

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

PROFİLAKTİK İNTRAVİTREAL MELATONİN VE BEVACİZUMAB
ENJEKSİYONUNUN RADYOTERAPİYE BAĞLI OKÜLER YAN ETKİLER
ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Dr. Alper KAHVECİOĞLU

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2024

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**PROFİLAKTİK İNTRAVİTREAL MELATONİN VE BEVACİZUMAB
ENJEKSİYONUNUN RADYOTERAPİYE BAĞLI OKÜLER YAN ETKİLER
ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Dr. Alper KAHVECİOĞLU

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Gözde YAZICI

ANKARA

2024

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimime başladığım günden itibaren üzerimde büyük emekleri olan, sonsuz bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tez sürecim içerisinde emekliliğe ayrılan saygıdeğer tez danışmanı hocam Prof. Dr. Abdullah Faruk Zorlu ve takibinde tez danışmanlığımı üstlenerek beni hiçbir zaman yalnız bırakmadığı gibi tez sürecimde de yalnız bırakmayan sayın Prof. Dr. Gözde Yazıcı başta olmak üzere, sayın Prof. Dr. Gökhan Özyiğit, Prof. Dr. Ferah Yıldız, Prof. Dr. Mustafa Cengiz, Prof. Dr. Murat Gürkaynak, Prof. Dr. Fadıl Akyol, Prof. Dr. Pervin Hürmüz, Prof. Dr. Melis Gültekin ve Doç. Dr. Sezin Yüce Sarı'ya sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Beş yıllık asistanlık sürecim boyunca birlikte çalışma fırsatı bulduğum başta Dr. Ayşenur Elmalı, Dr. Çağlayan Selenge Bedük Esen, Dr. Melek Tuğçe Yılmaz Aslan, Dr. Burak Tilki ve Dr. Ecem Yiğit olmak üzere tüm hekim arkadaşlarıma, fizik mühendislerine, hemşirelere ve personele en içten şekilde teşekkür ederim. Bu süreçte desteklerini esirgemeyen sevgili dostum Dr. Neslihan Durmaz'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin çalışma protokolünü oluşturma ve uygulama aşamasındaki tüm katkıları için Prof. Dr. Samiye Yabanoğlu Çiftçi'ye, Doç. Dr. İrem Koç'a, Dr. Nergiz Rustamova'ya ve Prof. Dr. Selçuk Sürücü'ye sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatımın her alanında yanımda olan, bugünlerimin mimarı sevgili annem Nurhan Kaygusuz, babam Mehmet Kahvecioğlu ve canım kardeşim Nehir Kahvecioğlu'na tüm varlıkları için sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Alper Kahvecioğlu, Profilaktik İntravitreal Melatonin ve Bevacizumab Enjeksiyonunun Radyoterapiye Bağlı Oküler Yan Etkiler Üzerindeki Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi, Radyasyon Onkolojisi Uzmanlık Tezi, Ankara, 2024. Bu çalışmanın amacı, intravitreal melatonin ve bevacizumab enjeksiyonlarının radyoterapi (RT) ile ilişkili oküler komplikasyonlar üzerindeki profilaktik etkilerini incelemektir. Bu amaçla 12 adet erkek Yeni Zelanda beyaz tavşanının bilateral göz kürelerine yönelik 30 Gy RT uygulanmış, RT sonrası 6 tavşanın sol gözüne intravitreal melatonin (100 mcg/kg), diğer 6 tavşanın sol gözüne ise intravitreal bevacizumab (1,25 mg/mL) enjeksiyonu yapılmıştır. Sağ gözler ise kontrol grubunu oluşturmuştur. Altı hafta izlemin ardından tüm tavşanlara bilateral enükleasyon uygulanmıştır. Aspire edilen vitröz sıvılardaki ortalama oksidatif stres indeksi değerleri kontrol, bevacizumab ve melatonin grupları için sırasıyla 22,3, 18,3 ve 9,3 olarak hesaplanmıştır. Elektron mikroskopisi incelemelerinde, kontrol grubundaki retina dokularında ciddi derecede vasküler ve aksonal yapısal hasar gözlenirken, bevacizumab grubunda vasküler hasarın minimal düzeyde olduğu, aksonal hasarın ise orta şiddette olduğu bulunmuştur. Melatonin grubunda ise vasküler hasar izlenmemişken, aksonal hasar ise minimal olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, intravitreal melatonin enjeksiyonunun radyasyon retinopatisi profilaksisinde en az bevacizumab kadar etkili olduğunu ve bevacizumaba kıyasla daha fazla nöroprotektif etki sağladığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: bevacizumab, melatonin, radyoterapi

Bu çalışma KOBAY DHL A.Ş. Yerel Etik Kurulu tarafından 04.07.2023 tarihinde onaylanmış (Onay Numarası: 673) ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir (Proje Numarası: 20917).

ABSTRACT

Alper Kahvecioğlu, Prophylactic Effect of Intravitreal Melatonin and Bevacizumab Injection on Radiotherapy-Induced Ocular Complications, Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Radiation Oncology, Ankara, 2024. The aim of this study is to investigate the prophylactic effects of intravitreal melatonin and bevacizumab injections on radiation therapy (RT)-related ocular complications. Twelve male New Zealand white rabbits received 30 Gy RT to their bilateral ocular globes. Following RT, the left eyes of six rabbits were injected with intravitreal melatonin (100 mcg/kg), and the left eyes of the other six rabbits were injected with intravitreal bevacizumab (1.25 mg/mL), with the right eyes serving as the control group. After a six-week follow-up, bilateral enucleation was performed on all rabbits. The mean oxidative stress index values in the aspirated vitreous fluid were calculated as 22.3, 18.3, and 9.3 for the control, bevacizumab, and melatonin groups, respectively. Electron microscopy examinations revealed severe vascular and axonal structural damage in the retinal tissues of the control group. In the bevacizumab group, vascular damage was minimal, while axonal damage was moderate. In the melatonin group, no vascular damage was observed, and axonal damage was minimal. These results indicate that intravitreal melatonin injection is at least as effective as bevacizumab in the prophylaxis of radiation retinopathy and provides greater neuroprotective effects compared to bevacizumab.

Key Words: bevacizumab, melatonin, radiotherapy

This study has been approved by the Local Ethics Committee of KOBAY DHL Inc. on July 4, 2023 (Approval Number: 673) and supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project Number: 20917).

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	ix
TABLolar.....	xi
EKLER.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Radyoterapi	2
2.2. Oküler Onkoloji Alanında Radyoterapi	2
2.3. Oküler Radyoterapi Uygulanmasına Bağlı Geç Dönem Komplikasyonlar	3
2.4. Oküler Radyoterapiye Bağlı Geç Dönem Komplikasyonların Yönetimi	5
2.4.1. Lazer Fotokoagülasyon.....	5
2.4.2. Fotodinamik Terapi	6
2.4.3. Kortikosteroidler	7
2.4.4. Anti-VEGF ajanlar	8
2.4.5. Diğer Tedaviler	9
2.5. Melatonin	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1. Deney Popülasyonu ve Özellikleri	13
3.2. Radyoterapi Planlanması ve Uygulanması	14
3.3. İlaçların Hazırlanması.....	17
3.4. İntravitreal Enjeksiyon.....	19
3.5. Bakım, Besleme ve Takip	20
3.6. Enükleasyon ve Sakrifikasyon.....	21
3.7. Oksidatif Stres Düzeylerinin İncelenmesi	22
3.8. Histopatolojik İncelemeler	24
3.9. İstatistiksel Analizler	24
4. BULGULAR.....	26

4.1.	Fizik Muayene Bulguları.....	26
4.2.	Oksidatif Stres Düzeylerine İlişkin Bulgular	33
4.3.	Elektron Mikroskopisi Bulguları.....	35
5.	TARTIŞMA	40
5.1.	Kısıtlılıklar.....	43
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	45
7.	KAYNAKLAR.....	47

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Başvuru Onayı

SİMGELER VE KISALTMALAR

BT:	Bilgisayarlı Tomografi
COMS:	Kolaboratif Oküler Melanoma Çalışma Grubu
CTV:	Klinik hedef hacim
DNA:	Deoksiribonükleik asit
DMSO:	Dimetil sülfoksit
FDA:	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Uygulamaları
Gy:	Gray
ICAM-1:	Hücreler arası adezyon molekülü-1
MCP-1:	Monosit kemoatraktif protein-1
Nrf2:	Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2
OSi:	Oksidatif stres indeksi
PBS:	Fosfat tamponlu salin
PSK:	Posterior subkapsüler katarakt
RT:	Radyoterapi
TAS:	Toplam antioksidan durumu
TOS:	Toplam oksidan durumu
TNF:	Tümör nekroz faktörü
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VMAT:	Volümetrik modüle ark tedavisi

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Melatonin sentez basamakları	10
Şekil 3.1. Çalışma protokolü	13
Şekil 3.2. Simülasyon bilgisayarlı tomografisi çekimi	14
Şekil 3.3. Radyoterapi hedef hacimleri (Kırmızı: klinik hedef hacim)	15
Şekil 3.4. Radyoterapi planı (Sarı: %95'lik izodoz, yeşil: %50'lik izodoz)	15
Şekil 3.5. Radyoterapi doz-volüm histogramı (Kırmızı: klinik hedef hacim, yeşil: eksternal kontur).....	16
Şekil 3.6. Deneklerin radyoterapi sırasında izlemi.....	17
Şekil 3.7. İntravitreal enjeksiyon.....	20
Şekil 3.8. Sklerotomi işlemi	21
Şekil 3.9. Vitröz sıvının aspirasyonu.....	22
Şekil 4.1. İkinci haftada izlenen periorbital ödem ve alopesi	27
Şekil 4.2. Üçüncü haftada şiddeti artan periorbital ödem ve alopesi	28
Şekil 4.3. Dördüncü haftada şiddeti azalan periorbital ödem ve artan alopesi	28
Şekil 4.4. Beşinci haftada izlenen stabil periorbital ödem ve alopesi.....	29
Şekil 4.5. Posterior subkapsüler katarakt (2 numaralı denek).....	31
Şekil 4.6. Posterior subkapsüler katarakt (10 numaralı denek).....	31
Şekil 4.7. Atılmış pamuk manzarası (5 numaralı denek).....	32
Şekil 4.8. Retinal mikroanevrizmalar (11 numaralı denek).....	32
Şekil 4.9. Farklı uygulama gruplarına ait ortalama OSİ değerlerinin grafiği	35
Şekil 4.10. Kontrol grubuna ait hasarlı retina dokusunun elektron mikroskopi görüntüsü	36
Şekil 4.11. Kontrol grubuna ait hasarlı aksonların elektron mikroskopi görüntüsü ..	36
Şekil 4.12. Kontrol grubuna ait retina dokusuna ait dış pleksiform tabakada vakuolizasyon	37
Şekil 4.13. Bevacizumab grubuna ait normal retina dokusunun elektron mikroskopi görüntüsü	37
Şekil 4.14. Bevacizumab grubuna ait normal retina ve ödemli aksonların elektron mikroskopi görüntüsü	38

Şekil 4.15. Melatonin grubuna ait normal retina dokusunun elektron mikroskopi görüntüsü	38
Şekil 4.16. Melatonin grubuna ait normal aksonların elektron mikroskobisi	39

TABLolar

Tablo 2.1. Kolaboratif Oküler Melanoma Çalışma Grubu (COMS) prospektif randomize çalışmasının sonuçları	3
Tablo 3.1. İntravitreal melatonin enjeksiyonunun incelendiği çalışmalar.....	18
Tablo 4.1. Haftalık fizik muayene bulguları	27
Tablo 4.2. Altıncı haftada yapılan fundus ve lens muayenesi bulguları	30
Tablo 4.3. Altıncı haftada yapılan muayene bulgularının oranlarının gruplar arasındaki karşılaştırılması.....	30
Tablo 4.4. Vitroz sıvı örneklerinin toplam protein derişimleri.....	33
Tablo 4.5. Vitroz sıvı örneklerinin TAS/protein, TOS/protein ve OSİ değerleri	34

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı

1. GİRİŞ

Radyoterapi (RT) sırasında normal dokuların çeşitli seviyelerde radyasyona maruz kalması, erken ve geç dönemde çeşitli komplikasyonların gelişimi için risk oluşturmaktadır. Özellikle oküler onkoloji alanında uygulanan RT nedeniyle retinopati, katarakt, glokom, kseroftalmi gibi geç komplikasyonlar görülebilir.¹ Katarakt veya kseroftalmi gibi komplikasyonlar basit oftalmolojik yaklaşımlarla etkin bir şekilde tedavi edilebilirken; retinopati, glokom ve optik nöropati gibi ciddi morbidite yaratan komplikasyonların tedavisi ise oldukça zordur. Radyasyon retinopatisinin profilaksisinde intravitreal kortikosteroid ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) antagonistlerinin enjeksiyonlarının etkin yaklaşımlar olduğu bilinmektedir.^{2,3} Buna rağmen profilaktik yeni farmakoterapötik ajanlara hala büyük bir ihtiyaç olduğu literatürde açıkça belirtilmiştir.⁴ Melatonin başlıca epifiz bezinden salgılanan, sirkadiyen ritm düzenleyici ve antioksidan etkileri bulunan endojen bir hormondur.⁵⁻⁸ Melatoninin profilaktik kullanımının RT'ye bağlı mukozit, enterit, dermatit gibi çeşitli komplikasyonlar üzerinde olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir.⁹⁻¹⁴ Ek olarak radyasyon ile ilişkili katarakt gelişiminde koruyucu etkileri olduğunu gösteren çalışma sonuçları da mevcuttur.^{15,16} Ancak melatoninin katarakt haricindeki RT'ye bağlı diğer oküler komplikasyonlar üzerindeki profilaktik rolünü inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada profilaktik amaçla intravitreal olarak uygulanan melatoninin ve bir VEGF antagonisti olan bevacizumabın, RT'ye bağlı retinal komplikasyonlar üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla bir deneysel hayvan modeli oluşturulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Radyoterapi

Radyasyon en temel tabiri ile enerjinin bir kaynaktan çevreye doğru taşınmasıdır. Bu taşınma parçacık veya elektromanyetik dalga şeklinde olabilir. Dokuların radyasyon maruziyeti sonucunda kimyasal ve biyolojik birçok tepkime gerçekleşir. Radyasyon bir yandan direkt olarak hücre çekirdeğindeki Deoksiribonükleik Asit (DNA) zincirlerini kırarak, diğer yandan da su molekülleriyle etkileşimi sonucu oluşturduğu serbest oksijen radikalleri aracılığıyla indirekt olarak DNA hasarına yol açar.¹⁷ Oluşan bu hasar, çeşitli tamir mekanizmaları ile onarılabileceği gibi, hücre ölümüyle de sonuçlanabilir. RT birçok kanser tipi ve bazı benign hastalıkların tedavisinde iyonizan radyasyonun kullanıldığı bir tedavi olmakla birlikte tüm kanser hastalarının yarısından fazlasında hastalık süreçlerinin bir bölümünde RT ihtiyacı gelişmektedir.¹⁸

Radyasyonu farklı şekillerde hedefe ulaştırmak mümkündür. Eksternal RT, elektromanyetik veya parçacık formundaki radyasyonun çeşitli tedavi uygulama cihazları ile hastanın vücudunun dışarısından başlayarak vücudunun içerisindeki hedef hacimlere ulaştırılmasını ifade eder. Eksternal RT’de çoğunlukla yüksek enerjili X-ışınlarını içeren foton demetleri veya elektron, proton gibi yüklü parçacıklar kullanılır. Brakiterapi ise, çeşitli radyoaktif kaynakların tümör dokusunun doğrudan içerisine veya hemen bitişiğine yerleştirilmesi ile uygulanan bir RT tekniğidir.¹⁹ Her iki teknik de kanserin türü, yerleşimi, evresi ve hastanın genel sağlık durumu gibi faktörlere bağlı olarak değişmekle birlikte rutin pratikte sıklıkla uygulanmaktadır.

2.2. Oküler Onkoloji Alanında Radyoterapi

Amerika Birleşik Devletleri’nde her yıl primer oküler veya orbital malignite tanısı alan toplam 3540 yeni vaka bildirilmektedir.²⁰ Erişkinlerde en sık saptanan intraoküler malignite koroidal metastazlar iken, en sık primer intraoküler malignite ise üveal melanomdur.²¹ Oküler onkoloji alanına giren diğer hastalıklar ise perioküler cilt kanserleri, orbital ve oküler adneksiyal lenfomalar, lakrimal bez tümörleri, sarkomlar ve retinoblastoma olarak sayılabilir. Her tümör tipi için özgün tedavi

algoritmaları bulunmaktadır ve RT bu algoritmaların neredeyse tamamında kritik bir rol oynamaktadır.²²⁻²⁴ Üveal melanom tedavisinde uzun yıllar boyunca standart lokal tedavi yöntemi olarak enükleasyon tercih edilmiştir. Ancak Kolaboratif Oküler Melanoma Çalışma Grubu (COMS) tarafından yapılan köşe taşı çalışmasının sonuçları, orta boy üveal melanom tanısı konmuş hastalarda plak brakiterapisi ile enükleasyonun benzer onkolojik sonuçlar sağladığını göstermiştir (Tablo 2.1).²⁵ Literatürde brakiterapiye ek olarak foton ve proton tabanlı eksternal RT uygulamaları ile de oldukça yüksek lokal kontrol oranlarının sağlanabildiği belirtilmiştir.²⁶⁻²⁸ Brakiterapi ile eksternal RT uygulamalarını doğrudan karşılaştıran prospektif randomize bir çalışma mevcut olmasa da, günümüzde her iki RT tekniği de etkin tedavi yöntemleri olarak kullanılmaktadır. Orbital lenfomaların tedavisinde ise RT, %90'ın üzerinde lokal kontrol oranı sağlaması nedeniyle tek başına definitif amaçla uygulanabileceği gibi sistemik tedavi sonrasında konsolidasyon amacıyla da uygulanabilir.^{29,30} Dolayısıyla RT, birçok oküler ve orbital malignitenin yönetiminde kritik bir tedavi yöntemi olmaya günümüzde de devam etmektedir.

