



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİR YÜZEY YAPIŞMA PROTEİNİ OLAN E-KADERİNİN
PTERJİYUM GELİŞİMİNDEKİ
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

Emel ENSARİ

Temel Tıp Bilimleri Ana Bilim Dalı

Tıbbi Biyoloji Bilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman

Prof. Dr. Hacı Ömer ATEŞ

TOKAT-2020



Bu tez çalışması;

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 2019/40 nolu proje ve TÜBİTAK 215S692 nolu proje ile desteklenmiştir.

ETİK SÖZLEŞME

T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu belge ile, bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak toplanıp sunulduğunu, bu kural ve ilkelerin gereği olarak, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yaptığımı ve kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

(05/10/2020)

Emel ENSARİ

İmza

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesini esirgemeyen, azim ve kararlılıkla çalışmamı sağlayan ve bana olan güvenini sürekli dile getirerek desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Hacı Ömer ATEŞ'e,

Deneyisel çalışmaların yapılmasında ve çalışmanın her safhasında yardım ve desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Nihan BOZKURT'a, Prof. Dr. Helin DENİZ DEMİR'e, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğr. Üyesi Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ'a

Çalışmalarımın yürütülebilmesi için 2019/40 no'lu proje ile maddi destek sağlayan Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna ve TÜBİTAK'a,

Çalışmalarım esnasında moral ve motivasyon kaynağım olan çalışma arkadaşlarım Dr. Sümeyya Deniz AYBEK'e, Yüksek Biyolog Kübra ŞAHİN'e, Arş. Gör. Merve Nur ÖZGEN ve Arş. Gör. Berna DOĞAN'a,

Hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen ve bana inanan aileme, her zaman yanımda olan biricik eşim Ömer Faruk ENSARİ'ye ve varlığıyla hayatıma neşe getiren sevgili oğlum Ali İhsan ENSARİ'ye en içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

BİR YÜZEY YAPIŞMA PROTEİNİ OLAN E-KADERİNİN PTERJİYUM GELİŞİMİNDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Emel ENSARİ, Doktora Tezi

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat, 2020

Gözde et büyümesi olarak ifade edilen pterjiyum, kornea üzerinde konjonktivanın kontrolsüz bir şekilde büyüyerek ilerlemesiyle sonuçlanan yaygın bir göz hastalığıdır. Özellikle anormal çoğalmaya sebep olarak fibrovasküler dokunun epitel hücrelerinde görülen bozukluklar gösterilmiştir. Epitelyal kaderin olarak da bilinen E-kaderin, hücreler arası adezyona aracılık etmenin ötesinde hücre tanıma, sınır oluşumu ve korunması, koordineli hücre hareketleri de dâhil pekçok biyolojik süreçte anahtar rol oynamaktadır. E-kaderin ekspresyonunun azalması, hücre adezyonunun kaybına, tümör büyümesi ve proliferasyonuna neden olarak metastaza yol açtığı bilinmektedir. Bu çalışmada, tümör oluşumuna benzer davranışlar gösteren pterjiyum ile bir tümör supresör gen olan E-kaderinin ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmada 36 hastaya ait pterjiyum dokusunda E-kaderinin geninin promotör metilasyonu metilasyona spesifik PZR yöntemi ile, ekspresyon düzeylerindeki farklılık kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu qRT-PZR yöntemi ile ve protein ifade farklılıkları western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, kontrol grubuna göre pterjiyumlu dokularda E-kaderin geni metilasyon ve ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,005$). E-kaderin genindeki metillenme ve ekspresyon ifadelerindeki azalışın pterjiyum oluşumu ve gelişimiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Pterjiyum, E-Kaderin, MSP, Western Blot, qRT-PZR

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ROLE OF E-CADHERIN, A SURFACE ADHESION PROTEIN, IN PTERGIUM DEVELOPMENT

Emel ENSARİ, Doctorate Thesis

Tokat Gaziosmanpaşa University, Tokat, 2020

Pterygium, defined as flesh growth in the eye, is a common eye disease that results in uncontrolled growth of the conjunctiva on the cornea. Especially, defects in epithelial cells of fibrovascular tissue have been shown to cause abnormal proliferation. E-cadherin, also known as epithelial cadherin, plays a key role in many biological processes, including cell recognition, border formation and maintenance, and coordinated cell movements, beyond mediating intercellular adhesion. It is known that decreased expression of E-cadherin leads to loss of cell adhesion, tumor growth and proliferation, leading to metastasis. In this study, the relationship between pterygium and E-cadherin, a tumor suppressor gene, was investigated. In the study, promoter methylation of E-cadherin gene in pterygium tissue belonging to 36 patients was determined by methylation specific PCR method, difference in expression levels by quantitative reverse transcription PCR method and protein expression differences by western blot method. According to the obtained data, the methylation and expression levels of the E-cadherin gene in tissues with pterygium were statistically significant compared to the control group ($p < 0.005$). It is thought that the decrease in the expression and methylation of the E-cadherin gene may be related to the formation and development of pterygium.

Keywords: Pterygium, E-Cadherin, MSP, Western Blot, qRT-PCR

İÇİNDEKİLER

ETİK SÖZLEŞME	Sayfa
ETİK SÖZLEŞME	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. PTERJİYUM	4
2.1.1 Pterjiyum tanımı ve tarihçesi	4
2.1.2 Pterjiyum epidemiyolojisi	6
2.1.3 Pterjiyum Histo-Patolojisi	9
2.1.4. Pterjiyum Etiyo-Patogenezi	11
2.1.4.1. UV ışını	12
2.1.4.2. Oksidatif stres	13
2.1.4.3. Büyüme faktörleri	14
2.1.4.4. Matris metalloproteinazlar (MMP) ve doku inhibitörleri metalloproteinazlar (TIMP)	17
2.1.4.5. İnterlökinler	18
2.1.4.6. Çoğalma ile ilişkili proteinler	18
2.1.4.7. Apoptoza bağlı proteinler	19
2.1.4.8. Hücre dışı matris proteinleri	20
2.1.4.9. Isı şoku proteinleri	20
2.1.4.10. Sıkı bağlantı proteinleri	20
2.1.4.11. Kolesterol metabolizması modifikasyonu	21
2.1.4.12. Virüsler	21
2.1.4.13. Epiyelyal-mezenkimal geçiş	22
2.1.5. Pterjiyum genetiği	23
2.1.5.1. Kalıtsal faktörler	23

2.1.5.2. Tümör supresör genleri	23
2.1.5.3. Epigenetik gaktörler	24
2.1.5.4. Pterjiyum'da DNA onarımı	25
2.1.5.5. Pterjiyumda DNA tamirinde kalıtsal defektler	26
2.2. HÜCRE ADEZYONU	27
2.2.1. Hücre adezyonu nedir?	27
2.2.2. Hücre adezyon molekülleri.....	31
2.2.3. E-Kaderin	37
3. MATERYAL ve METOD	40
3.1. MATERYAL.....	40
3.1.1. Çalışma gruplarının oluşturulması	40
3.1.2. Dokuların saklanması	40
3.1.3. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	41
3.1.4. Çalışmada kullanılan sarflar ve kimyasallar.....	42
3.2. METOD.....	45
3.2.1. Dokudan genomik DNA izolasyonu	46
3.2.2. Metilasyon	50
3.2.3. Dokudan mRNA izolasyonu.....	54
3.2.4. cDNA sentezi.....	57
3.2.5. qRT-PZR aşaması.....	59
3.2.6. Dokudan protein izolasyonu.....	60
3.2.7. Western blotlama.....	61
4. BULGULAR.....	65
4.1. ÇALIŞMA GRUPLARINA AİT BULGULAR.....	65
4.2. PTERJİYUMLU DOKULARA AİT HİSTOPATOLOJİK İNCELEME.....	67
4.3. METİLASYONA SPESİFİK PZR (MSP) ANALİZ BULGULARI.....	67
4.3.1. E-CAD genine ait jel görüntülerinin incelenmesi	67
4.3.2. E-CAD geni MSP sonuçlarının istatistiksel analizi.....	68
4.4. KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI PZR (QRT-PZR) ANALİZ BULGULARI	70
4.4.1. E-CAD genine ait qRT-PZR görüntü ve değerlendirilmesi	70
4.4.2. E-CAD mRNA genine ait qRT-PCR bulgularının istatistiksel analizi	73
4.5. E-CAD GENİNE AİT WESTERN BLOT ANALİZ BULGULARI.....	77
4.5.1. E-CAD genine ait western blot jel görüntüleri ve değerlendirilmesi	77

4.5.2. E-CAD genine ait western blot sonuçlarının istatistiksel analizi	78
5. TARTIŞMA	81
6. KAYNAKLAR	87
7. ÖZGEÇMİŞ	108



TABLOLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3. 1. Primer dizileri ve bilgileri	53
Tablo 3. 2. PZR reaksiyonu koşulları	53
Tablo 3. 3. Revers transkriptaz reaksiyon hacmi (20 µl)	57
Tablo 3. 4. cDNA sentezi için uygulanan PZR programı	58
Tablo 3. 5. PZR reaksiyonu bileşenleri (20 µl)	59
Tablo 3. 6. Kullanılan antikorlar ve sulandırma oranları	63
Tablo 4. 1. Pterijumlu hasta grublarına ait demografik veriler	65
Tablo 4. 2. E-CAD geni promotör bölgesine ait metilasyon yüzdeleri ve istatistiksel analizi	69
Tablo 4. 3. E-CAD baş ve gövde dokularına ait $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerlerinin istatistiksel analizi	74
Tablo 4. 4. E-CAD baş ve konjonktiva dokularına ait $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerlerinin istatistiksel analizi	74
Tablo 4. 5. E-CAD gövde ve konjonktiva dokularına ait $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerlerinin istatistiksel analizi	75
Tablo 4. 6. E-CAD baş ve gövde dokularına ait protein değerlerinin istatistiksel analizi	79
Tablo 4. 7. E-CAD baş ve konjonktiva dokularına ait protein değerlerinin istatistiksel analizi	79
Tablo 4. 8. E-CAD gövde ve konjonktiva dokularına ait protein değerlerinin istatistiksel analizi	79

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Pterjiyum kısımları https://www.bostoneyegroup.com/cornea-boston/pterygium/	5
Şekil 2. 2. Pterjiyum histopatolojisi (http://www.pathologyoutlines.com/)	10
Şekil 2. 3. Hücre-hücre adezyon bağlantılarının şematik gösterimi (Campbell ve ark., 2017).	29
Şekil 2. 4. Adezyon molekülleri 4 ana sınıfı (https://sites.google.com/site/chsanatomyphysiology27/home/cellular-adhesion-molecules-cam)	33
Şekil 2. 5. CDH1 geni 16. kromozom üzerindeki yerleşimi (16q22.1). https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CDH1#location	37
Şekil 2. 6. Hücre-hücre yapışmasına aracılık eden E-kaderin arayüzü	39
Şekil 3. 1. Tez çalışması genel akış şeması	45
Şekil 3. 2. DNA İzolasyonu protokol özeti şematize olarak gösterimi	48
Şekil 3. 3. ABP iQuant™ dsDNA HS Assay kiti çalışma prensibi	49
Şekil 3. 4. Metilasyon işleminin genel mekanizması	50
Şekil 3. 5. A) Metilasyona spesifik PZR genel mekanizma ve primer seçimi. B) PZR sonrası beklenen agaroz jel elektroforez görüntüleri	53
Şekil 3. 6. RNA izolasyonu protokol özeti şematize edilmesi	56
Şekil 4. 1. Pterjiyumlu hasta gruplarına ait cinsiyet dağılım grafiği	66
Şekil 4. 2. Pterjiyumlu hasta gruplarına ait dokusu alınan göz	66
Şekil 4. 3. Pterjiyumlu dokuya ait histopatolojik görüntü (H&E, X100).	67
Şekil 4. 4. E-CAD geni MSP analizi sonrası agaroz jel görüntüsü	68
Şekil 4. 5. E-CAD geni promotör bölgesi metilasyon yüzde profilinin sütun grafiği ile gösterimi (UM: Unmetile M: Metile)	70
Şekil 4. 6. ACTB genine ait amplifikasyon eğrisi	71
Şekil 4. 7. ACTB genine ait erime piki	72
Şekil 4. 8 E-CAD genine ait amplifikasyon eğrisi	72
Şekil 4. 9. E-CAD genine ait erime piki	73

Şekil 4. 10. E-CAD genine ait relatif kantifikasyon (RQ , $2^{-\Delta\Delta C_t}$) değerlerinin baş, gövde pterjiyum ve konjonktiva dokusundaki dağılımı.	76
Şekil 4. 11. E-CAD ve ACTB genlerine ait ortalama $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri.....	76
Şekil 4. 12. ACTB proteinin SDS-PAGE görüntüsü	77
Şekil 4. 13. E-CAD proteinin SDS-PAGE görüntüsü.	78
Şekil 4. 14. Baş, gövde ve kontrol pterjiyum dokularına ait E-CAD protein ekspresyon değerlerinin hata çubukları ile gösterimi.	80



KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
4-HHE	: 4-Hidroksiheksenal
4-HNE	: 4- Hidroksinonenal
6-4 PP	: 6-4 Fotofosfat
ACTB	: Aktin
AJ	: Yapışkan Kavşaklar
BFGF	: Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
CAMS	: Hücre Adezyon Molekülleri
CBD	: Katenin Bağlayıcı Bölge
CCN	: Hücre Dışı Matrikse Bağlı Proteinler
CPD	: Siklobütan Primidin Dimeri
CTGF	: Bağ Doku Büyüme Faktörü
CTN	: Katenin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
E-CAD	: E-Kaderin
ECM	: Hücre Dışı Matriks
EMT	: Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
FGF2	: Fibroblast Büyüme Faktörü 2
GSTM1	: Glutasyon S-Transferaz 1
H&E	: Hematoksilen Eozin Boyama
HOGG1	: İnsan 8- Oksoguanin Glikosilaz1
HPV	: İnsan Papilloma Virüsü
HSP	: Isı Şoku Proteinleri
Ig	: İmmünoglobülin
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGFBP-2	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein-2
IGFBP-3	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein-3

IL	:	İnterlökinler
iCAM	:	Hücreler Arası Adezyon Molekülleri
iNOS	:	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
JMD	:	Jukstamembran Bölgesi
Kb	:	Kilobaz
kDa	:	Kilo Dalton
M	:	Metile
Ma	:	Miliamper
MMC	:	Mitomisin C
MMP-2	:	Matriks Metalloproteinaz 2
mRNA	:	Mesajcı Ribonükleik Asit
MSP	:	Metilasyona Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Nf-K β	:	Nükleer Faktör Kappa Beta
NGF	:	Nörotrofik Faktör
NGF	:	Sinir Büyüme Faktörü
NO	:	Nitrik Oksit
PCNA	:	Hücre Nükleer Antijeni
PLK1	:	Polo Benzeri Kinaz 1
PUFA	:	Çoklu Doğmamış Yağ Asidi
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qRT-PZR	:	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	:	Ribonükleik Asit
RNS	:	Reaktif Azot Türleri
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
TGF-21	:	Dönüştürücü Büyüme Faktörü 21
TGF-B	:	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
TGM2	:	Transglutaminaz 2
TIMP-1	:	Metalloproteinaz-1
TJ	:	Sıkı Bağlantılar

TNF-A	:	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
TRKA	:	NGF Reseptörü
UM	:	Unmetile
UV	:	Ultraviyole
UV-B	:	Ultraviyole B
V	:	Volt
VEGF	:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGF-C	:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-C
VEGFR-2,3	:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü -2,3 Reseptörü



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Eski Yunanca’da ‘pterygion’/‘kanat’ anlamına gelen pterjiyum, kornea üzerinde limbus boyunca konjonktivanın kanat şeklinde fibrovasküler büyümesi olarak tanımlanmaktadır. Pterjiyum, korneanın ön kısmını ele geçiren baş kısmı, limbus yüzeyini içeren boyun ve sklera boyunca uzanan gövde kısmı olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Yönü korneanın merkezine bakacak şekilde horizontaldir. Baş kısmı pterjiyum oluşumunun ilk işaretidir ve bu kısım epitelce yoğundur (Anguira ve ark., 2014), ayrıca baş kısmı korneaya sıkıca, gövdesi ise zayıf olarak yapışmaktadır (Kocamış, 2005).

Pterjiyum, dünyanın pek çok yerinde görülen yaygın bir hastalık olmakla birlikte etiyolojisi hala tartışmalı bir konudur (Jaworski ve ark., 2009). Daha çok güneşli, sıcak, rüzgarlı, tozlu iklim koşullarında ve tropikal- subtropikal bölgelerde daha yaygın olduğu görülmektedir. Bu yerler ekvatorial bölgeler olup nedeni ultraviyole (UV) radyasyonuna daha yoğun maruz kalma ile ilişkilendirilmiştir (Aslankurt ve ark., 2003). Pterjiyum, erkeklerde kadınlardan iki kat daha sık görülmektedir. Bunun nedeni erkeklerin çok daha fazla dış ortamlarda bulunup güneş ışığına daha çok maruz kalmaları olarak gösterilmektedir. İki kuşak boyunca ailesel geçiş gösteren pterjiyum olguları da bildirilmiştir. Bu olguların büyük çoğunluğu sporadik olarak ortaya çıkmaktadır. Pterjiyumun düşük penetrasyonlu otozomal dominant kalıtım gösterdiği rapor edilmiştir. Ancak bu vakalarda lezyonun kalıtılmasından ziyade gözün çevresel uyarılara karşı hassasiyet oluşturmalarının neden olduğu düşünülmektedir. Pterjiyum insidansı değişik ırklarda ve mesleklerde farklılık göstermektedir (Aslankurt ve ark., 2003).

Pterjiyum semptonları arasında yanma, irritasyon, göz kızarıklığı, merkezi kornea üzerine pterjiyum dokusunun göç etmesiyle görme aksının kapanmasına bağlı olarak görmede azalmanın oluşması ve düzensiz astigmatizm bulunmaktadır (Riau ve ark., 2011). Aynı zamanda korneada damarlanma, doku dejenerasyonu, hipertrofi, hiperplazi, yabancı cisim batma hissi, göz kuruluğu gibi olgularda görülmektedir (Fang, 2013). Pterjiyum görmeye engel olabildiği gibi, kozmetik olarak da kabul edilemez olabilmektedir. Ameliyat sonrası nüks pterjiyum olguları, ilk büyümedekinden çok daha agresif olabilmektedir. Pterjiyum ile ilgili yapılan çalışmalara rağmen, hastalığın patogenezi tam olarak açıklanmamış olup, ameliyat sonrası, pterjiyum oluşumunun ve nüks durumunun önlenmesi henüz başılamamıştır (Anguira ve ark., 2014). Pterjiyum yüksek derecede vasküler bir doku olarak karakterize edilmektedir. Bu yüzden anjiyogenezin pterjiyumda muhtemel bir rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca pterjiyumun aşırı duyarlılık reaksiyonları, artan fibroblastik proliferasyon ve Bowman membranını çevreleyen doku boyunca kornea içine fibroblastların subkonjonktival invazyonu sonucu olduğu öngörülmektedir. Aynı zamanda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, kollojen ve elastik fibrillerin dönüşümüyle hücre dışı matriksin (ECM) aşırı derecede ekspresyonu da katkıda bulunan faktörler arasındadır (Fang, 2013). Ayrıca son yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre, pterjiyumun pre-maling özelliklere sahip bir kök hücre hastalığı olduğuna dair kanıtlar da bulunmuş olup pterjiyum patogenezinde epitelyal-mezenşimal değişimlerin (EMT) anahtar bir rol oynayabileceği ifade edilmiştir (Engelsvold ve ark., 2013).

E-Kaderin, klasik kaderinler ailesinin bir üyesidir. Kaderinlerin, embriyonik gelişim ve genç doku homeostazının sağlanmasında çok önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Hücre membranına bağlı halde bulunan bu proteinler, kalsiyum bağımlı

hücre adezyon molekülleri olarak çalışırlar ve hücre bağlantılarının oluşmasına aracılık ederler. Özellikle E- Kaderin, yapışkan kavşakların (AJ) integral bileşeni ve epitelyal fenotipin oluşmasını sağlayan temel organizatörlerdir. E-kaderinin sitoplazmik kuyruğu, çeşitli kateninler (α , β ,p120) ile bağlantılıdır ve bu kateninler de sito-iskelet ile bağlantılı olup, aşağı yönlü sinyal etkileşimlerinin oluşmasına aracılık eder. Bu sinyal yollarına Hippo, Wnt, TGF β ve daha birçok büyüme faktörü sinyal yolları dahildir (Mendonsa ve ark., 2018).

E-kaderin ekspresyonunun azalmasının, hücre adezyonunun kaybına, tümör büyümesi ve proliferasyonuna neden olarak metastaza yol açtığı bilinmektedir. Düşük E-Kaderin ekspresyonu birçok çalışmada, çeşitli malignitelerle birlikte tümör ilerlemesini arttırdığı ve hastalığın sürecini hızlandırdığı rapor edilmiştir (Andriescu ve ark., 2018) .

Pterjiyum patolojisi henüz tam olarak bilinmeyen en tartışmalı oküler hastalıklardan birisidir. İyi huylu lezyon olarak tanımlanmasına rağmen, oküler yüzeydeki epiteliyal ve fibrovasküler aşırı büyüme proliferatif, invaziv ve yüksek derecede vaskülerleşmiş mikroskobik oluşumlara sahip olması nedeniyle tümör oluşumuna benzer davranışlar göstermektedir. E-kaderin, bitişik epitel hücrelerinin yapışmasında anahtar bir moleküldür ve onun inaktivasyonu veya ifadesinin azalması tümör oluşumu ve metastazında önemli bir tetikleyici olmaktadır. Bu bağlamda çok iyi bilinen bir tümör supresör gen olan E-kaderinin tümör oluşumuna benzer davranışlar gösteren pterjiyum ile olan ilişkisini değerlendirdik. Çalışmamızda E-kaderinin promotör metilasyonu, ekspresyonu ve protein ifade düzeyleri analiz edildi.

2. GENEL BİLGİLER

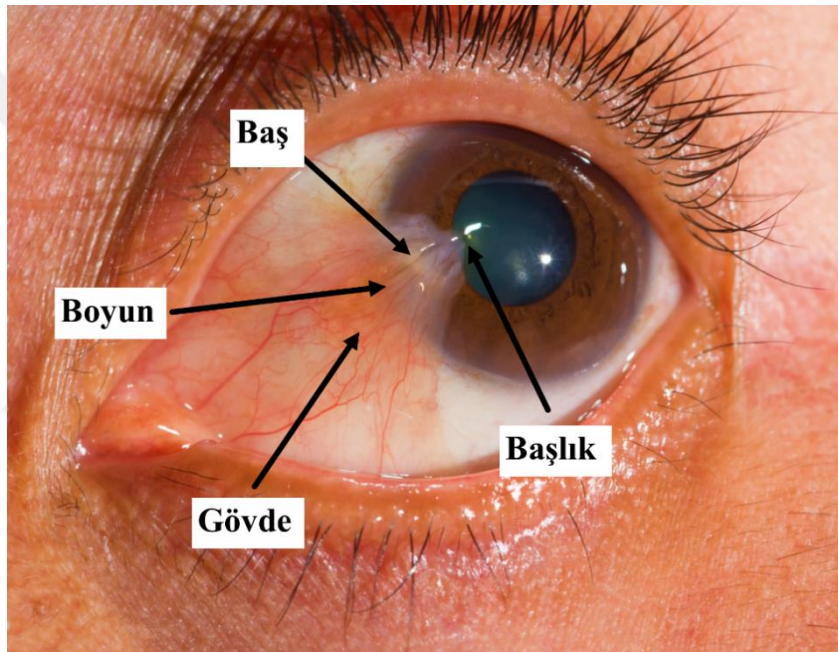
2.1. PTERJİYUM

2.1.1 Pterjiyum tanımı ve tarihçesi

‘Pterygion’ kelimesi, Yunanca ‘pteron’ (kanat, tüy) ve ‘pteryx’, ‘pterigos’ (kanat, kuş, palet) sözcüklerinden köken almaktadır. Öyleki bu iki kelimededen, pterygoid (kemik ya da kanat şekilli obje), pterodactyl ve pterosaur (parmak arası membranlı soyu tükenmiş sürüngenler, yarasaya benzer), pteropus (uçan köpek), helicopter helisler tarafından havada asılı kalan bir tür uçak), hemipteran (ön kanatlarının yarısı sert yapılı böcek) gibi modern yani günümüzde de kullanılan birçok yeni sözcüğün son bilimsel literatüre girmesine kaynak oluşturmuştur (Murube, 2007).

Eski Yunanlılar, pteryx- köküne –ion ekini takarak pterygion yani küçük kanat sözcüğünü oluşturdular. Türetilmiş pterygion kelimesi Hipokrat tarafından, ayrıca küçük bir kanata benzer olması nedeniyle korneanın konjonktival istilasına atıfta bulunmak için kullanılmıştır (Hippocrates of Kos. Predictions II. V-IV century BC). Tarih boyunca, Roma imparatorluğu döneminde bilim dili dahil kullanılan birçok kelime Yunancadan girmiştir. Bunların arasında, korneanın lateral kısımlarında trigonal konjonktival büyüme olarak anılan pterygion kelimesi de vardı ve Romalılar, Yunan kökenli pteryx- sözcüğünü alıp, birçok Latin küçültme eklerinden birini (-elus, -olus, -ulus, -culus) eklemek yerine pterygion terimini tam olarak aldı ve pterygium olarak Latinleştirdiler. Kelimenin çoğul halini, –a eki getirilerek pterygia ifadesini almıştır. Orta ve Güney Avrupa, Batı Asya ve Kuzey Afrika’nın Romalılaşması ile birlikte Latince geniş karalara yayılmış ve ptergyium kelimesi de farklı ülkelerde farklı dillere bu şekilde yerleşmiştir (Murube, 2007; 2008).

Pterjiyum, konjonktivanın kornea üzerine, limbus boyunca kanat şeklinde fibrovasküler büyümesi olarak tanımlanmaktadır (Bai ve ark., 2010). Pterjiyum, baş, boyun ve gövde olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Baş kısmı, korneanın ön yüzeyi boyunca, boyun kısmı, limbus yüzeyi boyunca ve gövde kısmı ise, sklera boyunca uzanmaktadır. Pterjiyum oluşumunun ilk işareti, ‘cap’ yani başlık kısmının oluşumudur ki pterjiyumun baş kısmının hemen ön tarafında halelenmeyle kendisini gösterir ve bu kısım epitelce oldukça yoğundur (Anguria ve ark., 2014).



Şekil 2. 1. Pterjiyum kısımları <https://www.bostoneyegroup.com/cornea-boston/pterygium/>

Pterjiyum görmeyi bozabilir ya da görüş alanını engelleyebilir, ayrıca kozmetik olarak da rahatsız edici olabilmektedir. Ameliyat sonrası nüks pterjiyum olguları, primer büyümeyle kıyasla daha agresif olabilmektedir. Pterjiyum patogenezi henüz tam olarak bilinmediği için, pterjiyum oluşumu ve ameliyat sonrası nüks oluşumunu engellemeyle ilgili problemler halen devam etmektedir (Islam ve Wagoner, 2001; Eze, 2013; Anguria ve ark., 2014).

2.1.2 Pterjiyum epidemiyolojisi

Pterjiyum, kornea üzerinde sub-konjonktival ve fibrovasküler bağlantılı dokuların kontrolsüz bir şekilde hücre çoğalmasıyla sonuçlanabilen aynı zamanda, hem inflamatuvar hem de dejeneratif süreçleri ihtiva eden bir göz hastalığıdır (Kormanovski ve ark., 2014). Epidemiyolojisi açısından, daha çok güneş, sıcak, rüzgar, ısı, toz, ve atmosferdeki diğer partüküller, immünolojik mekanizmalar, hücre dışı matriks yapılanması, büyüme faktörleri, sitokinler, apoptozis ve anjiyogenesizi içine alan düzenlemeler de dahil birçok fiziksel ve biyolojik faktörün pterjiyum patogenezi ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Son yıllarda, artan kanıtlar ise, pterjiyum gelişiminde genetik faktörlerin önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Rodrigues ve ark., 2008; Peng ve ark.,2014; Hu ve ark., 2018).

Pterjiyum, Dünya çapında çok yaygın görülen bir hastalık olup, prevalansı (%5-%15), ekvatorun 30° kuzey ve 30° güneyindeki özellikle ‘pterjiyum kuşağı’ olarak bilinen tropikal bölgelerde en yüksektir (Singh, 2018). Ultra-viyole ışığına maruz kalmak doğrudan hastalık oluşumu ile güçlü bir bağlantı oluştururken, hastalığın etiyolojisi hala tam olarak aydınlatılamamıştır (Young ve ark., 2018). Pterjiyum, 15 yaş altında nadiren görülür ve yaşla birlikte insidansı artmaktadır. Dünya genelinde popülasyonun %7–13’ünü etkilemektedir (Bai ve ark., 2010). Pterjiyum insidansı değişik ırklarda ve mesleklerde farklılık göstermektedir. Pterjiyum prevalansının Avustralya’da % 3, ABD’de siyahlarda % 23, Çin’de Tibet’te % 15, Çin’de Moğollarda % 18, Japonlarda % 30 ve Singapur’lu Çin ve Hintlilerde % 7 olduğu bildirilmektedir (Singh, 2018). Ülkemizde yapılan bir çalışmada, bu oranın %7,8 olarak bulunmuştur. Özellikle pterjiyumun, güneşe açık alanlarda çalışan meslek gruplarında daha yaygın olduğu saptanmıştır. Türkiye’de yapılan bir çalışma da bu görüşü destekler nitelikte olup, ev

hanımı, memur, çiftçi ve tarım işçilerini de kapsayan farklı meslek gruplarıyla ilgili pterjiyum açısından değerlendirme yapılmış ve çıkan sonuçlara göre, çiftçi ve tarım işçilerinde pterjiyum görülme oranının daha sık görüldüğü tespit edilmiştir. Bu durum ise, çiftçi ve tarım işçilerinin diğer meslek gruplarına oranla, daha çok güneş ışığı mağduriyeti ve toz, kum, güneş gibi pterjiyum açısından risk faktörleriyle daha sık bir arada bulunmalarından kaynaklandığı bildirilmiştir (Gümüş ve Yaşar., 2013). Pterjiyum, erkeklerde kadınlara oranla iki kat daha sık görülmektedir. Bunun nedeni erkeklerin çok daha fazla dış ortamlarda bulunması ve güneş ışığına daha çok maruz kalması olarak düşünülmektedir (Aslankurt ve ark., 2003). Çin’de yapılan birkaç çalışmada bu durumun aksi yönünde sonuçlar bulunmuş olup, kadınlarda pterjiyum gelişimi erkeklere oranla daha riskli bulunmuştur. Bunun nedeni ise, Tibet bölgesinde kadınların dış ortam mesleklerinde çalışıyor olmaları ve koruyucu yöntem olarak güneş gözlüğü takmıyor olmaları gösterilmiştir. Aslında bu durumun, cinsiyetle alakalı değil de daha fazla güneş ışığı mağduriyetine bağlı gerçekleşen olaylara ilişkili olarak pterjiyum gelişimin ortaya çıktığını görmekteyiz (Anbesse ve ark., 2017).

