

T.C.

MERSİN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**PRİMER PTERJİUM HASTALARINDA DOKU MİKRO
RNA DÜZEYLERİNİN KATARAKTLI OLGULARDA
KONJONKTİVA DOKU MİKRO RNA DÜZEYLERİ İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

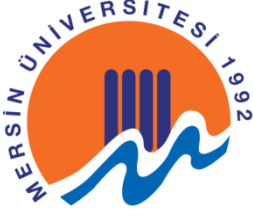
Dr. GÖKHAN İÇME

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. AYÇA YILMAZ

MERSİN – 2016



T.C.

MERSİN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**PRİMER PTERJİUM HASTALARINDA DOKU MİKRO
RNA DÜZEYLERİNİN KATARAKTLI OLGULARDA
KONJONKTİVA DOKU MİKRO RNA DÜZEYLERİ İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. GÖKHAN İÇME

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. AYÇA YILMAZ

MERSİN – 2016

TEŐEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım çok değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Atila ARGİN, Prof. Dr. Özlem YILDIRIM, Prof. Dr. Ufuk ADIGÜZEL, Doç. Dr. Ayőe Ayça SARI ve Yrd. Doç. Dr. Erdem DİNÇ'e teőekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tezimin oluşumu, yapımı ve yazımı aşamasında yanımda olan; değerli zamanından fedakarlık etmekten kaçınmayan, eğitimimin her safhasında büyük katkıları olan tez hocam sayın Prof. Dr. Ayça YILMAZ' a,

Biyokimya Anabilim Dalından sayın Prof. Dr. Lülüfer TAMER ve Arő. Gör. Dr. Ayőegül GÖRÜR'e

Dört yıl boyunca sevgi, saygı ve anlayışı paylaőtığım asistan arkadaşlarıma, klinik hemőirelerimize ve personeline teőekkür eder, saygılarımı sunarım.

Hayatımın hiçbir döneminde beni yalnız bırakmayan, bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan sevgili aileme tüm kalbimle ve içtenlikle minnet ve sevgilerimi sunarım.

Dr. Gökhan İÇME

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	7
GİRİŞ VE AMAÇ	9
GENEL BİLGİLER	11
Konjonktiva Anatomi ve Fizyolojisi	11
Korneanın Anatomi ve Fizyolojisi	13
Korneanın Fonksiyonları	16
Skleranın Anatomi ve Fizyolojisi	17
Limbus Anatomi ve Fizyolojisi	18
Pterjium Tanımı	18
Epidemiyoloji	19
Etyopatogenezi	19
Histopatoloji	21
Pterjium Kliniği	22
Klinik Sınıflama	22
Pterjium Tedavisi	25
MikroRNA Oluşumu	29
MikroRNA Fonksiyonları	30
GEREÇ VE YÖNTEMLER	32
BULGULAR	41
TARTIŞMA	44
SONUÇ VE ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	49
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	62
ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ	63
TABLolar DİZİNİ	64

ÖZET

Pterijum, dejeneratif bulber konjonktiva dokusunun limbus üzerinden korneaya doğru üçgen şeklinde fibrovasküler epitel altı büyüme yapmasıdır. Yüzyıllardır pterijum etiyojisi, patogenezi ve tedavisi konusunda göz hekimleri arasında tartışmalar süregelmiş ve günümüzde halen bu konularda kesin bir sonuca ve fikir birliğine varılamamıştır. Etiyojisi hala tam olarak bilinmemekle birlikte, son yıllarda daha çok ultraviyole(UV) ışınına bağlı limbal kök hücre değişiklikleri üzerinde durulmaktadır. Özellikle insan gözü tarafından algılanmayan ultraviyole B'ye kronik maruziyetin limbal epitelyal kök hücrelerde genetik travmaya neden olduğu düşünülmektedir. UV ışınlarına uzamış maruziyetin konjonktiva dokusunda proinflamatuvar sitokinlerin oluşumunu indüklediği bildirilmiştir. oluşan bu sitokinlerin damar oluşumu, hücre çoğalması, doku invazyonu ve inflamasyonu başlatarak pterijum gelişimine neden olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca UV radyasyon, P53 gibi tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlara neden olarak pterijum epitelinde anormal ekspresyona yol açabilir.

Son yıllarda insan vücudunda mikroRNA olarak adlandırılan küçük moleküller tespit edilmiş ve başta onkolojik hastalıklar olmak üzere çeşitli hastalıklarda serum ve doku düzeyindeki seviyelerinde değişiklikler saptanmıştır. Aynı zamanda bazı mikroRNA subtiplerinin anjiogenez ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buradan yola çıkarak pterijum fizyopatolojisinde bu moleküllerin rol oynadığı düşünülebilir.

Literature bakıldığında göz dokularında miRNA çalışmaları yapılmış olup miRNA 184 retina, kornea ve lenste, miRNA-182, 183 ve 205 kornea ve limbus epitelinde saptanmıştır. miRNA-126 ve miRNA -221'in anjiogenez ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu bilgilerden yola çıkarak pterijum hastalığının patogenezinde suçlanan limbal kök hücrelerdeki değişim ile miRNA arasındaki ilişkiyi sorgulamayı ve hastalığın patogenezinde ayrı bir bakış açısı getirmeyi planladık.

MikroRNA ile primer pterijum ilişkisini araştırma amacıyla, Ocak 2014-Ocak 2016 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniğine başvuran ve primer pterijum tanısı alan toplam 24 hasta çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubu ise primer pterijum tanısı olmayan 24 katarakt hastasından

oluşturuldu. Bu olgulardan alınan konjonktiva doku örneklerinde miRNA-126,182,183,184,221 ve 205 ekspresyon düzeyleri hasta ve kontrol grubunda karşılaştırıldı. miRNA-182,183,184 ekspresyon miktarının hasta grubunda anlamlı düzeyde artmış olduğu, miRNA-221 ekspresyon miktarının ise hasta grubunda anlamlı düzeyde azalmış olduğu saptandı.

Elde ettiğimiz sonuçlar, hastalığın patofizyolojisinde bu moleküllerin etkin olabileceğini gösterebilir. Aynı zamanda daha fazla hastanın katılımıyla yapılacak çok merkezli çalışmalar bu moleküller ile hastalık arasındaki ilişkiyi daha anlaşılır ve net bir şekilde ortaya koyabilir.

Anahtar Kelimeler: MikroRNA, primer pterjum,anjyogenez

ABSTRACT

Comparing the tissue miRNA levels of patients who have primary pterygium with the tissue miRNA levels of patients who have cataract

For centuries etiology, pathogenesis, and management of pterygium have been continually debated among ophthalmologists, and even today a definitive conclusion, and consensus on these issues could not be reached. Although its etiology is still not known completely, in recent years alterations in limbal root cells secondary to exposure to ultraviolet light have been increasingly emphasized. In our country, epidemiologic studies related to eye diseases, encompassing predetermined regions or whole population are lacking or in inadequately scarce numbers.

Small molecules called microRNAs have been identified in the human body in recent years, and changes in their serum and tissue levels has been determined in various diseases including especially oncological diseases. Also, some microRNAs subtypes have been shown to be associated with angiogenesis. Starting from this point, it can be thought that these molecules may have a role in pterygium pathophysiology

Considering the literature, miRNA studies were made in the eye tissues and it was reported that miRNA 184 was in retina, cornea and lens, miRNA-182, 183,184 and 205 was in cornea and limbus,epithelium. miRNA-126 and miRNA -221 has been shown to be associated with angiogenesis. In the light of this information, we aimed to examine the relationship between miRNA and the accused changed limbal stem cells in the pathogenesis of pterygium disease and to bring a new perspective to the disease pathogenesis.

In order to investigate the relationship of microRNAs with primary pterygium, 24 patients admitted to Mersin University Medical School Department of Ophthalmology and diagnosed as with primary pterygium January 2014- January 2016 were included in the study. Control group consisted of 24 patients with no primary pterygium. In the conjunctival tissue samples collected from these cases, miRNA-126,182,183,184,221 and 205 expression levels were compared in patient and control groups. It was detected that miRNA-182,183,184 expression levels

significantly increased in the patient group, and miRNA-221 expression level significantly decreased in the patient group.

Our results may show that these molecules might be effective in the pathophysiology of the disease. Also, multicenter studies conducted with the participation of more patients may demonstrate the relationship between these molecules and disease more clearly and transparently.

Keywords: MicroRNA, Primary pterygium , Angiogenesis



GİRİŞ VE AMAÇ

Pterijyum, patogenezinde özellikle UV-B ışınlarına maruziyet sonucu p53 gen değişikliği ile oluşan, korneaskleral limbal kök hücre yetmezliği ile ilgili sık görülen bir okuler yüzey hastalığıdır.¹ Özellikle güneş ışınlarına maruziyet varlığında oldukça sık görülmektedir. Patogenezini ile ilgili bir çok hipotez ortaya atılsa da, en çok suçlanan teori UV-B maruziyeti sonucu limbal epitelyal hücrelerin korneaya invazyonudur. Bu invazyonda limbal epitelyal hücreler tarafından salgılanan metalloproteinaz enzimlerinin (MMP) de rolü olduğu öne sürülmektedir.² Korneaskleral limbus, kornea ve konjonktiva arasında bir bariyer görevi üstlenen ve histolojik olarak kök hücrelere sahip anatomik bir bölgedir. Bu bölgedeki hücre yetmezlikleri pingekula, pterijyum gibi kornea yüzey dejeneratif hastalıkları ve limbal tümörler gibi hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır.³

MikroRNA'lar (miRNA'lar-mirna), yaklaşık 21–23 nükleotid uzunluğunda, tek iplikli kısa RNA molekül türleri olup dokular arasında farklı şekilde eksprese oldukları ve kan dolaşımında saptanabildikleri gösterilmiştir. Aynı zamanda tek bir miRNA'nın farklı fonksiyonları olan yaklaşık 200 hedef gene bağlandığı saptanmıştır. Bu nedenle tek bir miRNA hücrenin yüzlerce fonksiyonunu etkileyebilmektedir. Bu moleküllerin fonksiyonları arasında, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, metabolik regülasyon, hafıza ve sinaptik gelişim, embriyogenez, organogenez, farklılaşma ve büyüme kontrolü, angiogenez, tümörögenез yer almaktadır. Tüm bu fonksiyonlardan yola çıkarak miRNA'ların birçok hastalık ile bağlantılı olması sürpriz değildir. Bu moleküller hücrelerin normal fonksiyonlarında görev aldıkları için meydana gelen miRNA kusurlarında çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Kardiyovasküler hastalıklar, inflamatuvar hastalıklar, infeksiyonlar, gelişimsel bozukluklar, kas bozuklukları, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser ile ilişkileri ortaya konulmuştur. Bu ilişkilerden dolayı özellikle neoplastik ve angiogenezis ile giden hastalıklarda miRNA'ları hedefleyen erken tanı ve tedavi yaklaşımları araştırılmaya başlanmıştır.

Literature bakıldığında göz dokularında miRNA çalışmaları yapılmış olup miRNA 184 retina, kornea ve lenste, miRNA 205 özellikle kornea ve limbusta miRNA 182 ve 183 kornea ve limbus epitelinde saptanmıştır.⁴ Lee ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada pterijyum dokusunda vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonu gösterilmiştir.⁵ Wu ve arkadaşları endotel fonksiyonu ve

angiogenez ile ilgili yaptıkları çalışmada anjiogenezi miRNA-126'nın aktive ettiğini, miRNA-221'in ise inhibe ettiğini göstermişlerdir.⁶Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda pterijyum hastalığının patogenezinde; miRNA-126, miRNA-182, miRNA-183, miRNA-184, miRNA-205 ve miRNA-221'in doku düzeylerini araştırarak hastalığın erken tanı, tedavi ve takiplerinde oynayabileceği rolü incelemeyi planladık.



GENEL BİLGİLER

A. Konjonktiva Anatomi ve Fizyolojisi

Konjonktiva kapakların iç kısmını ve göz küresinin kornea dışındaki ön kısmını örten mukozal bir dokudur. Konjonktiva 3 kısımdan oluşur. Bunlar göz küresini örten bulber konjonktiva, kapak iç yüzeylerini örten palpebral konjonktiva ve konjonktivanın kendi üzerine kıvrılarak oluşturduğu forniks konjonktivasıdır. Alt ve üst kapakların birleştiği karankül denilen iç köşede semilunar katlantı mevcuttur. Palpebral konjonktiva altındaki tarsi sıkıca, bulber konjonktiva ise tenon kapsülüne zayıf olarak bağlanır. Bu dokular limbusta karışarak Vogt palizadlarını oluşturur.⁷

Konjonktiva palpebral arterlerden ve ön siliyer arterlerden beslenir. Göz kapağının marjinal arter arkı tarsal konjonktivayı, periferik arter arkı da forniks ve limbusta 4 mm mesafeye kadar olan bulber konjonktivayı besler. Ön siliyer arterler limbusta yüzeysel ve derin episkleral perilimbal pleksusu oluşturur. Bulber konjonktivanın venleri episkleral venöz pleksusa, palpebral konjonktivanın venleri orbita venlerine dökülür. Konjonktivanın sinirsel uyarımı nervus trigeminusun oftalmik ve maksiller dallarından sağlanır. Konjonktiva lenfatikleri medialde submandibular, lateralde preauriküler lenf bezlerine boşalır. Konjonktiva yabancı cisimlere, eksojen mikroorganizmalara karşı önemli bir bariyerdir. Konjonktiva epiteli biyokimyasal ve histolojik olarak kornea epitelinden çok farklıdır. Kornea saydam, düzenli, kırıcılık özelliği olan damarsız bir yapı iken konjonktiva opak, düzensiz ve damarlı bir yapıdır. Konjonktiva epitelinde bulunan goblet hücreleri gözyaşı film tabakasında bulunan müsinin önemli kaynağıdır. Tüm oküler yüzey hücrelerinin % 5-10'unda goblet hücreleri oluşturur.⁸ Karbonhidratlar, aminoasitler ve diğer besinler konjonktival damarlardan kolayca temin edilir. Az miktarda glikojen bulunur. Glikolik, trikarboksiasetik asit ve solunum zinciri enzimlerini yüksek oranda bulundururken düşük oranda heksoz monofosfat aktivitesine sahiptir.⁹ Kornea epiteli olmadığında konjonktiva epiteli 1mm/sa hızla korneal stromayı kapatabilir.¹⁰ Bir kez kapattığında konjonktival özelliklerini 4-5 hafta sonra kaybeder.¹¹ Bu histolojik görünüm konjonktiva epitelinin kornea epiteline transdiferansiyasyonu olarak adlandırılır. Ancak transdiferansiyasyon epitel kornea epiteline eşit değildir.¹² Metabolik seviyesi, enzim aktivitesi, protein profili haftalar sonra bile kornea ile karşılaştırılmaz.¹² Bu

epitel travmaya karşı dayanıksızdır, kolayca vaskülarize olur ve konjonktiva benzeri bir görünüm alır.