Tablo 2.1. Kolaboratif Oküler Melanoma Çalışma Grubu (COMS) prospektif randomize çalışmasının sonuçları

	Brakiterapi	Enükleasyon
5-yıllık Melanom Spesifik Mortalite	%10	%11
10-yıllık Melanom Spesifik Mortalite	%18	%17
12-yıllık Melanom Spesifik Mortalite	%21	%17

2.3. Oküler Radyoterapi Uygulanmasına Bağlı Geç Dönem Komplikasyonlar

Oküler, orbital maligniteler veya benign tümörler nedeniyle RT uygulanan tüm hastalar tedavilerinden sonraki uzun süreli izlemlerinde radyasyona bağlı çeşitli komplikasyonlar açısından risk altındadır. Radyasyon retinopatisi, katarakt, neovasküler glokom ve optik nöropati bu komplikasyonlar arasında sayılabilir.

Radyasyon retinopatisi oküler RT sonrasında en sık görülen geç komplikasyonlardan birisidir. Retinal vasküler yatakta radyasyona bağlı gelişen endotel hasarı ile karakterize, ilerleyici ve oklüziv bir vaskülopatidir. Retinal damarların endotel hücrelerindeki sınırlı enzimatik tamir mekanizmaları, iyonizan radyasyona bağlı gelişen vaskülopati için zemin oluşturmaktadır.³¹ Klinik olarak pamuk atılmış manzarası, sert eksudalar, telenjektaziler, mikroanevrizmalar, neovaskülarizasyon, vitröz hemorajiler ve maküler ödem ile kendini gösterebilir.^{32,33} Vakaların tamamına yakınında retinopatinin oftalmoskop ile tespit edilebilen ilk bulgusu mikroanevrizmalardır.³⁴ Retinopati tedavi edilmediği durumda kalıcı görme kaybı ile sonuçlanabilir. Üveal melanom tedavisi amacıyla uygulanan plak brakiterapisi sonrasında radyasyon retinopatisinin görülme oranı 5 yılda %43 olarak rapor edilmiştir.³⁵ Radyasyon makülopatisi ise retinopatinin makülayı ilgilendirdiği tabloları tanımlamak için kullanılan terimdir. Tümör boyutu ve kalınlığı, radyasyon dozu ve tümörün foveaya yakınlığı, makülopati için önemli risk faktörlerindedir.^{36,37} Makülopati, RT'ye bağlı oküler komplikasyonlar arasında en sık kalıcı görme kaybına yol açan komplikasyondur.^{38,39}

Radyasyona bağlı gelişen katarakt, oküler RT sonrasında en sık görülen geç dönem komplikasyonlardan bir diğeridir. COMS grubu, üveal melanom tedavisi amacıyla uygulanan plak brakiterapisi sonrası 5 yıl içerisinde katarakt gelişme oranını %83 olarak saptamıştır.⁴⁰ Fraksiyone uygulanan RT'de 4 Gy, tek fraksiyon uygulamada ise 2 Gy gibi düşük radyasyon dozlarında dahi kataraktogenezin başladığı bilinmektedir.⁴¹ Katarakt her ne kadar radyasyonun eşik değer doza sahip deterministik bir etkisi olarak tanımlansa da, 0,5 Gy gibi oldukça düşük radyasyon dozlarında dahi kataraktogenezin başlayabileceği de literatürde gösterilmiştir.³⁶ Lensin maruz kaldığı doz, anterior tümör yerleşimi, ileri hasta yaşı, mevcut olan kontrolsüz hipertansiyon ve diyabetes mellitus, radyasyona bağlı gelişen katarakt riskini arttıran faktörlerdendir.⁴⁰

Neovasküler glokom, oküler RT sonrası %20'ye varan görülme sıklığı ile bir diğer önemli komplikasyondur.^{42,43} Altta yatan patofizyolojik mekanizma retinal iskemiye ve oksidatif strese bağlı olarak salgılanan proanjiojenik faktörler aracılığıyla

göz içi basıncın artmasıdır.⁴⁴ Özellikle iris yerleşimli üveal melanomlara yönelik uygulanan RT sonrasında vasküler yataktaki iskemi ile indüklenen profilerasyon, neovasküler glokoma neden olabilir.³² Birçok geç komplikasyon kendini görme keskinliğinde azalma ile gösterirken, neovasküler glokom acil enükleasyon gerektiren ağrılı, kırmızı göz tablosuna neden olabilmesi açısından önemlidir.

Radyasyona bağlı optik nöropati ise genellikle optik sinir için tanımlanmış olan doz kısıtlamaları aşıldığında gözlenen, nadir ancak oldukça yıkıcı bir komplikasyondur. Genellikle 54 Gy üzerindeki kümülatif dozlarda görülür.⁴⁵

Bütün bu geç komplikasyonların ortak sonucu olarak görme fonksiyonlarındaki bozulma, hastaların hayat kaliteleri üzerinde olumsuz bir etkiye neden olmaktadır. COMS grubu, üveal melanom tedavisi amacıyla uygulanan plak brakiterapisi sonrası hastaların %50'ye yakın bir oranının ilk 3 yıl içerisinde görme keskinliğinde önemli derecede azalma yaşadığını belirtmiştir.⁴⁶

2.4. Oküler Radyoterapiye Bağlı Geç Dönem Komplikasyonların Yönetimi

Oküler RT'ye bağlı geç dönem komplikasyonlara yönelik tedavi edici yaklaşımlar invaziv olmayan veya minimal invaziv basit işlemlerden enükleasyona kadar uzanan oldukça geniş bir dağılıma sahiptir. Katarakt veya kseroftalmi gibi göreceli olarak daha az morbiditeye sahip komplikasyonlar basit oftalmolojik yaklaşımlar ile etkin bir şekilde tedavi edilebilirken, radyasyon retinopatisi, neovasküler glokom ve optik nöropati gibi ciddi morbidite yaratan tabloların yönetimi ise daha karmaşıktır. Lazer fotokoagülasyon, fotodinamik terapi, perioküler veya intraoküler çeşitli farmakolojik ajanların enjeksiyonları, oral pentoksifilin ve hiperbarik oksijen tedavisi bu komplikasyonların yönetiminde sık kullanılan tedavi seçenekleridir.^{22,32,45,47}

2.4.1. Lazer Fotokoagülasyon

Lazer fotokoagülasyon 1940'lı yıllarda keşfedilmesinin ardından birçok oftalmolojik hastalık için sıklıkla kullanılmış bir tedavi yöntemidir. Özellikle diyabetik retinopati ve makula ödemi tedavisinde onlarca yıl boyunca ilk basamak tedavi olarak kullanılmıştır. Çalışma mekanizmasına bakıldığında uygun dalga boyuna sahip yüksek

yoğunlukta bir lazer kaynağı ile hedef bölgeye uygulandığında hücre ve dokulara ait protein içerikli yapılarda termal denatürasyona yol açması yatmaktadır.^{48,49} Fotokoagülasyonun, oküler RT'ye bağlı gelişen bazı geç dönem komplikasyonların yönetimindeki rolü de çeşitli araştırmalarda incelenmiştir. Üveal melanom nedeniyle plak brakiterapisi uygulanan ve radyasyon retinopatisi gelişen 45 hasta üzerinde yapılmış bir çalışmada, lazer fotokoagülasyon tedavi yöntemi ile hastaların %64'ünde retinopatinin gerilediği izlenmiştir.³⁷ Ek olarak RT sonrası henüz retinopati gelişmemiş ancak arka segment yerleşimli tümör gibi çeşitli nedenlerden dolayı retinopati açısından yüksek risk taşıdığı düşünülen 16 hastaya da profilaktik olarak lazer fotokoagülasyon işlemi uygulanmış ve bu hastaların %81'inde retinopati gelişiminin engellendiği rapor edilmiştir. Washington Üniversitesi'nde yapılan bir diğer çalışmada ise radyasyon retinopatisi nedeniyle panretinal fotokoagülasyon uygulanan hastaların gözlerinin %91'inde neovaskülarizasyonun durduğu rapor edilmiştir⁵⁰. Plak brakiterapisi sonrasında oküler iskemi gelişen 20 hastadan 11'ine panretinal fotokoagülasyon uygulandığı, 9'unun ise tedavisiz bırakıldığı bir retrospektif çalışmada ise, neovasküler glaukom gelişme oranının fotokoagülasyon uygulanan hastalarda anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır⁵¹. Sonuç olarak lazer fotokoagülasyon yöntemi radyasyon retinopatisi ve makülopatisi gibi bazı geç dönem komplikasyonların yönetiminde etkin bir tedavi seçeneği olmakla beraber, rutin profilaktik kullanımını destekleyecek literatür verileri sınırlıdır.

2.4.2. Fotodinamik Terapi

Fotodinamik terapinin yaşa bağlı maküla dejenerasyonunun tedavisinde kullanımı, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Uygulamaları (FDA) tarafından 2000 yılında onaylanmıştır. Temel uygulanış şekli, ışığa duyarlılaştırıcı bir ilaç olan verteporfinin intravenöz uygulanmasını takiben göze düşük güçte, uzun süreli kızılötesi lazer uygulanması şeklindedir. Neovaskülarizasyon varlığı durumunda verteporfin seçici olarak retina ve koroidal patolojik damarlarda toplanır ve kızılötesi radyasyon enerjisi tarafından aktive edildiğinde serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Serbest radikaller ve lokal olarak artan immün modülasyon faktörleri ise endotelial hücre hasarına ve vasküler oklüzyona neden olur. Radyasyon makülopatisi

nedeniyle fotodinamik terapi uygulanan dört hastanın tamamında sert eksuda formasyonunda azalma ve üç hastada görme keskinliğinde artış elde edildiği rapor edilmiştir⁵². Her ne kadar fotodinamik terapinin RT'ye bağlı geç dönem oküler komplikasyonlar üzerindeki etkisine dair literatür verisi oldukça sınırlı olsa da, seçili hastaların komplikasyonlarının yönetiminde gündeme gelebilir. Profilaktik kullanımı için ise literatürde herhangi bir veri bulunmamaktadır.

2.4.3. Kortikosteroidler

Kortikosteroidler çeşitli oküler hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılmış terapötik ajanlardandır. Terapötik etkilerindeki en temel mekanizmanın antiinflamatuvar etkileri olduğu düşünülmektedir. Kortikosteroidler selektin, integrin, hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1), tümör nekroz faktörü (TNF), monosit kemoatraktif protein-1 (MCP-1) gibi inflamatuvar yolakları çeşitli seviyelerde inhibe ederler.⁵³ Kuvvetli antiinflamatuvar etkilerine ek olarak anjiostatik etkileri de bulunmaktadır. Bütün bu mekanizmalar ışığında radyasyon retinopatisinin tedavisinde kortikosteroidlerin kullanımı, komplikasyonun patogenezindeki inflamatuvar süreçler düşünüldüğünde oldukça cazip bir seçenek olarak görünmektedir. Prospektif bir çalışmada, semptomatik radyasyon makülopatisi bulunan 31 hastada intravitreal enjeksiyon şeklinde uygulanan triamsinolon asetonid ile hastaların %91'inin görme keskinliğinde iyileşme ve/veya stabilizasyon sağlandığı rapor edilmiştir.⁵⁴ Literatürde intravitreal triamsinolon asetonidin radyasyon makülopatisi üzerinde etkinliğini destekleyen çok sayıda retrospektif çalışma sonuçlarına da ulaşmak mümkündür.^{3,55} Tekrarlayan enjeksiyonlara alternatif bir seçenek olarak intravitreal dekzametazon implant uygulanması da literatürde güvenli ve etkin bir tedavi seçeneği olarak belirtilmektedir.⁵⁶ Ancak intravitreal kortikosteroid enjeksiyonunun kendisinin de bazı komplikasyonlara yol açtığı bilinmektedir. Glokom, katarakt, retinal ayrılmalar ve endoftalmi bu komplikasyonlar arasında sayılabilir.^{57,58} İntravitreal uygulamanın potansiyel riskleri nedeniyle tasarlanan ve perioküler enjeksiyonun etkinliğinin incelendiği randomize kontrollü bir çalışmada toplam 163 hasta plak brakiterapisi sonrasında gözlem veya profilaktik perioküler triamsinolon asetonid enjeksiyon kollarına randomize edilmiştir.⁵⁹ Enjeksiyon kolundaki hastalara

plak brakiterapisi zamanında, brakiterapiden sonra 4. ve 8. aylarda olmak üzere perioküler triamsinolon asetonid enjeksiyonu uygulanmıştır. Ortanca 18 aylık izlem süresince enjeksiyon kolundaki hastalarda gözlem kolundaki hastalara kıyasla maküler ödemin anlamlı derecede daha az görüldüğü ve görme keskinliklerinin daha iyi olduğu saptanmıştır. Bütün bu veriler ışığında kortikosteroidler radyasyona bağlı retinopatinin hem profilaksisi hem de tedavisinde etkin bir tedavi seçeneği olarak görülse de, uzun dönem kullanımlarında görülebilecek çeşitli yan etkiler akılda tutulmalıdır.

2.4.4. Anti-VEGF ajanlar

Radyasyon retinopatisinin patogenezinde yer alan vaskülopati, endotel hücrelerinin ve perisitlerin kaybı, mikroanevrizmatik süreçler, vasküler oklüzyonlar gibi faktörler retinal yatakta iskemiyeye neden olmaktadır. İskemik ortamda salınan proanjiojenik faktörler ise neovaskülarizasyonun indüklenmesine yol açar. Posterior segment iskemisinin indüklediği neovaskülarizasyon özellikle ön kamarada gerçekleştiğinde rubeosis iridis veya neovasküler glokom gibi ciddi komplikasyonlara yol açabilir. Neovaskülarizasyonun patogenezi oldukça karmaşık ve henüz tam olarak aydınlatılmamış olsa da, potent bir proanjiojenik faktör olan VEGF'nin rolünün oldukça fazla olduğu bilinmektedir. Anjiogenezi baskılayan bevacizumab, ranibizumab, aflibercept gibi VEGF antagonisti ajanlar ile radyasyona bağlı oküler komplikasyonların hem görülme riskinin azaldığı hem de terapötik rollerinin olduğuna dair çok sayıda çalışmanın sonuçlarına literatürde ulaşmak mümkündür.⁶⁰ Bevacizumab esas olarak kolorektal kanserlerin tedavisinde kullanımıyla gündeme gelmiş, ardından oftalmolojik kullanımı da giderek yaygınlaşmıştır.⁶¹ Üveal melanom nedeniyle proton demet tedavisi uygulanmasının sonrasında 24 hastaya profilaktik intravitreal bevacizumab enjeksiyonunun uygulandığı bir retrospektif çalışmada, kontrol grubundaki 44 hastaya kıyasla anterior segment neovaskülarizasyonu görülme oranının intravitreal bevacizumab enjeksiyonu ile %36'dan %4'e düşürüldüğü belirtilmiştir.⁶² Prospektif randomize bir çalışmada ise üveal melanom nedeniyle RT uygulanmış olan ve radyasyon makülopatisi gelişen 40 hasta üzerinde intravitreal aflibercept enjeksiyonunun rolü incelenmiş ve afliberceptin radyasyon

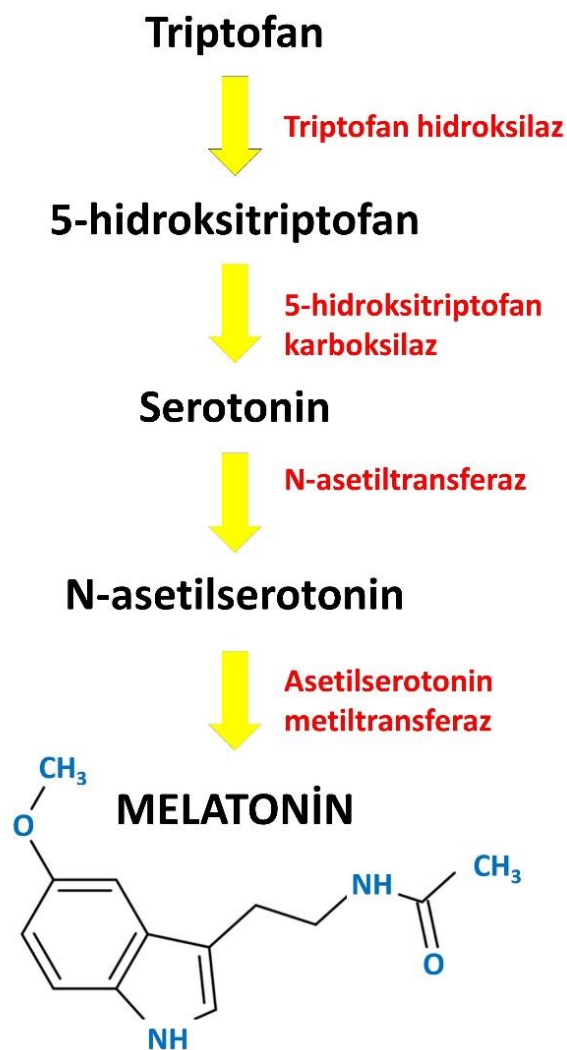
makulopatisi tedavisinde etkin bir tedavi yaklaşımı olmakla beraber, en iyi sonuçlar için devamlı enjeksiyonların uygulanması gerektiği belirtilmiştir.^{2,63} Sonuç olarak anti-VEGF ajanlar radyasyon retinopatisi ve neovasküler glokom gibi komplikasyonların hem tedavisinde hem de profilaksisinde etkinlikleri kabul edilmiş yaklaşımlardır.