Pterjiyum, bulbar konjonktivadan kornea üzerine doğru üçgen şekilli anormal doku oluşumuyla karakterize edilen yaygın bir fibrovasküler oküler yüzey hastalığıdır. Hastalığın tutulumu gözde tahriş, kızarıklık ve görme kayıpları ile kendini gösterir. Örneğin, pterjiyum dokusu yön olarak gözün görme ekseninden merkezi korneaya doğru göç etmektedir ve çok geniş pterjiyum alanlarının oluşması durumunda görüş yüzeyi kapanarak görme kayıplarına neden olabilmektedir. Ayrıca düzensiz astigmatizm ve bozulmuş gözyaşı filmi içeriği gibi birçok hayat kalitesini bozabilen faktörler pterjiyuma bağlı olarak indüklenmektedir (Riau ve ark., 2011).

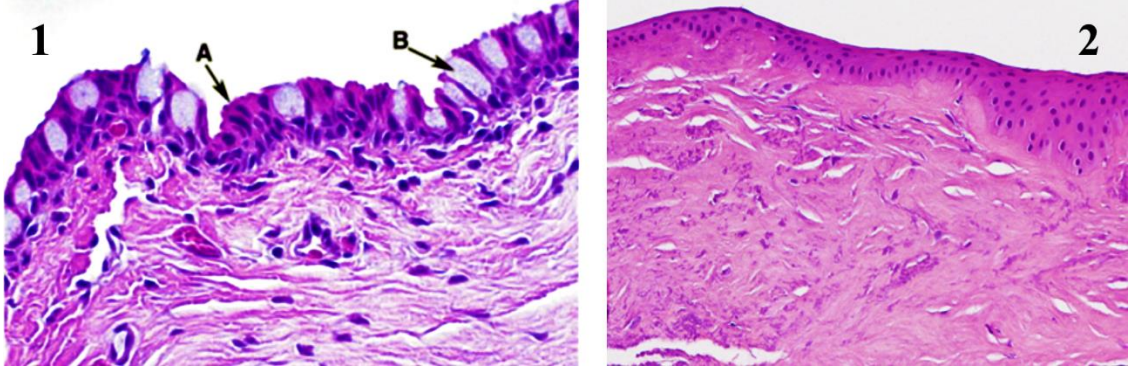
Pterjiyum nispeten iyi huylu bir oluşumdur. Ancak, çıkarıldıktan sonra, agresif nüks ve lokal olarak invazivlik, in situda hafif displaziden kansere kadar çeşitli derecelerde anormallikler ve tümör benzeri özellikler göstermesi hastalığın, neoplastik benzeri bir büyüme bozukluğu olarak anılmasına sebep olmuştur. Nitekim, birçok araştırmacı tarafından da yapılan çalışmalar sonucu preneoplastik lezyonların, pterjiyum ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Perra ve ark., 2006; Chui ve ark., 2011). Pterjiyumun patogenezinde, hücre dışı matrisin yapılanması, enflamatuar süreç, anti-apoptotik mekanizmalar, sitokinler, büyüme ve anjiyojenik faktörler, viral enfeksiyon, oksidatif stres, hipoksik-iskemik yaralanma, epiteldeki anormal farklılaşma ve yara iyileşmesindeki bozukluklar gibi birçok nedensel ajanın sebep olduğu faktörler önerilmiştir. Bununla birlikte, pterjiyumun ultraviyole radyasyonu ile ilişkili bir hastalık olduğu da çok iyi bilinmektedir. Uzun bir süredir, pekçok araştırmacı tarafından pterjiyum kronik dejeneratif büyüme bozukluğu olarak kabul görmekteydi ancak epitelde p53 geninin aşırı ekspresyonunun keşfi şimdilerde hastalığın UV-ilişkili bir tümör olarak anılmasına neden olmuştur. Patogenezi çok faktörlü gibi görünse de, kronik inflamasyon, anjiyogenez ve kontrolsüz hücre çoğalması pterjiyum patogenezinde önemli bir role sahiptir (Maxai ve ark., 2017).

Günümüzde pterjiyum ile başa çıkmanın en etkili yolu ameliyattır ancak bu işlem sonrası nüks vakaları yaygın gözükmemektedir. Bu nedenle tedaviye yönelik stratejilerin geliştirilmesi için, pterjiyumun proliferasyonu, apoptozu ve fibrozunun da dahil olduğu moleküler mekanizmaların incelenmesi kritik bir öneme sahiptir (He ve ark., 2019). Pterjiyum cerrahisi, ameliyat sonrası komplikasyonları ve özellikle primer nüks vakalarını azaltmak amacıyla son 50 yılda çok fazla ilerleme kaydetmiştir. 2016 yılı meta-analizlerine göre, şu anda en popüler olan iki teknik-limbal konjonktival otogreft ve

amniyotik membran greftleme, incelenmiş olup, 6 aylık nüks oranlarının daha düşük çıkması sebebiyle konjonktival otogreftlemenin daha üstün olduğu saptanmıştır (Clearfield ve ark., 2016). Cerrahlar, nüks oranlarını daha da azaltmak için konjonktival otogreft varyasyonlarını kullanmaktadırlar. 2011 yılı meta-analiz raporlarına göre, daha düşük nüks oranlarına göre konjonktival otogreftlemede fibrin ile yapıştırmanın dikiş atmaktan daha üstün olduğu saptanmıştır (Pan ve ark., 2011). Bu bilgilere ek olarak, ilave mitomisin C (MMC) kullanımı ile nüks oranının daha da düştüğünü gösteren bir dizi randomize kontrol çalışmaları da mevcuttur. Şu an için pterjiyum cerrahisinde kullanılan en yaygın teknik, limbal konjonktival otogreft tekniği olup ameliyat esnasında ilave MMC kullanımı ve fibrin ile yapıştırma çarpıcı bir şekilde nüks oranını düşürmektedir (Frucht-Pery ve ark., 2006; Hwang ve ark., 2018).

2.1.3 Pterjiyum Histo-Patolojisi

Pterjiyum, burun limbusunda, görmeyi engelleyen, iltihaplanmaya neden olan ve kozmetik görünümü etkileyen, kanat benzeri bir şekil ile karakterize edilen oküler bir yüzey bozukluğudur. Pterjiyum oluşumunun histopatolojisinde, asıl neden limbal kök hücre dejenerasyonu ve Bowman tabakasının çözünmesi yatmakta olup, bunlara aktif fibroblast büyümesi, neovaskülarizasyon, hücre dışı matrisin aşırı çoğalması ve iltihaplanma eşlik etmektedir (Chui ve ark., 2008; Sun ve Zhang., 2018).



Şekil 2. 2. Pterjiyum histopatolojisi (<http://www.pathologyoutlines.com/>)

Şekil 2.2. 1-) normal konjonktiva histopatolojisi 2-) pterjiyum histopatolojisi. (A) silindirik epitel hücreleri; (B) goblet hücreleri. H&E: hematoxilen eozin boyama. (X200).

Şekil 2.2’de normal konjonktiva ve pterjiyum dokusunun morfolojilerinin birbirinden çok farklı olduğu görülmektedir. Normal konjonktiva histopatolojisi çok katlı düzgün sıralı epitel hücre tabakasından oluşmaktadır ve bu hücreler arasına düzenli bir şekilde goblet hücreleri yerleşmiştir (Maggs., 2008). Bu tabakanın altında ise az sayıda damarlanma gözlenmektedir. Pterjiyum histopatolojisinde ise, konjonktivital displastik görüntü, organizasyonu bozulmuş artmış epitel hücre kalınlığı ve polarite kaybı, goblet hücresi kaybı, konjonktivital stromada görülen yoğun damarlanma, kümelenme, fibrosiz ve elastik dejenerasyon (Bowman tabakasında elastik liflerin fibrovasküler büyümesi), buna bağlı olarak görünen kıvrımlı ve parçalı liflerle dejenere amorf bir birikinti gözlemlenmektedir (Kato ve ark., 2007; Turan ve Turan., 2019; Chui ve ark., 2008; Serra ve ark., 2018; Nassar ve ark., 2014).

2.1.4. Pterjiyum Etiyo-Patogenezi

Gözde oluşabilecek patolojik şartlara bağlı olarak, diğer göz hastalıklarına oranla insan pterjiyumu en tartışmalı göz hastalıklarından birisidir (Eze ve ark., 2011). Pterjiyumun patoloğlar tarafından iyi huylu lezyon olarak sınıflandırılmasına rağmen, göz yüzeyinde oluşan bu epitelyal ve fibrovasküler büyüme proliferatif aynı zamanda invaziv olup, yüksek derecede damarlanmış mikroskobik oluşumlara sahiptir (Bradley ve ark., 2010). Dahası, tekrar eden davranışlar sergilemesi insan pterjiyumunun açıklanamayan özellikleri arasında yer almaktadır.

Pterjiyum etiyojisi, UV hasarı, gözde kuruluk, çevresel toz kirleticiler gibi pekçok faktörü içeren geniş bir skalaya sahiptir (Cimpean ve ark., 2013). Pterjiyum, inflamasyon, anjiyogenesis, hücre proliferasyonu, fibrosis, konjonktivadaki ECM'de bozulmalar ve artan bir şekilde korneal istila ile karakterize edilmektedir (Soloman., 2006; He ve ark., 2019). Özellikle pterjiyumun patogenezi açısından en güçlü kanıtlar UV- aracılı limbal hasar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Ayrıca, anormal yara iyileştirme mekanizmaları, genetik kararsızlık, kök hücre bozuklukları, metabolik hastalıklar ve nöronal bozukluklar gibi birçok faktör pterjiyum açısından diğer sebepler arasında gösterilmiştir (Riau ve ark., 2011). Özetle, pterjiyum, multifaktöriyel bir hastalık olup, çeşitli çevresel ve genetik faktörlerin etkisinde kalmış, geniş bir etiyo-patogenik skalaya sahip yaygın görülen bir oküler yüzey hastalığıdır. Yani hastalığın oluşumundan tek bir mekanizma sorumlu değil, bir den fazla mekanizmanın birbirleri ile ortak etkileşimleri sonucu hastalık klinik olarak ortaya çıkmaktadır (Liu ve ark., 2013). Bununla birlikte, çeşitli faktörler tarafından indüklenen pterjiyumun, patogenezi hala tam olarak bilinmemektedir (Feng ve ark., 2017). Pterjiyum patogenezi ile alakalı çok sayıda etkili faktör tanımlanmış olup, bunlar hastalığın oluşumunda ve gelişiminde farklı fonksiyonlar

görmektedirler. Hastalığa sebep olan faktörlerin ve moleküler mekanizmaların aydınlatılması, hastalığın patogenezi açısından çok büyük önem arz etmektedir.

Pterjiyuma neden olan faktörler aşağıda verilmiştir:

2.1.4.1. UV ışını

Pterjiyum oluşumu ile ultraviyole radyasyonu arasında güçlü bir bağlantı olup, güneşe maruz kalmanın pterjiyum prevalansını daha da arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu tip bir radyasyon, hücrelere zarar verme potansiyeline sahiptir ve iki mekanizma yoluyla dokuları değiştirebilir; ilk olarak hücresel DNA üzerine doğrudan fototoksik etkiler ile, ikincisi ise, hücresel DNA, proteinler ve lipitlere zarar veren reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi yoluyla olmaktadır (Kau ve ark., 2006; Balcı ve ark., 2011) Küçük dalga boyları özellikle 300 nm'nin altında olanlar biyolojik olarak en aktif formlar olup, çoğunlukla kornea tarafından emildiği bilinmektedir. 280 ve 315 nm arasında değişen UV-B radyasyon dalga boyları görme alanını etkiler ve UV'ye maruz kalma seviyesiyle doğrudan ilişkilidir. UV-B radyasyonu, oksidatif stres oluşturma kapasitesi nedeniyle pterjiyum oluşumundan sorumlu ana faktör olarak kabul edilmektedir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). UV-B'ye maruz kalma, pterjiyum büyümesinde rol alan birçok potansiyel molekülün yukarı regülasyonuna yol açarak, 8-hidroksideoksiguanozin varlığı saptanmış ki bu molekül, DNA'daki oksidatif hasarını tanımlamak için yaygın olarak kullanılan bir marker olarak bilinmektedir. 8-hidroksideoksiguanozini metabolize eden enzim olan insan 8-oksoguanin glikosilaz 1'in (hOGG1) bu dokularda yukarı yönde düzenlediği kaydedilmiştir. Bu bilgilere ek olarak, insan 8-oksoguanin glikosilaz 1'deki bazı polimorfizmlerin pterjiyum riskini arttırdığı gösterilmiştir (Bradley ve ark., 2009). Cimpean ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada

primer pterijyum fibroblastlarında, endotelyal hücrelerde ve nüks pterijyum fibroblastlarında timin dimerlerinin varlığını tespit etmişlerdir (Cimpean ve ark., 2013). UV radyasyonun bazal epitelyal hücrelerin modifikasyonuna sebep olarak insan pterijyumunda invazyona ve özellikle reküren pterijyum olgularının oranını arttığı görüşü benimsenmiştir. Bu görüşü destekler nitelikte, primer pterijyumlu örneklerin epitellerinde kümelenmiş hücrelerde çok yüksek miktarlarda timin dimerleri tespit edilmiştir (Chui ve ark., 2011). Ayrıca, DNA tarafından UV-B radyasyonun doğrudan emilimi, iki tip sarmal çıkış gösteren fotolezyonların üretimine yol açmaktadır: Bitişik pirimidinler arasında oluşan siklobutan pirimidin dimerleri (CPD) ve 6-4 foto fosfat ürünleri (6-4PP), bunlar da DNA replikasyonu sırasında C'den T'ye ve CC'den TT'ye dönüşümle sonuçlanabilir. CPD'ler, memeli hücrelerinin UV-B radyasyonu tarafından üretilen mutasyonların yarısından fazlasıyla ilişkilidir ve UV ışığına maruz kaldıktan sonra sadece oküler ön bölmenin yapılarında bulunmuşlardır (Beukers ve ark., 2008; Besaratinia ve ark., 2011; Mesa ve ark., 2013; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

2.1.4.2. Oksidatif stres

Serbest radikaller, süperoksit radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini (ROS) içeren oldukça kararsız moleküllerdir. Ayrıca, ROS'lar normal metabolizmanın bir yan ürünü olarak üretilen nitrik oksit (NO) gibi reaktif azot türlerini (RNS) de içermektedirler (Elahi ve ark., 2007). ROS'lar DNA, lipitler ve proteinlerle kimyasal olarak reaksiyona girerek DNA hasarına, lipit peroksidasyonuna ve protein yapısında değişikliklere yol açmaktadırlar (Cejkova ve ark., 2004). Oksidatif stresin yaşa bağlı katarakt, maküler dejenerasyon, glokom ve keratokonus gibi bir dizi oküler süreçte yer aldığı bilinmektedir (Truscott , 2005; Algvere ve ark., 2006; Izzotti ve ark., 2006; Chui ve ark., 2008).

UV-B radyasyonunun bir sonucu olarak oluşan ROS, hücresel zarlarda lipid peroksidasyonuna neden olma potansiyeline sahiptir, böylece reaktif aldehydler 4-hidroksiheksenal (4-HHE) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) dahil olmak üzere çeşitli bileşiklerde çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA'ların) dejenerasyonunu teşvik edebilirler. Bu moleküllerin, pterijyum oluşumunun ön tarafında korneal göçün olduğu yer olan baş kısmı ve sub-epitelyal bağ dokuların aktif çoğalmasının meydana geldiği yer olan gövde kısmı da dahil pterijyum örneklerinin tamamında miktarlarının arttığı bulunmuştur. 4-HHE ve 4-HNE, histidin, sistein ve lizin kalıntıları ile reaksiyona girerek proteinleri değiştirme ve normal işlevlerini etkileme potansiyeline sahiptirler. Bu gibi protein modifikasyonlarının normal konjonktivaya kıyasla pterijyum dokusunda daha belirgin olduğu bulunmuştur (Tanito ve ark., 2006; Sano ve ark., 2013).

Pterijyum patogenezinde oksidatif stresin rol oynayabileceğini gösteren çok sayıda kanıt vardır. Oksidatif stresin keratokonusta, matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) aktivitesini arttırdığı ve metalloproteinaz inhibitör 1'i (TIMP-1) azalttığı gösterilmiştir (Brown ve ark., 2004). Lee ve arkadaşları pterijyum epitelyumunda artmış indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve NO bildirmişlerdir (Lee ve ark., 2001). Aksine Özdemir ve arkadaşları konjonktivaya göre bütün pterijyum dokusunda antioksidan süperoksit dismutaz ve NO düzeylerinde azalma olduğunu bildirmişlerdir (Özdemir ve ark., 2005).

2.1.4.3. Büyüme faktörleri

Büyüme faktörleri, hücre büyümesini uyaran moleküllerin bir tipi olup, hücre döngüsünde mitozu ve proliferasyonu teşvik etme kabiliyetindedir. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), sinir büyüme faktörü

(NGF) ve bağ doku büyüme faktörü (CTGF) gibi birçok büyüme faktörünün pterjiyumla ilişkili olduğu bulunmuştur (Di Girolamo ve ark.,2004). İlk olarak VEGF, oküler hastalıklarda en önemli büyüme faktörlerinden biridir. VEGF ailesi, göz hastalıklarında, patolojik anjiyogenezi kontrol eder ve vasküler geçirgenliği arttırmaktadır (Witmer ve ark., 2003). Normal konjonktiva ile karşılaştırıldığında, pterjiyum dokusunda, VEGF ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR)-2,3 daha yüksek seviyelerde bulunmuştur (Gümüş ve ark., 2014). Gharace ve arkadaşları atopik pterjiyumlu hastalarda atopik olmayan bireylere oranla VEGF mRNA ekspresyon seviyelerini çok daha yüksek bulmuşlardır (Gharace ve ark., 2014). VEGF-C mRNA seviyesinin artması, muhtemelen pterjiyumda lenfanjiyogeneze yol açmaktadır ve özellikle nüks pterjiyum üzerinde çok daha etkili olabilmektedir. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda, tümör nekroz faktörü alfa'nın (TNF- α) VEGF-C ekspresyonuna aracılık ettiği saptanmıştır. Artmış VEGF'nin ekspresyonu, konjonktiva hücrelerinin normal metabolizmasını etkileyerek, bunların pterjiyum hücreleri haline dönüşmesine neden olabilecek mekanizmalar olan anjiyogenez ve lenfanjiyogeneze yol açabilmektedir (Dong ve ark., 2016; Hoyama ve ark., 2015). Dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β) fibroblast proliferasyonu, anjiyogenez, kontrollü sentez, kollajen ve fibronektin gibi matris proteinlerinin degradasyonu dahil olmak üzere, hem doku tamiri hem de hastalık için ortak olan birçok işlemi düzenlemektedir (Govinden ve ark., 2003). Zhong ve arkadaşları normal bulbar konjonktival dokulara oranla pterjiyumda, TGF- β 1 ve TGF- β 2'nin yukarı düzenlenmesi, dönüşüm büyüme faktörü-beta reseptörü 1, 2 (TGFR- β 1, - β 2) aşağı yönde düzenlendiğini bulmuşlardır (Zhong ve ark., 2009). Bianchi ve arkadaşları TGF- β seviyelerinin, pterjiyumun epitelial ve stromal katmanlarında orta derecede, normal konjonktivada ise, zayıf bir şekilde eksprese olduğunu tespit etmişlerdir (Bianchi ve

ark.,2012). Fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF2) olarak da bilinen bFGF, anjiyogenez, yara iyileşmesi ve çeşitli endokrin sinyal yollarına katılmaktadır. bFGF ekspresyonunun, pterjiyum mast hücreleri, epitel ve kan damarlarında arttığı bulunmuştur, ayrıca mast hücrelerinin ek bir bFGF kaynağı olarak işlev görebileceği ileri sürülmüştür (Zhong ve ark.,2001). Detorakis ve ark., yaptıkları bir çalışmada FGF2'nin mRNA seviyesini qRT-PCR tekniği kullanarak ölçmüşlerdir ve normal konjonktivaya göre pterjiyumda daha yüksek FGF2 eksprese edildiğini bulmuşlardır (Detorakis ve ark., 2010). Hücre mitozunu teşvik edebilen, hücre proliferasyonunu uyarabilen ve apoptozu inhibe edebilen IGF, pterjiyumun büyümesine katkıda bulunmaktadır (Wit ve Walenkamp., 2013). Solomon ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmaya göre, insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-2'nin (IGFBP2) pterjiyum cisim fibroblastlarında aşırı eksprese olduğunu bulmuşlardır (Solomon ve ark., 2003). Bununla birlikte, insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3 (IGFBP3), pterjiyumda normal konjonktivaya kıyasla önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. IGFBP3'ün aşağı yönde düzenlenmesi yakın bir şekilde kanser oluşumu ile ilgilidir. Başka bir deyişle, IGFBP3'ün düşük seviyeleri, kontrol dışı hücre çoğalması ile ilgili olabilir ki, aşağı yönde düzenlenen IGFBP3 muhtemelen pterjiyumun devam eden büyümesiyle bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Yu ve ark., 2000). Bir nörotrofik faktör olan NGF, esas olarak belirli hücrelerin büyümesini, çoğalmasını ve hayatta kalmasını düzenlemektedir. NGF ekspresyonun, pterjiyum epitelinde, fibroblastlarında ve vasküler endotel hücrelerinde güçlü iken, normal konjonktiva epitelinde ve fibroblastlarında zayıf olduğu ölçülmüştür (Zhao ve ark., 2008). Artmış NGF ve TrkA (NGF reseptörü) seviyeleri pterjiyum vaskülarizasyonunu hızlandırdığı görülmüştür. Hücre adezyonu, migrasyonu ve kemotaksisinde rol oynayan bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF), hücre dışı matrikse bağlı (CCN) protein ailesine aittir. Yapılan

bir çalışmada, CTGF pterjiyum epitelinde bulunmuştur, normal konjonktivada ise olmadığı tespit edilmiştir. Bu yüzden, muhtemelen normal konjonktivada bulunmayan CTGF ekspresyonu sadece pterjiyumda gözlenmiştir (Van Setten ve ark., 2003).

2.1.4.4. Matris metalloproteinazlar (MMP) ve doku inhibitörleri metalloproteinazlar (TIMP)

MMP'ler, çok sayıda hücre dışı matriks süreçlerinde veya bozunmalarında rol oynayan, hücre yüzeyi enzimlerinden oluşan ve 25'in üzerinde salgılanan çok genli yapıya sahip bir ailenin üyesidirler (Sternlicht ve Werb., 2001). Pterjiyum ile bu protein (MMP) grubu arasındaki ilişki, pterjiyumun patogenezi için uzun zamandır bir odak noktası olmuştur. MMP-1, MMP-2, MMP-3, TIMP-1 ve TIMP-3 pterjiyum dokularında ve kültüre edilmiş pterjiyum epitelyal hücrelerinde ve fibroblastlarında konjonktivaya kıyasla artan miktarlarda saptanmıştır (An ve ark., 2011). Siak ve arkadaşları TNF- α 'nın pterjiyum fibroblastlarındaki nükleer faktör kappa B (NF- κ B) yolunu aktive ettiğini, böylece MMP-1, MMP-2 ve MMP-3'ün ekspresyonlarının yukarı yönde düzenlendiğini bulmuşlardır. Hücre dışı sinyal ilişkili kinaz 1/2 mitojenle aktive edilen protein kinaz hücre içi yolu, pterjiyumda MMP-1 ekspresyonunun UVB indüksiyonunda rol oynadığı tespit edilmiştir (Siak ve ark., 2011). Yao ve arkadaşları MMP-3 ve MMP-8 seviyelerinin pterjiyumda normal dokuya kıyasla daha yüksek ifade edildiğini göstermişlerdir (Yao ve ark., 2006). Çok sayıda çalışmada, MMP-9 ve MMP-10'ların pterjiyum oluşumuna katkıda bulunduğu, TIMP'lerin pterjiyum invazyonunu inhibe ettiği görülmüştür. Pterjiyum hücreleri tarafından üretilen MMP'ler, Bowman tabakasını çözme yeteneğine sahiptir ve bu da stromal fibroblastların uyarılarak büyümesine yol açmaktadır (Reid ve ark., 2010). MMP'lerin ve TIMP'lerin ekspresyonu pterjiyumun oluşumunun farklı aşamalarında değişmektedir. Bu iki molekül arasındaki

dengeinin, pterjiyum progresyonundan ve nüks oluşumundan sorumlu olabilecekleri düşünülmektedir (Feng ve ark., 2017).

2.1.4.5. İnterlökinler

İnterlökinler (IL) ilk kez beyaz kan hücreleri tarafından eksprese edildiği görülen salgı proteinleri ve sinyal moleküllerinin bir grubunu oluşturmaktadır. Beyaz kan hücreleri inflamasyon yani iltihaplanma sürecinde hayati rol oynamaktadırlar. Bu yüzden IL'lerin pterjiyum oluşumu ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir (Brocker ve ark., 2010). IL-1 ailesi proteinlerinin artan seviyelerinin, sadece pterjiyumlu hücrelerde mevcut olduğu ortaya çıkmıştır. Benzer şekilde Huang ve arkadaşları IL-1α'nın sadece primer pterjiyumda değil aynı zamanda nüks pterjiyumda da daha yüksek ifade edildiğini bulmuşlardır (Huang ve ark., 2010). Önemli pro-enflamatuar sitokinler olan IL-6 ve IL-8 proteinleri, pterjiyum epitelinde normal kornea, konjonktiva ve limbus ile karşılaştırıldığında güçlü bir şekilde eksprese edildikleri görülmüştür. IL-17 seviyesinin son zamanlarda pterjiyum, iltihaplı genç konjonktival nevüs ve oküler demodikoz gibi oküler yüzey enflamatuar patolojilerinde, yukarı yönde düzenlendiği bulunmuştur (Jabarin ve ark., 2016).

2.1.4.6. Çoğalma ile ilişkili proteinler

Ki-67, çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA) ve siklin D1 gibi çoğalma ile ilişkili proteinler, hücre büyümesi sürecinde önemli roller oynamaktadırlar. Pterjiyumun en karakteristik özelliklerinden biri çoğalmadır ve bu nedenle çoğalma ile ilgili proteinlerin bu hastalığın patogenezinin anlaşılması açısından aktif olarak çalışması çok önemlidir (Feng ve ark., 2017). Genel olarak, çoğalma için bir hücresel belirteç (markör) olarak bilinen Ki-67 proteininin ifadesi, pterjiyumun proliferatif doğasını destekler nitelikte hem

primer hem de nüks pterjiyumda arttığını gösterilmiştir (Konuk ve ark., 2011). Ki-67 oküler malign tümör için duyarlı bir belirteç olabilir. Bilindiği üzere, pterjiyum tümöre benzer birkaç özelliğe sahiptir ve bu nedenle Ki-67 de pterjiyum için bir belirteç olabilir (Ohara ve ark., 2004). Yapılan çalışmalarda, pterjiyumda PCNA ve Ki-67 ekspresyonunun, normal konjonktivadan anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (Liang ve ark., 2011). Siklin D1, hücre döngüsünün G1 fazı boyunca ilerleme için gerekli bir proteindir. Son çalışmalarda, PCNA ve siklin D1, yerleşik epitel hücrelerinin hiperproliferasyonu gibi limbal mikro çevresel anomaliye yol açabilen normal konjonktivaya kıyasla pterjiyum epitel hücrelerinin limbal kısmında aşırı eksprese olduğu bulunmuştur (Das ve ark., 2011).

2.1.4.7. Apoptoza bağlı proteinler

Survivin, Bcl-2, Bax ve Bcl-w gibi apoptozla ilişkili proteinler, hücre apoptozunun düzenlenmesine dâhil oldukları ileri sürülmektedir. Apoptoz inhibitörleri ailesinin önemli bir üyesi olan survivin, kaspaz aktivasyonunu inhibe edebilir ve apoptozun negatif düzenlenmesine yol açabilmektedir. Xu ve arkadaşları survivinin pterjiyum dokularında güçlü bir şekilde eksprese edildiğini ve epitel hücrelerinin hem çekirdeğinde hem de sitoplazmasında yer aldığını, ancak normal konjonktival epitelyum sitosolünde sadece zayıf bir şekilde ifade edildiğini belirtmiştir (Xu ve ark., 2014). Oksidatif stres, hiperproliferatif şartları indükleyerek survivin ekspresyonunun aktivasyonuna neden olabileceği ve bu durumun pterjiyumun büyümesinde kritik bir öneme sahip olduğu vurgulanmıştır (Maxia ve ark., 2008). Bcl-2 proteini, apoptozun kontrolünü apoptozisi ya indükleyerek ya da inhibe ederek göstermektedir. Tüm pterjiyum epitel hücrelerinin bazal epitel tabakasında Bcl-2'nin belirgin ekspresyonu gözlenirken, normal konjonktiva Bcl-2'ye dair bir kanıt bulunamamıştır. Bax, apoptotik

bir aktivatör proteindir ve pterjiyumlu dokularda ekspresyonu yukarı yönde düzenlenmektedir (Tan ve ark., 2000).

2.1.4.8. Hücre dışı matris proteinleri

Keratin, elastin, kollajen, fibroin gibi proteinler hücre dışı matris proteinleri grubuna dâhildirler. Bazı keratinlerin (K8, K16, K14 ve AE3) normal konjonktivada değil de pterjiyum epitelinde tamamiyle kalınlaşmayı sağladığı görülmektedir (Zhang ve ark., 2000). Perez-Rico ve arkadaşları konjonktival dokuya nazaran pterjiyumlu dokularda daha yüksek mRNA seviyesi ve tropoelastin ekspresyonu saptanmıştır (Perez-Rico ve ark., 2011). Hem pterjiyum hem de normal konjonktivada kollajen tip I, III ve IV saptanmış olup, kollajen tip II'nin sadece pterjiyumda bulunduğu tespit edilmiştir (Feng ve ark., 2017).