Konjonktiva mikroskobik olarak iki kısımdan oluşur. Dışta epitel, içte ise lamina propria tabakası bulunur.

1. Epitel

Konjonktivanın farklı bölgelerinde değişik özellikler gösterir. Kapak konjonktivasında keratinleşmemiş silindirik epitel, bulber konjonktivada ise bazal hücreler silindirik olup epitel keratinleşmemiş çok katlı yassı epitel hücrelerinden oluşur. Kapak konjonktivasında epitel hücreleri iki kat iken bulber konjonktivada beş kata çıkar. Epitelyum tabakasında ayrıca bazal hücreler arasında melanositler ve tüm konjonktivada Langerhans hücreleri bulunmaktadır. Özellikle palpebral konjonktiva ve inferonazal bulber konjonktivada yoğun olarak bulunan müsin salgılayan goblet hücreleri bulunur. ⁷ Epitelin yüzeyinde bulunan mikrovilli ve mikropili adı verilen yapıların üzerini glikokaliks ve hidrofilik özellikteki müsin tabakası örtmektedir. Gözyaşının konjonktiva üzerinde tutulmasında bu yapıların büyük önemi vardır. Korneadan farklı olarak konjonktiva epiteli organize bir bazal membrandan yoksundur. Substantia propria üzerinde gevşek olarak bulunmaktadır. Konjonktiva epitelinin kök hücrelerinin kaynağı belirsizdir. Forniksin konjonktiva epitelinin, goblet hücrelerinin, bulber ve palpebral konjonktivadakilere kıyasla proliferasyon yeteneklerinin daha fazla olduğu gösterilmiştir.

2. Lamina Propria

Epitelden bir bazal membran ile ayrılır. Üstte lenfoid tabaka altta fibrovasküler tabaka olmak üzere iki tabakadan oluşur. Lenfoid tabakada gözün immünesinde önemli rol oynayan lenfositler, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Lenfoid doku insanda doğumdan üç ay sonra gelişir. Fibrovasküler tabakada damarlar, lenf yolları ve sinirler mevcuttur. Krause ve Wolfring denilen yardımcı gözyaşı bezleri de bulunmaktadır.

B. Korneanın Anatomi ve Fizyolojisi

Kornea avasküler, saydam, gözün kırıcı gücünün %75'ini sağlayan bir dokudur. Yetişkinlerde horizontal çapı 11-12 mm, vertikal çapı 9-11 mm'dir. Kalınlığı santralde 0.57 mm periferde 0.7 mm dir. Hava-gözyaşı +44D, gözyaşı kornea +5D, kornea-aköz – 6D olup toplam kırıcılığı +43 D dir.¹³ Kornea damarsız bir yapı olduğundan beslenmesi aköz hümorden glikoz difüzyonu ve gözyaşı film tabakasından oksijen difüzyonu ile olur. Ayrıca korneal limbustan da destek alır. ¹³ Kornea vücudumuzun en fazla sinir sonlanmasına sahip dokusudur. Sinir sonlanması konjonktivadan 100 kat daha fazladır. İnnervasyonu trigeminal sinirin oftalmik dalı ve uzun siliyer sinirler tarafından sağlanır. Uzun siliyer sinirler perilimbal bölgenin innervasyonunu sağlar, derin stromada korneaya penetre olurlar ve öne doğru ilerleyerek epitelyum altında pleksus oluştururlar. Sinir lifleri korneada miyelinini kaybeder ¹³.

Mikroskopik olarak dıştan içe doğru epitel, bowman membranı, stroma, descemet membranı ve endotel olarak adlandırılan yapılardan oluşur.

1. Epitel

Kornea epiteli kornea kalınlığının %10'unu (0.05mm) oluşturan çok katlı skuamoz epiteldir. Epitel ve gözyaşı film tabakası düzgün bir optik yüzey sağlar. En dışta 2-3 sıra yassı, horizontal nükleuslu yüzey hücreleri, ortada 2-3 sıra polihedral kanat hücreleri ve en içte tek sıra silendirik bazal hücrelerinden oluşur. Bazal hücreler bazal membrana hemidesmozomlarla yapışmış tek katlı küboidal hücrelerdir. Bazal membran ile bazal hücreler arasındaki hemidesmozomlardaki anomaliler tekrarlayan korneal erozyonlar veya persistan epitel defektlerine neden olabilir. Bazal hücreler mitotik aktiviteye sahiptir. Bazal hücrelerin üstünde ince kanat benzeri kanat hücreleri bulunur. Kanat hücreleri keratin adı verilen tonoflaman yönünden zengindir ¹³. Yüzey hücreler ince poligonal hücrelerden oluşur. En üstteki hücreler mikrovillus ve mikroplicatalara sahiptir. Bu sayede müsin absorpsiyonunu artıracak şekilde yüzey alanı genişler. Yüzey hücreler arasında bulunan sıkı bağlantılar (tight-junction) gözyaşının stromaya geçişini önler. Kornea epiteli, yedi ile ondört günde farklılaşarak gözyaşı film tabakasına dökülür.¹³

Kornea epiteli mikroorganizma, yabancı cisim, solüsyonlar ve ilaçlara karşı bariyer oluşturur. Saydam ve düzgün bir optik yüzey sağlar. Normalde kornea periferinde bulunan, antijenin işlenmesinde görevli dendritik hücreler (Langerhans hücreleri) bulunur. Kornea epiteli sürekli kendini yenileyen bir yapıya sahiptir. Bu yenilenme limbustaki kök hücreler ve bazal kornea epiteli ile olmaktadır. Hall ve Watt farklı dokuların kök hücrelerinin üç ortak özelliğe sahip olduğunu göstermiştir. ¹⁴

1. Kök hücreleri insanın tüm yaşamı boyunca gelişen ve sınırlı olmayan kendi kendini yenileme özelliğine sahiptir.
2. Kök hücreler asimetric bölünme özelliğine sahiptir. Bir kardeş hücre kök hücre olarak kalırken diğeri farklılaşır.
3. Bir kez farklılaşma başlayınca bu geri dönülmez bir süreçtir.

Kan hücreleri gibi bazı dokularda kök hücreleri pluripotenttir ve kök hücreler birbirinden farklı hücrelere farklılaşır. Korneanın çok katlı epitelinde kök hücreler unipotenttir. Kök hücreler uzun ömürlü olup asimetric yapıda bölünme özelliğine sahiptir. Bu asimetric hücre bölünmesi sonucu ortaya çıkan iki hücreden biri kök hücre olarak kalırken diğeri bazal korneal epitelyum olarak farklılaşır. Bazal korneal epitel daha sonra kısmen farklılaşmış hücrelere ve en son suprabazal korneal epitel haline gelir. Hem kısmen farklılaşmış hücreler hem de tam farklılaşmış hücreler bölünme yeteneğine sahiptirler. Geçici çoğalan hücreler tetikleyici korneal hücreler olarak kabul edilebilirler. Limbal kök hücreler düşük mitotik aktiviteli ve yavaş siklusa sahip iken, geçici çoğalan hücreler kısa ömürlü olup, uzun siklusa sahiptir. Farklı dokularda çok katlı epitelin kök hücrelerinin yeri değişir. Dil papillasında bazal hücre tabakasında konnektif doku içinde derinde yerleşir.¹⁵ Kornea epitelinin kök hücrelerinin limbusta olduğuna dair günümüzde yapılan çalışmalar bu hipotezi doğrular niteliktedir. Korneal epitelyal kök hücrelerinin:

1. Hücre siklusları yavaştır. H- Timidin çevre hücrelerden daha uzun süre tutulu kalır.¹⁶
2. Korneaya spesifik 64 kD keratin antikorlarını bağlamazlar. ¹⁷
3. Kornea ve konjonktivaya bağlanmayan alfa-enolaz olarak bilinen 4G10.3 antikorunu bağlarlar. ¹⁸
4. Nadir olarak görülen kornea tümörleri primer olarak limbustan kaynaklanır. ¹⁹

Epitel bazal membranı, bazal epitel hücreleri tarafından salgılanır ve tip IV kollajen, laminin, heparan sülfat, fibronektin gibi proteinleri içermektedir. Bazal membran ve bazal hücreler arasında hemidesmozom denilen bağlantılar bulunur. Bu

bağlantılardaki anormallikler tekrarlayan korneal erozyonlar veya persistan epitel defektlerine neden olur. Bazal membran hasarlanmadan 6 hafta sonra yeniden oluşur. Bu sırada yeni oluşan bazal membran stromaya çok zayıf olarak bağlıdır.

2. Bowman Tabakası

Stroma ön bölümünde yer alan kısa kollajen liflerden oluşan aselüler bir yapıdır. Yenilenme yeteneği olmadığından yaralanması skar oluşumuna neden olur. Epiteldeki patolojilerin stromaya yayılmasını önleyen bir bariyerdir.

3. Stroma

Stroma asellüler bowman tabakası altında kollajen ve proteoglikanların oluşturduğu ekstrasellüler matriksten oluşur. Kornea kalınlığının %90'nını oluşturur. Keratositler stromanın ana hücreleridirler. Ekstrasellüler matriks, tip I, V, VI kollajen, dekorin ve lumikan adı verilen proteoglikanlar içerir. Bu matrikse gömülü kollajen liflerin kafes şeklindeki dizilimi korneanın saydamlığını sağlar. Kornea transparandır, çünkü kafes şeklindeki yapıyı oluşturan birimler görülebilen ışığın dalga boyundan küçüktür. Kornea stromasının %78 oranında su içermesi saydamlığın devamında önemlidir. Epitel tabakasının sağlam yapısı ve endotelial pompa fonksiyonu korneal hidrasyonun kontrolünden sorumludur.

4. Descemet Membranı

Descemet membranı kornea endotel bazal laminasıdır. Doğumda 3 mikrometre, erişkinde 10-12 mikrometre kalınlığındadır. İridokorneal açıya 2 mm uzaklıkta son bulur. Öndeki stromaya komşu kısım embriyoner hayatta kollajen lifler ve glikoproteinlerden oluşmuştur. Endotele komşu kısım doğumdan sonra endotel hücreleri tarafından salgılanır. Bu kısım hasar sonrası endotel tarafından tekrar salgılanır.

5. Endotel

Tek katlı hegzagonal hücrelerin birbirine sıkıca bağlanarak mozaik patern oluşturdukları tabakadır. Rejenerasyon yeteneği yoktur. Defektif alan hücrelerin genişleyip yayılması ile kapatılmaya çalışılır. Doğumda 4000/mm² olan hücre sayısı erişkinde 2500/mm² ye iner. Hücre sayısı 400/mm² ye düşerse korneal ödem oluşur.

C. Korneanın Fonksiyonları

1. Refraksiyon

Kornea, yapısındaki fibrillerin homojen, paralel ve sıkı dizilimi nedeniyle saydamdır. Kornea ön yüzü eğrilik yarıçapı yatay meridyende 7.8 mm, dikey meridyende 7.7 mm'dir. Arka yüzün kurvatürü ise 6.8 mm dir.

2. Saydamlık

Stromada fibriller eşit uzaklıkta ve birbirine paraleldir. Saydamlığın devam edebilmesi için korneayı çevreleyen sıvıların osmotik basınçlarının en az interstisyel sıvı basıncı kadar olması gereklidir.

3. Dehidratasyon

Korneanın %75-80'i sudur. Stromadaki glikozaminoglikan yapının osmotik gücü sayesinde izotonik ortamlarda bile su tutabilir.

4. Geçirgenlik

Epitel tabakası hidrofobik olduğundan hidrofilik maddeler için bariyerdir. Hidrofilik yapıdaki stroma lipofilik maddeler için bariyer oluşturur. Endotel ise lipofilik olduğundan stromadan aköz hümöre hidrofilik maddelerin difüzyonunu önler.

5. Prekorneal Gözyaşı Film Tabakası

Lipid, aköz ve müsin olmak üzere üç tabakadan oluşur. 7 mikrometre kalınlığındadır. Düzgün bir optik yüzey sağlar. Sağlıklı epitelin devamında önemlidir. Göz kapağının rahat hareketini sağlar.²⁰ Lipid tabaka Meibomian, Zeis ve Moll bezlerinden salınır, buharlaşmayı geciktirir. Aköz tabaka lakrimal bez, krause ve Wolfring bezlerinden salınır. Toplam volümü 6.5 mikrolitredir. NaCl, glikoz, üre, enzim, proteinler, immünglobulin, kompleman ve albumin içerir. Musin tabaka goblet hücrelerinden salınır. Gözyaşı film tabakasının kornea yüzeyinde stabilitesini sağlar. Epitel hücre membranındaki mikrovilluslara tutunur. Kornea epitelini hidrofilik hale getirerek yeterince ıslanmasını sağlar.

D. Skleranın Anatomi ve Fizyolojisi

Sklera önde kornea arkada optik sinir ile devam eder ve göz küresini oluşturur. Arka yüzünde optik sinir liflerinin ve kısa siliyer arterlerin geçtiği elek şeklinde lamina cribrosa tabakası bulunur. Dış yüzünde tenon kapsülü ve konjonktiva, iç yüzünde uvea vardır. Arka kutupta 1mm, ekvator da 0.5mm, kasların yapışma yerinde 0.3mm, kornea çevresinde 0.8mm'dir. Skleranın dış yüzünde episklara iç yüzünde ise lamina fusca bulunur. Episklara fibröz elastik dokudan oluşmuştur. Lamina fusca uvea kromatofor hücrelerinden dolayı koyu renklidir. Sklera %75 kollajen lifler, %25 elastik liflerden oluşur. Sklera hücre yönünden fakirdir. Kollajen, proteoglikan, glikozaminoglikan, glikoprotein ve az sayıda da fibroblast bulunur. Sklera dışarda episklara içeride ise koroidden beslenir. Episklara duyu sinirleri bakımından zengindir. Trigeminiun oftalmik dalı tarafından innerve olur.

Sklera göz küresine şekil verir ve travmalara karşı korur. Su oranı %65 olan sklerada bu oran %40 a düştüğünde saydamlaşır. Elastin ve kollajenden oluşan mukopolisakkaritler diğer önemli elementlerdir. Sklera göz içi basıncının etkisi altındadır. Basıncın sürekli yüksek olduğu durumlarda sklerada uzama olur ve basınç düşer.

E. Limbus Anatomi ve Fizyolojisi

Konjonktiva ve skleradan korneaya geçiş bölgesidir. 1-2 mm genişliğindedir. Çok katlı yassı konjonktiva epitel korneanın çok katlı skuamoz epiteline dönüşür. Korneadan konjonktiva içine doğru parmak şeklindeki girintilere Voght Palizadları denir. Stromal kollajenin yapısı bozularak hem kornea hem de sklera kollajenin özellikleri birarada görülür.

