



T.C

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**PTERJİYUM TANISI ALMIŞ HASTALARDA COL1A1 GENİNİN
ANALİZİ**

Hazırlayan

Asiye YANCI

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. Hacı Ömer ATEŞ

TOKAT-2021

Her hakkı saklıdır

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PTERJİYUM TANISI ALMIŞ HASTALARDA *COL1A1* GENİNİN
ANALİZİ

Asiye YANCI

TOKAT-2022

Bu çalışma Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
tarafından desteklenmiştir.(Proje No:2020/91)

Her hakkı saklıdır

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini aktaran, tez çalışmama yön veren, manevi desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof.Dr. Hacı Ömer Ateş'e,

Eğitimim boyunca bilgilerinden faydalandığım, tez ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Nihan BOZKURT'a, Arş. Gör. Dr. Emel ENSARİ'ye ve Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ'a

Tez çalışmam için gereken doku örneklerinin toplanmasında emeği geçen Tokat Gaziosmanpaşa Üniversite Hastanesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Öğr.Üyesi Prof. Dr. Helin Deniz DEMİR'e ve istatistiksel hesaplamaların yapılmasında yardımcı olan Biyoistatistik Anabilim Dalı Dr.Öğr.Üyesi Osman DEMİR'e,

Çalışmalarımın yürütülebilmesi için 2020/91 no'lu proje ile maddi destek sağlayan Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna,

Tez çalışmamda büyük emeği geçen, benimle tecrübelerini paylaşan ve destek olan Doktora Öğrencileri Kübra ŞAHİN ve Sadegül ŞAVKIN'a,

Bu süreçte birçok anımı paylaştığım, birbirimize destek olduğumuz çalışma arkadaşlarım, İrem YILDIZ, Aso İbrahim KHALEEL, Azize ÖZEN, Yusuf SELEN ve Mustafa KOÇAK'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca maddi manevi desteğim olan canım ablam Kübra YANCI'ya, tüm hayatım boyunca bana yol gösteren ve her zaman yanımda olduklarını bildiğim canım abilerime,

Bugünlere gelmemi sağlayan, beni desteklemekten hiç vazgeçmeyen canım annem ve babama *sonsuz sevgi ve teşekkürler...*

İTHAF

*Her koşulda birlikte olmayı, ne olursa olsun değerlerimize sahip çıkmayı ve en
önemlisi aile olmayı öğreten canım annem ve babama
ithaf ediyorum...*

ÖZET

PTERJİYUM TANISI ALMIŞ HASTALARDA *COL1A1* GENİNİN ANALİZİ

YANCI, Asiye

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hacı Ömer ATEŞ

Ocak 2022

Pterjiyum, göz kapağı aralığına yerleşen üçgen şekilli, genellikle bilateral, nazal tarafta bulbar konjoktivadan orjin alan dejeneratif, anormal fibrovasküler dokunun kornea üzerine ilerlemesi olarak tanımlanmaktadır. Kollajen, hareket sisteminin yapı taşlarını, özellikle kemik, kıkırdak, lif ve eklemleri oluşturan proteindir. Bu protein birbiri üzerine sarılmış üç alfa zincirinden meydana gelmektedir. 28 tane değişik tipi tanımlanmış olup, tip I, tip II şeklinde isimlendirilmektedir. Tip I kollajen ECM’de en fazla bulunan kollajen tipi olarak bilinmektedir. Kollajen tip I alfa 1 (*COL1A1*) geni ise, iki alfa 1 zinciri ve bir alfa 2 zincirinden oluşan tip I kollajenin pro-alfa 1 zincirlerini kodlamaktadır. *COL1A1* geni 17q21.33 pozisyonunda kromozom 17 üzerinde yer almakta ve 51 ekzon içermektedir. Pterjiyum ile ilgili birçok çalışma olmasına rağmen, hastalığın patogenezi tam olarak açıklanamamıştır. Pterjiyum patogenezinin hücresel proliferasyon ve anti-apoptozis ile karakterize edilmesi, pterjiyumun dejeneratif bir hastalıktan ziyade bir tümör anoloğu olduğunu düşündürmektedir. Kollajen familyasının üyelerinin çeşitli doku tiplerinde karsinogeneze rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır. *COL1A1* gen mutasyonlarının patojenitesinin birçok hastalıkla ilişkili olduğu söylenmektedir ve *COL1A1*’nin anormal ekspresyonun bazı kanserlerde rol oynadığı bildirilmiştir. Pterjiyum tanısı almış 27 olgunun pterjiyum ve normal konjonktiva dokusu çalışmaya alındı. Pterjiyum dokusunda *COL1A1* geninin RNA düzeyinde ekspresyonu için qRT-PCR analizi yapıldı. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre normal konjonktiva dokusuna kıyasla pterjiyum dokusunda *COL1A1* geni ekspresyon düzeyinin arttığı fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$).

Anahtar Kelimeler: *COL1A1*, Pterjiyum, qRT-PCR

ABSTRACT

ANALYSIS OF *COL1A1* GENE IN PATIENTS DIAGNOSED WITH PTERGIUM

YANCI, Asiye

Master's Thesis, Department of Medical Biology

Advisor: Prof. Dr. Hacı Ömer ATEŞ

January 2022

Pterygium is defined as the progression of a triangular, usually bilateral, degenerative, abnormal fibrovascular tissue originating from the bulbar conjunctiva on the nasal side onto the cornea, located in the eyelid space. Collagen is the protein that forms the building blocks of the movement system, especially bone, cartilage, fiber and joints. This protein is composed of three alpha chains wrapped around each other. 28 different types have been defined and they are named as type I and type II. Type I collagen is known as the most abundant type of collagen in the ECM. The collagen type I alpha 1 (*COL1A1*) gene encodes the pro-alpha 1 chains of type I collagen, which consists of two alpha 1 chains and one alpha 2 chain. The *COL1A1* gene is located at position 17q21.33 on chromosome 17 and contains 51 exons. Although there are many studies on pterygium, the pathogenesis of the disease has not been fully explained. Characterization of pterygium pathogenesis by cellular proliferation and anti-apoptosis suggests that pterygium is a tumor analog rather than a degenerative disease. There is evidence that members of the collagen family are involved in carcinogenesis in various tissue types. The pathogenicity of *COL1A1* gene mutations is said to be associated with many diseases, and abnormal expression of *COL1A1* has been reported to play a role in some cancers. Pterygium and normal conjunctival tissues of 27 cases diagnosed with pterygium were included in the study. qRT-PCR analysis was performed for the expression of *COL1A1* gene at the RNA level in the pterygium tissue. According to the data obtained as a result of the study, it was found that the expression level of *COL1A1* gene increased in pterygium tissue compared to normal conjunctival tissue, but this increase was not statistically significant ($p>0,05$).

Keywords: *COL1A1*, Pterygium, qRT-PCR

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Pterjiyum Tanımı	4
2.2. Pterjiyum Morfolojisi	4
2.3. Pterjiyum Sınıflandırması	5
2.4. Pterjiyum Çeşitleri	6
2.5. Pterjiyum Epidemiyolojisi	7
2.6. Pterjiyum Histolojisi	8
2.7. Pterjiyum Patogenezi	9
2.8. Pterjiyum Oluşumuna Sebep Olan Faktörler	9
2.8.1. UV Işını	9
2.8.2. Viral Enfeksiyonlar.....	11
2.8.3. Tümör Baskılayıcı Genler	13
2.8.3.1. p53	13
2.8.4. Apoptoz proteinleri.....	14
2.8.5. Hücre Yapışma Molekülleri	15
2.8.6. Proliferasyonla İlgili Proteinler	16
2.8.7. Isı Şoku Proteinleri	17
2.8.8. Sıkı Bağlantı Proteinleri	17
2.8.9. Hücre Dışı Matris Proteinleri	18
2.8.10. Matris Metalloproteinazlar Ve Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri..	19
2.8.11. İnterlökinler'ler	20
2.8.12. Büyüme Faktörleri.....	21
2.8.13. Pterjiyum Gelişimine Yatkınlıkta Genetik Faktörler	23
2.8.14. Oksidatif Stres	24

2.8.15. Pterijyumda DNA Onarımı.....	25
2.9. Pterijyum Gelişimine İlişkin Moleküler Mekanizmalar	26
2.9.1. Epigenetik Faktörler	26
2.9.2. Hücre Proliferasyon Faktörleri	27
2.9.3. Anjiyogenez ve Lenfanjiyogenez	28
2.9.4. İmmünolojik Mekanizmalar	29
2.9.5. Epiyelyal-mezenkimal geçiş.....	29
2.9.6. Kolesterol Metabolizmasındaki Değişiklikler	30
2.10. ECM.....	31
2.10.1. ECM 'nin İşlevi.....	32
2.10.2. ECM'nin Birincil Bileşenleri	33
2.10.3. Kollajen Gen Ailesi	34
2.10.4. Kollajen	35
2.10.5. Fibriller Kollajenler	36
2.10.6. <i>COL1A1</i> Geni	36
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	43
3.1. Çalışma grubu.....	43
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	43
3.3.Çalışmada Kullanılan Sarflar ve Kimyasallar	44
3.4. Uygulanan Yöntemler.....	45
3.4.1. Dokuların Saklanması	45
3.4.2. Total RNA izolasyon protokolü	45
3.4.3. Total RNA Konsantrasyon Ölçümü	46
3.4.4. Total RNA'dan cDNA Sentezi.....	46
3.4.5. cDNA Konsantrasyonunun Hesaplanması	48
3.4.6. qRT-PCR Aşaması	48

4.BULGULAR	51
4.1. Pterijyumlu Dokulara Ait Histopatolojik İnceleme	52
4.2. qRT-PCR Analiz Sonuçları	52
4.3. <i>COL1A1</i> Geni qRT-PCR Sonuçlarının İstatistiksel Analizi	55
4.4. Analiz Sonuçları	56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	57
KAYNAKLAR	60



TABLÖLER LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Pterijyum çeşitleri.....	6
Tablo 3.1. cDNA sentezi için kullanılan bileşenler ve miktarları	47
Tablo 3.2. cDNA sentezi için uygulanan PCR programı.....	47
Tablo 3.3. qRT-PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları	49
Tablo 3.4. qRT PCR Analizinde Kullanılan Primer Baz Dizileri.....	50
Tablo 3.5. qRT-PCR Programı	50
Tablo 4.1. Konjonktiva ve pterijyum dokularındaki <i>COL1A1</i> geni değerlerinin istatistiksel analizi	55
Tablo 4.2. <i>COL1A1</i> ve <i>ACTB</i> genlerinin ortalama $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Pterjiyumun yapısal bölümleri.....	5
Şekil 2.2. Pterjiyum Sınıflandırması.....	6
Şekil 2.3. Konjonktiva ve pterjiyum dokusu	8
Şekil 2.4. Pterjiyum gelişiminde UV etkisi	11
Şekil 2.5. Pterjiyum gelişimine etki eden moleküler mekanizmalar	26
Şekil 2.6. ECM'nin işlevlerinin şematize gösterimi.....	32
Şekil 2.7. Kollajen ailesi	35
Şekil 2.8. <i>COL1A1</i> geninin kromozom üzerindeki lokasyonu	36
Şekil 2.9. Tip I kollajen pro -1(I) zinciri ve <i>COL1A1</i> geninin yapısı	37
Şekil 2.10. <i>COL1A1</i> proteininin 3D yapıları	38
Şekil 2.11. <i>COL1A1</i> geninin farklı dokulardaki ekspresyonu	38
Şekil 2.12. <i>COL1A1</i> geninin çeşitli kanser hastalıklarında görülme sıklığı	41
Şekil 3.1. Total RNA izolasyonu protokol özetinin şematize gösterimi	46
Şekil 3.2. cDNA sentezi şematik gösterimi	48
Şekil 3.3. qRT-PCR aşamaları	50
Şekil 4.1. Çalışılan hasta gruplarında Cinsiyet Dağılım Grafiği	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.2. Pterjiyumlu Dokuya Ait Histopatolojik Görüntü	53
Şekil 4.3. <i>COL1A1</i> genine ait amplifikasyon eğrisi.....	53
Şekil 4.4. <i>COL1A1</i> genine ait erime eğrisi	54
Şekil 4.5. <i>ACTB</i> genine ait amplifikasyon eğrisi	54
Şekil 4.6. <i>ACTB</i> genine ait erime eğrisi.....	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

Açıklama

µl	Mikrolitre
5-FU	5-Florourasil
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
bFGF	Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
COX-2	Siklooksijenaz-2
CRC	Kolorektal kanser
CTGF	Bağ Dokusu Büyüme Faktörü
DFSP	Dematofibrosarkom protuberans
DNMT	DNA Metiltransferaz
EBV	Epstein-Barr Virüsü
ECM	Hücre Dışı Matris
EMT	Epitelyal-Mezenkimal değişim
FGF2	Fibroblast Büyüme Faktörü 2
FGFR3	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 3
FN	Fibronektin
GAG	Glikozaminoglikanlar
HIF-1α	Hipoksi ile İndüklenebilir faktör 1- α
HPV	İnsan Papilloma Virüsü
HSP	Isı Şok Proteini
HSV	Herpes Simpleks Virüsü
ICAM-1	Hücreler arası yapışma molekülü 1
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGFBP2	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein 2
IGFBP3	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein 3
IL	İnterlökin
LC	Akciğer Karsinomu
LC	Limbal-konjonktival otograft
LOX	Lisil Oksidaz

MMC	Mitomisin-C
MMP	Matris Metalloproteinazlar
mTORC1	Rapamisin Kompleksi1
NGF	Sinir Sistemi Büyüme Faktörü
NO	Nitrik Asit
PCNA	Proliferatif Hücre Nükleer Antijeni
PG	Proteoglikan
PLK1	Polobenzeri Kinaz1
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
sn	Saniye
SPARC	Sisteinden Zengin Protein
TAZ	Tafazzin
TF	Doku Faktörü
TGFR- β 1, β 2	Dönüştürücü Büyüme Faktörü beta resetörü 1,2
TGF- β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü-beta
TIMP	Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri
UV	Ultraviyole
VCAM-1	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü 1
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGF-C	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü C
VEGFR	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
VEGFR-2,3	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü 2,3

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pterijyum, konjonktiva dokusunun şeffaf kornea üzerine invazyonu, elastoz ve Bowman tabakasının parçalanmasından oluşan üçgen şekilli bir büyüme ile karakterize sık görülen oküler yüzey hastalıklarından biridir (Liu ve ark., 2017;Zhang ve ark., 2019).

Üçgen şekilli bu etli fibrovasküler doku limbus boyunca ilerleyip korneanın görme eksenine ulaştığında görmeyi etkilemektedir (Liu ve ark., 2017;Ghoz ve ark., 2019). Lezyon; astigmatizma, kuruluk, oküler irritasyon ve görme bozukluğu ile kornea stromal skarlaşmaya neden olmaktadır (Zhang ve ark., 2019). Kornea skarlaşması, kronik oküler yüzey iltihabı ve düzensiz astigmatizma ile sonuçlanarak oküler hareketi kısıtlamaktadır (Ghoz ve ark., 2019).

Pterijyumun altında yatan biyolojik mekanizmalar tam anlaşılamamıştır ve görmeyi etkilediğinde uygulanan tek tedavi seçeneği cerrahi olarak çıkarılmasıdır (Liu ve ark., 2017). Pterijyumun çıkarılmasından sonraki seçenekler arasında konjonktivanın primer kapatılması, konjonktival otogreft, limbal-konjonktival otogreft (LCAG), konjonktival rotasyonel greft, konjonktival flepler ve amniyotik membran grefti bulunmaktadır (Chu ve ark., 2020). Ancak pterijyumda nüksler yaygın olarak görülmektedir ve pterijyumun büyüme eğilimine dayanarak dejeneratif bir süreçten ziyade proliferatif bir bozukluk olabileceğini düşündüren araştırmalar yapılmıştır (Liu ve ark., 2017).

Pterijyumun etiyolojisi tamamen anlaşılamamış olmakla birlikte, hem genetik bileşenlerin hem de çevresel faktörlerin bu hastalığa katkıda bulunduğu bilinmektedir. Önceki çalışmalar, ileri yaş, erkek cinsiyet ve açık havada çalışmanın pterijyum varlığı için kritik risk faktörleri olduğunu öne sürmüştür (Zhang ve ark., 2019). Bunlar arasında Ultraviyole radyasyona (UVR) maruz kalma en önemli risk faktörü sayılmaktadır (Ramirez ve ark., 2018).

UVB radyasyonu sebebiyle meydana gelen DNA hasarı, fototoksik etkinin doğrudan bir sonucu veya reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunun dolaylı sonucu

olmakta ve pterjiyum gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (Meshkani ve ark., 2019).

Pterjiyum kapsamlı bir şekilde çalışılmış olmasına rağmen, patogenezi belirsizliğini halen korumaktadır (Feng ve ark., 2017). Ultraviyole ışık, göz kuruluğu, zararlı kimyasallara maruz kalma, rüzgara ve toz partikülleri ile mikrotravmaya maruz kalma genetik ve immünolojik faktörler gibi çevresel faktörler pterjiyum patogenezinde büyük rol oynamaktadır. Çevresel faktörlerin yanı sıra fibrovasküler proliferasyon, inflamasyon ile anjiyogenez, pterjiyum patogenezi ve ilerlemesinde rol oynamaktadır (Ramirez ve ark., 2018;Ghoz ve ark., 2019). Çok sayıda çalışma, büyüme faktörleri, matris metalloproteinazlar (MMP) ve interlökinler (IL) gibi çeşitli moleküllerin, pterjiyum patolojisini oluşturan anjiyogenez, fibroz, proliferasyon ve inflamasyon ile yakın ilişkisi olduğuna dair kanıtlar sunmaktadır(Feng ve ark., 2017).

Pterjiyum gelişimine yol açan başlıca faktörlerden birinin de hücre döngüsünün bozulması olduğu düşünülmektedir. Anormal hücre döngüsü kinetiğinin, hücresel proliferasyona ve apoptozdan kaçışa sebep olması muhtemelen pterjiyum oluşması ile büyümesinde önemli bir faktör olabileceğini göstermektedir. Pteryjiyum da *p53* tümör baskılayıcı gende mutasyon ve yabanıl tip *p53* geninin kaybı gösterilmiştir, bu olayın mitojenik gücü desteklediği düşünülmektedir (Kim ve ark, 2013). Ayrıca son yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, pterjiyumun pre-maling özelliklere sahip bir kök hücre hastalığı olduğunu desteklemesinin yanı sıra patogenezinde epitelyal-mezenkimal değişimlerin (EMT) anahtar bir rol oynayabileceği ifade edilmektedir (Engelsvold ve ark., 2013).

Pterjiyum gelişiminde hücresel proliferasyon ve antiapoptotik süreçlerin yer alması araştırmacılara hastalığın dejeneratif bir hastalıktan ziyade bir tümör analogu olduğunu düşündürmektedir (Kim ve ark., 2013). Kanserle ilgili mortalitenin ana nedeni olan metastaz, karmaşık, çok aşamalı bir süreçtir. Hücre dışı matris bileşeni (ECM) tümörler metastatik ilerlemede rol oynamaktadır. Fakat ECM karmaşık bir makromoleküler substrat olarak bulunur ve moleküler bileşiminin kanser ilerlemesini nasıl teşvik ettiği henüz belirlenememiştir. Bununla birlikte, ECM homeostazının deregülasyonu sıklıkla kanser büyümesine eşlik etmekte ve tümör gelişimini

destekleyen patolojik ECM'nin yeniden şekillenmesini tetiklemektedir (Yuzhalin ve ark., 2018).

ECM'nin ana bileşeni kollajenlerdir. Kollajenler ise memelilerde en çok bulunan proteinlerdir. Kollajen ailesi, en az bir üçlü sarmal alan içeren 28 üyeden oluşmaktadır. Kollajenler, hücrelerin çoğunun supramoleküler düzenekler oluşturduğu ECM içinde biriktirilmektedir. Kollajenler yapısal roller oynamakta ve dokuların mekanik özelliklerine, organizasyonuna ve şekline katkıda bulunmaktadır. Birkaç reseptör ailesi aracılığıyla hücrelerle etkileşime girerek hücrelerin çoğalma, göç ve farklılaşmalarını düzenlemektedirler (Ricard-Blum., 2011;Tural ve ark., 2011).

Tüm kollajenler içerisinde en çok bulunan Tip I kollajen, çoğu bağ dokusunda ve embriyonik dokularda özellikle kemik, kornea, dermis ve tendonda bol miktarda bulunmaktadır (Ma ve ark., 2019). Kollajen tip I alfa 1 (*COL1A1*) geni, üçlü sarmalı iki alfa 1 zinciri ve bir alfa 2 zincirinden oluşan tip I kollajenin pro-alfa 1 zincirlerini kodlamaktadır (Li ve ark., 2020).

COL1A1 gen mutasyonlarının patojenitesinin birçok hastalıkla ilişkili olduğu ve *COL1A1*'nin anormal ekspresyonunun bazı kanser türlerinde rol oynadığı bildirilmiştir (Ma ve ark., 2019). *COL1A1*'in mide kanserinde yukarı regüle edildiği ve kanser hücresi invazyonu ve metastazında önemli roller oynadığı düşünülmektedir (Liu ve ark., 2017). Meme kanseri hücre hatlarında, stromal fibroblastlar tarafından salgılanan tip I kollajenin, MMP-9'un mRNA seviyesinin indüklenmesi yoluyla meme kanseri hücrelerinin agresif özelliklerini arttırabileceği belirtilmektedir (Ma ve ark., 2019). Kolorektal kanserde (CRC) artan *COL1A1* ekspresyonu, serosalinvazyon, lenf metastazları ve hematojen metastazlarla anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur (Zhang ve ark., 2018).

Bu çalışma da amacımız, pterijyum ile *COL1A1* geni arasındaki olası ilişkiyi belirlemek olup moleküler mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pterjiyum Tanımı

Pterjiyum, konjonktivanın kornea üzerine fibrovasküler uzanım göstermesi ile karakterize, dejeneratif ve proliferatif bir oküler yüzey hastalığıdır (Özer, 2014).

Pterjiyum sık görülen oküler yüzey bozukluklarından biridir. Yunanca iki kelimeden "pterygium" kelimesi türetilmiştir: (pteryx) kanat anlamına ve (pterygion) yüzgeç anlamına gelmektedir (Sarkar, 2020). Hastalığın adı, klinik olarak bir böceğin zarımsı kanadına benzerliğinden türetilmiştir (Hanbazazh ve ark., 2018). Oftalmik cerrah olan Sushruta, MÖ 1000' de pterjiyumu tanımlayan ilk kişidir (Sarkar, 2020).

Pterjiyum, göz kapağı aralığına yerleşen üçgen şekilli, genellikle bilateral, nazal tarafta bulbar konjonktivadan orjin alan dejeneratif, anormal fibrovasküler dokunun kornea üzerine ilerlemesi olarak tanımlanmaktadır (Kocamış, 2005). Genellikle iyi huylu ve kozmetik bir sorun olarak görülse de, üçgen şekilli büyüme göz bebeğini kapladığında, iltihaplanarak o bölgede kızarıklık ve tahrişe neden olmaktadır. Önemli derecede görmeyi tehdit eden komplikasyon haline geldiğinde ve uygun tedavi uygulanmadığında önemli görsel morbiditeye hatta ilerleyen aşamalarda potansiyel olarak körlüğe neden olabilmektedir (Liu ve ark., 2013;Liu ve ark., 2017;Song., 2017).

2.2. Pterjiyum Morfolojisi

Pterjiyum, korneayı merkezci olarak istila eden, görüşü bozan ve iltihaplanmaya neden olan korneo-skleral limbustan anormal kanat şeklinde epitel ve fibrovasküler doku büyümesidir (Cardenas-Cantu, 2016).

Pterjiyum dokusunun yapısal olarak belirlenmiş bölümleri vardır:

Baş (apex): Korneayı invaze eden bölümdür.

Gövde (body): Semilunar katlantıya doğru uzanım gösteren trapezoid şekilli vaskülarize bölümdür.