2.1.4.9. Isı şoku proteinleri

Isı şoku proteinleri (HSP) stresli koşullara maruz kalmaya yanıt olarak hücreler tarafından üretilen bir protein ailesidir. Hsp27 ekspresyonu, pterjiyumlu epitelyal hücrelerinde, endotelyal hücrelerinde ve vasküler düz kas hücrelerinde belirlenirken, normal konjonktiva dokularında sadece epitelde tespit edilmiştir. Hsp90 ekspresyonu ise pterjiyum epitelinde normal konjonktiva epiteline göre daha çok eksprese olduğu bulunmuştur (Pharmakakis ve ark., 2001; Sebastia ve ark., 2013).

2.1.4.10. Sıkı bağlantı proteinleri

Sıkı bağlantı bölgeleri, zarları bir araya getiren ve sıvı geçirmez bariyerini oluşturan iki hücrenin yakın ilişkili bölgeleridir. Klaudinler, sıkı bağlantıların oluşumu ve bakımı için vazgeçilmez proteinlerdir. Doğan ve arkadaşları pterjiyumda klaudin-1

ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığını bulmuşlar ve klaudin-1'in kaybının muhtemel pterjiyum patogeneğine katkıda bulunduğunu öne sürmüşlerdir (Doğan ve ark., 2016).

2.1.4.11. Kolesterol metabolizması modifikasyonu

Bazı çalışmalarda pterjiyum gelişimi ile kolesterol metabolizmasında yaşanan modifikasyonlar arasında ilişkilendirme yapılmıştır. Pterjiyumlu vakalarda, artan hidroksil-metilglutaryl-koenzim A-redüktaz ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü seviyeleri bulunmuştur ve araştırmacılar bunun fibroblast proliferasyonunun uyarılmasında rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir (Peiretti ve ark., 2004). Aslında, bazı lipit metabolizmasını değiştiren ilaçlar, pterjiyumda fibroblastlarının çoğalmasını azalttığı gözlemlenmektedir. Bu ilişki, pterjiyum gelişimini ve büyümesini önlemek için gelecekte bir terapötik hedef olarak kullanılabilir (Peiretti ve ark., 2006).

2.1.4.12. Virüsler

Virüslerin tümör oluşumunu teşvik eden doku çoğalmasını ve DNA'daki mutasyonları indüklediği varsayılmaktadır. Bazı çalışmalarda, hem pterjiyumlu hem de normal konjonktivadan alınan biyopsi örneklerinde pterjiyumlu dokularda, insan papilloma virüsü (HPV) ve herpes simpleks virüsü tespit edilmiştir (Gallagher ve ark., 2001; Detorakis ve ark., 2001). Bununla birlikte, sonraki yapılan çalışmalar bu bulguları desteklememiştir. Başka bir çalışma HPV'nin pterjiyumda coğrafi değişkenliğini göstermiştir ve İtalya'da toplanan tüm örneklerde, Ekvator bölgesinden toplanan 24 pterjiyumlu olgunun sadece 5 tanesinde HPV için pozitif test vermiştir. Daha önce yapılan çalışmalar arasındaki bu tutarsızlıklar, viral enfeksiyon oranlarındaki farklılıkların coğrafi değişikliklerle ilişkili olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle

virüsler pterjiyum gelişiminde rol oynayabilir, ancak bu, pterjiyum mekanizması açısından önemli bir kanıt oluşturmamaktadır. Çoğu pterjiyum vakasında virüslerle doğrudan bir ilişki kurulamadığından virüsler sadece duyarlılığı artırabilir, ancak pterjiyum patogenezi için etkili olmadıkları düşünülmektedir (Piras ve ark., 2003; Reid ve Dushku., 2003).

2.1.4.13. Epiyelyal-mezenkimal geçiş

Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelerin özelliklerini üstlendiği bir süreçtir. Gelişim, yara iyileşmesi ve kanserleşme süreçlerinde EMT söz konusudur. Son zamanlarda yapılan çalışmalar EMT'nin pterjiyum patogenezinde dâhil olduğu görüşündedir. Bu durum, pterjiyum fibroblastlarının kökenlerinin nereden geldiğinin bir kanıtı olabilir (Hay, 2005; Kase ve ark., 2007). Normal konjonktiva EMT'sine kıyasla pterjiyum EMT'sinde bir seri değişiklikler görülmüştür. Bunlar arasında, beta-katenin ve lenfoid güçlendirici-faktör-1'in intranükleer birikimi ile E-kaderinin aşağı regülasyonu, stromaya doğru uzanan epitel hücrelerinde sitokeratin 14 ve alfa-pürüzsüz kas aktin veya vimentin yardımcı (co-)ekspresyonu ve normal kornea epitelinde bulunmayan pterjiyum epitelyal hücre çekirdeklerinde salyangoz ve sülük transkripsiyon faktörleri gibi değişiklikler en majör olanlarındandır (Kato ve ark., 2007). Pterjiyum fibroblastlarının kökeni belirsizliğini korumaktadır. Muhtemelen, bu fibroblastlar, EMT'den geçen limbal epitelyumdan köken almaktadırlar. Burada, TGF- β veya FGF gibi büyüme faktörleri ya da UV'ye maruz kalmanın bir sonucu olarak keratinositlerde, EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörleri olan (slag ve snail) indüklendiği için, limbal epitelyumdaki değişiklikler gözlemlenmektedir. EMT yoluyla pterjiyum fibroblastlarına neden olan limbal epitel hücreleri kavramı, EMT'nin fibrozis sırasında lokal olarak meydana gelebileceğini gösteren hayvan

modelleri tarafından desteklenmektedir. Ayrıca bu kavramı destekleyen başka bir olay, yara iyileşmesi sırasında korneal epitel hücrelerinde mezenkimal markör vimentinin eksprese olmasıdır (Zavadil ve Bottinger., 2005; Hudson ve ark., 2007; Iwano ve ark., 2002)

2.1.5. Pterjiyum genetiği

2.1.5.1. Kalıtsal faktörler

Pterjiyum ile ilişkili kalıtsal faktörler hala tam olarak net anlaşılamamıştır. Hücre döngüsü düzenlenmesinde görevli proteinler ve diğer markörler pterjiyum oluşumunda ve gelişimindeki genetik farklılıklarla ilişkili olabilirler. Bazı çalışmalarda, pozitif aile öyküsü olan, ancak kesin miras kalıbı olmayan hastalarda pterjiyum riskinin arttığı gösterilmiştir (Di Girolamo ve ark., 2006). Bazı çalışmalarda ise, ailesel pterjiyum kalıtım paterninin, eksik penetrasyon ile otozomal dominant olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bir dizi monozygotik ikiz çalışmaları dâhil olmak üzere, genellikle erken yaşta çok sayıda etkilenen bireye sahip ailelerin önceki raporları, pterjiyuma yatkınlığı etkileyen genetik faktörler için ek kanıt sağlamaktadır. Dolayısıyla, ikiz çalışmalardan, göç çalışmalarından veya ayrışma analizi çalışmalarından elde edilen sınırlı kanıtlar, pterjiyumun kalıtımla arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Kalıtsal faktörler genetik mutasyon olasılığını artırabilir ve bu bireyleri pterjiyum oluşumuna yatkın hale getirebilmektedir (Saw ve ark., 1999; Chui ve ark., 2008; Bradley ve ark., 2010).

2.1.5.2. Tümör supresör genleri

Tümör baskılayıcı genler, normal hücreleri kanser hücrelerine dönüşmekten korumaktadır ve proto-onkogenler ile birlikte hücrelerin büyümesini düzenlemektedirler. En yaygın tümör baskılayıcı genlerden biri olan P53 ile ilgili literatürde çok fazla çalışma

mevcuttur. Ueda ve arkadaşları Japon ve Tunus toplumları üzerinde yaptıkları bir çalışmada, pterjiyumlu hastalarda mutant p53 geninin varlığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca çalışmada, pterjiyumlu hücrelerde mutant-p53'e bağlı programlanmış hücre ölümleri ve yine mutant-p53 kaynaklı diğer genlerde mutasyonlar saptanmış olup, bu durumun çok aşamalı limbal tümörlerin gelişimine olanak sağladığını ileri sürmüşlerdir (Ueda ve ark., 2001). Yapılan immuno-histokimyasal birçok çalışmada, pterjiyumlu örneklerde aşırı ekspresyonuna bağlı olarak mutant p53 geninde pozitif boyama gözlenirken, normal konjktivada ise p53'e bağlı patolojik olarak anormal bir boyanma gözlemlenmemiştir (Weinstein ve ark., 2002). Son zamanlarda p53 proteininin pterjiyumda, proliferatif hücresel aktivitenin bir markörü olan Ki-67 proteini ile, pozitif korelasyonu olduğu bilinmektedir (Ljubojevic ve ark., 2016). Şaşırtıcı bir şekilde, pterjiyumda artan p53 ekspresyonu hücre proliferasyonunu ya da apoptozu bloke etmemektedir. Çünkü pterjiyumda, bu normal mekanizmalar mutant p53 tarafından inaktive edilmektedir (Schneider ve ark., 2006). p53, p53 kodon 72 polimorfizminlerinin anormal ekspresyonu ve insan papillomavirüs (HPV) DNA'sı, pterjiyum oluşum süreci için gerekli ortak faktörlerdendir. HPV 16/18 E6 onkoprotein, HPV aracılı pterjiyum patogenezinde p53 inaktivasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. Görünüşe göre p53'ün anormal ifadesi, pterjiyumda hücre çoğalmasını teşvik eder ve apoptozu yavaşlatmaktadır, böylece bu hastalığın gelişimini hızlandırmaktadır. P53'ün yanı sıra p63, p16 ve p27 gibi bazı homeotik tümör baskılayıcı genlerin de pterjiyum sürecinde ekspresyonlarının arttığı gözlemlenmiştir (Rodrigues ve ark., 2008; Tsai ve ark., 2009).

2.1.5.3. Epigenetik Faktörler

Epigenetik, temel DNA sekansını içermeyen gen ekspresyonundaki kalıtsal değişikliklerin çalışmasını ifade etmektedir. Epigenetik mekanizmalara, DNA

metilasyonu, histon modifikasyonları ve mikro RNA'lar dahildir (Jirtle ve Skinner., 2007). Yapılan bir çalışmada, transglutaminaz 2 (TGM2), MMP-2 ve CD24'ü kodlayan genlerin yakınında, CpG lokusundaki değişen metilasyon paternlerini tanımlamışlardır. TGM2'nin promotör bölgesindeki hiper metilasyonu, transkript ve protein seviyelerinin azalmasına ve MMP2'nin intergenik bölgelerinin ve CD24'ün promotör bölgesinin hipometilasyonları, transkript ve protein seviyelerinin artmasına neden olduğu bulunmuştur. Bu değişikliklerin hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesinde ve hücre yapışmasında anahtar rol oynadıkları için pterjiyum gelişiminde etkisi olabileceği düşünülmektedir (Riau ve ark., 2011; Li ve ark., 2016; Serra ve ark., 2018).

2.1.5.4. Pterjiyum'da DNA onarımı

UV radyasyonunun oksidatif DNA hasarına neden olduğu bilinmektedir ve bu durumun pterjiyum patogenezi açısından önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir. P53, DNA onarım sistemindeki esas molekül olduğu için, bu sistemin aşağı akış (downstream) bileşenleri de anormal olarak ifade edilebilmektedir. Yapılan çalışmalarda, DNA çift zincir kırıklarını tamir eden MRN kompleksinin üyeleri (RAD50 ve RAD51) ve iki RAD51 paralog (XRCC2 ve XRCC3) genler olan, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında pterjiyumlu hastalarda farklı şekillerde eksprese edildiği rapor edilmiştir (Lekawa-Ilczuk ve ark., 2011). Pterjiyum dokularında kontrol konjonktiva dokularına kıyasla daha yüksek bir RAD50 proteini ekspresyonu gözlemlenmektedir. RAD50'nin, çift zincirli DNA kırıklarını onarımını hızlı bir şekilde organize ettiği bilinmektedir (Delmas ve ark., 2009). Pterjiyum dokularında daha yüksek RAD50 proteini ekspresyonu, pterjiyumda rekombinasyonel DNA onarım mekanizmalarının aktive olabileceğini düşündürmektedir. Pterjiyum nüks öyküsü olan hastaların periferal kan lenfositlerinde RAD51, XRCC2 ve XRCC3 gen ekspresyonu yüksek bulunmuştur. Aynı zamanda, RAD51'in aktivitesini

düzenleyebilen PLK1 (polo benzeri kinaz 1), pteryjiyum dokularında yüksek oranda eksprese edilmektedir. Bu kanıtlardan yola çıkarak, çift zincir DNA tamir sistemi ile pteryjiyum patogenezi arasında temel bir bağlantı olduğu görülmektedir (Lu ve ark., 2009; Lui ve ark., 2013).

2.1.5.5. Pteryjiyumda DNA tamirinde kalıtsal defektler

Genetik açıdan, bir alt jenerasyon pteryjiyum gelişimi açısından kalıtsal bir yatkınlık taşımaktadırlar ve dolayısı ile akrabalarında bu hastalığın görülme sıklığının arttığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Carmichael., 2001). Kalıtsal pteryjiyumlu hastalarda, doğuştan yetişkinliğe kadar geçen dönem içinde erken yaşlarda bu hastalık görülmektedir ve kalıtım paterni olarak eksik penetrasyona sahip otozomal dominanttır (Hecht ve Shoptaugh., 1990). Kümülatif DNA hasarı pteryjiyum patogeneze katkıda bulunabilir ve bu durumu destekleyerek DNA onarım mekanizmalarında kalıtsal kusurları olan bireyler pteryjiyum oluşumu ve gelişimi açısından daha yatkındırlar. Bu durum, hatalı nükleotid eksizyon tamiri ile karakterize edilen xeroderma pigmentosumlu bireylerde bilateral pteryjiyum insidansının artmasıyla gösterilmiştir (Goyal ve ark., 1994). Daha yakın zamanlarda, insan-8-oksoguanin glikosilaz I (HOGG1) Ser326Cys polimorfizmi, glutatyon S-transferaz M1 (GSTM1) null genotipi ve Ku70 promotörü T-991C polimorfizminin pteryjiyum gelişimi açısından çok büyük bir risk oluşturduğu bildirilmiştir. Aksine TNF-alfa-308 promotörü, IL-1beta (511 promotörü ve ekson 5), IL-1 reseptör antagonisti içeren polimorfizmler, 14 p21 (kodon 31) ve p53 (kodon 72) pteryjiyumla ilişkili değildiler (Chui ve ark., 2008). HOGG1, reaktif oksijen türlerine maruz kalmaya bağlı oluşan ve oldukça mutajenik bir DNA fotooksidasyon ürünü olan 7,8-dihidro-8-oksoguaninin (8 OHdG) çıkarılmasından sorumludur. HOGG1 geni ekson 7'de 1245 pozisyonundaki tek bir nükleotid polimorfizmi (SNP), C/G değişimi sonucu,

kodon 326'da serin amina asiti yerini sistein amino asiti almaktadır ve HOGG1 Ser326Cys polimorfizmine yol açmaktadır, bu durum artmış kanser riski ile doğrudan ilişkilidir (Weiss ve ark., 2005). Her ne kadar HOGG1 Ser326Cys polimorfizmi insidansı açısından pterjiyum hastaları ve kontrol arasında farklılık göstermese de, Cys / Cys genotipi pterjiyumda daha yaygın olarak bulunmuştur (Kau ve ark., 2004).

Genetik çalışmalar pterjiyum patogenezinin anlaşılmasında önemli bir adım içermektedir ve genetik belirteçler, koruyucu tedbirlerin pterjiyum gelişme olasılığını azaltabileceği risk altındaki bireyleri belirlemeye yardımcı olabilir. Bu anlamda yapılan mevcut çalışmaların dikkatle yorumlanması gerekmektedir. Çünkü fonksiyonel ve mekanik verilerden yoksundurlar, tek bir popülasyonda gerçekleştirilmişlerdir ve ırksal yanlılıktan etkilenebilirler. Örneğin, HOGG1 Ser326Cys polimorfizmi, Asyalılar'da (0.41-0.61) Kafkasyalılara (0.13-0.27) kıyasla daha yaygındır ve Ser326Cys enzimin fonksiyonel aktivitesi net değildir (Weiss ve ark., 2005). Pterjiyum ile ilgili mevcut genetik çalışmaların veri analizlerinde UV'ye maruz kalma seviyeleri belirsizdir. DNA tamir mekanizmalarında görülen kalıtsal defektlerin, UV ışığı gibi bireyin sadece gen toksik stresine maruz kalması durumunda ortaya çıkacağından, pterjiyumlu hastalar ve kontroller arasında HOGG1 Ser326Cys polimorfizmi oluşumunda niçin bir fark gözlemlenmediğini açıklamaktadır (Chui ve ark., 2008).

2.2. HÜCRE ADEZYONU

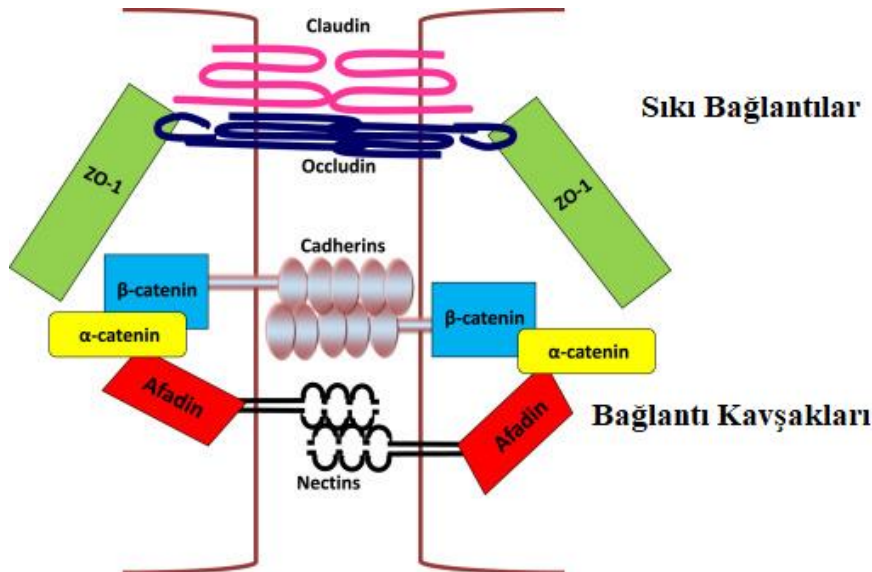
2.2.1. Hücre adezyonu nedir?

Hücre adezyonu, dokuların gelişimi ve devamlılıklarını sürdürebilmeleri açısından çok kritik bir öneme sahiptir. Hücreler arası etkileşimler özellikle dokuya üç boyutlu yapısının kazandırılması bakımından doğru düzgün montaj ve beraberinde

devamlılık çok önem arz etmektedir (Campbell ve ark., 2017). Adezyon yani hücreler arası yapışma işlemi, özelleşmiş hücre-hücre bağlantıları olan özellikle yapışkan bağlantılar (AJ; Adherens Junctions), desmozomlar ve sıkı bağlantılar (TJ; Tight Junctions) tarafından sağlanmaktadır. Bu bağlantılar, hücreler arası fiziksel bağlantılar oluşturmaya ek olarak, hücre iskeleti elemanlarını organize ederler ve onları düzenlemektedirler. Ayrıca, doku gelişimini, yapısını ve fizyolojisini düzenlemek için sinyal yollarını modüle ederler. Hücre adezyonu, geniş çaplı olarak kültüre hücrelerde çalışılmış olmasına rağmen, genetik yaklaşımlar, her bir bileşenin altında yatan fizyolojik fonksiyonları ve bağlantı proteinlerinin bilinmeyen rollerini açığa çıkarmıştır. Bağlantılar, birbirinden bağımsız olarak fonksiyon görmezler, doku bütünlüğü ve sağlamlığı için, karşılıklı çapraz konuşma, dayanışma ve denge gereklidir. Fare epidermisi, doku yapısı ve fizyolojisi bakımından hücre-hücre adezyonunun fonksiyonunun araştırıldığı ilk modeldir. Epidermis, birkaç temel koruyucu işlevi yerine getiren tabakalı bir epitelyumdur. Su kaybı, dehidrasyon ve vücuda toksik madde girişinden korumak için özelleşmiştir. Bunu başarmak için, epidermis organizma ve çevresi arasında sıkı bir bariyer oluşturmali ve sürdürmeli, büyük miktarlarda mekanik strese dayanmalıdır. Bu bariyer fonksiyonu için gerekli olan hücre-hücre yapışmasının uygun şekilde tesis edilmesi gerekmektedir (Sumigray ve Lechler., 2015).

Hücre-hücre adezyon bağlantıları (AJ, desmozomlar ve TJ) epidermiste belirgin lokalizasyon modellerine sahiptirler. Bazal hücreler polarize yani kutuplaştırılmış hücreler olup, lateral ve apikal membranları boyunca AJ'lere ve desmozomlara sahiptirler. Bu, yapışkan olmayan apikal yüzeylere sahip basit epitel hücrelerinden farklıdır. Supra-bazal yani bazal hücrelerin üzerinde yer alan hücrelerde, tüm hücre yüzeyinde AJ'ler ve desmozomlar bulunmaktadır. Desmozom yoğunluğu ve bileşimi,

hücreler farklılaştıkça belirgin bir şekilde değişmektedir. Buna karşılık, sıkı kavşaklar tüm hücreyi çevrelemezler, sadece granüler, tanecikli hücrelerde toplanmaktadır ve ancak düzlemsel çokgen bir ağda bulunmaktadırlar (Furuse ve ark., 2002; Schluter ve ark., 2004). Hem insan mutasyonları hem de farelerde yapılan genetik ablasyon çalışmaları, epidermal fonksiyondaki bu üç adezyon yapının tümü için rolleri göstermiştir. Her bir bağlantının, kendine has olarak bilinen fonksiyonlarının yanı sıra ek rolleri de anlaşılmaya başlanmıştır. Sıkı kavşaklar, su kaybını önlemek için gerekli iç-dış bariyeri sağlar, desmozomlar mekanik güç sağlar ve AJ'ler epidermal fizyolojinin birçok farklı yönünü koordine etmektedirler (Şekil 2.3). Ayrıca, her hücre-hücre birleşiminin kendi bağımsız işlevlerine sahip olmasının yanı sıra, epidermise tam bariyer aktivitesi kazandırmak için önemli olan çeşitli birleşim kompleksleri arasında çapraz konuşma ve karşılıklı etkileşim olduğu da giderek daha açık hale gelmektedir (Godsel ve ark., 2010; Sumigay ve ark., 2012; Tunggal ve ark., 2005).



Şekil 2. 3. Hücre-hücre adezyon bağlantılarının şematik gösterimi (Campbell ve ark., 2017).

➤ **Bağlantı Kavşakları (AJ):** Bağlantı kavşakları kaderinler ve nektinler olarak bilinen transmembran sarmal yapıda iki yapışkan reseptör ailesinden meydana gelmektedir. Bu proteinlerin hücre dışına bakan bölgeleri, hücrelerin komşu hücreler ile yapışmasına aracılık ederken, hücre içi bölgeler ise, bir dizi proteinle etkileşime girmektedirler. Bu hücre içi proteinler, sinyal yollarını uyararak ve aktin hücre iskeleti ile bağlantılar kurarak, bağlantı kavşaklarının düzgün bir şekilde koordine olmasını kontrol etmektedirler (Campbell ve ark., 2017). Özellikle kaderin bazlı AJ'lar F-aktin hücre iskeletini plazma membranına bağlamaktadırlar. Transmembran kaderinler aynı hücrede hem yanıl dimerizasyonu sağlarken, hem de bitişik hücrelerde E-kaderin molekülleri arasındaki yapışma dimerizasyonu yoluyla hücreler arasındaki fiziksel bağlantıları oluşturular (Ozawa ., 2002; Sumigray ve Lechler., 2015).

➤ **Desmozomlar:** AJ'ler gibi, desmozomlar da transmembran kaderin molekülleri etrafında oluşmaktadırlar. Desmokolın ve desmoglein olarak bilinen iki tür desmozomal kaderin vardır. Fareler ve insanlarda, hücre tipine özgü şekilde ifade edilen üç desmokolın geni ve dört desmoplakin geni ifade edilmektedir. Desmozomun sitoplazmik yüzü, dış yoğun plak ve iç yoğun plak olarak adlandırılan iki ayrı elektron yoğun yapı içermektedir. Dış yoğun plak, hücre membranına yakın olan plak olup, desmozomal kaderinin sitoplazmik kuyrukları bu plağa bağlanmaktadır. İç yoğun plak ise, desmoplakin kuyruğunun keratinlere bağlandığı bölgedir (Sumigray ve Lechler., 2015).

➤ **Sıkı Bağlantılar (TJ):** Tüm bağlantıların en uçtaki bileşeni sıkı bağlantılardır. Sıkı kavşakların iki işlevi vardır. İyonların, suyun ve makromoleküllerin hücreler arasındaki bölgelerden geçişini düzenleyen bir bariyer veya kapı fonksiyonuna sahiptirler. Sıkı kavşaklar ayrıca, zar içindeki lipit dağılımını kısıtlayarak hücre

polaritesini kuran ve koruyan bir bariyer fonksiyonuna sahiptir. Sıkı kavşaklar, transmembran proteinleri veya sitoplazmik aktin bağlayıcı proteinler olan 40'tan fazla proteinden oluşmaktadırlar. İlk grup, hücreler arası boşlukta hücre-hücre temasını sağlamaktan sorumluyken, ikincisi aktin hücre iskeletine bir bağlantı görevi görmektedir (Campbell ve ark., 2017). AJ ve desmozomlardan farklı olarak, sıkı kavşaklar kaderin bazlı yapışma yapıları değildirler. Aksine, bu kavşakların baskın transmembran protein bileşenleri kloudinler ve okludin'dir. Hem kladinler hem de okludin dört transmembran sarmala sahiptir. Sıkı kavşak bağlantılarının oluşumu için okludin gerekli değildir ancak işlevine ihtiyaç duyulmaktadır. Klaudinlerin aksine, sıkı kavşak bağlantılarını oluşturmak için gereklidir (Sumigray ve Lechler., 2015)

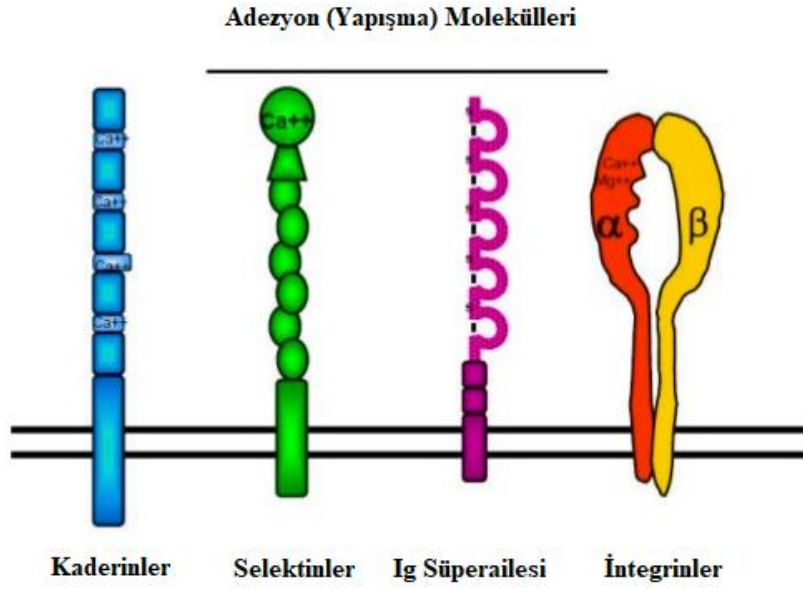
2.2.2. Hücre adezyon molekülleri

Hücre-hücre yapışması hücresel ve doku morfogenezini tamamlayan çok hücreli organizmalarda, temel bir biyolojik süreçtir (Wickström ve Niessen., 2018). Hücreler arasındaki ve altta uzanan hücre dışı matriks (ECM) ile adezyon yoluyla taşınan sinyal, normal doku homeostazı sırasında gen regülasyonu ile sıkı bir şekilde koordine edilmektedir. Hücre-hücre adezyonunun bozulması, bu durumu takiben adezyon aracılı sinyallemede görülen değişiklikler ve hücre motilitesindeki artış, invaziv metastatik kanser gelişimi sırasında gözlenen karakteristik adımlardandır (Clément ve ark., 2017; Nieto ve ark., 2016).

Hücre-hücre adezyonu, hücre adezyon molekülleri (CAM) tarafından düzenlenmektedir. Bu moleküller, hücrelerin üç boyutlu dokulara birleşmesini yöneten hücre iskeletine bağlı transmembran reseptörlerdir. CAM'lar aynı zamanda hücrelerin

kendileriyle ve etrafındaki çevreleriyle olan etkileşimlerini belirler ve dış uyaranlara karşı yanıtları düzenlerler. CAM'lerin ekspresyonunda ve sinyalizasyonundaki değişiklikler, kanser gelişiminin farklı aşamalarında önemli bir rol oynamaktadır (Cavallaro ve ark., 2004; Basu ve ark., 2018).

Dokulardaki ve organlardaki hücrelerin organizasyonu, hücrelere komşularını ve hücre dışı matrisini tanıma yeteneği kazandıran moleküler programlar tarafından kontrol edilmektedir. Hücre-hücre ve hücre-matriks teması ve yapışmasına dört ana molekül grubu aracılık eder: kaderinler, immünoglobulin benzeri moleküller, integrinler ve selektinler. Yapıştırıcı yani adezyon etkileşimler, embriyonik gelişim açısından gereklidir. Çünkü, hücre özelleşmesi ve doku farklılaşması, farklılaşmamış hücrelerin embriyonun belirli alanlarında bir araya gelme ve ayrılma kabiliyetine bağlıdır. Hücre adezyonu, aynı zamanda hücre polaritesi, bağışıklık yanıtı, enflamatuvar süreç, bölünme ve ölüm, tümör ilerlemesi ve metastaz gibi diğer çeşitli biyolojik süreçlerde de rol oynamaktadır. Bazı doku ve organlarda hücre-hücre yapışmasının biyolojik önemi, pemfigus vulgaris, lökosit yapışma eksikliği, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve konjenital işitme kaybı ve retinal dejenerasyon gibi farklı patolojik durumlarda mutasyon bulguları ile vurgulanmaktadır. Artan kanıtlarla birlikte, doğrudan hücre-hücre etkileşimlerinin, embriyonik kıkırdak oluşumundan yetişkin kemik oluşumuna kadar kemik gelişimi için kritik olan çeşitli süreçlerde yakından rol oynadığına dair bulgular fazlalaşmıştır (Gumbiner ., 2005; Levenberg ve ark., 1999; Petruzzell ve ark., 1999; Mbalaviele ve ark., 2006).