Kan damarları, sinirler ve mast hücreleri yönünden zengindir. Bowman membranının yerini düzenli kollajen lifler ve amorf madde alır. Descemet dar bantlara ayrılır ve trabekülün katlarını çevreler. Limbus içinde iki önemli anatomik yapı, trabeküler ağ ve Schlemm kanalı bulunur. Ön silyer arterden kaynaklanan konjonktiva damarları limbusun kanlanmasıyla sorumludur. Limbusta kornea epitel hücrelerinin yenilenmesini ve beslenmesini sağlayan kök hücreleri bulunur. Göz kapağı hareketi ve bulber basınç limbusta çok katlı skuamoz epitel oluşumu için uyarı oluşturur.

Pterijum Tanımı

Pterijum, kapak aralığında yerleşen üçgen şekilli, genellikle bilateral, nazal tarafta, ²¹⁻²³ bulbar konjoktivadan orjin alan, ²⁴⁻²⁶ dejeneratif, anormal fibrovasküler dokunun kornea üzerine ilerlemesi olarak tanımlanır.²⁷⁻²⁸ Yunanca'da kanat anlamına gelen "pterygion" sözcüğünden alınmıştır. ²⁹⁻³⁰

Çoğunlukla nazal yerleşimlidir ve horizontal uzanma eğilimindedir, bazen hem nazal hem temporal bölgede veya yalnız temporalde görülebilir. Fibrovasküler granülasyon dokusu korneaya invaze olarak, stromanın yüzeyel tabakalarını ve Bowman membranını destrükte eder. ³¹

Gerçek pterijum, konjonktivanın korneayı aktif olarak invaze ettiği dejeneratif ve hiperplastik bir dokudur. Pseudo-pterijum ise inflamatuvar bir süreç sonucu inflame konjonktivanın kornea kenarındaki ülserle uzanıp yapıştığı ve pasif olarak korneaya çekildiği bir doku olarak tanımlanmıştır. Bu ikisi arasındaki en önemli fark pterijumun limbus ve korneaya tamamen yapışıkken, pseudopterijumda limbusu atlayıp sadece korneaya tutunması ve böylece altından bir probun rahatlıkla geçirilebilmesidir. ^{30,31}

Pterijum dokusu; tepe, baş, gövde olmak üzere 3 kısımdan oluşur:

Tepe; gri-beyaz, korneaya sıkıca yapışan, subepitelyal, avasküler kısımdır.

Baş; kabarık kitle oluşturan ve globa sıkı sıkı bağlı olan anastomoz yapan damarların olduğu kısımdır.

Gövde; konjonktivanın alt ve üst kısmından foldlarla ayrılan fibrovasküler kısımdır.

Hastalık genellikle yavaş ilerler, gerçek bir tümör değildir fakat kontrol edilemeyen büyüme özellikleri vardır. Cerrahi eksizyonu kolay olmasına rağmen nüks oranı oldukça yüksektir. ³²

Epidemiyoloji

Pterjium tüm dünyada görülmekle birlikte güneşli, sıcak, tozlu iklim koşullarında ve tropikal, subtropikal ülkelerde görece daha sıktır. Ekvator çizgisi ile 37° kuzey ve güney enlemleri arasındaki bölgeler içerisinde daha fazla görülmesinden dolayı bu bölgeler, "pterjium kuşağı" olarak adlandırılmaktadır. Güneş ışınlarına daha çok maruz kalan yerlerde pterjium oluşma nedenlerinden biri ultraviyole (UV) ışınlarıdır. Populasyonla ilgili yapılan çalışmalarda pterjium prevalansının % 0,3 ile % 29 arasında değişen oranlarda olduğu bildirilmiştir. Kliniklerde yapılan prevalans çalışmalarında bu oran % 4 ile % 31 arasında bulunmuştur. Pterjium, erkeklerde kadınlardan iki kat daha sık görülür. Bu insidans farklılığı, erkeklerin dış ortamlarda daha sık çalışmasına bağlanmıştır. ³¹⁻³⁸

Çeşitli meslek gruplarında; örneğin kaynakçılar, balıkçılar, inşaat işçileri, çiftçiler ve marangozlarda diğer meslek gruplarından daha sık görüldüğü bildirilmiştir. Pterjiumun görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır. Lezyonun başlangıcı ortalama 44 yaş iken, 50 ile 60 yaşlar arasında pik yaptığı bildirilmektedir. ³⁹⁻⁴³

Etyopatogenezi

Pterjiumun oluşmasında ve ilerlemede rol oynayan, çevresel risk faktörleri içinde başlıca yeri UV ışınları almaktadır. Özellikle insan gözü tarafından algılanamayan, 290-320nm dalga boyuna sahip UV-B'ye kronik maruziyetin, gözde bir takım değişikliklerden sorumlu olduğu düşünülmektedir. ⁴⁴

Pterjiumun patogenezi hakkında çeşitli teoriler öne sürülmüştür: Viral enfeksiyonlar, immunolojik mekanizmalar, ekstraselüler matriks yeniden yapılanması, büyüme faktörleri, sitokinler, antiapoptotik mekanizmalar, çeşitli anjiogenik faktörler,

kronik oküler yüzey enflamasyonu ve benign neoplastik transformasyon bunlar içinde yer almaktadır.⁴⁵⁻⁴⁷

Pterijum epitelyal hücreleri ve limbal epitelyal hücreler ultraviole B'ye (UV-B) maruz kalmaya cevap olarak matriks metalloproteinaz 1 enzim (MMP 1) üretimini artırabilirler. Bu durum, pterijumun patogenetik bir mekanizması olarak öne sürülen ultraviole ışınları tarafından indüklenen limbal epitelyal hücrelerin genetik travmaya uğradığı teorisini destekler.⁴⁸

Ultraviole aracılı genetik travma; büyüme faktörleri, çeşitli sitokinler ve büyüme faktör reseptörlerinin ekspresyonunu da etkileyebilir. Vasküler endotelial büyüme faktörü-A (VEGF-A) normal, inflame ya da vaskülarize korneada mevcuttur. Bu yüzden pterijumda meydana gelen limbal epitelyal hücre değişiklikleri, konjonktival fibroblastlar tarafından üretilen VEGF-A'nın inhibisyonunda azalmaya yol açabilir. Bu durum, pterijumun karakteristik özelliği olan anjiogenezin artmasına yol açar.¹

Derideki VEGF-A seviyelerinin ultraviole radyasyonla yükseldiği gösterilmiştir.⁴⁹ Pterijumda limbal epitelyal hücreler (LEC), VEGF-A tarafından indüklenen kapiller tüp oluşumunu baskılar.⁵⁰

Ultraviole radyasyon, P53 tümör supressor gibi genlerde mutasyonlara neden olarak pterijum epitelinde anormal ekspresyona yol açabilir. Bu bulgular, pterijumun dejeneratif bir lezyon değil, kontrolsüz hücre proliferasyonunun bir sonucu olabileceğini işaret eder.⁵¹⁻⁵³

İlerleyen pterijum dokusu kenarındaki MMP aktivitesindeki artış ; pterijumun korneaya invazyonu ve bowman tabakasının destrüksiyonunun yanı sıra, pterijumun karakteristik özelliği olan inflamasyon, doku yeniden yapılanması ve anjiogenezisten sorumlu olabilir.⁵

Pterijumda; dejeneratif sürecin, inflamasyonun ve fibrovasküler proliferasyonun önemli faktörler olduğu kanıtlanmıştır. Pterijum, proliferatif olmuş fibrovasküler dokudan oluştuğu için, progresyonun neovaskülarizasyona ihtiyaç duyduğu açıktır.^{1,55}

Pterijum oluşumu esnasında anjiogenezin meydana geldiği gösterilmiştir. Anjiogenez önceden var olan damarlardan yeni damarların büyümesini içeren fizyolojik bir süreçtir. Anjiogenez, yara iyileşmesinin yanı sıra büyüme ve gelişmede normal bir süreç olmasına rağmen, birçok patolojik süreçte de kritik rol oynar. VEGF, Fibroblast büyüme faktörü (FGF), Platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), Transforming growth faktör- β (TGF- β) ve tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) gibi birçok

büyüme faktörü, kimyasal olarak anjiogenezi stimüle eder. Bu büyüme faktörleri, fibroblastik ve inflamatuvar pterjium hücrelerinde de gözlemlenmiştir. VEGF, anjiogenezin en güçlü bir uyarıcısıdır.⁵⁵⁻⁵⁷ VEGF'in mevcudiyetinde endotel hücreler proliferasyon olarak çevre alanına göç eder ve sonuçta kapillerlere benzeyen yapılar oluşturur.

VEGF, VEGF-2 reseptörüne bağlanarak endotel hücrelerde bir sinyal oluşturur, böylece bir tirozin-kinaz sinyal kaskadı başlar ve çeşitli faktörlerin üretimini uyarır. Bunlar da damar permeabilitesini artırır, endotel hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu uyarır ve son olarak kan damarlarında farklılaşmayı uyarır.^{58,59}

Aspitois ve ark. ile Taraboletti ve arkadaşları pterjium dokusunda immunohistokimyasal olarak VEGF'nin ve mikrodamar yoğunluğunun bir belirteci olan CD 31 ekspresyonunun arttığını, aynı zamanda anjiogenezin bir inhibitörü olan trombospondin-1'in (TSP-1) de karakteristik olarak yokluğunu göstermişlerdir.⁶⁰⁻⁶²

Histopatoloji

Pterjiumun histopatolojik yapısını inceleyen bir çok çalışmada pterjium oluşumu ve ilerlemesi ile inflamatuvar değişiklikler ve mast hücreleri arasında yakın bir ilişki saptanmıştır. Elektron mikroskopu incelemelerinde pterjiumun çok katlı, ileri derecede diferansiyasyon, prizmatik şekilli epitel hücreleriyle örtülü olduğu görülmektedir. Mast hücreleri, kimyasal ve immünolojik etkenlerden sonra inflamasyon ve doku fibrozisinde önemli rol oynamaktadır.⁶³⁻⁶⁶

Elektron mikroskopik incelemede fibroblastların arttıkları, aktif bir görünüm sergiledikleri, preelastik ve denatüre elastik liflerde belirgin artış, elastik liflerin yanı sıra kollajen liflerde de artış ve dejenerasyon tipik olarak izlenmiştir. Pterjiumda fibroblastlar; çeşitli etkenlere bağlı olarak, metabolik yönden hasara uğramakta, çoğalmakta ve yoğun bir şekilde normal yapısını değiştirmiş dejenere kollajen ve elastik lif sentezi oluşmaktadır.^{67,68}

İmpresyon sitolojisi ile yapılan çalışmalarda epitel hücrelerinde, goblet hücre yoğunluğunun artışı ile seyreden skuamoz metaplazi izlenmiştir. Hücrelerde uzama ve genişleme, nukleusta piknotik değişiklikler, bazı olgularda akantozis ve diskeratozis olduğu görülmüştür.⁶⁹

Pterjium Kliniği

Pterjium çoğunlukla gözün iç tarafında oluşan kozmetik değişiklik, yabancı cisim hissi, kızarıklık, lakrimasyon, tekrarlayan inflamasyon, yanma, görmede bulanıklık ve azalma, fotofobi, kronik irritasyon gibi çeşitli şikayetlere yol açmaktadır.⁶⁹⁻⁷²

Pterjium, kornea yatay ekseninde düzleşme ve buna bağlı olarak kurala uygun astigmatizma oluşturmaktadır.⁷³

Oluşan astigmatizma ve pterjiumun görme aksına kadar uzaması, görmenin azalmasına neden olmaktadır. Yapılan alışmalar, astigmatizma ile pterjium büyüklüğü arasında ilişki olduğunu göstermiştir.⁷⁴⁻⁷⁶

Görmede azalma şikayeti iki nedenden ortaya çıkar: Pterjiumun indüklediği astigmatizma ve optik aksın kapanması. Başın kornea üzerinde ilerlemesi, kornea kurvatüründe değişikliğe neden olur. Bu değişiklik, hem statik hem dinamik güçlerle meydana gelir. Adezyonun olduğu insersiyö bölgesinden oluşturulan vektör güç sabittir.

Medial kantüs yapılarıyla güçlü adezyon gösteren olgularda ise bazı bakış yönlerinde ek traksiyonel kuvvetler ortaya çıkar. Bu kuvvetler de glob hareketleriyle değişen yoğunlukta ortaya çıkan dinamik vektör güçler şeklindedir.⁷⁷

Rekürren pterjiümlar, oküler hareket kısıtlılığı yaratarak dışa bakışta diplopi, semblefaron ve estetik kusur oluşturabilmektedirler. Semblefaron oluşumunun ve dışa bakışta diplopi yapan glob restrüksiyonunun nedeni, subkonjonktival fibrovasküler dokunun fornikslerdeki bağ dokusu ve iç rektus kasının kapsülü ile kuvvetli adhezyonundandır.^{78,79}

Klinik Sınıflama

Pterjiumun uygulanan tedavi sonucunun değerlendirilmesinde, klinik sınıflamanın önemli rolü vardır. Pterjiumun boyutu, vaskülarizasyonu, kornea yüzeyine ilerleyişi, optik zon tutulumu ve komplikasyonlar, sınıflamada göz önünde tutulan klinik özelliklerdir.⁸⁰

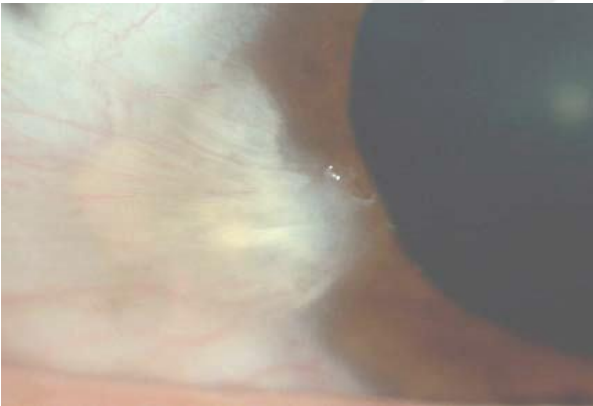
Tip 1: Küçük primer pterjium:

Primer pterjiumun başlangıç düzeyindeki tipidir. Lezyon limbusta sınırlıdır ya da korneayı minimal invaze etmiştir. Semptom yoktur ya da oldukça hafiftir ve progresyonu yavaştır. Morfolojik açıdan üç farklı şekilde izlenir:

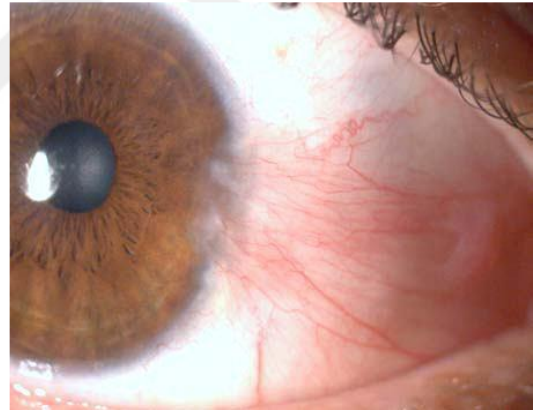
Fibröz: Limbusta paralel, küçük, beyaz renkli, vaskülarizasyondan fakir fibröz bir halka şeklindedir. Beden kısmı, sağlıklı konjonktiva tarafından çevrelendiğinden açık olarak izlenemez. (Şekil 1).