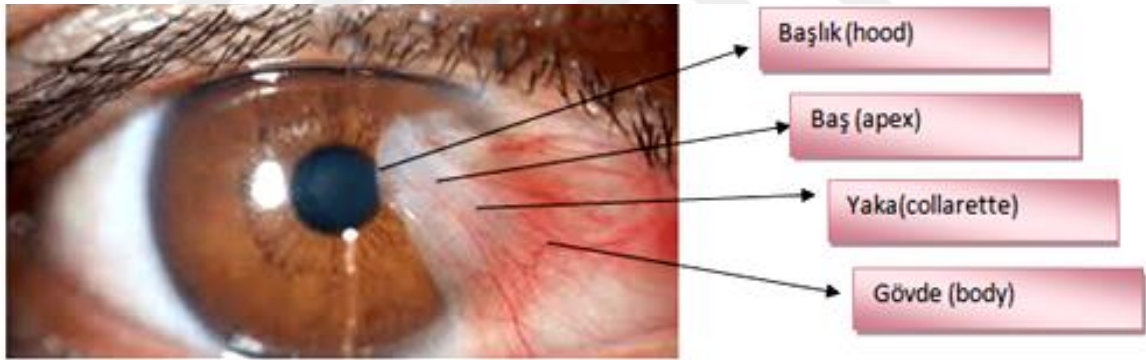
Yaka (collarette): Lezyonun limbal kısmıdır.

Başlık (hood): Baş etrafında, kornea epitelinde görülen, gri, avasküler, hilâl şeklindeki kısımdır. Pterjiyum aktifken üzerinde oluşan mikroülserasyonlar nedeniyle epitel floraseinle boyanır ve altındaki stroma buğulanır.

Fuchs yamaları (Fuchs' patches): Başlık önünde kornea epiteli altında görülen, küçük, irregüler, gri opasitelerdir. Bunlar, derin kornea katlarında gömülü konjonktiva epitel adacıklarının oluşturduğu mikrokistlerdir. Aktif pterjiyum olgularında izlenmemektedir.

Stocker çizgisi (Stocker's line): Baş önünde, sarı-yeşil renkli hilâl biçimli çizgidir. Bowman membranında demir birikimi sonucu oluşmaktadır ve lezyonun kronik ve yavaş seyirli olduğunu göstermektedir (Şekil 2.1.) (Esen., 2005).

Kornea yüzeyinde ilerleyen bu anormal doku, Bowman tabakasına doğru da invazyon göstererek kornea destrüksiyonuna neden olmaktadır. Genellikle yavaş ilerlemekte, inflamatuvar epizodlar ve inaktif dönemlerle seyretmektedir. Daha çok nazalde (%91) olmak üzere; bazen temporal bölgede de bulunmaktadır ve %25 oranında her iki tarafta da olabilmektedir (Özer., 2014).



Şekil 2.1. Pterjiyumun yapısal bölümleri

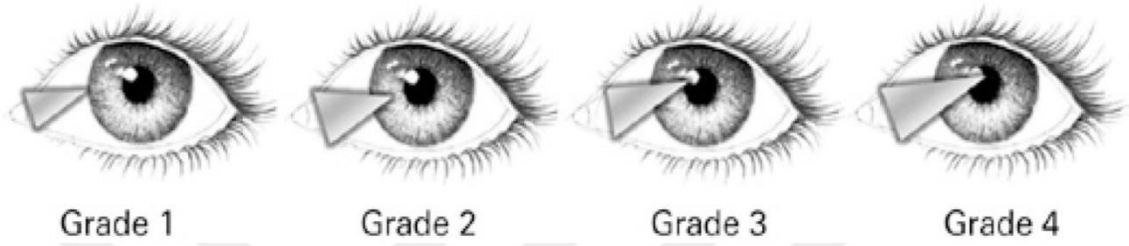
2.3. Pterjiyum Sınıflandırması

Pterjiyum, korneaya kadar uzanan ve tahriş edici semptomlara, görme bozukluklarına, tekrarlayan inflamasyona ve oküler yüzeyde estetik değişikliklere yol açabilen konjonktival fibrovasküler bir dokudur.

Tanıda, fibrovasküler doku limbusa ulaştığında 1. derece, korneayı yaklaşık 2 mm kapladığında 2. derece, göz bebeği sınırına ulaştığında 3. derece ve göz bebeğini

aştığında 4. derece olarak sınıflandırılabilceği yarık lamba muayenesi ile doğrulanmaktadır (Şekil 2.2.).

Morfolojik olarak, pterjiyum lezyonun hemen altındaki yapıların görüntülenmesine izin verdiğinde involüsyonlu veya atrofik olarak sınıflandırılabilir. Fibrovasküler doku etli olduğunda ve aşağıdaki yapıların görüntülenmesini engellediğinde iltihaplı olarak sınıflandırılmaktadır (Wanzeler., 2019).



Şekil 2.2. Pterjiyum Sınıflandırması

Pterjiyum şiddeti objektif olarak değerlendirebilmek için, üç bölge içindeki kornea düzensizliğine göre 1.0, 3.0 ve 5.0 mm çaplar olarak derecelendirilmiştir. Bu nedenle, 1.0 mm çapındaki artan kornea düzensizliğinin, görsel fonksiyon etkisi riski ile yüksek oranda sonuçlandığı kabul edilmiştir ve 5.0 mm çapında artan kornea düzensizliği, görsel fonksiyon etkileri ile hafif şiddet olarak kabul edilmiştir (Wanzeler., 2019)

2.4. Pterjiyum Çeşitleri

Pterjiyum atrofik (dejenere) veya progresif (ilerleyici) olabilmektedir (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. Pterjiyum çeşitleri

Progresif Pterjiyum		Atrofik Pterjiyum
Dış Görünüş	Kalın ve etli	İnce ve zarlı
Kan Damarları	Çok belirgin	Soluk bir görünüm veren çok az kan damarı
Başın önünde kap	Mevcut	Mevcut değil
İlerleme	Korneaya doğru ilerlemeye devam	İlk büyüme döneminden sonra statik

2.5. Pterjiyum Epidemiyolojisi

Pterjiyum etiyolojisi tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, hem genetik bileşenlerin hem de çevresel faktörlerin bu hastalığa katkıda bulunduğu bilinmektedir (Zhang ve ark., 2019). Yapılan epidemiyolojik çalışmalar bunun güneşe bağlı bir göz hastalığı (oftalmoheliosis) olduğunu düşündürmektedir (Chalkia ve ark., 2013).

Dünya çapında görülmesine rağmen ekvatorun 30 derece kuzeyi ile 30 derece güneyi arasındaki “pterjiyum kuşağı”nda yaşayan popülasyonlarda çok yaygın gözlenen bir fibrovasküler lezyondur (Liu ve ark. 2013;Singh, 2017). Bu bölgedeki genel popülasyonun yaklaşık %22'sinde pterjiyum olduğu tahmin edilmektedir. Bu epidemiyolojik gözlem pterjiyumun gelişimi üzerinde güçlü çevresel etkilerin olduğunu göstermektedir. Çevresel etki, pterjiyum bölgesi dışındaki ülkelerde önemli ölçüde düşük pterjiyum prevalans oranı (%2'den az) ile doğrulanmaktadır (Liu ve ark., 2013).

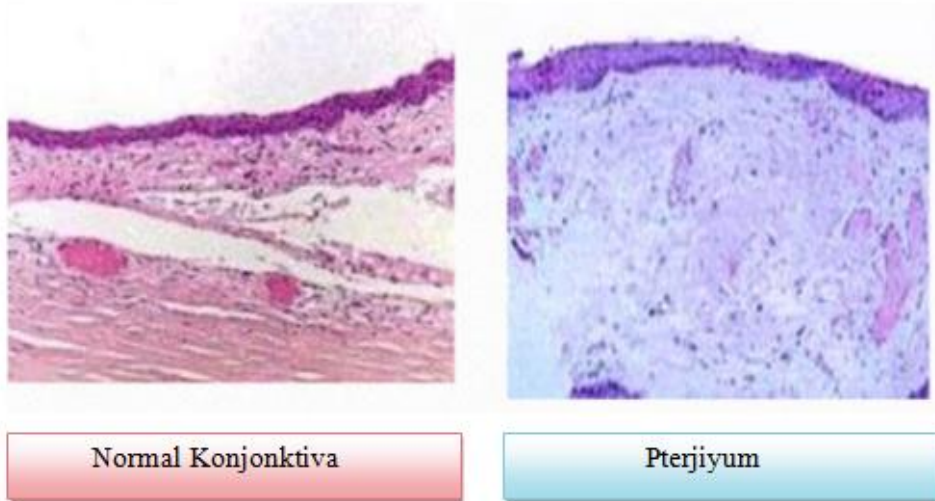
Pterjiyumdan 200 milyondan fazla insanın etkilendiği tahmin edilmektedir ve epidemiyolojisine ilişkin raporlar farklı etnik kökenler arasında değişiklik göstermektedir (Meshkani ve ark., 2019;Shibata ve ark., 2020). Pterjiyum prevalansı Avustralyalılarda %3, ABD'li (Amerika Birleşik Devletleri) siyahlarda %23, Çin'de Tibetlilerde %15, Çin'de Moğollarda %18, Japonlarda %30 ve Singapurlu Çinli ve Hintlilerde %7 olarak bildirilmektedir (Chalkia ve ark., 2013). Genel olarak, kırsal bölgelerde kentsel bölgelere göre daha yüksek pterjiyum prevalansı bulunmaktadır (Shiroma ve ark., 2009).

Literatürlerde pterjiyumun, güneşe açık alanlarda çalışanlarda ve risk faktörleriyle daha çok karşılaşan bazı meslek gruplarında daha sık saptandığı belirtilmektedir (Gumus, 2013;Liu ve ark., 2013). Pterjiyumun erkeklerde kadınlara göre iki kat daha fazla ortaya çıktığı gösterilmiştir, bu da erkeklerin bazı ülkelerde kadınlardan daha fazla dışarıda vakit geçirmesine bağlanmaktadır (Liu ve ark., 2013). Artan yaşın pterjiyum vakalarında artışa sebep olmasıyla birlikte, pterjiyum daha sık genç erişkinlerde, nadiren 15 yaşından önce ortaya çıkmaktadır (Droutsas ark., 2010;Wanzeler ve ark., 2019). Bazı çalışmalarda yaşla bir ilişki bulunamamasına ve konu tartışmalı olmasına rağmen, daha genç yaş genellikle nüks ile ilişkilendirilmektedir (Janson., 2014).

Diğer bir önemli çevresel faktör de insan papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonudur (Liu ve ark., 2013). Ek olarak, toza maruz kalma, kronik konjonktival inflamasyon, genetik yatkınlık ve oküler kuruluğun aracılık ettiği tekrarlayan mikro travmaların pterijyumda rol oynadığı ve multifaktöriyel bir patogeneze işaret ettiği bildirilmiştir (Chalkia ve ark., 2013). Pterijyumun kesin etiolojisi bilinmemekle birlikte, pterijyum oluşumu ile yaşlanma, cinsiyet, UVR ve açık hava çalışması arasında bir ilişki var gibi görünmektedir (Lin., 2019).

2.6. Pterijyum Histolojisi

Işık mikroskopunda, bulbar konjonktival ve limbal epitelinin hemen altında, anormal elastik dokuya benzeyen kıvrılmış veya parçalanmış liflerle serpiştirilmiş dejenere kollajene benzeyen amorf, eozinofilik, hyalinize veya granüler görünümlü materyal birikimlerinin olduğu değişen kalınlıkta bir bölge sergilemektedir. Genellikle stromal fibrokitler, yaralanmaya yanıt olarak çoğalmış gibi sayıca artmaktadır. Ek olarak, özellikle yaşlı lezyonlarda, proteinli bir maddenin küçük agregatları, asit mukopolisakkarit ve kalsifik konkresyonlar görülmektedir. Tanımlanan histolojik özellikler pingueculae'de bulunanlara benzemektedir ve güneşe maruz kalan derinin dermisinde bulunanlarla hemen hemen aynıdır (Şekil 2.3.) (Hill., 1989).



Şekil 2.3. Konjonktiva ve pterijyum dokusu
(<https://www.slideshare.net/Anjalihiroli87/pterygium-and-its-management>)

2.7. Pterjiyum Patogenezi

Pterjiyum, patogenezi hala belirsiz olan en yaygın oftalmik bozukluklardan biridir. Konjonktival epitelin kornea üzerinde ilerlemesine izin veren bir limbal yetmezlik olarak düşünülmektedir. Bu genellikle Bowman membranının çözünmesi, bağ dokusunun yeniden şekillenmesi, kronik inflamasyon ve anjiyogenez ile ilişkilendirilmektedir (Bai ve ark., 2010).

Pterjiyumla ilgili en sık belirtilen patojenik faktörler arasında; ısı, toz, kuru atmosfer, viral enfeksiyonlar, immünolojik mekanizmalar, hücre dışı matriksin yeniden şekillenmesi, büyüme faktörleri, bazı sitokinler, anti-apoptotik mekanizmalar ve birkaç anjiyojenik faktör bulunmaktadır (Hamed-Azzam ve ark., 2016)

Son yıllarda, pterjiyum hastalarına ait doku örneklerinin araştırıldığı çalışmalarla, hastalığın patogeneze yeni ve önemli bilgiler sağlanmıştır. Pterjiyumun patogenezi ile ilgili en popüler hipotezlerden biri, genetik duyarlı konaklarda UVR ve HPV enfeksiyonuna maruz kalmanın hastalık gelişimi ile sonuçlanmasıdır (Liu ve ark., 2013).

2.8. Pterjiyum Oluşumuna Sebep Olan Faktörler

2.8.1. UV Işını

Güneşe maruz kalma süresi uzadıkça yüksek pterjiyum prevalansı ve UVR arasında açık bir ilişki gözlemlendiğinden, UVR'nin pterjiyum oluşumu ile de bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Bu radyasyon türü, hücresel DNA üzerinde doğrudan fototoksik etkiler ve hücresel DNA da, proteinler ve lipidlere zarar veren ROS üretimi yoluyla hücrelere zarar verme ve dokuları değiştirme potansiyeline sahiptir (Cardenas ve ark., 2016).

UVR, limbal kök hücre yetmezliğini tetikleyen önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Göze girerken saçılan ışık transkatedral bir yol izlemekte ve iç yüzeyden limbal kök hücrelere çarpmaktadır. Kök hücreler hasara eğilimlidir ve aktif serbest radikallerin oluşumu çeşitli makromolekülleri, DNA hasarını, oksidatif stresin indüksiyonunu ve düzensiz protein ekspresyonunu etkilemektedir (Bai ve ark.,

2010).UV ışık saçılımları ve serbest radikaller yoluyla limbusa verilen zararlar arasındaki bu varsayılan bağlantı, pterijyum gelişiminin altında yatan kanıtlanmış bir mekanizma değildir. Fakat uzun bir süre boyunca, pterijyum progresyonunun limbal alanda birbirini izleyen iki olayın sonucu olduğu düşünülmüştür. Bunlar, kronik UV maruziyeti nedeniyle limbal bariyerin birincil bozulması ve ardından konjonktivalizasyon adı verilen aktif bir süreç yoluyla bitişik kornea üzerinde konjonktival doku, kan damarları ve enflamatuvar hücrelerin kapsamlı proliferasyonudur (Bai ve ark., 2010). Güneş ışığından gelen UVR üç kategoriye ayrılmaktadır.

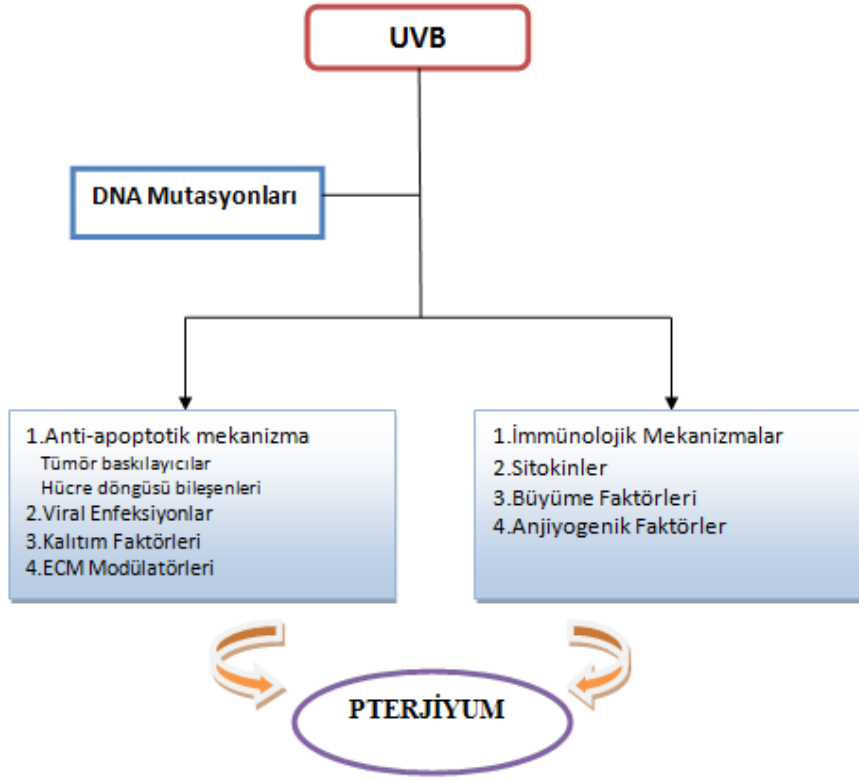
1. UVA (dalga boyu, 320-400 nm): En uzun dalga boyuna ve maksimum penetrasyon gücüne sahiptir; dolayısıyla ozon tabakası tarafından zayıflatılmaz. Pigmentasyonun önemli bir indükleyicisidir ve erken cilt yaşlanmasına, immünosupresyona ve karsinojeneze katkıda bulunmaktadır (Zhou ve ark., 2016).

2. UVB (dalga boyu, 280-320 nm): Ozon tabakası tarafından emilmekte ve Dünya yüzeyine ulaşan toplam UVR yaklaşık %1-10'unu oluşturmaktadır. Güneş yanığı, immünosupresyon ve karsinojenez dahil olmak üzere çeşitli biyolojik olaylardan sorumludur (Zhou ve ark., 2016).

3. UVC (dalga boyu, 200-280 nm): Üç UV ışını arasında en yüksek enerjiye ve güçlü mutajenik özelliklere sahiptir. Ozon tabakası tarafından neredeyse tamamen emilir, bu nedenle insan gözü üzerinde ihmal edilebilir etkiler yaratmaktadır (Cooper., 2007).

İlk çalışmalar UVB'nin DNA hasarındaki rolüne ve oküler yüzey hastalığında hücre içi sinyalleşmenin değişmesine odaklanmış olsa da, epidemiyolojik çalışmalar hem UVB hem de UVA'nın pterijyum gelişimi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. UVA, reaktif oksijen türlerini indükleyerek, DNA'da dolaylı hasara ve ECM değişikliklerinde yer alan çoklu genlerin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır (Shahraki ve ark., 2021).

UVB ışığına maruz kalma ise, pterijyumun ana nedeni olarak ilişkilendirilmiştir. 300 nm' nin altındaki dalga boyları biyolojik olarak en aktif formlar olarak bilinmekte ve kornea tarafından emilmektedir. UVB radyasyonuna maruz kalmak oksidatif strese neden olmaktadır ve bu da pterijyum büyümesinde birçok potansiyel aracın düzenlenmesine yol açabilmektedir (Şekil 2.4.) (Wanzeler ve ark., 2019).



Şekil 2.4. Pterjiyum gelişiminde UV etkisi (Wanzeler ve ark., 2019)

2.8.2. Viral Enfeksiyonlar

Çok aşamalı bir patofizyolojinin parçası olarak, UVR ve kalıtsal genetik faktörlerin yanında, viral ajanların pterjiyum gelişiminde rol oynadığı kabul edilmektedir (Shahraki ve ark., 2021).

Bazı raporlar, pterjiyum örneklerinde herpes simpleks virüsü (HSV) ve HPV'nin varlığını göstermiştir. Virüsler, *p53*'ü inaktive eden proteinleri kodlayarak kromozomal kararsızlığa yol açıp hücrenin maligniteye ilerleme olasılığını artırmaktadır (Wanzeler ve ark., 2019).

HPV, travmatize epitelyal bazal membranları enfekte eden ve konakçı DNA'ya entegre olan bir epitelyotropik virüstür. E6 ve E7 onkoproteinleri, *p53* ve *Rb* dahil olmak üzere konakçı tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, apoptozun inhibisyonu ve telomerazın aktivasyonu dahil olmak üzere birçok hücresel yolakta değişiklik

yaparak hücre döngüsünün düzensizliğine ve kromozom kararsızlığına yol açmaktadır (Hanbazazh., 2018). Kanser gelişimi için yüksek riskli suşlar olarak kabul edilen HPV tip 16 ve 18, pterjiyum ile ilişkili olarak en sık bildirilen genotiplerdir. Pterjiyumda HPV enfeksiyonu prevalansının çok değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Shahraki ve ark., 2021).

HPV'nin pterjiyumda sınırlı tespiti, pterjiyum oluşumunda belirli bir rolü olmadığını veya tek başına hareket etmediğini, ancak gelişiminin çok aşamalı sürecinde sinerjik bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bir fikir birliği sağlanamamış olsa da, popülasyonlar arasındaki genetik arka planın bu farklılıklar için önemli bir faktör olabileceği gösterilmektedir (Liu ve ark., 2013). Yapılan bir çalışmada, pterjiyum patogeneğinde HPV'nin bir kofaktör olarak yer aldığı öne sürülmüştür, buna ek olarak, pterjiyumun cerrahi olarak çıkarılmasından sonra tekrarlamasının da HPV ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Ancak bu konu tartışmalıdır (Wanzeler ve ark., 2019;Shahraki ve ark., 2021). Eğer HPV pterjiyum patogeneğinde veya tekrarlamasında rol oynuyorsa, pterjiyum tedavisinde anti-viral ilaçlar veya aşılama yeni seçenekler arasında olabilir (Wanzeler ve ark., 2019).

Pterjiyumda HSV'nin saptandığını bildiren çalışmalar arasında da benzer bir farklılık mevcuttur. Yunan çalışmaları, hastaların %45'i kadarında HSV ve sitomegalovirüs varlığını bildirirken, Tayvan'da yürütülen bir çalışma, pterjiyum HSV tespiti için sadece %5'lik bir prevalans ortaya koymuştur. Türkiye'de yapılan bir çalışmada ise, incelenen hastaların %10'unda Epstein-Barr virüsü (EBV) DNA tespiti bildirilmiştir (Shahraki ve ark., 2021).

Pterjiyum patogeneğinde onkojenik virüslerin rolü konusunda belirsizlikler olmasına rağmen, güncel literatür, pterjiyum patofizyolojisinin heterojen doğasını ortaya koyan bir farklılık göstermektedir. Mevcut bilgilere göre, en azından bir hasta alt grubunda pterjiyum gelişiminde virüslerin olası bir rolü olduğu ileri sürülebilmektedir (Shahraki ve ark., 2021).

2.8.3. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler, hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesini engellemekte ve proto-onkogenlerle birlikte hücre büyümesini düzenlemektedir. Kapsamlı olarak incelenen tümör baskılayıcı genlerden biri *p53*'tür (Wanzeler ve ark, 2019). *p53*'ün anormal ifadesinin hücre proliferasyonunu teşvik ettiği ve apoptozu yavaşlattığı, böylece pterjiyum gelişimini hızlandırdığı ileri sürülmektedir. Ayrıca limbal tümörlerin olası büyümesinin, diğer genlerde mutasyonlara neden olan hücresel DNA hasarından kaynaklandığı da ileri sürülmektedir (Feng ve ark., 2017).

