



Doksorubisinin sıçan iskelet kasında kemomiyektomi etkisi

Doxorubicin-induced chemomyectomy effects in rat skeletal muscle

Emre ÇULLU, ¹ İlhan ÖZKAN, ¹ Nil ÇULHACI, ² Bülent ALPARSLAN, ¹ Emel DİKİCİOĞLU, ² Ş. Öner ŞAVK ¹

¹Ađnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, ²Patoloji Anabilim Dalı

Amaç: Bu çalışmada, spastik kasta aktif kas lif sayısının azaltılmasıyla dengenin sağlanabileceği düşünülerek, doksorubisinin iskelet kasında yaratacağı kalıcı hücre kaybının (kemomiyektomi) deneysel olarak gösterilmesi amaçlandı.

Çalışma planı: Wistar cinsi 18 sıçan iki gruba ayrıldı; birinci gruptaki dokuz sıçanın sol kuadriseps kasına 0.02 mg/0.5 ml, ikinci gruptaki dokuz sıçanın sol kuadriseps kasına 0.05 mg/0.5 ml doksorubisin enjekte edildi. Tüm sıçanların sağ kuadriseps kaslarına 0.5 ml serum fizyolojik enjekte edilerek kontrol grubu oluşturuldu. Her iki gruptan üçer sıçanın yaşamları 1, 6 ve 10. haftalarda sonlandırılarak her iki taraf kuadriseps kasları histolojik olarak incelendi.

Bulgular: Histolojik incelemede kontrol grubunu oluşturan sağ kuadriseps kasları normal bulundu. Birinci haftada alınan örneklerde doza bağımlı olarak, ikinci grupta daha fazla olmak üzere akut enflamasyon bulguları görüldü. Birinci grupta %2.5, ikinci grupta %10 oranında enflamasyon alanı saptandı. Altıncı hafta örneklerinde, dozdan bağımsız olarak akut enflamasyon bulgularının yerini, tüm alanın ortalama %0.8'i kadar oranda rejenerasyon oluşumuna ve fibroziye bıraktığı gözlemlendi. On haftalık örneklerde ise rejenerasyonun bulunmadığı, hasarlı alanların (ortalama %2.5 oranında) fragmente olduğu, atrofik fibrillerin var olduğu ve dozdan bağımsız olarak belirgin fibrozis geliştiği saptandı.

Çıkanmlar: Doksorubisinin erken dönemde doza bağımlı akut bir enflamasyona yol açtığı; geç dönemde ise doza bağımlı olmaksızın kas liflerinde fragmentasyon, atrofi ve fibroziye neden olarak, kasın kasılabilir elemanlarında kalıcı bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi. İskelet kasındaki bu kemomiyektomi etkisiyle, doksorubisinin spastisiteyle seyreden hastalıkların tedavisinde yeni bir kimyasal ajan olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: Doksorubisin/terapötik kullanım/farmakoloji; enjeksiyon, intramusküler; kas denervasyonu/yöntem; kas/metabolizma/fizyoloji/ilâç etkisi; nekroz; sıçan; spazm/ilâç tedavisi.

Objecti ves: This study was based on the assumption that decreased number of active muscle fibres in the spastic muscle may be associated with restoration of the balance. Hence, the effect of doxorubicin was evaluated in inducing permanent cell necrosis on skeletal muscle (chemomyectomy).

Metho ds: Eighteen Wistar rats were divided into two groups, equal in size, to receive doxorubicin injections (0.02 and 0.05 mg/0.5 ml) into the left quadriceps muscles under general anaesthesia. The right quadriceps muscles (controls) were assigned to receive 0.5 ml of physiologic saline solution. Three rats in each group were sacrificed on the 1st, 6th, and 10th post-injection weeks, after which all the quadriceps muscles were histologically evaluated.

Results: Histopathologic findings were normal in the control muscles. Dose-dependent acute inflammatory reactions were observed in both groups at the end of the first week, with a higher severity at 0.05 mg doses. The size of the inflammation areas were 2.5% and 10% at 0.02 mg and 0.05 mg doses, respectively. At the end of six weeks, acute inflammatory reactions were replaced by the development of regeneration and fibrosis accounting to 0.8% of all the areas, regardless of the dose given. Specimens of the 10th week exhibited no regeneration; there was a mean of 2.5% fragmentation within the impaired areas, with atrophic fibrils and marked fibrosis showing no dose-dependence.