Pinguekular: Limbus düzeyindedir ve baş kısmı korneaya invazyon göstermez, beden kısmında medial kantüsten horizontal uzanım gösteren vaskülarizasyon mevcuttur; ancak çoğu kez çevredeki sağlıklı konjonktivadan ayırt etmek mümkün olmaz.

Klasik: Pterjiumun tüm bölümleri izlenir. Apeksi korneayı yaklaşık 1-2 mm invaze etmiştir. (Şekil 2).



Şekil 1. Tip 1 fibröz pterjium ⁸¹



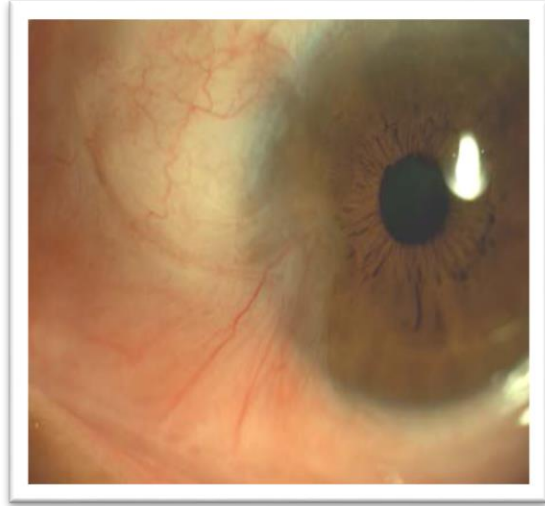
Şekil 2. Tip 1 klasik pterjium ⁸¹

Tip 2: Optik zon tutulumu olmayan ileri primer veya nüks pterjium:

Pterjiumun tüm anatomik yapıları izlenir. Baş kısmı yükselmiş ve limbustan yaklaşık 2-4 mm ilerlemiştir, optik zon açıktır. Beden kısmında dilate kapillerler vaskülarize bir band oluştururlar. İrritasyon ve görmede azalma şikayetleri belirgindir. (Şekil 3) ve (Şekil 4).



Şekil 3. Tip 2 primer pterjium ⁸¹



Şekil 4. Tip 2 rekürren pterjium ⁸¹

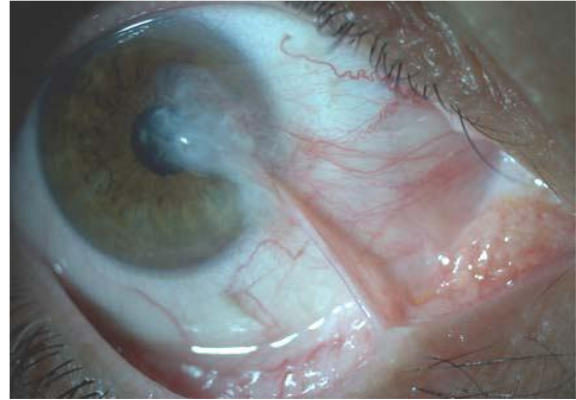
Tip 3: Optik zonu kapatan ileri primer veya nüks pterjium:

Pterjiumun en ileri formudur. Apeksi korneada 4 mm'den fazla ilerler ve optik zonu kapatır. Kornea kalınlığının % 30'undan fazlasını invaze eder. Görme kaybı belirgindir.

Subkonjonktival fibröz komponent, bazı hastalarda medial rektus kası tendonunu çevreleyen kapsüle yapışıklık göstererek abdüksiyon kısıtlılığına ya da fornikslere ulaşarak semblefarona neden olabilir. (Şekil 5) ve (Şekil 6).



Şekil 5. Tip 3 primer pterjium. ⁸²



Şekil 6. Tip 3 rekürren pterjium. ⁸²

Pterjium cerrahisi için endikasyonlar, araştırmacılar tarafından sıkça ilgilenilen konulardan biridir. Operasyon kararı verilirken, birçok faktör göz önünde bulundurulmalıdır.⁸⁰Yapılan araştırmalara göre, hekimlerin en çok dikkate aldıkları faktör, pterjiumun limbustan ne kadar ilerlediğidir. Pterjium boyutu arttıkça, sebep

olduğu astigmatizma artacağından ve optik aksı kapatacağından görmede azalma şikayeti de artacaktır. Ayrıca pterjium eksizyonu sonrası korneada kalacak skar dokusu görme eksenine ne kadar yakın olursa, operasyon sonrası kalacak astigmatizma o kadar fazla olacaktır. Düzeltilmiş görme keskinliğinin azalması, cerrahi için ikinci önemli faktör olmuştur. Bazı araştırmacılar, hastanın takibi sırasında görme keskinliğinin mutlaka ölçülmesi gerektiğini ve görmede hastalığın progresyonunu düşündürecek bir azalma tespit edildiğinde cerrahi müdahalenin planlanmasını öne sürmektedir.⁸¹⁻⁸³

Pterjium lezyonları yapılan ilk muayenede Tan ve ark. tarafından geliştirilen gradeleme sistemiyle de derecelendirilmektedir.⁸⁴

Tip 1 : Atrofik.

Tip 2 : Minimal enflamasyon.

Tip 3 : Orta ciddi enflamasyon veya aktif büyüme gösterenler.

Tip 1’de lezyonlar kabarık değildir ve episkleral damarlar pterjiumun altında gözlenebilir.

Tip 3’de lezyonlar kabarıktır ve düz horizontal vaskülarizasyon gösterirler, lezyonlar episkleral damarları gizlerler.

Diğer tüm pterjium lezyonları, tip 2 olarak sınıflandırılmaktadır.⁸⁵

Pterjium Tedavisi

Yirminci yüzyılın ikinci yarısından itibaren, pterjiumun gerek patogenezi gerekse tedavisi konusunda literatüre her geçen gün yeni bilgiler eklenmektedir. D’Ombrain, 1948’de çıplak sklera tekniğini; Haik, 1957’de Stronsiyum 90 (Sr 90) ile topikal beta terapiyi; Meacham, 1962’da antimitotik ajan kullanımını; Panzardi, 1964’da amniyon membranı kullanımını ve ilk defa Kenyon, 1985’de konjonktival otogreft transplantasyon kullanımını önererek bugünkü tekniklerin temellerini oluşturmuşlardır.⁸⁵

Medikal yaklaşım: Pterjium yaklaşık 3000 yıldır bilinmektedir. O yıllardan günümüze kadar çok çeşitli tedavi yöntemleri denenmiş, mikrocerrahi yöntemlerinin ve ilaçların çok geliştiği günümüzde dahi tam olarak benimsenen bir yöntem bulunamamıştır.⁸⁶ Medikal tedavide; topikal nemlendiriciler, topikal histamin, vazokonstrüktör (nafazoline), hafif topikal steroidler (flormethalone 0.1%) veya

nonsteroid anti-inflamatuar damlalar, vasküler injeksiyon ve irritasyon semptomlarının tedavisinde kullanılabilir. ⁸⁷

Intraoperatif ve postoperatif Mitomisin C (MMC), pterjium rekürrensini önlemek için en yaygın olarak kullanılan medikal tedavidir. 5-florurasil ve Daunorubicin gibi birkaç diğer ilaç, medikal alternatif tedavide denenmiştir. ⁵¹

Postoperatif Mitomisin C içeren göz damlalarının etkili olduğu gösterilmiştir. (ortalama 10 gün 4x1). Kullanılan konsantrasyonlar, % 0.005 ile % 0.04 arasında değişir.

En yaygın kullanılan konsantrasyon, % 0.02'dir. Bildirilen rekürrens oranları, % 0 ile %38 arasında değişir .

Non-steroid anti-enflamatuarlardan özellikle indometazin, pterjium enflamasyonunu baskılamada başarılı olduğu belirtilmektedir. ³⁹

Lazer tedavisi: Pterjium tedavisinde yeni denemeye başlanmış olan bu teknikler, henüz klinik pratiğe geçmiş durumda değildir ve uzun süreli takip gerektirmektedirler.

Argon Laser fotokoagülasyon: Bu teknikte küçük pterjiumlarda, argon laserle oluşturulan ısı ile baş ve gövdedeki damarların fotokoagülasyonu ve obliterasyonu, bunun sonucunda da lezyonun regresyonu amaçlanmaktadır.³⁹ Literatürde, bu teknikle yapılmış az sayıdaki çalışmalarda, başarılı sonuçlar alındığı ifade edilmiştir. ^{88,89}

YAG lazer fotokoagülasyon: İlk olarak, Tsubota'nın okuler dokuları erbium: YAG lazer ile ablasyona uğratmasından yola çıkılarak bu sistemin pterjium cerrahisinde bir lazer bıçağı şeklinde kullanılabileceğini öne süren uygulamalar olmuştur. ^{90,91} Ancak bu teknik, henüz pratikte kabul görmüş aşamada değildir.

Excimer lazer fotoablasyon: Aslında cerrahi tedaviye adjuvan olarak uygulanan bir yöntemdir. Amaç, pterjiumun başı eksize edildikten sonra fotokeratektomi yapmak suretiyle düz, pürüzsüz ve şeffaf bir kornea elde etmektir. Bu teknikle ilgili olarak farklı serilerde %4,5 ile %91 arasında değişen nüks oranları bildirilmektedir. ^{92,93}

Fotodinamik tedavi: Verteporfin infüzyonu sonrası 689 nm dalga boylu lazer uygulanan pterjium dokusundaki vasküler yapılarda, fototromboz meydana geldiği izlenmiştir. Bu teknikle küçük ve orta boylu pterjiumlarda birkaç seansta başarı sağlanabildiği rapor edilmiştir. Pterjium dokusunda LDL reseptör sayısında artış tespit edilmesi, fotodinamik tedavinin uygulanabilirliğini akla getirmiştir .^{94,95}

Cerrahi Yaklaşımlar: Pterjiumun tedavisi cerrahidir. En önemli cerrahi endikasyon, görme kalitesinin bozulmasıdır. Pterjium; dokunun görme aksına doğru ilerlemesi ve gelişen düzensiz astigmatizma ya da pre-korneal gözyaşı tabakasında kırılma sonucunda görmeyi etkiler.

Cerrahiye gerektiren diğer sebepler ise; suni gözyaşlarına cevap vermeyen rahatsızlık hissi, oküler motilitenin kısıtlanması, kontakt lens kullanımındaki zorluklar, refraktif cerrahi ve kozmetik sebeplerdir. Pterjium tedavisinde, birçok farklı yöntem denenmiştir. Cerrahi tedavinin esas amacı; pterjiumu tam olarak eksize etmek, görme keskinliğini artırmak ve rekürrensi engellemektir. ⁹⁶⁻⁹⁸

Çıplak sklera tekniği: Pek çok otör, geçmişte pterjium eksize edildikten sonra çıplak sklera yöntemini önermekteydi. Bulbar konjonktivaya kısmi eksizyon yapılır, sklera açıkta kalır, kendiliğinden iyileşmeye bırakılır. Tek başına çıplak sklera eksizyonu için rekürrens oranları, kabul edilemez şekilde yüksektir. Literatürde %30 ile %88 arasında değişir .⁹⁹⁻¹⁰³

Basit konjonktival kapama: Pterjium dokusu çıkarıldıktan sonra konjonktiva, yara dudakları birbirine suture edilerek, basitçe kapatılır. Bu teknikle ilgili literatürde az sayıda çalışma mevcuttur ve nüks oranları en düşük % 2, en yüksek % 69 olarak rapor edilmiştir. ^{104,105}

Konjonktival flep kaydırma: Pterjium çıkarıldıktan sonra oluşan defekt, superior veya inferior konjonktivadan hazırlanan flebin kaydırılmasıyla kapatılır. Bu teknikle % 1,6 ve % 15 gibi düşük nüks oranları bildirilmiştir. ^{106,107}

Konjonktival otogreft: Pterjium eksizyonu sonrası açıkta kalan sklera, bulber konjonktivadan alınan serbest konjonktiva greftinin bu alana suture edilmesi

ya da fibrin doku yapıştırıcısı ile yapıştırılması suretiyle kapatılır. Literatürde bu yöntem için nüks oranları en düşük % 2 ve en yüksek % 39 olarak bildirilmiştir. ^{99,100}

Limbal konjonktival otogreft: Eksizyon sonrası oluşan açıklığın örtülmesinde limbal dokuyu da içine alarak hazırlanan serbest konjonktiva grefti kullanılır. Bu teknikle yapılan çalışmalarda nüks oranları % 0 ile % 40 arasında değişmektedir. ¹⁰⁸⁻¹¹²

Amniyotik membran transplantasyonu: Pterjium alındıktan sonra açığa çıkan sklera, amniyon membranı ile kapatılır. Bu teknikle ilgili yayınlara bakıldığında, nüks oranları % 3,8 ile % 64 arasında değiştiği görülmektedir. ¹¹³⁻¹¹⁶

Lamellar keratoplasti: Özellikle ileri evre pterjiumlarda, periferik korneada derin ve geniş bir keratektomiden sonra, incelmış olan dokunun tektonik olarak güçlendirilmesi ve limbusta mekanik bir bariyer oluşturmak amacıyla uygulanmaktadır. Pterjiyumun eksize edildiği korneal kısım, trepanla lamellar olarak çıkarılır ve buraya donör korneasından hazırlanmış lamellar korneal ya da korneaskleral greft suture edilir. Pratik açıdan uygulanabilirliği oldukça güçtür. Yapılan az sayıdaki çalışmada % 6 ve % 30 gibi değişen nüks oranları bildirilmiştir. ^{117,118}

Kombine cerrahi: Yukarıda sayılan cerrahi yöntemlerin kombine olarak tek seansta uygulanması da rekkürrensi azaltma yönündeki çalışmalar sonucu ortaya çıkmıştır. Örneğin konjonktival ya da limbal konjonktival greft uygulamasıyla amniyon membran transplantasyonu bir arada yapılabilir, hatta bu kombinasyonlara mitomisin C gibi kemoadjuvan bir tedavi de eklenebilir. ^{119,120}

Destekleyici tedavi: Son yıllarda, pterjiyum nükslerini azaltmak için cerrahide fibroblast aktivitesini uzun süre baskılama özelliğine sahip, DNA sentezini engelleyen alkilleyici bir ajan olan mitomisin C (MMC) kullanımı yaygınlaşmıştır. ^{121,122}

Günümüzde Mitomicin C uygulamasının başlıca 2 formu kullanılmaktadır:

1. İntraoperatif uygulama: Pterjiyum eksizyonundan sonra ıslatılmış cerrahi sponç, direkt skleral yatağa uygulanır. Çoğu çalışmalarda, intraoperatif Mitomicin C konsantrasyonu % 0.01 ile % 0.04 arasında değişir. En yaygın kullanılan dozaj, 3 dak

süreyile 0.02'lik kullanımdır. ^{102,123-126} İntaoperatif Mitomicin C ile ilişkili kullanım rekürrens oranları % 3 ile % 37.9 arasında değişir.