2.4.5. Diğer Tedaviler

Hiperbarik oksijen tedavisi radyasyona bağlı gelişen bir çok geç dönem komplikasyon için etkinliği gösterilmiş bir tedavi yöntemidir.⁶⁴ Oftalmoloji alanında da vaskülopatilerin, avasküler skleral nekrozun, maküler ödem gibi tabloların tedavisinde tercih edilebilmektedir. Ancak literatürde oküler RT'ye bağlı geç dönem komplikasyonlar üzerinde hiperbarik oksijen tedavisinin rolünü inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır. Gall ve ark.⁶⁵, üveal melanom nedeniyle plak brakiterapisi uygulanmış olan bir hastada gelişen radyasyon retinopatisi ve optik nöropatinin tedavisinde hiperbarik oksijen tedavisi ile iki ayın sonunda hastanın görme kalitesinde ve fundus muayene bulgularında iyileşme rapor etmişlerdir. Diğer yandan Ashby ve ark.⁶⁶, RT ile eş zamanlı hiperbarik oksijen tedavisi uygulanmasının iki tedavi tekniğinin muhtemel sinerjistik vazokonstrüktör etkisi nedeniyle retinal damarlarda ciddi oklüzyona yol açtığını rapor etmişlerdir. RT'ye bağlı geç dönem oküler komplikasyonlar üzerindeki etkisi incelenen bir diğer tedavi ajanı ise fosfodiesteraz enzim inhibitörü olan pentoksifilindir. Pentoksifilinin, kuvvetli vazodilatör etki mekanizması nedeniyle RT'ye bağlı yumuşak doku fibrozisi tedavisinde etkin bir seçenek olduğu bilinmektedir.⁶⁶ Literatürde intrakranial tümör tanısı ile RT uygulanan 28 yaşında bir kadın hastada gelişen radyasyon retinopatisinin tedavisinde oral pentoksifilinin rolü rapor edilmiştir.⁶⁷ Sekiz ay boyunca günde 1200 mg dozunda oral pentoksifilin uygulanan hastada sonuç olarak kapiller perfüzyonun tamamen normale döndüğü ve görme keskinliğinin anlamlı şekilde arttığı belirtilmiştir. Ancak ne hiperbarik oksijen tedavisinin, ne de pentoksifilinin RT'ye bağlı oküler komplikasyonlar üzerinde profilaktik etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

2.5. Melatonin

Memeli organizmalarda melatonin sentezi esansiyel bir aminoasit olan triptofanın, triptofan hidroksilaz enzimi ile 5-hidroksitriptofana dönüştürülmesi ile başlar.⁶⁸ Oluşan bu bileşik ise 5-hidroksitriptofan karboksilaz enzimi ile serotonine dönüştürülür. N-asetiltransferaz enzimi ise serotonini N-asetilserotonine dönüştürür. Son olarak ise asetilserotonin metiltransferaz enzimi aracılığıyla melatonin sentezi tamamlanır (Şekil 2.1). Melatoninin moleküler ağırlığı 232.28 g/mol'dür ve kimyasal formülü $C_{13}H_{16}N_2O_2$ 'dir.⁶⁹



Şekil 2.1. Melatonin sentez basamakları

Lerner ve ark.⁷⁰ tarafından ilk defa 1958 yılında siğir epifiz bezinden elde edilen melatoninin biyolojik etkileri ve olası kullanım alanları ile ilgili olarak günümüze

kadar çok sayıda araştırma yapılmıştır. Melatonin başta sirkadiyen ritim regülasyonu olmak üzere çeşitli biyolojik fonksiyonlar üzerinde düzenleyici etkilere sahip olmasına ek olarak kuvvetli bir serbest radikal temizleyici, immün sistem modülatörü, antiinflamatuvar ve onkostatik etkileri de bulunan endojen bir hormondur.^{71,72} Vücutta en fazla epifiz bezinden ve daha az sıklıkta olmak üzere retinadan, lensten, gastrointestinal mukozadan ve kemik iliğinden salgılanır.⁷³⁻⁷⁶

1990'lı yılların başlarından beri melatoninin serbest radikal temizleyici etkisi sayesinde radyoprotektör ve kemoprotektör etkileri çok sayıda prelinik ve klinik çalışmada incelenmiştir.^{77,78} Dündar ve ark.⁹ çalışmasında laringeal RT uygulanan farelerde intraperitoneal 5 mg/kg dozunda melatonin enjeksiyonunun radyasyon mukozitini anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir. Baş boyun kanseri nedeniyle RT uygulanan 40 hastanın incelendiği bir prospektif randomize klinik çalışmada 20 mg dozunda oral melatonin uygulanmasının radyasyona bağlı oral mukozitin şiddetini anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir¹⁰. Ündeğer ve ark.⁷⁹ çalışmasında intraperitoneal 100 mg/kg dozunda melatonin enjeksiyonunun farelerde RT'ye bağlı DNA kırığı gelişme riskini anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir. Arıcıgil ve ark.¹² çalışmasında ise boyun bölgesine yönelik RT uygulanan farelerde intraperitoneal 50 mg/kg dozunda uygulanan melatonin ile radyasyona bağlı gelişen tiroid hasarının kontrol grubuna kıyasla daha az olduğu rapor edilmiştir. Toplam sekiz makalenin dahil edildiği bir sistematik derlemede melatoninin radyasyona bağlı pnömonit ve akciğer fibrozisi üzerinde de koruyucu etkileri olduğu belirtilmiştir.⁸⁰

Melatoninin RT'ye bağlı oksidatif stresi azaltmak vasıtasıyla komplikasyonları önlemesine ek olarak anjiogenez üzerinde de etkisi olduğuna dair veriler mevcuttur. Lin ve ark.⁸¹ çalışmasında melatoninin VEGF tarafından indüklenen endotelial projenitör hücre anjiogenezisini baskıladığı ve dolayısıyla yaşa bağlı neovasküler maküler dejenerasyon üzerinde profilaktik bir rolünün olabileceği belirtilmiştir. Gonzalez ve ark.⁸² çalışmasında da benzer şekilde melatoninin anjiogenezisin çeşitli basamaklarında etkili olduğu belirtilmiştir. RT'ye bağlı çeşitli oküler komplikasyonların patogenezinde yer alan iskemik süreçlerin indüklediği neovaskülarizasyonun rolü düşünüldüğünde, melatoninin antioksidan etkisine ek

olarak antianjiojenik etkisinin de bulunması RT'ye bağlı oküler komplikasyonlar açısından profilaktik bir rolü olabileceği hipotezini kuvvetlendirmektedir.

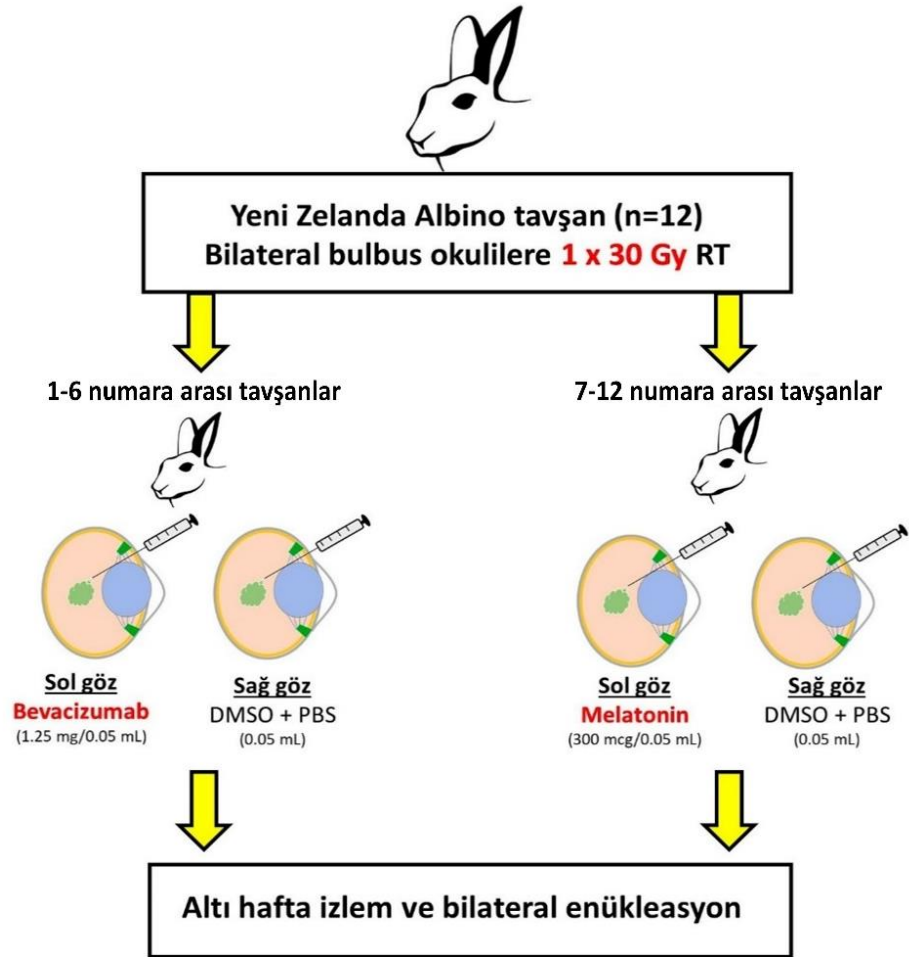
Melatoninin radyasyona bağlı çeşitli uzun dönem komplikasyonlar üzerinde koruyucu etkileri olduğunu destekleyen çok sayıda çalışma mevcut olsa da, oküler RT uygulamasına spesifik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Literatürde sadece radyasyon ile ilişkili katarakt gelişimi üzerinde melatoninin rolünü inceleyen iki adet prelinik çalışma mevcut olup, retinopati, nöropati, glokom gibi diğer önemli oküler komplikasyonlar üzerindeki rolünü inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Karslıoğlu ve ark.¹⁵ çalışmasında farelerde tek fraksiyonda 5 Gy kranial RT uygulanması sonrasında 5 mg/kg dozunda melatoninin 10 gün boyunca intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle uygulanmasının katarakt gelişimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışmanın sonuçlarında tek fraksiyonda uygulanan 5 Gy kranial RT ile lens dokusunda reaktif oksijen türevlerinin arttığı, antioksidan enzimlerin ise azaldığı ve klinik olarak katarakt formasyonunun geliştiği rapor edilmiştir. Ancak intraperitoneal melatonin uygulanan farelerde kontrol grubundan farklı olarak katarakt gelişimi saptanmamış ayrıca antioksidan enzim düzeyleri anlamlı şekilde daha yüksek saptanmıştır. Shirazi ve ark.¹⁶ çalışmasında da benzer şekilde kranial RT uygulanan farelerin lenslerinde oksidan bir madde olan malondialdehit seviyesinin arttığı, antioksidan bir madde olan glutasyonun ise azaldığı rapor edilmesine rağmen, intraperitoneal melatonin enjeksiyonu uygulanan farelerde bu maddelerin normal sınırlarda kaldığı rapor edilmiştir. Melatoninin RT ilişkili oküler komplikasyonlar üzerindeki etkisi bakımından literatür oldukça kısıtlı olsa da bu iki prelinik çalışmanın sonuçları, yüksek derecede radyoduyarlı bir doku olduğu bilinen lenste dahi radyasyona bağlı oksidatif stresin melatonin ile azaltılabileceğine dair kanıt oluşturmaktadır. Sonuç olarak RT'ye bağlı oküler komplikasyonların patogenezindeki iskemik ve oksidatif süreçler gözönünde bulundurulduğunda melatoninin bu komplikasyonlar üzerindeki muhtemel profilaktik olumlu etkileri umut vaad eden ve araştırılmaya açık bir konu olarak görünmektedir.

Bu çalışmada oküler RT uygulanmasının ardından intravitreal bevacizumab ve melatonin enjeksiyonlarının RT'ye bağlı oküler komplikasyonlar üzerindeki profilaktik etkilerinin incelenmesi amacıyla deneysel bir hayvan modeli oluşturulmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Popülasyonu ve Özellikleri

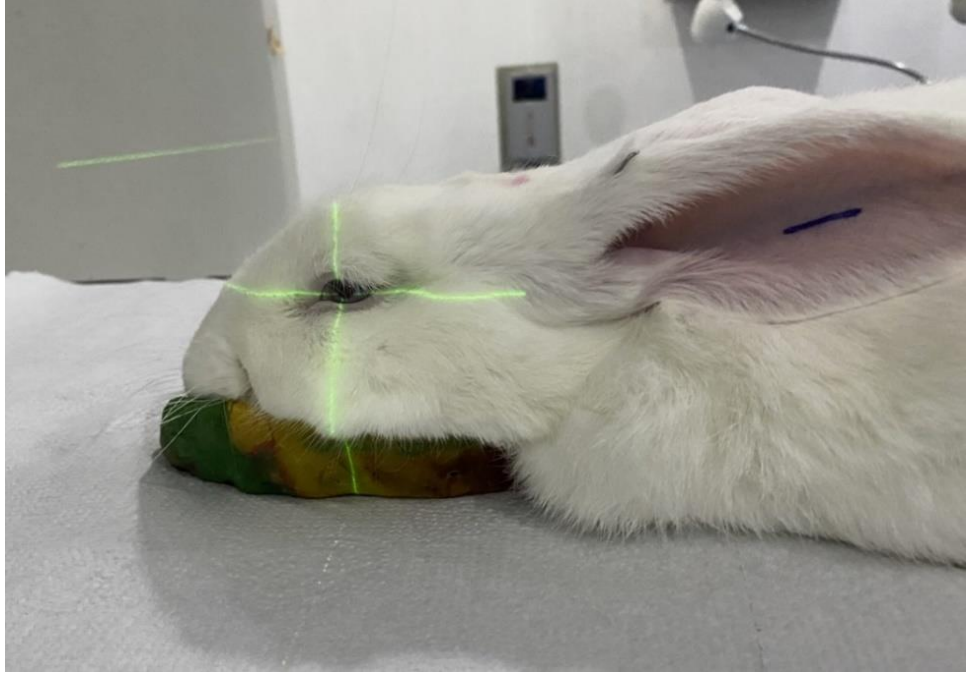
Deney popülasyonu için insan gözüne anatomik ve fizyolojik benzerliğine ek olarak farelere ve kobaylara kıyasla göz-vücut oranının daha büyük olması nedeniyle oftalmolojik araştırmalarda sıklıkla tercih edilen bir memeli türü olan tavşan modeli tercih edilmiştir.⁸³ Bu amaçla 6 aylık ve 3 kg ağırlığında 12 adet erkek, sağlıklı Yeni Zelanda albino tavşan çalışma protokolüne dahil edilmiştir. Çalışma protokolü Şekil 3.1'de özetlenmiştir. Çalışmamız KOBAY DHL A.Ş. Yerel Etik Kurulu tarafından 04.07.2023 tarihinde onaylanmıştır.



Şekil 3.1. Çalışma protokolü

3.2. Radyoterapi Planlanması ve Uygulanması

Denekler öncelikle birden 12'ye kadar numaralandırılmış ve bir numaralı denek RT simülasyonu için kullanılmıştır. Simülasyon aşamasında optimal immobilizasyonun sağlanabilmesi amacıyla intramusküler %2 ksilazin (5 mg/kg) ve %10 ketamin (35 mg/kg) enjeksiyonu ile genel anestezi uygulanmıştır. Anestezinin ardından prone pozisyonunda, GE™ Brightspeed Bilgisayarlı Tomografi (BT) cihazı ile 0.625 mm kesit kalınlığına sahip simülasyon BT çekilmiştir (Şekil 3.2).

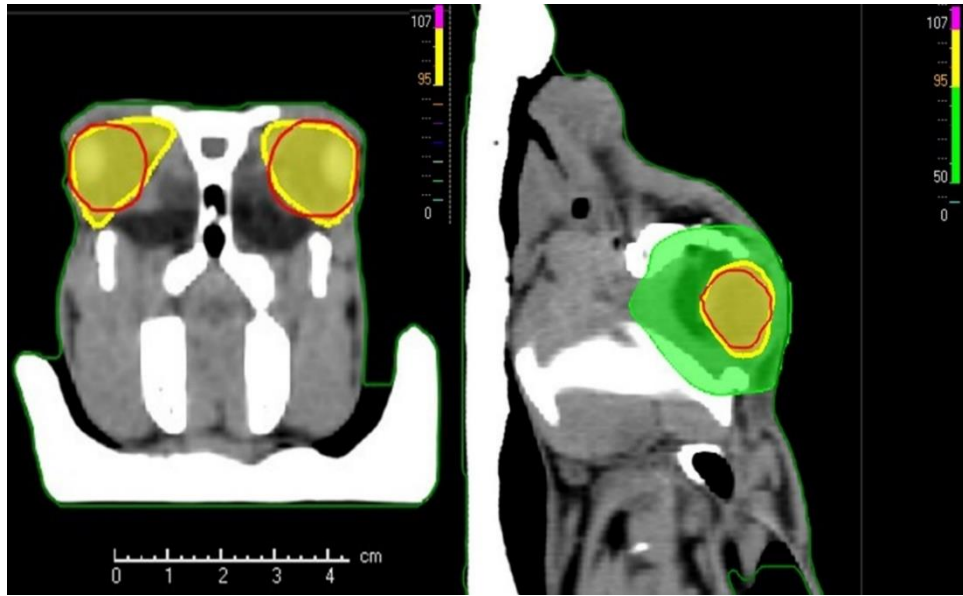


Şekil 3.2. Simülasyon bilgisayarlı tomografisi çekimi

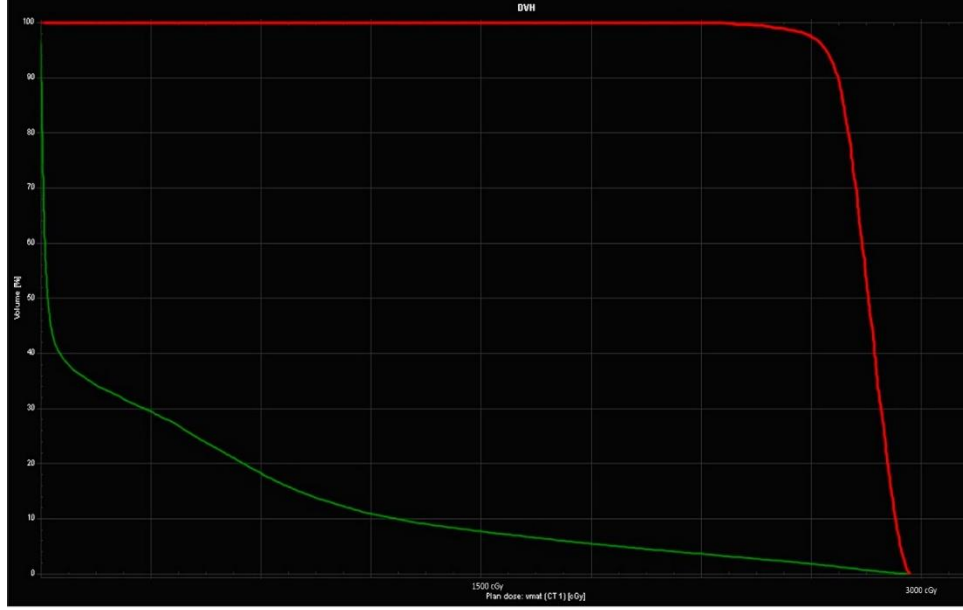
Hedef hacim konturlamasında bilateral bulbus oküliler klinik hedef hacim (CTV) olarak konturlanmıştır (Şekil 3.3). Konturlamanın ardından her iki CTV'ye yönelik tek fraksiyonda 30 Gy radyasyon dozu reçetelendirilmiştir. Tedavi planlaması ve doz optimizasyonu için RayStation™ (RaySearch Lab., Stokholm, İsveç) tedavi planlama sistemi kullanılmıştır (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5).