Son zamanlarda *p53* proteininin, pterjiyumda proliferatif hücresel aktivitenin bir belirteci olan Ki-67 proteini ile pozitif korelasyona sahip olduğu bilinmektedir. Bazı araştırmacılara göre *p53*, *p53* kodon 72 polimorfizmlerinin ve HPV DNA'sının anormal ekspresyonu, pterjiyumun ilerlemesi için gerekli ortak faktörlerdendir. HPV aracılı pterjiyum patogenezi *p53* inaktivasyonunda, HPV 16/18 E6 onkoproteininin rol oynadığı gösterilmiştir. Böylece, *p53*'ün anormal ekspresyonunun, hücre proliferasyonunu teşvik ettiği ve pterjiyumda apoptozu yavaşlatarak, bu hastalığın gelişimini hızlandırdığı düşünülmektedir (Feng ve ark.2017).

p53'e ek olarak, *p63*, *p16* ve *p27* gibi diğer tümör baskılayıcı genler de pterjiyum gelişiminde rol oynamaktadır. *p63* daha çok primer pterjiyumda bazal ve parabazal tabakalarda ve tekrarlayan pterjiyumda epitelin toplam kalınlığında ifade edilmektedir. *p16* proteininin artan ekspresyonu gözlenmiştir. Hem *p63* hem de *p16* , normal konjonktivada nadiren ifade edilmiştir (Ramalho ve ark., 2006). *p27* geni ise diğer tümör baskılayıcı genlerden farklı olarak pterjiyum dokularında düşük nükleer immün reaktivite göstermiştir (Kase ve ark., 2007).

2.8.3.1. *p53*

UVR ile hasar görmüş birçok hücre tipinde, çeşitli hücresel streslerden gelen sinyalleri entegre etmek için hareket eden ana hücre stres düzenleyicisi olan *p53*, aşırı eksprese edilmektedir ve immünohistokimyasal olarak saptanabilmektedir. İyi bilinen bir tümör baskılayıcı olan *p53* geni, hücre döngüsü düzenlenmesinde, DNA onarımı, sentezi, hücre farklılaşması ve apoptoz sürecinde işlev görmektedir. *p53* mutasyonları, insan neoplastik büyümesinin en yaygın genetik belirtecidir. Pterjiyum dejeneratif işlev

bozukluğundan ziyade neoplastik benzeri bir büyüme bozukluğu olarak kabul edilmektedir. Kontrol numunelerinde pozitif *p53* boyaması gözlemlenmezken, immünohistokimya ile pterjiyum numunelerinde anormal *p53* ekspresyon seviyeleri gözlemlenmiştir. *p53* kodon 72 polimorfizminin (rs104(21)2522, G/C, Arg72Pro), tümör duyarlılığı için en önemli belirteçtir. *p53* proteininin anormal ekspresyonunun ve kodon 72 polimorfizminin eşzamanlı varlığı, *p53* gen mutasyonunun pterjiyum patogeneğinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Liu ve ark., 2013).

2.8.4. Apoptoz Proteinleri

Survivin, Bcl-2, Bax ve Bcl-w gibi apoptozla ilgili proteinlerin hücre apoptozunun düzenlenmesinde rol oynadığı öne sürülmektedir (Feng ve ark., 2017).

Survivin, insanlarda *BIRC5* geni tarafından kodlanan bir proteindir (Wanzeler ve ark., 2019). Apoptoz inhibitörleri ailesinin önemli bir üyesi olan Survivin, apoptozun negatif düzenlenmesine yol açan kaspaz aktivasyonunu inhibe etme yeteneğine sahiptir. Survivin pterjiyum dokularında güçlü bir şekilde eksprese edildiği ve epitel hücrelerinin hem çekirdeğinde hem de sitoplazmasında yer aldığı, ancak normal konjonktival epitelinin sitozolünde zayıf bir şekilde eksprese edildiği ortaya konulmuştur. Oksidatif stresin, pterjiyumun büyümesinde hiperproliferatif bir durumu indükleyerek survivin ekspresyonunun aktivasyonuna neden olabileceği gösterilmiştir (Feng ve ark., 2017). Survivin'in primer pterjiyumda siklooksijenaz-2 (COX-2) ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur, bu da antiapoptotik bir mekanizma olduğunu düşündürmektedir (Wanzeler ve ark., 2019).

Bcl-2, apoptozu indükleyebilen veya inhibe edebilen apoptoz düzenleyici protein Bcl-2 ailesi üyelerindendir. İnsanlarda *Bcl-2* geni tarafından kodlanmaktadır. Tüm pterjiyum epitel hücrelerinin bazal epitel tabakasında *Bcl-2* ekspresyonu olmasına rağmen normal konjonktiva da bulunmamıştır (Wanzeler ve ark., 2019).

Bax, Bcl-2 ile aynı aileden gelmektedir, bu nedenle Bax'ın ifadesinin de artmış olabileceği düşünülmektedir. Ancak, ifadesi hem pterjiyumda hem de normal konjonktivada benzer görünmektedir (Feng ve ark., 2017).

Pterjiyumda azalan miR-122 ekspresyonu, anti-apoptotik olan Bcl-2 ailesinin bir geni olan *Bcl-w* ekspresyonunun düzenlenmesine bağı olarak hücre apoptoz anormalliklerine neden olabilmekte ve ardından pterjiyum gelişimine katkıda bulunabilmektedir (Cui ve ark., 2016).

Rapamisin kompleksi 1 (mTORC1) hücre büyümesi, çoğalması, protein sentezi, otofaji ve transkripsiyonun merkezi düzenleyicisidir. mTORC1'in rolü, protein translasyonunu aktive etmektir. mTOR sinyali yüksek düzeyde etkinleştirildiğinde pterjiyum örneklerinde anormal apoptoz ve hücre proliferasyonu gözlenmiştir. mTORC1 aktivasyonunun, *Bcl-2*'yi hedefleyerek ve *Beclin-1*'e bağı otofajiyi düzenleyerek pterjiyumda apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. mTORC1 ayrıca *p73* inhibisyonu yoluyla fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3'ü (FGFR3) negatif olarak düzenlemektedir, böylece pterjiyumda hücre proliferasyonunu da uyarmaktadır. Bu, mTORC1 sinyalinin pterjiyumda yüksek oranda aktive olduğunu, patogenezi ve ilerlemesi hakkında yeni yollar sağladığını göstermektedir (Liu ve ark., 2017).

2.8.5. Hücre Yapışma Molekülleri

Hücre yapışma molekülleri, çeşitli fizyolojik ve patolojik olaylarda önemli bir rol oynamaktadır. Bu proteinler hücre yüzeyinde, hücre bağlanmasında, selektin ve integrin dahil olmak üzere hücre yapışması ile ilgili hücre dışı matrikste yer almaktadır. Hücreler arası yapışma molekülü-1'in (ICAM-1) ifadesinin pterjiyumda mevcut olduğu ve normal bir konjonktiva epitelinde olmadığı bulunmuştur (Wanzeler ve ark., 2019).

Vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), normal konjonktival doku ile karşılaştırıldığında pterjiyumda, daha yüksek CD4 ve CD8 lenfosit seviyeleri ile birlikte yukarı regüle olmuştur. Bu, ICAM-1 ve VCAM-1'in T-lenfosit infiltrasyon seviyelerini yükseltebileceği böylece pterjiyumun patogenezi destekleyebileceği anlamına gelmektedir (Feng ve ark., 2017).

E-kaderin ve beta-katenin'in de pterjiyum dokusunda yoğunlaştığı, epitelyal proliferasyon ve adezyonda yer aldığı öne sürülmüştür (Wanzeler ve ark., 2019). Hücreler arası yapışmaya aracılık eden bir transmembran protein olan e-kadherin,

pterjiyumdaki epitelyal ve vasküler hücrelerin yapışmasında rol oynarken hastalığın patogenezini de hızlandırabilmektedir (Feng ve ark., 2017).

İntegrin, hücre ve hücre dışı matriks arasındaki iletişimi sağlamakla birlikte hücre göçü, doku homeostazisi ve kök hücreler için stabil bir hücresel ortamı desteklemektedir (Boudreau ve ark., 1999). Bu sebeple artmış integrin seviyesi, limbal hücrelerin homeostazisini bozarak konjonktiva hücrelerinin yapışma ve göçünü etkileyip pterjiyum nüksüne neden olabilmektedir (Feng ve ark., 2017).

2.8.6. Proliferasyonla İlgili Proteinler

Ki-67, siklin D1 ve nükleer proliferasyon antijeni gibi proliferasyonla ilgili proteinler hücre döngüsünde anahtar rol oynamaktadır. Ki-67, hücre proliferasyonunun önemli bir belirteçidir. Normal bir konjonktiva ile karşılaştırıldığında, pterjiyum örneklerinde anormal bir Ki-67 ekspresyonu bulunmuştur (Wanzeler ve ark., 2019). Ki-67'nin oküler malign tümör için hassas bir belirteç olabileceği öne sürülmektedir. Pterjiyum, tümör benzeri özellikler taşıması sebebiyle Ki-67'nin aynı şekilde pterjiyum için de bir belirteç olabileceği düşünülmektedir (Feng ve ark., 2017).

Proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA), DNA sentezi için gerekli bir nükleer histon olmayan proteindir. PCNA ekspresyonu, hücre proliferasyonunun bir belirteci olarak kullanılabilir (Wanzeler ve ark., 2019). Bir DNA kelepçe proteini olan PCNA, DNA replikasyonu, DNA onarımı, kromatin yeniden modellemesi ve epigenetikte yer alan proteinleri bir araya getirmek için DNA'yı çevreler (Feng ve ark., 2017). Pterjiyumlu dokularda PCNA'nın ifadesi, normal konjonktiva dokusuna göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (Wanzeler ve ark., 2019).

Cyclin D1, hücre döngüsünün ilerlemesini destekleyen hücre döngüsü kontrol genidir. Yapılan bir çalışmada, pterjiyum ve normal konjonktiva dokularında PCNA ve siklin D1 seviyesi karşılaştırıldığında pterjiyum epitel hücrelerinde aşırı eksprese oldukları ve bunun da epitel hücrelerin hiperproliferasyonuna yol açabileceği düşünülmektedir (Das ve ark., 2015). Pterjiyumda siklin D1 protein düzeyi, atrofik olanlara göre progresif pterjiyumda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Başka bir

çalışma, çekirdek ve sitoplazmada eksprese edilen β -katenin'in, pterjiyum hücrelerinin proliferasyonunu destekleyen siklin D1 protein ekspresyonunu artırabileceğini göstermiştir (Tung ve ark., 2010).

2.8.7. Isı Şoku Proteinleri

Isı Şok Proteinleri (HSP), stresli koşullara maruz kalmaya yanıt olarak hücreler tarafından üretilen bir protein ailesidir. İlk olarak ısı şoku ile ilişkili olarak tanımlanmışlardır, ancak son çalışmalarla düşük sıcaklık, UV ışığına maruz kalma, yara iyileşmesi veya doku yeniden şekillenmesi gibi birçok süreçte ifade edildikleri bulunmuştur (Sebastiá ve ark., 2013).

Hsp27, *Hsp70* ve *Hsp90* ve hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 α (HIF-1 α) ekspresyonunun pterjiyumda belirgin bir şekilde arttığı bulunmuştur. *Hsp27*, pterjiyumdaki epitelyal, endotelyal ve vasküler düz kas hücrelerinde ekspre olurken normal konjonktivada sadece epitel hücrelerinde saptanmıştır. Pterjiyumdaki HIF-1 α ve HSP seviyelerindeki değişikliklerin, stresli koşullar altında hücrenin hayatta kalması için adaptif bir süreci temsil ettiği düşünülmektedir (Wanzeler ve ark., 2019). Ek olarak, bazı HSP üyelerinin keratokonjonktivit gibi diğer oküler yüzey hastalıklarında da aşırı eksprese edildiği bulunmuştur (Feng ve ark., 2017).

2.8.8. Sıkı Bağlantı Proteinleri

Sıkı bağlantı proteinleri, epitel veya endotel hücre katmanlarında hücreler arası yapışmanın bir biçimini temsil etmektedir. Moleküllerin hücre dışı boşluktan serbestçe geçmesini önlemek için fiziksel bariyer görevi görmektedir. Bu fonksiyonel ve yapısal bariyerin önemli bir parçası olan Claudin ailesi proteinlerinin gen ekspresyonundaki düzensizlik kanser dahil çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir. Normal kornea ve konjonktivada claudin-1 ve claudin-4 varlığı immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir (Wanzeler ve ark., 2019). Epitel konjonktiva dokularında claudin-1 ekspresyonu, pterjiyum dokularına kıyasla yüksek bulunmuştur. Normal konjonktivaya kıyasla

pterjiyumdaki claudin-1 ekspresyonundaki önemli azalma, pterjiyumun patogenezinde rol alabileceğini düşündürmektedir (Dogan ve ark., 2016).

2.8.9. Hücre Dışı Matriks Proteinleri

ECM, hücrelere yapısal ve biyokimyasal destek sağlayan hücre dışı moleküllerin bir bütünüdür (Pérez-Rico ve ark., 2011).

Hücre dışı matris proteinlerinin anormal ekspresyonu ile, pterjiyumun proliferatif büyümesi arasında doğrudan bir ilişki olabileceği düşünülmektedir. Çünkü; pterjiyum hücre dışı matrisin aşırı birikmesi ve vasküler büyüme ile karakterize edilen bir fibrovasküler dokudur. Hücre dışı matris proteinleri, keratin, elastin, kollajen ve fibrin içermektedir. K8, K16, K14 ve AE3 proteinlerinin pterjiyum epitelinin tüm kalınlığı boyunca mevcut olduğu bilinmektedir, ancak normal konjonktivada bulunamamıştır (Zhang ve ark., 2000).

Son zamanlarda, elastin gelişiminde rol oynayan lisil oksidaz'lar (LOX), *FBN1* ve *FBLN5* gibi birkaç hücre dışı matris bileşeninin pterjiyumda aşırı eksprese edildiği bulunmuştur, bu da elastinin aynı şekilde aşırı ifade edilebileceği anlamına gelmektedir. Tip II kollajen ekspresyonu sadece pterjiyumda pozitif iken, tip I, III ve IV kollajen ekspresyonu hem pterjiyumda hem de normal konjonktivada tespit edilmiştir. Yakın zamanda, pterjiyum eksizyonunu takiben biyolojik olarak parçalanabilen kollajen matris implantlarının kullanımının pterjiyum nüksü riskini azalttığı bildirilmiştir. Pterjiyum, aşırı hücre dışı matris birikimi ve damar içi büyüme ile karakterize fibrovasküler doku olduğundan, hücre dışı matris proteinlerinin anormal ekspresyonu, pterjiyumun büyümesi ile doğrudan ilişkili görünmektedir (Feng ve ark., 2017).

2.8.10. Matriks Metalloproteinazlar Ve Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri

Matriksinler olarak da bilinen MMP'ler, hücre dışı matriksin bileşenlerini hidrolize ederler. Bu proteinazlar, embriyogenez, normal doku yeniden şekillenmesi, yara iyileşmesi, anjiyogenez gibi çeşitli biyolojik süreçlerde ve aterom, artritis, kanser, doku ülserasyonu gibi hastalıklarda merkezi bir rol oynamaktadır (Yong ve ark., 1998). MMP'ler, substrat tercihinine göre beş alt gruba ayrılabilen, çeşitli hücre dışı matrisleri düzenleyen veya bozan, hücre yüzeyi enzimlerinden oluşan bir multigen ailesidir (Wanzeler ve ark., 2019). Bunlar: kollajenazlar (MMP-1, MMP-8, MMP-13), jelatinazlar (MMP-2, MMP-9), stromelisinler (MMP-3, MMP-10), membran ilişkili MMP'ler (MT1-MMP, MT2-MMP) ve diğerleridir.(örn., MMP 12, MMP-19, MMP-20). Metalloproteinaz doku inhibitörlerinin (TIMP'ler) çoğu MMP'ye bağlanır ve aktivitelerini engellerler (Feng ve ark., 2017).

MMP-1, MMP-2, MMP-3, TIMP-1 ve TIMP-3, normal konjonktiva ile karşılaştırıldığında pterjiyum dokularında, epitel hücrelerinde ve fibroblastlarda daha büyük miktarlarda tespit edilmiştir. MMP-3 ve MMP-8'in pterjide, normal dokulardan daha yüksek ekspresyonu edildiği belirtilmiştir. MMP-3 ve salgılanan asidik ve sisteinden zengin proteinin (SPARC) pterjiyum epitelinde yukarı regüle olduğu ve ortak lokalize olduğu rapor edilmiştir. MMP-7'nin öncül ve aktif formları pterjiyum epitelinde ve kan damarlarında bulunmuş, ancak konjonktival damarlarda bulunamamıştır. MMP-9 ve MMP-10'un pterjiyum oluşumuna katkıda bulunduğu, TIMP'lerin ise pterjiyum istilasını engellediği sonucuna varılmıştır. Pterjiyum hücreleri tarafından üretilen MMP'ler, Bowman tabakasını çözerek stromal fibroblastların büyüme stimülasyonuna yol açma yeteneğine sahiptir. Ayrıca, MMP'ler diğer oküler yüzey bozukluklarında aktif görünmektedir. Pterjiyumun farklı evrelerinde MMP ve TIMP ifadeleri farklılık göstermektedir. MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki dengenin bozulması, pterjiyumun ilerlemesinden veya tekrarlamasından sorumlu olarak kabul edilebilmektedir (Feng ve ark., 2017;Wanzeler ve ark., 2019).

2.8.11. İnterlökinler'ler

IL'ler, lökositler tarafından ifade edilen sitokinler, salgılanan proteinler ve sinyal moleküllerinden oluşan bir gruptur. Bu hücreler iltihaplanma sürecinde hayati roller oynamaktadırlar. Bu nedenle, IL'lerin pterjiyum ile yakından ilişkili olabileceğine inanılmaktadır (Brockner ve ark., 2010).

IL-1 α , IL-1b RA ve IL-1b öncü proteinlerinin primer pterjiyum ve normal konjonktival epiteldeki ekspresyonu immünofloresan yoluyla tespit edilmiştir. IL-1 protein ailesi gelişmiş seviyelerinin sadece pterjiyumda olduğu ve benzer şekilde, IL-1 α 'nın sadece primerde değil, aynı zamanda rekürren pterjiyumda da yüksek oranda eksprese edildiği bulunmuştur (Wanzeler ve ark., 2019). IL-4'nün, tekrarlayan pterjiyum dokularında transkripsiyonel olarak yüksek olduğu, ayrıca pterjiyumun subkonjonktiva stromasındaki perivasküler dokularında ve endotel hücrelerinde lokalize olduğu bulunmuştur (Feng ve ark., 2017).

IL-6 ve IL-8'in, normal kornea, konjonktiva ve limbusa kıyasla pterjiyum epitelinde yüksek eksprese edildiği bulunmuştur. Ek olarak, UVB'ye maruz bırakılmış pterjiyumda IL-6 ve IL-8 proteinleri önemli ölçüde yükselmiştir, bu da UVB'nin bu iki IL'nin salgılanmasını indükleyebileceğini düşündürmektedir. IL-10'un pterjiyumda normal konjonktivadakinden daha fazla eksprese edildiği rapor edilmiştir. IL-17 seviyesinin yakın zamanda pterjiyum, iltihaplı juvenil konjonktival nevüs ve oküler demodikoz gibi oküler yüzey inflamatuvar patolojilerinde yukarı regüle olduğu bulunmuştur (Feng ve ark., 2017;Wanzeler ve ark., 2019).

2.8.12. Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri, hücresel büyümeyi, çoğalmayı, iyileşmeyi ve hücresel farklılaşmayı uyaran proteinlerdir. Mitoz gibi çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Feng ve ark., 2017;Wanzeler ve ark., 2019).

Pterjiyum patogeneğinde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β), temel fibroblast büyüme faktörü (β -FGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), sinir sistemi büyüme faktörü (NGF) ve bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) gibi çok sayıda büyüme faktörünün rolü olduğu düşünülmektedir (Wanzeler ve ark., 2019).

VEGF ailesi, pterjiyum, retina hastalıkları gibi oküler hastalıklarda vasküler geçirgenliği artırma ve patolojik anjiyogenezdaki rolü nedeniyle oftalmolojide kapsamlı bir şekilde araştırılan en önemli büyüme faktörlerinden biridir (Wanzeler ve ark., 2019). VEGF ailesi patolojik anjiyogenezi kontrol etmekte ve göz hastalıklarında damar geçirgenliğini arttırmaktadır. Normal konjonktiva ile karşılaştırıldığında, pterjiyum da daha yüksek seviyelerde VEGF ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR)-2,3 bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada VEGF ekspresyonunun atopik pterjiyum hastalarında atopik olmayan bireylere göre çok daha yüksek olduğu bulunmuştur. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF-C) mRNA seviyesinin yukarı regülasyonu pterjiyumda, özellikle tekrarlayan pterjiyumda lenfanjiyogeneze yol açtığı bulunmuştur. Son zamanlarda, TNF- α 'nın VEGF-C'nin ekspresyonuna aracılık ettiği anlaşılmıştır. VEGF'nin artan ekspresyonu, konjonktiva hücrelerinin normal metabolizmasını etkileyebilen ve onları pterjiyum hücreleri haline getirebilen anjiyogeneze ve lenfanjiyogeneze yol açmaktadır (Feng ve ark., 2017). Mevcut kanıtlar pterjiyum cerrahisinde anti-VEGF ilaçlarının kullanımını desteklemiyor olsa da VEGF karşıtı ilaçlar, oküler hastalıkların iyileştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Feng ve ark., 2017;Wanzeler ve ark., 2019).

TGF- β , fibroblast proliferasyonu, anjiyogeneze, sentez, hücre dışı matris proteinlerinin bozulması dahil olmak üzere doku onarımı ve hastalık için ortak olan çeşitli süreçleri düzenlemektedir. Pterjiyumda TGF- β 1 ve TGF- β 2'nin pozitif olarak düzenlendiği bulunurken, dönüştürücü büyüme faktörü-beta reseptörü 1,2'nin (TGFR-

$\beta 1$, $\beta 2$) negatif olarak düzenlendiği bulunmuştur (Wanzeler ve ark., 2019). Yapılan bir çalışmada Tafazzin (TAZ) proteininin TGF- β sinyalini baskılayarak konjonktiva epitel hücre çoğalmasını düzenlediği bulunmuştur. Ek olarak, amniyotik membran aşılamanın TGF- β sinyalini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle, TGF- β ekspresyonunun inhibe edilmesi pterjiyum oluşumunun önlenmesinde etkili görünmektedir (Feng ve ark., 2017)

Fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF2) olarak da bilinen β -FGF, anjiyogenez, yara iyileşmesi ve çeşitli sinyal yollarına katılmaktadır. Epitel ve pterjiyum kan damarlarında β -FGF ekspresyonunun arttığı, ayrıca mast hücrelerinin ek bir β -FGF kaynağı olarak görev yapabileceği bulunmuştur. FGF2'nin, normal konjonktivada bulunmayan ancak insan pterjiyum fibroblastlarında bulunan COX-2 ekspresyonunu indüklediği gözlemlenmiştir. COX-2, inflamatuvar sitokin kaynaklı anjiyogenez için anahtar enzimdir. Bu nedenle FGF2'nin, pterjiyumda inflamasyonu ve anjiyogenezi indükleyebileceği düşünülmektedir (Feng ve ark., 2017).

Mitozu teşvik edebilen, hücre proliferasyonunu uyarabilen ve apoptozu inhibe edebilen IGF, pterjiyumun büyümesine katkıda bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmaya göre, insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-2'nin (IGFBP2) pterjiyum fibroblastlarında aşırı eksprese edildiği bulunmuştur. Bununla birlikte, normal konjonktiva ile karşılaştırıldığında insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3'ün (IGFBP3), pterjiyumda belirgin şekilde azaldığı bulunmuştur. IGFBP3'ün aşağı regülasyonunun, kanser oluşumu ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu sebeple pterjiyumun devam eden büyümesi ile de bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (Feng ve ark., 2017)

Bir nörotrofik faktör (NGF), temel olarak belirli hücrelerin büyümesini, çoğalmasını ve hayatta kalmasını düzenlemektedir. NGF'nin ekspresyonu, pterjiyum epitelinde, fibroblastlarında, vasküler endotelial hücrelerinde fazla iken, normal konjonktiva epitelinde ve fibroblastlarında az bulunmuştur (Chunming ve ark., 2008).

Son olarak, hücre yapışması, göçü ve kemotaksisinde yer alan CTGF, CCN protein ailesine aittir. CTGF, pterjiyum epitelinde mevcutken, normal konjonktivada belirlenmemiştir. Bu nedenle, normal konjonktiva eksprese edemezken, sadece pterjiyum CTGF'yi eksprese edebilmektedir (Feng ve ark., 2017).