2. Postoperatif uygulama: Mitomicin C damlalarının etkili olduğu gösterilmiştir. Kullanılan konsantrasyonlar, % 0.005 ile % 0.04 arasında değişir. En yaygın kullanılan konsantrasyon, % 0.02'dir. Bunlar, genellikle 5 ile 14 gün arasında değişen uygulama süresinde günde 4x1 olarak reçete edilmiştir. Bildirilen rekürrens oranları % 0 ile % 38 arasında değişir. ¹²⁷⁻¹²⁹

Thiotepa (Triethylene thiophosphoramide):

Alkilleyici ajandır. 1/2000-1/5000 konsantrasyon arasında postoperatif 2 günden itibaren 3 saat ara ile 6-8 hafta kullanılması sonucu, nüks oranlarını azalttığına dair çalışmalar vardır. ⁸⁷

Bu uygulamadan sonra görülen nüks oranları en düşük % 0, en yüksek % 28 olarak bildirilmiştir. ^{130,131} Bu ajanla, sklera perforasyonuna kadar varabilen çok ciddi komplikasyonlar da bildirilmiştir. ¹³²

5-Florourasil: Pirimidin analogu olan bu antimetabolit, timidilat sentetazı inhibe ederek fibroblast proliferasyonunu engeller. Pterijum alındıktan sonra genellikle 25 mg/ml'lik solüsyonda, sünger parçalarına emdirilir ve 3-5 dakika çıplak sklera üzerinde bekletilir. Literatürde, % 11 ve % 25 gibi değişen nüks oranları rapor edilmiştir. ^{133,134}

Radyoterapi: Radon, radium plakları, Grenz ışınları, X-ray ve Beta radyasyon kullanımı denenmiştir.⁸⁸ Pterijum tedavisinde kullanılan radyoaktif maddeler Rhutenium 106 ve Sr 90'dır. Radyoaktif madde; 1000–7000 Gy doz aralığında, tek doz veya ayrı ayrı dozajlar şeklinde uygulanmaktadır. Literatürlerde, rekürrens oranları % 0 ile % 50 arasındadır. Beta radyoterapinin düzenlenmesinin zorluğu ve skleral nekroz, enfeksiyöz sklerit, korneal perforasyon ve endoftalmi gibi görmeyi tehdit eden ciddi uzun dönem komplikasyon riski nedeniyle daha az sıklıkla kullanılan bir işlemdir. ^{117,135-138}

MikroRNA Oluşumu

Küçük ve protein kodlamayan RNA türü olan miRNA'lar, RNA polimeraz II (pol II) tarafından sentezlenmektedir. Son çalışmalar ile birçok farklı miRNA lokusunda

RNA polimeraz III (pol III) ile ilişkili tekrar dizilerinin gösterilmesi pol III'ün de miRNA transkripsiyonunda önemli yeri olduğunu göstermiştir.¹³⁹ MikroRNA'ların sentezi DNA'dan RNA pol enzimi aracılığıyla öncü miRNA (pri-miRNA) sentezlenmesiyle başlar. Saç tokası şeklinde oluşan pri-miRNA nükleusta bulunan bir RNaz olan Drosha ve RNA bağlanma noktası bulunan bir protein DGCR8/Pahsa'dan oluşan mikroişlemci komplekse bağlanır ve 60 ile 70 nükleotidlik parçalar haline getirilerek pre-miRNA haline dönüştürülür.¹³⁹⁻¹⁴⁸ Bir nükleer taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nükleer bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı bir şekilde pre-miRNA molekülü sitoplazmaya taşınır.¹⁴⁹ RNAaz III enzimi ailesinden bir endonükleaz olan Dicer, TAR RNA bağlayan protein (TRBP) veya Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) aktive eden protein (PACT) ile etkileşimde bulunarak sitoplazmada pre-miRNA'ı parçalayarak çift zincirli, 18-24 nükleotid uzunluğunda miRNA dubleksine dönüştürürler.¹⁵⁰ Dicerin diğer fonksiyonu da RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA İndüklenmiş Baskılayıcı Kompleksi; RISC) oluşumunda kilit rolü olmasıdır.¹⁵¹ Pre-miRNA'nın saplı, ilmikli yapısı dicer tarafından kesildikten sonra miRNA dubleksinden sadece bir tanesi RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksine katılır. RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksinin ihtiva ettiği RNAaz olan Argonaute'un yardımı ile bu iki iplikten 5' ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse katılır. Bu komplekse dahil olan yapı kılavuz iplik (guide iplik) olarak isimlendirilir. Diğer kılavuz olmayan ve yolcu iplik olarak adlandırılan iplik RISC kompleksi tarafından sindirilir. miRNA'lar aktif RISC kompleksine katıldıktan sonra, ya Argonaute proteinleri aracılığıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun engellenmesine neden olurlar.¹⁵²

MikroRNA Fonksiyonları

miRNA'lar hedef genlerin ekspresyonunu azaltarak protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar ve kendi nükleotid dizilerini tamamlayıcı hedef genleri tanıma özelliğine de sahiptirler. Kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliğine sahip miRNA'lar, RISC ile kompleks oluşturup baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlandıktan sonra protein translasyonunun inhibisyonuna ya da mRNA'nın yıkımına sebep olur.¹⁵³ miRNA'ların herbirinin birden fazla mRNA'nın

ekspresyonunu düzenleyebildiği ve mRNA'ların herbirinin de birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği belirlenmiştir.¹⁵⁴

MikroRNA, hedef mRNA'nın ORF (open reading frame-açık okuma çerçevesi) bölgesine veya hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlanır ve bağlanma pozisyonu miRNA kompleksinin mRNA'ya nasıl komplementer olduğuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. 3'UTR bölgesine tam olarak bağlanmayan, kusurlu, eksik komplementerlik gösterir ve translasyonun baskılanması ile sona ererken ORF bölgesi içine bağlanması kusursuz olan tam komplementerliği gösterir ve mRNA'nın Argonaute 2(Ago2) tarafından yıkımı ile sonuçlanır.¹⁵⁴ Aynı zamanda, her bir miRNA'nın birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği ve her bir mRNA'nın da birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği görülmektedir.¹⁵⁴

miRNA ve Göz

miRNA'ların kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve göz hastalıklarında yeni terapötik ajanlar olabileceği düşünülmektedir.¹⁵⁵ miRNA'ların gözün gelişmesinde ve farklılaşmasında rol aldığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.¹⁵⁷⁻¹⁵⁸ Karali ve arkadaşları farelerde miRNA-9,-29c, -124a, -181a, -182, -184, -204'ün göz gelişiminde etkili olduğunu ve miRNA-184'ün lens ve korneada, diğerlerinin ise retinada eksprese olduğunu göstermişlerdir.¹⁵⁶ Ryan ve arkadaşları fare kornealarında 31 çeşit miRNA'nın eksprese olduğunu rapor etmişlerdir. Bunlardan miRNA-184 lens,kornea ve retinada,miRNA-182,-183,-205'in kornea ve limbusta eksprese olduğunu göstermişlerdir.¹⁵⁷

Anjiogenez ve miRNA

Wu ve arkadaşları endotel fonksiyonu ve anjiogenez ile ilgili yaptıkları çalışmada miRNA-126'nın anjiogenezini aktive ettiğini, miRNA-221'in ise inhibe ettiğini göstermişlerdir.⁶

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 20.08.2015 tarihli, 2015-254 numaralı onayı ile yapılan bu klinik çalışmaya Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Polikliniğine Ocak 2014-Ocak 2016 tarihleri arasında başvuran daha önce tedavi almamış, yeni primer pterjium tanısı alan 14'ü erkek, 10'u kadın olmak üzere toplam 24 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubu 9'u erkek, 15'i kadın olmak üzere 24 pterjium saptanmayan katarakt hastasından oluşmuştur. Hastalara tam oftalmolojik muayenenin yanı sıra detaylı bir fundus muaynesi uygulanmıştır. Primer pterjium tanısı konan, sistemik problemi olmayan(diyabet,hipertansiyon v.b.) ve daha önce tedavi almamış 35-80 yaş grubundaki hastalar çalışma kapsamına alınmıştır.Kontrol grubundaki bireyler sistemik problemi olmayan ve daha önce okuler cerrahi geçirmemiş 35-80 yaş grubundaki kişilerden seçilmiştir.

Doku Örneklerinin Toplanması ve Saklanması:

Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Göz Hastalıkları Ana Bilim Dalına başvuran ve pterjium tanısı konulan 24 hasta (hasta grubu) ve katarakt tanısı konulan 24 kişi (kontrol grubu) olmak üzere toplam 48 birey çalışmaya dahil edilmiştir.Bu bireylerden miRNA analizi için cerrahi olarak eksize edilmiş pterjium (hasta grubu) ve sağlıklı konjonktiva (kontrol grubu) doku örnekleri RNA LATER'lı tüplere alınmıştır. Doku örneği alındıktan sonra en az 5 kez yavaşça alt-üst edilerek karıştırılmış ve alınan örnekler oda sıcaklığında 2 saatten daha uzun bekletilmeden -80°C'lik derin dondurucuda saklanmıştır.

miRNA EKSPRESYON PROFİLLEMESİ:

miRNA ekstraksiyonu:

-80°C'lik derin dondurucuda saklanan plazmalardan miRNA ekstraksiyonu, miRNA izolasyon kiti (High Pure miRNA Isolation Kit-Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Her bir plazma örneğinden elde edilen total miRNA'nın konsantrasyonu "NanoDrop 2000 Spektrofotometre" (Thermoscientific, USA) cihazı ile ölçülmüştür.. Bu miRNA'lar daha ileri çalışmalar yapıncaya kadar yine -80°C'deki derin dondurucuda saklanmıştır.

İzole edilen miRNA'lar Reverse Transcription kit (Fluidigm, USA) ile cDNA'ya dönüştürülmüştür ve analiz gününe kadar -20°C'de saklanmıştır. cDNA'lar Arrayler üzerinde hedef miRNA'lar için yüksek kapasiteli Real-Time PCR sistemi (Fluidigm, Biomark, USA) kullanılarak analiz edilmiştir.

cDNA eldesi, Preamplifikasyon ve RT-PCR ile miRNA analizi

cDNA Hazırlanması:

Aşağıdaki karışım hazırlanmıştır. Bu karışım 96 örneğin cDNA reaksiyonu için yeterlidir. (ekstra hacimler hesaplamaya dahil edilmiştir)

RT Buffer	168 µL
RT Primer Mix	84 µL
DNase, RNase-free su	84 µL
RT Enzyme	84 µL

TOPLAM **420 µL**

Bu karışım bir 8'li strip tüpün tüm kuyularına 51 er µl olarak transfer edilmiştir. Buradan 8 kanallı pipet yardımı ile 3.5'er µl alınarak temiz bir 96'lık Plate'in tüm kuyularına pipetlenmiştir.

RNA örnekleri de her kuyuya, yukarıda transferi yapılan karışımların üzerine 3.5'er µl olmak üzere pipetlenmiştir. Plate film ile kaplanıp, plate karıştırıcıda 2000 rpm de 3 dakika karıştırılmıştır. Vorteks ile 2 saniye karıştırılıp, 4-5 saniye ara verilip bir kez daha vorteks ile 2 saniye karıştırılmıştır. Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edilip ve Plate Thermal Cyclers'a konularak aşağıdaki program çalıştırılmıştır.

37°C 60 dakika

95°C 5 dakika

4°C ∞

Thermal programın sonunda plate'in oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. (deney bitiminde yüzeyi sıcak olabilir) Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bir plate taşıyıcı üzerine konulmuştur. (plate'in kaymaması ve kıpırdamaması için gereklidir). Film açılmıştır. Bir rezervuara 5 mL kadar DNase, RNase-free su konulmuştur. Plate'in her kuyusuna 28 µl bu sudan eklenmiştir. Yeni bir film ile plate kaplanıp, plate karıştırıcıda 2000 rpm de 3 dakika karıştırılmıştır. Vorteks ile 2 saniye

kariştirilip, 4-5 saniye ara verilip bir kez daha vorteks ile 2 saniye kariştirilmiştir. Plate el ile alt üst edilerek (bir kaç kez) kariştirilmiştir. Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Preamplifikasyon Hazirlanması:

Aşağıdaki karişim hazirlanmiştir. Bu karişim 96 örneğın Preamplifikasyon reaksiyonu için yeterlidir (ekstra hacimler hesaplamaya dahil edilmiştir)

PreAMP Buffer	230 µL
PreAmp Master Mix	92 µL
PreAMP Primer Mix	230 µL
DNase, RNase-free su	322 µL
PreAMP Universal Primer	46 µL

TOPLAM **920 µL**

Bu karişim bir 8'li strip tüpün tüm kuyularına 113 er µl olarak transfer edilmiştir. Buradan 8 kanallı pipet yardımı ile 8 er µl alınarak temiz bir 96'lık Plate'in tüm kuyularına pipetlenmiştir.

Bir önceki aşamada sulandırılmış olan cDNA örneklerinden her kuyuya 2 şer µl olmak üzere pipetlenmiştir. Plate, film ile kaplanıp, plate kariştiricıda 2000 rpm'de 3 dakika kariştirilmiştir. Vorteks ile 2 saniye kariştirilmiştir. Plate santrifüjünde 1 dakika santrifüj edilip ve Plate Thermal Cycler'a konularak aşağıdaki program çalıştırılmıştır.

95°C 15 dakika

94°C 30 saniye

60°C 3 dakika

4°C ∞

12 döngü

Thermal programın sonunda plate'in oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir (deney bitiminde yüzeyi sıcak olabilir). Plate santrifüjde 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bir mikrosantrifüj tüpünde, 52 µl Exonuclease I ve 78 µl DNA suspension buffer (Teknova) pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.. Bir adet 8'li strip tüp alınarak tüm kuyulara bu karışımdan 16'şar µl pipetlenmiştir. (bu strip tüp kapatılarak derin dondurucuda saklanıp bir sonraki deneyde kullanılabilir) PreAmp plate'inin filmi açılmıştır. Her kuyuya 1.0 µl bu karışımdan pipetlenmiştir. Plate yeni bir film ile kapatılır, plate karıştırıcıda 2000 rpm'de 3 dakika karıştırılmıştır. Vortex ile 2 saniye karıştırılmıştır (bu karıştırma 2 kez daha her defasında 4-5 saniye ara vererek tekrarlanır). Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Plate Thermal Cycler'a konularak aşağıdaki program çalıştırılmıştır.