Şekil 3.3. Radyoterapi hedef hacimleri (Kırmızı: klinik hedef hacim)



Şekil 3.4. Radyoterapi planı (Sarı: %95'lik izodoz, yeşil: %50'lik izodoz)



Şekil 3.5. Radyoterapi doz-volüm histogramı (Kırmızı: klinik hedef hacim, yeşil: eksternal kontur)

RT uygulanmasından önce deneklerin optimal immobilizasyonlarının sağlanabilmesi amacıyla intramusküler %2 ksilazin (5 mg/kg) ve %10 ketamin (35 mg/kg) enjeksiyonu aracılığıyla genel anestezi uygulanmıştır. Planlanmış olan RT'nin uygulanması için Elekta Versa HD™ lineer akseleratör cihazı kullanılmıştır. RT'ye başlamadan önce, lineer akseleratör ünitesinde bulunan "cone-beam" BT ile deneklerin baş ve göz pozisyonları doğrulanmış ve pozisyonu uygun olan deneklerde ışınlama işlemine başlanmıştır. RT volümetrik modüle ark tedavisi (VMAT) tekniği ile uygulanmıştır. RT sırasında deneklerin vital fonksiyonları, tedavi cihazı ünitesinde bulunan kamera aracılığıyla kumanda odasından devamlı olarak izlenmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Deneklerin radyoterapi sırasında izlemi

3.3. İlaçların Hazırlanması

Çalışmamızda tercih edilen melatonin dozu ve formülasyonu belirlenirken literatürdeki veriler dikkate alınmıştır (Tablo 3.1)⁸⁴⁻⁸⁷. Yılmaz ve ark.⁸⁵'nin çalışmasında 50 ile 150 mcg/kg dozunda intravitreal olarak uygulanan melatoninin kobaylarda herhangi bir oküler hasara yol açmazken, 200 mcg/kg dozunda retinal ganglion hücrelerinin kaybına ve retinal ödeme neden olduğu belirtilmiştir. Benzer şekilde Tao ve ark.⁸⁴'nin çalışmasında 100-300 mcg/kg dozunda intravitreal olarak uygulanan melatonin ile farelerde fotoreseptör hücreler üzerinde veya görme keskinliğinde olumsuz bir etki gözlenmezken, 400-500 mcg/kg dozlarında retinal kompartmanda harabiyete yol açtığı belirtilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda 100 mcg/kg dozunda melatoninin intravitreal olarak uygulanmasına karar verilmiştir.

Tablo 3.1. İntravitreal melatonin enjeksiyonunun incelendiği çalışmalar

Yazar (yıl)	Denek	Melatonin Hazırlanışı	Bulgular
Tao ve ark.⁸⁴ (2020)	320 fare	%5 Dimetil sülfoksit & Fosfat tamponlu salin	Güvenli doz aralığı 100-300 mcg/kg. 400-500 mcg/kg doz aralığında retinal hasar ve görmede bozulma.
Li ve ark.⁸⁶ (2019)	280 fare	%5 Dimetil sülfoksit & Fosfat tamponlu salin	İyatrojenik retinal dejenerasyonda ve oksidatif stres belirteç düzeylerinde azalma, antioksidan belirteç düzeylerinde artış. 150-250 mcg/kg doz aralığında, 50-100 mcg/kg dozlarına kıyasla azalmış fotoreseptör dejenerasyonu, apoptoz indeksi, görme keskinliğinde azalma.
Yılmaz ve ark.⁸⁵ (2004)	35 sağlıklı kobay	Saf etanol & Fizyolojik salin	Güvenli doz aralığı 50-150 mcg/kg. 200 mcg/kg dozunda retinal ganglion hücre kaybı ve retinal ödem.

İlaç hazırlık aşamasında melatonin (Sigma Chemical, St. Louis, MO), %5'lik Dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözündürülmüş ve daha sonra 0.05 mL'de 300 mcg melatonin konsantrasyonu sağlanacak şekilde fosfat tamponlu salin (PBS) ile dilüe edilmiştir. Bevacizumab için ise literatürde radyasyon makülopatisi tedavisinde en sık kullanılan doz olan 1.25 mg/0.05 mL dozu tercih edilmiştir.⁸⁸ Deneklerin melatonin veya bevacizumab uygulanmayacak olan sağ gözleri için ise 0.05 mL hacminde, melatonin grubundaki deneklerin sol gözleri ile eşit konsantrasyona sahip

DMSO ve PBS solüsyonu hazırlanmıştır. Elde edilen solüsyonlar intravitreal enjeksiyon zamanına kadar +4 derece ortam sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.4. İnvitreal Enjeksiyon

RT uygulanmasından hemen sonra henüz genel anestezi tesiri altında olan deneklerin steril blefarosta ile palpebral açıklıkları sağlanmış ve konjonktival yüzeylerine bir birim %10 povidon iyot ve dokuz birim serum fizyolojikten oluşan dezenfektan solüsyon damlatılmıştır.

Dezenfeksiyonun ardından sklerokorneal limbustan itibaren 1 mm'lik mesafe göz pergeli ile işaretlenmiş ve bu noktadan 90 derece açı ile intravitreal enjeksiyon uygulanmıştır (Şekil 3.7). Birden altıya kadar numaralandırılmış olan deneklerin sol gözleri bevacizumab grubuna, yediden onikiye kadar numaralandırılmış olan deneklerin sol gözleri ise melatonin grubuna dahil edilmiştir. Sadece DMSO ve PBS solüsyonu enjekte edilen sağ gözler ise kontrol grubunu oluşturmuştur. Enjeksiyon için 30 gauge kalınlığa sahip steril iğne ucu kullanılmış ve enjeksiyon 20 saniye içerisinde yavaşça uygulanmıştır. Enjektörün geri çekilmesi esnasında ilaç reflüsünü engellemek amacıyla steril pamuklu eküvyon çubuğu ile skleral iğne giriş yerine 5 saniye boyunca hafif şiddette kompresyon uygulanmıştır. Enjeksiyon sonrasında gelişebilecek olası enfeksiyöz komplikasyonları önlemek amacıyla deneklerin oküler yüzeylerine işlem günü de dahil edilecek şekilde toplam 5 gün boyunca tobramisin içerikli topikal göz damlası damlatılmıştır.



Şekil 3.7. İntravitreal enjeksiyon

3.5. Bakım, Besleme ve Takip

Deneklere RT ve intravitreal enjeksiyon uygulandıktan sonraki takip periyodu belirlenirken literatür baz alınmıştır. Literatürde tavşanlar özelinde radyasyon maruziyeti sonrası retinopati gelişme zamanı ile ilgili bir veri bulunmamakla birlikte, domuz, fare, kobay, kedi ve köpek çalışmalarının çoğunda RT uygulamasından sonraki ilk ay içerisinde retinal değişikliklerin başladığı ve üç yılın üzerinde takibi yapılan deneklerde dahi retinal anevrizma gibi bazı geç dönem komplikasyonların görülmeye devam ettiği belirtilmiştir.⁸⁹ Bu nedenle çalışmamızdaki deneklerin, RT ve intravitreal enjeksiyon uygulanmasının ardından altı hafta boyunca izlenmeleri kararlaştırılmıştır.

İzlem süresi boyunca denekler 22-24 °C'lik oda sıcaklığında, 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık olacak şekilde koşullarda barındırılmıştır. Tüm deneklerin ad-libitum beslenmeye uygun olacak şekilde sürekli olarak yiyecek ve suya ulaşımı 6 hafta boyunca laboratuvar koşullarında sağlanmıştır.

Takip süresi boyunca denekler haftalık olarak muayene edilmiştir. Muayeneler sırasında deneklerin genel durumları, cilt reaksiyonları ve yüzeysel oküler yapıları değerlendirilmiştir. Ek olarak altı haftalık takip süresinin sonunda, enükleasyon öncesinde, indirekt oftalmoskop ile fundus muayenesi de yapılmıştır. Fundus muayenesi öncesinde pupiller dilatasyon sağlamak amacıyla deneklerin gözlerine topikal olarak %1'lik sikloptolat hidroklorid ve %0.5'lik tropikamid uygulanmıştır.

Muayene süreci biten deneklerde enükleasyon ve sakrifikasyon aşamasına geçilmiştir.

3.6. Enükleasyon ve Sakrifikasyon

Toplam 6 haftalık takip süresinin ardından tüm deneklere genel anestezi ile insani sonlandırma yapıldıktan sonra her iki gözün optik sinir proksimalinden bilateral enükleasyon uygulanmıştır. Enükle edilen gözlerde sklerotomi ile vitröz sıvıya ulaşılmış ve 1 cc hacimli steril enjektörler ile vitröz sıvı aspire edilmiştir (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9). Vitröz sıvı aspirasyonu sonrasında optik sinir etrafından yaklaşık 3 cm çapa sahip retinal örnekler alınmıştır. Vitröz sıvı örnekleri, denek numarası ve örnek alınan göze göre 1L, 1R, ... 12L ve 12R şeklinde isimlendirilmiş eppendorf tüplerine transfer edildikten sonra hızlıca soğutulmuş ve laboratuvar işlemlerine kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.8. Sklerotomi işlemi



Şekil 3.9. Vitroz sıvının aspirasyonu

3.7. Oksidatif Stres Düzeylerinin İncelenmesi

Vitroz sıvının iyonizan radyasyon maruziyeti sonrasında protein ekspresyon düzeylerinin değişkenlik göstermesi nedeniyle örneklerdeki toplam antioksidan (TAS) ve toplam oksidan (TOS) değerleri, protein miktarlarına bölünerek gruplar arasında karşılaştırılmıştır⁹⁰. Vitroz sıvılardaki toplam protein miktarı bikinkoninik asit (BCA) protein tayin kiti (A.B.T. Biosciences, Kat. No. P011) prosedürünce değerlendirilmiştir.

BCA analizi için dokuz farklı konsantrasyona sahip (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 ve 2000 µg/ml) standart çözelti hazırlanmıştır. Doksanaltı kuyucuklu plakaya her standart çözelti ve örnekten 20 µL eklenmiştir. Her kuyucuğa 200 µL BCA çalışma reaktifi eklenmiştir (BCA çalışma reaktifi 50 kısım reaktif A ve 1 kısım reaktif B). Plaka 30 saniye süreyle yatay çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra plaka 37 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Plakanın oda sıcaklığına soğutulmasını takiben 562 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Standart derişimlerine denk gelen absorbanslar ile standart doğru çizilerek, doğrunun denkleminden örnek derişimleri belirlenmiştir.

Toplam Antioksidan Durumu (TAS) ölçümleri için TAS kolorimetrik test kiti (Elabscience, Kat. No. E-BC-K801-M) üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda spektrofotometrik ölçüm yapılarak kullanılmıştır. Bu yöntemin prensibi 2,2'-azino-di-

(3-etilbenzotiyazolin-sülfonat) (ABTS®) bileşiğinin oksidan bileşik varlığında stabil yeşil renkli ABTS+ radikal katyonuna okside olmasına, bu radikalın de antioksidanların varlığında renksiz ABTS'ye indirgenebilmesine dayanmaktadır. Örneğin TAS değerleri 660 nm'de absorbansın ölçülmesi ile belirlenir. Standartlar 6 farklı konsantrasyonda (0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.4, 1.6 mmol/L) olacak şekilde kit içerisindeki 2 mmol/L stok çözeltinin %60 etanol ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plakaya her standart ve örnek 10 µL eklenmiştir. Her birinin üzerine 200 µL tampon çözelti eklenerek 660 nm'deki absorbans ölçülmüş, sonuçlar A1 olarak kaydedilmiştir. Ölçüm sonrasında her bir kuyucuğa 20 µL kromojenik ajan eklenip karıştırılmıştır. Plaka 37°C de 5 dk inkübe edildikten sonra 660 nm'de tekrar absorbans ölçülmüştür. Sonuçlar A2 olarak kaydedilmiştir. Standart absorbansları A1-A2 olarak hesaplanarak standart eğri çizilerek denklemleri belirlenmiştir. Örnek absorbansları elde edilen denklemde yerine koyularak örnek derişimleri hesaplanmıştır. Örneklerdeki TAS değerleri (mmol/L) ilgili örneğe ait total protein tayini sonucuna bölünerek TAS/protein (mmol/g) şeklinde hesaplanmıştır.

Toplam Oksidan Durumu (TOS) ölçümleri için TOS kolorimetrik test kiti (Elabscience, Kat. No. E-BC-K802-M) üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda spektrofotometrik ölçüm yapılarak kullanılmıştır. Bu yöntemin prensibi asit koşullar altında örnekteki oksidan materyalin Fe+2 iyonunu Fe+3 iyonuna oksitlemesi, Fe+3 iyonunun ksilenol turuncusuna yüksek oranda bağlanarak mavi-mor kompleks oluşturmasıdır. Çözelti pH 2-3 aralığında 590 nm'de absorbans verir. Standartlar 8 farklı konsantrasyonda (0, 1, 10, 20, 40, 50, 80, 100 µmol/L) olacak şekilde kit içerisindeki 200 µmol/L hidrojen peroksit stok çözeltisinin saf su ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plakaya her standart ve örnek 20 µL eklenmiştir. Her birinin üzerine 200 µL kromojenik ajan eklenmiştir. Daha sonra 590 nm'deki absorbans ölçülmüş, sonuçlar A1 olarak kaydedilmiştir. Ölçüm sonrasında her bir kuyucuğa 50 µL substrat eklenip karıştırılmıştır. Plaka 37°C de 5 dk inkübe edildikten sonra 590 nm'de absorbans okunmuştur. Sonuçlar A2 olarak kaydedilmiştir. Standart absorbansları A2-A1 olarak hesaplanarak standart doğru çizilerek denklemleri bulunmuştur. Doğru denkleminde örnek absorbansları (A2-A1) yerine koyularak

örnek derişimleri hesaplanmıştır. Örneklerdeki TOS değerleri (mmol/L) ilgili örneğe ait total protein tayini sonucuna bölünerek TOS/protein (mmol/g) şeklinde hesaplanmıştır.

Oksidatif stres indeksi (OSi), redoks dengesinin kapsamlı şekilde değerlendirmesi için kullanılır ve yüzde TOS/TAS oranı olarak tanımlanır⁹¹. Her bir örnek için TOS/TAS*100 formülü kullanılarak OSi hesaplanmıştır.

3.8. Histopatolojik İncelemeler

Elektron mikroskopunda yapılacak incelemeler için ayrılan retinal örnekler denek numarası ve örnek alınan tarafa uygun şekilde numaralandırılmış ve %3 gluteraldehit solüsyonu içeren eppendorf tüpleri içerisine alınmıştır ve 4°C sıcaklıkta 48 saat bekletildikten sonra gluteraldehit içerisinden tampon çözelti içerisine transfer edilerek fikse edilmiştir. İncelemeye kadar tampon çözelti içerisinde 4°C sıcaklıkta bekletilmiştir. İnceleme öncesinde doku örnekleri 24 saat boyunca perfüzyon solüsyonunda tutulmuş, 1 saat süreyle %2 OsO4 fosfat tamponu ile post-fikse edilmiş ve ardından alkol ile seri dehidrate edilmiştir. Araldite gömüldükten sonra, ultratome kullanılarak 1-2 µm yarı-ince kesitler elde edilmiş, toluidin mavisi ile boyanmış ve ışık mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir. Işık mikroskobisi incelemeleri sonucunda ince kesitlerin alınacağı yerler belirlenmiştir. Aynı ultratome kullanılarak uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrast boyanmış 60-90 nm kalınlığında kesitler elde edilmiştir. Elde edilen bu kesitler (HITACHI HT7800 120KV TEM) transmisyon elektron mikroskobu aracılığı ile görüntülenmiştir. İncelemeler 20.000 büyütme ile yapılmıştır.

3.9. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 23.0 (IBM, Armonk, New York, Amerika Birleşik Devletleri) yazılımı kullanılmıştır. Eşleştirilmiş örneklem t testi, normal dağılım gösteren bağımlı değişkenler arasındaki farkı değerlendirmek için kullanılmıştır. Bağımsız değişkenler arasındaki farkı değerlendirmek için ise bağımsız örneklem t testi tercih edilmiştir. Normal dağılım göstermeyen bağımlı değişkenler arasındaki farkı belirlemek için Wilcoxon testi kullanılırken, bağımsız değişkenler arasındaki farkı değerlendirmek için Mann

Whitney U testi tercih edilmiştir. Tüm analizlerde $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Fizik Muayene Bulguları

Deneklerin RT uygulamasından sonra yapılan haftalık fizik muayene bulguları Tablo 4.1'te özetlenmiştir. Birinci hafta muayenesinde deneklerin %42'sinde izlenen bilateral konjonktival ve skleral hiperemi dışında herhangi bir erken dönem bulgusu izlenmemiştir. İkinci hafta muayenesinde, birinci hafta muayenesinde hiperemi gözlenen tüm deneklerde hipereminin regrese olduğu izlenmiştir. Ancak deneklerin %33'ünde bilateral periorbital ödem ve alopesi bulgularının gelişmeye başladığı izlenmiştir (Şekil 4.1). Üçüncü hafta muayenesinde bilateral periorbital ödem ve alopesinin hem görülme sıklığının (%58) hem de şiddetinin arttığı izlenmiştir (Şekil 4.2). Dördüncü hafta muayenesinde bilateral periorbital ödem ve alopesinin görülme sıklığı artarken (%75), şiddetinin azaldığı izlenmiştir. Beşinci ve altıncı haftalarda ise bilateral periorbital ödem ve alopesinin hem sıklığının hem de şiddetinin dördüncü hafta muayenesinde göre stabil olduğu izlenmiştir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

Konjonktival hiperemi, periorbital ödem ve alopesi gözlenme oranları intravitreal bevacizumab ve melatonin enjeksiyonu uygulanan sol gözler için sırasıyla %50 ve %33 ($p=0.55$), %66 ve %50 ($p=0.57$), ve %83 ve %66 ($p=0.52$) olarak saptanmıştır. Tüm bulguların bilateral olarak benzer şiddette izlenmesi nedeniyle, sağ ve sol gözler arasında enjeksiyon grubundan bağımsız olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Tablo 4.1. Haftalık fizik muayene bulguları

HAFTA	BULGULAR	DENEKLER
1	Bilateral konjonktival hiperemi (n=5, %42)	1, 2, 4, 7, 12
2	Bilateral periorbital alopesi ve ödem (n=4, %33)	1, 2, 8, 12
3	Bilateral periorbital alopesi ve ödem (n=7, %58)	1, 2, 4, 6-8, 12
4	Bilateral periorbital alopesi (n=9, %75)	1-4, 6, 8, 10-12
5	Bilateral periorbital alopesi (n=9, %75)	1-4, 6, 8, 10-12
6	Bilateral periorbital alopesi (n=9, %75)	1-4, 6, 8, 10-12

**Şekil 4.1.** İkinci haftada izlenen periorbital ödem ve alopesi



Şekil 4.2. Üçüncü haftada şiddeti artan periorbital ödem ve alopesi



Şekil 4.3. Dördüncü haftada şiddeti azalan periorbital ödem ve artan alopesi



Şekil 4.4. Beşinci haftada izlenen stabil periorbital ödem ve alopesi

Altıncı haftanın sonunda yapılan fundus ve lens muayenesi bulguları Tablo 4.2'de özetlenmiştir. Deneklerden 8 numara, altıncı hafta muayenesinden önceki hafta genel durum bozukluğu gelişmesi nedeniyle erken sakrifiye edilmiş ve volvulus nedeniyle genel durum bozukluğunun geliştiği izlenmiştir. Bu nedenle 8 numaralı denek için fundus ve lens muayeneleri yapılamamış, elektron mikroskobisi incelemesi için gerekli dokular temin edilememiş ancak oksidatif stres belirteçlerinin incelenebilmesi için vitröz sıvı temin edilebilmiştir.