Conclusion: Doxorubicin induces a dose-dependent inflammatory reaction during the early postoperative period. In the long-term, permanent effects, which are not dose-dependent, are observed characterized by fragmentation, atrophy, fibrosis of muscle fibres, and losses in contractile muscle elements. These doxorubicin-induced chemomyectomy effects may prove therapeutic in the treatment of spasticity-associated diseases.

Key words: Doxorubicin/therapeutic use/pharmacology; injections, intramuscular; muscle denervation/methods; muscles/metabolism/physiology/drug effects; necrosis; rats; spasm/drug therapy.

XVII. Ulusal Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi'nde (Deneysel Araştırma Dalı'nda Birincilik ödüllü) sunulmuştur (24-29 Ekim 2001, Antalya).

Yazışma adresi: Dr. Emre Çullu, Efeler Mah., Atatürk Bulvarı, Eylül Sok., No: 21/2, 09020 Aydın.

Tel: 0256 - 212 40 78 Faks: 0256 - 212 01 46 e-posta: ecullu@superonline.com

Başvuru tarihi: 22.01.2003 **Kabul tarihi:** 12.08.2003

Spastisite ile seyreden hastalıklarda patoloji santral sinir sistemindeyken, etkileri kas iskelet sisteminde görülmektedir. Antagonist kasların spastisitesi, agonist kasların normal ve/veya zayıf oluşu, hareketin amaca uygun ve dengeli yapılmasını engeller. Tedavide amaç, hareketin agonist ve antagonist kaslarının dengesini sağlamaktır. Spastisitenin konservatif tedavisinde etil alkol, fenol ve son yıllarda botulinum toksini kullanılmaktadır. Etil alkol ve fenol genellikle sinir blokajı için sinirlere, botulinum toksini ise sinir kas kavşağında oluşturduğu ileti kaybı nedeniyle spastik kaslara uygulanmaktadır. Her üç ajanın da etkileri 3-6 ay ile sınırlıdır.^[1,2] Tekrarlayan toksin uygulamalarında ise bu etki süresi daha kısalmakta ve vücutta zamanla alerjik reaksiyon ortaya çıkabilmektedir.^[3]

Doksozobisin, tedavi amacıyla sık kullanılan bir antibiyotiktir. İntravenöz yolla uygulandığında, sistemik etkiyle hızlı proliferen olan hücrelerde DNA sentezini engellemektedir. Çizgili bir kas olan kalbe, doza bağımlı olarak toksik etkide bulunmaktadır.^[4] Bu yan etkisinden faydalanılarak, oftalmolojide blefarospazm tedavisinde, spastik kasa enjeksiyonu ile kasta nekroz geliştiği gösterilmiştir.^[5-7] Kimyasal ajan ile kasın geri dönüşümsüz olarak nekroza uğratılması (kemomiyektomi) yoluyla ortopedik patolojilerin tedavisi literatürde henüz bildirilmemiştir. Son yıllardaki deneysel çalışmalarda, servikal distoni tedavisi için sternokleidomastoid kasına, larenjeal distoni tedavisi için tiroaritenoid kasa doksozobisin enjeksiyonu yapılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.^[8-10]

Daha önceki deneysel çalışmamızda, doksozobisinin kas içinde oluşturduğu erken enflamatuvar yanıt gösterilmiştir.^[11] Bu deneysel çalışmada, doksozobisinin iskelet kasında yaratacağı kalıcı kas hücresi kaybının (kemomiyektomi) incelenmesi amaçlandı. Böylece, spastik kastaki aktif kas lif sayısının azaltılarak, eklem hareketlerinde bozulmuş dengenin sağlanmasına çalışıldı.

Gereç ve yöntem

Çalışmamız, Adnan Menderes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Hayvan Laboratuvarı'nda, Hayvan Etik Kurulu'nun izni ve gözetiminde yürütüldü; tüm işlemlerimizde hayvan hakları dikkate alındı.