2.8.13. Pterjiyum Gelişimine Yatkınlıkta Genetik Faktörler

Pterjiyumun ailesel eğilim gösterdiği düşünülmektedir. Bazı ailelerin, genel popülasyonda görüldenden çok daha fazla pterjiyum gelişimine yatkınlığı vardır (Di Girolamo ve ark., 2004).

Pterjiyumun kalıtımında yer alan birkaç ailesel gen ve yolun olduğu öne sürülmüştür. Bu yolların çoğundaki ailesel kusurlar, bireyleri UV radyasyonuna karşı anormal bir fibrovasküler tepkiye yatkın hale getirmektedir (Shahraki ve ark., 2021). Proanjyogenik genlerdeki polimorfik bölgeler, pterjiyumda ailesel yatkınlık olabileceği görüşünü desteklemektedir. VEGF polimorfizmlerinin, pterjiyumun daha yüksek vaskülaritesi ve anti-VEGF ajanlarına karşı değişken yanıt ile ilişkili olduğundan, VEGF genlerinin varyasyonunun, hastalığın ailesel insidansını açıklayabileceği öne sürülmektedir (Peng ve ark., 2014).

Ayrıca mikroRNA'lar da pterjiyumun patogenezinde yer almıştır. Bunlar, özel protein seviyelerini ve gen ekspresyonunu dolaylı olarak düzenleyen küçük kodlanmayan RNA'lardır. Son zamanlarda, microRNA-145 seviyesinin ilerlemiş ve belirgin pterjiyum ile negatif ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır. Ek olarak, tekrarlayan pterjiyumda mikroRNA seviyesinde azalma tespit edilmiştir (Shahraki ve ark., 2021). Pterjiyum kalıtımındaki genetik çalışmaların diğer hedefleri, *FN1*, *KPNB1*, *DDB1*, *NF2*, *BUB3*, *PRSS23*, *MEOX1*, *ABCA1*, *KRT6A*, *SSH1*, *RBM14* ve *UPK1B* dahil olmak üzere farklı şekilde eksprese edilen genlerdir. Bu genlerin, belirteçler veya terapötik hedefler olarak pterjiyum patogenezinde önemli bir rol oynadığı öne sürülmektedir (Yue., 2019).

Çok sayıda çalışmaya ve farklı aday genlere rağmen, pterjiyumun genetik temeli aydınlatılmayı beklemektedir. (Shahraki ve ark., 2021).

2.8.14. Oksidatif Stres

Serbest radikaller; süperoksit radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi ROS içeren oldukça kararsız moleküllerdir. Bunlar ayrıca normal metabolizmanın bir yan ürünü olarak üretilen nitrik oksit (NO) gibi reaktif nitrojen türleri (RNS) içermektedir. ROS, DNA, lipidler ve proteinlerle kimyasal olarak reaksiyona girerek, DNA hasarına, lipid peroksidasyonuna ve protein yapısında değişikliklere yol açmaktadır. Oksidatif stres, ROS'a karşı normal hücresel savunmalar yetersiz kaldığında ortaya çıkar ve yaşlanmaya neden olmasının yanı sıra kronik inflamasyon, kardiyovasküler hastalık ve kanser dahil olmak üzere birçok hastalık sürecinde rol oynamaktadır. Oksidatif stresin, yaşa bağlı katarakt, makula dejenerasyonu, glokom ve keratokonus dahil olmak üzere bir dizi oküler hastalıkta rol oynadığı gösterilmiştir. UV ışığı, ROS oluşturmak için oksijenle etkileşime giren endojen ışığa duyarlılaştırıcıları aktive ederek, oksidatif strese neden olmaktadır. UV kaynaklı oksidatif stres, hücre dışı matriksin parçalanmasını indükleyerek ayrıca kollajen ve elastin sentezini değiştirerek kutanöz foto yaşlanmaya katkıda bulunmaktadır (Wlaschek ve ark., 2001).

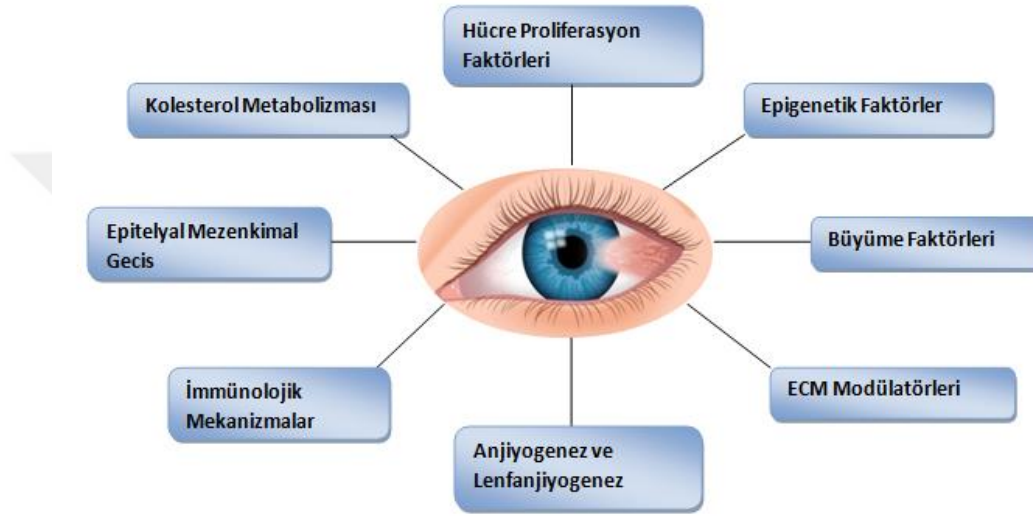
UV ile tetiklenen benzer süreçler oküler yüzeyde meydana gelerek pterijyum patogeneze katkıda bulunabilmektedir. Yaşlanan kornealarda pro-oksidanlara göre antioksidanlarda bir azalma rapor edilmiştir, bu da oksidatif strese karşı duyarlılığı artıracaktır. Oksidatif stresin pterijyum patogenezinde rol oynayabileceğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar pterijyum epitel hücre çekirdeklerinde 8-OHdG'nin (bir DNA foto oksidasyon ürünü) ve pterijyum dokusunda artmış malondialdehitin (bir lipid peroksidasyon ürünü) varlığını içermektedir. Oksidatif stresin keratokonusta MMP-2 aktivitesini arttırdığı ve TIMP-1'i azalttığı gösterilmiştir (Chui ve ark., 2008).

2.8.15. Pterijyumda DNA Onarımı

UV radyasyonunun oksidatif DNA hasarına neden olduğu bilinmektedir ve pterijyum patogenezinde önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir. p53, DNA onarım sistemi için önemli bir rol oynadığından, bu sistemin aşağı yönlü bileşenleri de anormal şekilde ifade edilebilmektedir. Esas olarak MRN kompleksinin üyeleri (RAD50 ve RAD51) ve iki RAD51 paralogu (XRCC2 ve XRCC3) olmak üzere çift zincirli DNA kırılma onarımında yer alan genlerin, kontrol gruplarına kıyasla pterijyum hastalarında farklı şekilde eksprese edildiği bildirilmiştir. Pterijyum dokularında kontrol konjonktiva dokularına kıyasla daha yüksek bir RAD50 protein ekspresyonu gözlemlenmektedir. RAD50, çift zincirli DNA kırıklarının hızlı onarımını teşvik etmede rol oynamaktadır. Pterijyum dokularında RAD50 proteininin daha yüksek ekspresyonu, pterijyumda rekombinasyonel DNA onarım mekanizmalarının aktive olabileceğini düşündürmektedir. Pterijyum nüksü öyküsü olan hastaların periferik kan lenfositlerinde RAD51, XRCC2 ve XRCC3 gen ekspresyonunun yükseldiği bulunmuştur. RAD51'in aktivitesini düzenleyebilen polo benzeri kinaz 1 (PLK1) de pterijyumda yüksek oranda eksprese edilmiştir. Bu çalışmalar, pterijyum patogenezi ile çift zincirli DNA kırılma onarım sistemleri arasında temel bir bağlantı olabileceğini göstermektedir (Liu ve ark., 2013).

2.9. Pterjiyum Gelişimine İlişkin Moleküler Mekanizmalar

Epigenetik faktörler, hücre proliferasyon faktörleri, inflamatuvar mediatörler, büyüme faktörleri, hücre dışı matriks modülatörleri, anjiyojenik ve lenfanjiyojenik faktörler, immünolojik mekanizmalar, epitelyal-mezenkimal geçiş ve kolesterol metabolizmasındaki değişiklikler dahil olmak üzere çeşitli faktörler pterjiyum patogenezi ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 2.5.) (Cardenas-Cantu ve ark., 2016).



Şekil 2.5. Pterjiyum gelişimine etki eden moleküler mekanizmalar

2.9.1. Epigenetik Faktörler

Pterjiyum, hücre proliferasyonu ve rezeksiyondan sonra nüks dahil olmak üzere kanserle benzerlikler paylaşmaktadır. Artmış proliferatif aktivite (Ki-67, PCNA ve eritropoietin), düşük seviyelerde hücresel apoptoz (Bcl-2 ve p53) ve malignite (Hsp90) ile ilişkili proteinlerin sağlıklı konjonktiva ile karşılaştırıldığında, pterjiyumun epitel hücre tabakasında aşırı eksprese edildiği bulunmuştur. Bu proteinlerin, neoplastik koşulların altında yatan farklı kanser türlerinde arttığı bulunmuştur ve bunlar bir tümörün proliferatif aktivitesinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır (Cardenas-Cantu ve ark., 2016).

DNA metilasyon paternlerindeki değişiklikler birçok kanser türünde yaygındır ve kanser ile pterjiyum arasındaki benzerliklerden dolayı pterjiyumun metilasyonu üzerine bazı çalışmalar yapılmıştır. Matriks yeniden şekillenmesi (MMP-2, hipometilasyon) ve hücre yapışması (TGM-2 ve CD24 hipermetilasyonu) ile ilgili genlerin anormal DNA metilasyonu, pterjiyum istilasası ile yüksek oranda ilişkili bulunmuştur (Riau ve ark., 2011). Ek olarak, tümör baskılayıcı gen p16'nın hipermetilasyonu, pterjiyumda DNA metiltransferaz 3b'nin (DNMT3b) aşırı ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir (Chen., 2006). Bu epigenetik modifikasyonlar, pterjiyum patogenezi ile ilgili önemli genlerin kontrolsüz ekspresyonuna veya baskılanmasına neden olabilen DNA mutasyonlarına yol açabilmektedir. UV radyasyonunun neden olduğu oksidatif stres, bu anormal metilasyon modellerinden sorumlu olabilmektedir (Cardenas-Cantu ve ark., 2016).

2.9.2. Hücre Proliferasyon Faktörleri

Pterjiyum bazal epitel hücreleri, apoptoz ile ilişkili moleküler belirteçler sergilemekte, bu da çoğalma ile ilgili yolların pterjiyum oluşumunda anahtar roller oynadığını düşündürmektedir (Cardenas-Cantu ve ark., 2016).

Son zamanlarda pterjiyum patogenezinde S100 protein ailesinin rolü rapor edilmiştir. Bunlar, biyolojik süreçleri modüle etmek için diğer proteinlerle etkileşime giren dimerik kalsiyum bağlayıcı proteinlerdir. Oküler yüzeyde, S100 proteinlerinin yapısal proteinlere, transkripsiyon faktörlerine ve bağışıklık modülatörlerine bağlanması, bağışıklık hücrelerinin korneanın bazal membranları üzerindeki yapışmasını ve göçünü etkilemektedir (Tong ve ark., 2014).

İmmün algılama ile ilgili çalışmalarda, insan pterjiyum epitel örneklerinde S100A6, S100A8, S100A9 ve S100A11 proteinlerinde normal konjonktivaya göre bir artış tespit edilmiştir. Havuz yapılmış 15 insan pterjiyum örneğinden elde edilen bir cDNA kütüphanesinden oluşan bir çalışmada, birkaç genin yüksek ekspresyonu rapor edilmiştir. Bunlar: poliamin metabolizmasında hız sınırlayıcı enzim olan N1-asetiltransferaz 1 (SAT1), MMP-9 aktivitesinin indüklenmesinde rol oynayan anneksin

A2 ve hücre göçünün kontrolünde rol oynayan S100A9 proteindir. Son olarak, S100A8 ve S100A9, pterjiyum hastalarının gözyaşlarında yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmiştir (Cardenas-Cantu ve ark., 2016).

İki proapoptotik belirteç, TUNEL ve Bax, yalnızca pterjiyumun epitelyal bazal tabakasında önemli ölçüde bulunurken, anti-apoptotik protein Bcl-2'nin tüm pterjiyum dokusunda daha yaygın olarak dağıldığı gözlemlenmiştir (Tan ve ark., 2000). Hücre proliferasyonu ve apoptoza dahil olan bir protein olan C-Myc'nin pterjiyumda az eksprese olduğu, hücre proliferasyonuna katılan bir importin olan IPO13'ün fazla eksprese olduğu bulunmuştur (Cardenas-Cantu ve ark., 2016). Pterjiyum dokusunun epitelinde telomeraz aktivitesinde bir artış bildirilmiştir. Bu bulgular pterjiyumun anormal apoptoz düzenlemesinin bir sonucu olabileceğini düşündürmektedir (Shimmura ve ark., 2000).

2.9.3. Anjiyogenez ve Lenfanjiyogenez

Sağlıklı yetişkin organizmada yara iyileşmesi sırasında yeni damarların gelişimi (anjiyogenez) gözlenmektedir. Patolojik koşullar altında, anjiyogenez düzensiz görünmektedir. Özellikle tümör anjiyogenezi, sınırlı tümör büyümesinden invazyon ve metastaza geçişi desteklemektedir. Malignite ile dönüştürülmüş hücreler, sırasıyla otokrin büyüme kontrolünü ve neovaskülarizasyonun parakrin kontrolünü indükleyen anjiyojenik faktörler üretmektedir (Hanahan., 1996).

Enflamasyonun, neovaskülarizasyonla sonuçlanabilecek ve pterjiyum büyümesine katkıda bulunabilecek anjiyojenik yolları indüklediği bilinmektedir (Cardenas-Cantu ve ark., 2016).

Son zamanlarda pterjiyumda lenfanjiyogenezin olduğu ve geliştiği gösterilmiştir. Lenfatik damarların çokluğu ile pterjiyumun şiddeti arasında bir ilişki bulunmuştur. Ayrıca cerrahi numunelerdeki artmış lenfatik mikrodamar yoğunluğunun pterjiyum nüksünü öngördüğü bildirilmiştir (Ling ve ark., 2012). Kan damarları, daha fazla inflamasyon yaratan immün efektör hücreler için bir giriş yolu sağlamak ve lenfatik damarlar, antijenik materyalin oküler yüzeyden bölgesel lenf düğümüne çıkışını

sağlamaktadır. Böylece pozitif bir inflamasyon geri besleme döngüsü oluşmaktadır. Bu mekanizmalar pterjiyum başlangıcı ile pek ilgili olmasa da, hastalığın büyümesi ve gelişmesi ile ilişkili sayılmaktadır (Cardenas-Cantu ve ark., 2016).

2.9.4. İmmünolojik Mekanizmalar

Bağışıklık sisteminin, pterjiyum patogenezinde ya da oluşumunun bir sonucu olarak, gelişimi ile doğrudan ilişkili olduğu görünmektedir. Pterjiyumda mast hücreleri, lenfositler, plazma hücreleri, dendritik hücreler ile ve CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde bir artış da gösterilmiştir (Cardenas-Cantu ve ark., 2016).

T-lenfositleri, B-lenfositleri ve makrofajların ön plana çıkarıldığı pterjiyum dokusuyla yapılan bir çalışmada, pterjiyum bağ dokusunda bulunan bağışıklık sistemi hücresinde çoğunluğu T-lenfositlerin oluşturduğu bildirilmiştir. Enflamatuvar sürecin yoğunluğu antijen seviyelerine bağlı olarak değiştiğinden, makrofaj tipi hücrelerin pterjiyum dokusunda eşit olmayan bir şekilde dağıldığı bulunmuştur. Bu immün hücre infiltratı, subepitelyalde ve örtü epitelinin erozyona uğradığı bölgelerde daha çok bulunmuştur. Bu da hücre proliferasyonundan, anjiyogenez sürecinden veya pterjiyumun tekrarlamasından inflamatuvar sürecin sorumlu olmadığını düşündürmektedir (Golu ve ark., 2011).

2.9.5. Epiyelyal-mezenkimal geçiş

Yaralı dokudan gelen morfojenik basıncın ardından epitel hücrelerin fenotiplerini fibroblastik hücelere değiştirmesi olgusuna EMT denir ve kanser hücrelerinin ortak bir özelliğidir (Zeisberg ve ark., 2004). Bir çalışmada, ana EMT uyarıcısı olan doku faktörü (TF) için immünreaktivite bulunmuştur. TF-immünopozitif hücreler, bazal, suprabazal ve yüzeysel epitel hücrelerinin sitoplazmasında daha yüksek ekspresyon seviyeleri ile tespit edilmiştir. Ek olarak, EMT'nin klasik bir işareti olan a-SMA'nın protein ekspresyonu, çift boyamalı immünohistokimya üzerinde TF immünoreaktivitesinin birlikte lokalize olduğu pterjiyal epitel hücrelerinde tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, epitel hücrelerinin mezenkimal fenotiple ifade edilen TF'ye

dönüştüğünü göstermektedir. E-kadherinin aşağı regülasyonu ve hücre-hücre yapışmasını düzenleyen proteinler olan β -katenin'in çekirdek içi birikimi de immünohistokimya ile pterjiyal epitelde tespit edilmiştir (Cardenas-Cantu ve ark., 2016). E-kadherinin aşağı regülasyonu, EMT sırasında önemli bir yoldur ve kanonik β -katenin sinyal yolu, EMT'yi geliştirmede yönlendiren ve kanserde sıklıkla aktive olan gerekli bir bileşendir (Larue, 2005). Yakın tarihli bir çalışma, pterjiyumda EMT miRNA düzenleyicilerinin farklı ekspresyonunu göstermiştir. EMT'yi inhibe eden, kanserde göçü ve istilayı artıran miR-200 ailesinin kümelerinden dört üyenin aşağı regülasyonu ayrıca mezenkimal belirteç fibronektinin yukarı regülasyonu, EMT'nin pterjiyum patogenezinde potansiyel bir rol oynayabileceğini devamında terapötik bir hedef oluşturabileceğini düşündürmektedir (Cardenas-Cantu ve ark., 2016).

2.9.6.Kolesterol Metabolizmasındaki Değişiklikler

Pterjiyumdan türetilen fibroblastlarda kolesterol metabolizmasında değişiklikler gözlenmiştir. Yapılan çalışmada, hücre içi kolesterol metabolizmasında bir artış gösterilmiştir (Peiretti ve ark., 2006). Ek olarak, insan örneklerinden izole edilen pterjiyum fibroblastlarında HMG-KoA redüktaz (kolesterol biyosentezinin hız sınırlayıcı enzimi) ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörünün (kolesterol açısından zengin lipoproteinleri içselleştiren) mRNA seviyelerinde artış bulunmuştur. Kolesterol metabolizmasını değiştiren ilaçlar olan everolimus ve pioglitazonun, pterjiyum fibroblast proliferasyonunu ve ayrıca hücre içi kolesterol homeostazını düzenleyen açılkoenzim A kolesterol açıltransferaz ve çoklu ilaç direnci proteininde yer alan moleküllerin seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Cardenas-Cantu ve ark., 2016).

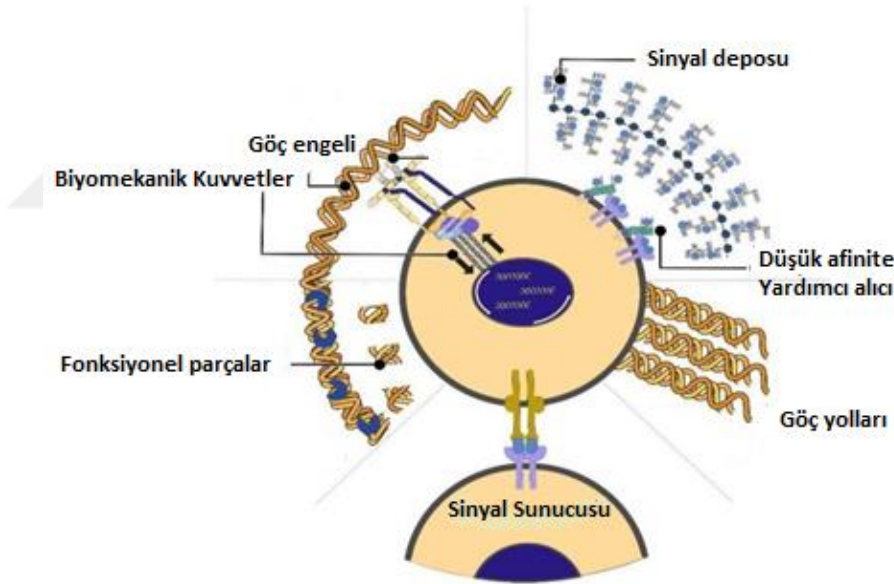
2.10. ECM

ECM, hücresel bileşenler için hem biyokimyasal hem de temel yapısal destek sağlayan dokunun hücresel olmayan bileşeni olarak tanımlanmaktadır. Basitçe hücreler arası bir dolgu olarak hizmet etmekten ziyade, hücre-hücre iletişiminden, hücre adezyonundan ve hücre proliferasyonundan sorumlu olan canlı dokunun fizyolojik olarak aktif bir bileşenidir (Frantz ve ark., 2010). Temel olarak ECM, yerleşik hücreler tarafından salgılanan su, mineraller, proteoglikanlar ve lifli proteinlerden oluşan ve birbirine kenetlenen ağdan oluşmaktadır. Bununla birlikte, her organ, belirli bir dokuya özgü amaç için bu elementlerin bileşimine sahiptir. Bu bileşim, doku gelişimi sırasında hücresel bileşenler ve bunların gelişen mikroçevresi arasındaki dinamik biyofiziksel ve biyokimyasal geri besleme yoluyla ortaya çıkmaktadır. Herhangi bir spesifik doku için, ECM'nin bileşenleri, dokunun ihtiyaçlarına göre yerleşik hücreler tarafından oluşturulmakta ve düzenlenmektedir. Kollajen, elastin ve laminin gibi temel fibröz proteinlerin üretimi ECM tarafından kontrol edilmektedir ve embriyonik gelişimin, hastalık ilerlemesinin çeşitli aşamalarında uyum sağlanmaktadır. Dinamik bir yapı olan ECM, sürekli olarak bileşenlerin bozulduğu ve değiştirildiği ECM proteinazları tarafından kolaylaştırılan bir yeniden modelleme sürecinden geçmektedir (Walker ve ark., 2018).

İn vitro olarak, çoğu hayvan hücresinin sadece bir substrata bağlandığında canlılığını koruduğu bilinmektedir (Gumbiner., 1996). Buna bağlı olarak, hücreler, çevredeki ECM ile çıkıntı yapıp, bağlanarak ve uzamsal olarak etkileşime girerek canlı kalabilmektedir. İntegrinler gibi hücre zarı boyunca bulunan çeşitli hücresel büyüme faktörü reseptörleri ve yapışma molekülleri, hücrenin çevre ile yapışma, iletişim kurma yeteneğinden sorumludur (Engler ve ark., 2006; Walker ve ark., 2018). Hücrelerin ECM'nin biyofiziksel ve biyokimyasal işaretlere yanıt verme duyarlılığı, sağlıklı yerleşik hücrelerin korunmasında doku homeostazının önemini göstermektedir. Buna göre, ECM yeniden şekillenme düzensizliğinin, aşırı ECM birikimi ve artan sertlik ile karakterize edilen çeşitli fibrotik koşullar yoluyla hücre yaşamına önemli ölçüde katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Artan interstisyel basınç nedeniyle, doku homeostazı kaybı, osteoartrit, kardiyovasküler hastalık ve kanser gibi çeşitli durumların riskinin artmasıyla da ilişkilendirilmiştir (Cox., 2011).