Şekil 2. 4. Adezyon molekülleri 4 ana sınıfı
(<https://sites.google.com/site/chsanatomyphysiology27/home/cellular-adhesion-molecules-cam>)

İntegrinler: İntegrinler, hücre-hücre ve hücre dışı matris (ECM) etkileşimlerinde yer alan ve tüm hücre tiplerinde eksprese edilen büyük bir heterodimerik transmembran glikoprotein ailesidir (Andrew ve ark., 2002; Fukuda ve Sugihara., 2012). Bu moleküller, kovalent olarak ilişkili olmayan birbirinden farklı α - (120-180 kDa) ve β alt birimlerden (90-110kDa) oluşan heterodimerler olup, 20'den fazla tanımlanmış fonksiyonel heterodimerleri vardır. Her bir integrin alt ünitesi, büyük bir hücre dışı domaine, tek bir membranı geçen bölgeye ve kısa bir sitoplazmik alana sahiptir. Bu α - β alt üniteleri arasındaki ilişki, çeşitli ligandlar için integrin heterodimerlerinin bağlanma spesifikliklerini belirlemektedir. Genellikle, $\beta 2$ alt aile üyeleri çoğunlukla hücre-hücre adezyonunda rol oynarken, integrin $\beta 1$ - $\beta 3$ alt ailesi üyeleri ECM'deki hücre yapışmasına aracılık etmektedirler (Andrew ve ark., 2002). $\beta 1$ ve $\beta 3$ integrinleri arasında ek bir ayrım vardır, çünkü genel olarak $\beta 1$ integrinleri, fibronektin, laminin ve kollajenler gibi bağ dokusu makromoleküllerine yapışmaya dahil olurken, $\beta 3$ integrinleri fibrinojen, von

Willebrand faktörü (faktör VIII ile ilişkili antijen), trombospondin ve vitronektin gibi vasküler ligandlara bağlanmaktadır. Hücresel dağılım açısından, $\beta 1$ ve $\beta 3$ integrinleri pek çok hücre tipinde birlikte ifade edilirken, $\beta 2$ integrinleri lökositlerle sınırlıdır (Freemont., 1998).

Selektinler: Selektinler bir grup karbonhidrat bağlayıcı proteinlerdir. Hem insanlarda hem de farelerde üç tane selektin geni bulunmaktadır ve bu genlerin ürünleri olan E-selektin, P-selektin ve L-selektin, lökositler ve endotel hücreleri olarak bilinen hematopoietik hücrelerde eksprese edilmektedir. E-selektin inflamasyon esnasında endotelial yüzeyde, P-selektin aktive edilmiş trombositlerde, ve L-selektin ise, esas olarak lenfositler üzerinde eksprese edilmektedir (Fukuda ve Sugihara., 2012). L-selektin'in sonraki yapılan çalışmalarda sadece hematopoietik hücrelerde değil, aynı zamanda insan blastosistlerinin yüzeyinde bulunmuştur (Genbacev ve ark., 2003). Lökositlerde eksprese edilen L-selektin, kan damarı endotel hücreleri üzerindeki karbonhidrat-ligandları ile etkileşime geçmektedir. Bu etkileşim, lökositlerin damar dışına çıkmadan sağlam yapışmalarından önce vasküler endotel üzerinde yuvarlanmasını sağlamaktadır (Fukuda ve Sugihara., 2012). E- ve P selektin, monositler, eozinofiller ve bazı lenfosit alt popülasyonlarının yüzeyinde eksprese edilen karbonhidrat antijenleri ile etkileşime girmektedirler (Joseph-Silverstein, ve Silverstein., 1998).

İmmünoglobülin benzeri moleküller: Bu büyük molekül ailesi, immünoglobulinlere benzeyen bileşenlere sahip oldukları için böyle adlandırılmıştır. Bu grup, lenfositler ve diğer hücreler tarafından hücre ve antijen tanıma ile ilgili molekülleri içermektedir. CD3, CD4 ve CD8 gibi hücre tanıma amacıyla patoloğlar tarafından sıkça kullanılan bu moleküller bu gruba dâhildir. Bu moleküllerin diğer önemli alt grupları, epitelyal ve endotelial hücreler üzerinde geniş ölçüde eksprese olan hücreler arası

adezyon molekülleridir (ICAM) (Freemont., 1998). Örneğin, Nektinler, epitelyal ve endotelyal bağlantıların organizasyonuna katılan Ca^{2+} bağımsız immünoglobulin (Ig) benzeri CAM'lardır. Nektinler, hücre dışı bölgede üç Ig benzeri alana sahiptir ve bu alanlardan ilki, hücre-hücre yapışmasında çok önemli olup birkaç virüsün zarf glikoproteini D ile etkileşiminde merkezi bir rol oynamaktadır (Dong ve ark., 2006).

Kaderinler: Kaderinler, kalsiyum bağımlı hücre-hücre yapışmasına aracılık eden tek zincirli integral membran glikoproteinlerdir. Şimdiye kadar bu geniş süper ailenin, yaklaşık 80 üyesi klonlanmıştır ve artık birçok dokunun birden fazla kaderin ifade ettiği açıktır. ~120 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahip olduğu bilinen kaderinler, uzun bir hücre dışı alan, tek bir transmembran alanı ve nispeten küçük bir sitoplazmik C-terminal kuyruğundan oluşmaktadır. Kalsiyum bağlanma bölgeleri, hücre dışı bölgelerde bulunmaktadır ki, aynı zamanda bu alanlar beş tekrardan oluşmaktadır ve komşu hücrelerdeki aynı kaderinleri birbiri ile bağlama yeteneği sunmaktadır. Yapısal farklılıklara dayanarak, kaderinleri tip I ve tip II olarak iki gruba ayırabiliriz. Tip I grup kaderinler, N-, E-, M- ve R- kaderin; tip II grup kaderinler ise, kaderin-5 ila -12 'den oluşmaktadır. Başka bir kaderin grubu ise, işlevi hala belirsiz olan hücre içi kuyruğu olmayanları (T-kaderin ve kaderin-13) içermektedir. Şimdilerde bu büyük molekül ailesini, protokaderinlerden, kaderinle ilişkili nöronal reseptörden ve esas olarak merkezi sinir sisteminde bulunan diğer yapısal olarak ilişkili moleküllerden ayırt etmek için genellikle “klasik” kaderinler olarak ifade edilmektedir (Mbalaviele ve ark., 2006).

Kaderinler, başlangıçta preimplantasyon fare embriyosunda morula sıkışması esnasında ve civciv gelişimi sırasında Ca^{+2} bağımlı homofilik hücre-hücre yapışmasından sorumlu hücre yüzeyi glikoproteinleri olarak tanımlanmışlardır (Yoshida ve Takeichi., 1982). Daha sonraları çeşitli protein yapılarıyla 100 den fazla aile üyesi tanımlanmıştır

ve hepsinin karakteristik özelliği hücre dışı kaderin tekrarlarına sahip olmalarıdır. Kaderinler hem basit hem de kompleks organizmalar için çok önemli moleküllerdir. Omurgalılar, böcekler ve nematodlara ek olarak, kaderin ailesinin üyeleri tek hücreli koanoflagellatlarda (King ve ark., 2003), Diploblast Hydra (Hobmayer ve ark., 2000) ve sünger *Oscarella carmela*'da (Nichols ve ark., 2006) bulunmuştur. Keşiflerinden bu yana geçen otuz yılda, kaderinlerin rolünün hücreler arasındaki mekanik yapışma ile sınırlı olmadığı anlaşılmıştır. Daha ziyade, kaderin fonksiyonu, hücre tanıma ve sıralama, sınır oluşumu ve korunması, koordineli hücre hareketleri ile yapısal, fonksiyonel hücre ve doku polaritesinin indüksiyonu ve sürdürülmesi dahil olmak üzere doku morfogenezinin birçok yönüne uzanmaktadır.

Kaderinler, basit epitelyumun polarizasyonundan, kokleadaki saç hücrelerini mekanik olarak bağlamaya, beyin elektriksel ağı yapılanması sırasında nöral devre oluşumu için bir yapışma kodu sağlamaya kadar çeşitli doku ve organların oluşumunda ve korunmasında rol oynamaktadır (Halbleib ve Nelson., 2006). İşlevlerinin genişliği göz önüne alındığında, kusurlu kaderin ekspresyonunun, normal doku mimarisinin bozulması, metastatik kanser de dâhil olmak üzere çok çeşitli hastalıklarla doğrudan bağlantılı olması şaşırtıcı değildir (Bex ve Van Roy., 2001).

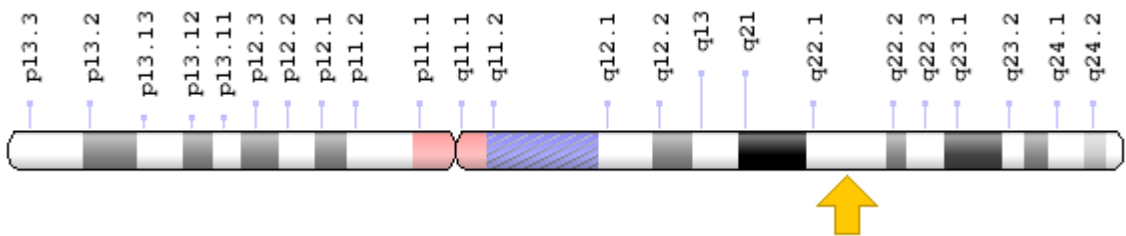
Kaderin ailesinin büyük boyutu ve üyelerinin yapısal çeşitliliği, karmaşık organizmalarda doku morfogenezi için gerekli olan birçok hücre etkileşimi türünü sağlamak için gelişmiş olabilir. Kaderin sayısı ve gen yapılarının farklı özellikleri, kaderin alt tiplerinin transkripsiyonel regülasyonuna ve protein yapısında, özellikle sitoplazmik alandaki varyasyonlarda, hem kaderin aktivitesinin hem de yapışma yanıtı oluşturan hücre içi sinyal kaskadlarının başlamasını kolaylaştırmaktadır (Halbleib ve Nelson., 2006).

2.2.3. E-Kaderin

E-Kaderin, klasik kaderinler ailesinin bir üyesidir. Hücre membranına bağlı halde bulunan bu proteinler, kalsiyum bağımlı hücre adezyon molekülleri olarak çalışırlar ve hücre bağlantılarının oluşmasına aracılık ederler. Özellikle E- Kaderin, yapışkan kavşakların (AJ) integral bileşeni ve epitelyal fenotipin oluşmasını sağlayan temel organizatörlerdir. E-kaderinin sitoplazmik kuyruğu, çeşitli kateninler (α , β ,p120) ile bağlantılıdır ve bu kateninler de sito-iskelet ile bağlantılı olup, aşağı yönlü sinyal etkililerinin oluşmasına aracılık eder. Bu sinyal yollarına Hippo, Wnt, TGF β ve daha birçok büyüme faktörü sinyal yolları dahildir (Mendonsa ve ark., 2018).

E-Kaderin Geni ve Yapısı

Epitelyal-kaderin (E-kaderin) *CDH1* geni tarafından kodlanmaktadır. *CDH1* geni 16. kromozom (16q22.1) üzerinde lokalize olup, yaklaşık 100kb'lık bir alan kaplamaktadır (Şekil 2.5). *CDH1* türler arasında son derece korunmuş bir gen olup, 16 ekzon ve 15 introndan meydana gelmektedir (Gall ve Frampton., 2013).



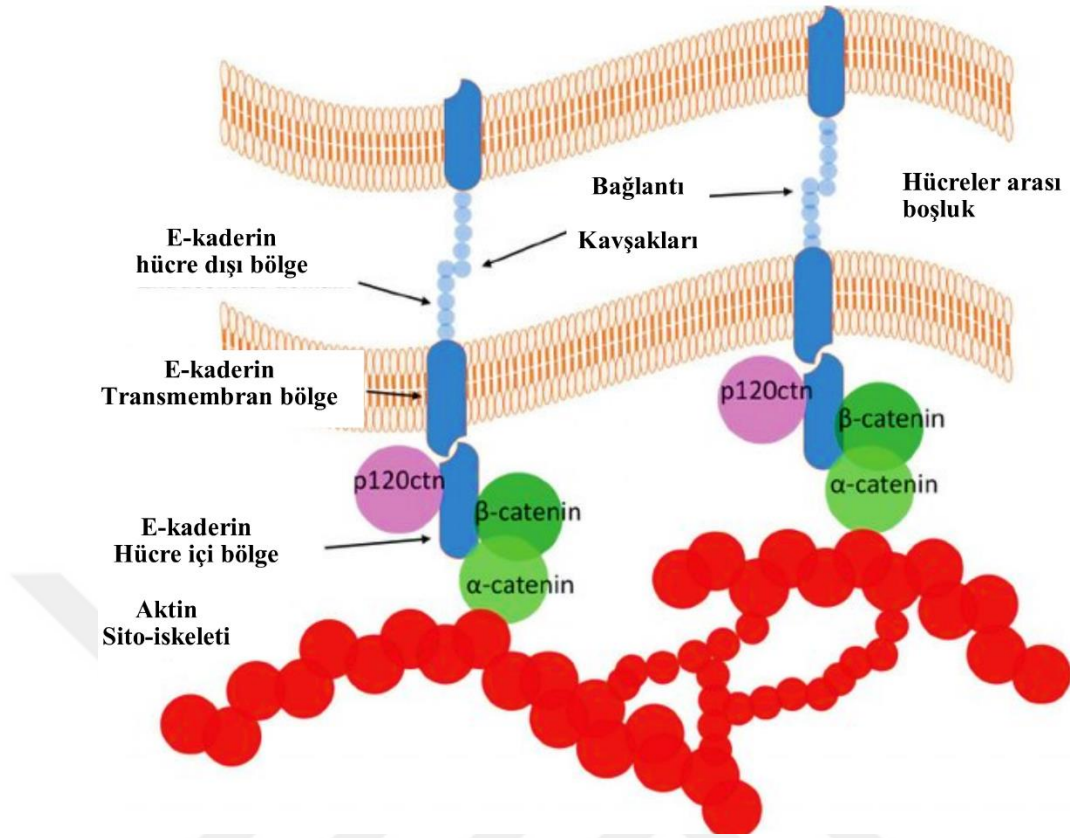
Şekil 2. 5. *CDH1* geni 16. kromozom üzerindeki yerleşimi (16q22.1).
<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CDH1#location>

E-Kaderin Proteini ve Yapısı

Hücre membranını tek seferde geçen transmembran bir glikoprotein olan E-kaderin, çok fazla farklı tipteki dokularda eksprese olmaktadır ve Ca^{+2} -bağımlı hücre-

hücre adezyon molekülü grubuna dahildirler. İlk olarak fare ve tavuk karaciğer hücrelerinde adezyon molekülü olarak tanımlanmışlardır ve 1980'lerin başında ilk olarak E-kaderin kelimesini Takeichi ve arkadaşları kullanmışlardır. O tarihten beri, normal epitel hücre yapılanması ve doku oluşumundaki, aynı zamanda kanser gelişimi ve sürecindeki tümör supresör olarak bilinen rolü, E-Kaderine olan ilgiyi arttırmış ve daha fazla çalışma alanını genişletmiştir (Ogou ve ark., 1983).

E-kaderin proteini 120kDa'luk bir glikoproteindir ve rastgele beş tekrarlı bir hücre dışı domaini, bir sitoplazmik domain ve tek bir transmembran domainden oluşmaktadır. Hücre dışı domaini Ca^{+2} iyonunu bağlayan bölgesidir ve lateral dimerizasyon yoluyla çevresindeki diğer adezyon hücreleri yüzeyindeki kaderinlere bağlanarak genişlerler. Bu durum kaderin-kaderin arayüzü ve böylelikle hücre-hücre adezyonu oluşmasına izin vermektedir. Sitoplazmik domain her biri yaklaşık 30-35 kalıntı içeren jukstamembran domain (JMD) ve katenin bağlayıcı domainden (CBD) oluşmaktadır. JMD kaderinlerin kümelenmesine izin verir ve p120 -katenin (p120-ctn) aracılığıyla güçlü yapışmalara katkıda bulunur. CBD β -katenin ve γ -katenin ile etkileşime girmektedir. α -katenin β -katenin ile bağ kurarak aktin sitoiskeletine bağlanırlar (Şekil 2.6). Bu olay aderent bağlantılardaki protein kümelenmesini ve hücre adezyonu stabilitesini teşvik etmektedir. Sitoplazmik domainin C-terminal ucu CBD'ninde dahil olduğu yaklaşık 150 protein kalıntısı içerir ve bu bölgenin kalsiyum-bağımlı hücre yığılması için gerekli olduğu rapor edilmiştir. Normal yetişkin epitel dokularında, E-kaderin hücre adezyonunda baş aktör olarak aracılık etmektedir. özellikle bu bilgilere ek olarak, kaderin-katenin kompleksi EMT'de aktif bir role sahiptir ve bu kompleks çok önemli sinyal kaskadlarının başlatıcısı ve devamlılığı açısından çok büyük önem arz etmektedir (Gall ve Frampton., 2013).



Şekil 2. 6. Hücre-hücre yapışmasına aracılık eden E-kaderin arayüzü (Gall ve Frampton., 2013).

Hücre dışı domainler, kalsiyum aktiviteli dimerizasyon yoluyla yapışkan hücreler üzerindeki E-kaderin hücre dışı domainlerine bağlanmaktadır. Hücre içi domainler p120ctn ve β -katenine bağlanmaktadır. Bu oluşan β -katenin kompleksi α -katenin ile bağlantı kurarak bu yeni oluşan kompleksin hücresel aktin iskeleti ile bağlantı kurmasına izin verir (Gall ve Frampton., 2013).

3. MATERİYAL ve METOD

3.1. MATERİYAL

3.1.1. Çalışma gruplarının oluşturulması

Bu çalışmaya, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversite Hastanesi Göz Hastalıkları Polikliniğine başvuran pterjiyum tanısı almış 36 hasta (13 kadın, 23 erkek) dâhil edildi. Ameliyat esnasında alınan pterjiyum dokuları hasta grubu ve her bir hastanın aynı gözüne ait sağlıklı konjonktiva dokusu da kontrol grubu olarak kullanılmak suretiyle çalışma grupları oluşturuldu. Çalışma için gerekli izin Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 02.04.2019 tarihli toplantısında 19-KAEK-090 proje numarası ile alındı. Çalışmanın tamamı Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Bu tez çalışması, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığınca 2019/40 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1.2. Dokuların saklanması

Çalışmaya dahil olan katılımcıların izni ve bilgisi dahilinde ameliyat sırasında alınan doku örnekleri hızlı bir şekilde istenilen parçalara ayrılarak sıvı azotta donduruldu ve sonrasında çalışılmak üzere -80°C’de muhafaza edildi. Parçalara ayrılan dokuların bir kısmı histopatolojik inceleme için patoloji laboratuvarına gönderildi. Her bir hastaya ait pterjiyum dokuları baş ve gövde olmak üzere iki kısma ayrıldı. Parçalara ayrılan bu doku örnekleri 3’erli gruplar halinde havuz oluşturuldu. Sonrasında havuz oluşturulan dokular 3 gruba ayrıldı. İlk grup DNA izolasyonu ve takiben metilasyona-spesifik PZR analizleri için, ikinci grup RNA izolasyonu, cDNA eldesi ve ekspresyon analizleri için, üçüncü ve

son grup olarak ise, protein izolasyonu ve takiben western blotlama analizleri için çalışılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı. Aynı şekilde kontrol grubu için de 3'erli havuz sistemi oluşturularak dokular DNA, RNA ve protein analizleri için 3 gruba bölünerek çalışılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

3.1.3. Çalışmada kullanılan cihazlar

- Real Time PZR (Applied Biosystems, İngiltere)
- PZR (Termal Döngü Cihazı, Techne, İngiltere)
- PZR (Termal Döngü Cihazı, Biometra)
- İblot Gel Transfer Sistemi (İnvitrogen, IB301001, Avusturalya)
- Voteks (Velp, Scientifica, F20220176, İtalya)
- Santrifüj (Hettich, Almanya)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich, Almanya)
- Qubit 2.0 Fluormeter (İnvitrogen, Life Technology, Avusturalya)
- Qubit 3.0 Fluormeter (İnvitrogen, Life Technology, Avusturalya)
- Plate (Applied Biosystems, 4346907, İngiltere)
- Plate Yapıştırıcı (Applied Biosystems, 201405092, İngiltere)
- Ph Metre (Hanna Instruments, HI2020W, ABD)
- Otomatik Pipetler (Gilson, Fransa)
- Otomatik Pipetler (ABT, Türkiye)
- Otoklav (HMC, HV25, Almanya)
- Mikrodalga Fırın (Arçelik, MD554, Türkiye)
- Manyetik Karıştırıcı (Velp Scientifica, F20520162, İtalya)
- Hassas Terazı (Kern ABT, Wb0750631, Almanya)

- Güç Kaynağı (Biorad, 1645070, ABD)
- Etüv (Memmert, Almanya)
- Distile Su Cihazı (Elgaoption Q7, İngiltere)
- Dikey Elektroforez Seti (XCell SureLock, İnvitrogen, Avusturalya)
- Yatay Elektroforez Seti (SUB-GEL Midi, ABD)
- Isıticılı Çalkalayıcı (Thermoshaker, İngiltere)
- Buzdolabı (Arçelik, 570465, Türkiye)
- -20°C Derin Dondurucu (Arçelik, 2052dy, Türkiye)
- -80°C Derin Dondurucu (Nuaire,Nu9483e, ABD)

3.1.4. Çalışmada kullanılan sarflar ve kimyasallar

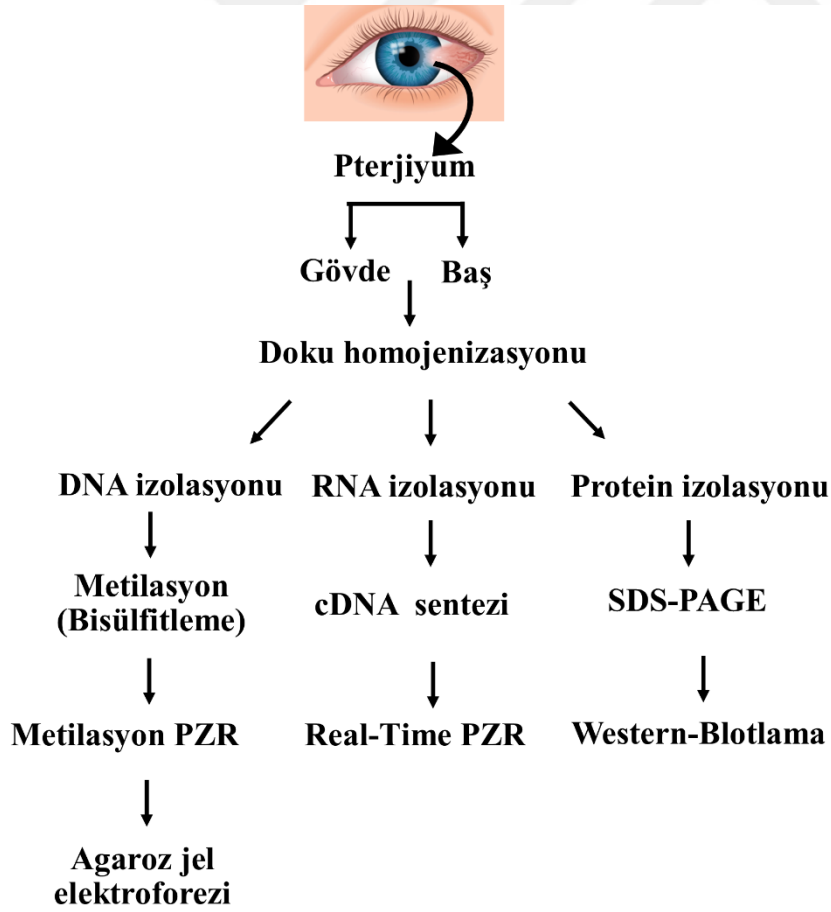
- DNA İzolasyon Kiti GeneALL Clinic SV Mini (108-101)
 - Mini column type G (Genomik DNA'ya uygun kolon)
 - Collection tube (toplama tüpü)
 - Buffer CL (ilk lizis solüsyonu)
 - Buffer BL (ikinci lizis solüsyonu)
 - Buffer BW (Yıkama solüsyonu)
 - Buffer TW(Yıkama sol. 2)
 - Buffer AE (Elüsyon tamponu)
 - Proteinaz K (20 mg/ml)
 - RNaz A
- Metilasyon işlemi için bisülfitleme aşamasında kullanılan kit seti
 - CT Conversion Reagent
 - M-Dilution Buffer

- M-Dissolving Buffer
- M-Binding Buffer
- M-Wash Buffer
- M-Desulphonation Buffer
- M-Elution Buffer
- Zymo-Spin IC Kolon
- Toplama Tüpü
- Metilasyona spesifik PZR
 - 0.1ml'lik PZR tekli ve 8-strip tüp
 - A.B.T.TM 2X PZR MasterMix (without Dye)(P01-01-01)
 - dH₂O
 - Pipet-Pipet ucu
- RNA İzolasyon Kiti
 - GeneAll marka RiboEx (301-001)
 - Hybrid-R (305-101)
- cDNA sentezi için A.B.T. marka cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity) (C03-01-05)
 - 10X Reaction Buffer
 - dNTP Mix(2.5 mM)
 - Random hekzamer
 - Revers Transkriptaz (200U/μl)
 - RNaz İnhibitor
 - RNaz free Water
- Real time PZR için PZR reaksiyonu

- A.B.T.[™] 2X qPZR SYBRGreen MasterMix (with ROX)
- 1X ROX Dye (50X)
- Forward Primer
- Reverse Primer
- Template cDNA
- RNaz-free Water
- Protein İzolasyonu için GeneAll marka ProtinEx (Cat: 701-001) Kit
- Westen Blotlama
 - %4-12'lik Bis-Tris gradient jel
 - MES Running Buffer
 - NuPAGE[™] Antioxidant
 - Buffer Core
 - Prime-Step[™] Prestained Broad Range Protein Ladder
 - Iblot transfer stack Nitrocellulose (NC) Kiti
 - Tween-20
 - PBS-T solüyonu
 - BSA (Bovine Serum Albumin)
 - Nitroselüloz membran bloklama solüsyonu (%5 BSA-PBST)
 - Anti-beta Actin Antibody
 - Anti E-cadherin Antibody
 - Sekonder antibody (Goat-anti-rabbit IgG (H+L))
- ABP iQuant[™] dsDNA HS Assay Kiti
- ABP iQuant[™] RNA HS Assay Kiti
- Qubit® Protein Assay Kiti

- Absolute etanol
- Otomatik tek kanallı pipet seti (10-200-1000 µl)
- Steril Pipet Uçları
- Ependorf tüp
- Kloroform
- Bistüri
- Agaroz
- TBE buffer
- DuGreen

3.2. METOD



Şekil 3. 1. Tez çalışması genel akış şeması

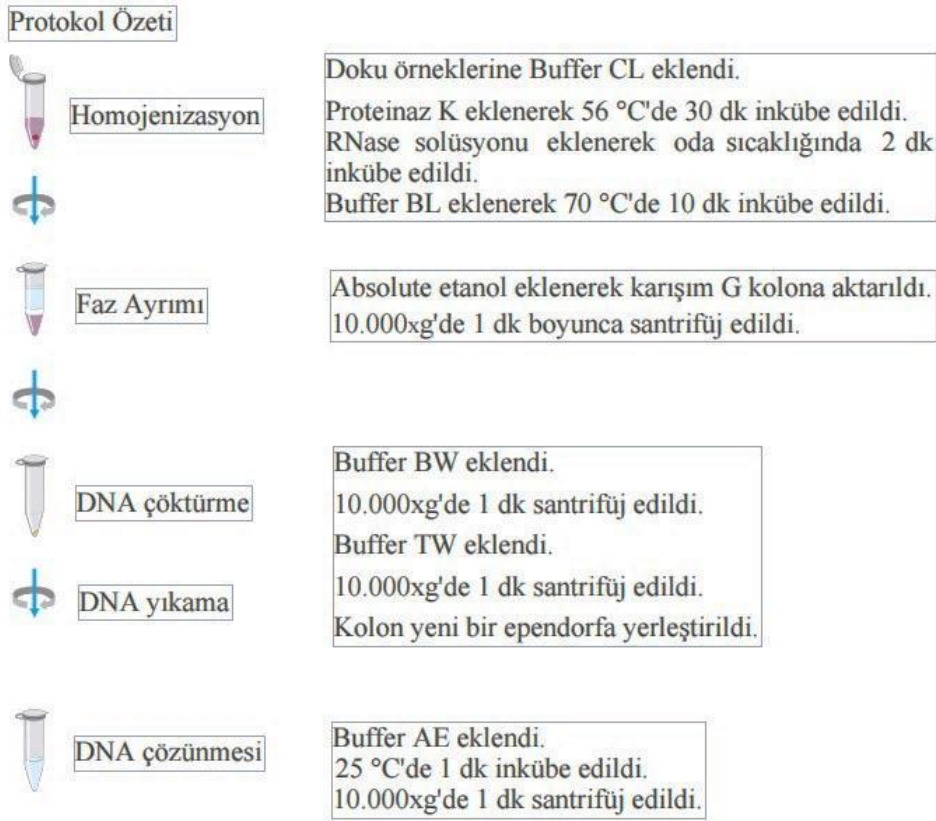
3.2.1. Dokudan genomik DNA izolasyonu

DNA analizlerinde kullanılmak üzere ayrılan hasta ve kontrol gruplarına ait doku örnekleri çıkartıldı. Dokudan DNA izolasyonu için GeneALL Clinic SV Mini (108-101) marka kit kullanılmış olup, izolasyon basamakları için üretici firmanın öngördüğü protokol uygulanmıştır (Şekil 3.2.)