Wistar cinsi 18 sıçan iki gruba ayrıldı; birinci gruptaki dokuz sıçanın sol kuadriseps kasına 0.02 mg/0.5 ml, ikinci gruptaki dokuz sıçanın sol kuadriseps kasına 0.05 mg/0.5 ml doksozobisin enjekte edildi. Girişimler intraperitoneal ketamin ve xylazin anestezisi altında yapıldı. Enjeksiyonun altı saat öncesinden bir gün sonrasında dek, sıçanların içme suyuna analjezik olarak metamizol damlatıldı. Uygulama sonrası uyanan sıçanlar kafeste serbest dolaşıma bırakıldı. Sıçanların sağ kuadriseps kaslarına 0.5 ml serum fizyolojik enjekte edilerek kontrol grubu oluşturuldu. Enjeksiyonlar, patellanın 1 cm üzerinden 1 cm'lik cilt insizyonu ile uygulandı.

Her iki gruptan üçer sıçanın yaşamları 1, 6 ve 10 haftalarda sonlandırılarak her iki taraf kuadriseps kasları histolojik incelemeye alındı.

On hafta beklenen sıçanların karaciğer ve kalp örnekleri de incelendi. Çıkarılan kas örnekleri uzun eksen boyunca fizyolojik gerginliğinde tutularak, %4'lük nötralize formalin solüsyonunda 72 saat bekletildi. Tüm örneklerden eşit sayıda dikey ve yatay kesitler alındı. Preparatlar hematoksil-eosin, Masson trikrom ve periyodik asit-Schiff ile boyandı ve grupları bilmeyen iki ayrı patolog tarafından ayrı ayrı incelendi. Işık mikroskobu ile hasar alanı, kas fibrillerinde sitoplazmik vaküolizasyon, akut enflamasyon (ödem, enflamatuvar hücre infiltrasyonu) bulguları, nekroz, fibrozis, rejenerasyon varlığı araştırıldı. Bu histopatolojik bulgular, az (+), orta (++) , belirgin (+++) şeklinde üç dereceli olarak değerlendirildi (Tablo 1, 2, 3). Hasar alanı, lezyonlu bölgelerin tüm kesit alanına oranı ile ortaya kondu.

Tablo 1. Histolojik olarak kas kesitlerinde sitoplazmik vaküolizasyon, fragmentasyon ve nekrotik fibril varlığının derecelendirilmesi

Büyük büyütme alanı	Sitoplazmik vaküolizasyon, fragmentasyon, nekrotik fibril varlığı	
10	1 kas fibrilinde	+
10	2-4 kas fibrilinde	++
10	5 ve üstü kas fibrilinde	+++

Tablo 2. Histolojik olarak kas kesitlerinde enflamatuvar hücre miktarının derecelendirilmesi

Büyük büyütme alanı	Enflamatuvar hücre varlığı	
1	Odaksal	+ (Az)
1	Alanın 1/2'sinde	++ (Orta)
1	Alanın tümünde	+++ (Belirgin)

Tablo 3. Histolojik olarak kas kesitlerinde gözlenen fibrozis ve rejenerasyon miktarının derecelendirilmesi

Büyük büyütme alanı	Fibrozis ve rejenerasyonun kapladığı alan	
10	1 kas fibrili kalınlığı	+ (Az)
10	2-4 kas fibrili kalınlığı	++ (Orta)
10	5 ve üstü kas fibrili kalınlığı	+++ (Belirgin)

Sonuçlar

Kontrol grubunu oluşturan sağ kuadriseps kasları histolojik olarak normal bulundu. Doksorubisin enjekte edilen sol kuadriseps kaslarında, birinci haftada alınan örneklerde, dozun yüksek olduğu ikinci grupta daha fazla olmak üzere, sitoplazmik vakuolizasyon, fragmentasyon, nekrotik fibril, enflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödem (akut enflamasyon) bulguları görüldü. D

Dozun az olduğu birinci grupta %2.5, fazla olduğu ikinci grupta %10 enflamasyon alanı saptandı.