Toplam 11 denek ve 22 gözün altıncı haftada yapılan muayene bulgularına göre bevacizumab grubundaki iki gözde (%33), melatonin grubundaki üç gözde (%60) ve kontrol grubundaki dört gözde (%36) posterior subkapsüler katarakt (PSK) geliştiği izlenmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).

Bevacizumab grubundaki üç gözde (%50), melatonin grubundaki iki gözde (%40) ve kontrol grubundaki altı gözde (%55) retinada pamuk atılmış manzarası izlenmiştir (Şekil 4.7).

Melatonin grubundaki bir gözde (%20) sert eksuda formasyonu, kontrol grubundaki bir gözde ise (%9) mikroanevrizma gelişimi izlenmiştir (Şekil 4.8).

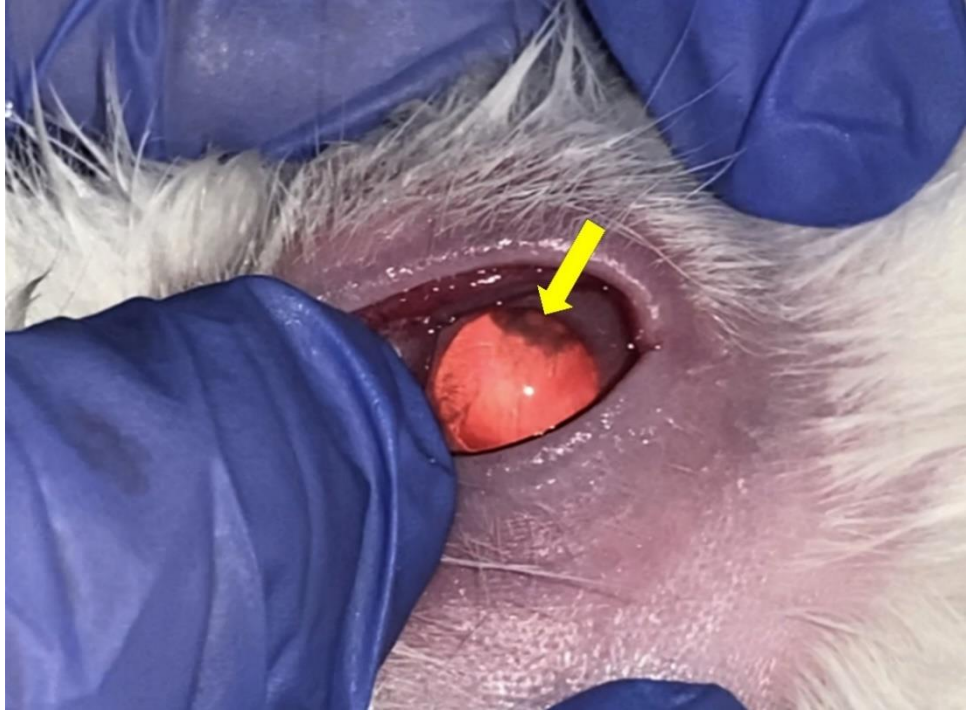
Tablo 4.2. Altıncı haftada yapılan fundus ve lens muayenesi bulguları

DENEK	SOL GÖZ	SAĞ GÖZ
1	Normal	Normal
2	PSK	PSK
3	Normal	Normal
4	Atılmış pamuk manzarası, PSK	Atılmış pamuk manzarası
5	Atılmış pamuk manzarası	Atılmış pamuk manzarası
6	Atılmış pamuk manzarası	Atılmış pamuk manzarası
7	PSK	Normal
8	-	-
9	Atılmış pamuk manzarası	Atılmış pamuk manzarası
10	PSK	Atılmış pamuk manzarası, PSK
11	Sert eksuda, PSK	Mikroanevrizma, PSK
12	Atılmış pamuk manzarası	Atılmış pamuk manzarası, PSK

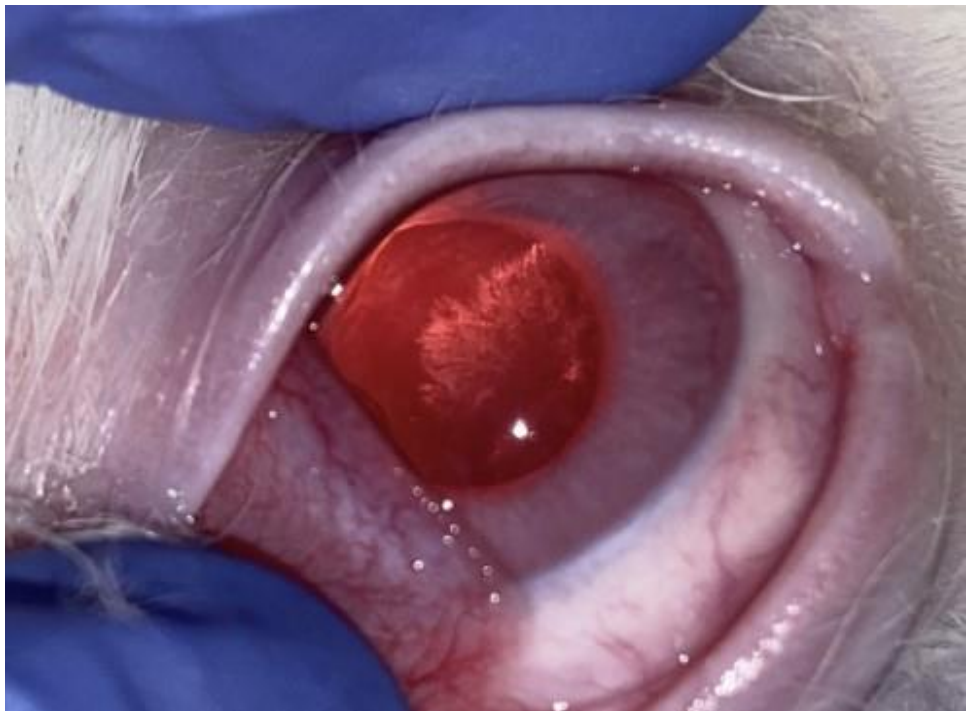
Altıncı haftada gerçekleştirilen muayene bulgularından hiçbirinin melatonin, bevacizumab ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediği izlenmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Altıncı haftada yapılan muayene bulgularının oranlarının gruplar arasındaki karşılaştırılması

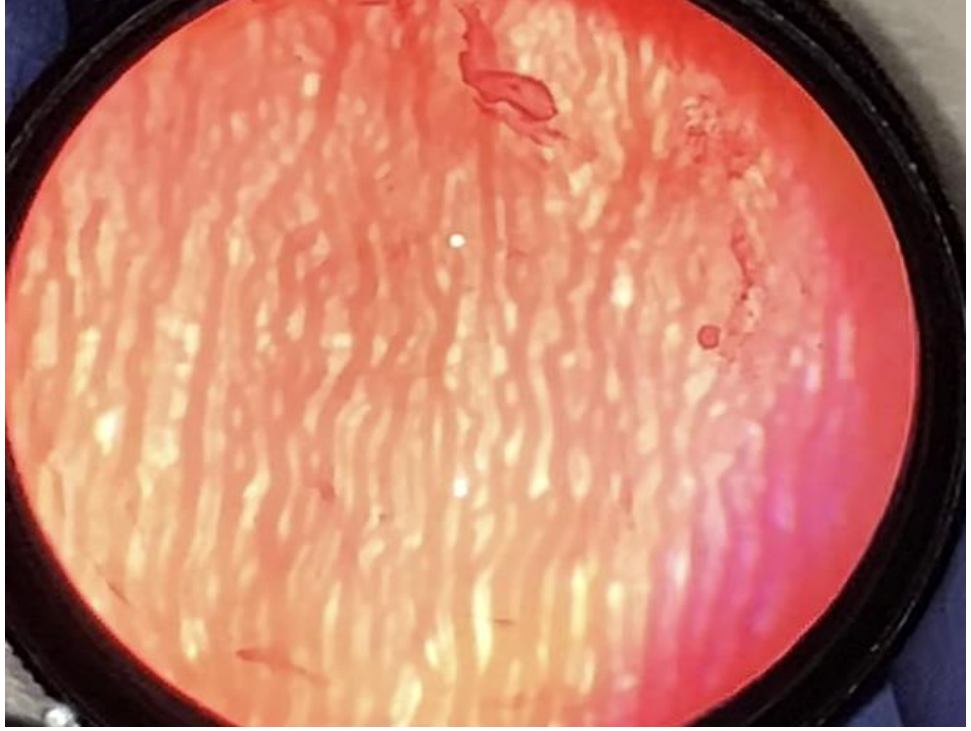
	Bevacizumab	Melatonin	Kontrol	p
Posterior Subkapsüler Katarakt	2 (%33)	3 (%60)	4 (%36)	0.6
Atılmış Pamuk Manzarası	3 (%50)	2 (%40)	6 (%55)	0.8
Sert Eksuda Formasyonu	0 (%0)	1 (%20)	0 (%0)	0.1
Mikroanevrizma	0 (%0)	0 (%0)	1 (%9)	0.5



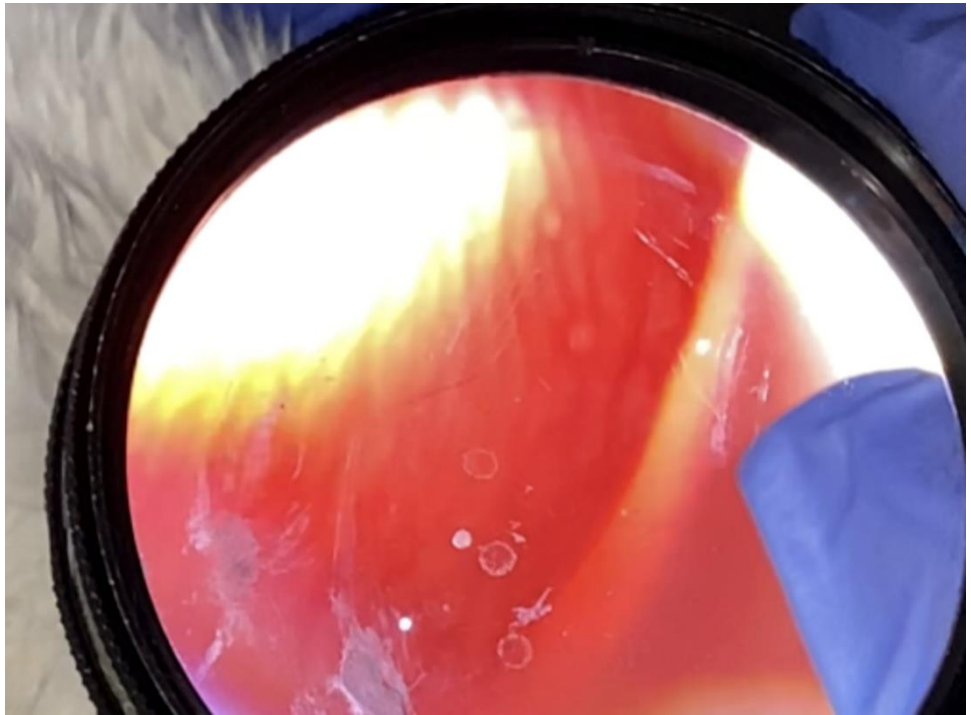
Şekil 4.5. Posterior subkapsüler katarakt (2 numaralı denek)



Şekil 4.6. Posterior subkapsüler katarakt (10 numaralı denek)



Şekil 4.7. Atılmış pamuk manzarası (5 numaralı denek)



Şekil 4.8. Retinal mikroanevrizmalar (11 numaralı denek)

4.2. Oksidatif Stres Düzeylerine İlişkin Bulgular

Enükleasyon sonrası aspire edilen vitröz sıvı örneklerinin absorbansları ve örneklerdeki toplam protein derişimleri Tablo 4.4'te yer almaktadır. Vitröz sıvılara ait TAS/protein, TOS/protein, ve OSİ değerleri ise Tablo 4.5'te yer almaktadır.

Tablo 4.4. Vitröz sıvı örneklerinin toplam protein derişimleri

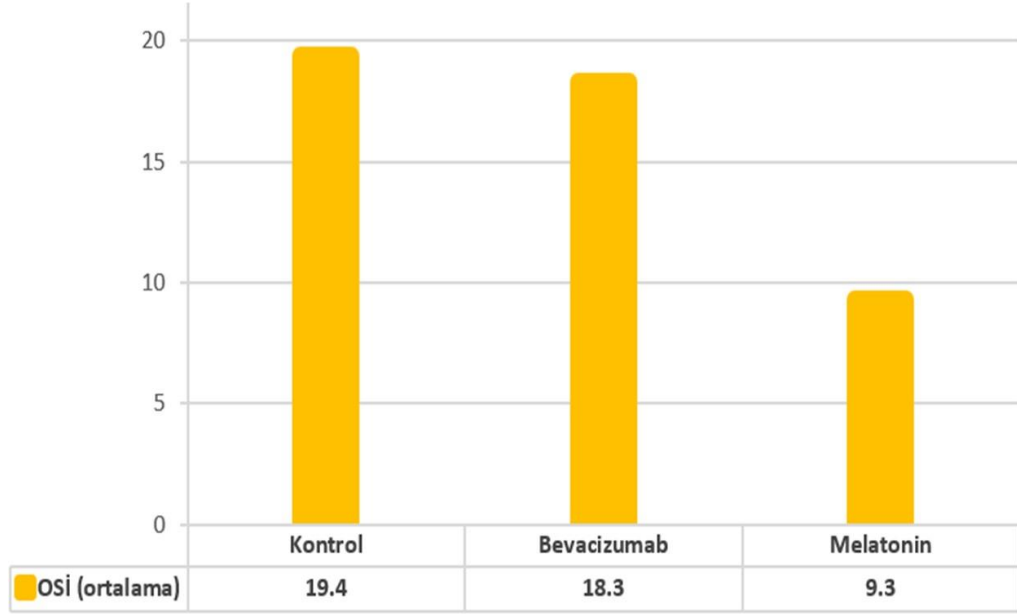
Örnek	Absorbans	Seyreltme Faktörü	Derişim (g/L)
1R	0,406	10	3,63
1L	0,2035	10	1,09
2R	1,118	10	12,53
2L	1,1945	10	13,48
3R	0,267	10	1,89
3L	0,844	10	9,10
4R	0,2135	10	1,22
4L	1,049	20	23,33
5R	0,2225	10	1,33
5L	0,291	10	2,19
6R	0,5605	10	5,56
6L	0,213	10	1,21
7R	0,2965	10	2,26
7L	0,5315	10	5,19
8R	0,6855	20	14,24
8L	0,233	10	1,46
9R	0,212	10	1,20
9L	0,2785	10	2,03
10R	0,2055	10	1,12
10L	0,6605	20	13,61
11R	0,353	10	2,96
11L	0,438	10	4,03
12R	0,2505	10	1,68
12L	0,3635	10	3,09

Tablo 4.5. Vitroz sıvı örneklerinin TAS/protein, TOS/protein ve OSİ değerleri

Örnek	TAS/protein (mmol/g)	TOS/protein (mmol/g)	OSİ
1R	0,127	0,008	6,29
1L	0,229	0,033	14,41
2R	0,126	0,003	2,38
2L	0,047	0,002	4,25
3R	0,118	0,025	21,18
3L	0,027	0,004	14,81
4R	0,542	0,022	4,05
4L	0,066	0,002	3,03
5R	0,331	0,028	8,45
5L	0,144	0,022	15,27
6R	0,042	0,008	19,04
6L	0,062	0,036	58,06
7R	0,214	0,012	5,60
7L	0,064	0,006	9,37
8R	0,122	0,002	1,63
8L	0,156	0,023	14,74
9R	0,061	0,031	50,81
9L	0,123	0,018	14,63
10R	0,042	0,042	100,00
10L	0,072	0,006	8,33
11R	0,199	0,011	5,52
11L	0,169	0,008	4,73
12R	0,194	0,016	8,24
12L	0,199	0,008	4,02

Kontrol, bevacizumab ve melatonin gruplarına ait ortalama TAS/protein ($p=0.364$) ve TOS/protein ($p=0.685$) değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı izlenmiştir.

Gruplar arasındaki OSİ değerleri Şekil 4.9'de grafiksel olarak gösterilmiştir. Gruplar arasındaki ortalama OSİ değerleri karşılaştırıldığında en düşük değerin sayısal olarak melatonin grubuna ait vitröz sıvılarda olduğu saptansa da, bu bulgu istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır ($p=0.827$).