37°C 15 dakika

95°C 5 dakika

4°C ∞

Thermal programın sonunda plate'in oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. (deney bitiminde yüzeyi sıcak olabilir).Plate santrifüjde 1 dakika santrifüj edilmiştir. Film açılmıştır. Her kuyuya 39.2 µl DNase, RNase free su eklenmiştir. Yeni bir film ile plate kapatılıp, plate karıştırıcıda 2000 rpm'de 3 dakika karıştırılmıştır. Vortex ile 2 saniye karıştırılmıştır. (bu karıştırma 2 kez daha her defasında 4-5 saniye ara vererek tekrarlanır) Plate el ile alt üst edilerek (bir kaç kez) karıştırılmıştır. Plate santrifüjde 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Dynamic Array Hazırlanması:

Bu aşama da 6 ayrı adım vardır;

1. Dynamic Array'in hazırlanması (PRIME edilmesi),
2. Test Plate'inin hazırlanması,
3. Örneklerin hazırlanması,
4. Dynamic Array'e pipetlemelerin yapılması,
5. Dynamic Array'in IFC Controller'a yüklenmesi,
6. Dynamic Array'in BioMark'da çalışılması.

1.Dynamic Array'in Hazırlanması:

Bir adet Dynamic Array'e kontrol sıvıları enjekte edilir ve Dynamic Array IFC Controller'a yüklenerek Dynamic Array çipleri kullanıma hazır hale getirilmiştir. Bu işlem tam 20 dakika sürmüştür. İşlem devam ederken aşağıdaki aşamaya geçilmiştir.

2. Test Plate'inin Hazırlanması:

Aşağıdaki karışım hazırlanmıştır. Bu karışım bir adet Test Plate'i için yeterlidir (ekstra hacimler hesaplamaya dahil edilmiştir.)

PCR Universal Primer	180 µL
2x Assay Loading Reagent (Fluidigm, cat. no. PN 360 µL 85000736)	360 µL
RNase-free water	180 µL
TOPLAM	720 µL

Bu karışım bir 8'li strip tüpün tüm kuyularına 88'er µl olarak transfer edilmiştir. Test plate'i paketinden çıkarılıp ve bir plate taşıyıcı üzerine konulmuştur. (plate'in kaymaması ve kırıdamaması için gereklidir) 8'li strip tüpten 6'şar µl alınarak test Plate'inin tüm kuyularına pipetlenmiştir.

Test Plate'i film ile kaplanmıştır. Plate karıştırıcıda 10 saniye vortekslenmiştir. Bu işlem 3 kez her defasında 4-5 saniye ara verilerek tekrarlanmıştır. Plate santrifüjde 2 dakika santrifüj edilmiştir.

3. Örneklerin Hazırlanması:

Aşağıdaki karışım hazırlanmıştır. Bu karışım bir set (96 örnek) için yeterlidir (ekstra hacimler hesaplamaya dahil edilmiştir).

qPCR Master Mix	360 µL
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm, PN 100-3738)	36 µL
RNase-free water	84 µL

TOPLAM **480 µL**

Bu karışım bir piko plate'in ilk kolonunun 8 kuyusuna (1'er atlayarak) 58'er µl olarak transfer edilmiştir. Bu karışımdan 4'er µl temiz bir 96'lık plate'in tüm kuyularına pipetlenmiştir. Sulandırılmış olan PreAmplifiye ürünlerin üzerindeki film açılmıştır. Her bir PreAmplifiye örnekten 2'şer µl bu plate' e transfer edilmiştir. Plate yeni bir film ile kaplanmıştır. Plate, plate karıştırıcıda 2000 rpm'de 3 dakika karıştırılmıştır. Vortex ile 2 saniye karıştırılmıştır (bu karıştırma 2 kez daha her defasında 4-5 saniye ara vererek tekrarlanır). Plate el ile alt üst edilerek (bir kaç kez) karıştırılmıştır. Plate santrifüjde 1 dakika santrifüj edilmiştir.

4. Dynamic Array'e Pipetlemelerin Yapılması:

Test pipetlemeleri için Viaflo Voyager (12.5 µl) de şu program yapılmıştır. Aspirate 4.75 µl, Dispense 4.50 µl. Tüm kuyularda ki testler bu şekilde Dynamic Array'e transfer edilmiştir.

Örnek pipetlemeleri için Viaflo Voyager (12.5 µl) de test için yapılan program kullanılmıştır. Tüm kuyulardaki örnekler bu şekilde Dynamic Array'e transfer edilmiştir.

5. IFC Controller'a Dynamic Array'in Yüklenmesi:

Dynamic Array IFC Controller'a yerleştirilmiştir ve LOAD Seçeneği seçilerek yükleme işlemi başlatılmıştır. Bu işlemi başlattıktan sonra BioMark Data Collection

yazılımı başlatılmıştır ve “Double Click to Turn Lamp On” kısmına çift tıklanarak BioMark’ın lambası çalıştırılmıştır. Lambanın ısınması 20 dakika sürmüştür.

6.Dynamic Array’in RT-PCR cihazında (BioMark) çalışılması:

Dynamic Array IFC Controller’den alınır. Dynamic Array altındaki mavi filmin uzaklaştırıldığından emin olunmuştur. Dynamic Array yüzeyinin temiz olup olmadığı kontrol edilmiştir. Dynamic Array BioMark’a barkod kısmı dışarı bakacak şekilde yerleştirilmiştir.

BioMark Data Collection yazılımı yardımı ile Dynamic Array çalıştırılmıştır. Verilerin kaydedileceği yer ve Dosya adı seçildikten sonra diğer sayfa da. “Gene Expression” seçilmiştir. Passive Reference Dye olarak “ROX” seçilmiştir. “Probe Type” kısmında “EvaGreen” seçilmiştir.

Sonraki ekranda Prokoller arasından “miRNA EvaGreen Protocol” seçilmiş ve program başlatılmıştır.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sürekli ölçümlere ait normallik kontrolleri Shapiro Wilk testi ile test edilmiş ve normal dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Hasta ve kontrol grupları arasında ortalama yaş ve cinsiyet açısından olası farklılıkları tesbit etmek için sırasıyla Student t testi ve Pearson kare testinden yararlanılmıştır. İstatistik anlamlılık olarak $p < 0.05$ alınmıştır.miRNA ekspresyon verilerinin karşılaştırılması gruplar arası gen ekspresyonu seviyesindeki kat olarak artış/azalış şeklinde ifade edilmiştir.miRNA’da grupları karşılaştırmak için Basic Student T testinden yararlanılmıştır.Verilerin analizinde kullanılan Basic Student T testinde anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak incelendi.Normalizasyon için miRNA çalışmalarında tercih edilen global ortalama normalizasyonu kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmaya 24 hasta (%50) ve 24 kontrol (% 50) olmak üzere toplam 48 kişi alınmıştır.Hasta grubuna 14 erkek (%58), 10 kadın (%42), kontrol grubuna 9 erkek (%38), 15 kadın (%62) dahil edildi. Hasta grubun yaş ortalaması $61.75 \pm 12,28$ yıl, kontrol gurubunun yaş ortalaması 62.96 ± 9.85 yıl olarak bulundu. Kontrol ve hasta grupları arasında cinsiyet ve yaş açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.P değerleri sırasıyla 0,248 ve 0,709 olarak saptandı.

Tablo 1:Hasta ve kontrol grubu arasındaki cinsiyet dağılımı

Cinsiyet	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	p Değeri
Kadın	10 (%41.7)	15 (%62.5)	P=0.248
Erkek	14 (%58.3)	9 (%37.5)	
TOPLAM	24 (%100,0)	24 (%100,0)	

Tablo 2:Hasta ve kontrol grubu ortalama yaşları

Grup	Sayı	Ortalama	Standart Sapma	p Değeri
Kontrol Grubu Yaş Ortalaması	24	62.96	9.858	P=0.709
Hasta Grubu Yaş Ortalaması	24	61.75	12.284	

Hasta ve kontrol gruplarından alınan pterjium ve konjonktiva doku örneklerinde toplam 6 miRNA (126-182-183-184-205-221)analizi yapıldı.

Hasta grubundaki bireylerin hepsine pterjium eksizyonu yapıldı ve cerrahi alan konjonktival limbal otogreft ile kapatıldı.

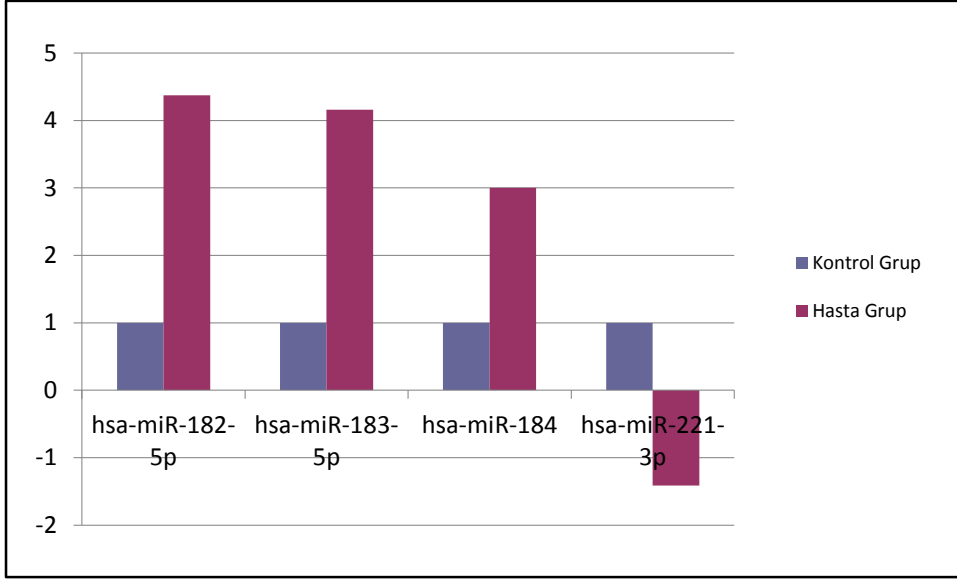
Kontrol grubunda katarakt cerrahisinin bitiminde üst bulber konjonktivadan doku örneği alındı.

Tablo 3: Hasta ve kontrol gruplarında konjonktiva dokusu miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.

	AVG Delta(Ct)	AVG Delta(Ct)	Standard Sapma	Standard Sapma
	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu
hsa-miR-205-5p	0,560063	1,627907	0,527752	0,392692
hsa-miR-126-3p	-0,560063	-1,627907	0,527752	0,392692
hsa-miR-182-5p	4,426898	2,297558	1,049066	0,848375
hsa-miR-183-5p	5,268197	3,211962	1,221359	0,765
hsa-miR-184	4,494587	2,90838	1,229917	1,001604
hsa-miR-221-3p	2,65611	3,155257	0,755027	0,732124

Tablo 4: Hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde eksprese olan miRNA'lar

	p-değeri (kontrol grubuna göre)
	Hasta Grubu
hsa-miR-182-5p	0,000006
hsa-miR-183-5p	0,010566
hsa-miR-184	0,010225
hsa-miR-221-3p	0,027082



Şekil 7 : Hasta grubunda anlamlı olarak eksprese olan miRNA ve ekspresyon oranlarının grafiksel ifadesi

TARTIŞMA

Pterijum, patogenezinde özellikle UV-B ışınlarına maruziyet sonucu p53 gen değişikliği ile oluşan, korneaskleral limbal kök hücre yetmezliği ile ilgili sık görülen bir okuler yüzey hastalığıdır¹.

Pterijum patogenezinde VEGF-A'nın da önemli bir rolü vardır. Normal konjonktival hücreler ile karşılaştırıldığında pterijum doku örneklerinde daha yüksek VEGF-A ve mesajcı RNA (mRNA) düzeyleri gözlemlenmiştir. Bu durum da pterijum dokularının proliferere olma eğilimini açıklar ve VEGF - A'nın kayda değer terapötik hedef olabileceğine işaret eder.¹⁵⁹

Ryan ve arkadaşları fare kornealarında 31 çeşit miRNA' nın eksprese olduğunu rapor etmişlerdir. Bunlardan miRNA-184'ün lens,kornea ve retinada,miRNA-182,-183,-205'in de kornea ve limbusta eksprese olduğunu göstermişlerdir.¹⁵⁸ Biz de çalışmamızda pterijum gelişiminde etkin rol oynayabileceğini düşündüğümüz küçük genetik materyal olan miRNA'lara odaklandık. Böylece pterijum patogenezi, erken tanı ve tedavisine farklı bir bakış açısı getirmeyi amaçladık.

MiRNA moleküllerinin fonksiyonları arasında metabolik regülasyon, hafıza ve sinaptik gelişim, anjiogenez, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, tümörögenez, farklılaşma ve büyüme kontrolü yer almaktadır. Bu moleküller hücrelerin normal fonksiyonlarında görev aldıkları için meydana gelen miRNA kusurlarında çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Kardiyovasküler hastalıklar, inflamatuvar hastalıklar, infeksiyonlar, gelişimsel bozukluklar, kas bozuklukları, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser ile ilişkileri ortaya konulmuştur.¹⁶⁰Bu ilişkilerden dolayı özellikle neoplastik ve anjiogenezis ile giden hastalıklarda miRNA'ları hedefleyen tedavi yaklaşımları araştırılmaya başlanmıştır.

Literatüre bakıldığında miRNA ile pterijum arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar mevcuttur.