Altıncı hafta alınan örneklerde, dozdan bağımsız olarak, tüm alanın ortalama %0.8'inde akut enflamasyon bulgularının yerini rejenerasyon bulgularının ve fibrozisin aldığı gözlemlendi (Şekil 1a). On haf-

Tablo 4. Doksorubisin enjeksiyonu yapılan kuadriseps örneklerinde histopatolojik değişikliklerin şiddeti ve hasarlı alanların normal dokuya oranı

	Sitoplazmik vakuolizasyon	Fragmentasyon	Nekrotik fibril	Ödem	Enflamatuvar hücre	Fibrozis	Rejenerasyon	Hasarlı alan (%)
A1.1	++	++	+	++	++	-	-	4.3
A1.2	+	+	-	+	+	-	-	2
A1.3	+	-	-	+	+	-	-	1.2
A6.1	-	+	-	-	+	+++	+	2
A6.2	-	+	-	-	+	+	+	0.3
A6.3	-	+	-	-	-	+	+	0.2
A10.1	-	+	-	-	-	++	-	2.3
A10.2	-	+	-	-	-	+++	-	2.3
A10.3	-	+	-	-	-	++	-	3
B1.1	+	+++	++	+	++	+	-	13
B1.2	++	++	+++	+++	+++	+	-	7.3
B1.3	++	+++	++	++	+++	-	-	9.6
B6.1	-	+	-	-	+	++	+	0.2
B6.2	-	+	-	-	-	++	+	0.3
B6.3	-	+	-	-	+	+++	++	2
B10.1	-	++	-	-	-	+++	-	3
B10.2	-	++	-	-	-	++	-	2.3
B10.3	-	+	-	-	-	++	-	2.3

A: 0.02 mg; B: 0.05 mg enjeksiyon gruplarını; harften sonra gelen 1, 6, 10 değerleri sıçanların öldürüldükleri haftaları, noktadan sonra gelen sayılar deneklerin numaralarını belirtmektedir.

talık örneklerde ise rejenerasyonun bulunmadığı, hasarlı alanların (ortalama %2.5 oranda) fragmente olduğu, atrofik fibrillerin var olduğu ve dozdan bağımsız olarak belirgin fibrozisin geliştiği görüldü (Şekil 1b) (Tablo 4). İncelenen kalp ve karaciğer kesitlerinde patolojiye rastlanmadı.

Tartışma

Dokсорubisin, malign neoplazmların tedavisinde sık kullanılan, hücre içinde birkaç yolla sitotoksik

etki oluşturan antrasiklin türü bir antibiyotiktir. *Streptomyces peucetius* mikroorganizmasından elde edilir. Orta derecede lipofilik özellik taşır. Çekirdek DNA'sına ve RNA'ya bağlanıp nükleik asit ve protein sentezini engelleyerek toksik etki gösterir. Ayrıca, sarkoplazmik retinakulum yapı ve fonksiyonlarını da bozar.^[4] Serbest radikal üretimi ve kalsiyum salınımını da etkilediği bildirilmiştir.^[12] İskelet kası ve kalp üzerine toksik etkisi dokudaki konsantrasyonuna bağlıdır. Sistemik yolla verildiğinde, gastrokne-



Şekil 1. (a) Altı haftalık örneklerde atrofik kas fibrilleri (beyaz ok), fibrozis başlangıcı (siyah ok) ve seyrek alanlarda enflamasyon bulguları (asteriks) görülüyor. (H-E x 40). (b) On haftalık örneklerde atrofik kas fibrilleri (beyaz ok) ve fibrozis (siyah ok) izleniyor (Masson trikrom x 200).

mius kasında, kalp kasındaki konsantrasyonunun %17'sine ulaştığı saptanmıştır.^[13]

Spastisiteyle seyreden hastalıkların tedavisinde kullanılan etil alkol, fenol ve botulinum toksininin etkileri geçicidir.^[1,2] Üç ila altı ay sonunda uyguladıkları kaslarda rejenerasyon olur ve spastisite tekrar oluşur. Kazanılan bu sürede yapılan rehabilitasyon ile, antagonist kaslar güçlendirilerek hareketin dengesi sağlanmaya çalışılır.^[14] Aynı zamanda hareketi bozan spastik kasın saptanmasında ve uygun cerrahi endikasyonun belirlenmesinde de bu ajanların önemi vardır. Etki sürelerinin geçici olmasının yanı sıra botulinum toksininin pahalı oluşu ve tekrarlayan enjeksiyonlar sonrası toksine karşı gelişen alerjik reaksiyonlar da bu ajanların kullanımını sınırlamaktadır.^[3] Doksorubisinin kalıcı kemomiyektomi etkisi ve tedavi maliyetinin düşük oluşu, konservatif tedavinin bu olumsuz yanlarını ortadan kaldıracaktır. Çalışmamızda, 10. haftada %2.5 oranında gözlenen kalıcı kas hasarı ve fibrozis, etkinin kalıcılığını göstermektedir.