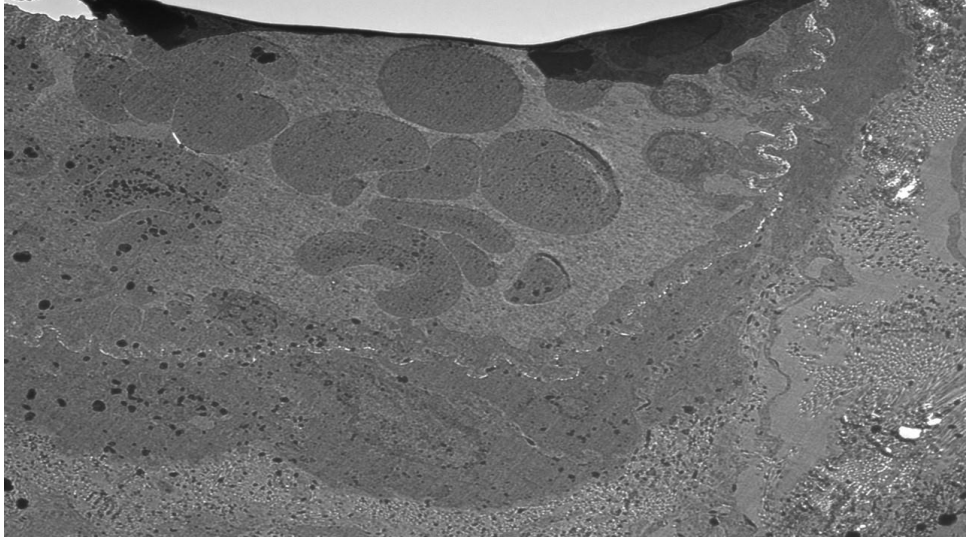


Şekil 4.9. Farklı uygulama gruplarına ait ortalama OSİ değerlerinin grafiği

4.3. Elektron Mikroskopisi Bulguları

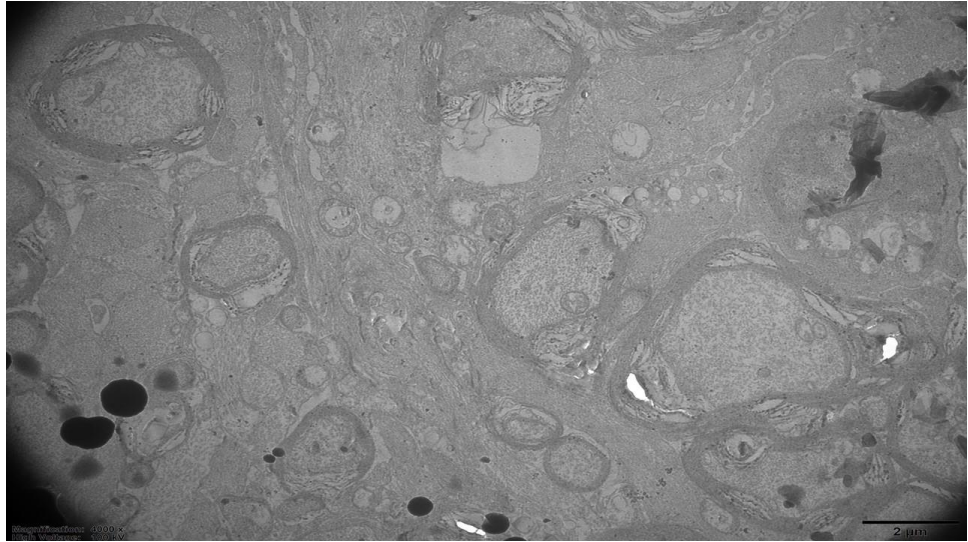
Deneklerin sağ gözlerinden oluşan kontrol grubuna ait retina dokularının elektron mikroskopisi ile incelemelerinde iyonizan radyasyon maruziyetine bağlı olarak hem vasküler çatıda hem de nöral tabakalarda ciddi yapısal hasar geliştiği izlenmiştir.

Retina kapiller damarlarına ait endotel hücrelerinde incelme, perivasküler sahalarda kollajenizasyon artışı, bazal laminada kalınlaşma, perisit sayısında azalma ve perisitlerde intrasitoplazmik ödem sahaları Şekil 4.10'da görülmektedir.

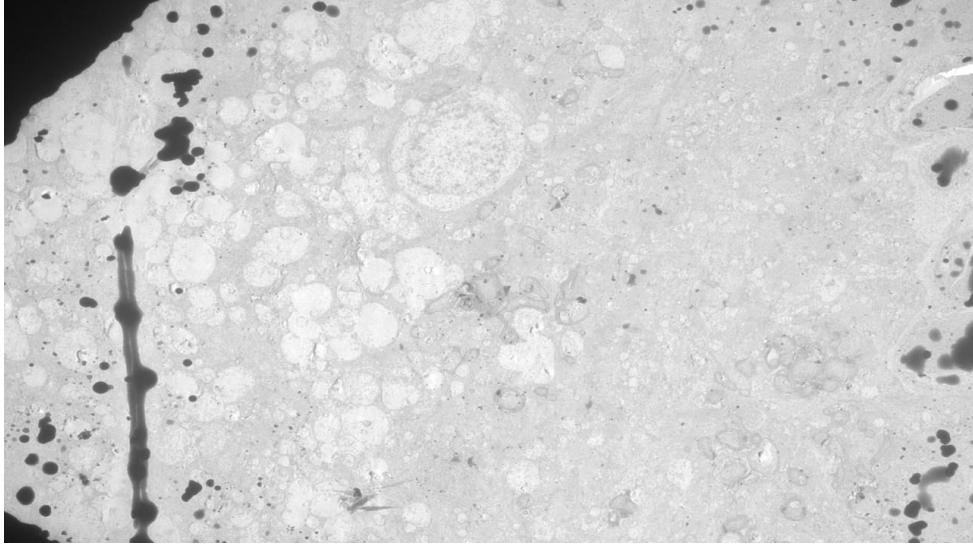


Şekil 4.10. Kontrol grubuna ait hasarlı retina dokusunun elektron mikroskopi görüntüsü (5 μ m)

Bu gruptaki nöral dokuların incelenmesinde stratum nörofibrarumdaki aksonların miyelinlerinde şişme ve myelin lamelasyonlarında artış (Şekil 4.11), akson genişliğinde azalma, dış pleksiform tabakada vakuolizasyon (Şekil 4.12) ve çekirdeklerde kümeleşme izlenmiştir.

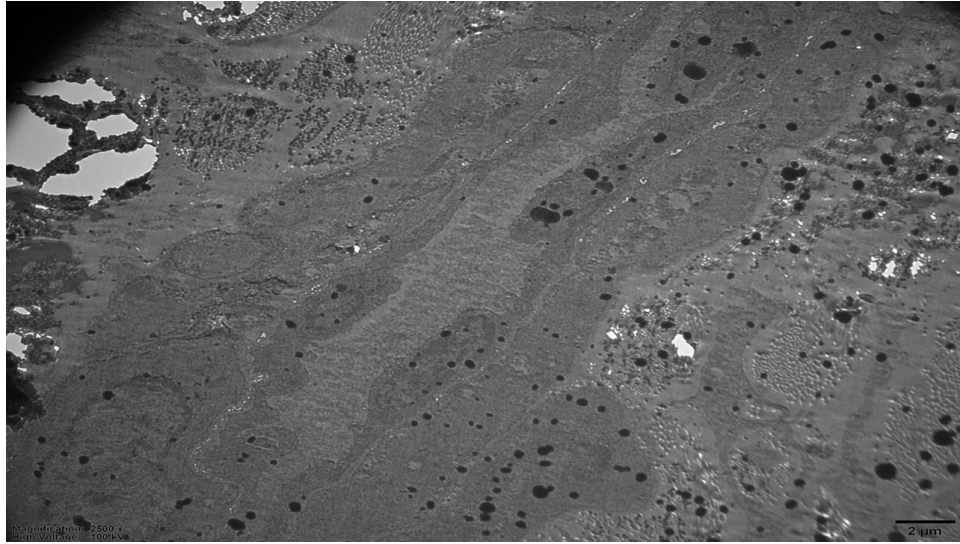


Şekil 4.11. Kontrol grubuna ait hasarlı aksonların elektron mikroskopi görüntüsü (2 μ m)

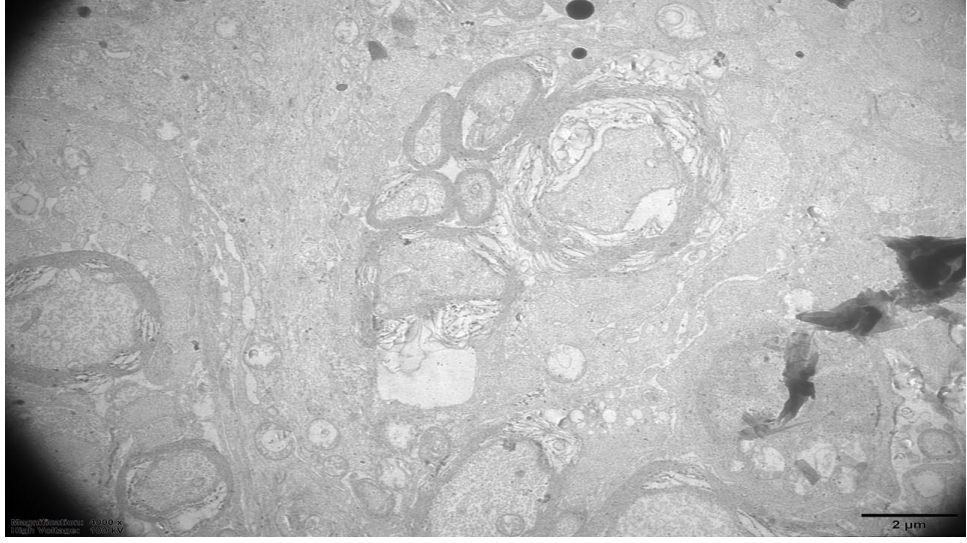


Şekil 4.12. Kontrol grubuna ait retina dokusuna ait dış pleksiform tabakada vakuolizasyon (20 μm)

Bevacizumab grubuna ait dokuların elektron mikroskobisi incelemelerinde retinal kapiller damarlardaki perisit sayısının ve endotel yapısının normal olduğu izlenmiştir (Şekil 4.13). Ancak perivasküler sahada kollajenizasyon artışı ve yer yer orta derecede ödemli aksonal yapılar izlenmiştir (Şekil 4.14).

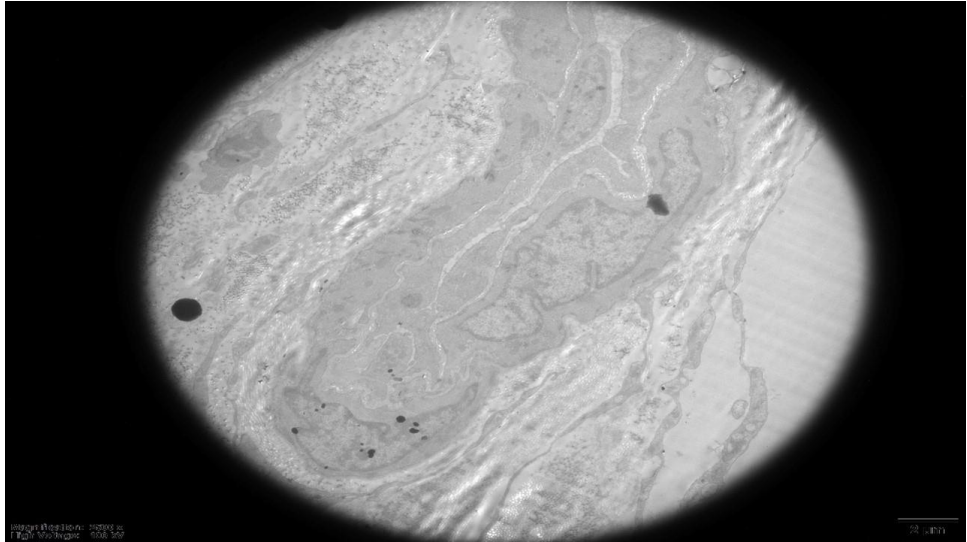


Şekil 4.13. Bevacizumab grubuna ait normal retina dokusunun elektron mikroskopi görüntüsü (2 μm)

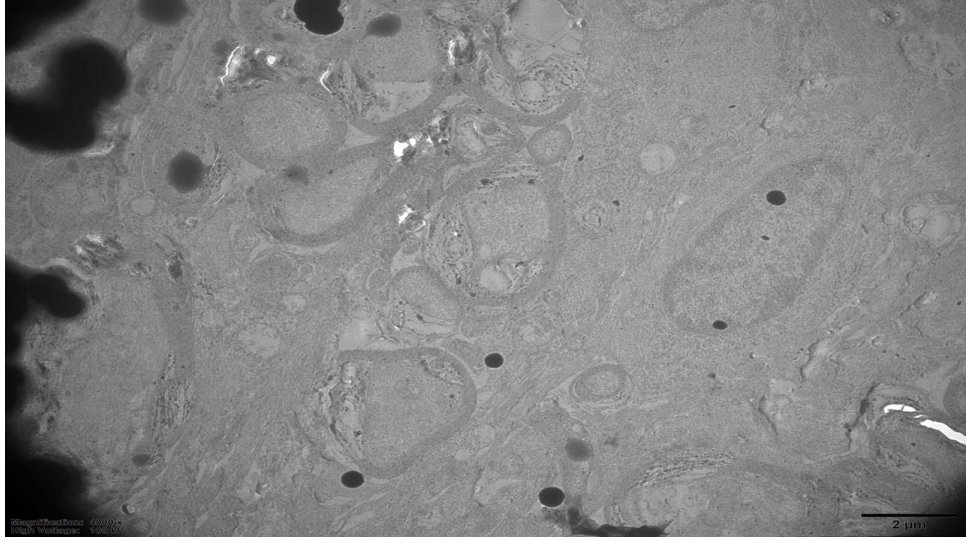


Şekil 4.14. Bevacizumab grubuna ait normal retina ve ödemli aksonların elektron mikroskobisi görüntüsü (2 μ m)

Melatonin grubuna ait dokuların elektron mikroskobisi incelemelerinde ise normal yapıda perisit ve endotel hücreleri içeren kapiller damarlar izlenmiştir (Şekil 4.15). Perivasküler sahada kollajenizasyon gözlenmemiştir. Nöral dokuların incelenmesinde normal kalınlığa ve myelin tabakaya sahip aksonlar izlenmiş olup, aksonal ödem bulgularının diğer gruplara kıyasla daha az olduğu izlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.15. Melatonin grubuna ait normal retina dokusunun elektron mikroskobisi görüntüsü (2 μ m)



Şekil 4.16. Melatonin grubuna ait normal aksonların elektron mikroskopisi (2 μm)

Sonuç olarak kontrol grubuna ait dokuların elektron mikroskopisi incelemelerinde hem retinal kapiller damarlarda, hem de aksonal yapılarda radyasyon maruziyeti ile ilişkili şiddetli yapısal hasar geliştiği saptanmıştır.

Bevacizumab grubuna ait dokuların elektron mikroskopisi incelemelerinde retinal kapiller damarların yapısı büyük oranda korunmuş olmakla beraber, aksonal yapılarda radyasyon maruziyetine sekonder orta derecede ödem geliştiği saptanmıştır.

Melatonin grubuna ait dokuların elektron mikroskopisi incelemelerinde ise retinal kapiller damarların yapısı büyük oranda korunmuş ve aksonal ödem bulguları minimal olarak izlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada iyonizan radyasyon maruziyetine bağlı olarak gelişme riski mevcut olan çeşitli retinal hasar bulgularının profilaksisinde etkinliği gösterilmiş olan intravitreal bevacizumab enjeksiyonunun ve potansiyel bir farmakoterapötik ajan olan melatoninin intravitreal enjeksiyonunun etkinliği incelenmiştir. Sonuçlar her iki yaklaşımın da retinal vasküler yapılar üzerinde koruyucu etkilerinin olduğunu göstermektedir. Ayrıca, intravitreal bevacizumab enjeksiyonundan farklı olarak intravitreal melatonin enjeksiyonunun retinal nöral dokularda da iyonizan radyasyona bağlı olarak gelişebilecek aksonal hasar bulgularını önlediği saptanmıştır.

İyonizan radyasyon maruziyetine bağlı erken ve geç dönem komplikasyonların patogenezi DNA hasarı, serbest radikal oluşumu ve hücre ölümü gibi biyolojik süreçlerle başlar⁹². Erken dönem komplikasyonlar hızlı bölünen hücrelerin apoptoza gitmesi ve inflamatuvar yanıtların tetiklenmesiyle karakterizedir. Geç dönem komplikasyonlar ise süregelen bir inflamasyon, kök hücre ve projenitör hücrelerin tükenmesi, fibrozis ve vasküler değişiklikler gibi mekanizmalarla gelişir. Oküler RT uygulamasına bağlı gelişen erken dönem komplikasyonlar arasında hiperemi, konjonktivit, periorbital ödem ve alopesi, keratit, fotosensitivite gibi bulgular yer alır⁹³. Bu bulgular radyasyon maruziyetinden kısa bir süre sonra gerilemeye başlar ve genellikle geçicidirler. Çalışmamıza dahil edilen deneklerde de iyonizan radyasyon maruziyetine bağlı çeşitli erken dönem komplikasyonlar gözlenmiş olmakla beraber görülme oranlarının bevacizumab, melatonin ve kontrol grupları arasında farklılık göstermediği izlenmiştir. Bevacizumab molekülünün ağırlığı 149.000 g/mol'dür ve literatürde intravitreal enjeksiyonunu takiben sistemik dolaşıma geçme oranının oldukça az olduğu rapor edilmiştir^{94,95}. Melatonin molekülünün ağırlığı ise 232,28 g/mol'dür ve lipofilik özelliği nedeniyle bevacizumaba kıyasla sistemik dolaşıma daha fazla geçebileceği düşünülmektedir⁶⁹. Ancak çalışmamızda izlenen erken dönem komplikasyonlarının çoğunlukla yüzeysel oküler dokularda ve periorbital ciltte bilateral olarak gözlenmesi, intravitreal enjeksiyon ile uygulanan ilaçların sistemik dolaşıma katılan miktarlarının bu komplikasyonlar üzerinde herhangi bir profilaktik etki yaratabilecek düzeylerde olmadığını düşündürmüştür.