2.10.1. ECM 'nin İşlevi

ECM moleküllerinin bolluğu, hücredeki biyokimyasal ve biyofiziksel süreçleri aynı anda etkileyen çeşitli işlevlere hizmet etmektedir (Şekil 2.6.). ECM uzun yıllardır sadece hücrelere yapı sağlayan inert bir iskelet olarak düşünülürken, son yirmi yılda hücrelerin fonksiyonlarını ve fenotiplerini belirlemedeki rolü açıkça ortaya çıkmıştır. ECM, hücrelerin etkileşimini ve hareketini kontrol ederek bağlanma bölgeleri olarak görev yapmaktadır (Brown., 2011).Yapısal bütünlük ve desteğin yanı sıra, ECM bileşenlerinin büyüme faktörleri için çeşitli bağlanma bölgeleri vardır ve bunların salınımını kontrol etmektedir. Bu, morfojen gradyanları oluşturduğu için morfogenezde önemli sayılmaktadır. Son olarak, ECM, birkaç hücre içi sinyal yolunu ve hücre iskeleti mekanizmasını aktive eden mekanik sinyalleri hücrelere iletmektedir (Walker ve ark., 2018).



Şekil 2.6. ECM'nin işlevlerinin şematize gösterimi

ECM, doku polaritesini ve asimetrik kök hücre bölünmesini sürdürmek için gerekli olan hücreler arasında bir bağlantı noktası görevi görmektedir. Buna bağlı olarak, göçü engelleyebilmekte veya kolaylaştırabilmektedir. Büyüme faktörlerini ayırabilir ve serbest difüzyonunu engelleyebilmektedir. Diğer ECM bileşenleri, büyüme faktörlerini bağlayabilir ve hücre-hücre iletişiminin yönünü belirlemeye yardımcı olan

yardımcı alıcılar veya sinyal sunucuları olarak görev yapabilir. MMP'lerin etkisi sayesinde, ECM'nin fragmentleri de hücre davranışını etkileyebilmektedir. ECM'nin fiziksel özellikleri, 3D genomun yeniden düzenlenmesi gibi hücre fenotipinde çeşitli değişikliklere yol açan fokal yapışma kompleksleri tarafından algılanabilmektedir (Lu ve ark., 2012).

ECM'nin işlevi en iyi gelişim bağlamında tanımlanmaktadır. Bir fetüsten tam gelişmiş bir organizmaya bir memeli embriyosunun gelişimi, iyi organize edilmiş bir olgudur. Böylesine hızlı bir süreçte, ECM'nin uzamsal-zamansal bileşimi, miktarı ve özellikleri sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Birkaç çalışma, mutasyona uğramış ECM bileşenlerinin doğum kusurlarına veya embriyonik ölümcüllüğe yol açtığını göstermiştir, bu da gelişimdeki rolünü vurgulamaktadır. ECM'nin geometrisi, katılığı ve diğer fiziksel özellikleri hücreler tarafından algılanmakta ve nihayetinde farklılaşmalarını ve dokularda oluşturdıkları karmaşık uzaysal ve yapısal düzenlemeleri yönlendirmektedir (Walker ve ark., 2018).

2.10.2. ECM'nin Birincil Bileşenleri

ECM, içinde var olan farklı yapılara ve özelliklere yol açan çeşitli proteinlerden oluşmaktadır (Walker ve ark., 2018). ECM'lerin ana bileşenleri, yüksek oranda asidik ve hidratlı moleküller olan kollajenler, elastin, fibronektin (FN), lamininler, glikoproteinler, proteoglikanlar (PG'ler) ve glikozaminoglikanlar (GAG'ler) gibi lif oluşturuucu proteinlerdir (Theocharis ve ark., 2016). Bu ECM bileşenleri arasında, ECM'nin genel yapısı ve özelliklerinde işlevlerini daha fazla belirten alt tipler vardır. ECM moleküllerinin farklı alt tipleri ve kombinasyonları, tüm vücudun çalışması için gerekli olan farklı işlevleri sağlamaktadır (Walker ve ark., 2018).

2.10.3. Kollajen Gen Ailesi

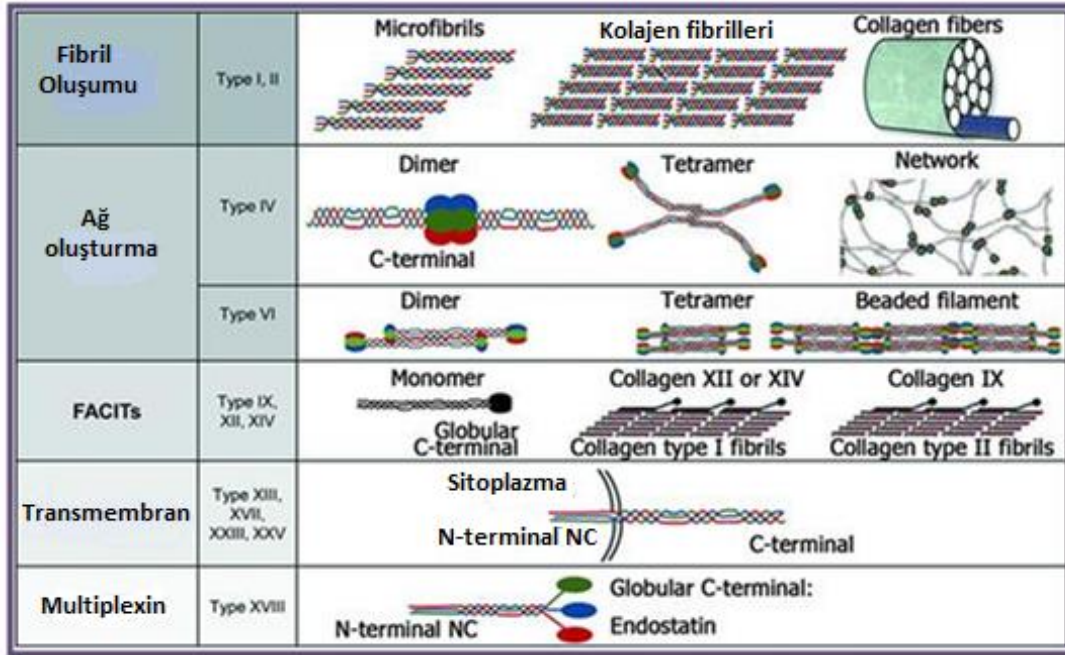
Kollajen süper ailesi, omurgalılarda en az kırk altı farklı polipeptit zinciri (a zincirleri) tarafından oluşturulan yirmi sekiz farklı kollajen türünden oluşmaktadır (Theocharis ve ark., 2016). Ayrıca, aynı kollajen tipi (örneğin kollajen IV ve VI) için birkaç moleküler izoformun ve iki farklı kollajen tipine ait α zincirlerinden oluşan hibrit izoformların varlığından dolayı kollajen ailesinde daha fazla çeşitlilik meydana gelmektedir. Bu sebeple kollajenler, yapıları ve özellikleri bakımından birbirlerinden farklılık göstermektedirler (Ricard-Blum., 2011;Theocharis ve ark., 2016).

Kollajenlerde, kollajen ağlarının oluşumunu ve propeptitlerin bölünmesini etkileyebilecek çeşitli mutasyonlar tanımlanmıştır. Kollajenlerdeki mutasyonlar, Ehlers-Danlos sendromu (kollajen tip I, III, V), osteogenezis imperfekta ve osteoporoz (kollajen tip I), osteoartroz (kollajen tip II, IX, XI), kondrodisplaziler (kollajen tip II, IX, X, XI), arteriyel anevrizmalar (kollajen tip III), Alport sendromu (kollajen tip IV), Bethlem miyopati ve Ullrich musküler distrofi (kollajen tip VI), epidermolizis bullosa acquisita (kollajen tip VII), genelleştirilmiş atrofik epidermolizis bülloza (kollajen tip XVII), Fuchs endotel kornea distrofisi (kollajen tip VIII) ve Knobloch sendromu (kollajen tip XVIII) gibi çeşitli klinik patolojilerle ilişkilendirilmiştir (Kadler ve ark., 2007;Shoulders., 2009).

Kollajen biyosentezi ve yapısı, tümörijeniz dahil olmak üzere çeşitli patolojilerde ECM'nin yeniden şekillenmesi sırasında belirgin şekilde değiştirilmektedir. Artan kollajen birikimi ve çapraz bağlanma ile indüklenen ECM sertleşmesi doku morfogenezini bozmakta ve malign ilerlemeye katkıda bulunmaktadır. Artan kollajen çapraz bağlanmasına LOX ve LOX benzeri enzimler aracılık etmekte, integrinler ve DDR'ler gibi kollajen bağlayıcı hücre yüzeyi reseptörleri yoluyla sinyalleşmeyi teşvik ederek tümör ilerlemesini desteklemektedir (Theocharis ve ark., 2016).

Kollajenler, ortak alan homolojilerine göre sınıflandırılmakta ve yedi kategoride işlev görmektedir. Bunlar, FACIT'leri (fibriller ve ağ oluşturan kollajenleri), MACIT'leri (kesilmiş üçlü sarmallı zarla ilişkili kollajenleri), sabitleyici fibrilleri, boncuklu filament

oluşturan kolajenleri ve MULTIPLEXIN'i (çoklu üçlü sarmalı) içermektedir (Şekil 2.9.) (Shoulders., 2009).



Şekil 2.7. Kollajen ailesi (Singh ve ark., 2012)

2.10.4. Kollajen

Kollajen kelimesi, kökeni 19. yüzyıla dayanan Fransızca bir terim olup bağ dokunun yapışkan madde üretmesine işaret eden bir anlam taşımaktadır. Bu tabir yunanca “kola (xoXXa)” (yapışkan) kelimesi ve –yevos (doğum) ekinin birleşmesi ile ortaya çıkmış bir terimdir. 1865 yıllarında İngilizce’ye “collagen” olarak geçmiştir (Van Der Rest., 1991).

Kollajenler memelilerde en bol bulunan proteinlerdir ve toplam proteinlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır (Ricard-Blum., 2011). Kollajen, tüm hayvanlarda interstisyel ECM'lerde en bol bulunan fibröz proteindir ancak aynı zamanda bazal membranlar gibi periselüler matrislerde de bulunmaktadır. Esas olarak fibroblastlar tarafından ECM'lerde sentezlenmekte ve salgılanmaktadır. Fibroblastlar matris üzerine gerilim uygulayarak, kolajen fibrillerinin dizilmesini organize eder ve böylece kolajen liflerinin hizalanmasını sağlar (Theocharis ve ark., 2016).

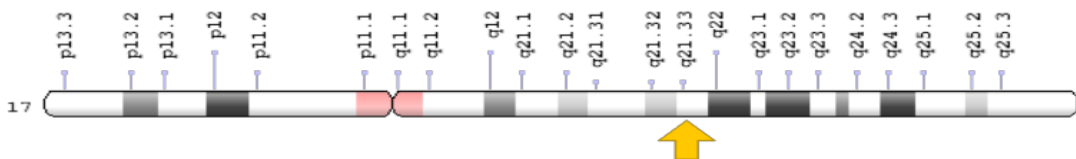
Kollajenler yapısal roller oynamakta, dokuların mekanik özelliklerine, organizasyonuna ve şekline katkıda bulunmaktadır. Birkaç reseptör ailesi aracılığıyla hücrelerle etkileşime girerek çoğalmalarını, göçlerini ve farklılaşmalarını düzenlemektedirler. Bazı kollajenler sınırlı bir doku dağılımına ve dolayısıyla spesifik biyolojik fonksiyonlara sahiptir (Ricard-Blum., 2011).

2.10.5. Fibriller Kollajenler

Fibriller kolajenler, kolajen tip I, II, III, V, XI, XXIV ve XXVII'yi içermektedir. Fibriller kolajenler, birçok dokuda eksprese edilmekte ve dokulara gerilme kuvveti sağlamaktadır (Kadler ve ark., 2007). Belirli dokulardaki liflerde genellikle belirgin bir kolajen tipi baskın olmasına rağmen, diğer kolajen tipleri ile matris makromoleküllerinin de yer aldığı ve onlara spesifik yapısal, fonksiyonel özellikler sağladığı bulunmuştur. Kollajen, dokuların temel gerilme elemanı olmasının yanı sıra, hücre göçü, adezyon, anjiyogenez, doku gelişimi ve onarımı gibi çeşitli hücre fonksiyonlarda görev alır (Theocharis ve ark., 2016). En yaygın fibriller kollajen tipleri I, II ve III'tür. Kollajen tip I deride, tendonlarda, damar sisteminde, akciğerler, kalp gibi organlarda bulunur ayrıca kemik ve dişlerin kalsifiye dokusunun organik kısmında ana bileşeni oluşturmaktadır (Boraschi-Diaz ve ark., 2017).

2.10.6. COL1A1 Geni

COL1A1 geni, 50,183,289 baz çiftinden 50,201,632 baz çiftine kadar 21.3 ve 22.1 konumları arasında, 18 kb uzunluğunda, 17. kromozomun uzun (q) kolunda olup, 51 ekzon içermektedir (Şekil 2.10.) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1277>).

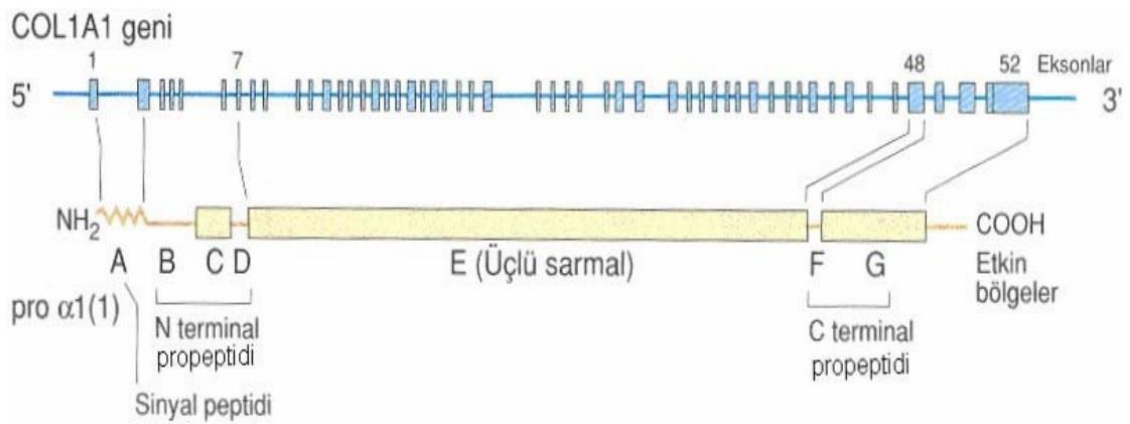


Şekil 2.8. *COL1A1* geninin kromozom üzerindeki lokasyonu (<https://tr1lib.org/ireader/5594562>)

Önemli bir yapısal protein olan tip I kollajen, başlıca fibriller kollajenlerden biri olarak sınıflandırılmaktadır. İnsan vücudunda ve diğer omurgalılarda bulunan en yaygın kolajendir. Tip I kollajen, kemikler, bağlar, tendonlar, kıkırdak, cilt, karaciğer, kalp kapakçıkları, kornea, akciğerler ve diğer bağ dokuları dahil olmak üzere geniş çapta dağılmaktadır (Lu ve ark., 2019). *COL1A1* geni, iki alfa 1 zinciri ve bir alfa 2 zincirinden oluşan tip I kollajenin pro-alfa 1 zincirlerini kodlamaktadır. *COL1A1*, ECM'nin önemli bir bileşenidir ve hücre dışı matris yeniden şekillenmesi, tümör hücresi yapışması, hücre göçü ve kan damarı gelişimi gibi çoklu biyolojik süreçlerde yer almaktadır (Li ve ark., 2020).

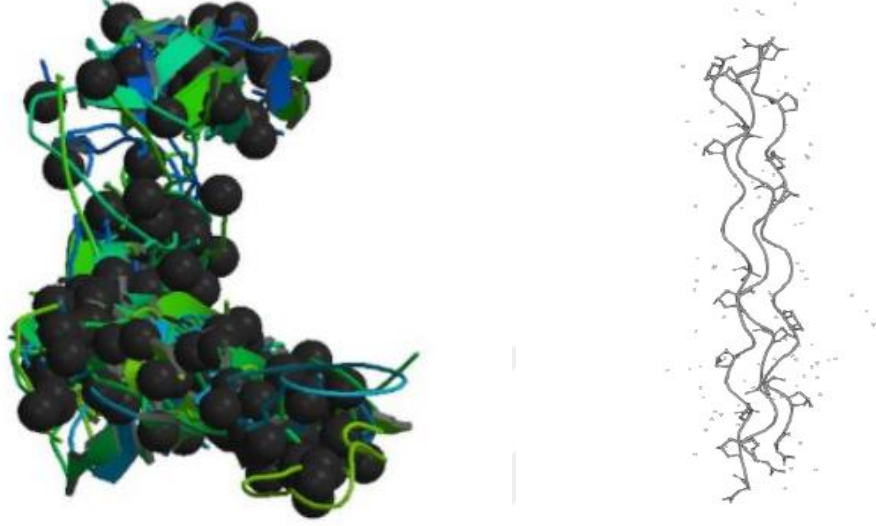
Tip I kolajen, iki pro- α -1 zincirinden ve bir pro- α -2 zincirinden oluşmakta ve sert bir üçlü sarmal oluşturmaktadır (Valadares ve ark., 2014). Tip I kollajen, heterotrimer yapıda olup, pro 1(I) α zinciri kollajen tip I alfa 1 (*COL1A1*) geni tarafından, pro2 (I) zincirleri ise kollajen tip I alfa 2 (*COL1A2*) geni tarafından kodlanmaktadır.

Tip I kollajenin pro α 1(I) zinciri 1464 amino asitten oluşan 140 kDa (102) ağırlığında bir protein olup yapısında sinyal peptidi (A bölgesi), N terminal propeptidi (B,C,D bölgesi), üçlü heliks sarmal domaini (E bölgesi) ve C terminal propeptidi (F,G bölgesi) yer almaktadır. Pro α 1(I) zincirini kodlayan *COL1A1* geninin 1. ekzonu sinyal peptidi, 2–6. ekzonları N terminal propeptidi, 7–48. ekzonları ve 49. ekzonun bir kısmı üçlü heliks domainini ve 49–52. ekzonlar C terminal propeptidi kodlamaktadır (Şekil 2.11.) (Sel, 2011).



Şekil 2.9. Tip I kollajen pro -1(I) zinciri ve COL1A1 geninin yapısı (Sel., 2011)

COL1A1 geni; alfa 1 tip I kollajen preproprotein, *COL1A1*_İNSAN, *COL1A1* proteini, kolajen I, alfa-1 polipeptit, cilt, tendon ve kemik kollajeni, alfa-1 zinciri, kolajen tip I alfa 1, tip I kollajen alfa 1 gibi isimlerle de bilinmektedir (<https://tr1lib.org/ireader/5594562,2021>).

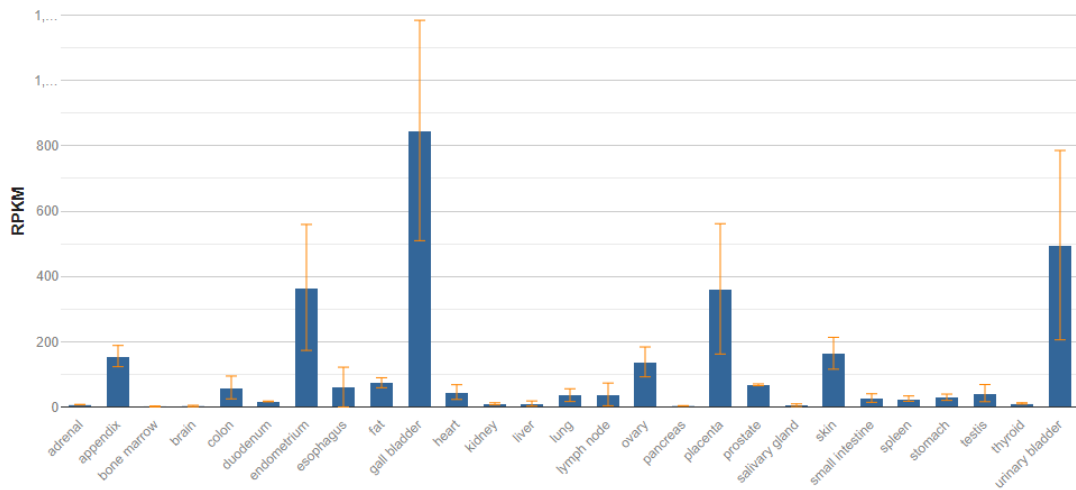


Şekil 2.10. *COL1A1* proteinin 3D yapıları

(<https://stringfixer.com/tr/COL1A1>) (<https://www.uniprot.org/uniprot/P02452>)

COL1A1 geni safra kesesinde, idrar kesesinde ve aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi daha birçok dokuda ekspre edilmektedir (Şekil 2.13.).

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1277>).



Şekil 2.11. *COL1A1* geninin farklı dokulardaki ekspresyonu

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1277>).

COL1A1 geni son zamanlarda birçok hastalıkla ilgilenen hayati bir aday gen olarak ortaya çıkmaktadır (Ackermann., 2017). Osteogenezis imperfekta, *COL1A1* genindeki mutasyonların neden olduğu en yaygın bozukluktur. Bu durumdaki kişilerde, genellikle hafif bir travmadan veya belirgin bir neden olmaksızın kolayca kırılan kemikler bulunmaktadır. Bu bozukluğun en hafif formu olan osteogenezis imperfekta tip I'den sorumlu mutasyonların çoğu, pro- α 1(I) zincirlerinin üretimini azaltmaktadır. Mevcut olan daha az pro- α 1(I) zinciri ile hücreler, normal tip I kollajen miktarının sadece yarısını üretebilir. Bu kritik proteinin eksikliği, kemik kırılabilirliğinin ve osteogenezis imperfekta tip I'in diğer karakteristik özelliklerinin altında yatmaktadır. *COL1A1* genindeki birkaç çeşit mutasyon, tip II, III ve IV dahil olmak üzere daha şiddetli osteogenezis imperfekta formlarına neden olmaktadır. Bu mutasyonlardan bazıları, *COL1A1* geninden DNA parçalarını silmekte ve bu da anormal şekilde kısaltılmış bir pro- α 1(I) zincirine sebep olmaktadır. Diğer genetik değişiklikler, pro- α 1(I) zincirindeki amino asitlerin dizisini değiştirmekte ve bu genellikle amino asit glisini farklı bir amino asit ile değiştirerek gerçekleşmektedir. Bazı durumlarda, amino asit ikameleri protein zincirinin bir ucunu (C-terminali veya C-propeptit olarak adlandırılır) değiştirmekte ve bu da kolajen moleküllerinin birleşmesini engellemektedir. Bunlar *COL1A1* gen mutasyonlarına, tip I kollajenin anormal versiyonlarının üretilmesine yol açmaktadır. Bu anormal kollajen, gelişmekte olan kemiklere ve diğer bağ dokularına dahil edildiğinde, osteogenezis imperfekta'nın şiddetli formlarıyla ilişkili ciddi sağlık sorunlarına sebebiyet vermektedir (<https://medlineplus.gov/genetics/gene/col1a1>).

COL1A1 genindeki yaygın bir polimorfizm, osteoporoz gelişme riskini arttırıyor gibi görünmektedir. Osteoporoz, kemikleri giderek daha kırılabilir ve kırılmaya meyilli yapan bir durumdur. *COL1A1* geninin kontrol (düzenleyici) bir bölgesinde meydana gelen bu polimorfizm, muhtemelen tip I kollajen üretimini etkilemektedir (<https://medlineplus.gov/genetics/gene/col1a1>).

COL1A1 genindeki belirli bir mutasyon, yaygın olarak Caffey hastalığı olarak bilinen İnfantil Kortikal Hiperastoz'a neden olmaktadır. Bu duruma neden olan mutasyon, her hücrede *COL1A1* geninin bir kopyasında meydana gelmektedir. 836 protein konumundaki sistein amino asiti ile arginin amino asit (Arg 836 veya R836C)

yer değiştirmesidir. Bu mutasyon, boyut ve şekil olarak değişken olan tip I kollajen fibrillerinin üretilmesine neden olmaktadır (<https://medlineplus.gov/genetics/gene/col1a1>).