Doksorubisin enjeksiyonu sonrasında kas kesitlerinin histolojik incelemesinde sitoplazmik vaküolizasyon, ödem ve miyofibriler düzensizlikler gözlenmiştir. Enjeksiyon bölgesinde birçok nekrotik kas hücresi saptanmıştır. Masson trikrom ile boyanan kesitlerde, koyu boyanan hiyalin fibriller vardır. Kas liflerinde gözlenen belirgin fragmentasyon ve bozulma, toksik hasarın kasa verdiği aşırı zararın belirtidir.^[7,15-18] Doksorubisinin kemomiyektomi ve fonksiyonel kemodenerjasyon etkisi bu şekilde ortaya çıkmaktadır.

Kardiyomiyopati, mukoza iltihabına bağlı bulantı, kusma ve diyare ve flebosklerozis, doksorubisinin kanser tedavisi sırasında görülen yan etkileridir.^[4] Damar dışına çıktığı hallerde, hızla eritematöz lezyona yol açar ve bir hafta içinde bu bölgede nekroz ve ülserasyon gelişir. Ülserin büyüklüğü ve derinliği damar dışına kaçan doksorubisin miktarı ile doğru orantılıdır.^[19,20] Oftalmolojide, blefarospazm ile ilgili kullanımında, spastisiteyi çözücü etki için tekrarlayan uygulamalar gerektiği bildirilmiştir. Göz çevresindeki cildin ince oluşu, uygulamanın cilt lezyonu şeklindeki yan etkisini ortaya çıkarmış; tekrarlayan uygulamalar ise bu riski artırmıştır.^[6] Nguyen ve ark.^[21] lokal anesteziğin hafif ve geri dönüşümlü kas nekrozu oluşturan etkilerini,

doksorubisinin etkisini artırmak ve tekrarlayan uygulamalardan kaçınmak için kullanmışlardır. Enjeksiyonu uyguladığımız bölgede cildin yeterince kalın oluşu, lokal anesteziğin kas nekrozunu artırıcı etkisinden yararlanmamıza gerek olmadığını düşündürdü. Ayrıca, çalışmamızda kas içi enjeksiyonlardan sonra cilt lezyonu oluşmaması, uyguladığımız dozun düşük olmasına ve enjeksiyonun cerrahi diseksiyon ile ve görecelik yapılmasına bağlanabilir.

Enjeksiyon sonrası sıçanlar kafeste serbest dolaşıma bırakıldı; birinci günden itibaren yürüyüşleri normale döndü ve aksamaları ortadan kalktı. Yaşamlarının sonlandırıldığı güne kadar aksama gözlenmedi. Anestezi altında kuadrisepleri alınmadan önce yapılan diz muayenesinde kontraktür saptanmadı. Doksorubisinin oluşturduğu kemomiyektomi sonrası gelişen fibrozis, kasın boyunu kısaltacak bir kontraktüre neden olmadı. Başka çalışmalarda da, doksorubisin uygulanan bölgelerde kas liflerinin sayısının azaldığı; ancak boylarının değişmediği ve kontraktür oluşmadığı gözlenmiştir.^[9,10,15,17]