Radyasyon retinopatisi, oküler RT uygulamasına bağılı gelişen geç dönem komplikasyonlar arasında oldukça sık gözlenen ve görme kaybı ile yüksek ilişkisi bulunan bir komplikasyondur. Retinopatinin tedavisinde lazer fotokoagülasyon, fotodinamik terapi, perioküler veya intraoküler kortikosteroid ve/veya anti-VEGF ajanların enjeksiyonları, oral pentoksifilin ve hiperbarik oksijen tedavisi sık kullanılan tedavi seçenekleridir.^{22,32,45,47,96} Ancak komplikasyon gözlendikten sonra uygulanan tedavi yaklaşımlarından farklı olarak mevcut literatür bilgileri, komplikasyon gelişme riskini azaltan profilaktik yaklaşımlar konusunda oldukça kısıtlıdır. İntravitreal kortikosteroid ve anti-VEGF enjeksiyonları retinopati profilaksisinde literatürde en fazla kanıt düzeyine sahip olan yaklaşımlar olmakla birlikte tekrarlayan kullanımlarında ortaya çıkan çeşitli yan etkileri, uygulama zorlukları ve finansal nedenlerden ötürü yeni profilaktik farmakoterapötik ajanlara hala büyük bir ihtiyaç olduğu literatürde açıkça belirtilmiştir.^{4,59,62}

Profilaktik etkisi incelenecek olan farmakoterapötik ajanların başarılı sonuçlara ulaşabilmesi için öncelikle intravitreal enjeksiyonlarının güvenli olması, buna ek olarak da radyasyon retinopatisinin patogenezinde yer alan çeşitli basamaklar üzerinde etkilerinin olması gereklidir. Radyasyon retinopatisinin patogenezinde temel olarak oksidatif strese bağılı gelişen endotel hasarı yatmaktadır³¹. Dolayısıyla oksidatif stres üzerinde etkisi olabilecek farmakoterapötik yaklaşımların profilaktik etkilerinin incelenmesi gerekmektedir. Melatonin, bir çok prelinik çalışmada oksidatif stres üzerinde koruyucu etkilere sahip olduğu gösterilmiş ve radyasyon maruziyeti ile ilişkili çeşitli oküler dışı komplikasyonların profilaksisinde etkinliği saptanmış olan bir farmakoterapötik ajandır^{14,97-101}. Ancak radyasyon maruziyetine bağılı oküler komplikasyonlar içerisinde sadece katarakt üzerindeki etkileri incelenmiştir^{15,16}. Bu nedenle çalışmamızda kuvvetli bir antioksidan etkisi olduğu bilinen melatonin molekülünün intravitreal enjeksiyonunun iyonizan radyasyon maruziyeti sonrası retina üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmamızda tercih edilen melatonin dozu 100 mcg/kg'dır ve bu dozda intravitreal enjeksiyon şeklinde uygulanan melatoninin literatür bulguları ile uyumlu olarak herhangi bir toksisiteye yol açmadığı ve güvenli olduğu sonucuna varılmıştır⁸⁴⁻⁸⁶.

Enükleasyon sonrası aspire edilen vitröz sıvılara ait oksidatif stres düzeyleri incelendiğinde, melatonin grubuna ait ortalama OSİ değerinin, bevacizumab ve kontrol gruplarına göre yarı yarıya daha düşük olduğu gözlemlenmiştir; ancak bu fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Bu bulgu OSİ ölçümlerinin RT uygulamasından sonra altıncı haftada yapılmış olması ile açıklanabilir. Dokuların iyonizan radyasyon ilişkili oksidatif strese maruz kalmasından milisaniyeler sonra hızlı bir antioksidan yanıt başlar¹⁰². Süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler ile vitamin C ve E gibi non-enzimatik antioksidanlar oksidatif strese neden olan serbest radikalleri nötralize ederek antioksidan yanıtta katkıda bulunurlar¹⁰³. Ayrıca hücreler, redoks dengesini korumak için Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini aktive ederek antioksidan genlerin ekspresyonunu uzun vadede artırır¹⁰⁴. Bu mekanizmaların tamamı birlikte çalışarak iyonizan radyasyonun neden olduğu oksidatif hasarı azaltır ve hücrel işlevleri korur. Ancak antioksidan yanıtın başlangıç zamanı ve oksidatif stresi kompanse etme süreci içerisinde uğradığı değişiklikler ile ilgili veriler net değildir. Literatürde melatonin molekülünün antioksidan sisteme olan katkısını inceleyen çalışmaların çoğunda iyonizan radyasyon maruziyetinden sonra saatler veya birkaç hafta içerisinde ölçümler yapılmıştır^{101,105-107}. Çalışmamızda iyonizan radyasyon maruziyetinin ardından retinopati gelişebilmesi için 1,5 ay beklenmiş ve OSİ ölçümleri bu sürenin sonunda yapılabilmektedir. Dolayısıyla melatonin grubunda numerik olarak daha düşük OSİ değerleri gözlenmiş olsa da bu bulgunun istatistiksel anlamlılığa ulaşmamış olmasının iyonizan radyasyon maruziyeti sonrası aradan geçen zaman ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Maruziyet sonrası devreye giren antioksidan mekanizmalar aracılığıyla bevacizumab ve kontrol grubuna ait OSİ değerleri zaman içerisinde azalma göstermiş olabilir.

Çalışmamızda retina dokularının elektron mikroskopisi incelemesinde gruplar arasında belirgin farklılıklar olduğu izlenmiştir. Kontrol grubuna ait retina dokularında ciddi vasküler ve aksonal hasar bulguları izlenmişken, bevacizumab grubunda vasküler hasarın olmadığı ancak aksonal hasar bulgularının geliştiği, melatonin grubunda ise vasküler hasarın bevacizumab grubu ile benzer şekilde izlenmezken,

aksonal hasar bulgularının da diğer gruplara kıyasla minimal düzeyde olduğu izlenmiştir. Bu bulgu bevacizumab ve melatonin moleküllerinin farklı etki mekanizmaları ile açıklanabilir. Bevacizumabın retinopati profilaksisi üzerindeki esas etkisi hipoksi ile indüklenen VEGF salınımını inhibe ederek vasküler yatak üzerinde olmaktadır¹⁰⁸. Her ne kadar bevacizumabın klinik etki yaratma potansiyeli taşıyan antioksidan bir etkisinin olup olmadığı belirsiz olsa da, son zamanlarda anjiogenez üzerindeki inhibitör etkisine ek olarak non-vasküler dokular üzerinde de koruyucu etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar rapor edilmiştir¹⁰⁹. Melatonin ise oldukça kuvvetli bir antioksidan olmakla birlikte, VEGF ile indüklenen anjiogenez üzerinde de inhibitör etkisi olduğu rapor edilmiş bir moleküldür^{81,82}. Dolayısıyla radyasyon retinopatisi ve nöropatisi gibi komplikasyonların patogenezi düşünüldüğünde hem bevacizumab hem de melatonin etkin yaklaşımlar olarak görülmekle birlikte, çalışma sonuçlarımıza göre melatoninin nöroprotektif etkilerinin bevacizumaba kıyasla daha etkili olduğu düşünülmüştür. Bu durum melatoninin anjiogenez üzerindeki düzenleyici etkisine ek olarak bevacizumaba kıyasla çok daha yüksek antioksidan etkiye sahip olması ile açıklanabilir.

Özetle çalışma sonuçlarımız çeşitli oküler maligniteler veya benign hastalıklar nedeniyle RT uygulanmış olan hastalarda gelişebilecek oküler komplikasyonların profilaksisinde, melatoninin umut vaat eden bir farmakoterapötik ajan olduğunu desteklemektedir.

5.1. Kısıtlılıklar

Çalışmamız her ne kadar iyonizan radyasyon maruziyetine bağlı gelişen oküler komplikasyonlar üzerinde intravitreal melatonin enjeksiyonunun profilaktik rolünü inceleyen bildiğimiz kadarıyla ilk çalışma olsa da çeşitli kısıtlılıkları mevcuttur. Hayvan deneylerinin etik kuralları içerisinde yer alan, aynı bilimsel sonuçları elde etmek için mümkün olan en az sayıda hayvanın kullanılması ilkesi nedeniyle denek sayımız 12 ile sınırlandırılmıştır. Denek sayısının azlığı çalışma sonuçlarını etkilemiş olabilir.

Ek olarak çalışmamızdaki RT dozu tercih edilirken kısa zaman içerisinde komplikasyonların görülme ihtimalini arttırmak amacıyla tek fraksiyonda yüksek doz radyasyon uygulaması tercih edilmiştir. Dolayısıyla çalışma sonuçlarımız

konvansiyonel fraksiyone RT uygulamaları açısından değerlendirilirken dikkatli olunmalıdır.

Bir diğer kısıtlılık, OSİ ölçümlerinin radyasyon maruziyetinden 1,5 ay sonra yapılabilmiş olmasıdır ancak bu OSİ ölçümü için optimal zamanlamanın literatürde net olarak tanımlanmamış olmasından kaynaklanmaktadır.

Ek olarak deneklerden 8 numaralı denek enükleasyon prosedürü öncesinde volvulus nedeniyle kaybedilmiş ve bu deneğe ait dokular elektron mikroskopi incelemelerine dahil edilememiştir. Bu durum elektron mikroskobisi incelemeleri için bevacizumab ve melatonin gruplarının eşit denek sayısına sahip olmamasına neden olmuştur.

Ayrıca elektron mikroskopi bulgularını objektif değerlendirmeye imkan sağlayacak valide edilmiş bir skorlama sistemi bulunmadığından bulgular arasında istatistiksel açıdan farklılık olup olmadığı değerlendirilememiş, çıkarımlar subjektif olarak yapılabilmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Oküler RT uygulanmasına bağlı gelişme riski taşıyan komplikasyonlar için literatürdeki mevcut profilaktik yaklaşımlar yetersizdir ve potansiyel yeni farmakoterapötik ajanların incelenmesine ihtiyaç vardır.
- Bevacizumab bir anti-VEGF monoklonal antikoru olarak radyasyon retinopatisi üzerinde koruyucu etkinliği gösterilmiş, rutin pratikte sıklıkla kullanılan ancak maliyeti yüksek bir ajandır.
- Bu çalışmada intravitreal melatonin enjeksiyonunun radyasyon retinopatisi profilaksisinde en az bevacizumab kadar etkin bir yaklaşım olduğu gösterilmiştir.
- İyonizan radyasyon maruziyeti sonrasında intravitreal melatonin enjeksiyonu uygulanan vitröz sıvılardaki OSİ değerlerinin sayısal olarak bevacizumab ve kontrol gruplarına kıyasla daha düşük olduğu saptanmıştır.
- Hem bevacizumab hem de melatonin intravitreal enjeksiyonu ile retinal vasküler çatının büyük ölçüde korunduğu izlense de, melatoninin aksonlar üzerindeki nöroprotektif etkisi bevacizumaba kıyasla daha baskın olarak izlenmiştir.
- Çalışmamızda literatürdeki verilerden yola çıkarak 100 mcg/kg dozunda intravitreal melatonin uygulaması tercih edilmiştir. Farklı melatonin dozlarında intravitreal enjeksiyonların toksisite ve etkinliği ile ilgili ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.
- Çalışmamızda tekrarlayan intravitreal enjeksiyonlar nedeniyle gelişebilecek olası komplikasyonların önüne geçebilmek için tek seferlik bir enjeksiyon tercih edilmiştir. Bu nedenle tekrarlayan enjeksiyonların etkisinin incelendiği ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.
- Çalışmamızda radyasyon maruziyeti sonrası 1,5 ay gibi görece kısa bir izlem süresi mevcuttur. Ancak iyonizan radyasyon maruziyetinden yıllar sonra dahi çeşitli komplikasyonların ortaya çıkabilmesi nedeniyle daha uzun süreli izleme sahip çalışmalara ihtiyaç vardır.

- Çalışmamız radyasyon retinopatisi gibi oldukça yıkıcı sonuçları olan bir komplikasyonun önlenmesi için gelecekteki araştırmalara temel oluşturmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Jensen AW, Petersen IA, Kline RW, Stafford SL, Schomberg PJ, Robertson DM. Radiation complications and tumor control after 125I plaque brachytherapy for ocular melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;63(1):101-8. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2005.01.022.
2. Murray TG, Latiff A, Villegas VM, Gold AS. Aflibercept for Radiation Maculopathy (ARM Study): Year-2 Extension of a Prospective Clinical Study. *J Vitreoretin Dis* 2021;5(3):232-238. DOI: 10.1177/2474126420958894.
3. Seibel I, Hager A, Riechardt AI, Davids AM, Boker A, Jousen AM. Antiangiogenic or Corticosteroid Treatment in Patients With Radiation Maculopathy After Proton Beam Therapy for Uveal Melanoma. *Am J Ophthalmol* 2016;168:31-39. DOI: 10.1016/j.ajo.2016.04.024.
4. Giuliani GP, Sadaka A, Hinkle DM, Simpson ER. Current treatments for radiation retinopathy. *Acta Oncol* 2011;50(1):6-13. DOI: 10.3109/0284186X.2010.500299.
5. Baba K, Pozdeyev N, Mazzoni F, et al. Melatonin modulates visual function and cell viability in the mouse retina via the MT1 melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(35):15043-8. DOI: 10.1073/pnas.0904400106.
6. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Pilar Terron M, Flores LJ, Koppisepi S. Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. *Adv Med Sci* 2007;52:11-28. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18217386>).
7. Huang R, Xu Y, Lu X, et al. Melatonin protects inner retinal neurons of newborn mice after hypoxia-ischemia. *J Pineal Res* 2021;71(1):e12716. DOI: 10.1111/jpi.12716.
8. Vijayalaxmi, Meltz ML, Reiter RJ, Herman TS, Kumar KS. Melatonin and protection from whole-body irradiation: survival studies in mice. *Mutat Res* 1999;425(1):21-7. DOI: 10.1016/S0027-5107(98)00246-2.
9. Dundar G, Gunaydin O, Yazici G, Kurtulan O, Ogus E, Sahin I. Investigation of the protective effects of intraperitoneal melatonin in rats receiving laryngeal radiotherapy. *Auris Nasus Larynx* 2023;50(3):395-402. DOI: 10.1016/j.anl.2022.08.003.
10. Elsabagh HH, Moussa E, Mahmoud SA, Elsaka RO, Abdelrahman H. Efficacy of Melatonin in prevention of radiation-induced oral mucositis: A randomized clinical trial. *Oral Dis* 2020;26(3):566-572. DOI: 10.1111/odi.13265.
11. Kose O, Arabaci T, Kizildag A, et al. Melatonin prevents radiation-induced oxidative stress and periodontal tissue breakdown in irradiated rats with experimental periodontitis. *J Periodontal Res* 2017;52(3):438-446. DOI: 10.1111/jre.12409.

12. Aricigil M, Dundar MA, Yucel A, et al. Melatonin prevents possible radiotherapy-induced thyroid injury. *Int J Radiat Biol* 2017;93(12):1350-1356. DOI: 10.1080/09553002.2017.1397296.
13. Shabeeb D, Keshavarz M, Shirazi A, et al. Evaluation of the Radioprotective Effects of Melatonin Against Ionizing Radiation-Induced Muscle Tissue Injury. *Curr Radiopharm* 2019;12(3):247-255. DOI: 10.2174/1874471012666190219120329.
14. Shabeeb D, Musa AE, Keshavarz M, et al. Histopathological and Functional Evaluation of Radiation-Induced Sciatic Nerve Damage: Melatonin as Radioprotector. *Medicina (Kaunas)* 2019;55(8). DOI: 10.3390/medicina55080502.
15. Karslioglu I, Ertekin MV, Taysi S, et al. Radioprotective effects of melatonin on radiation-induced cataract. *J Radiat Res* 2005;46(2):277-82. DOI: 10.1269/jrr.46.277.
16. Shirazi A, Haddadi GH, Asadi-Amoli F, Sakhaee S, Ghazi-Khansari M, Avand A. Radioprotective effect of melatonin in reducing oxidative stress in rat lenses. *Cell J* 2011;13(2):79-82. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23508093>).
17. Wang JS, Wang HJ, Qian HL. Biological effects of radiation on cancer cells. *Mil Med Res* 2018;5(1):20. DOI: 10.1186/s40779-018-0167-4.
18. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci* 2012;9(3):193-9. DOI: 10.7150/ijms.3635.
19. Chargari C, Deutsch E, Blanchard P, et al. Brachytherapy: An overview for clinicians. *CA Cancer J Clin* 2019;69(5):386-401. DOI: 10.3322/caac.21578.
20. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018;68(1):7-30. DOI: 10.3322/caac.21442.
21. Shields CL, Shields JA, Gross NE, Schwartz GP, Lally SE. Survey of 520 eyes with uveal metastases. *Ophthalmology* 1997;104(8):1265-76. DOI: 10.1016/s0161-6420(97)30148-1.
22. Reichstein DA, Brock AL. Radiation therapy for uveal melanoma: a review of treatment methods available in 2021. *Curr Opin Ophthalmol* 2021;32(3):183-190. DOI: 10.1097/ICU.0000000000000761.
23. Stannard C, Sauerwein W, Maree G, Lecuona K. Radiotherapy for ocular tumours. *Eye (Lond)* 2013;27(2):119-27. DOI: 10.1038/eye.2012.241.
24. Thariat J, Boudin L, Loria O, Nguyen AM, Kodjikian L, Mathis T. How to Manage a Patient with Ocular Metastases? *Biomedicines* 2022;10(12). DOI: 10.3390/biomedicines10123044.
25. Jampol LM, Moy CS, Murray TG, et al. The COMS Randomized Trial of Iodine 125 Brachytherapy for Choroidal Melanoma: IV. Local Treatment Failure and Enucleation in the First 5 Years after Brachytherapy. COMS Report No. 19.