DNA izolasyonu aşamaları:

1. Steril bir petri kabı içerisine alınan dokular, bir bistüri yardımıyla çok küçük parçalara ayrılarak homojen hale getirildi. Sonra her bir örnek 1,5 ml'lik ependorf tüplerine alındı.
2. Örneklerin üzerine 200 µl Buffer CL eklenerek 15 sn boyunca vorteks yapıldı.
3. Her bir örneğe 20 µl Proteinaz K eklenip, vortekslenerek iyice karışması sağlandı.
4. Örnekler tamamen parçalanana kadar 56°C'de 15-30 dk arasında inkübasyona bırakıldı.
5. Her bir örneğin üzerine RNaz solüsyonu (20 mg/ml, Cat.No.391-001) eklenerek vortekslendi ve 2 dk oda sıcaklığında bekletildi.
6. Her bir tüpün içerisine 200 µl Buffer BL eklendi. Vorteks yapıldı ve 70°C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı.
7. Sonra tüplere 200 µl 100% etanol eklendi ve vorteks ile iyice karıştırıldı. Yüksek kalitede DNA eldesi için bu aşamada etanolü iyice karıştırmak önemlidir.

8. Tüm karışım tip G kolona aktarıldı. 10.000 x g'de 1 dk boyunca santrifüj edildi. Kolonun altında yer alan toplama tüpü boşaltılıp kolon geri içine yerleştirildi.
9. Kolona 600 µl Buffer BW eklendi. 10.000 x g'de 1 dk boyunca santrifüj yapıldı ve kolonun altında yer alan toplama tüpü boşaltılıp kolon geri içine yerleştirildi.
10. Kolona 700 µl Buffer TW eklendi. 10.000 x g'de 1 dk boyunca santrifüj yapıldı ve kolonun altında yer alan toplama tüpü boşaltılıp kolon geri içine yerleştirilir.
11. Geride eser miktarda wash buffer (yıkama tampon solüsyonu) kalmasını engellemek için kolona hiçbir şey eklenmeden boş şekilde 10.000 x g'de 1 dk boyunca santrifüj yapıldı. Kolonun altında yer alan toplama tüpü atılıp kolon temiz 1.5 ml ependorfa yerleştirildi.
12. Elüsyon aşaması için her bir ependorf tüpünün içerisine 200 µl Buffer AE eklendi. 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 10.000 x g'de 1 dk boyunca santrifüj yapıldı. Üst kolon atıldı, altta kalan 1.5 ml ependorf kapatılarak daha sonraki analizler için kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

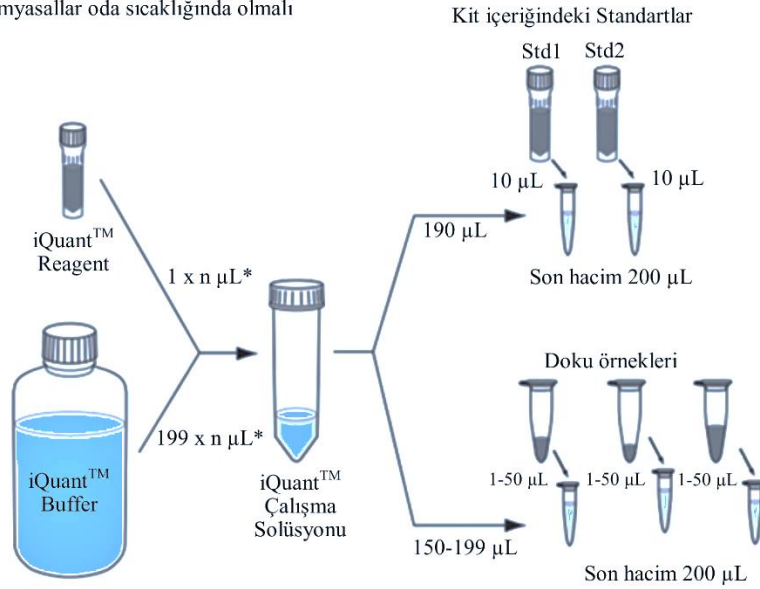


Şekil 3. 2. DNA İzolasyonu protokol özeti şematize olarak gösterimi

Qubit HS DNA ile DNA konsantrasyon ölçümü

ABP iQuant™ dsDNA HS Assay Kit kullanılarak DNA ölçümleri gerçekleştirildi. Ölçümün standardize edilmesi ve doğru yapılması için önce standartlar cihaza tanıtilmelidir. Tüm bileşenler kullanımdan önce oda sıcaklığına getirildi.

Tüm kimyasallar oda sıcaklığında olmalı



Şekil 3. 3. ABP iQuant™ dsDNA HS Assay kiti çalışma prensibi

Yukarıdaki Şekil 3.3'te ifade edildiği gibi öncelikle örnek başına 1µl iQuant Reagent ve 199 µl iQuant buffer karıştırıldı ve vortekslendi. Bu solüsyon hem standartlarda hem de örnek ölçümünde hazırlandı.

Standartlar için 190ul solüsyondan 0.5ml'lik tüplere alındı. 10 µl Standard1 ve Standard2 ayrı ayrı tüplerde hazırlandı ve cihaza standart okumaları yaptırıldı. DNA kiti için Standard 1:0 ng/µl, Standard2:10ng/µl olmalıdır. Bunlar örnekmiş gibi cihaza okuma yaptırılarak kontrol sağlanır.

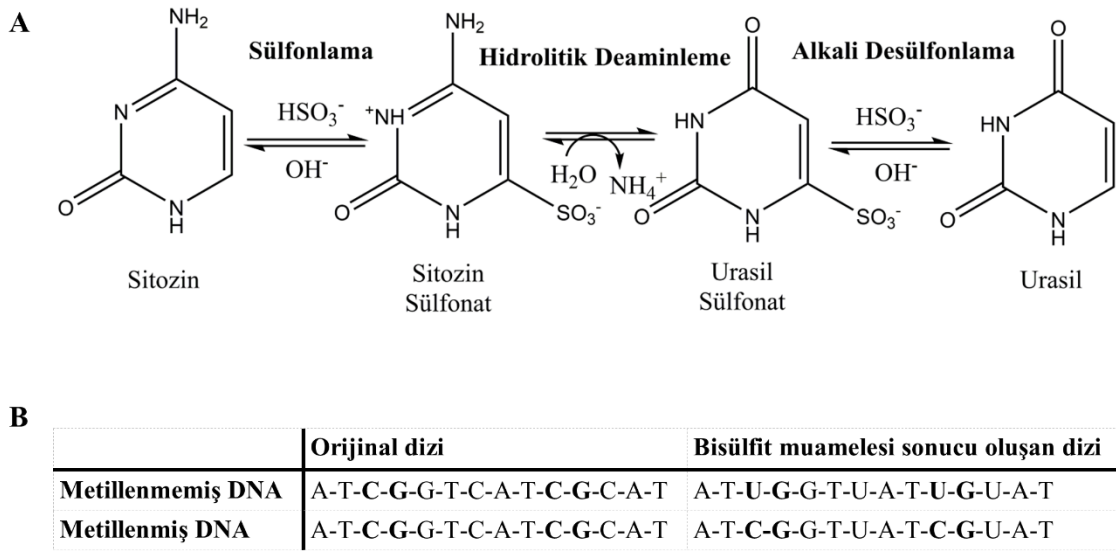
Örnek ölçümü için; elimizdeki miktara göre 1ul-10ul aralığında örnek tüplere alındı, üzeri Working solution ile 200 µl 'ye tamamlandı. Parmakla hafifçe vurularak örneğin iyice karışması sağlandı. Vorteks tercih edilmez.

Böylelikle ölçümleri tamamlanan örnekler sonraki deneysel aşamalar için hazır hale gelmiş oldu.

3.2.2. Metilasyon

DNA izolasyonları ve ölçümleri gerçekleştirilen örnekler metilasyona spesifik PZR için hazır hale getirildi. Metod, bisülfitleme ile muamele edilmiş DNA'nın metile ve unmetile ayrımı yapabilen primerler yardımıyla çoğaltılması ve PZR sonuçlarının jelde görüntülenmesi esasına dayanmaktadır.

Bu çalışma için EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo D5005&D5006) kullanılmıştır.



Şekil 3. 4. Metilasyon işleminin genel mekanizması

Şekil 3.4.'te Metilasyon işleminin genel mekanizması gösterilmiştir. (A)Metilasyon gerçekleşmemiş sitozinler sülfonasyon ile ilk önce sitozin sülfonata sonra urasil sülfonata dönüşür. Daha sonra yapılan desülfonasyon işlemi ile sülfat grubu ayrılır ve sitozinler tamamen urasile çevrilir. (B) Metilasyon olmayan sitozinlerin tamamı bisülfitleme işleminden sonra urasile dönüşürken metile sitozinler (Bold ile gösterilenler) sitozin olarak kalır.

Kit İceriği: CT Conversion Reagent, M-Dilution Buffer, M-Dissolving Buffer, M-Binding Buffer, M-Wash Buffer, M-Desulphonation Buffer, M-Elution Buffer, Zymo-Spin IC Column, Collection Tube

Conversion Reagent Hazırlanışı: CT Conversion Reagent tüpünün içersine, 900 µl distile su, 300 µl M-Dilution Buffer ve 50 µl M-Dissolving Buffer kullanımdan hemen önce eklendi. Vorteks yardımıyla iyice karıştırıldı.

Saklama koşulları: CT Conversion Reagent ışığa karşı hassastır, ışık almayan ortamda saklanmalıdır. En iyi sonuç için CT Conversion Reagent hazırlandıktan hemen sonra kullanılmalıdır. Eğer kullanılmadıysa, solüsyon oda sıcaklığında 1 gün boyunca, 4°C’de bir hafta ya da -20°C’de bir aya kadar saklanabilir. Saklanan solüsyon kullanımdan önce 37°C’ye getirilmeli ve vorteks yapılmalıdır.

M-Wash Buffer hazırlanışı: 6 ml M-Wash Buffer konsantresine (D5005) 24 ml 100% etanol eklenerek hazırlandı.

Bisülfitleme işlemi:

1. PZR tüplerine 20’şer µl DNA örneği alınarak, her bir tüpün içersine 130 µl CT Conversion Reagent eklendi. Pipetaj yaparak ve tüpe hafifçe vurarak örnek karıştırıldı. Daha sonra örneğin tüp çeperlerinde kalmaması için hızlıca santrifüj yapıldı.

2. örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi ve aşağıdaki adımlar izlendi:

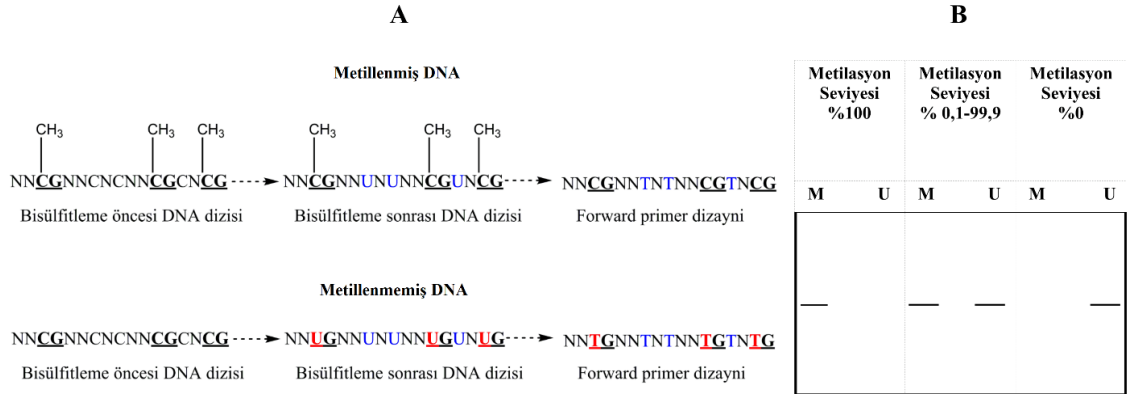
98°C ‘de 10 dk

64°C ‘de 2.5 saat

4°C ‘de 20 saate kadar saklama

3. 600 µl M-Binding Buffer Zymo-Spin™ IC Column kolona eklendi ve kolon toplama tüpüne yerleştirildi.
4. Termal döngü cihazından alınan örnekler M-Binding Buffer içeren Zymo-Spin™ IC kolona aktarıldı. Kapağı kapatılarak birkaç kez invert (tersyüz) edildi.
5. Maksimum hızda ($>10,000 \times g$) 30 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpü içerisindeki sıvı boşaltıldı.
6. Kolona 100 µl M-Wash Buffer eklendi. 30 sn maksimum hızda santrifüj yapıldı.
7. 200 µl M-Desulphonation Buffer kolona eklendi ve oda sıcaklığında (20-30°C) 15-20 dakika inkübe edildi. Daha sonra maksimum hızda 30 sn santrifüj yapıldı.
8. Kolona 200 µl M-Wash Buffer eklendi. Maksimum hızda 30 sn santrifüj yapıldı. Bu adım 200 µl M-Wash Buffer eklenerek tekrarlandı.
9. Kolon 1.5 ml temiz ependorfa koyuldu. 10 µl M-Elution Buffer direkt olarak kolonun ortasına gelecek şekilde eklendi. DNA eldesi için 30 sn boyunca maksimum hızda santrifüj yapıldı.
10. Elde edilen DNA'lar çalışma aşamasına kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Metilasyona Spesifik PZR ve Agaroz Jelde Yürütülmesi



Şekil 3. 5. A) Metilasyona spesifik PZR genel mekanizma ve primer seçimi. B) PZR sonrası beklenen agaroz jel elektroforez görüntüleri

Tablo 3. 1. Primer dizileri ve bilgileri

CDH1-M-F	TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT	Tm: 58°C
CDH1-M-R	TAACTAAAAATTCACCTACCGAC	Tm: 55°C
CDH1-UM-F	TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT	Tm: 55°C
CDH1-UM-R	CACAACCAATCAACAACACA	Tm: 53°C

Primerler stok konsantrasyonu 100µM olacak şekilde sulandırıldı. Daha sonra stok primer konsantrasyonları 10µM konsantrasyon olacak şekilde dilüe edildi. (10µl stok+ 90 µl dH₂O)

Tablo 3. 2. PZR reaksiyonu koşulları

2X PZR Master Mix	10 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 ul
dH ₂ O	3 µl
DNA örneği	5 µl
Toplam	20 µl

*1 örneklik reaksiyon için olan miktarlardır.

Uygulanan PZR programı

95°C 2 dk	}	45 döngü
95°C 30 sn		
55°C 30 sn		
72°C 30 sn		
72°C 10 dk		

PZR sonucunda örnekler %2'lik agaroz jelde yürütüldü. Jel 5 gr agaroz +100 ml TBE buffer ile hazırlanmış olup agaroz eritildikten sonra 10 µl DuGreen eklendi. Jel donduktan sonra 110V'da 30 dk yürütüldü.

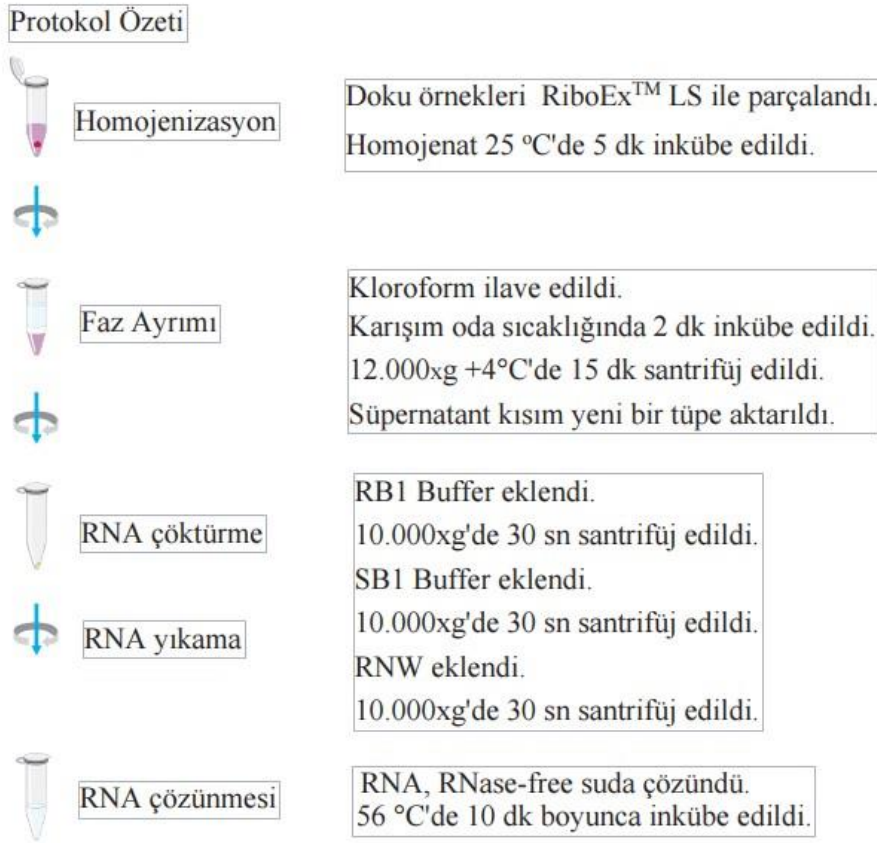
3.2.3. Dokudan mRNA izolasyonu

mRNA izolasyonu için, GeneAll marka RiboEx (301-001) ve Hybrid-R (305-101) kitleri kullanılmış olup, izolasyon aşamaları aşağıda verildiği gibi kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

mRNA izolasyon protokolü;

1. Doku örnekleri bistüri ile küçük parçalara ayrılarak homojenize edildi ve üzerlerine 1 mL RiboEx eklenerek vortekslendi.
2. Daha sonra örnek karışımları oda ısısında 5 dk. inkübe edildi.
3. Karışım 11.000rpm, 10 dk. 4°C'de santrifüj yapıldı ve süpernatant başka bir tüpe aktarıldı.
4. Karışım üzerine 200 µL kloroform eklenip karıştırıldı ve 2 dk. inkübe edildi.
5. +4°C de 12.000×g'de 15 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant temiz bir tüpe alındı.
6. Süpernatantın hacmi kadar RB1 Buffer eklendi. Pipetaj yapılarak karıştırıldı.

7. 700 μ L karışım kolona aktarıldı.
8. 10.000 $\times$ g'de 30 sn. santrifüj yapıldı. Toplama tüpü yenisi ile değiştirildi.
9. Kolon üzerine 500 μ L SW1 Buffer eklendi.
10. 10.000 $\times$ g de 30 sn. santrifüj yapıldı. Toplama tüpü yenisi ile değiştirildi.
11. Kolon üzerine 500 μ L RNW Buffer eklendi.
12. 10.000 $\times$ g de 30 sn. santrifüj yapıldı. Toplama tüpü yenisi ile değiştirildi.
13. Kolon içinde kalan yıkama solüsyonlarını uzaklaştırmak için 10.000 $\times$ g de 1 dk. santrifüj yapıldı. Daha sonra kolon temiz bir tüpe alındı.
14. Kolon üzerine 50 μ L RNaz-free su eklendi ve 1dk. oda sıcaklığında bekletildi.
15. Sonra 10.000 $\times$ g de 1 dk. santrifüj yapılarak elde edilen mRNA örnekleri saklanmak üzere -80°C sıcaklıkta donduruldu.



Şekil 3. 6. RNA izolasyonu protokol özeti şematize edilmesi

Oubit HS RNA ile mRNA konsantrasyon ölçümü

ABP iQuant™ RNA HS Assay kiti kullanılarak RNA ölçümleri gerçekleştirildi. Aynen DNA ölçümü için gerekli olan işlemler yapıldı. Ölçümün standardize edilmesi ve doğru yapılması için önce standartlar cihaza tanıtılmalıdır. Tüm bileşenler kullanımdan önce oda sıcaklığına getirildi. Öncelikle örnek başına 1 µl iQuant Reagent ve 199 µl iQuant buffer karıştırıldı ve vortekslendi. Bu solüsyon hem standartlarda hem de örnek ölçümünde hazırlandı.

Standartlar için 190 µl solüsyondan 0.5ml'lik tüplere alındı. 10 µl Standard1 ve Standard2 ayrı ayrı tüplerde hazırlandı ve cihaza standart okumaları yaptırıldı. RNA kiti

için Standard 1:0 ng/μl, Standard2:10ng/μl olmalıdır. Bunlar örnekmiş gibi cihaza okuma yaptırılarak kontrol sağlanır.

Örnek ölçümü için; elimizdeki miktara göre 1μl-10μl aralığında örnek tüplere alındı, üzeri Working solution ile 200 μl 'ye tamamlandı. Parmakla hafifçe vurularak örneğin iyice karışması sağlandı. Vorteks tercih edilmez.

Böylelikle ölçümleri tamamlanan örnekler sonraki deneysel aşamalar için hazır hale gelmiş oldu.

3.2.4. cDNA sentezi

mRNA izolasyonu sonrasında, cDNA sentezi aşamasına geçilmiştir. cDNA sentezi için A.B.T. marka cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity) (C03-01-05) kiti kullanılmış olup, sentez işlemi için üretici firmanın kit protokolü uygulanmıştır.

- İki aşamada cDNA sentezi yapıldı.

1. cDNA sentezi için kullanılan kitin miktar bilgileri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 3. 3. Revers transkriptaz reaksiyon hacmi (20 μl)

10X Reaction Buffer	2 μl
dNTP Mix(2.5 mM)	1 μl
Random hexamer	2 μl
Reverse Transcriptase (200U/μl)	1 μl
RNase Inhibitor	0.5 μl
RNase free Water	3.5 μl
RNA örneği	10 μl

2. cDNA mastermix buz üzerinde hazırlandıktan sonra aşağıdaki koşullar takip edilmiştir.

Tablo 3. 4. cDNA sentezi için uygulanan PZR programı

RT Adımları	Sıcaklık(°C)	Zaman	Döngü
Adım 1	25	10 min	1
Adım 2	37	120 min	1
Adım 3	85	5 min	1
Adım 4	4	∞	1

Elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PZR aşamasına kadar -80°C’de donduruldu.

Qubit HS dbDNA ile cDNA konsantrasyon ölçümü

ABP iQuant™ dbDNA HS Assay kiti kullanılarak cDNA ölçümleri gerçekleştirildi. Aynen DNA ölçümü için gerekli olan işlemler yapıldı. Ölçümün standardize edilmesi ve doğru yapılması için önce standartlar cihaza tanıtılmalıdır. Tüm bileşenler kullanımdan önce oda sıcaklığına getirildi. Öncelikle örnek başına 1µl iQuant Reagent ve 199 µl iQuant buffer karıştırıldı ve vortekslendi. Bu solüsyon hem standartlarda hem de örnek ölçümünde hazırlanmalıdır.

Standartlar için 190 µl solüsyondan 0.5ml’lik tüplere alındı. 10 µl Standard1 ve Standard2 ayrı ayrı tüplerde hazırlandı ve cihaza standart okumaları yaptırıldı. cDNA kiti için Standard 1:0 ng/µl, Standard2:10ng/µl olmalıdır. Bunlar örnekmiş gibi cihaza okuma yaptırılarak kontrol sağlanır.

Örnek ölçümü için; elimizdeki miktara göre 1µl-10µl aralığında örnek tüplere alındı, üzeri Working solution ile 200 µl ‘ye tamamlandı. Parmakla hafifçe vurularak örneğin iyice karışması sağlandı. Vorteks tercih edilmez.

Böylelikle ölçümleri tamamlanan örnekler sonraki deneysel aşamalar için hazır hale gelmiş oldu.

3.2.5. qRT-PZR aşaması

İzole edilen RNA'lerden cDNA eldesinden sonra ekspresyon analizi için real time PZR aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada hedef E-kaderin geni için kontrol ve çalışma grupları ile kontrol primeri olarak beta-aktin kullanıldı. Reaksiyon karışımı olarak A.B.T.™ 2X qPZR SYBR-Green MasterMix (with ROX) (Cat no: Q03-02-01) kullanılmıştır.

Reaksiyon karışımı aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

Tablo 3. 5. PZR reaksiyonu bileşenleri (20 µl)

A.B.T.™ 2X qPZR SYBRGreen MasterMix (with ROX)	10 µl
1X ROX Dye (50X)	0.4 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
Kalıp cDNA	3 µl
Rnase-free Water	4.6 µl

Reaksiyon döngüsü Applied Biosystems Real Time PZR cihazında aşağıdaki gibi ayarlanmıştır:

Uygulanan qRT-PZR programı

50°C 20 sn

95°C 10 dk

95°C 15 sn

55°C 1 dk

40 cycle

Melt Curve: 95°C 30 sn, 60°C 15 sn

3.2.6. Dokudan protein izolasyonu

Dokudan total protein izolasyonu için GeneAll marka ProtinEx (Cat: 701-001) kiti kullanılarak izolasyon aşamaları üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

İzolasyon aşamaları;

- 1- Steril petri kablarına alınan her bir doku örneği bir bistürü yardımıyla küçük parçalara ayrıldı.
- 2- Her bir doku örneğinin üzerine 1000 µl ProteinEx Animal cell/tissue solüsyonu ilave edildi. 2 dk vortekslenerek karıştırıldı.
- 3- Örnekler buzdolabında -20°C’de 5 dk boyunca bekletildi.
- 4- Daha sonra üzerlerine 10 µl proteaz inhibitör kokteyli eklendi.
- 5- Soğutmalı santrifüjde 16.000 x g, 4°C de 10 dk. santrifüj edildi.
- 6- Süpernatant yeni bir ependorf tüpüne alınarak izolasyon işlemi tamamlandı.
- 7- Sonrasında protein örnekleri -80°C’de muhafaza edildi.

Protein miktarının ölçümü

Protein miktar ölçümü Qubit® Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, Cat No: Q33211) kiti kullanılarak üretici talimatlarına göre Qubit® 3.0 Fluorometer cihazı (Thermo Fisher Scientific, Cat No: Q33216) kullanılarak gerçekleştirildi.

Örneklerin Jele Yüklenmesi ve SDS-Page Elektroforez

1. XCell SureLock dikey jel sistemi tankı (Invitrogen) içerisine yerleştirildi. %4-12’lik Bis-Tris gradient jeli (Invitrogen, NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel, Cat: NP0321PK2) plastik ambalajından çıkartılıp, jel kaseti üzerinde yer alan beyaz bant söküldü ve jel kuyucuklarını bozmadan jel tarağı dikkatlice çıkarıldı.

2. Bir mezür yardımıyla 20X MES Running Buffer'dan (ThermoFisher, B0002) 50 ml alınıp üzerine 950 ml distile su ekleyerek 1X MES buffer'a sulandırıldı.
3. 200 ml 1X MES Running Buffer içerisine 500 µl NuPAGE™ Antioxidant (Invitrogen, NP0005) eklenerek buffer core içerisine ilave edildi. Tankın içerisine buffer core dışına ise 600ml 1X MES Running Buffer eklendi.
4. Örnekleri yüklemekten önce 200 µl'lik pipete temiz bir pipet ucu takıldı ve kuyucuklar pipetaj yapılarak temizlendi.
5. Jel kasetinde yer alan kuyucuklardan en başta ki ve sondakine 5 µl marker (Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder, Biolegend, Cat No: 773301) yüklendi.
6. Kalan kuyucuklara hazırlanan protein örneğinden 20 µl protein örneği yüklendi.
7. Dikey elektroforez sistemi ile güç kaynağı elektrot kabloları ile bağlandı. Güç kaynağı jel üretici firmasının önerileri doğrultusunda 200 Volt, 135 miliamper (mA) ortamında 35 dk. yürütüldü.

3.2.7. Western blotlama

1. Yürütme işlemi sonunda jel güç kaynağı ve dikey jel sisteminin elektrot kabloları güç kaynağından çıkarılıp kapağı açıldı. Jel sıkıştırma aparatı çıkarıldıktan sonra jel kaseti çıkarıldı.
2. Jel kaseti, jel bıçağı kullanılarak kenar bağlantıları kopartılarak açıldı. Jelin tarak kısımları ve alt tarafında ki kalın jel kesilerek uzaklaştırıldı. İçerisinde distile su bulunan bir kap içerisine dikkatlice yerleştirildi.
3. Blotlama kısmında iblot gel transfer sistemi kullanıldı. Iblot transfer stack Nitrocellulose (NC) kitinde (Invitrogen, IB301001) yer alan Anot Stack plastiği

ile birlikte cihaza yerleştirildi. Anot stack üzerinde yer alan membran üstüne dikkatli bir şekilde jel yerleştirildi. Kit içerisinde yer alan filtre kağıdı distile su ile ıslatılarak jelin üstüne konuldu. Hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Kit içerisinde yer alan katot stack plastiğinden uzaklaştırıldı ve bakır yüzey yukarı/jelimsi yüzey ıslak filtre kağıdına bakacak şekilde filtre kağıdının üzerine dikkatlice yerleştirildi. Roller kullanarak hava kabarcıklarını tekrar uzaklaştırıldı. Kit içerisinde yer alan sünger üzerindeki metal, Iblot cihaz kapağının sağ tarafında yer alan elektroda denk gelecek şekilde kapağa yerleştirildi ve kapağı dikkatlice kapatıldı. Program düğmesinden P3 programı seçildi ve 7 dk'lık süre de işlem tamamlandı.

4. Transfer işleminin gerçekleştiği marker bantlarının hepsinin membrana geçmiş olduğu gözlenerek kontrol edildikten sonra nitroselüloz membran dikkatli bir şekilde distile su içerisine alındı.

Bloklama

1. Bloklama işleminde kullanılmak üzere %0.1 Tween-20 içeren PBS-T solüyonu içerisine %5 oranında BSA (Bovine Serum Albumin) eklenerek bloklama solüyonu hazırlandı.
2. Hazırlanan bloklama solüsyonundan 10 ml temiz bir kap alınarak içerisine alındı. Nitroselüloz membran bloklama solüsyonu (%5 BSA-PBST) içerisine alındı.
3. Membran, karıştırıcı kullanılarak hafif şekilde çalkalanarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

Yıkama

Bloklama işlemi bittikten sonra bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı. Daha sonra membran PBST içerisinde 3 kere 5dk çalkalayıcı içerisinde hafifçe çalkalanarak yıkandı.

