. Oncol*, 1997; 9: 189-190.
45. Nakagawa H, Fujita T, Kubo S et al. Ventriculolumbar perfusion chemotherapy with methotrexate and cytosine arabinoside for meningeal carcinomatosis: a pilot study of 13 patients. *Surg. Neurol*, 1996; 45: 256-264.
46. Bleyer WA, Poplack DG, Simon RM. 'Concentration x time' methotrexate via a subcutaneous reservoir: a less toxic regimen for intraventricular chemotherapy of central nervous system neoplasms. *Blood*, 1987; 51: 835-842.
47. Gülecek O, Menteş J, Arslan AK, Karagül S. Arka segment ilaç uygulamalarında farmakokinetik ve farmakodinamik. 20. *Ulusal Oftalmoloji Kursu*. Ankara-Türkiye, Nisan 2000: 64-111.
48. Benet ZL. Pharmacokinetics: Absorbption, distribution, & elimination. In: Katzung BG Eds. *Basic & Clinical Pharmacology*. 5th Ed. Norwalk: Prentice-Hall Int. Inc, 1992: 35-48.
49. Urtti A, Salminen L. Animal Pharmacokinetic Studies. In: Mitra AK ed. *Ophthalmic drug Delivery System*. Marcel Dekker Inc. New York 121-136.
50. Hegazy HM, Kıvılcım M, Peyman GA, Ünal MH et al. Evaluation of toxicity of intravitreal ceftazidime, vancomycin and ganciclovir in a silicone oil filled eye. *Retina*, 1999; 19: 553-557.
51. Methotrexate. In: O'Neil MJ Eds. *The Merck Index of Chemicals, Drugs and Biologicals*, Whitehouse Station: Merck & Co Inc, 2001: 1071.
52. Salmon ES, Sartorelli AC. Cancer chemotherapy. In: Katzung BG Eds. *Basic & Clinical Pharmacology*. 5th Ed. Norwalk: Prentice-Hall Int. Inc, 1992: 766-800.

53. Kayaalp O. Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar. *Tıbbi Farmakoloji*. 8. Baskı, Ankara: Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şt. 2000: 392-394.
54. Samson MC, Waheed N, Baltatzis S, Foster CS. Methotrexate therapy for chronic noninfectious uveitis. *Ophthalmology*, 2001; 108(6): 1134-1139.
55. Chládek J, Martinková J, Šimková M, Vaněčková J et al. Pharmacokinetics of low doses of methotrexate in patients with psoriasis over the early period of treatment. *Eur J Clin Pharmacol*, 1998; 53: 437-444.
56. Bannwarth B, Labat L, Moride Y, Schaeffer T. Methotrexate in rheumatoid arthritis. An update. *Drugs*. 1994; 47: 25-50.
57. Kremer JM et al. Methotrexate for rheumatoid arthritis: suggested guidelines for monitoring liver toxicity. *Arth Rheum*, 1994; 37: 316-328.
58. Khalatbari D, Mc Callum RM, Jaffe JG. Methotrexate. *American Uveitis Society*. 2003
Erişim: (<http://www.uveitisociety.org/pages/diseases/methotrexate.html>) Ocak 2003.
Erişim tarihi: 13.3. 2003.
59. Bom S, Zamiri P, Lightman S. Use of methotrexate in the management of sight-threatening uveitis. *Ocular Immunology and Inflammation*, 2001; 9(1): 35-40.
60. Dev S, McCallum RM, Jaffe JG. Methotrexate Treatment for Sarcoid Associated Panuveitis. *Ophthalmology*, 1999; 106(1): 111-118.
61. Kiss S, Letko E, Quamruddin S, Baltatzis S, Foster S. Long term progression, prognosis, and treatment of patients with recurrent ocular manifestations of Reiter's syndrome. *Ophthalmol.*, 2003; 110(9): 1764-1769.
62. Messas KA, Yaniv B, Avni I, Neumann R. Methotrexate as a first-line corticosteroid-sparing therapy in a cohort of uveitis and scleritis. *Ocular Immunology and Inflammation*, 2003; 11(2): 131-139.
63. Blachandran C, McCluskey PJ, Champion DG, Halmagyi GM. Methotrexate induced optic neuropathy. *Clin Exp Ophth*, 2002; 30(6): 440-43.
64. Kaya M. Elektron Mikroskopi Teknikleri. *Ç.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 1984; 9: 1-21.
65. Millonig G. Advantages of phosphate buffer for OsO4 solutions and fixation. *J. App. Physics*. 1961; 32: 1637.
66. Ferreri AJM, Dell'oro S, Reni M et al. Questions and answers in the management of primary central nervous system and ocular lymphomas. *Journal of Haematology*, 2003; 88(09): 1063-1068.
67. de Smet MD, Vancs VS, Kohler D, Smith J et al. Intraocular levels of methotrexate after intravenous administration. *Am J Ophthalmol*, 1996; 121(4): 442-444.
68. Kaufman PL, Gabelt BT. Aqueous humor hydrodynamics. In: Alm A, Kaufman PL Eds. *Adler's Physiology of the Eye*. 10th Ed, St. Louis: Mosby, 2003: 237-292.
69. Andersen HL. Vitreous. In: Alm A, Kaufman PL Eds. *Adler's Physiology of the Eye*. 10th Ed, St. Louis: Mosby; 2003: 293-318.
70. Alimgil L, Mirza EG, Acar S, Batoğlu F. Ön segment ilaç uygulamalarında farmakokinetik ve farmakodinamik. 20. *Ulusal Oftalmoloji Kursu*. Ankara-Türkiye, Nisan 2000: 14-63.
71. Rootman J, Gudauskas G. Treatment of ocular leukemia with local chemotherapy. *Cancer Treat Rep*, 1985; 69(1): 119 (abs).