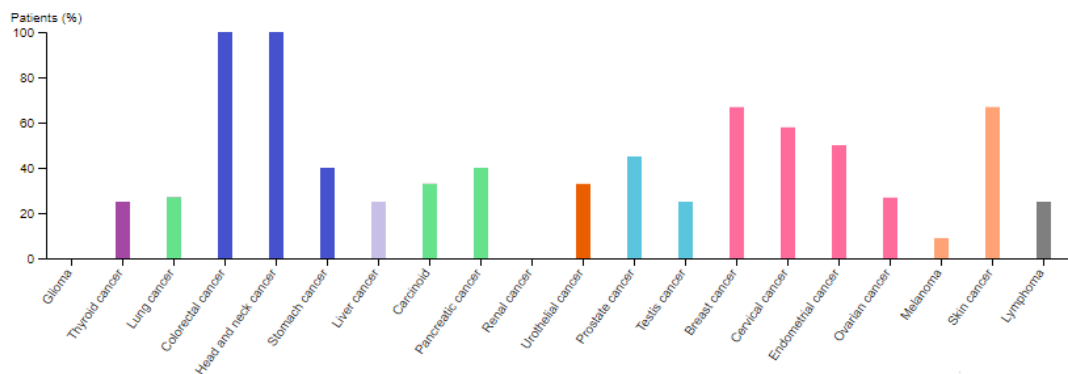
COL1A1 genindeki mutasyonların, cildi, kemikleri, kan damarlarını ve diğer birçok organ ve dokuyu destekleyen bağ dokularını etkileyen bir grup bozukluk olan çeşitli Ehlers-Danlos sendromu formlarına neden olduğu bulunmuştur. Bu mutasyonlar, her hücrede *COL1A1* geninin bir kopyasından meydana gelmektedir. *COL1A1* genindeki en az beş mutasyon, alışılmadık derecede geniş eklem hareket aralığı (hipermobilite) ve doğumda her iki kalçanın yerinden çıkmasıyla karakterize olan, Artrokalazi tipi Ehlers-Danlos Sendromu ile sonuçlanabilmektedir. Hastalığın bu formuna neden olan genetik değişikler, kritik bir segmenti eksik olan, pro- α 1(I) zincirinin üretilmesine neden olmaktadır. Bu segmentin eksikliği, pro- α 1(I) zincirlerinin olgun tip 1 kollajen moleküllerine birleştirilmesine ve işlenmesine müdahale etmektedir. Deri, kemik ve tendonlar gibi tip 1 kollajen bakımından zengin dokular, bu değişiklikten daha çok etkilenmektedir. *COL1A1* gen mutasyonları, ayrıca Ehlers-Danlos Sendromu'nun klasik ve vasküler tiplerinin nadir bir nedeni de sayılmaktadır (Çoğu vakada, bu tipler diğer genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanır). Hem klasik hem de vasküler Ehlers-Danlos Sendromu ile ilişkili bir *COL1A1* gen mutasyonunda, arginin amino asiti pro- α 1 (I) zincirinde 312 pozisyonunda (Arg312Cys veya R312C) sistein amino asiti ile yer değiştirmektedir. Değiştirilmiş pro- α 1(I) zinciri, tip 1 kollajen fibrillerinin yapısını bozarak, diğer kollajen yapıcı proteinlere müdahale etmektedir. Kollajenlerdeki bu değişiklikler, kan damarı ve organ yırtılma riskini ve Ehlers-Danlos Sendromu'nun klasik ve vasküler tiplerinde ortaya çıkabilecek diğer anormallikleri arttırmaktadır (<https://medlineplus.gov/genetics/gene/col1a1>).

Kollajen ailesinin üyelerinin çeşitli doku tiplerinde karsinogeneizde yer aldığına dair kanıtlar da vardır ve bazı kanserlerde *COL1A1* ve *COL1A2*'nin anormal ekspresyonu dikkat çekmiştir. Yakın zamanda ise *COL1A1*'in çeşitli tümör tipleri ile ilişkili olduğu ve tümör doku ve hücrelerinde *COL1A1* ekspresyonunun yüksek olduğu bulunmuştur (Zhang ve ark., 2018) *COL1A1* ve *COL1A2*'nin mide kanserinde farklı şekilde eksprese edildiği ve mide kanseri hastalarında kötü klinik sonuçlara yol açabileceği bildirilmiştir. Midenin normal epitelinde, premalign ve tümör lezyonlarında

COL1A1 ve *COL1A2* ekspresyonundan nadiren bahsedilir ve tip I kollajen hepatik fibrozis ile ilişkilendirilmiştir. (Ma ve ark., 2019).

Dermatofibrosarkom protuberans, derinin derin katmanlarında tümöre neden olan nadir bir kanser türüdür. *COL1A1* ve trombosit türevli büyüme faktörü beta geninin bulunduğu kromozomlar 17 ve 22 arasındaki karşılıklı translokasyonların, büyüme faktörünün düzensiz ekspresyonundan kaynaklanan Dermatofibrosarkom Protuberans'a neden olduğu düşünülmektedir (<https://medlineplus.gov/genetics/gene/col1a1>).

COL1A1'in, meme kanseri, tiroid kanseri ve pankreas kanseri gibi çoklu kanserlerin ilerlemesi ve prognozu ile ilişkili olduğu da bildirilmektedir (Şekil 2.12.) (Li ve ark., 2020). Zhu ve ark. bir immünohistokimyasal çalışmada, anaplastik yumurtalık karsinomlarında *COL1A1*'in anormal bir ifadesini göstermiştir. (Zhu ve ark., 1995) Ayrıca yapılan bir çalışmada *COL1A1*'in yukarı regülasyonunun yumurtalık kanseri hücrelerinin sisplatin direncine katkıda bulunduğu bulunmuştur (Wang., 2018). Yapılan cDNA mikrodizi analizi sonucu, *COL1A1*'in rahim ağzı kanserinin radyasyon direncinde rol oynadığı gösterilmiştir. Yakın tarihli bir çalışma, radyasyondan sonra *COL1A1* ekspresyonunun değiştiğini doğrulamıştır (Liu ve ark., 2017). Aynı zamanda *COL1A1*'in akciğer, böbrek, pankreas, hepatoselüler karsinom kanserleri gibi birçok kanserde tümör hücre proliferasyonu ve invazyonu ile ilişkisi de bildirilmiştir (Shi ve ark., 2019; An ve ark., 2020).



Şekil 2.12. *COL1A1* geninin kanser hastalığında görülme sıklığı

COL1A1 genindeki ekspresyon farklılıklarının birçok hastalığın olası nedenleri arasında olabileceğine dair literatürde çok sayıda çalışma mevcuttur ve bu hastalıklar

arasında kanserler büyük bir grubu oluşturmaktadır. Aynı şekilde pterjiyumun tümör benzeri bir doku özelliği göstermesi hastalığın patogeneğinde *COL1A1* geninin rolü olabileceğini düşündürmektedir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Çalışmaya Tokat Gaziosmanpaşa Üniversite Hastanesi Göz Hastalıkları Polikliniğine başvuran pterjiyum tanısı almış 27 hasta (9 kadın, 18 erkek) dahil edildi. Katılımcıların izni ve bilgisi dahilinde ameliyat esnasında alınan pterjiyum dokuları hasta grubu ve her bir hastanın aynı gözüne ait sağlıklı konjonktiva dokuları ise kontrol grubu olarak kullanıldı. Çalışma için gerekli izin Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 05.03.2020 tarihli toplantısında 20-KAEK-055 proje numarası ile alındı. Çalışmanın tamamı Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji laboratuvarında gerçekleştirildi. Bu tez çalışması, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığınca 2020/91 proje numarası ile desteklendi.

3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

1. Real Time PCR (Applied Biosystems, İngiltere)
2. Vorteks (Velp, Scientifica, F20220176, İtalya)
3. Santrifüj (Hettich, Almanya)
4. Plate (Applied Biosystems, 4346907, İngiltere)
5. Plate Yapıştırıcı (Applied Biosystems, 201405092, İngiltere)
6. Otomatik Pipetler (Gilson, Fransa)
7. Otomatik Pipetler (ABT, Türkiye)
8. Otoklav (HMC, HV25, Almanya)
9. Homojenizatör (Next Advance Storme 24, BBY24M-CE, USA)
10. Qubit 2.0 Florometre (Invitrogen by life Technologies, Avustralya)
11. Etüv (Memmert, Almanya)
12. Distile Su Cihazı (Elgaoption Q7, İngiltere)

13. Buzdolabı (Arçelik, 570465, Türkiye)
14. -20°C Derin Dondurucu (Arçelik, 2052dy, Türkiye)
15. -80°C Derin Dondurucu (Nuaire, Nu9483e, ABD)
16. PCR (Biometra, Almanya)

3.3. Çalışmada Kullanılan Sarflar ve Kimyasallar

1. Bistüri
2. Petri
3. RNaseZap (Thermo, Catalog No: 12183018A, USA)
4. RNA İzolasyon kiti (Thermo Catalog No: AM9780, USA)
 - Lizis Solüsyonu
 - Yıkama Solüsyonu 1
 - Yıkama Solüsyonu 2
 - RNase-free Water
5. cDNA Sentez Kiti (GeneAll, Hyperscript, First strand synthesis kit Catalog # 601-005, Korea)
 - 10X Reaksiyon solüsyonu,
 - dNTP Mix(10 mM), Oligo (dT) 20,
 - Random hekzamer,
 - Revers Transkriptaz Enzim (200U/μl),
 - RNaz İnhibitor,
 - RNaz free Water

6. Ethanol(Sigma-Aldrich Catalog No: E7023, USA),
7. Qubit ssDNA Test Kiti (Invitrogen Catalog No: Q10212, USA)
8. Qubit RNA HS Test Kiti (Invitrogen Catalog No: Q32852, USA)
9. Real time PCR (A.B.T.™ 2X qPZR SYBR Green MasterMix) (with ROX)
 - 1X ROX Dye (50X)
 - Forward Primer
 - Reverse Primer
 - Template cDNA
 - RNaz-free Water

3.4. Uygulanan Yöntemler

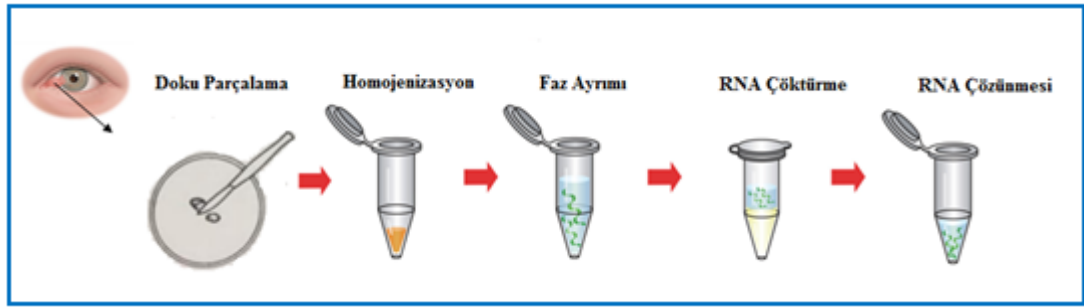
3.4.1. Dokuların Saklanması

Ameliyat sırasında alınan doku örneklerinin bir kısmı histopatolojik incelemeye gönderilerek pterjiyum tanısı kesinleştirildi. Kalan dokular sıvı azot içerisinde dondurulup, -80°C’de saklandı. -80’den çıkarılan dokular RNA İzolasyon kiti (Thermo, Catalog No: 12183018A, USA) protokolüne uygun olarak izole edildi. Sonrasında cDNA elde edilerek gen ekspresyonu analizi qRT-PCR (Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu) cihazı ile gerçekleştirildi.

3.4.2. RNA izolasyon protokolü

- Bistüri ile küçük parçalara ayrılan doku örnekleri homojenize edildi ve üzerlerine 0,75 mL RiboEx eklenerek vortekslendi.
- Vortekslenen örnek karışımları 5 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

- Karışım 4°C'de 12.000 xg'da, 10 dk boyunca santrifüj edildi, oluşan süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı.
- Aktarılan supernatant oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
- 4°C'de 10 dakika boyunca 12.000 x g'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- RNA peletini yıkamak için 1 ml %75'lik etanol eklendi. (RNA çökeltisi 4°C'de %75'lik etanol içinde saklanabilir).
- RNA, 4°C' de 5 dakika boyunca 7.500 x g'de santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve RNA peleti 5 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
- RNA peleti içerisine %0.5'lik SDS solüsyonu eklenip 10~15 dakika 56°C'de inkübe edilerek çözüldü ve RNA elde edildi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Total RNA izolasyonu protokol özetinin şematize gösterimi

3.4.3. Total RNA Konsantrasyon Ölçümü

RNA örneklerinin konsantrasyonlarını ölçmek için Qubit 2.0 cihazı ve RNA HSAssay kiti (Q32852) kullanıldı. Ölçümün standardize ve doğru yapılması için öncelikle kit içeriğindeki standartlar cihazda okutuldu. Tüm bileşenler kullanımdan önce oda ısısında bekletildi. Sırasıyla örneklerin cihazda ölçümleri gerçekleştirildi ve sonraki aşamalar için hazır hale getirildi.

3.4.4. Total RNA'dan cDNA Sentezi

İzole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi aşamasına geçildi. cDNA sentezi için GeneAll marka cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity) (C03-01-05)

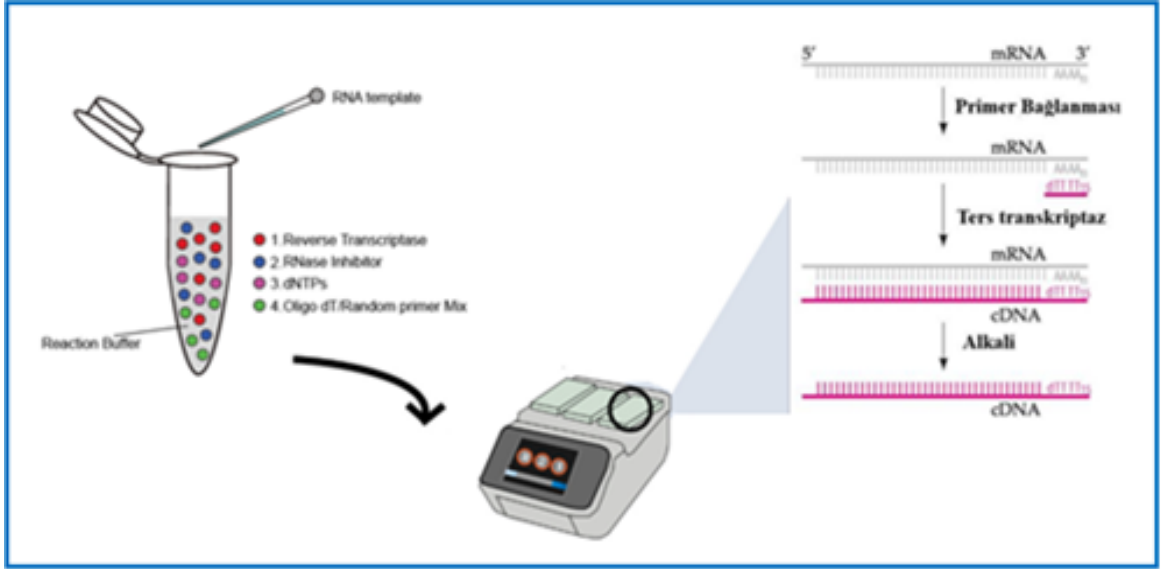
kiti kullanıldı. Sentez işlemi için üretici firmanın kit protokolü uygulandı. Kullanılan kit protokolüne uygun olarak bileşenler Tablo 3.1. de verilen oranlarda karıştırıldı ve Tablo 3.2.'de belirtilen PCR programı uygulandı.

Tablo 3.1. cDNA sentezi için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar(1X)
dNTP Mix(2.5mM)	1 µl
10X Reaction Buffer	2 µl
Rnase Inhibitor	0,5 µl
Random hexamer(50µM)	2 µl
RNase free Water	3,5 µl
Reverse Transcriptase(200µl)	1 µl
RNA örneği	10 µl
Total Hacim	20 µl

Tablo 3.2. cDNA sentezi için uygulanan PCR programı

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



Şekil 3.2. cDNA sentezi şematik gösterimi

Elde edilen cDNA örnekleri qRT PCR aşamasına kadar -80°C’de muhafaza edildi.

3.4.5. cDNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

cDNA miktarı Qubit 2.0 cihazı ve Qubit ssDNA Assay Kit (Invitrogen, Q10212) kullanılarak ölçüldü. Tüm bileşenler kullanılmadan önce oda ısısına getirildi. Ölçümler gerekli işlemler yapılarak gerçekleştirildi. Her bir kuyucuğa eklenecek cDNA miktarı 60 ng olarak hesaplandı ve ayrıca her bir numuneye eklenecek cDNA miktarı bağımsız olarak hesaplandı.

3.4.6. qRT-PCR Aşaması

qRT-PCR teknolojisi DNA’nın ya da mRNA örneklerinin çoğaltılmasını ve ürünlerinin miktarını tek bir tüpte tespit edebilen son yıllarda yaygın kullanılan bir yöntemdir. Floresan ışına tekniklerinin moleküler genetik yöntemlerde kullanıma girmesi ile birlikte bilinen “PCR” geliştirilerek oluşturulan teknik gen anlatım çalışmalarının hızına ivme kazandırmıştır. “PCR” çoğaltılmasını görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemi olması dolayısıyla “Sayımsal Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)”, “İzlenebilir Polimeraz

Zincirleme Tepkimesi (PZT)”, “Floresan Sayımsal RT-PZR” gibi farklı adlarla da isimlendirilmektedir (Günel., 2009). Bu yöntemde Syber Green , Eva Green gibi çeşitli floresan boyalar kullanılır. Floresan boya sadece çift zincirli DNA’nın minör oluşuna bağlandığında floresan ışıma yapar. Çift zincirli DNA’ya primer bağlanıp uzama gerçekleşirken floresan boya oluklara bağlanır. Amplifikasyon süresince DNA miktarındaki artışa orantılı olarak floresan miktarı da artar ve bu artış Real Time cihaz ekranından eş zamanlı olarak takip edilebilir (Günel., 2007;Kubulay., 2016).

cDNA aşamasından sonra ekspresyon analizi için qRT-PCR yapıldı. qRT-PCR aşamasında kontrol ve çalışma grupları için *COL1A1* geni, house keeping gen olarakta beta-aktin kullanıldı. Reaksiyon karışımı olarak A.B.T.™ 2X qPCR SYBR-Green MasterMix (with ROX) (Cat no: Q03-02-01) kullanıldı (Şekil 3.3).

Tablo 3.3. qRT-PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları

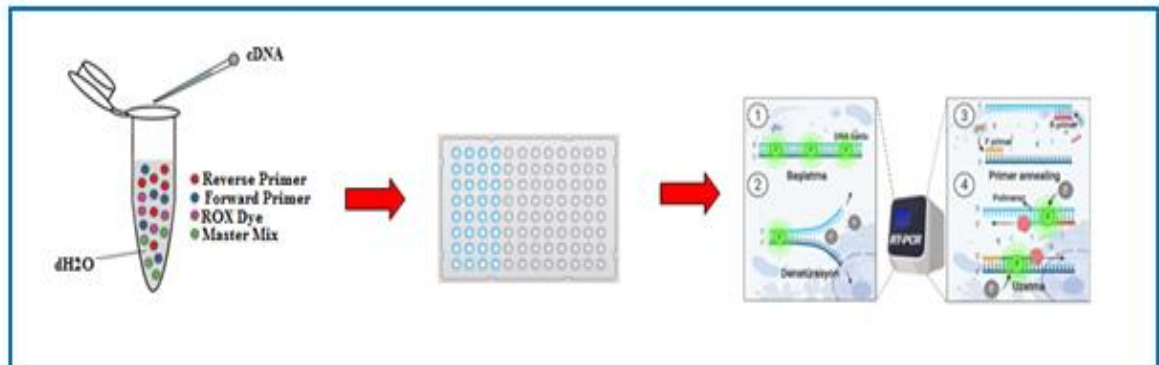
Bileşenler	Miktar(1x)
2X SYBR Green Master Mix(with ROX)	10 µl
1X ROX Dye(50X)	0.4 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
CDNA	3 µl
dH2O	4.6 µl

Tablo 3.4. qRT-PCR analizinde kullanılan primer baz dizileri

Transkript	Primer Sekansları	
COL1A1	Forward	5'-GCTCCTCTTAGGGGCCACT-3'
	Reverse	5'-CCACGTCTCACCATTGGGG-3'
ACTB	Forward	5'-GCATGGGTCAGAAGGATTCC-3'
	Reverse	5'-CACGCAGCTCATTGTAGAAGG-3'

Tablo 3.5. qRT-PCR Programı

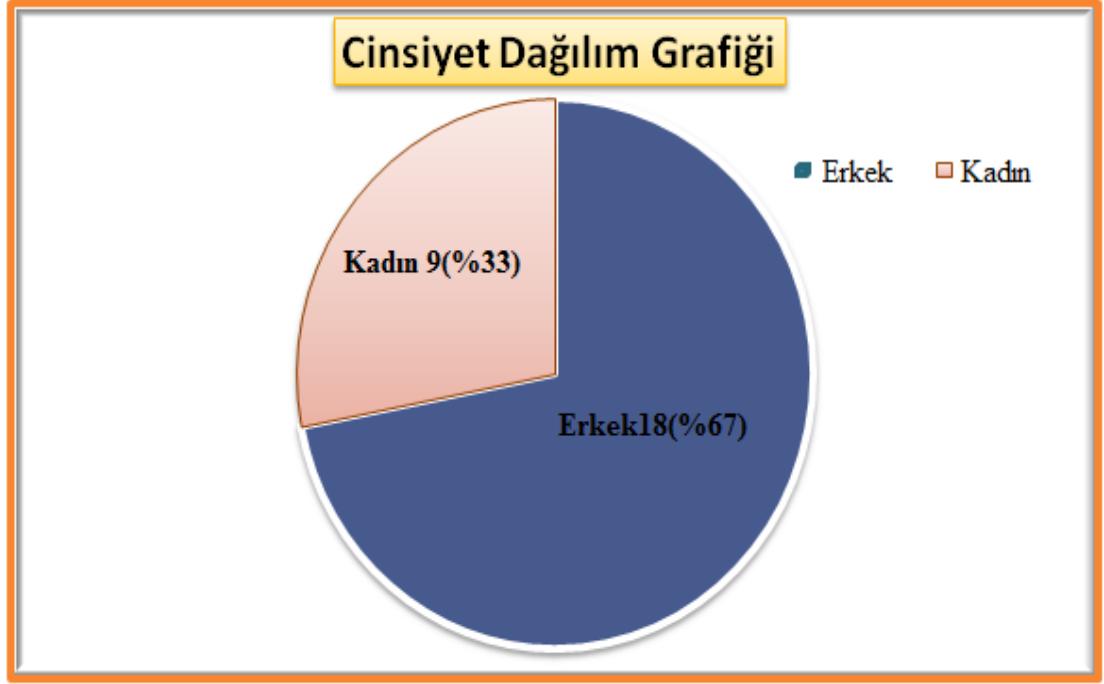
Basamaklar	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç	50	20sn	1
Denatürasyon	95	10dk	1
Yapışma	95	15sn	40
Uzama	55	1dk	



Şekil 3.3. qRT-PCR aşamaları

4. BULGULAR

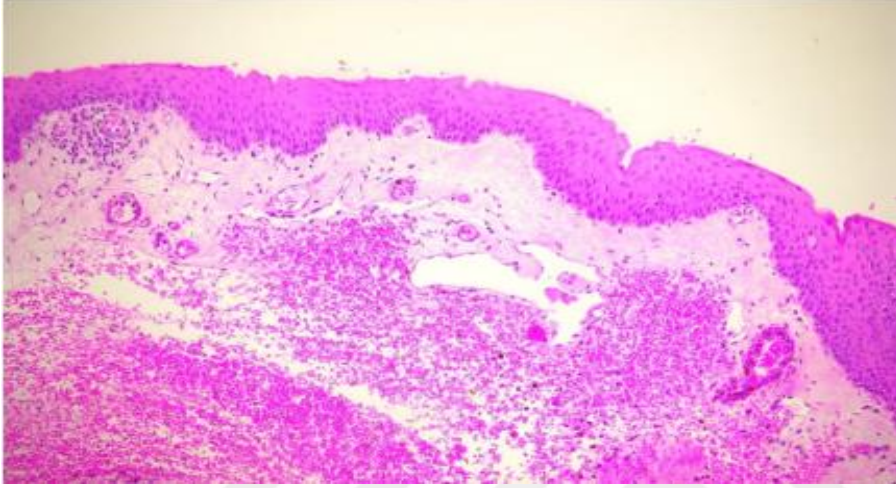
Çalışmaya dahil edilen hastaların cinsiyet dağılımı yapılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Çalışmaya dahil edilen hasta gruplarında cinsiyet dağılım grafiği

4.1. Pterjiyumlu Dokulara Ait Histopatolojik İnceleme

Şekil 4.2.'te verilen pterjiyumlu dokuya ait histopatolojik görüntüde, konjonktiva epiteli altındaki stromal alanlarda çok sayıda konjesyone ektazik kapiler vasküler alanlar tespit edilmiştir.