Primer Antibody Uygulanması

Tablo 3. 6. Kullanılan antikorlar ve sulandırma oranları

Marka	Kat No.	Host	Antikor	MW	Dilüsyon oranı
St. John's Laboratory	STJ91464	Rabbit	Anti-beta Aktin Antibody	42 kDa	1:1000
Anti-E-cadherin antibody	STJ97370	Rabbit	Anti E-cadherin Antibody	130 kDa	1:1000

Tablo 3.6'da bilgileri verilen antikorlar bloklama solüsyonu (%5BSA-PBST) kullanılarak sulandırıldı.

1. 500 kat sulandırma yapmak için 20 µl primer antikor üzerine 9.980 µl %5BSA-PBST eklendi.
2. 1000 kat sulandırma yapmak için 10 µl primer antikor üzerine 9.990 µl %5BSA-PBST eklendi.
3. Yıkama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra membran 10 ml dilüe edilmiş primer antikor içerisinde gece boyunca +4 °C'de inkübe edildi.
4. Ertesi gün +4 °C'den çıkarılan membranlar 2 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde hafifçe çalkalanarak inkübasyona devam edildi.

Sekonder Antikor Uygulanması

1. Sekonder antibody (Goat-anti-rabbit IgG (H+L), HRP conjugate, Advansta, Cat No:R05072-500) bloklama solüsyonu (%5BSA-PBST) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda 10.000 kat sulandırıldı.
2. 10.000 kat sulandırma yapmak için 1 µl sekonder antikor üzerine 9.999 µl %5BSA-PBST eklendi.
3. Yıkama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra membran 10 ml dilüe edilmiş sekonder antikor içerisinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

Yıkama

Sekonder antibody inkübasyonu bittikten sonra sekonder antikor solüsyonu uzaklaştırıldı. Daha sonra membran PBST içerisinde 3 kere 5 dk. çalkalayıcı içerisinde hafifçe çalkalanarak yıkandı.

Görüntüleme

1. Yıkama işlemi bittikten sonra membranlar 6 ml ECL Solüsyonu (NZY Supreme ECL HRP Substrate, Nzytech, Cat No: Mb19301) içerisinde alınarak görüntüleme cihazına (ChemiDoc-It2, UVP) yerleştirildi.
2. Her iki antikor uygulaması için membranlardan ECL içerisinde 1 dk. inkübasyon sonrasında görüntü alındı.

4. BULGULAR

4.1. ÇALIŞMA GRUPLARINA AİT BULGULAR

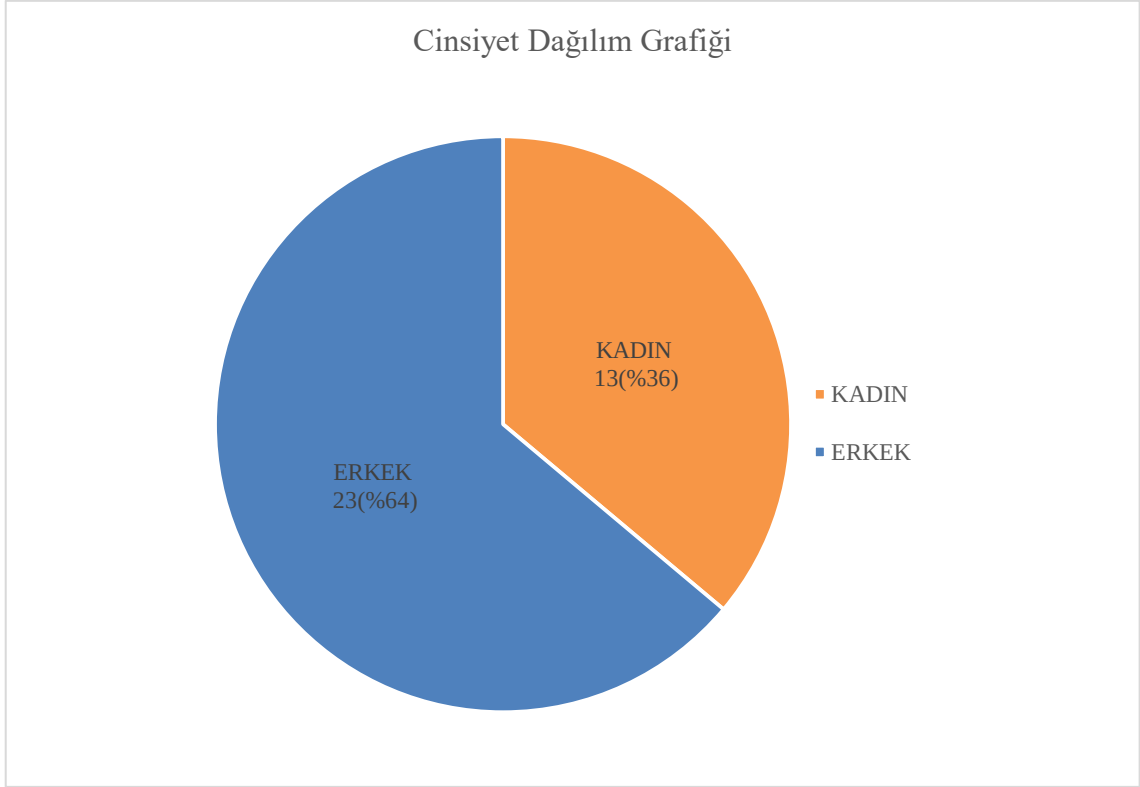
Bu çalışmaya Ocak 2018-Ocak 2020 yılları arasında Tokat Gaziosmanpaşa Üniversite Hastanesinde Göz Hastalıkları Polikliniğine başvuran ve pterjiyum tanısı koyulan 36 hasta dâhil edildi. Çalışma grubu olarak; pterjiyumlu dokunun baş kısmı birinci grup, pterjiyumlu dokunun gövde kısmı ikinci grup, üçüncü grup olarak ise, hastaların aynı gözüne ait sağlıklı konjonktiva dokuları oluşturuldu. Çalışmanın tamamı Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik laboratuvarlarında yapıldı.

Çalışmaya dahil edilen hastaların 13'i (%36) kadın, 23'si (%64) erkek olup, yaş aralığı 27-93 arasında değişkenlik göstermekle birlikte yaş ortalamaları $56 \pm 13,84$ olarak saptanmıştır. Pterjiyumlu hasta vakalarının 12'si (%40) sol göz, 24'i (%60) sağ göz kaynaklıydı.

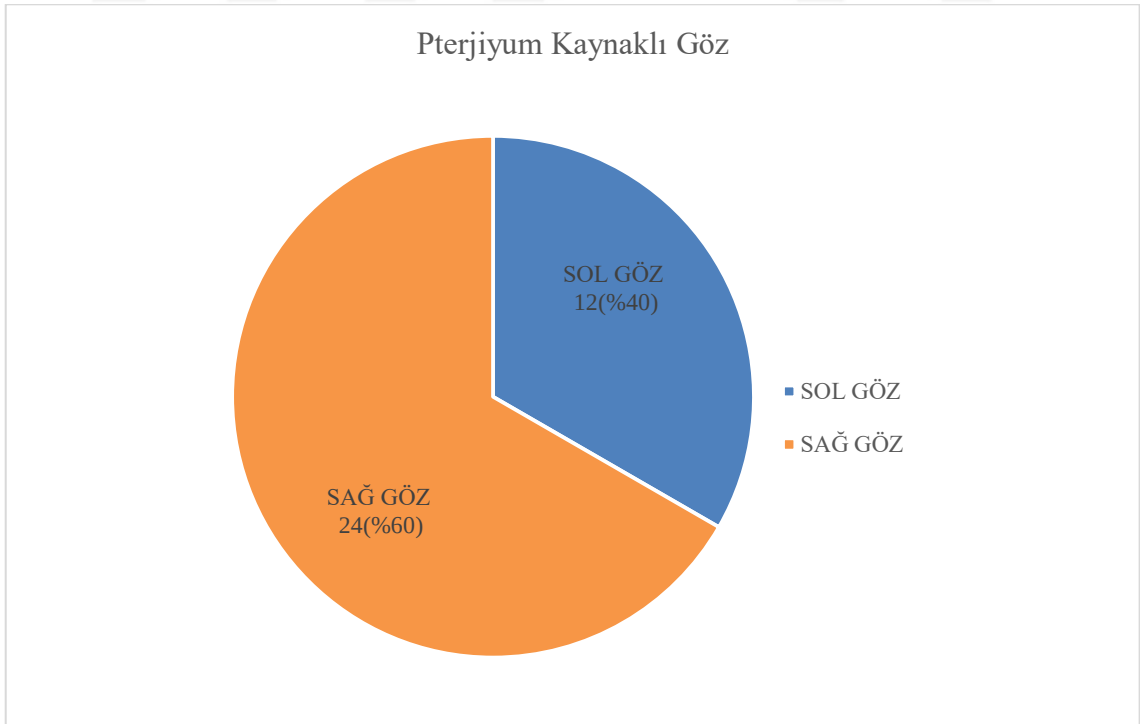
Çalışmaya dahil edilen pterjiyumlu hastalara ait demografik veriler Tablo 4.1, Şekil 4.1 ve Şekil 4.2. 'de verilmiştir.

Tablo 4. 1. Pterjiyumlu hasta gruplarına ait demografik veriler

Pterjiyum (n=36)	
Yaş	$56 \pm 13,29$
Cinsiyet	13 K/ 23 E
Sağ/Sol Göz	24 Sağ/12 Sol Göz

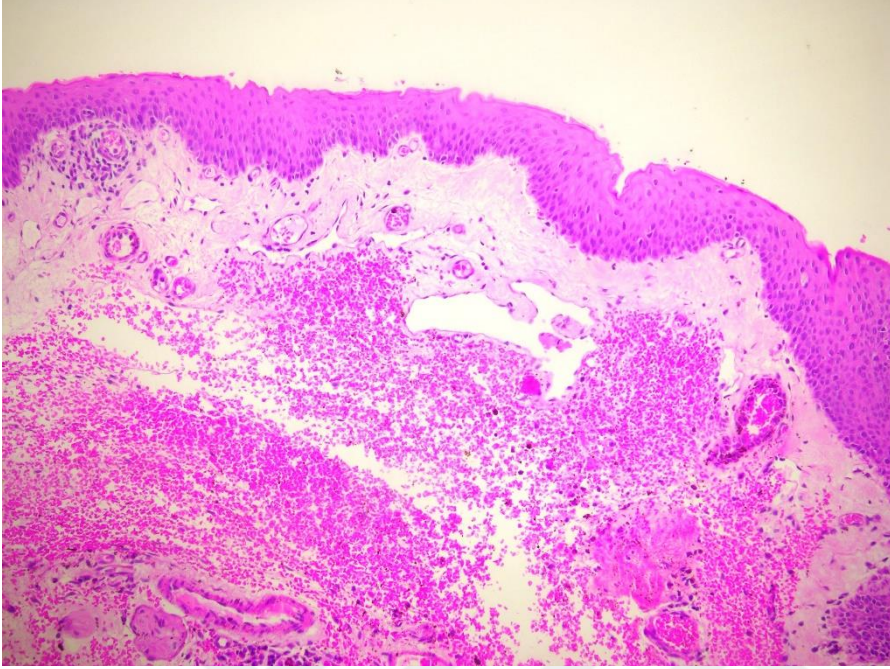


Şekil 4. 1. Pterjiyumlu hasta gruplarına ait cinsiyet dağılım grafiği



Şekil 4. 2. Pterjiyumlu hasta gruplarına ait dokusu alınan göz

4.2. PTERJİYUMLU DOKULARA AİT HİSTOPATOLOJİK İNCELEME



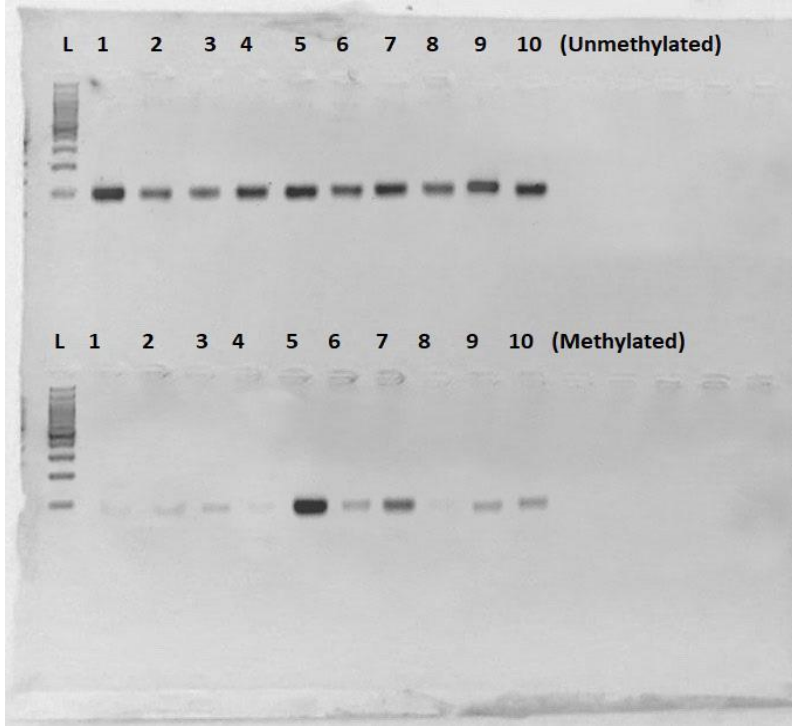
Şekil 4. 3. Pterjiyumlu dokuya ait histopataolojik görüntü (H&E, X100).

Yukarıdaki Şekil 4.3.'te verilen pterjiyumlu dokuya ait histopatolojik görüntüde, konjonktiva epiteli altındaki stromal alanlarda çok sayıda konjesyone ektazik kapiler vasküler alanlar tespit edilmiştir.

4.3. METİLASYONA SPESİFİK PZR (MSP) ANALİZ BULGULARI

4.3.1. E-CAD genine ait jel görüntülerinin incelenmesi

Pterjiyum ve normal konjonktiva dokularına ait E-CAD geni promotör metilasyon jel görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4. 4. E-CAD geni MSP analizi sonrası agaroz jel görüntüsü

E_CAD geni promotör bölgesinin MSP analizi sonrasında %2'lik agaroz jel görüntüsü. L:ladder (100bp), 1-5 arası kuyular: konjonktiva dokusu, 6-10 arası kuyular: peritoneum dokusu

4.3.2. E-CAD geni MSP sonuçlarının istatistiksel analizi

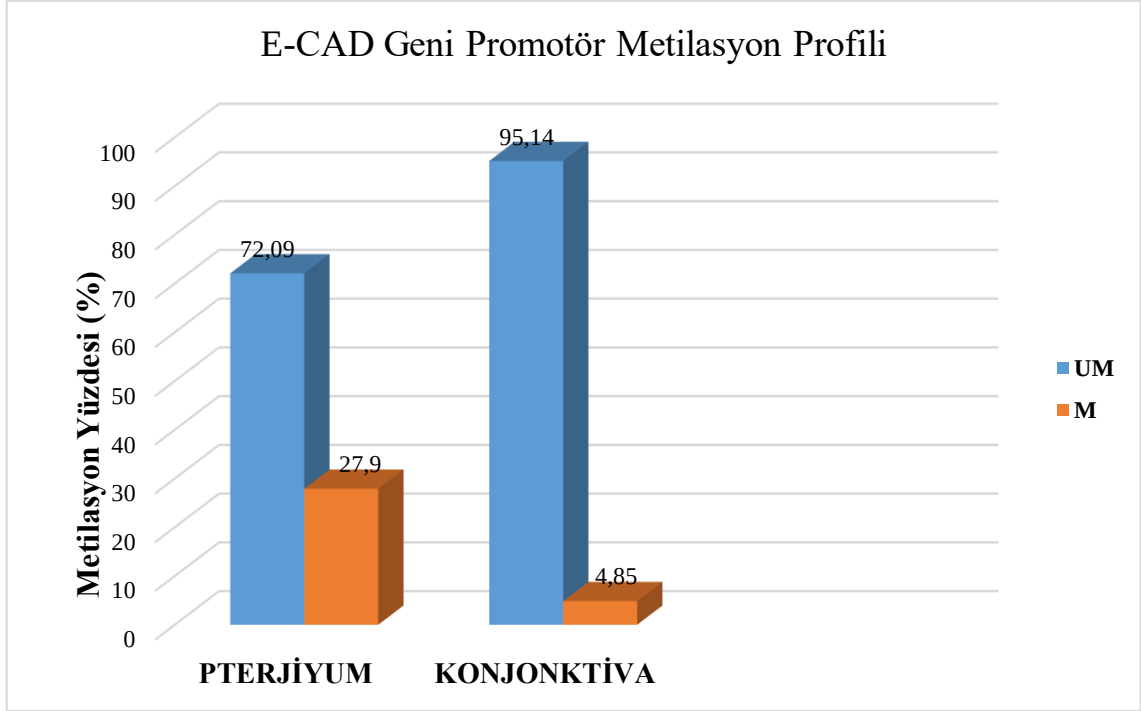
E-CAD geni promotör bölgesi agaroz jel elektroforez görüntülerine göre doku örneklerinin derecelendirmeleri tam metile olan, yarı metile ve metile olmayan şeklinde ifade edildi. Metilasyon yüzdesinin belirlenmesinde yarı metile olanlar tam metile olanlara eklenerek hesaplandı. Metilasyon verilerinin istatistiksel analizi χ^2 testi ile yapıldı. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak 0,05 kabul edilmiş olup, $p \leq 0,05$ ise anlamlı, $p > 0,05$ ise farklılık olmadığı yönünde değerlendirme yapıldı. Analiz sonuçları Tablo 4.2.'te gösterilmiştir.

Tablo 4. 2. E-CAD geni promotör bölgesine ait metilasyon yüzdeleri ve istatistiksel analizi

Doku	Metilasyon yüzdesi (%)	
	UM	M
Pterjiyum	26 (%72,09)	10 (%27,9)
Konjonktiva	34 (%95,14)	2 (%4,85)
P	0,024	

Metilasyon derecelerinin sayıları ve yüzdeleri verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olan veriler koyu renkte ifade edilmiştir. M: metile UM: unmetile

E-CAD geni promotör bölgesi metilasyon yüzdeleri pterjiyumlu ve kontrol konjonktiva dokuları ile karşılaştırıldığında, pterjiyumlu hastaların %72,09'u (26) metillenme gözlemlenmezken, %27,9'u (10) metillenme gözlemlenmiştir. Konjonktiva dokusunda ise, %95,14'ü (34) metillenme gözlemlenmezken %4,85'inde (2) metillenme gözlemlenmiştir (p=0,024). MSP analiz verilerine dayanarak, pterjiyum ve konjonktiva dokuları arasındaki metilasyon yüzde değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Hem pterjiyum hem de konjonktiva dokuları kendi içinde karşılaştırıldığında her iki grup için de belirgin bir şekilde metilasyon yüzdeleri düşük bulunmuştur. Pterjiyumlu dokulardaki metilasyon yüzdesi konjonktiva dokusuna oranla daha yüksek bulunmuştur. Buradan yola çıkarak konjonktiva dokusuna göre pterjiyumlu dokularda metillenme oranının arttığını görmekteyiz.



Şekil 4. 5. E-CAD geni promotör bölgesi metilasyon yüzde profilinin sütun grafiği ile gösterimi (UM: Unmetile M: Metile)

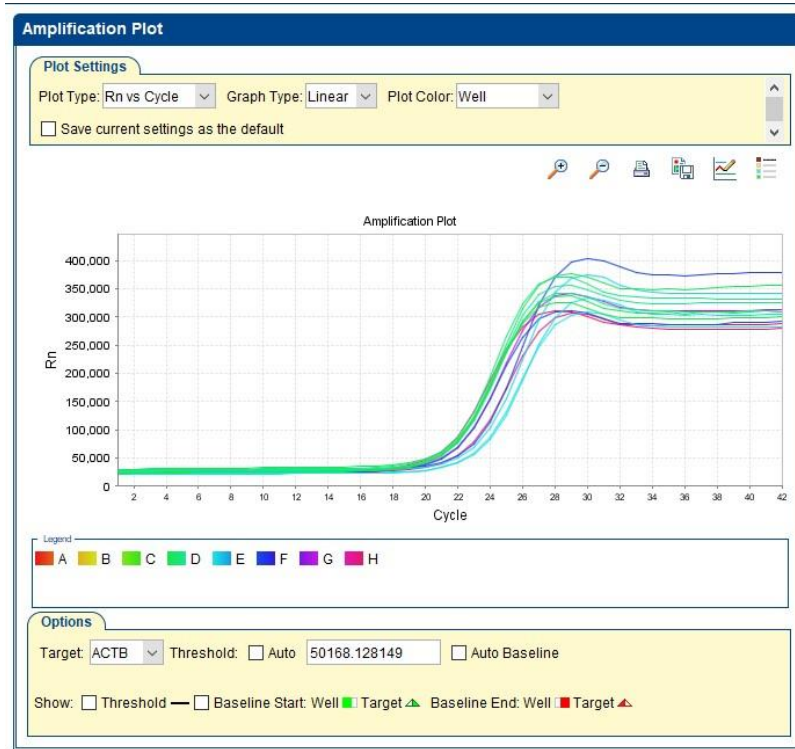
4.4. KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI PZR (qRT-PZR) ANALİZ BULGULARI

4.4.1. E-CAD genine ait qRT-PZR görüntü ve değerlendirilmesi

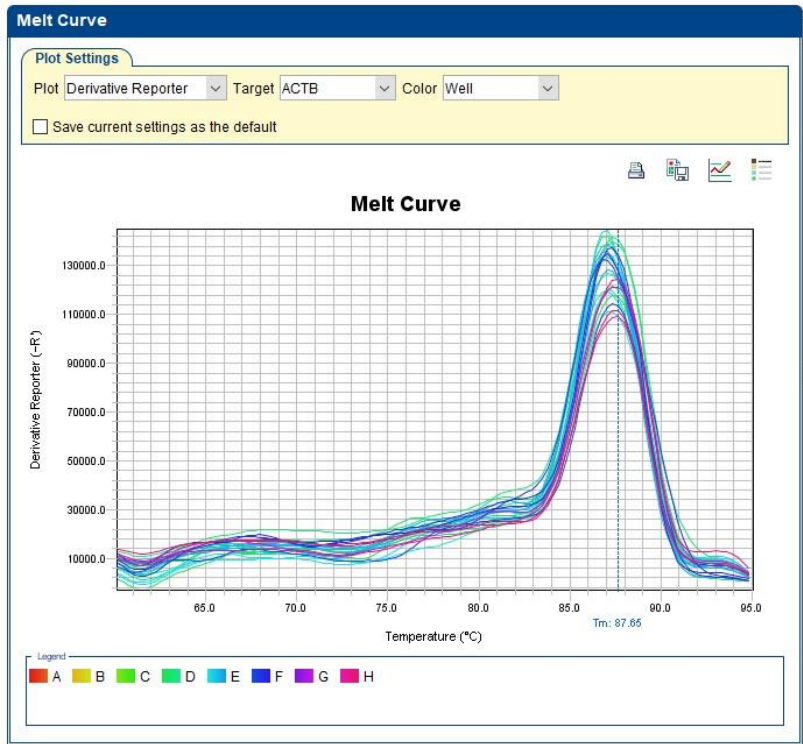
E-CAD mRNA ekspresyon ifade düzeyini belirlemek için SYBR Green temelli kantitatif Real-Time PZR metodu kullanıldı. E-CAD ve referans olarak tercih edilen gen (Aktin: ACTB) için, farklı konsantrasyonlarda cDNA (1/10:1/100:1/1000 ve 1/10000) örnekleri hazırlanarak seri dilusyon yapıldı. Her bir örnek için, Applied Biosystems StepOnePlus cihazında 3 tekrarlı okuma yapılarak amplifikasyon verimlilikleri hesaplandı. Amplifikasyon verimlilikleri hesaplandıktan sonra pterjiyumlu baş, gövde ve kontrol konjonktiva dokularına ait cDNA ve standart örnekleri dahil hepsi 3 tekrarlı çalışıldı ve CT (cycle threshold) değeri ortalamaları alındı. Çalışmada, referans (kontrol) geni olarak;

ACTB geni: negatif kontrol olarak; içerisinde cDNA kalıbı içermeyen Real-Time karışımı ve son olarak pozitif kontrol için; önceden sonucu iyi çıkan bir örnek kullanıldı.

Aşağıdaki şekillerde qRT-PZR sonucunda gözlemlenen ACTB ve E-CAD genine ait sırasıyla amplifikasyon eğrisi ve erime piki verilmiştir (Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9).



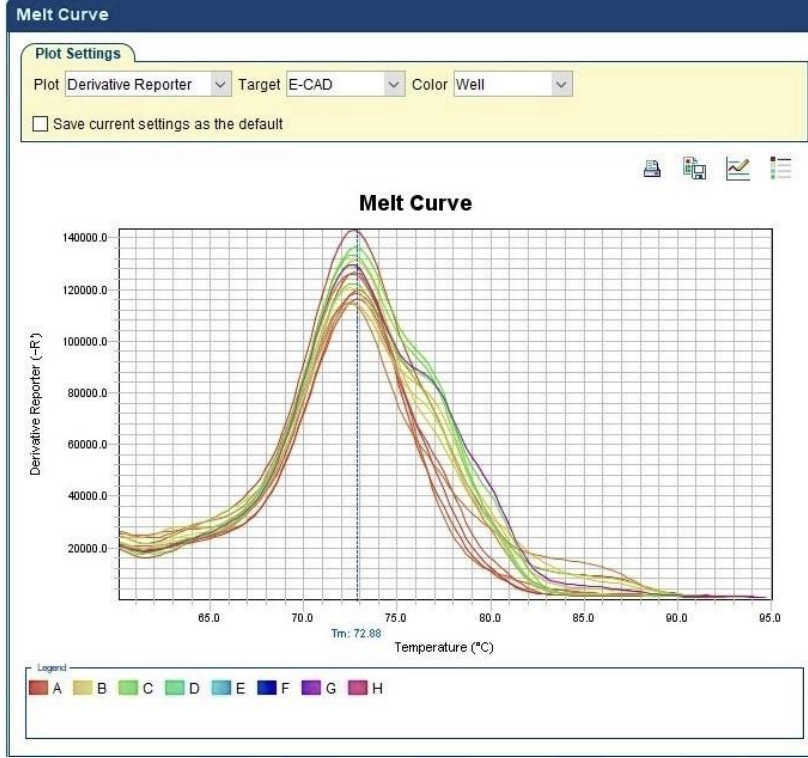
Şekil 4. 6. ACTB genine ait amplifikasyon eğrisi



Şekil 4. 7. ACTB genine ait erime piki



Şekil 4. 8 E-CAD genine ait amplifikasyon eğrisi



Şekil 4. 9. E-CAD genine ait erime piki

4.4.2. E-CAD mRNA genine ait qRT-PCR bulgularının istatistiksel analizi

Baş pterjiyum, gövde pterjiyum ve kontrol konjonktiva dokularında bulunan E-CAD geninin mRNA düzeyinde ifadesi için qRT-PZR analizi gerçekleştirildi. E-CAD ve ACTB genlerinin qRT-PZR sonuçları step one plus software v2.3 programı ile kantifikasyonu gerçekleştirildi. E-CAD genine ait veri ACTB geniyle normalize edilip kat değişikliğinin hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü kullanıldı. Bu işlemde çıkan verilerle istatistiksel analiz gerçekleştirildi. Tüm veriler $\text{ort} \pm \text{SEM}$ olarak verildi. Sonuçların analizi 0,9 – 1,1 aralığına göre yapıldı. 0,9'dan düşük olan değerlerde normal konjonktiva dokusuna oranla pterjiyum dokusunda ilgili geninin ifade düzeyinin azaldığı, 0,9–1,1 aralığında ise normal konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında değişmediği ve 1,1 değerinden yüksek değerlerde ise normal konjonktiva dokusuna oranla genin ifadesinde bir artış olduğu kabul edildi (Schmittgen ve Livak., 2008). Ekspresyon verilerinin

İstatistiksel analiz SPSS 16.0 yazılımı kullanılarak yapıldı. Student t testi ile verilerin anlamlılık düzeyleri analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak 0,05 kabul edilmiş olup, $p \leq 0,05$ ise anlamlı, $p > 0,05$ ise farklılık olmadığı yönünde değerlendirme yapıldı.

Tablo 4. 3. E-CAD baş ve gövde dokularına ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin istatistiksel analizi

Gen	Doku	
	Baş Pterjiyum (n=36)	Gövde Pterjiyum (n=36)
E-CAD (ort $\pm$ SEM)	0,073 $\pm$ 0,03	1,486 $\pm$ 0,45
<i>P</i>	0,005	

Tüm değerler ort $\pm$ SEM şeklinde verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olan veriler koyu olarak ifade edildi.

Tablo 4. 4. E-CAD baş ve konjonktiva dokularına ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin istatistiksel analizi

Gen	Doku	
	Baş Pterjiyum (n=36)	Normal Konjonktiva (n=36)
E-CAD (ort $\pm$ SEM)	0,073 $\pm$ 0,033	
<i>P</i>	0,000	

Tüm değerler ort $\pm$ SEM şeklinde verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olan veriler koyu olarak ifade edildi.