72. Doolittle ND, Miner ME, Hall WA. Safety and efficacy of a multicenter study using intraarterial chemotherapy in conjunction with osmotic opening of the blood-brain barrier for the treatment of the patients with malignant brain tumors. *Cancer*, 2000; 88: 637-47.
73. Kraemer DF, Fortin D, Neuwelt EA. Chemotherapeutic dose intensification for treatment of malignant brain tumors: Recent developments and future directions. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2002; 2: 216-24.
74. Henson JW, Yong T, Batchelor T. Intraocular methotrexate level after high dose intravenous infusion. *J Clin Oncol*, 1999; 17 :132-9.
75. National Cancer Institute, National Institutes of Health. Developmental Therapeutics Program. Erişim: (<http://www.dfp.nei.nih>) 1999
Erişim tarihi: 21.11.2002.
76. Velez G, Yuan P, Sung C, Tansey G et al. Pharmacokinetics and toxicity of intravitreal chemotherapy for primary intraocular lymphoma. *Arch Ophthalmol*, 2001; 119: 1518-1524.
77. Crom WR. Methotrexate. In: Ewans WE Eds. *Applied Pharmacokinetics: Principles of Therapeutic Drug Monitoring*. Vancouver, WA: Applied Therapeutics Inc, 1992; 29: 1-42.
78. Ericson L, Karlberg B, Rosengren BHO. Trials of intravitreal injections of chemotherapeutic agents in rabbits. *Acta Ophthalmol*, 1964; 42: 721-26.
79. Vernot J, Peyman GA, Gailitis R, Fiscella R et al. Effects of selected repeated intravitreal chemotherapeutic agents. *Int Ophthalmol*, 1985; 8(4): 193-98.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ebru (Bener) ÖZKAN

Doğum Tarihi ve Yeri : 01.01.1974 ADANA

Medeni Durumu : Evli –1 çocuklu

Adres : Ziyapaşa Bulv. Ciritçioğlu Apt. 53/4 Kat:2
Seyhan ADANA

Telefon : 0 322 457 60 52 – 0542 725 85 02

E.mail : cenkozkan@tt.net.net.tr

Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Görev Yerleri : Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları
Anabilim Dalı 01330 Balcalı ADANA

Dernek Üyelikleri : Türk Oftalmoloji Deneği Çukurova Şubesi
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Kliniği
Derneği

Yabancı Dil(ler) : İngilizce, Almanca