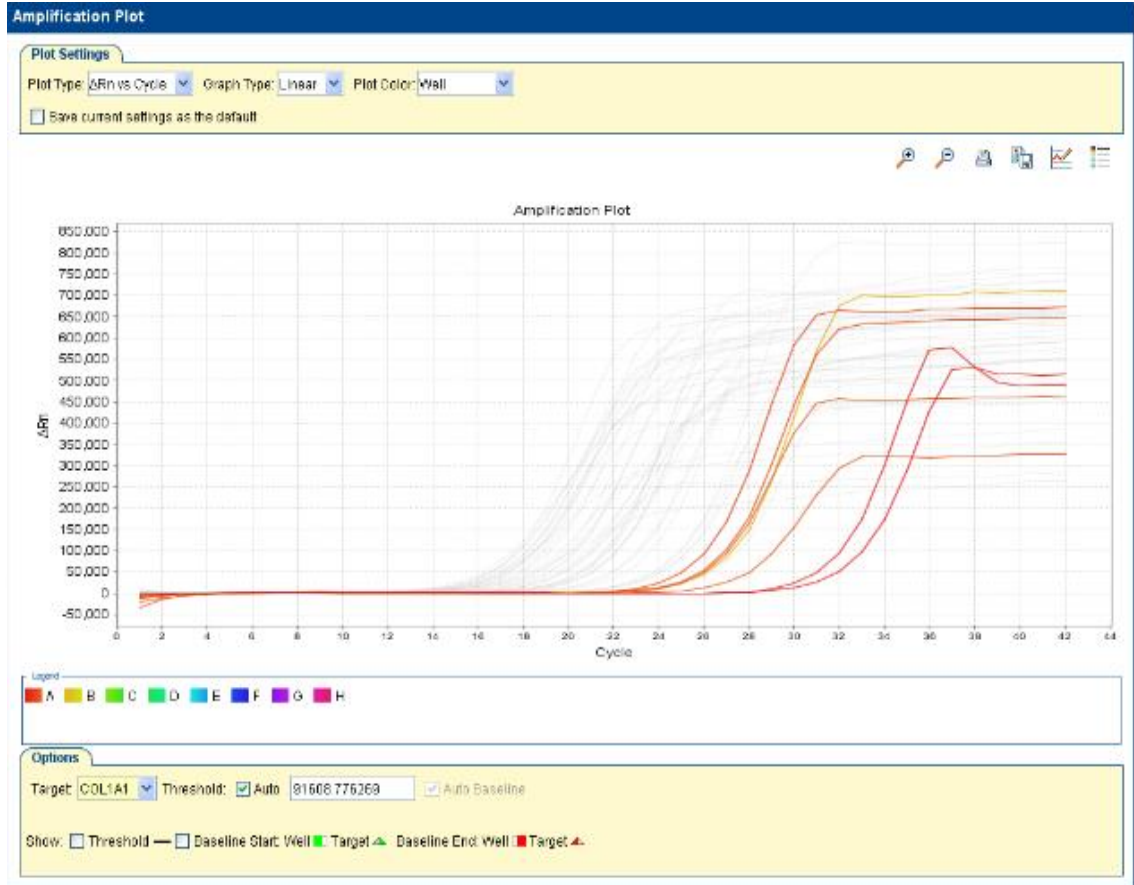


Şekil 4.2. Pterjiyumlu dokuya ait histopatolojik görüntü (H&E, X100)

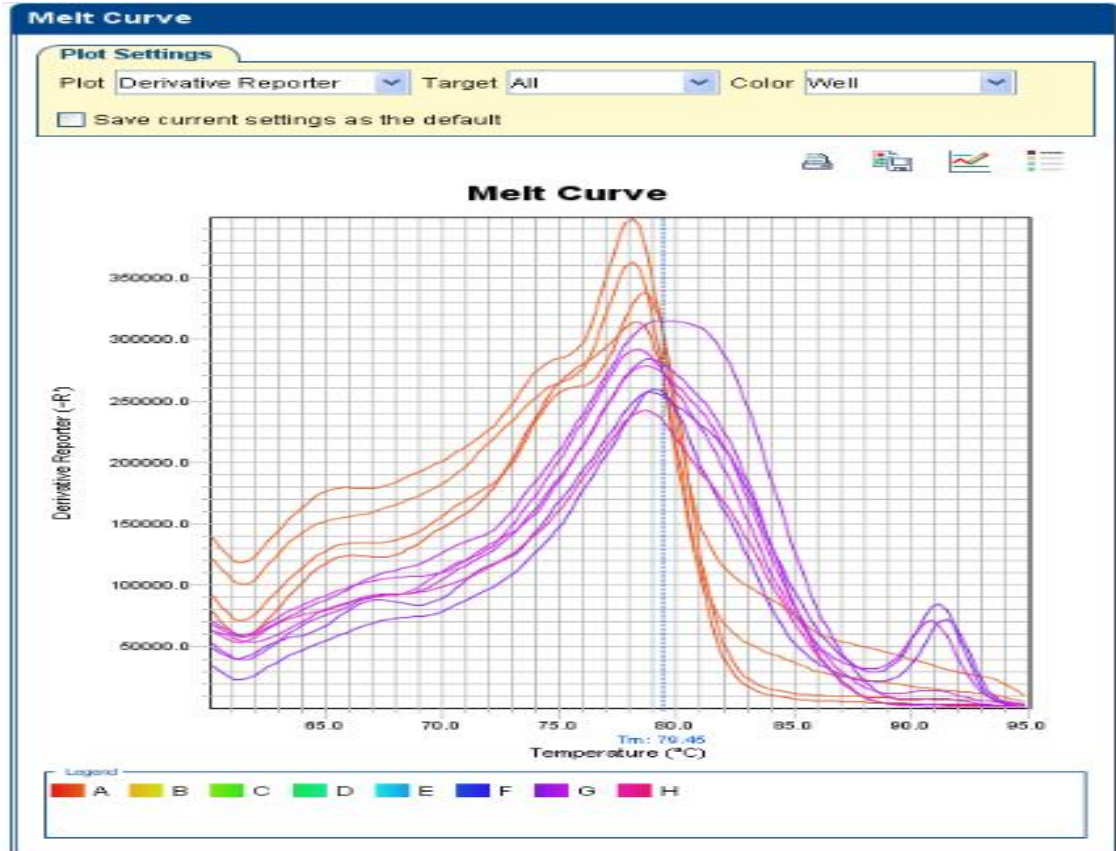
4.2. qRT- PCR Analiz Sonuçları

COL1A mRNA ekspresyon ifade düzeyini belirlemek için SYBR Green temelli kantitatif qRT-PCR tekniği kullanıldı. *COL1A1* ve referans olarak belirlenen gen (Aktin: *ACTB*) için, farklı konsantrasyonlarda cDNA (1/10:1/100:1/1000 ve 1/10000) örnekleri hazırlanarak seri dilusyon yapıldı.

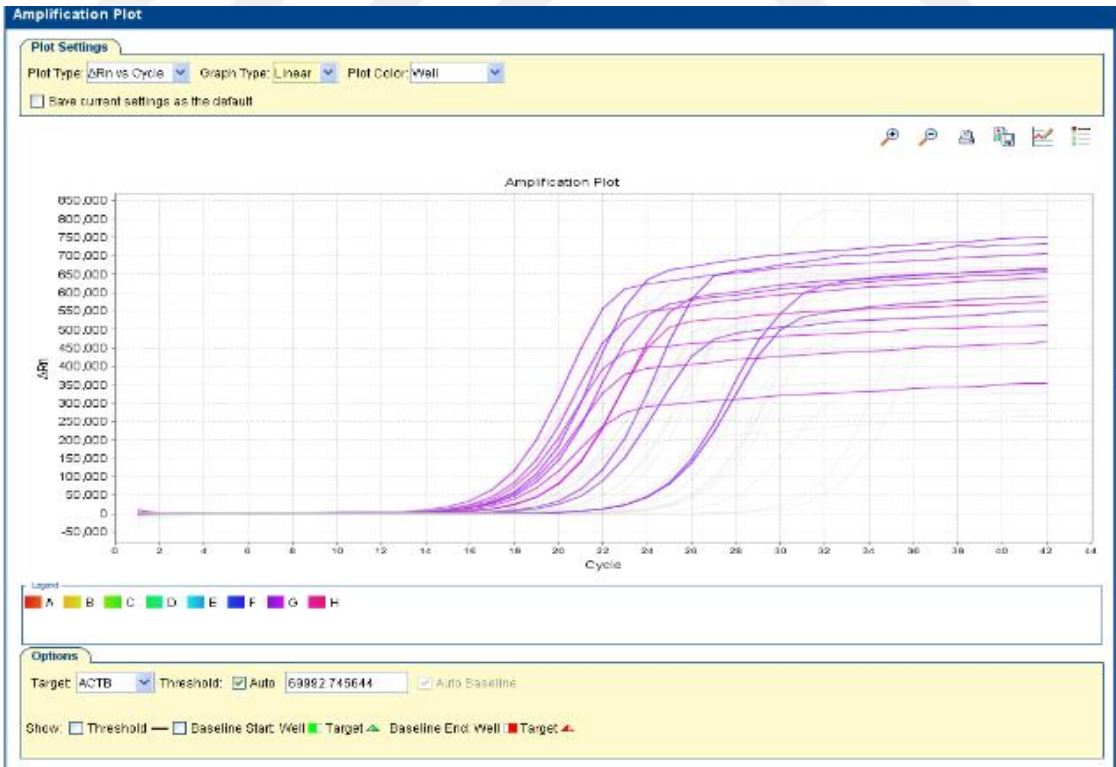
qRT-PCR sonucunda gözlemlenen *ACTB* ve *COL1A1* genine ait amplifikasyon ve erime eğrisi grafikleri Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6. de verilmiştir.



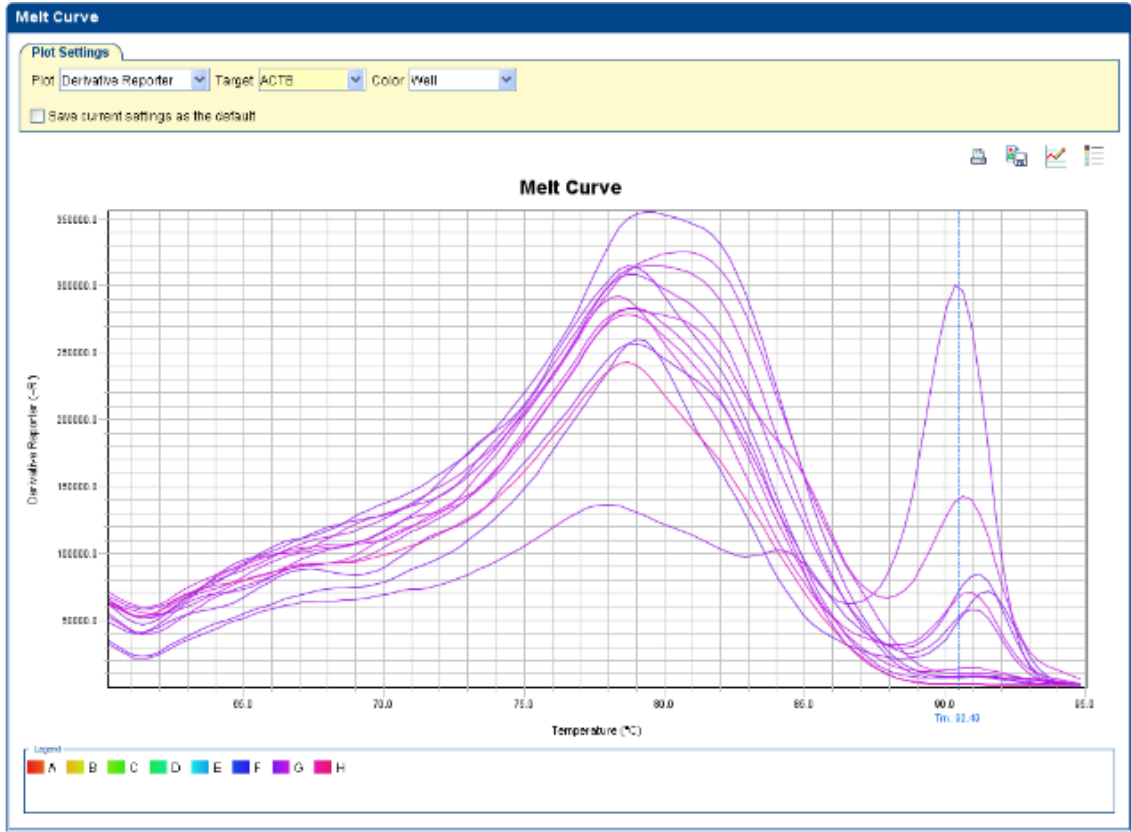
Şekil 4.3. COL1A1 genine ait amplifikasyon eğrisi



Şekil 4.4. *COL1A1* genine ait erime eğrisi



Şekil 4.5. *ACTB* genine ait amplifikasyon eğrisi



Şekil 4.6. *ACTB* genine ait erime eğrisi

4.3. COL1A1 Geni qRT-PCR Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

Kontrol konjonktiva ve pterjiyum dokularındaki *COL1A1* geninin RNA düzeyinde ifade analizi qRT-PCR kullanılarak gerçekleştirildi. *COL1A1* ve *ACTB* genlerinin qRT-PCR sonuçları step one plus software v2.3 programı ile kantifikasyonu yapıldı. *COL1A1* verileri *ACTB* geniyle normalize edilmiş olup kat değişikliğinin hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü kullanıldı. Bu işlemin sonucunda ortaya çıkan verilerle istatistiksel analiz gerçekleştirildi. 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., 2008). Çalışma gruplarının genel özellikleri

hakkında bilgi vermek amacı ile tanımlayıcı analizler yapılmıştır. Sürekli değişkenlere ait veriler ortalama±standart sapma şeklinde; kategorik değişkenlere ilişkin veriler ise n (%) şeklinde verilmektedir. Nicel değişkenlerin gruplar arasındaki ortalamalarını karşılaştırırken İki Ortalama Arasındaki Farkın Önemlilik testi ve Tek Yönlü Varyans Analizinden yararlanılmaktadır. Nitel değişkenler arasındaki ilişki olup olmadığını değerlendirmek için çapraz tablolardan ve ki-kare testlerinden yararlanılmaktadır. p değerleri 0.05'den küçük hesaplandığında istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Hesaplamalarda hazır istatistik yazılımı kullanılmıştır (SPSS 22.0 Chicago, IL, USA).

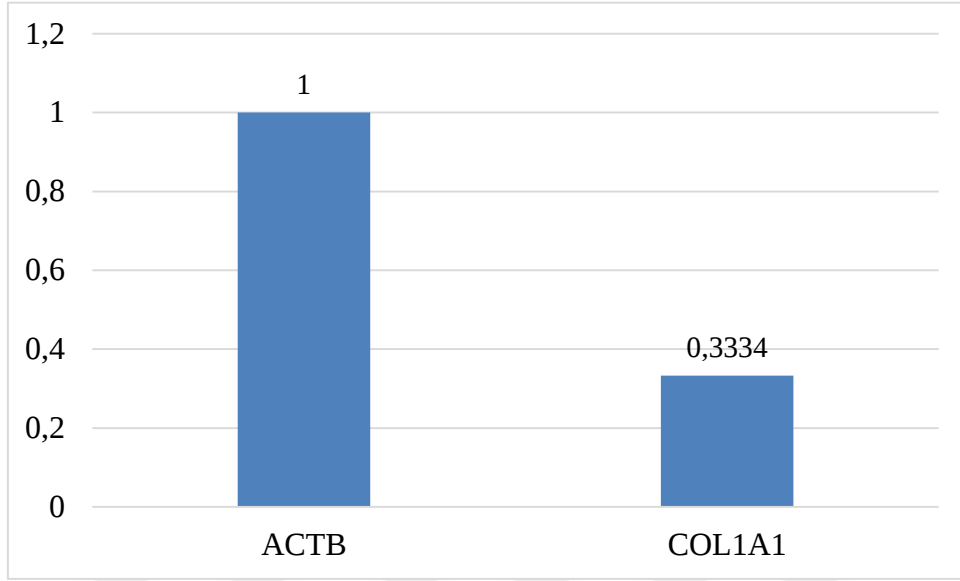
4.4. Analiz Sonuçları

Tablo 4.1. Konjonktiva ve pterjiyum dokularındaki *COL1A1* geni değerlerinin istatistiksel analizi

GEN	Pterjiyum Dokusu (n=27)	Konjonktiva Dokusu (n=27)
<i>COL1A1</i> ORT ± SH	0,333±0,321	
p	0,330	

qRT-PCR analiz sonuçlarına göre, pterjiyum dokusunda *COL1A1* geninin ifade düzeyi, normal konjonktiva dokusu ile karşılaştırıldığında, pterjiyum dokusunda *COL1A1* gen ekspresyonunun normal konjonktiva dokusuna kıyasla artmış olduğu (0,333±0,321 kat değişikliği, p=0,330), fakat bu artışın yapılan hesaplamalar ve istatistiksel değerlendirmenin sonucunda anlamlı olmadığı bulunmuştur (p>0,05).

Tablo 4.2. *COL1A1* ve *ACTB* genlerinin ortalama $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

En sık görülen oküler yüzey hastalıklarından biri olan pterijyum, kornea yüzeyine uzanan fibrovasküler konjonktiva dokusunun invaziv büyümesi ve görme keskinliğinde azalmaya yol açması ile karakterize bir hastalıktır. Pterijyum kapsamlı bir şekilde çalışılmış olmasına rağmen, patogenezi henüz netlik kazanmamıştır ve görmeyi etkilediği durumlarda uygulanan tek tedavi yöntemi cerrahi müdahale ile pterijyum dokusunun çıkarılmasıdır ancak yeniden nüks edebilmektedir (Liu ve ark., 2017).

Epidemiyolojik çalışmalar, pterijyum etiyolojisinin ultraviyole ve toz vb.'nin neden olduğu kronik uyaranlarla ilgili olduğunu göstermektedir. Çok sayıda çalışma, büyüme faktörleri, MMP'ler ve IL'ler gibi çeşitli moleküllerin, pterijyum patolojisini oluşturan anjiyogenez, fibrozis, proliferasyon ve inflamasyon ile yakın ilişkisi olduğuna dair kanıtlar sunmaktadır. (Feng ve ark., 2017; Liu ve ark., 2017). Yakın zamana kadar, pterijyum, esas olarak subepitelyal dokuyu içeren dejeneratif bir hastalık olarak kabul edilmiştir (Pelit ve ark., 2009). Ancak korneal invazyon, hücresel proliferasyon, ameliyat sonrası nüks ve antiapoptozis gibi özellikler göstermesi pterijyumun premalignant özellikte bir doku olabileceğini düşündürmektedir (Chen ve ark., 2006).

Pterijyum patogenezinin ilişkin mevcut kanıtlar arasında ECM modülasyonu da bulunmaktadır (Kim ve ark., 2013). ECM, hücreler arası bileşen olmaktan ziyade, hücre-hücre iletişiminden, hücre adezyonundan ve hücre proliferasyonundan da sorumludur (Walker ve ark., 2018). ECM; Kollajenler, proteoglikanlar, glikosaminoglikanlar, elastin, fibronektin, lamininler ve diğer birkaç glikoproteinden oluşan karmaşık, hücresel olmayan bir 3D ağ yapısına sahiptir (Ma ve ark., 2019).

Kollajenin birikmesi veya bozulmasındaki değişiklikler, ECM homeostazının kaybına yol açabilmektedir. Tümör hücreleri çoğaldıkça ECM'nin, mikro çevre ve yerleşik hücreler arasındaki etkileşiminde önemli değişiklikler gözlenmektedir. Fibronektin ve kolajen I, III ve IV'ün artan salgılanmasını içeren bu değişiklikler, tümör ilerlemesinin ECM ve tümör hücreleri arasında sürekli bir etkileşim gerektirdiğini göstermektedir. Matriks proteinlerinin artan birikimi, hücre-hücre adezyonuna, hücre polaritesine müdahale ederek ve büyüme faktörü sinyalini güçlendirerek tümörün ilerlemesini desteklemektedir. Son çalışmalar, artan kollajen çapraz bağlanma ve

birikiminin, artan integrin sinyalleşmesi yoluyla tümörün ilerlemesine yol açtığını göstermiştir. Fibriler kolajen I ve III'ün tükenmesi ise, kolajen birikimi tarafından üretilen biyomekanik kuvvetlerin, tümör ilerlemesi üzerinde hem yararlı hem de zararlı etkilere sahip olabileceğini gösteren, malign davranışı teşvik edebilmektedir (Walker ve ark., 2018).

COL1A1 ise ECM'nin önemli bir bileşenidir ve hücre dışı matriks yeniden şekillenmesi, tümör hücresi yapışması, hücre göçü ve kan damarı gelişimi gibi çoklu biyolojik süreçlerde yer almaktadır (Li ve ark., 2020). *COL1A1* polimorfizminin otoskleroz, yüksek miyopi, karaciğer fibrojenez ve osteosarkom gibi çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasıyla ilişkili olduğu bildirilmektedir. (Liu ve ark., 2018). Aynı zamanda kollajen ailesi üyeleri ile birlikte çeşitli doku tiplerinde karsinogenezde yer aldığına dair kanıtlar vardır ve kollajenlerin tümör büyümesini artıran sert bir matriks sağlamak için birçok kanserde aşırı eksprese edildiği bulunmuştur (Ma ve ark., 2019; Hao ve ark., 2019). *COL1A1* ile tümör hücresi proliferasyonu ve invazyonu arasındaki ilişki, pankreas kanseri, hepatoselüler karsinom ve mide kanseri gibi daha birçok kanserde rapor edilmiştir (An ve ark., 2020). Ayrıca *COL1A1*'in CRC metastazını desteklediği ve WNT/PCP sinyal yolundaki anahtar genleri düzenleyerek bir onkoprotein olarak rol alabileceği bulunmuştur (Hao ve ark., 2019). *COL1A1* ve *PDGFB* genlerinin yer aldığı 17 ve 22 numaralı kromozomlar arasındaki karşılıklı translokasyon, dermatofibrosarkom protuberans (DFSP) adı verilen ve tümör hücresi çoğalmasına sebep olan belirli bir cilt tümöründe sık görülmektedir. Bununla birlikte, *COL1A1*'in ECM'de birçok hastalığın progresyonunda ve kanser tiplerinin genelinde metastazında rol oynadığı tespit edilmesine rağmen (Liu ve ark., 2018) meme kanserinde *COL1A1*'in ekspresyon seviyesinde anlamlı değişiklikler bulunmamıştır (Kim ve ark., 2021). Yapılan bazı çalışmalar, *COL1A1*'in pankreas kanseri ve yıldız benzeri hücreler arasındaki glutamin aracılı etkileşime katılabildiği ve *COL1A1*'in (*siCOL1A1*) susturulmasının farelerde kolorektal tümörün ortotopik büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu bulgular, *COL1A1*'in çeşitli tümörlerin oluşumunda ve metastazında önemli bir rol oynadığını kanıtlar niteliktedir. Ancak, *COL1A1*'in malign, malign öncesi ve normal dokulardaki rolü ile akciğer karsinomundaki (LC) klinik önemi tam olarak belirlenememiştir. Geng ve ark. yaptığı bir çalışmada ise, *COL1A1*'in akciğer tümör prognostikindeki önemini ve ayrıca klinik araştırma ve immün hedefli tedavinin

temelini oluşturan *COL1A1* ile tümör bağışıklığı arasındaki potansiyel mekanizmayı ortaya koymuştur (Geng ve ark., 2021).