Tablo 4. 5. E-CAD gövde ve konjonktiva dokularına ait $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerlerinin istatistiksel analizi

Gen	Doku	
	Gövde Pterjiyum (N=36)	Normal Konjonktiva (N=36)
E-CAD (ort $\pm$ SEM)	1,486 $\pm$ 0,45	
<i>P</i>	0,296	

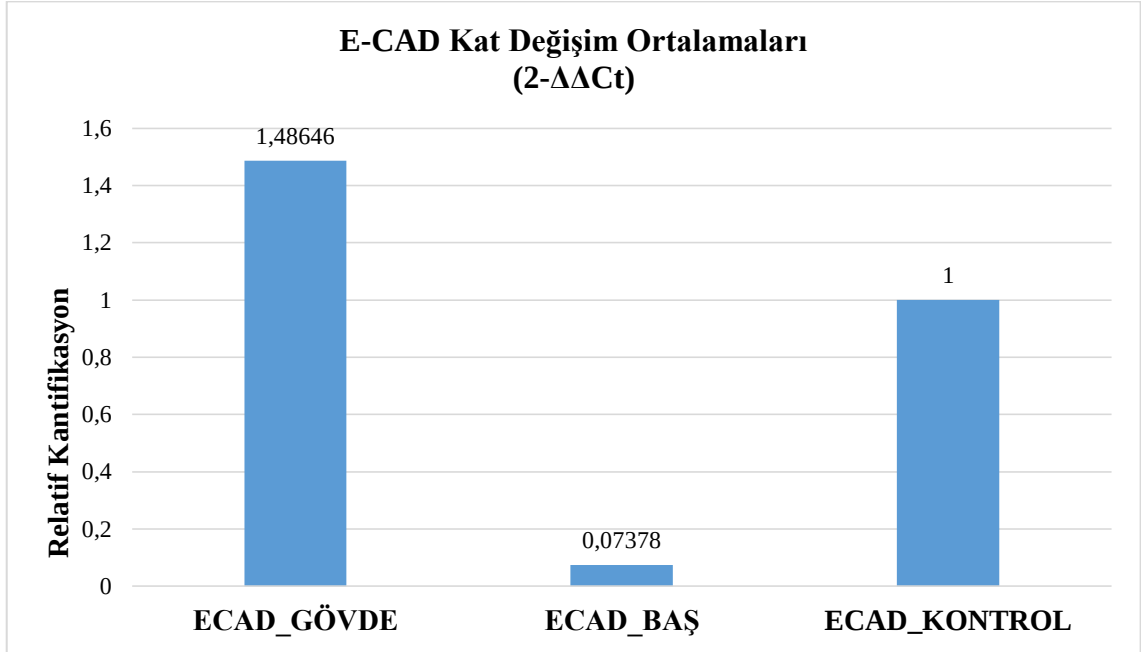
Tüm değerler ort $\pm$ SEM şeklinde verilmiştir.

Yapılan qRT-PZR analiz sonuçlarına göre (Tablo 4.3, Tablo 4.4, Tablo 4.5); E-CAD geninin ekspresyon seviyesi baş pterjiyum ve gövde pterjiyum dokuları ile karşılaştırıldığında, baş pterjiyum dokusunda (0,073 $\pm$ 0,03-kat değişikliği,) azaldığı, gövde pterjiyum dokusunda ise (1,486 $\pm$ 0,45-kat değişikliği, p=0,005) arttığı saptanmış olup, E-CAD geni mRNA ifade düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p $\leq$ 0,05).

E-CAD geninin ekspresyon seviyesi baş pterjiyum ve normal konjonktiva dokuları ile karşılaştırıldığında, baş pterjiyum dokusunda normal konjonktiva dokusuna kıyasla (0,073 $\pm$ 0,03-kat değişikliği, p=0,000) azaldığı saptanmış olup, E-CAD geni mRNA ifade düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p $\leq$ 0,05).

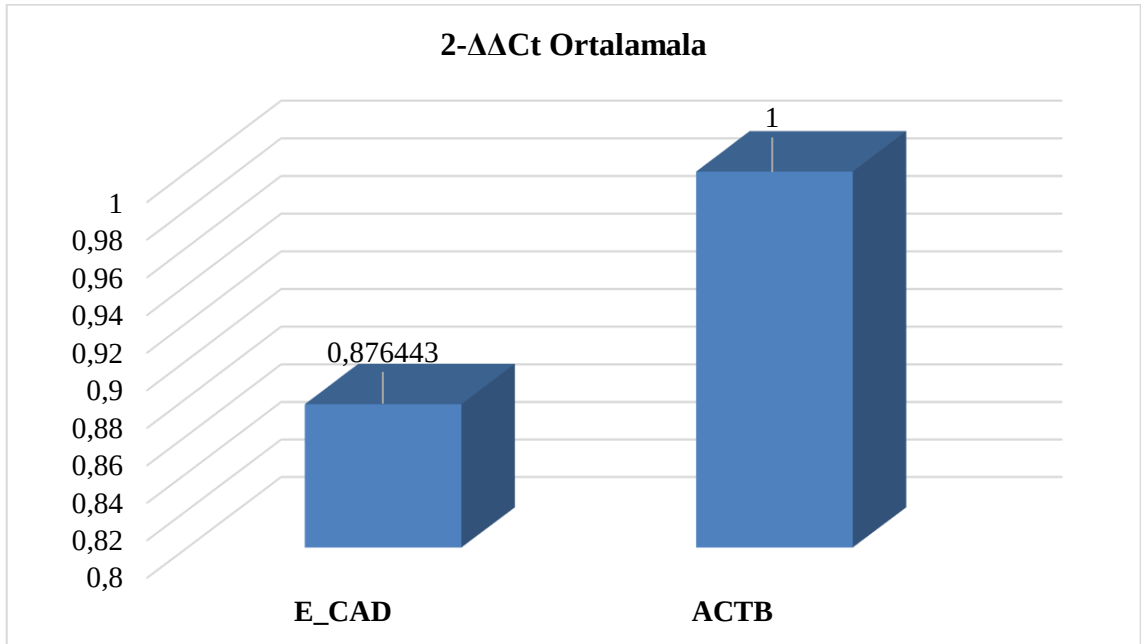
E-CAD geninin ekspresyon seviyesi gövde pterjiyum ve normal konjonktiva dokuları ile karşılaştırıldığında, gövde pterjiyum dokusunda normal konjonktiva dokusuna kıyasla (1,486 $\pm$ 0,45-kat değişikliği, p=0,296) arttığı saptanmış olup, ancak bu

artışın, E-CAD geni mRNA ifade düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4. 10. E-CAD genine ait relatif kantifikasyon ($RQ, 2^{-\Delta\Delta Ct}$) değerlerinin baş, gövde pterjiyum ve konjonktiva dokusundaki dağılımı.

Tüm veriler ortalama olarak verildi. ACTB geni normalizatör olarak kullanıldı.

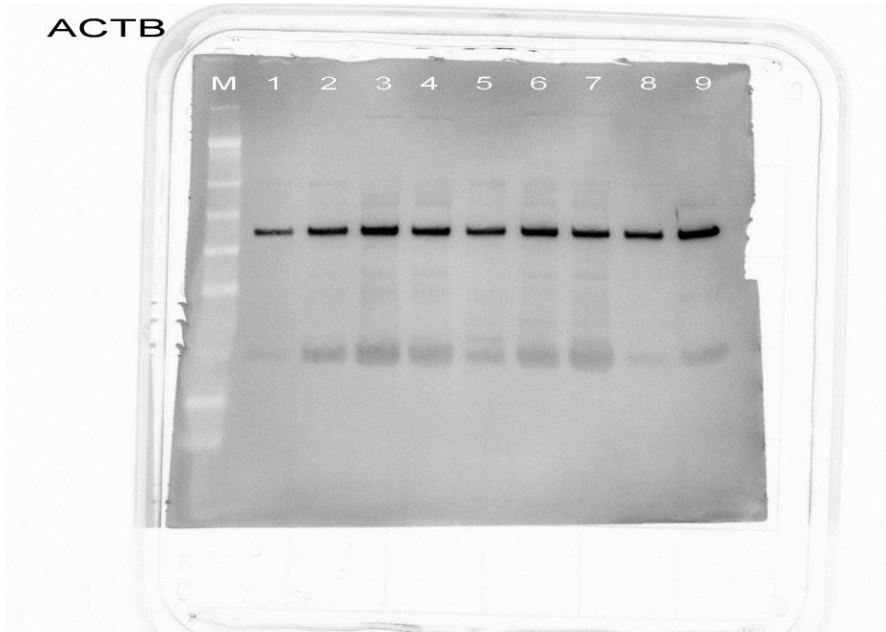


Şekil 4. 11. E-CAD ve ACTB genlerine ait ortalama $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.

4.5. E-CAD GENİNE AİT WESTERN BLOT ANALİZ BULGULARI

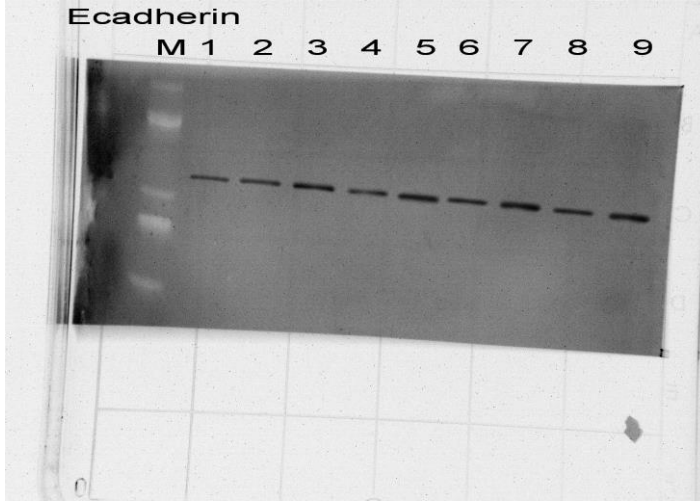
4.5.1. E-CAD genine ait western blot jel görüntüleri ve değerlendirilmesi

Baş pterjium, gövde pterjium ve normal konjonktiva dokularındaki E-CAD protein miktarı western blotlama yöntemiyle belirlendi. Normalizatör olarak ACTB proteini kullanıldı. ACTB ve E-CAD proteinlerine ait western blot jel görüntüleri aşağıda sırasıyla gösterildi (Şekil 4.12, Şekil 4.13).



Şekil 4. 12. ACTB proteinin SDS-PAGE görüntüsü

(M: Marker, 1-9. kuyu: bazı hastalara ait doku örnekleri. %12'lik jelde 120 V'da 50 dk yürütüldü. ACTB primer antikorumun moleküler ağırlığı 42-kDa).



Şekil 4. 13. E-CAD proteinin SDS-PAGE görüntüsü.

(M: Marker, 1-9. kuyu: bazı hastalara ait doku örnekleri. %12'lik jelde 120 V'da 50 dk yürütüldü. E_CAD primer antikorunun moleküler ağırlığı 130- kDa.)

4.5.2. E-CAD genine ait western blot sonuçlarının istatistiksel analizi

Baş, gövde ve kontrol pterjiyum dokularına ait E-CAD proteinin verileri ACTB proteini ile normalize edildi. Tüm veriler $\text{ort} \pm \text{SEM}$ olarak verildi. Sonuçların analizi 0,9 – 1,1 aralığına göre yapıldı. 0,9'dan düşük olan değerlerde normal konjonktiva dokusuna oranla pterjiyum dokularında ilgili proteinin düzeyinin azaldığı, 0,9–1,1 aralığında ise normal konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında değişmediği ve 1,1 değerinden yüksek değerlerde ise normal konjonktiva dokusuna oranla proteinin miktarında bir artış olduğu kabul edildi. Protein verilerinin istatistiksel analizi SPSS 16.0 yazılımı kullanılarak yapıldı. Student t testi ile verilerin anlamlılık düzeyleri analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak 0,05 kabul edilmiş olup, $p \leq 0,05$ ise anlamlı, $p > 0,05$ ise farklılık olmadığı yönünde değerlendirme yapıldı.

Tablo 4. 6. E-CAD baş ve gövde dokularına ait protein değerlerinin istatistiksel analizi

Gen	Doku	
	Baş Pterjiyum (n=36)	Gövde Pterjiyum (n=36)
E-CAD (ort±SEM)	0,873±0,10	1,059±0,07
<i>P</i>	0,150	

Tüm değerler ort±SEM şeklinde verilmiştir.

Tablo 4. 7. E-CAD baş ve konjonktiva dokularına ait protein değerlerinin istatistiksel analizi

Gen	Doku	
	Baş Pterjiyum (n=36)	Normal Konjonktiva (n=36)
E-CAD (ort±SEM)	0,873±0,10	
<i>P</i>	0,265	

Tüm değerler ort±SEM şeklinde verilmiştir.

Tablo 4. 8. E-CAD gövde ve konjonktiva dokularına ait protein değerlerinin istatistiksel analizi

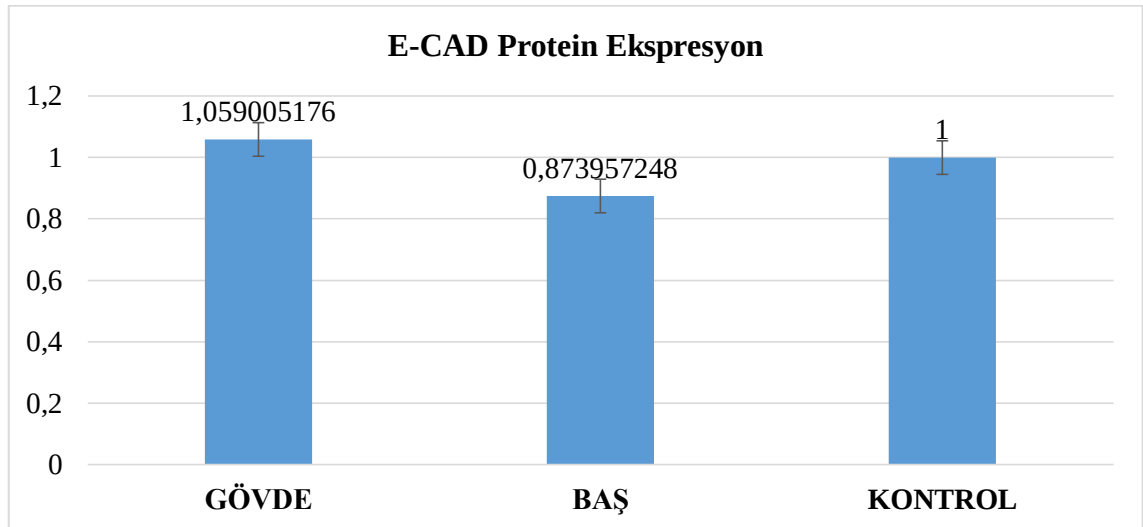
Gen	Doku	
	Gövde Pterjiyum (n=36)	Normal Konjonktiva (n=36)
E-CAD (ort±SEM)	1,059±0,07	
<i>P</i>	0,412	

Tüm değerler ort±SEM şeklinde verilmiştir.

Western blot analiz sonuçlarına göre (Tablo 4.6-8); E-CAD protein seviyesi baş pterjiyum ve gövde pterjiyum dokuları ile karşılaştırıldığında, baş pterjiyum dokusunda ($0,873 \pm 0,10$ -kat değişikliği,) azaldığı, gövde pterjiyum dokusunda ise ($1,059 \pm 0,07$ -kat değişikliği, $p=0,150$) arttığı saptanmış olup, E-CAD protein ifade düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

E-CAD protein seviyesi baş pterjiyum ve normal konjonktiva dokuları ile karşılaştırıldığında, baş pterjiyum dokusunda normal konjonktiva dokusuna kıyasla ($0,873 \pm 0,10$ -kat değişikliği, $p=0,265$) azaldığı saptanmış olup, E-CAD protein ifade düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

E-CAD protein seviyesi gövde pterjiyum ve normal konjonktiva dokuları ile karşılaştırıldığında, gövde pterjiyum dokusunda normal konjonktiva dokusuna kıyasla ($1,059 \pm 0,07$ -kat değişikliği, $p=0,412$) arttığı saptanmış olup, ancak bu artışın, E-CAD protein ifade düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4. 14. Baş, gövde ve kontrol pterjiyum dokularına ait E-CAD protein ekspresyon değerlerinin hata çubukları ile gösterimi.

ACTB proteini normalizatör olarak kullanıldı.

5. TARTIŞMA

Pterjiyum göz yüzeyinde meydana gelen, periferik korneada konjonktival dokunun üçgen şeklinde büyümesi sonucu kendini gösteren dejeneratif bir hastalıktır. Pterjiyuma neden olan asıl durum kronik bir şekilde UV radyasyonuna maruz kalma gösterilirken, hastalık hücre proliferasyonun indüklenmesi, skuamöz metaplazi, goblet hücresi hiperplazileri, enflamasyon, fibrozis, anjiyogenesis, ve hücre dışı matriksin bozulması şeklinde karakterize edilmektedir (Engelsvold ve ark., 2013).

Özellikle pterjiyumun premalign özellikler göstermesi kök hücre bozukluğunu akıllara getirmektedir (Hirst ve ark., 2009) ve epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) pterjiyum patogenezinin aydınlatılmasında anahtar bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (Ando ve ark., 2011). EMT, yara iyileşmesi, doku yeniden oluşumu ve tümör yayılması gibi gelişimsel süreçlerde çok önemli ve kritik fonksiyonlara sahip olup, epitel hücrelerinin hücre-hücre temaslarını kaybettiği ve mezenkimal özellikler kazandığı tersine çevrilebilir bir dizi olayı tanımlamaktadır (Weber ve ark., 2012; Thiery ve ark., 2009; Gregory ve ark., 2008). Bu olaylar, E-kaderin gibi epitele özgü hücre-hücre adezyon moleküllerinin kaybı veya yeniden dağıtımı dahil olmak üzere hücrenin moleküler yeniden programlanmasını ve fibronektin, vimentin ve N-kaderin dahil mezenkimal belirteçlerin açılmasını içermektedir (Thiery ve Sleeman., 2006). Yapılan tümör biyolojisi çalışmalarına göre, TGF β , Wnt, Notch ve PDGF ve FGF gibi büyüme faktörlerini içeren sinyal yollarının EMT'yi indükleyebileceği düşünülmektedir (Moustakas ve Heldin., 2007). TGF β tarafından uyarıldıktan sonra, ZEB transkripsiyon faktörleri (ZEB1 / ZEB2) yukarı yönde düzenlenerek, E-box elemanlarına bağlanmaları ve E-kaderin ve polarite faktör genlerinin baskılanmasına neden olarak neticede EMT'ye yol açmaktadırlar (Gregory ve ark., 2008; Engelsvold ve ark., 2013).

E-kaderin çok iyi bilinen bir hücre adezyon molekülü olup, organ morfogenezinde, doku oluşumunda ve embriyogenesis aşamasında uygun gelişimsel adımların atılmasında çok önemli roller üstlenmektedir (Young ve ark., 2010). Epitel hücrelerin yüzeylerinde eksprese olan E-kaderin, hücreler arası bağlantılarını kalsiyum bağımlı tarzda gerçekleştirirler ve aynı zamanda normal doku yapısının korunmasına katkıda bulunmaktadır. Bu işlemi E-kaderin sitoplazmik domaini aracılığı ile yapar. Bu bölge, alfa –katenin ve beta-katenin yoluyla hücre iskeletinde yer alan aktine bağlanır (Zhu ve ark., 2005). Azalmış E-kaderin ekspresyonu, epitelyal-mezenkimal geçiş süreçlerindeki bozukluklara bağlı olarak karsinomların ileri evrelerinde gözlemlenmiştir (Moghimi-Dehkordi ve ark., 2008). E-kaderin ifadesinin ve fonksiyonunun düzensizleşmesi, küçük hücreli akciğer kanseri, meme kanseri, kolon kanseri ve rahim ağzı kanseri gibi daha birçok kanser türünde invazyona ve metastaza neden olduğu gösterilmiştir (Zacapala-Gomez ve ark., 2018).

E-kaderin, bitişik epitel hücrelerinin yapışmasında anahtar bir moleküldür ve onun inaktivasyonu veya ifadesinin azalması tümör oluşumu ve metastazında önemli bir tetikleyici olmaktadır. Bazı mekanizmalar, genetik, epigenetik ve transkripsiyonel değişiklikler de dahil olmak üzere E-kaderin geninin ifadesinin düzenlenmesine dahildirler (Aghihloo ve ark., 2016). Buradan hareketle yapılan literatür taramaları ışığında E-kaderinin tümör oluşumuna benzer davranışlar gösteren pterjiyum hastalığı ile olan ilişkisini moleküler seviyede değerlendirdik. Bu anlamda çalışmamız son derece özgün olup E-kaderin geninin pterjiyum ile metilasyon, ekspresyon ve protein ifade düzeylerinde değerlendirildiği hem Türkiye’de hem de dünyada ilk çalışma olma niteliğindedir.

Çalışmadan elde edilen verilere göre baş pterjiyum dokusunda gövde pterjiyum dokusuna kıyasla ($0,073 \pm 0,03$ -kat değişikliği, $p=0,005$) E-CAD mRNA ekspresyonu belirgin bir şekilde azalış göstermiştir. Aynı şekilde baş ve konjonktiva dokuları karşılaştırıldığında baş pterjiyumun konjonktivaya göre ($0,073 \pm 0,03$ -kat değişikliği, $p=0,000$) anlamlı derecede gen ifade düzeyinin azaldığı saptanmış olup ($p \leq 0,005$), gövde ve konjonktiva dokuları açısından elde edilen bu artışın ($1,486 \pm 0,45$ -kat değişikliği, $p=0,296$) istatistiksel olarak bir anlam ifade etmediği sonucuna varılmıştır ($p > 0,005$).

Western blotlama sonuçlarına göre, sırasıyla baş/gövde pterjiyum ve baş/konjonktiva dokuları arasındaki azalışın (sırasıyla $p=0,150$ ve $p=0,265$), gövde/konjonktiva dokuları arasındaki artışın ($p=0,412$) bir anlam ifade etmediği bulunmuştur. Bunun nedeni E-CAD geninin mRNA ifadesi üzerindeki ekspresyon azalışının istatistiksel olarak western blotlamada desteklenmemesi, transkripsiyone sonrası değişikliklerin ve epigenetik mekanizmaların varlığını akla getirmektedir. Birçok çalışmada, tümör gelişim sürecinde E-Kaderin ekspresyonun kaybı ya genetik ya da epigenetik mekanizmalarla meydana geldiği ifade edilmiştir. E –Kaderin ekspresyonun kaybı, EMT'nin karakterizasyonunun değiştiğinin bir göstergesidir. E-Kaderinin azalması, hücre hareketini arttırmaktadır ve hücrel tümör invazyonunu teşvik etmektedir. Bu nedenle E-Kaderin kaybı, epitelyal tümör hücrelerinin invazyonuna önemli bir kanıt oluşturmaktadır. (Liu ve ark., 2005).

Azalmış E-kaderin ekspresyonu ve buna eşlik eden hücre ayrışması, kanser hücre gelişimin ilk safhalarında görülmektedir (Pecina-Slaus., 2003). E-kaderin tümör invazyonunu ve metaztasını engellediği ve E-kaderin eksikliğinin tümör farklılaşmasını azalttığı için, E-kaderin bir tümör baskılayıcı molekül olarak kabul görmektedir (Jeanes ve ark., 2008). Yapılan başka bir çalışmada E-kaderin ekspresyonun nüklear faktör-Kb

sinyal yolağı aracılığıyla mide kanseri hücre hatlarında hücre çoğalmasını arttırdığı tespit edilmiştir (Park ve ark., 2017). Wang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Notch sinyali aracılığı ile E-kaderinin aşağı yönde düzenlenmesinin prostat kanserinde kimyasal maddelere karşı dayanıklılığı arttırdığı bulunmuştur (Wang ve ark., 2017).

Pterjiyumdaki moleküler değişiklikler tümör hücrelerinde gerçekleşen moleküler değişiklikler ile benzerlik göstermektedir. Hatta pterjiyum ile onkogenesis mekanizmasının çok benzer olduğunu savunan görüşler de mevcuttur. Yapılan birçok çalışmada, farklı tümörlerde protein ekspresyonundaki azalışın E-kaderin ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Çok iyi bilinen bir epigenetik değişiklik olan metilasyon, gen inaktivasyonu açısından genetik farklılıklara çok önemli bir alternatif olarak hareket etmektedir. Tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgelerinde meydana gelen anormal metilasyonlar ve ilgili genlerin susturulması, çoğu insan kanserlerinin patolojisinin açıklığa kavuşturulmasında çok önemli roller oynamaktadırlar (Young ve ark., 2010). E-kaderin geni (CDH1) promotor bölgesindeki CpG adacıklarının hipermetilasyonu E-kaderin inaktivasyonuna katkıda bulunan faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Esteller., 2002).

Tez çalışmamızın bir diğer adımı olan metillenme analizleri için, E-kaderin geni promotör bölgesi metillenme durumunu tümör oluşumuna benzer davranışlar gösteren yaygın bir göz rahatsızlığı olan pterjiyum açısından değerlendirdik. Elde edilen verilere göre, pterjiyum ve konjonktiva dokuları arasındaki metilasyon yüzde değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,024$). Başka bir deyişle kontrol grubuna göre pterjiyumlu dokularda E-CAD geni promotör metillenmesi bariz bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Diğer yapılan kanser ve türevi çalışmalarla uyumlu olarak pterjiyumlu dokulardaki bu metillenme oranındaki artışın hastalıkla E CAD geni arasında bir ilişki

olduğunu düşündürmektedir. Çünkü E CAD geni düzensiz promotör hipermetilasyonları genin ifadesini bozmakta ve böylesine kilit bir tümör baskılayıcı genin anormal ekspresyonu hücre –hücre bağlantıları. EMT, hücre isleti de dâhil birçok önemli biyolojik sürecin bozulmasına dolayısıyla kanserle sonuçlanmasına neden olabilmektedir.

E-kaderin promotör hipermetilasyonu pek çok farklı tipteki kanser olaylarına dahildirler (Van Roy ve Berx., 2008). Young ve arkadaşları tarafından pterjiyumlu hastalarda yapılan bir çalışmada E-kaderin geni promotör bölgesi hipermetilasyonun E-kaderin protein ekspresyonun azalmasına katkıda bulunduğu saptanmıştır (Young ve ark., 2010). Bu durum da E-kaderin gibi tümör baskılayıcı genlerin anormal promotör hipermetilasyonlarının ilgili geni inaktif forma çevirerek genin fonksiyonun bozulmasına ve dolayısıyla kanserleşmeye giden süreçte yol almasına neden olmaktadır. E-kaderin ifadesinin değişmesi, kontak inhibisyon kaybına ve anormal hücre çoğalmasına sebebiyet verebilir.

Epitel hücrelerinde görülen fonksiyon bozukluğu anormal E-kaderin ifadesi ile ilişkilendirilmiştir. Epitel hücrelerinin adezyonunda E-kaderinin çok önemli bir protein olduğu bilinmektedir (De Wever ve ark., 2002). Fareler üzerine yapılan bir çalışmada RIPK4 (Receptor-interacting protein kinase 4) eksikliğine bağlı oluşan anormal E-kaderin lokalizasyonu fare epidermis epitel hücrelerinde düzensiz büyümelere, hücre-hücre birleşmelerine ve epidermal defektlere yol açmıştır (De Groote ve ark., 2015). Pterjiyumlu dokuların da epitelce zengin olduğu bilinmekte olup, buradan hareketle tezimizde kurduğumuz hipotezi doğrular nitelikte E-kaderin geni promotör metilasyonu ve mRNA transkrip ürünlerindeki ifade farklılıklarının hastalığın oluşumu ve gelişimi açısından önem arz ettiğini görmekteyiz. Yapılan başka bir çalışmada, Wang ve arkadaşları, pterjiyum postperatif granüloma (PPG) hücrelerinde E-kaderininde

aralarında bulunduğu pan-sitokeratin, klaudin, vimentin, snail ve kollajen gibi birçok markörü kullanarak hematoksilin ve eozin (H&E) ve immüno Floresan boyama işlemi gerçekleştirmiştir. Boyama sonuçlarına göre PPG dokularında epitelyal displaziler mevcuttur ve kontrol konjonktiva dokusu ile karşılaştırıldığında PPG epitelyumunda belirgin bir şekilde E-kaderin ekspresyonun daha düşük olduğu bulunmuştur (Wang ve ark., 2018).

Özetle tümör supresör bir gen olan E-kaderinin promotör bölgesi hipermetilasyonu ve ekspresyon seviyesinde azalma kanser oluşumuyla benzer davranışlar sergileyen pterjiyum hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Bu anlamda çalışma sonuçlarımızın halen patolojisi tartışmalı bir konu olan pterjiyumun moleküler temelli belirsizliğine bir nebze olsun ışık tuttuğu kanaatindeyiz. Bulgularımız patolojisi halen netlik kazanmamış ancak tümör benzeri bir doku olma özelliği gösteren pterjiyumun hem neoplastik özelliğini desteklemekte hem de pterjiyum gelişimi için moleküler bir temel sağlamaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Algvere, P.V., Marshall, J. ve Seregard, S., (2006). Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, Vol. 84, pp. 4–15.
- An, M.X., Wu, K.L. ve Lin, S.C., (2011). Detection and comparison of matrix metalloproteinase in primary and recurrent pterygium fibroblasts. *International Journal of Ophthalmology*, 4(4), 353–356.
- Anbesse, D.H., Kassa, T., Kefyalew, B. ve ark., (2017). Prevalence and associated factors of pterygium among adults living in Gondar city, Northwest Ethiopia. *PLoS ONE*, 12(3).
- Ando, R., Kase, S., Ohashi, T. ve ark., (2011). Tissue factor expression in human pterygium. *Molecular Vision*, 17, 63–69.
- Andriescu, E.C., Căruntu, I.D., Giușcă, S.E., Lozneanu, L. ve Apostol, D.G.C., (2018). Prognostic significance of cell-adhesion molecules in histological variants of papillary thyroid carcinoma. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 59(3), 721–727.
- Anguria, P., Kitinya, J., Ntuli, S. ve Carmichael, T., (2014). The role of heredity in pterygium development. *International Journal of Ophthalmology*, Vol. 7, pp. 563–573.
- Aslankurt, M. ve Astam, N., (2003). Pterjium etiyojisi. *Tıp Araştırmaları Derneği*, 1(2), 39–42.
- Bai, H., Teng, Y., Lee ve ark., (2010). Proliferative and migratory aptitude in pterygium. *Histochem Cell Biol*, 134, 527–535.

- Balci, M., Şahin, Ş., Mutlu, F.M. ve ark., (2011). Investigation of oxidative stress in pterygium tissue. *Molecular Vision*, 17, 443–447.
- Basu, S., Cheriyaundath, S. ve Ben-Ze'ev, A., (2018). Cell–cell adhesion: Linking wnt/ β -catenin signaling with partial emt and stemness traits in tumorigenesis [version 1; peer review: 4 approved]. *F1000Research*, Vol. 7, p. 1488.
- Berx, G. ve Van Roy, F., (2001). The E-cadherin/catenin complex: An important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Research*, 3(5), 289–293.
- Besaratinia, A., Yoon, J., Schroeder, C. ve ark., (2011). Wavelength dependence of ultraviolet radiation-induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight. *The FASEB Journal*, 25(9), 3079–3091.
- Beukers, R., Eker, A.P.M. ve Lohman, P.H.M., (2008). 50 Years Thymine Dimer. *DNA Repair*, 7(3), 530–543.
- Bianchi, E., Scarinci, F., Grande, C. ve ark., (2012). Immunohistochemical profile of vegf, tgf- β and pge2 in human pterygium and normal conjunctiva: Experimental study and review of the literature. *Inter. J. of Immunopathology and Pharmacology*, 25(3), 607–615.
- Bradley, J.C., Yang, W., Bradley, R.H., Reid, T.W. ve Schwab, I.R., (2010). The science of pterygia. *British Journal of Ophthalmology*, 94(7), 815–820.
- Brocker, C., Thompson, D., Matsumoto, A. ve ark., (2010). Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Hum. Gen.*, 5(1), 30–55.