- Ophthalmology 2020;127(4S):S148-S157. DOI: 10.1016/j.ophtha.2020.01.032.
26. Bellocq D, Roy P, Kodjikian L, et al. 20-year assessment of metastatic latency and subsequent time to death after proton therapy for uveal melanomas. *Melanoma Res* 2020;30(3):272-278. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000519.
 27. Toyama S, Tsuji H, Mizoguchi N, et al. Long-term results of carbon ion radiation therapy for locally advanced or unfavorably located choroidal melanoma: usefulness of CT-based 2-port orthogonal therapy for reducing the incidence of neovascular glaucoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013;86(2):270-6. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2012.12.022.
 28. Yazici G, Kiratli H, Ozyigit G, et al. Stereotactic Radiosurgery and Fractionated Stereotactic Radiation Therapy for the Treatment of Uveal Melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2017;98(1):152-158. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2017.02.017.
 29. Kharod SM, Herman MP, Morris CG, Lightsey J, Mendenhall WM, Mendenhall NP. Radiotherapy in the Management of Orbital Lymphoma: A Single Institution's Experience Over 4 Decades. *Am J Clin Oncol* 2018;41(1):100-106. DOI: 10.1097/COC.0000000000000229.
 30. Pereira-Da Silva MV, Di Nicola ML, Altomare F, et al. Radiation therapy for primary orbital and ocular adnexal lymphoma. *Clin Transl Radiat Oncol* 2023;38:15-20. DOI: 10.1016/j.ctro.2022.10.001.
 31. Archer DB, Gardiner TA. Ionizing radiation and the retina. *Curr Opin Ophthalmol* 1994;5(3):59-65. DOI: 10.1097/00055735-199406000-00011.
 32. Wong AJ, Scheffler AC, Teh BS. Overview of late complications of radiation therapy in uveal melanoma. *Chin Clin Oncol* 2023;12(3):29. DOI: 10.21037/cco-22-88.
 33. Bianciotto C, Shields CL, Pirondini C, Mashayekhi A, Furuta M, Shields JA. Proliferative radiation retinopathy after plaque radiotherapy for uveal melanoma. *Ophthalmology* 2010;117(5):1005-12. DOI: 10.1016/j.ophtha.2009.10.015.
 34. Le BHA, Kim JW, Deng H, et al. Outcomes of choroidal melanomas treated with eye physics plaques: A 25-year review. *Brachytherapy* 2018;17(6):981-989. DOI: 10.1016/j.brachy.2018.07.002.
 35. Gunduz K, Shields CL, Shields JA, Cater J, Freire JE, Brady LW. Radiation retinopathy following plaque radiotherapy for posterior uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 1999;117(5):609-14. DOI: 10.1001/archophth.117.5.609.
 36. Ainsbury EA, Bouffler SD, Dorr W, et al. Radiation cataractogenesis: a review of recent studies. *Radiat Res* 2009;172(1):1-9. DOI: 10.1667/RR1688.1.
 37. Finger PT, Chin KJ, Yu GP, Palladium-103 for Choroidal Melanoma Study G. Risk factors for radiation maculopathy after ophthalmic plaque radiation for

- choroidal melanoma. *Am J Ophthalmol* 2010;149(4):608-15. DOI: 10.1016/j.ajo.2009.11.006.
38. Horgan N, Shields CL, Mashayekhi A, Teixeira LF, Materin MA, Shields JA. Early macular morphological changes following plaque radiotherapy for uveal melanoma. *Retina* 2008;28(2):263-73. DOI: 10.1097/IAE.0b013e31814b1b75.
 39. Chaudhry IA, Liu M, Shamsi FA, Arat YO, Shetlar DJ, Boniuk M. Corneoscleral necrosis after episcleral Au-198 brachytherapy of uveal melanoma. *Retina* 2009;29(1):73-9. DOI: 10.1097/IAE.0b013e3181863f7c.
 40. Collaborative Ocular Melanoma Study G. Incidence of cataract and outcomes after cataract surgery in the first 5 years after iodine 125 brachytherapy in the Collaborative Ocular Melanoma Study: COMS Report No. 27. *Ophthalmology* 2007;114(7):1363-71. DOI: 10.1016/j.ophtha.2006.10.039.
 41. Kleineidam M, Augsburger JJ, Hernandez C, Glennon P, Brady LW. Cataractogenesis after Cobalt-60 eye plaque radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;26(4):625-30. DOI: 10.1016/0360-3016(93)90279-5.
 42. Peddada KV, Sangani R, Menon H, Verma V. Complications and adverse events of plaque brachytherapy for ocular melanoma. *J Contemp Brachytherapy* 2019;11(4):392-397. DOI: 10.5114/jcb.2019.87407.
 43. Summanen P, Immonen I, Kivela T, Tommila P, Heikkonen J, Tarkkanen A. Radiation related complications after ruthenium plaque radiotherapy of uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* 1996;80(8):732-9. DOI: 10.1136/bjo.80.8.732.
 44. Groenewald C, Konstantinidis L, Damato B. Effects of radiotherapy on uveal melanomas and adjacent tissues. *Eye (Lond)* 2013;27(2):163-71. DOI: 10.1038/eye.2012.249.
 45. Ataides FG, Silva S, Baldin J. Radiation-Induced Optic Neuropathy: Literature Review. *Neuroophthalmology* 2021;45(3):172-180. DOI: 10.1080/01658107.2020.1817946.
 46. Perez BA, Mettu P, Vajzovic L, et al. Uveal melanoma treated with iodine-125 episcleral plaque: an analysis of dose on disease control and visual outcomes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014;89(1):127-36. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2014.01.026.
 47. Banou L, Tsani Z, Arvanitogiannis K, Pavlaki M, Dastiridou A, Androudi S. Radiotherapy in Uveal Melanoma: A Review of Ocular Complications. *Curr Oncol* 2023;30(7):6374-6396. DOI: 10.3390/curroncol30070470.
 48. Leuenberger PM, Englert U, Schepens JM. [Biological effect of laser-photo-coagulation on the retina (author's transl)]. *Klin Monbl Augenheilkd* 1977;170(2):228-37. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/558463>).
 49. Diddie KR, Ernest JT. The effect of photocoagulation on the choroidal vasculature and retinal oxygen tension. *Am J Ophthalmol* 1977;84(1):62-6. DOI: 10.1016/0002-9394(77)90325-7.

50. Kinyoun JL, Lawrence BS, Barlow WE. Proliferative radiation retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1996;114(9):1097-100. DOI: 10.1001/archophth.1996.01100140299007.
51. Augsburger JJ, Roth SE, Magargal LE, Shields JA. Panretinal photocoagulation for radiation-induced ocular ischemia. *Ophthalmic Surg* 1987;18(8):589-93. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3658314>).
52. Bakri SJ, Beer PM. Photodynamic therapy for maculopathy due to radiation retinopathy. *Eye (Lond)* 2005;19(7):795-9. (In eng). DOI: 10.1038/sj.eye.6701637.
53. Nakano T, Ohara O, Teraoka H, Arita H. Glucocorticoids suppress group II phospholipase A2 production by blocking mRNA synthesis and post-transcriptional expression. *J Biol Chem* 1990;265(21):12745-8. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2373711>).
54. Shields CL, Demirci H, Dai V, et al. Intravitreal triamcinolone acetonide for radiation maculopathy after plaque radiotherapy for choroidal melanoma. *Retina* 2005;25(7):868-74. DOI: 10.1097/00006982-200510000-00009.
55. Kaplan RI, Chaugule SS, Finger PT. Intravitreal triamcinolone acetate for radiation maculopathy recalcitrant to high-dose intravitreal bevacizumab. *Br J Ophthalmol* 2017;101(12):1694-1698. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2017-310315.
56. Iovino C, Mastropasqua R, Lupidi M, et al. Intravitreal Dexamethasone Implant as a Sustained Release Drug Delivery Device for the Treatment of Ocular Diseases: A Comprehensive Review of the Literature. *Pharmaceutics* 2020;12(8). DOI: 10.3390/pharmaceutics12080703.
57. Gillies MC, Sutter FK, Simpson JM, Larsson J, Ali H, Zhu M. Intravitreal triamcinolone for refractory diabetic macular edema: two-year results of a double-masked, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Ophthalmology* 2006;113(9):1533-8. DOI: 10.1016/j.ophtha.2006.02.065.
58. Conti SM, Kertes PJ. The use of intravitreal corticosteroids, evidence-based and otherwise. *Curr Opin Ophthalmol* 2006;17(3):235-44. DOI: 10.1097/01.icu.0000193107.00089.ee.
59. Horgan N, Shields CL, Mashayekhi A, et al. Periocular triamcinolone for prevention of macular edema after plaque radiotherapy of uveal melanoma: a randomized controlled trial. *Ophthalmology* 2009;116(7):1383-90. DOI: 10.1016/j.ophtha.2009.01.051.
60. Kim IK, Lane AM, Jain P, Awh C, Gragoudas ES. Ranibizumab for the Prevention of Radiation Complications in Patients Treated With Proton Beam Irradiation for Choroidal Melanoma. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2016;114:T2. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27630373>).

61. Rosen LS, Jacobs IA, Burkes RL. Bevacizumab in Colorectal Cancer: Current Role in Treatment and the Potential of Biosimilars. *Target Oncol* 2017;12(5):599-610. DOI: 10.1007/s11523-017-0518-1.
62. Mantel I, Schalenbourg A, Bergin C, Petrovic A, Weber DC, Zografos L. Prophylactic use of bevacizumab to avoid anterior segment neovascularization following proton therapy for uveal melanoma. *Am J Ophthalmol* 2014;158(4):693-701 e2. DOI: 10.1016/j.ajo.2014.07.002.
63. Murray TG, Latiff A, Villegas VM, Gold AS. Aflibercept for Radiation Maculopathy Study: A Prospective, Randomized Clinical Study. *Ophthalmol Retina* 2019;3(7):561-566. DOI: 10.1016/j.oret.2019.02.009.
64. Tahir AR, Westhuyzen J, Dass J, et al. Hyperbaric oxygen therapy for chronic radiation-induced tissue injuries: Australasia's largest study. *Asia Pac J Clin Oncol* 2015;11(1):68-77. DOI: 10.1111/ajco.12289.
65. Gall N, Leiba H, Handzel R, Pe'er J. Severe radiation retinopathy and optic neuropathy after brachytherapy for choroidal melanoma, treated by hyperbaric oxygen. *Eye (Lond)* 2007;21(7):1010-2. DOI: 10.1038/sj.eye.6702820.
66. Ashby MA. Retinopathy after irradiation and hyperbaric oxygen. *J R Soc Med* 1985;78(7):604-5. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4009576>).
67. Gupta P, Meisenberg B, Amin P, Pomeranz HD. Radiation retinopathy: the role of pentoxifylline. *Retina* 2001;21(5):545-7. DOI: 10.1097/00006982-200110000-00026.
68. Zhao D, Yu Y, Shen Y, et al. Melatonin Synthesis and Function: Evolutionary History in Animals and Plants. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10:249. DOI: 10.3389/fendo.2019.00249.
69. Mannino G, Pernici C, Serio G, Gentile C, Berteza CM. Melatonin and Phytomelatonin: Chemistry, Biosynthesis, Metabolism, Distribution and Bioactivity in Plants and Animals-An Overview. *Int J Mol Sci* 2021;22(18). DOI: 10.3390/ijms22189996.
70. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J Biol Chem* 1960;235:1992-7. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14415935>).
71. Su SC, Hsieh MJ, Yang WE, Chung WH, Reiter RJ, Yang SF. Cancer metastasis: Mechanisms of inhibition by melatonin. *J Pineal Res* 2017;62(1). DOI: 10.1111/jpi.12370.
72. Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Tan DX, et al. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. *Int J Mol Sci* 2017;18(4). DOI: 10.3390/ijms18040843.

73. Abe M, Itoh MT, Miyata M, Ishikawa S, Sumi Y. Detection of melatonin, its precursors and related enzyme activities in rabbit lens. *Exp Eye Res* 1999;68(2):255-62. DOI: 10.1006/exer.1998.0601.
74. Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res* 2000;28(4):193-202. DOI: 10.1034/j.1600-079x.2000.280401.x.
75. Raikhlin NT, Kvetnoy IM, Tolkachev VN. Melatonin may be synthesised in enterochromaffin cells. *Nature* 1975;255(5506):344-5. DOI: 10.1038/255344a0.
76. Tosini G, Menaker M. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 1996;272(5260):419-21. DOI: 10.1126/science.272.5260.419.
77. Mohan N, Sadeghi K, Reiter RJ, Meltz ML. The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa B. *Biochem Mol Biol Int* 1995;37(6):1063-70. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8747536>).
78. Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, et al. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett* 1993;70(1-2):65-71. DOI: 10.1016/0304-3835(93)90076-l.
79. Undeger U, Giray B, Zorlu AF, Oge K, Bacaran N. Protective effects of melatonin on the ionizing radiation induced DNA damage in the rat brain. *Exp Toxicol Pathol* 2004;55(5):379-84. DOI: 10.1078/0940-2993-00332.
80. Sheikholeslami S, Aryafar T, Abedi-Firouzjah R, et al. The role of melatonin on radiation-induced pneumonitis and lung fibrosis: A systematic review. *Life Sci* 2021;281:119721. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119721.
81. Lin LW, Wang SW, Huang WC, et al. Melatonin Inhibits VEGF-Induced Endothelial Progenitor Cell Angiogenesis in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Cells* 2023;12(5). DOI: 10.3390/cells12050799.
82. Gonzalez-Gonzalez A, Gonzalez A, Rueda N, et al. Melatonin Enhances the Usefulness of Ionizing Radiation: Involving the Regulation of Different Steps of the Angiogenic Process. *Front Physiol* 2019;10:879. DOI: 10.3389/fphys.2019.00879.
83. Hou H, Nudleman E, Weinreb RN. Animal Models of Proliferative Vitreoretinopathy and Their Use in Pharmaceutical Investigations. *Ophthalmic Res* 2018;60(4):195-204. DOI: 10.1159/000488492.
84. Tao Y, Hu B, Ma Z, et al. Intravitreal delivery of melatonin affects the retinal neuron survival and visual signal transmission: in vivo and ex vivo study. *Drug Deliv* 2020;27(1):1386-1396. DOI: 10.1080/10717544.2020.1818882.
85. Yilmaz T, Naziroglu M, Celebi S, Ozercan HI, Kukner AS. Administration of high dose intravitreal melatonin degenerates retinal cells in guinea pigs.

- Pathophysiology 2004;11(2):107-111. DOI: 10.1016/j.pathophys.2004.06.006.
86. Li C, Tian Y, Yao A, Zha X, Zhang J, Tao Y. Intravitreal Delivery of Melatonin Is Protective Against the Photoreceptor Loss in Mice: A Potential Therapeutic Strategy for Degenerative Retinopathy. *Front Pharmacol* 2019;10:1633. DOI: 10.3389/fphar.2019.01633.
 87. Andres-Guerrero V, Alarma-Estrany P, Molina-Martinez IT, Peral A, Herrero-Vanrell R, Pintor J. Ophthalmic formulations of the intraocular hypotensive melatonin agent 5-MCA-NAT. *Exp Eye Res* 2009;88(3):504-11. DOI: 10.1016/j.exer.2008.11.004.
 88. Fallico M, Chronopoulos A, Schutz JS, Reibaldi M. Treatment of radiation maculopathy and radiation-induced macular edema: A systematic review. *Surv Ophthalmol* 2021;66(3):441-460. DOI: 10.1016/j.survophthal.2020.08.007.
 89. Ramos MS, Echegaray JJ, Kuhn-Asif S, et al. Animal models of radiation retinopathy - From teletherapy to brachytherapy. *Exp Eye Res* 2019;181:240-251. DOI: 10.1016/j.exer.2019.01.019.
 90. Elmali A, Koc I, Ciftci SY, et al. Radiotherapy-induced alterations in vitreous humor: A new potential critical structure. *Exp Eye Res* 2021;212:108802. DOI: 10.1016/j.exer.2021.108802.
 91. Janion K, Strzelczyk JK, Walkiewicz KW, et al. Evaluation of Malondialdehyde Level, Total Oxidant/Antioxidant Status and Oxidative Stress Index in Colorectal Cancer Patients. *Metabolites* 2022;12(11). DOI: 10.3390/metabo12111118.
 92. Kim JH, Jenrow KA, Brown SL. Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials. *Radiat Oncol J* 2014;32(3):103-15. DOI: 10.3857/roj.2014.32.3.103.
 93. Jeganathan VS, Wirth A, MacManus MP. Ocular risks from orbital and periorbital radiation therapy: a critical review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;79(3):650-9. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2010.09.056.
 94. Avery RL, Castellarin AA, Steinle NC, et al. Systemic Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intravitreal Aflibercept, Bevacizumab, and Ranibizumab. *Retina* 2017;37(10):1847-1858. DOI: 10.1097/IAE.0000000000001493.
 95. Kazazi-Hyseni F, Beijnen JH, Schellens JH. Bevacizumab. *Oncologist* 2010;15(8):819-25. DOI: 10.1634/theoncologist.2009-0317.
 96. Zhuang J, Yang Y, Liao Y, et al. Efficacy of Intravitreal Injections Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment for Radiation Retinopathy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Ophthalmol* 2024;263:141-151. DOI: 10.1016/j.ajo.2024.02.038.

97. Chen T, Luo Y, Li Q, et al. Melatonin reduces radiation damage in inner ear. *J Radiat Res* 2021;62(2):217-225. DOI: 10.1093/jrr/rraa137.
98. Aras S, Tanzer IHO, Karacavus S, et al. Effect of melatonin on low and high dose radiotherapy induced thyroid injury. *Biotech Histochem* 2023;98(5):346-352. DOI: 10.1080/10520295.2023.2189752.
99. Ren J, Zhu T, Wang Z, Lu L, Fan S. Amelioration of gamma irradiation-induced salivary gland damage in mice using melatonin. *J Pineal Res* 2023;75(2):e12897. DOI: 10.1111/jpi.12897.
100. Serin M, Gulbas H, Gurses I, Erkal HS, Yucel N. The histopathological evaluation of the effectiveness of melatonin as a protectant against acute lung injury induced by radiation therapy in a rat model. *Int J Radiat Biol* 2007;83(3):187-93. DOI: 10.1080/09553000601129093.
101. Rezapoor S, Shirazi A, Abbasi S, et al. Modulation of Radiation-induced Base Excision Repair Pathway Gene Expression by Melatonin. *J Med Phys* 2017;42(4):245-250. DOI: 10.4103/jmp.JMP_9_17.
102. Halliwell B. Understanding mechanisms of antioxidant action in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2024;25(1):13-33. DOI: 10.1038/s41580-023-00645-4.
103. Obrador E, Montoro A. Ionizing Radiation, Antioxidant Response and Oxidative Damage: Radiomodulators. *Antioxidants (Basel)* 2023;12(6). DOI: 10.3390/antiox12061219.
104. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2013;53:401-26. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320.
105. Pikalova LV, Legeza VI, Ivanov MB, Zhakovko EB. Experimental study of cytoprotective effect of melatonin in radiation exposure. *Bull Exp Biol Med* 2011;152(1):76-8. DOI: 10.1007/s10517-011-1458-x.
106. Hussein MR, Abu-Dief EE, Abou El-Ghait AT, Adly MA, Abdelraheem MH. Melatonin and roentgen irradiation of the testis. *Fertil Steril* 2006;86(3):750-2. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.02.094.
107. Yalcin B, Yay AH, Tan FC, Ozdamar S, Yildiz OG. Investigation of the anti-oxidative and anti-inflammatory effects of melatonin on experimental liver damage by radiation. *Pathol Res Pract* 2023;246:154477. DOI: 10.1016/j.prp.2023.154477.
108. Powell BE, Chin KJ, Finger PT. Early anti-VEGF treatment for radiation maculopathy and optic neuropathy: lessons learned. *Eye (Lond)* 2023;37(5):866-874. DOI: 10.1038/s41433-022-02200-5.
109. Brar VS, Sharma RK, Murthy RK, Chalam KV. Bevacizumab neutralizes the protective effect of vascular endothelial growth factor on retinal ganglion cells. *Mol Vis* 2010;16:1848-53. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21031022>).

EKLER**Ek 1.** Etik Kurul Başvuru Onayı