Ke-Hung Chien ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada pterijum ciddiyeti arttıkça miRNA-145 seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada pterijum genişliği ile miRNA-145 seviyeleri arasında negatif korelasyon tesbit edilmiştir.¹⁶¹

Wanwen Lan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise miRNA-215 seviyesinin pterijum dokusunda, sağlıklı konjonktival dokulara göre 2 kat daha az

olduğu tesbit edilmiştir. Aynı çalışmada miRNA -215, primer pterjium fibroblast hücre kültürüne eklendiğinde hücre proliferasyonunda azalma tesbit edilmiştir.¹⁶²

Pterjium gelişiminde; kuru, sıcak bir iklimde yaşamak ve ultraviyole radyasyona maruz kalmak gibi çoğu çevresel olan risk faktörleri mevcuttur.¹⁶³

Konjonktival epitel ve subkonjonktival bağ dokulardan oluşan ptejiyumlar; bowman katmanı bozulması, elastoz, epitelyal-mezenkimal geçiş ve inflamatuvar neovasküler fibroblastik stroma varlığı ile karakterize edilir.¹⁶⁴

Pterjium oluşumunda hem hücresel proliferasyon hem de apoptozisin artışı önemli rol oynar.¹⁶⁴ Bunlar şüpheli premalignite işaretleridir. Aslında pterjium dokularının, premalign dokularla birkaç ortak özelliği vardır. Bunlar epitelyal proliferasyon, goblet hücre hiperplazisi, anjiogenez, inflamasyon ve elastoz gibi özelliklerdir.^{164,167}

Buna bağlı olarak, pterjiuma yönelik tedavi geliştirme çabaları, büyümeyi biyomoleküler modülasyondan yararlanarak durdurmaya¹⁶⁸ ve anjiyogenez ile neovaskülarizasyonu durdurmaya odaklanmıştır.¹⁶⁹

Mevcut çalışmamızda oküler pterjium dokuları ile sağlıklı konjonktiva dokuları arasında miRNA -126, miRNA-182, miRNA-183, miRNA-184, miRNA-205 ve miRNA-221'in ekspresyon oranlarını karşılaştırdık. miRNA-182, miRNA-183, miRNA-184'te hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı oranda artış tesbit ettik. miRNA-221'de ise hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı miktarda azalma tesbit ettik. miRNA-126 hasta grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat fazla eksprese olmasına rağmen, istatistiksel olarak 2 grup arasında anlamlı ilişki yoktu. miRNA-205 ise hasta grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat daha az eksprese olmasına rağmen 2 grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark tesbit edilemedi.

Lee ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada pterjium dokusunda vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonu gösterilmiştir.⁵

Wu ve ark. endotel hücrelerinde yaptığı çalışmada miRNA'ları anjiogenezi aktive ve inhibe edenler olarak ayırmışlardı.⁶ Anjiogenezi aktive edenleri; miRNA-126, miRNA-17-92, miRNA- 7b.f, miRNA-27b, miRNA-130a, miRNA-210, miRNA-378, miRNA-296 olarak tesbit ettiler. Anjiogenezi inhibe edenleri; miRNA-15b, miRNA-16, miRNA-20, miRNA-221, miRNA-222 ve miRNA-328 olarak tesbit ettiler. Bizim çalışmamızda da miRNA-221 ekspresyonunu hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı miktarda azalmış tesbit ettik. Ayrıca miRNA-

126 ekspresyonunu hasta grubunda kontrol grubuna göre 2 kat artmış olarak tesbit etmemize rağmen 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktu. Bu bulgular Wu ve arkadaşlarının çalışmasını destekler niteliktedir.

Yin G.R. ve arkadaşları miRNA-184 ile osteosarkom hücre kültürlerinde yapmış oldukları çalışmada kontrol grubuna göre; miRNA-184 mimik eklenen grupta hücre proliferasyonunu ve hücre invazyonunu anlamlı düzeyde artmış olarak tesbit etmişler. Yine aynı çalışmada miRNA-184 inhibitör eklenen grupta hücre proliferasyonu ve invazyonunun kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığını tesbit etmişler.¹⁷⁰ Bizim çalışmamızda da Yin ve arkadaşlarının çalışması ile uyumlu olacak şekilde miRNA-184 ekspresyonu hasta grubunda artmış olarak tesbit edildi.

Li He ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada normal pankreas duktal hücre kültürü (kontrol grubu), pankreas duktal adenokarsinom hücre kültürü ve miRNA-184 inhibitörü eklenmiş pankreas duktal adenokarsinom hücre kültüründe miRNA-184 ekspresyon seviyeleri, hücre proliferasyon ve invazyon düzeylerini karşılaştırmışlar. Bu çalışmada miRNA-184 ekspresyon düzeyi; pankreas duktal adenokarsinom hücre kültürü grubunda kontrol grubuna göre anlamlı oranda artmış olarak tesbit edilmiş. miRNA-184 inhibitörü eklenen grupta hücre proliferasyon ve invazyon yeteneklerinin, pankreas duktal adenokarsinom hücre kültür grubuna göre anlamlı oranda azaldığı tesbit edilmiş. Yine bu çalışmada miRNA-184 inhibitörü eklenen grupta proapoptotik protein kaspaz-3 ekspresyonunda artma tesbit edilmiş.¹⁷¹ Biz de çalışmamızda Li He ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde miRNA-184 ekspresyonunun hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artmış olduğunu tesbit ettik.

Bian D.L. ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada osteosarkomlu hücrelerde miRNA-182 ekspresyonunda artış tesbit etmişlerdir. Yine bu çalışmada miRNA-182 ekspresyonundaki artışın apoptozisi indüklediğini, hücre canlılığını, hücre proliferasyonunu, hücre migrasyon ve invazyon yeteneğini de inhibe ettiğini tesbit etmişlerdir.¹⁷²

Song C. ve ark.'larının yapmış oldukları çalışmada miRNA-183/182/96 küme ekspresyonunun meme kanserli olgularda artmış olduğu tesbit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada miRNA-183/182/96 küme ekspresyonunun artışı; lokal nüks, metastaz ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir.¹⁷³ Yapmış olduğumuz çalışmada daha önceki çalışmaları destekler şekilde mi-RNA 182 ve 183 ekspresyonunun hasta grubunda

kontrol grubuna göre yaklaşık 4 kat arttığı tesbit edildi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Miao F. ve ark.'larının yapmış oldukları çalışmada pankreas adenokarsinomlu olgularda miRNA-183-5p ekspresyonunun anlamlı düzeyde arttığı tesbit edilmiştir. Bu çalışmada miRNA-183-5p inhibitörü eklendiğinde pankreas adenokanserli dokularda hücre proliferasyonunun azaldığı tesbit edilmiştir.¹⁷⁴ Benzer şekilde bizim çalışmamızda da miRNA-183 ekspresyonu pterjiyum doku örneklerinde sağlıklı konjunktiva doku örneklerine göre anlamlı düzeyde arttığı gösterilmiştir.

Li P. ve arkadaşları kolorektal kanserlerde miRNA-205 ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir. Bu çalışmada miRNA-205 ekspresyonundaki artışın kolorektal kanser hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve invazyon yeteneklerini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca miRNA-205 seviyesi ile cAMP responsive element binding protein 1 (CREB-1) seviyesi arasında negatif korelasyon olduğu belirtilmiştir.¹⁷⁵ Guohui N. ve arkadaşları nazofarenks kanserli dokularda miRNA-205 ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Ayrıca miRNA-205 ekspresyonundaki artışın nazofarenks kanser hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve invazyon yeteneklerini arttığını tesbit etmişlerdir.¹⁷⁶ Bizim çalışmamızda ise hasta grubunda kontrol grubuna göre miRNA-205 ekspresyonunda yaklaşık 2 kat azalma tesbit ettik. (2 grup arasında miRNA-205 ekspresyonu açısından anlamlı istatistiksel fark yoktu.)

Bu sonuç Li P. ve arkadaşlarının çalışmasıyla uyumlu bulunurken Guohui ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma ile uyumsuz bulundu.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Hasta ile kontrol grubu arasında belirli miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında; kontrol grubuna göre hasta grubunda miRNA-182-5p, miRNA-183-5p, miRNA-184 ekspresyonunda anlamlı düzeyde artma, miRNA-221-3p ekspresyonunda ise anlamlı düzeyde azalma tespit ettik. Hasta grubunda kontrol grubuna göre miRNA-126-3p ekspresyonunda artma ve miRNA-205-5p ekspresyonunda azalma tesbit etmemize rağmen, bu bulgular istatistiksel açıdan anlamlı değildi.

Bununla birlikte miRNA'ların pterjium patogenezi ile ilişkileri şu ana kadar net bir şekilde ortaya konmamış ve yapılan çalışma sayıları sınırlı kalmıştır. Bu yüzden pterjium patogenezinde rol alan ancak etkinlikleri henüz ortaya konmamış moleküller olabilir. Yaptığımız çalışmadan yola çıkarak yeni çok merkezli çalışmalar yapılabilir ve pterjium tanı ve tedavisi ile ilgili yeni yöntemler geliştirilebilir.

Gelecekte, pterjium gelişimi açısından genetik ve çevresel risk faktörlerinin etkisi altında olan kişilere, hastalık gelişiminde rol oynadığı gösterilen miRNA'lara yönelik girişimler ile pterjium gelişimi ve cerrahi sonrası nüksler önlenebilir.

Primer ve nüks pterjiumlarda yapılacak miRNA analizleri ile; nüks pterjium gelişimi açısından risk altında olabileceği gösterilen kişilere önleyici cerrahi teknikler uygulanabilir ve çevresel risk faktörlerinden korunmak için yüksek oranda korunma sağlanabilir.

Sonuç olarak çalışmamızda hasta ile kontrol grubu arasında konjonktiva dokularında belirgin şekilde eksprese olan miRNA düzeylerinin karşılaştırılmasına yer verildi. Elde edilen sonuçlarla hasta sayısının daha fazla olduğu çok merkezli çalışmalar ile Primer Pterjium hastalığında eksprese olan, ekspresyonu azalan ya da artan miRNA düzeylerinin belirlenmesi ile yeni tanı ve tedavi yaklaşımları geliştirilebileceğini, bu çalışmanın bir öncü çalışma olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Di Girolamo N, Chui J, Coroneo MT, Wakefield D: Patogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Prog Retin Eye Res*, 2004;23: 195-228.
2. Dushku N, Mollykuty J, Schultz G, Corneal invasion Matrix Mettalloproteinase Expressing Altered Limbal Epitelial Basal Cells. *Arch Opththalmol/Vol 119*, May 2011
3. Dushku N, Reid TW. P53 expression in altered limbal basal cells of pingueculae, pterygia, and limbal tumors. *Curr Eye Res*. 1997 Dec;16(12) :1179-92
4. Xu S, microRNA expression in the eyes and their significance in relation to functions *Progress in Retinal and Eye Research* 28 (2009) 87–116
5. Lee DH, Cho HJ, Kim JT, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and inducible nitric oxide synthase in pterygia. *Cornea* 2001; 20: 738-42.
6. Wu F, Yang Z, Li G. Role of specific microRNAs for endothelial function and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;386:549-53
7. Kracher JH, Mannis MJ, Holland EJ, eds. *Cornea*. St Luis: Mosby; 1997:1;3-27
8. Thift RA, Friend J. Ocular surface evaluation. In Francois J, Brown SI, Itoi M, Editors: *Proceedings of the Symposium of the International Society for Corneal Research (Doc ophthalmol Proc series 20)* Junk, The Netherlands, 1980, The Hague.
9. Baum J. A histochemical study of corneal respiratory enzymes, *Arch Ophthalmol* 1963;70:59.
10. Records RE. The Conjunctiva and lacrimal system. In Tsman W, Jeager EA, Editors; *Duane's Foundations of clinical ophthalmology*, Philadelphia, 1994, JBLipincott.
11. Shapiro MS, Friend J, Thoft RA. Corneal reepitalization from conjunctiva, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;21:35 62
12. Thoft RA, Friend J. Biochemical transformation of regenerating ocular surface epithelium, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16:14-20.

13. Wilhelmus KR, Huang AJW, Hwwang DG, Parrish CM, Sutpuin JE, Whitsett, JC, External Disease and Cornea Basic Science Course American Academy of Ophthralmology 1999-2000;(8):11-3,39-54.
14. Hall PA, Watt FM; Stem Cells: The generation and maintenance of celluler diversity. Development 1989;106:619.
15. Hume WJ, Potten CS; The ordered columnar structure of Mouse filiform papillae. J Cell Sci 1976;22:419.
16. Lauker RM, Dong G, Chen SZ, et al: Relative proliferative rates of limbal and corneal epithelia: Implications of corneal epithelial migration, circadien rhyt and suprabasally located DNA synthesizing keratinocytes. Invest Ophthalmol Vis Sci 1991;32:1864.
17. Schermer A, Galvin S, Sun T-T: Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests a limbal location of corneal epithelial stem cells. J Cell Biol 103:49,1986.
18. Zieske JD, Bukusoglu G, Yankauckas MA: Characterization of a potential marker of corneal epithelial stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci: 1992;33;143.
19. Pizzarello LD, Jacobiec FA. Bowen's Disease of Conjunctiva. Amisnomer, In Jacobiec FA (ed); Ocular and adnexial Tumors. B110.Friedenwald JS, Bushke W: Some factors concerned in the mitotic and wound healing activities of the corneal epithelium. Trans Am Ophthalmol Soc 42:371,1944.
20. Duke-Elder. System of Ophthalmology. Vol III, part II. Henry Kimpton London, 1965;648.
21. Özeç AV, Erdoğan H, Toker Mİ, Özer H, Arıcı MK. Pterjium etiyopatogenezinde P53 ve apoptozisin rolü. C.Ü. Tıp Fak. Dergisi 2008;30:58-67.
22. Duke-Elder SS: Pterygium: Diseases Of The Outher Eye. System Of Ophthalmology G.Britain. The C.V. Mosby Company. 1969;8:573-85.
23. Duman S: Pterjiumun insidansı, prevalansı ve klinik tablosu XXV. Ulusal Türk Oftalmoloji Kongresi 1991;l:85-7.
24. Bilek B, Keklikçi U, Şakalar YB, Ünlü MK, Çaça İ. Primer pterjium eksizyonunda amnion membran grefti ve intraoperatif mitomisin C yöntemlerinin karşılaştırılması. Dicle Üniv. Tıp Fak.Tıp Dergisi 2008;35:44-49.
25. Coroneo MT, Di Girolamo N, Wakefield D. The pathogenesis of pterygia. Curr Opin Ophthalmol. 1999; 10: 282-288.