Pterjiyumda hücre proliferasyonu ve antiapoptozun yer alması, bu dokunun dejenerasyondan ziyade tümör benzeri bir büyüme bozukluğu sergilemesi, kanser benzeri bir hastalık olduğunu düşündürmektedir (Kim ve ark., 2013). Yapılan çalışmalar incelendiğinde *COL1A1* geninin birçok kanser türünde, hücre proliferasyonu, invazyon, metastaz ve anjiyogenez dahil olmak üzere birçok biyolojik davranışta yer aldığının rapor edilmesi *COL1A1* geninin pterjiyum patogenezinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Sun ve ark., 2018). Bu çalışmada tüm bu veriler değerlendirilerek *COL1A1* geninin pterjiyum dokusunda analizi gerçekleştirildi.

Yaptığımız çalışmada pterjiyum dokusunda *COL1A1* geninin ekspresyon seviyesi normal konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında pterjiyum dokusunda artış olduğu fakat bu artışın ($0,333 \pm 0,321$ kat değişikliği, $p=0,330$), istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. ($p>0,05$)

Pterjiyumun premalignant özellikler göstermesi, *COL1A1* geni ve diğer kollajen türlerinin ise birçok kanserde rol oynuyor olması, pterjiyum ile *COL1A1* geni arasında olası bir ilişki olabileceği ihtimalini desteklemektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda *COL1A1* geninin birçok kanserde aşırı eksprese edilirken pterjiyumda anlamlı bir artışı olmamıştır. Fakat anlamlı olmasa da bir artışın olması pterjiyum dokusu oluşumu ve gelişiminde *COL1A1* geninin rolü olabileceğini düşündürmektedir. Literatürü taradığımız kadarıyla *COL1A1* geni ile pterjiyum arasındaki ilişkinin araştırıldığı spesifik bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızın özgün nitelikte olması, diğer kollajen ailesi üyeleriyle çalışılmaması, ve görece örneklem sayısının az olması, pterjiyum ve *COL1A1* geni arasındaki ilişkinin çeşitli çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- ACKERMANN, A. M., & LEVINE, M. A. (2017). Compound heterozygous mutations in COL1A1 associated with an atypical form of type I osteogenesis imperfecta. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 173(7): 1907-1912.
- AN, Q., LIU, T., WANG, M. Y., YANG, Y. J., ZHANG, Z. D., LIN, Z. J., & YANG, B. (2020). circKRT7-miR-29a-3p-COL1A1 Axis Promotes Ovarian Cancer Cell Progression. *OncoTargets and therapy*. 13: 8963.
- BAI, H., TENG, Y., WONG, L., JHANJI, V., PANG, C. P., & YAM, G. H. F. (2010). Proliferative and migratory aptitude in pterygium. *Histochemistry and cell biology*. 134(5): 527-535.
- BORASCHI-DÍAZ, I., WANG, J., MORT, J. S., & KOMAROVA, S. V. (2017). Collagen type I as a ligand for receptor-mediated signaling. *Frontiers in Physics*. 5: 12.
- BOUDREAU, N. J., & JONES, P. L. (1999). Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochemical Journal*. 339(3): 481-488.
- BROCKER, C., THOMPSON, D., MATSUMOTO, A., NEBERT, D. W., & VASILIOU, V. (2010). Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Human genomics*. 5(1): 1-26.
- BROWN, N. H. (2011). Extracellular matrix in development: insights from mechanisms conserved between invertebrates and vertebrates. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3(12): a005082.
- CARDENAS-CANTU, E., ZAVALA, J., VALENZUELA, J., & VALDEZ-GARCÍA, J. E. (2016, November). Molecular basis of pterygium development. In *Seminars in ophthalmology* (Vol. 31, No. 6, pp. 567-583). Informa Healthcare.
- CHALKIA, A. K., SPANDIDOS, D. A., & DETORAKIS, E. T. (2013). Viral involvement in the pathogenesis and clinical features of ophthalmic pterygium. *International journal of molecular medicine*. 32(3): 539-543.
- CHEN, K. H., & HSU, W. M. (2006). Intraoperative ethanol treatment as an adjuvant therapy of pterygium excision. *International journal of biomedical science: IJBS*. 2(4): 414.
- CHEN, Y., MILOS, D. C., STEIN, W.D., ARDECKY, R.J. VE RONINSON, I.B. (2006). Agonist and Antagonist of Retinoic Acid Receptors Cause Similar Changes in Gene Expression and Induce Senescence-like Growth Arrest in MCF-7 Breast Carcinoma. *Cancer Res*. 66: (17).
- CHUI, J., DI GIROLAMO, N., WAKEFIELD, D., & CORONEO, M. T. (2008). The pathogenesis of pterygium: current concepts and their therapeutic implications. *The ocular surface*. 6(1): 24-43.

- CHUNMING, Z., MINGCHANG, Z., BANGXING, H., & JIE, Z. (2008). Expressions of NGF, TrkA and p75 in pterygium. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 6.
- COOPER, S. J., & BOWDEN, G. T. (2007). Ultraviolet B regulation of transcription factor families: Roles of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and activator protein-1 (AP-1) in UVB-induced skin carcinogenesis. *Current cancer drug targets*. 7(4): 325-334.
- COX, T. R., & ERLER, J. T. (2011). Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Disease models & mechanisms*. 4(2): 165-178.
- CUI, Y. H., LI, H. Y., GAO, Z. X., LIANG, N., MA, S. S., MENG, F. J., ... & PAN, H. W. (2016). Regulation of Apoptosis by miR-122 in Pterygium via Targeting Bcl-w. *Investigative ophthalmology & visual science*. 57(8): 3723-3730.
- DAS, P., GOKANI, A., BAGCHI, K., BHADURI, G., CHAUDHURI, S., & LAW, S. (2015). Limbal epithelial stem-microenvironmental alteration leads to pterygium development. *Molecular and cellular biochemistry*. 402(1): 123-139.
- DÌ GIROLAMO, N., CHUI, J., CORONEO, M. T., & WAKEFIELD, D. (2004). Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Progress in retinal and eye research*. 23(2): 195-228.
- DOGAN, A. S., ONDER, E., ARİKOK, A. T., BİCER, T., & GURDAL, C. (2016). Claudin-1 expressions decrease in pterygium with respect to normal conjunctiva. *Cutaneous and ocular toxicology*. 35(4): 315-318.
- DROUTSAS, K., & SEKUNDO, W. (2010). Epidemiologie des pterygiums. *Der Ophthalmologe*. 107(6): 511-516.
- ENGELSVOLD, D. H., UTHEİM, T. P., OLSTAD, O. K., GONZALEZ, P., EİDET, J. R., LYBERG, T., ... & RAEDER, S. (2013). miRNA and mRNA expression profiling identifies members of the miR-200 family as potential regulators of epithelial-mesenchymal transition in pterygium. *Experimental eye research*. 115: 189-198.
- ENGLER, A. J., SEN, S., SWEENEY, H. L., & DİSCHER, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 126(4): 677-689.
- ESEN, E. (2005). Farklı pterjiyum cerrahi tekniklerinde görülen nüks oranları. (Yayınlanmış Tıpta Uzmanlık Tezi). Adana: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- FENG, Q. Y., HU, Z. X., SONG, X. L., & 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.
- FRANTZ, C., STEWART, K. M., & WEAVER, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science*. 123(24): 4195-4200.

- GENG, Q., SHEN, Z., Lİ, L., & ZHAO, J. (2021). COL1A1 is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in lung cancer. *PeerJ*. 9: e11145.
- GHOZ, N., BRİTTON, J., ROSS, A. R., MOHAMMED, I., HOGAN, E., SAİD, D. G., & DUA, H. S. (2019). Management of primary pterygium with intra-lesional injection of 5 fluorouracil and bevacizumab (Avastin). *Eye*. 33(11): 1776-1783.
- GOLU, T., MOGOANTA, L., STREBA, C. T., PİRİCİ, D. N., MALAESCU, D., MATEESCU, G. O., & MUTIU, G. (2011). PTERYGIUM: histological and immunohistochemical aspects. *Rom J Morphol Embryol*. 52(1): 153-8.
- GUMBİNER, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*. 84(3): 345-357.
- GUMUS, E., & YASAR, I. (2013). The Effects of Job on the Development of pterygium/Pterjium olusmasinda meslegin etkileri. *Turkish Journal of Ophthalmology*. 43(4): 245-250.
- GÜNEL T.,(2007). Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”, Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007. 27: 763-767
- HAMED-AZZAM, S., EDİSON, N., BRİSCOE, D., MUKARİ, A., & ELMALAH, I. (2016). Identification of human papillomavirus in pterygium. *Acta ophthalmologica*. 94(3): e195-e197.
- HANAHAN, D., & FOLKMAN, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *cell*. 86(3): 353-364.
- HANBAZAZH, M., & GYURE, K. A. (2018). Ocular human papillomavirus infections. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 142(6): 706-710.
- HAO, S., LV, J., YANG, Q., WANG, A., Lİ, Z., GUO, Y., & ZHANG, G. (2019). Identification of key genes and circular RNAs in human gastric cancer. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 25: 2488.
- HİLL, J. C., & MASKE, R. (1989). Pathogenesis of pterygium. *Eye*, 3(2), 218-226.
- JANSON, B. J., & SİKDER, S. (2014). Surgical management of pterygium. *The ocular surface*. 12(2): 112-119.
- KADLER, K. E., BALDOCK, C., BELLA, J., & BOOT-HANDFORD, R. P. (2007). Collagens at a glance. *Journal of cell science*. 120(12): 1955-1958.
- KASE, S., TAKAHASHİ, S., SATO, I., NAKANİSHİ, K., YOSHİDA, K., & OHNO, S. (2007). Expression of p27 (KIP1) and cyclin D1, and cell proliferation in human pterygium. *British journal of ophthalmology*. 91(7): 958-961.

- KİM, K. W., PARK, S. H., WEE, S. W., & KİM, J. C. (2013). Overexpression of angiogenin in pterygium body fibroblasts and its association with proliferative potency. *Investigative ophthalmology & visual science*. 54(9): 6355-6362.
- KİM, Y. J. (2021). RhoBTB3 Regulates Proliferation and Invasion of Breast Cancer Cells via Col1A1.
- KOCAMIŞ, Ö. (2005). Primer pterijum cerrahi tedavisinde serbest konjonktival otogreft.(Yayınlanmış Uzmanlık Tezi).İstanbul:Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi
- KUBULAY, B.,(2016). Deneysel Yangı Oluşturulmuş Gökkuşağı Alabalıklarında (Oncorhynchus mykiss WALBAUM, 1792) Timolün Apoptoz Üzerine Etkilerinin Araştırılması (Yüksek Lisans Tezi).
- LARUE, L., & BELLACOSA, A. (2005). Epithelial–mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*. 24(50): 7443-7454.
- Lİ, M., WANG, J., WANG, C., XİA, L., XU, J., XİE, X., & LU, W. (2020).Microenvironment remodeled by tumor and stromal cells elevates fibroblast-derived COL1A1 and facilitates ovarian cancer metastasis. *Experimental Cell Research*. 394(1): 112153.
- LİN, Y. H., SUN, C. C., YEUNG, L., YU, Y. W., SUN, M. H., & CHEN, K. J. (2019). Epidemiologic study of pterygium in Taiwan. *Japanese journal of ophthalmology*. 63(4): 297-303.
- LİNG, S., LIANG, L., LİN, H., Lİ, W., & XU, J. (2012). Increasing lymphatic microvessel density in primary pterygia. *Archives of ophthalmology*. 130(6): 735-742.
- LİU Y, XU H, AN M. (2017). mTORC1 regulates apoptosis and cell proliferation in pterygium via targeting autophagy and FGFR3. *Sci Rep*. 7(1): 7339.
- LİU, J., DİNG, X., YUAN, L., & ZHANG, X. (2017). Identification of pterygium-related mRNA expression profiling by microarray analysis. *Eye*. 31(12): 1733-1739.
- LİU, J., SHEN, J. X., WU, H. T., Lİ, X. L., WEN, X. F., DU, C. W., & ZHANG, G. J. (2018). Collagen 1A1 (COL1A1) promotes metastasis of breast cancer and is a potential therapeutic target. *Discovery medicine*. 25(139): 211-223.
- LİU, S., LİAO, G., & Lİ, G. (2017). Regulatory effects of COL1A1 on apoptosis induced by radiation in cervical cancer cells. *Cancer cell international*. 17(1): 1-9.
- LİU, T., LİU, Y., XİE, L., HE, X., & BAI, J. (2013). Progress in the pathogenesis of pterygium. *Current Eye Research*. 38(12): 1191-1197.

- LU, P., WEAVER, V. M., & WERB, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *Journal of cell biology*. 196(4): 395-406.
- LU, Y., ZHANG, S., WANG, Y., REN, X., & HAN, J. (2019). Molecular mechanisms and clinical manifestations of rare genetic disorders associated with type I collagen. *Intractable & rare diseases research*. 8(2): 98-107.
- MA, H. P., CHANG, H. L., BAMODU, O. A., YADAV, V. K., HUANG, T. Y., WU, A. T., ... & LEE, W. H. (2019). Collagen 1A1 (COL1A1) is a reliable biomarker and putative therapeutic target for hepatocellular carcinogenesis and metastasis. *Cancers*. 11(6): 786.
- MESHKANİ, S. E., KOOSHAN, N., MOGHADAM, A. B., FALANJİ, F., ADLİ, A., BAGHBANİ-ARANİ, F., ... & RAD, A. (2019). Signaling roadmap to epithelial–mesenchymal transition in pterygium, TWIST1 centralized. *Journal of cellular physiology*. 234(10): 18146-18155.
- ÖZER, M. A. Pterijum cerrahisinde konjonktiva-limbal otogreft uygulamasına bağlı nüks ve komplikasyon oranları. *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi*. 2(1): 13-21.
- PEİRETTİ, E., DESSÌ, S., MULAS, M. F., ABETE, C., GALANTUOMO, M. S., & FOSSARELLO, M. (2006). Fibroblasts isolated from human pterygia exhibit altered lipid metabolism characteristics. *Experimental eye research*. 83(3): 536-542.
- PELİT, A., BAL, N., AKOVA, Y. A., & DEMİRHAN, B. (2009). p53 expression in pterygium in two climatic regions in Turkey. *Indian journal of ophthalmology*. 57(3): 203.
- PENG, M. L., TSAİ, Y. Y., TUNG, J. N., CHİANG, C. C., HUANG, Y. C., LEE, H., & CHENG, Y. W. (2014). Vascular endothelial growth factor gene polymorphism and protein expression in the pathogenesis of pterygium. *British Journal of Ophthalmology*. 98(4): 556-561.
- PÉREZ-RICO, C., PASCUAL, G., SOTOMAYOR, S., MONTES-MOLLÓN, M. Á., TREJO, C., SASAKİ, T., ... & BUJÁN, J. (2011). Tropoelastin and fibulin overexpression in the subepithelial connective tissue of human pterygium. *American journal of ophthalmology*. 151(1): 44-52.
- RAMALHO, F. S., MAESTRİ, C., RAMALHO, L. N., RIBEIRO-SILVA, A., & ROMÃO, E. (2006). Expression of p63 and p16 in primary and recurrent pterygia. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 244(10): 1310-1314.
- RAMÍREZ, C. A., PÉREZ-MARTINOT, M., GIL-HUAYANAY, D., URRUNAGA-PASTOR, D., & BENÍTES-ZAPATA, V. A. (2018). Ocular exposure to particulate matter and development of pterygium: A case-control study. *The international journal of occupational and environmental medicine*. 9(4): 163.

- RİAU, A. K., WONG, T. T., FİNGER, S. N., CHAURASİA, S. S., HOU, A. H., CHEN, S., ... & TONG, L. (2011). Aberrant DNA methylation of matrix remodeling and cell adhesion related genes in pterygium. *PloS one*. 6(2): e14687.
- RİCARD-BLUM, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3(1): a004978.
- SARKAR, P. &. (2020). Pterygium. *StatPearls [Internet]* .
- SCHMİTTGEN, T. D., & LİVAK, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*. 3(6): 1101-1108.
- SEBASTİÁ, R., VENTURA, M. P., SOLARİ, H. P., ANTECKA, E., ORELLANA, M. E., & BURNİER, M. N. (2013). Immunohistochemical detection of Hsp90 and Ki-67 in pterygium. *Diagnostic pathology*. 8(1): 1-7.
- SEL, S. K., & KASAP, H. (2011). Osteoporoz ve ilişkili genler: vdr, esr ve colla1. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 20(4): 246-269.
- SHAHRAKİ, T., ARABİ, A., & FEİZİ, S. (2021). Pterygium: an update on pathophysiology, clinical features, and management. *Therapeutic Advances in Ophthalmology*. 13: 25158414211020152.
- SHİ, Y., DUAN, Z., ZHANG, X., ZHANG, X., WANG, G., & Lİ, F. (2019). Down-regulation of the let-7i facilitates gastric cancer invasion and metastasis by targeting COL1A1. *Protein & cell*. 10(2): 143-148.
- SHİBATA, N., SHİDA, H., KİYOKAWA, E., SİNGH, D. P., SASAKİ, H., & KUBO, E. (2020). Relative gene expression analysis of human pterygium tissues and UV radiation-evoked gene expression patterns in corneal and conjunctival cells. *Experimental Eye Research*. 199: 108194.
- SHİMMURA, S., SHİİOKA, M., HANADA, K., SHİMAZAKİ, J., & TSUBOTA, K. (2000). Telomerase activity and p53 expression in pterygia. *Investigative ophthalmology & visual science*. 41(6): 1364-1369.
- SHİROMA, H., HİGA, A., SAWAGUCHİ, S., IWASE, A., TOMİDOKORO, A., AMANO, S., & ARAİE, M. (2009). Prevalence and risk factors of pterygium in a southwestern island of Japan: the Kumejima Study. *American journal of ophthalmology*. 148(5): 766-771.
- SHOULDER, M. D., & RAİNES, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry*. 78: 929-958.
- SİNGH, B., FLEURY, C., JALALVAND, F., & RİESBECK, K. (2012). Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. *FEMS microbiology reviews*. 36(6): 1122-1180.
- SİNGH, S. K. (2017). Pterygium: epidemiology prevention and treatment. *Community eye health*. 30(99): S5.

- SONG, P., CHANG, X., WANG, M., & AN, L. (2017). Variations of pterygium prevalence by age, gender and geographic characteristics in China: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 12(3): e0174587.
- SUN, S., WANG, Y., WU, Y., GAO, Y., LI, Q., ABDULRAHMAN, A. A., ... & GAO, D. S. (2018). Identification of COL1A1 as an invasion-related gene in malignant astrocytoma. *International journal of oncology*. 53(6): 2542-2554.
- TAN, D. T., TANG, W. Y., LIU, Y. P., GOH, H. S., & SMITH, D. R. (2000). Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium. *British Journal of Ophthalmology*. 84(2): 212-216.
- THEOCHARIS, A. D., SKANDALIS, S. S., GIALELI, C., & KARAMANOS, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Advanced drug delivery reviews*. 97: 4-27.
- TONG, L., LAN, W., LIM, R. R., & CHAURASIA, S. S. (2014). S100A proteins as molecular targets in the ocular surface inflammatory diseases. *The ocular surface*. 12(1): 23-31.
- TUNG, J. N., CHIANG, C. C., TSAI, Y. Y., CHOU, Y. Y., YEH, K. T., LEE, H., & CHENG, Y. W. (2010). CyclinD1 protein expressed in pterygia is associated with β -catenin protein localization. *Molecular vision*. 16: 2733.
- TURAL, Ş., KARA, N., & ALAYLI, G. (2011). Osteoporoz Genetiği. *Turkish Journal of Osteoporosis/Turk Osteoporoz Dergisi*. 17(3).
- VALADARES, E. R., CARNEIRO, T. B., SANTOS, P. M., OLIVEIRA, A. C., & ZABEL, B. (2014). What is new in genetics and osteogenesis imperfecta classification?. *Jornal de pediatria*. 90: 536-541.
- VAN DER REST, M., & GARRONE, R. (1991). Collagen family of proteins. *The FASEB journal*. 5(13): 2814-2823.
- WALKER, C., MOJARES, E., & DEL RÍO HERNÁNDEZ, A. (2018). Role of extracellular matrix in development and cancer progression. *International journal of molecular sciences*. 19(10): 3028.
- WANG, Q., & YU, J. (2018). MiR-129-5p suppresses gastric cancer cell invasion and proliferation by inhibiting COL1A1. *Biochemistry and Cell Biology*. 96(1): 19-25.
- WANZELER, A. C. V., BARBOSA, I. A. F., DUARTE, B., BORGES, D., BARBOSA, E. B., KAMIJÍ, D., ... & ALVES, M. (2019). Mechanisms and biomarker candidates in pterygium development. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*. 82: 528-536.
- WLASCHEK, M., TANTCHEVA-POÓR, I., NADERI, L., MA, W., SCHNEIDER, L. A., RAZI-WOLF, Z., ... & SCHARFFETTER-KOCHANKE, K. (2001). Solar

- UV irradiation and dermal photoaging. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 63(1-3): 41-51.
- YONG, V. W., FORSYTH, P. A., BELL, R., KREKOSKI, C. A., & EDWARDS, D. R. (1998). Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends in neurosciences*. 21(2): 75-80.
- YUE, X. L., & GAO, Z. Q. (2019). Identification of pathogenic genes of pterygium based on the gene expression omnibus database. *International journal of ophthalmology*. 12(4): 529.
- YUZHALLIN, A. E., LIM, S. Y., KUTIKHIN, A. G., & GORDON-WEEKS, A. N. (2018). Dynamic matrisome: ECM remodeling factors licensing cancer progression and metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 1870(2): 207-228.
- ZEISBERG, M., & KALLURI, R. (2004). The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *Journal of Molecular Medicine*. 82(3): 175-181.
- ZHANG, J., XIANG, J., WU, D., DAI, Y., & XU, J. (2019). Shared gene signature between pterygium and meibomian gland dysfunction uncovered through gene-expression meta-analysis. *Annals of human genetics*. 83(6): 397-404.
- ZHANG, M., LIU, Z., & XIE, Y. (2000). The study on the expression of keratin proteins in pterygial epithelium. *Yan ke xue bao (2016)*. 16(1): 48-52.
- ZHANG, Z., FANG, C., WANG, Y., ZHANG, J., YU, J., ZHANG, Y., ... & ZHONG, J. (2018). COL1A1: A potential therapeutic target for colorectal cancer expressing wild-type or mutant KRAS. *International journal of oncology*. 53(5): 1869-1880.
- ZHANG, Z., WANG, Y., ZHANG, J., ZHONG, J., & YANG, R. (2018). COL1A1 promotes metastasis in colorectal cancer by regulating the WNT/PCP pathway. *Molecular Medicine Reports*. 17(4): 5037-5042.
- ZHU G.G., RISTELI L., MÄKINEN M., RISTELI J., KAUPPIA A., AND STENBÄCK F. (1995). Immunohistochemical study of type I collagen and type I pN-collagen in benign and malignant ovarian neoplasms. *Cancer*. 75(4): 1010–1017.
- ZHOU, W. P., ZHU, Y. F., ZHANG, B., QIU, W. Y., & YAO, Y. F. (2016). The role of ultraviolet radiation in the pathogenesis of pterygia. *Molecular medicine reports*. 14(1): 3-15.

<https://medlineplus.gov/genetics/gene/col1a1>, (02.10.2021).

<https://stringfixer.com/tr/COL1A1>, (09.09.2021).

<https://tr1lib.org/ireader/5594562>, (15.09.2021).

<https://www.medindia.net/patientinfo/pterygium.htm>, (02.10.2021).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1277>, (03.10.2021).

<https://www.slideshare.net/Anjalihiroli87/pterygium-and-its-management>, (24.09.2021).

<https://www.uniprot.org/uniprot/P02452>, (26.09.2021).