- Brown, D.J., Lin, B., Chwa, M. ve ark., (2004). Elements of the nitric oxide pathway can degrade TIMP-1 and increase gelatinase activity. *Molecular Vision*, 10, 281–288.
- Campbell, H.K., Maier, J.L. ve DeMali, K.A., (2017). Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Experimental Cell Research*, Vol. 358, pp. 39–44.
- Cárdenas-Cantú, E., Zavala, J., Valenzuela, J. ve Valdez-García, J.E., (2016). Molecular Basis of Pterygium Development. *Seminars in Ophthalmology*, 31(6), 567–583.
- Carmichael, T.R., (2001). Genetic factors in pterygium in South Africans. *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde*, 91(4), 322.
- Cavallaro, U. ve Christofori, G., (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer*, Vol. 4, pp. 118–132.
- Čejková, J., Štípek, S., Crkovská, J., Ardan, T., Pláteník, J., Čejka, Č. ve Midelfart, A., (2004). UV Rays, the Prooxidant/Antioxidant Imbalance in the Cornea and Oxidative Eye Damage. *Physiological Research*, 53(1), 1–10.
- Chui, J., Coroneo, M.T., Tat, L.T., Crouch, R., Wakefield, D. ve Di Girolamo, N., (2011). Ophthalmic pterygium: A stem cell disorder with premalignant features. *American Journal of Pathology*, 178(2), 817–827.
- Chui, J., di Girolamo, N., Wakefield, D. ve Coroneo, M.T., (2008). The pathogenesis of pterygium: Current concepts and their therapeutic implications. *Ocular Surface*, 6(1), 24–43.
- Chunming, Z., Mingchang, Z., Bangxing, H. ve Jie, Z., (2008). Expressions Of Ngf, Trka And P75 In Pterygium. *Chinese Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 17(6).

- Cimpean, A.M., Sava, M.P. ve Raica, M., (2013). DNA damage in human pterygium: One-shot multiple targets. *Molecular Vision*, 19, 348–356.
- Clearfield, E., Muthappan, V., Wang, X. ve Kuo, I.C., (2016). Conjunctival autograft for pterygium. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Vol. 2016.
- Clément, R., Dehapiot, B., Collinet, C., Lecuit, T. ve Lenne, P.F., (2017). Viscoelastic Dissipation Stabilizes Cell Shape Changes during Tissue Morphogenesis. *Current Biology*, 27(20), 3132-3142.e4.
- Das, P., Gokani, A., Bagchi, K. ve ark., (2015). Limbal epithelial stem-microenvironmental alteration leads to pterygium development. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 402(1–2), 123–139.
- De Groote, P., Tran, H. T., Fransen, M. ve ark., (2015). A novel RIPK4-IRF6 connection is required to prevent epithelial fusions characteristic for popliteal pterygium syndromes. *Cell Death and Differentiation*, 22(6), 1012–1024.
- De Wever, O., Pauwels, P., De Craene, B. ve ark., (2008). Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(3), 481–494.
- Delmas, S., Shunburne, L., Ngo, H.P. ve Allers, T., (2009). Mre11-Rad50 promotes rapid repair of DNA damage in the polyploid archaeon *Haloferax volcanii* by restraining homologous recombination. *PLoS Genetics*, 5(7), e1000552.
- Detorakis, T. E., Zaravinos, A. ve Spandidos, A.D., (2010). Growth factor expression in ophthalmic pterygia and normal conjunctiva. *International Journal of Molecular Medicine*, 25(4), 513–516.

- Detorakis, E. T., Sourvinos, G., ve Spandidos, D. A., (2001). Detection of herpes simplex virus and human papilloma virus in ophthalmic pterygium. *Cornea*, 20(2), 164–167.
- Di Girolamo, N., Chui, J., Coroneo, M.T. ve Wakefield, D., (2004). Pathogenesis of pterygia: Role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Progress in Retinal and Eye Research*, Vol. 23, pp. 195–228.
- Di Girolamo, N., Wakefield, D. ve Coroneo, M.T., (2006). UVB-mediated induction of cytokines and growth factors in pterygium epithelial cells involves cell surface receptors and intracellular signaling. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47(6), 2430–2437.
- Dogan, A.S., Onder, E., Arikok, A.T., Bicer, T. ve Gurdal, C., (2016). Claudin-1 expressions decrease in pterygium with respect to normal conjunctiva. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 35(4), 315–318.
- Dong, X., Xu, F., Gong, Y. ve ark., (2006). Crystal structure of the V domain of human nectin-like molecule-1/syncam3/ Tsl1/Igsf4b, a neural tissue-specific immunoglobulin-like cell-cell adhesion molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 281(15), 10610–10617.
- Dong, Y., Kase, S., Dong, Z. ve ark., (2016). Regulation of vascular endothelial growth factor-C by tumor necrosis factor-in the conjunctiva and pterygium. *International Journal of Molecular Medicine*, 38(2), 545–550.
- Elahi, M.M., Naseem, K.M. ve Matata, B.M., (2007). Nitric oxide in blood: The nitrosative-oxidative disequilibrium hypothesis on the pathogenesis of cardiovascular disease. *FEBS Journal*, Vol. 274, pp. 906–923.

- Esteller, M., (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: A booming present, a brighter future. *Oncogene*, Vol. 21, pp. 5427–5440.
- Eze, B. I., Maduka-okafor, F.C., Okoye, O.I. ve Chuka-okosa, C.M., (2011). Pterygium: A review of clinical features and surgical treatment. *Nigerian Journal of Medicine : Journal of the National Association of Resident Doctors of Nigeria*, 20(1), 7–14.
- Eze, B.I., (2013). Audit of ophthalmic surgical interventions in a resource-deficient tertiary eye care facility in sub-Saharan Africa. *Journal of Health Care for the Poor and Underserved*, Vol. 24, pp. 197–205.
- Feng, Q.Y., Hu, Z.X., Song, X.L. ve Pan, H.W., (2017). Aberrant expression of genes and proteins in pterygium and their implications in the pathogenesis. *International Journal of Ophthalmology*, 10(6), 973–981.
- Freemont, A.J., (1998). Demystified ... Adhesion molecules. *Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology*, Vol. 51, pp. 175–184.
- Frucht-Pery, J., Raiskup, F., Ilsar, M., Landau, D., Orucov, F. ve Solomon, A., (2006). Conjunctival Autografting Combined With Low-Dose Mitomycin C for Prevention of Primary Pterygium Recurrence. *American Journal of Ophthalmology*, 141(6).
- Fukuda, M.N. ve Sugihara, K., (2012). Cell adhesion molecules in human embryo implantation. *Sheng Li Xue Bao : [Acta Physiologica Sinica]*, Vol. 64, pp. 247–258.
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K. ve ark., (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: A lesson from claudin-1-deficient mice. *Journal of Cell Biology*, 156(6), 1099–1111.

- Gall, T.M.H. ve Frampton, A. E., (2013). Gene of the month: E-cadherin (CDH1). *Journal of Clinical Pathology*, 66(11), 928–932.
- Gallagher, M.J., Giannoudis, A., Herrington, C.S. ve Hiscott, P., (2001). Human papillomavirus in pterygium. *British Journal of Ophthalmology*, 85(7), 782–784.
- Genbacev, O. D., Prakobphol, A., Foulk, R. A. ve ark., (2003). Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science*, 299(5605), 405–408.
- Gharaee, H., Shayegan, M.R., Khakzad, M. R. ve ark., (2014). The expression of vascular endothelial growth factor in pterygium tissue of atopic patients. *International Ophthalmology*, 34(6), 1175–1181.
- Godsel, L.M., Dubash, A.D., Bass-Zubek, A.E. ve ark., (2010). Plakophilin 2 couples actomyosin remodeling to desmosomal plaque assembly via RhoA. *Molecular Biology of the Cell*, 21(16), 2844–2859.
- Govinden, R. ve Bhoola, K.D., (2003). Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- β . *Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 98, pp. 257–265.
- Goyal, J.L., Rao, V.A., Srinivasan, R. ve Agrawal, K., (1994). Oculocutaneous manifestations in xeroderma pigmentosa. *British J. of Opht.*, 78(4), 295–297.
- Gregory, P.A., Bert, A.G., Paterson, E.L. ve ark., (2008). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature Cell Biology*, 10(5), 593–601.
- Gumbiner, B.M., (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 6, pp. 622–634.

- Gümüş, E. ve Yaşar, I., (2013). The effects of job on the development of pterygium. *Türk Oftalmoloji Dergisi*, 43(4), 245–249.
- Gumus, K., Karakucuk, S., Mirza, G.E., Akgun, H., Arda, H. ve Oner, A.O., (2014). Overexpression of vascular endothelial growth factor receptor 2 in pterygia may have a predictive value for a higher postoperative recurrence rate. *British Journal of Ophthalmology*, 98(6), 796–800.
- Halbleib, J.M. ve Nelson, W.J., (2006). Cadherins in development: Cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes and Development*, Vol. 20, pp. 3199–3214.
- Hay, E.D., (2005). The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Developmental Dynamics*, Vol. 233, pp. 706–720.
- He, S., Sun, H., Huang, Y. ve ark., (2019). Identification and Interaction Analysis of Significant Genes and MicroRNAs in Pterygium. *BioMed Research International*, 2019.
- Hecht, F. ve Shoptaugh, M.G., (1990). Winglets of the eye: Dominant transmission of early adult pterygium of the conjunctiva. *Journal of Medical Genetics*, 27(6), 392–394.
- Hirst, L.W., Axelsen, R.A. ve Schwab, I., (2009). Pterygium and associated ocular surface squamous neoplasia. *Archives of Ophthalmology*, 127(1), 31–32.
- Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K. ve ark., (2000). WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. *Nature*, 407(6801), 186–189.

Horne, A.W., White, J.O. ve Lalani, E.N., (2002). Adhesion molecules and the normal endometrium. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 109(6), 610–617.

Hoyama, E., Viveiros, M. M. H., Shiratori, C. ve ark., (2015). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in macrophages, fibroblasts, and endothelial cells in pterygium treated with 5-fluorouracil. *Seminars in Ophthalmology*, 30(3), 171–176.

<https://www.bostoneyegroup.com/cornea-boston/pterygium/>

<https://sites.google.com/site/chsanatomyphysiology27/home/cellular-adhesion-molecules-cam>

<http://www.pathologyoutlines.com/>

Hu, P.S., Chang, W.S., Chou, A.K. ve ark., (2018). The association of MMP-8 genotypes with pterygium. *In vivo*, 32, 41-46.

Hudson, L.G., Choi, C., Newkirk, K.M. ve ark., (2007). Ultraviolet radiation stimulates expression of snail family transcription factors in keratinocytes. *Molecular Carcinogenesis*, 46(4), 257–268.

Hwang, H.S., Cho, K.J., Rand, G., Chuck, R.S. ve Kwon, J.W., (2018). Optimal size of pterygium excision for limbal conjunctival autograft using fibrin glue in primary pterygia. *BMC Ophthalmology*, 18(1).

Islam, S.I. ve Wagoner, M.D., (2001). Pterygium in young members of one family. *Cornea*, 20(7), 708-710.

- Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T.M. ve ark., (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 110(3), 341–350.
- Izzotti, A., Bagnis, A. ve Saccà, S.C., (2006). The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, Vol. 612, pp. 105–114.
- Jabarin, B., Solomon, A. ve Amer, R., (2016). Interleukin-17 and its correlation with vascular endothelial growth factor expression in ocular surface pathologies: A histologic study. *European Journal of Ophthalmology*, 26(4), 283–286.
- Jaworski, C.J., Aryankalayil-John, M., Campos, M.M. ve ark., (2009). Expression analysis of human pterygium shows a predominance of conjunctival and limbal markers and genes associated with cell migration. *Molecular Vision*, 15, 2421–2434.
- Jeanes, A., Gottardi, C.J. ve Yap, A.S., (2008). Cadherins and cancer: How does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*, Vol. 27, pp. 6920–6929.
- Jing-Yan, Y., Pei-Rong, L. ve Long-Biao, L., (2006). The Expression of MMP-3 in Pterygia. *Chinese Journal of Practical Ophthalmology*, 24(9), 942–945.
- Jirtle, R.L. ve Skinner, M.K., (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 8, pp. 253–262.
- Joseph-Silverstein, J. ve Silverstein, R.L., (1998). Cell adhesion molecules: An overview. *Cancer Investigation*, Vol. 16, pp. 176–182.
- Kase, S., Osaki, M., Sato, I. ve ark., (2007). Immunolocalisation of E-cadherin and β -catenin in human pterygium. *British Journal of Ophthalmology*, 91(9), 1209–1212.

- Kato, N., Shimmura, S., Kawakita, T. ve ark., (2007). B-Catenin Activation and Epithelial-Mesenchymal Transition in the Pathogenesis of Pterygium. *Inv. Oph. and Visual Science*, 48(4), 1511–1517.
- Kau, H.C., Tsai, C.C., Hsu, W.M., Liu, J.H. ve Wie, Y.H., (2004). Genetic polymorphism of hOGG1 and risk of pterygium in Chinese. *Eye*, 18(6), 635–639.
- Kau, H.C., Tsai, C.C., Lee, C F. ve ark., (2006). Increased oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxy-guanosine, in human pterygium. *Eye*, 20(7), 826–831.
- King, N., Hittinger, C.T. ve Carroll, S.B., (2003). Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins. *Science*, 301(5631), 361–363.
- Kocamış, Ö., (2005). Primer pterjium cerrahi tedavisinde serbest konjonktival otogreft. *Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Uzmanlık Tezi*.
- Konuk, O., Aktaş, Z., Erdem, Ö., Yüksel Konuk, E.B., ve Ünal, M., (2011). Expression of cyclooxygenase-2 and Ki-67 in primary and recurrent pterygias. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 31(1), 115–121.
- Kormanovski, A., Parra, F., Jarillo-Luna, A. ve ark., (2014). Oxidant/antioxidant state in tissue of primary and recurrent pterygium. *BMC Ophthalmology*, 14(1).
- Lee, D.H., Cho, H.J., Kim, J.T., Choi, J.S. ve Joo, C.K., (2001). Expression of vascular endothelial growth factor and inducible nitric oxide synthase in pterygia. *Cornea*, 20(7), 738–742.
- Łekawa-Ilczuk, A., Antosz, H., Rymgayłło-Jankowska, B., ve Zarnowski, T., (2011). Expression of double strand DNA breaks repair genes in pterygium. *Ophthalmic Genetics*, 32(1), 39–47.

- Levenberg, S., Yarden, A., Kam, Z. ve Geiger, B., (1999). p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry. *Oncogene*, 18(4), 869–876.
- Li, W., Liu, J. ve Galvin, J.A., (2016). Epigenetics and common ophthalmic diseases. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 89(4), 597–600.
- Liang, K., Jiang, Z., Ding, B. ve ark., (2011). Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in pterygia and normal conjunctiva. *Molecular Vision*, 17, 1687–1693.
- Liu, T., Liu, Y., Xie, L., He, X. ve Bai, J., (2013). Progress in the pathogenesis of pterygium. *Current Eye Research*, 38(12), 1191–1197.
- Liu, Y.N., Lee, W.W., Wang, C.Y. ve ark., (2005). Regulatory mechanisms controlling human E-cadherin gene expression. *Oncogene*, 24(56), 8277–8290.
- Ljubojević, V., Gajanin, R., Amidžić, L. ve Vujković, Z., (2016). Ekspresija i značaj proteina p53 i Ki-67 u pterigijumu. *Vojnosanitetski Pregled*, 73(1), 16–20.
- Lu, H., Lou, D.H. ve Zhu, L.L., (2009). Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction study of polo-like kinase-1 in pterygia. *Journal of International Medical Research*, 37(6), 1851–1858.
- Maxia, C., Perra, M.T., Demurtas, P.ve ark., (2008). Expression of survivin protein in pterygium and relationship with oxidative DNA damage. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(6A), 2372–2380.

- Maxia, C., Murtas, D., Corrias, M. ve ark., (2017). Vitamin D and vitamin D receptor in patients with ophthalmic pterygium. *European Journal of Histochemistry*, 61(4), 257–263.
- Mbalaviele, G., Chan, S.S. ve Civitelli, R., (2006). Cell-cell adhesion and signaling through cadherins: Connecting bone cells in their microenvironment. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(12), 1821–1827.
- Mendonsa, A.M., Na, T.Y. ve Gumbiner, B.M., (2018). E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene*, Vol. 37, pp. 4769–4780.
- Mesa, R. ve Bassnett, S., (2013). UV-B-induced DNA damage and repair in the mouse lens. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(10), 6789–6797.
- Moustakas, A. ve Heldin, C.H., (2007). Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Science*, Vol. 98, pp. 1512–1520.
- Murube, J., (2007). The ocular surface and its symbolism. *Ocular Surface*, 5(1), 6–12.
- Murube, J., (2008). Pterygium: Descriptive nomenclature of the past. *Ocular Surface*, 6(3), 104–107.
- Nichols, S.A., Dirks, W., Pearse, J.S. ve King, N., (2006). Early evolution of animal cell signaling and adhesion genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33), 12451–12456.
- Nieto, M.A., Huang, R.Y.Y.J., Jackson, R.A.A. ve Thiery, J.P.P., (2016). Emt: 2016. *Cell*, Vol. 166, pp. 21–45.

- Ogou, S.I., Yoshida, N.C. ve Takeichi, M., (1983). Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules common to hepatocytes and teratocarcinoma stem cells. *Journal of Cell Biology*, 97(3), 944–948.
- Ohara, M., Sotozono, C., Tsuchihashi, Y. ve Kinoshita, S., (2004). Ki-67 labeling index as a marker of malignancy in ocular surface neoplasms. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 48(6), 524–529.
- Ozawa, M., (2002). Lateral dimerization of the E-cadherin extracellular domain is necessary but not sufficient for adhesive activity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(22), 19600–19608.
- Ozdemir, G., Inanc, F. ve Kilinc, M., (2005). Investigation of nitric oxide in pterygium. *Canadian Journal of Ophthalmology*, 40(6), 743–746.
- Pan, H.W., Zhong, J.X. ve Jing, C.X., (2011). Comparison of fibrin glue versus suture for conjunctival autografting in pterygium surgery: A meta-analysis. *Ophthalmology*, 118(6), 1049–1054.
- Park, S.Y., Shin, J. ve Kee, S., (2017). E-cadherin expression increases cell proliferation by regulating energy metabolism through nuclear factor- κ B in AGS cells. *Cancer Science*, 108(9), 1769–1777.
- Pećina-Šlaus, N., (2003). Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell International*, Vol. 3, pp. 1–7.
- Peiretti, E., Dessì, S., Mulas, M.F. ve ark., (2006). Fibroblasts isolated from human pterygia exhibit altered lipid metabolism characteristics. *Experimental Eye Research*, 83(3), 536–542.

- Peiretti, E., Dessì, S., Putzolu, M. ve Fossarello, M., (2004). Hyperexpression of low-density lipoprotein receptors and hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A-reductase in human pinguecula and primary pterygium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45(11), 3982–3985.
- Peng, M.L., Tsai, Y.Y., Tung, J.N. ve ark., (2014). Vascular endothelial growth factor gene polymorphism and protein expression in the pathogenesis of pterygium. *British Journal of Ophthalmology*, 98(4), 556–561.
- Perra, M.T., Colombari, R., Maxia, C. ve ark., (2006). Finding of conjunctival melanocytic pigmented lesions within pterygium. *Histopathology*, 48(4), 387–393.
- Petruzzelli, L., Takami, M. ve Humes, H.D., (1999). Structure and function of cell adhesion molecules. *American Journal of Medicine*, 106(4), 467–476.
- Pharmakakis, N. ve Assimakopoulou, M., (2001). Immunohistochemical detection of heat shock protein 27 and Ki-67 in human pterygium [11]. *British Journal of Ophthalmology*, Vol. 85, pp. 1392–1393.
- Piras, F., Moore, P. S., Ugalde, J. ve ark., (2003). Detection of human papillomavirus DNA in pterygia from different geographical regions. *British Journal of Ophthalmology*, 87(7), 864–866.
- Prez-Rico, C., Pascual, G., Sotomayor, S. ve ark., (2011). Tropoelastin and fibulin overexpression in the subepithelial connective tissue of human pterygium. *American Journal of Ophthalmology*, 151(1), 44–52.
- Reid, T.W. ve Dushku, N., (2003). Does human papillomavirus cause pterygium? *British Journal of Ophthalmology*, Vol. 87, pp. 806–808.

- Reid, T.W. ve Dushku, N., (2010). What a study of pterygia teaches us about the Cornea? Molecular mechanisms of formation. *Eye and Contact Lens*, 36(5), 290–295.
- Riau, A.K., Wong, T.T., Finger, S.N. ve ark., (2011). Aberrant DNA methylation of matrix remodeling and cell adhesion related genes in pterygium. *PLOS ONE*, 6(2).
- Rodrigues, F.W., Arruda, J.T., Silva, R E., ve Moura, K.K.V.O., (2008). TP53 gene expression, codon 72 polymorphism and human papillomavirus DNA associated with pterygium. *Genetics and Molecular Research*, 7(4), 1251–1258.
- Sano, I., Kaidzu, S., Tanito, M. ve ark., (2013). 4-Hydroxyhexenal- and 4-Hydroxynonenal-Modified Proteins in Pterygia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Saw, S.M. ve Tan, D., (1999). Pterygium: Prevalence, demography and risk factors. *Ophthalmic Epidemiology*, 6, 219–228.
- Schlüter, H., Wepf, R., Moll, I. ve Franke, W.W., (2004). Sealing the live part of the skin: The integrated meshwork of desmosomes, tight junctions and curvilinear ridge structures in the cells of the uppermost granular layer of the human epidermis. *European Journal of Cell Biology*, 83(11–12), 655–665.
- Schneider, B.G., John-Aryankalayil, M., Rowsey, J.J., Dushku, N. ve Reid, T.W., (2006). Accumulation of p53 protein in pterygia is not accompanied by TP53 gene mutation. *Experimental Eye Research*, 82(1), 91–98.
- Sebastiá, R., Ventura, M.P., Solari, H.P. ve ark., (2013). Immunohistochemical detection of Hsp90 and Ki-67 in pterygium. *Diagnostic Pathology*, 8(1), 1–7.

- Serra, H.M., Suarez, M.F., Maccio, J.P., Esposito, E. ve Urrets-Zavalía, J.A., (2019). Pterygium: A Complex and Multifactorial Ocular Surface Disease. A Review on its Pathogenic Aspects. In *Rare Diseases*.
- van Setten, G.B., Aspiotis, M., Blalock, T.D. ve ark., (2003). Detection of connective tissue growth factor (CTGF) in pterygium. *Inv. Opht. & Vis. Sci*, 44(13), 1325-1325.
- Siak, J.J.K., Ng, S.L., Seet, L.F., Beuerman, R.W. ve Tong, L., (2011). The nuclear-factor κ B pathway is activated in pterygium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(1), 230–236.
- Singh, S.K., (2017). Pterygium: epidemiology prevention and treatment. *Community Eye Health*, 30(99), 5–6.
- Solomon, A., Grueterich, M., Li, D.Q. ve ark., (2003). Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in pterygium body fibroblasts. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(2), 573–580.
- Solomon, A.S., (2006). Pterygium. *British Journal of Ophthalmology*, Vol. 90, pp. 665–666.
- Sternlicht, M.D. ve Werb, Z., (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17(1), 463–516.
- Sumigray, K.D., Foote, H.P. ve Lechler, T., (2012). Noncentrosomal microtubules and type II myosins potentiate epidermal cell adhesion and barrier formation. *Journal of Cell Biology*, 199(3), 513–525.
- Sumigray, K.D. ve Lechler, T., (2015). Cell adhesion in epidermal development and barrier formation. In *Current Topics in Developmental Bio.* (Vol. 112, pp. 383–414).

- Sun, N. ve Zhang, H., (2018). Pyroptosis in pterygium pathogenesis. *Bioscience Reports*, 38(3).
- Tan, D.T.H., Tang, W.Y., Liu, Y.P., Goh, H.S. ve Smith, D.R., (2000). Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium. *British Journal of Ophthalmology*, 84(2), 212–216.
- Tanito, M., Haniu, H., Elliott, M.H. ve ark., (2006). Identification of 4-hydroxynonenal-modified retinal proteins induced by photooxidative stress prior to retinal degeneration. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(12), 1847–1859.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J. ve Nieto, M.A., (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, Vol. 139, pp. 871–890.
- Thiery, J.P. ve Sleeman, J.P., (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 7, pp. 131–142.
- Truscott, R.J.W., (2005). Age-related nuclear cataract - Oxidation is the key. *Experimental Eye Research*, 80(5), 709–725.
- Tsai, Y.Y., Chang, C.C., Chiang, C.C. ve ark., (2009). HPV infection and p53 inactivation in pterygium. *Molecular Vision*, 15, 1092–1097.
- Tunggal, J.A., Helfrich, I., Schmitz, A. ve ark., (2005). E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *EMBO Journal*, 24(6), 1146–1156.
- Turan, M. ve Turan, G., (2019). Pterjium nüksünde mast hücresinin rolü. *Cukurova Medical Journal*, 44, 108–112.

- Ueda, Y., Kanazawa, S., Kitaoka, T. ve ark., (2001). Immunohistochemical study of p53, p21 and PCNA in pterygium. *Acta Histochemica*, 103(2), 159–165.
- Van Roy, F. ve Berx, G., (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 65, pp. 3756–3788.
- Wang, G., Dong, N., Wang, Y. ve ark., (2018). Epithelial dysplasia in pterygium postoperative granuloma. *Experimental Eye Research*, 175, 199–206.
- Wang, X., Dong, B., Zhang, K. ve ark., (2018). E-cadherin bridges cell polarity and spindle orientation to ensure prostate epithelial integrity and prevent carcinogenesis in vivo. *PLOS Genetics*, 14(8), e1007609.
- Weber, C.E., Li, N.Y., Wai, P.Y. ve Kuo, P.C., (2012). Epithelial-mesenchymal transition, TGF- β , and osteopontin in wound healing and tissue remodeling after injury. *Journal of Burn Care and Research*, 33(3), 311–318.
- Weinstein, O., Rosenthal, G., Zirkin, H. ve ark., (2002). Overexpression of p53 tumor suppressor gene in pterygia. *Eye*, 16(5), 619–621.
- Weiss, J.M., Goode, E.L., Ladiges, W.C. ve Ulrich, C M., (2005). Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: A review of the functional and epidemiologic literature. *Molecular Carcinogenesis*, Vol. 42, pp. 127–141.
- Wickström, S.A. ve Niessen, C.M., (2018). Cell adhesion and mechanics as drivers of tissue organization and differentiation: local cues for large scale organization. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 54, pp. 89–97.
- Wit, J.M. ve Walenkamp, M.J., (2013). Role of insulin-like growth factors in growth, development and feeding. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 106, 60–65.

- Witmer, A.N., Vrensen, G.F.J.M., Van Noorden, C.J.F. ve Schlingemann, R.O., (2003). Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, Vol. 22, pp. 1–29.
- Xu, Y.X., Zhang, L.Y., Zou, D.L. ve ark., (2014). Differential expression and function of survivin during the progress of pterygium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55(12), 8480–8487.
- Yoshida, C. ve Takeichi, M., (1982). Teratocarcinoma cell adhesion: Identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell*, 28(2), 217–224.
- Young, A.L., Cao, D., Chu, W.K. ve ark., (2018). The Evolving Story of Pterygium. *Cornea*, 37, 1.
- Young, C.H., Chiu, Y.Te, Shih, T.S. ve ark., (2010). E-cadherin promoter hypermethylation may contribute to protein inactivation in pterygia. *Molecular Vision*, 16, 1047–1053.
- Yu, H. ve Rohan, T., (2000). Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 92, pp. 1472–1489.
- Zacapala-Gómez, A.E., Navarro-Tito, N., Alarcón-Romero, L. del C. ve ark., (2018). Ezrin and E-cadherin expression profile in cervical cytology: A prognostic marker for tumor progression in cervical cancer. *BMC Cancer*, 18(1), 1–10.
- Zavadil, J. ve Böttinger, E.P., (2005). TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*, Vol. 24, pp. 5764–5774.

Zhang, M., Liu, Z. ve Xie, Y., (2000). The study on the expression of keratin proteins in pterygial epithelium. *Yan Ke Xue Bao = Eye Science / "Yan Ke Xue Bao" Bian Ji Bu*, 16(1), 48–52.

Zhong, M., Shen, W., Fu, Q. ve Zhang, Y. (2009). Quantitative detection of the expression level of transforming growth factor- β and its receptors in pterygium with RT-PCR. *International Journal of Ophthalmology*, 9(4), 619–622.

Zhong, Y., Ding, K. ve Ye, W., (2001). The relation between expression of basic fibroblast growth factor and mast cells in pterygium. *C. J. of Oph.*, 37, 455-457.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Emel ENSARİ

Doğum Tarihi: 17.03.1986

Öğrenim Durumu: Doktora (Devam Ediyor)

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	TOGÜ	2009
Y. Lisans	Tıbbi Biyoloji AD	TOGÜ	2013-2015
Doktora	Tıbbi Biyoloji AD	TOGÜ	2016-Devam ediyor

Yüksek Lisans Tez Başlığı: Çocukluk Çağı Obezitesinde ANNEXİN A5 Gen Polimorfizmlerinin Rolü

Danışman: Doç Dr H. Ömer ATEŞ

Doktora Tez Başlığı ve Danışmanı: Bir Yüzey Yapışma Proteini Olan E- Kaderinin Pterijyum Gelişimindeki Rolünün Araştırılması

Danışman: Prof. Dr.H. Ömer ATEŞ

Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Arş. Gör.	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2011-2013
Arş. Gör.	Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	2013- Devam ediyor