Doksorubisin enjeksiyonundan beş dakika sonra göz çevresindeki kaslarda miyofibriler bozunmanın başladığı ve bunun 24 saat sürdüğü; ilk saat içinde, enjeksiyon bölgesinde birçok miyofibrilde bu bozulmanın gözlemlendiği bildirilmiştir.^[21-23] Dördüncü gün sonunda sadece bazı liflerde geri dönüşümsüz miyofibril hasarının ortaya çıktığının gözlenmesi üzerine, doksorubisine bağlı üç tür etki ileri sürülmüştür.^[21,22] Birinci grupta geri dönüşümsüz miyofibril hasarlı bölgeler, ikinci grupta geri dönüşümlü hasarlı alan, üçüncü grupta etkilenmeyen miyofibrillerin oluşturduğu bölge vardır. Bu bilgi ışığında, ilk yaptığımız çalışmada iskelet kasında oluşan değişiklikler birinci haftada incelenmişti.^[11] Birinci hafta sonunda enflamasyon bulguları, doz ile orantılı olarak iskelet kasında sürmekteydi. Rejenerasyon ve nekroz oranını saptamak için daha uzun süreli örneklerle gereksinim duyulması üzerine bu çalışma planlanmış, birinci haftanın yanı sıra altıncı ve 10. hafta kas örnekleri de ayrı gruplar oluşturularak incelenmiştir. Önçalışmamızda, 0.05 mg'lik enjeksiyon sonrası ilk haftada gözlenen %11 oranında hasar alanı, spastik kasın kasılabilir elemanlarındaki kayıp olarak düşünülmüştür. McLoon ve ark.^[22] çalışmasında da görüldüğü gibi, doksorubisin uygulamasından sonra rejenerasyon olabilen kas

lifi gruplarının varlığı, uzun dönemde akut faz geçtiğinde, hasarlı alanın %2.5 oranlarına düşmesine neden olmuştur. Bu orandaki bir kas gücü kaybı, spastisitenin gereği gibi geriletemeyeceğini düşündürülebilir. Elde edilen kemomiyektomi etkisinin dozla ilişkisinin olup olmadığının saptanması için, çalışmaların, istatistiksel değerlendirme yapılabilecek çoklu altgruplarla daha yüksek dozlarda ve tekrarlayan uygulamalarla derinleştirilmesi gerektiğini düşünüyoruz.

Falkenberg ve ark.^[9] yaptıkları elektrofizyolojik çalışmada, tavşanların sternokleidomastoid kaslarına doksorubisin enjeksiyonu sonrasında kas kuvvetini, tetanik uyarılara yanıtı ve yorgunluk oranlarını incelemişlerdir. Kasın oluşturduğu en yüksek kuvvetin özellikle tetanik uyarılara verilen yanıtta azaldığını, yorgunluk oranının değişmediğini gözlemişlerdir. Bu bulgular, doksorubisin uygulaması sonrasında, spastik hastalıklarda sürekli uyarılan kasların günlük aktivitelerinin etkilenmeyeceğini; ancak tetanik uyarılara verilen kas yanıtının azalacağını düşündürmektedir. Çalışmamızdan farklı olarak, Falkenberg ve ark.^[9] çalışmasında doksorubisinin bu etkisinin doz ile doğru orantılı olarak arttığı bildirilmiştir. Elektrofizyolojik çalışmaların geliştirilmesiyle ve doksorubisinin sağladığı kemomiyektomi sayesinde, serebral palsili hastalarda agonist-antagonist kas dengesinin sağlanabileceğine dair umutlar artacaktır.

Doksorubisinin erken dönemde doza bağımlı akut bir enflamasyona yol açtığı, geç dönemde ise doza bağlı olmaksızın kas liflerinde fragmentasyona, atrofiye ve fibrozise neden olarak, kasın kasılabilir elemanlarında bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi. Ortopedi literatüründe deneysel veya klinik çalışma alanında örneği henüz gözlenmemiş olmakla birlikte, iskelet kasında doksorubisine bağlı kemomiyektomi etkisinden, spastisiteyle seyreden hastalıkların tedavisinde yeni bir yöntem olarak yararlanılabileceği sonucuna varıldı.

Kaynaklar

1. Bodine-Fowler SC, Allsing S, Botte MJ. Time course of muscle atrophy and recovery following a phenol-induced nerve block. *Muscle Nerve* 1996;19:497-504.
2. Koman LA, Smith BP, Tingey CT, Mooney JF, Slone S, Naughton MJ. The effect of botulinum toxin type A injections on the natural history of equinus foot deformity in paediatric cerebral palsy patients. *Eur J Neuro* 1999;6(suppl 4): S19-S22.
3. Aoki KG. Preclinical update on BOTOX (botulinum toxin type A)-purified neurotoxin complex relative to other botulinum neurotoxin preparations. *Eur J Neuro* 1999;6(suppl 4):S3-S10.
4. Arky R. Physicians' desk reference. 52nd ed. Montvale, NJ: Medical Economics Data Production Company; 1998.
5. Wirtschafter JD. Clinical doxorubicin chemomyectomy. An experimental treatment for benign essential blepharospasm and hemifacial spasm. *Ophthalmology* 1991; 98:357-66.
6. Wirtschafter JD, McLoon LK. Long-term efficacy of local doxorubicin chemomyectomy in patients with blepharospasm and hemifacial spasm. *Ophthalmology* 1998; 105:342-6.
7. McLoon LK, Wirtschafter J. Doxorubicin chemomyectomy: injection of monkey orbicularis oculi results in selective muscle injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29: 1854-9.
8. McLoon LK, Falkenberg JH, Dykstra D, Iaizzo PA. Doxorubicin chemomyectomy as a treatment for cervical dystonia: histological assessment after direct injection into the sternocleidomastoid muscle. *Muscle Nerve* 1998;21: 1457-64.
9. Falkenberg JH, Iaizzo PA, McLoon LK. Muscle strength following direct injection of doxorubicin into rabbit sternocleidomastoid muscle in situ. *Muscle Nerve* 2002;25: 735-41.
10. Goding GS Jr, Pernell KJ. Doxorubicin chemomyectomy: effects on evoked vocal fold tension and mucosal wave. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109:294-300.
11. Çullu E, Özkan İ, Çulhacı N, Alparslan B, Dikicioğlu E, Şavk ŞÖ. Doksorubisinin iskelet kasına etkileri. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2000;34:84-8.
12. Zorzato F, Salviati G, Facchinetti T, Volpe P. Doxorubicin induces calcium release from terminal cisternae of skeletal muscle. A study on isolated sarcoplasmic reticulum and chemically skinned fibers. *J Biol Chem* 1985 25;260: 7349-55.
13. Doroshov JH, Tallent C, Schechter JE. Ultrastructural features of Adriamycin-induced skeletal and cardiac muscle toxicity. *Am J Pathol* 1985;118:288-97.
14. Corry IS, Cosgrove AP, Duffy CM, McNeill S, Taylor TC, Graham HK. Botulinum toxin A compared with stretching casts in the treatment of spastic equinus: a randomised prospective trial. *J Pediatr Orthop* 1998;18:304-11.
15. McLoon LK, Bauer G, Wirtschafter J. Quantification of muscle loss in the doxorubicin-treated orbicularis oculi of the monkey. Effect of local injection of doxorubicin into the eyelid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:1667-73.
16. McLoon LK, Wirtschafter J. Local injections of corticotropin releasing factor reduce doxorubicin-induced acute inflammation in the eyelid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38:834-41.
17. McLoon LK, Wirtschafter JD, Cameron JD. Muscle loss from doxorubicin injections into the eyelids of a patient with blepharospasm. *Am J Ophthalmol* 1993;116:646-8.
18. McLoon LK, Kirsch JD, Cameron S, Wirtschafter JD. Injection of doxorubicin into rabbit eyelid does not result in loss of facial motor neurons. *Brain Res* 1994;641:105-10.
19. Bleicher JN, Haynes W, Massop DW, Daneff RM. The delineation of adriamycin extravasation using fluorescence microscopy. *Plast Reconstr Surg* 1984;74:114-6.
20. Ermiş İ, Topalan M, Erkeş NÇ, Aydın A, Görgün B. Dok-

- sorubisine bağlı ekstremitasyon yaralarında “reverse” radial önkol flebi. *Acta Orthop Traumatol Turc* 1995;29: 317-20.
21. Nguyen LT, McLoon LK, Wirtschafter JD. Doxorubicin chemomyectomy is enhanced when performed two days following bupivacaine injections: the effect coincides with the peak of muscle satellite cell division. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:203-6.
22. McLoon LK, Luo XX, Wirtschafter J. Acute morphologic changes in orbicularis oculi muscle after doxorubicin injection into the eyelid. *Muscle Nerve* 1993;16:737-43.
23. Özkan SB, Can D, Bilgili H, Söylev MF, Arsan AK, Üstün H. The effect of doxorubicin on extraocular muscle. An experimental study. In: Spiritus M, editor. *Transaction 24th Meeting of European Strabismological Association*; September 1997; Vilamoura, Portugal. Buren: Aelous Press; 1998. p. 434-9.