26. Chowers I, Pe'er J, Zamir E, Livni N, Ilisar M, Frucht-Pery J. Proliferative activity and p53 expression in primary and recurrent pterygia. *Ophthalmology*. 2001;108:985-988.
27. Öksüz H, Tamer C. Pterygium cerrahisinde alt temporal konjonktival greft uygulaması. *Mustafa Kemal Üniv. Tıp Fak. Fırat Tıp Dergisi* 2006;11:190-192.
28. Touhami A, Di Pascuale MA, Kawatika T, Del Valle M, Rosa RH Jr, Dubovy S, Tseng SC. Characterisation of myofibroblasts in fibrovascular tissues of primary and recurrent pterygia. *Br J Ophthalmol* 2005;89:269-74.
29. Jaros PA, Deluisa VP. Pinguecula and pterygia. *Surv Ophthalmol* 1988;33:41
30. Aslankurt M, Yazıcı AT, Astam N. Pterygium etiolojisi. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2003;1:39-42.
31. Duke-Elder SS. Diseases Of The Outer Eye. *System Of Ophthalmology*. G. Britain. The C.V. Mosby Company. 1970;573-83.
32. Hilgers JHC. Pterygium: its incidence, heredity and etiology. *Am J Ophthalmol* 1960;50:635-644.
33. Moran DJ, Hollands FC. Pterygium and ultraviolet radiation: a positive correlation. *Br J Ophthalmol* 1984;68:343-346.
34. Taylor HR. Aetiology of climatic droplet keratopathy and pterygium. *Br J Ophthalmol* 1980;64:154-163.
35. Taylor HR, West S, Munoz B, Rosenthal FS, Bressler SB, Bressler NM. The long-term effects of visible light on the eye. *Arch Ophthalmol* 1992;110:99-104.
36. Coroneo MT. Pterygium as an early indicator of ultraviolet insolation: a hypothesis. *Br J Ophthalmol* 1993;77:734-739.
37. Forsius H, Maertens K, Fellman J. Changes of the eye caused by the climate in Rwanda, Africa. *Ophthalmic Epidemiol*, 1995;2:107-113.
38. Cameron ME. Pterygium throughout the world. Springfield, Ill: Charles C Thomas, 1965.
39. Buratto L, Phillips RL, Carito G. Pterygium Surgery, Thorofare: Slack Incorporated, 2000.
40. Duke-Elder S. Pterygium. In: Duke-Elder. Diseases of the outer eye. Conjunctiva. In: *System of ophthalmology*, vol 8; pt.1, St. Louis, C. V Mosby, 1965:573-85.
41. Detels R, Dhir SP. Pterygium: a geographical study. *Arch Ophthalmol* 1967;78:485-491.
42. Karai I, Horiguchi S. Pterygium in welders. *Br J Ophthalmol* 1984;68:347-349.

43. Mc Carty C, Fu CL, Taylor HR. Epidemiology of pterygium in Victoria, Australia. *Br J Ophthalmol* 2000;84:289-292.
44. Anduze AL. Pterygium surgery with mitomycin-C: Ten-year results. *Ophthalmic Surg Lasers*, 2001; 32: 341-5.
45. Garg P, Patogenesis of pterygium: role of eph receptors and ligand ephrins, *Can J Ophthalmol* 2009;44:138-40.
46. Chui J, Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT. The patogenesis of pterygium: current concepts and their therapeutic implications. *Ocul Surf* 2008;6:24-43.
47. Detorakis ET, Zaravinos A, and Spandidos DA: Growth factor exspression in ophtalmic pterygia and normal conjunctiva. *Int J Mol. Mrd* 2010;25:513-516.
48. Di Girolamo N, Coroneo MT, Wakefield D: UVB elicited induction of MMP expression in human ocular surface epithelial cells is mediated trhough the ERK1/2MAPK dependent pathway. *Invest Ophthalmol* 2003;44:4705-4714.
49. Blaudschun R, Sunderkotter C, Brenneisen P, et al: Vascular endotelial growt factor causalliy contributes to the angiogenic response upon ultraviolet B irradiation in vivo. *Br J Dermatol* 2002;146:581-587.
50. Ma DHK, Tsai RJ, Chu WK, Kao CH, Chen JK: Inhibition of vascular endothelial cell morfogenesis in cultures by limbal epithelial cells. *Inv Ophthalmol* 1999;40:1822-1828.
51. Leonard PK, Jocelyn LL, Tan DTH; Current concepts and techniques in pterygium treatment. *Curr Opin Ophthalmology* 2007;18:308-313.
52. Reisman D, Fadden JW, Lu G; Loss of heterozygosity and p53 expression in pterygium. *Cancer Lett* 2004;206:77-83.
53. Tan DT, Tang WY, Liu YP, et al. Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium. *Br J Ophthalmol* 2000; 84: 212-216.
54. Di Girolamo N, Chui J, Coroneo MT, Wakefield D; Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Prog Retin Eye Res* 2004;23: 195-228.
55. Mauro J. Foster CS. Pterygia: Pathogenesis and the role of subconjunctival bevacizumab in treatment. *Semin Ophthalmology* 2009;24,130-134.
56. Hosseini H, Nejabat M, Khalili MR. Bevacizumab (Avastin) a potential novel adjunct in the management of pterygia. *Med Hypotheses* Mar 2007;26:69:925-927.

57. Kria L, Ohira A, Amemiya T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, transforming growth factor-and tumor necrosis factor-in the pterygium. *Acta Histochem* 1996;98:195-201.
58. Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J: Synergistic effects of vascular endothelial growth-factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 1993;69:508-517.
59. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-447.
60. Prior BM, Yang HT, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training. *J App Physiol* 2004;97:1119-1128.
61. Aspiotis M, Tsanou E, Gorezis S, et al. Angiogenesis in pterygium: Study of microvessel density, vascular endothelial growth factor, and thrombospondin-1. *Eye* 2006;21:1095-1101.
62. Taraboletti G, Roberts D, Liotta LA, Giavazzi R. Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: A potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol* 1990;111:765-772.
63. Roberts DD. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. *FASEB J* 1996;10:1183-1191. Nov; 33:1991-1993.
64. Altıntaş AGK, Can B, Onursever N, Onursever A, Saran Y, Can İ. Pterijum Dokusunun Histopatolojik Özelliklerinin Farklı Yöntemlerle İncelenmesi. *MN Oftalmoloji* 2003;10:327-331.
65. Butrus SI, Ashraf MF, Laby Dm, Rabinowitz AI, Tabbara SO, Hidayat AA. Increased Number of mast cells in pterygia. *Am J Ophthalmol* 1995;119:236-7.
66. Ratnakar KS, Goswamy V, Agarwal LP. Mast cells and pterygium. *Acta Ophthalmol* 1976;54:363-8.
67. Arvas S, Öztürk M, Toparlak T, Yolar M, Yetik H, Özkan Ş. Pterijumlu olgularda ultrastrüktürel değerlendirme. *T Oft Gaz* 2002;32:88-93.
68. Erkılıç K, Özkırış A, Öner A, İlgün N, Doğan H. Primer ve nüks pterijum cerrahisinde serbest limbal konjonktival otogreftleme yönteminin uzun dönem sonuçları. *T Oft Gaz* 2002;32:215-9.
69. Ansari MW, Rahi HS, Shukla BR. Pseudoelastic nature of pterygium. *Br J Ophthalmol* 1970;54:473-6.
70. Cordelia C, Liu VP, Tan DTH. Ocular surface changes in pterygium. *Cornea*, 2002;21:38-42.

71. Şingar E, Katırcioğlu YA, Onat MM, Altınparmak UE, Budak K, Duman S. Pterijum Cerrahisinin Kornea Topografisi Bulguları Üzerine Etkisi. *MN Oftalmoloji* 2009; 16: 117-120.
72. Grimmert MR, Holland EJ. Management of pterygium. *Cornea* 1997;18:73-83.
73. Budak K, Khater TT, Friedman NJ, Koch DD. Corneal topographic changes induced by excision of perilimbal lesions. *Ophthalmic Surg Lasers* 1999;30: 458-64.
74. Stern GA, Lin A. Effect of pterygium excision on induced corneal topographic abnormalities. *Cornea* 1998;17:23-27.
75. Lin A, Stern GA. Correlation between pterygium size and induced corneal astigmatism. *Cornea* 1997;17:22-27.
76. Hansen A, Norn M. Astigmatism and surface phenomena in pterygium. *Acta Ophthalmol* 1980;58:174-81.
77. Avisar R, Loya N, Yassur Y, et al. Pterygium-induced corneal astigmatism. *Isr Med Assoc J.* 2000;2:14-5.
78. Hochbaum DR, Moskovitz SF, Withscaffer JD. A quantitative analysis of astigmatism induced by pterygium. *J Biomech* 1977;10:735-46.
79. Jaros PA, De Louis VP. Pingecula and pterygia. *Surv Ophthalmol* 1998;33;41-49
80. Oldenburg JB, Grabus J, McDonnell JM, McDonnell PJ: Conjunctival pterygia: mechanism of corneal topographic changes. *Cornea* 1990; 9: 200-204.
81. Buratto L, Phillips RL, Carito G: Pterygium Surgery. Amy Drumond D. Copyright by slack incorporated 2000:5-6.
82. Twelker JD, Bailey IL, Mannis MJ, Satarino WA. Evaluating pterygium Severity. A survey of corneal specialists. *Cornea* 2000;19:292-6.
83. Sebban A, Hirst LW. Treatment of pterygia in Queensland. *Aust N Z J Ophthalmol* 1991; 19:123-7.
84. Küçükerdönmez C, Akova YA, Altınörs DD. Comparison of conjunctival autograft with amniotic membrane transplantation for pterygium surgery surgical and cosmetic outcome. *Cornea* 2007;26:407-413.
85. Tan DTH, Chee SP, Dear KBG, et al. Effect of pterygium morphology on pterygium recurrence in a controlled trial comparing conjunctival autografting with bare sclera excision. *Arch Ophthalmol* 1997;115:1235-1240.
86. Cionni RJ, Watanabe TM. Buratto L, Phillips RL, Carito G. Historical background. In: *Pterygium Surgery*, Thorofare: Slack Incorporated 2000:5-6.

87. Yılmaz S, Yüksel T, Maden A. Pterjium Tedavisinde Farklı Cerrahi Tekniklerin Karşılaştırılması: MN Oftalmoloji 2007;14: 47-50.
88. Arslan OŞ. Pterjiumda Güncel Cerrahi Yaklaşımlar: İ.Ü.Cerr. Tıp Fak. Oftalmol Kurs Ko 2005;39:3-38
89. Saifuddin S, Baum KL. Recurrent pterygia-laser therapy: a preliminary report. Indian J Ophthalmol 1993; 41:17-9.
90. Apaydın KC, Duranoğlu Y, Saka O, Demirbaş NL. Argon laser treatment of pterygium. Ann Ophthalmol 2002;34:26-9.
91. Tsubota K. Application of erbium: YAG laser in ocular ablation. Ophthalmologica 1990;200:117-122.
92. Nakamura K, Bissen-Miyajima H, Shimmura S, Tsubota K. Clinical application of Er: YAG laser for the treatment of pterygium. Ophthalmic Surg Lasers 2000;31:8- 12.
93. Talu H, Taşındı E, Çiftçi F, Yıldız TF. Excimer laser phototherapeutic keratectomy for recurrent pterygium. J Cataract Refract Surg 1998;24:1326-32.
94. Krag S, Ehlers N. Excimer laser treatment of pterygium. Acta Ophthalmol 1992;70:530-3.
95. Fossarello M, Peiretti E, Zucca I, Perra MT, Sera A. Photodynamic therapy of pterygium with verteporfin: a preliminary report. Cornea, 2004;23:330-8.
96. Peiretti E, Dessi S, Putzolu M, Fossarello M. Hyperexpression of low-density lipoprotein receptors and hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A-reductase in human pinguecula and primary pterygium. Invest Ophthalmol 2004;45:3982-5.
97. Tuğcu B, Helvacıoğlu F, Yüzbaflıoğlu E, Ağaçhan A. Pterjium nükslerinin önlenmesinde, preoperatif subkonjonktival mitomisin C uygulanmasının 2 yıllık sonuçları. Bakırköy Tıp Dergisi 2009;5:18-21
98. Coşkun M, Akal A. Primer pterjium cerrahisinde konjonktival-limbal togreft uygulanması. Tıp Araştırmaları Dergisi 2009;7:101-104
99. Özcan AA, Ersöz TR, Yağmur M, Öksüz H. Nüks pterjiumda cerrahi: konjonktiva ve amniotik membran transplantasyonu. MN Oftalmoloji 2003;10:50-53.
100. Chen PP, Ariyasu RG, Kaza V, LaBree LD, McDonnell PJ. A randomized trial comparing mitomycin C and conjunctival autograft after excision of primary pterygium. Am J Ophthalmol 1995;120:151-60.
101. Tan DTH, Chee SP, Dear KB, Lim AS. Effect of pterygium morphology on pterygium recurrens in a controlled trial comparing conjunctival autografting with bare sclera excision. Arch Ophthalmol 1997;115:1235-40.

102. Hirst LW. The treatment of pterygium. *Surv Ophthalmol*, 2003;48:145-80.
103. Frucht-Pery J, Charalambos SS, Ilsar M. Intraoperative application of topical mitomycin C for pterygium surgery. *Ophthalmology* 1996;103:674-677.
104. Gupta VP, Saxena T. Comparison of single-drop mitomycin C regime with other mitomycin C regimes in pterygium surgery. *Ind J Ophth* 2003;51:59-65.
105. Anduze AL. Merest sclera technique for primary pterygium surgery. *Ophthalmic Surg* 1989;20:892-4.
106. Riordan-Eva P, Kielhorn I, Ficker LA, et al. Conjunctival autografting in the surgical management of pterygium. *Eye (Lond)* 1993;7:634-8.
107. Lei G. Surgery for pterygium using a conjunctival pedunculated flap slide. *Br J Ophthalmol* 1996;80:33-4.
108. Akura J, Kaneda S, Matsuura K, Setogawa A, Takeda K, Honda S. Measures for preventing recurrence after pterygium surgery. *Cornea* 2001; 20: 703-7.
109. Frau E, Labetoulle M, Lautier-Frau M, Hutchinson S, Offret H. Corneo-conjunctival autograft transplantation for pterygium surgery. *Acta Ophthalmol Scand* 2004;82:59-63.
110. Al Fayed MF. Limbal versus conjunctival autograft transplantation for advanced and recurrent pterygium. *Ophthalmology* 2002;109:1752-5.
111. Gris O, Guell JL, del Campo Z. Limbal-conjunctival autograft transplantation for the treatment of recurrent pterygium. *Ophthalmology* 2000;107:270-3.
112. Young AL, Leung GYS, Wong AKK, Cheng LL, Lam DSC. A randomised trial comparing 0,02% mitomycin C and limbal conjunctival autograft after excision of primary pterygium. *Br J Ophthalmol* 2004;88:995-997.
113. Fernandes M, Sangwan VS, Bansal AK, et al. Outcome of pterygium surgery: analysis over 14 years. *Eye (Electronic Journal)* Oct. 2004.
114. Ma DHK, See LC, Liao SB, Tsai RJF. Amniotic membrane graft for primary pterygium: comparison with conjunctival autograft and topical mitomycin C treatment. *Br J Ophthalmol* 2000;84:973-78.
115. Ma DHK, See LC, Hwang YS, Wang SF. Comparison of amniotic membrane graft alone or combined with intraoperative mitomycin C to prevent recurrence after excision of recurrent pterygia. *Cornea* 2005;24:141-50.
116. Essex RW, Snibson GR, Daniell M, Tole DM. Amniotic membrane grafting in the surgical management of primary pterygium. *Clin Experiment Ophthalmol* 2004;32:501-4.

117. Tananuvat N, Martin T. The results of amniotic membrane transplantation for primary pterygium compared with conjunctival autograft. *Cornea* 2004;23:458-63.
118. De Kezier RJ, Swart-van den Berg M, Baartse WJ. Results of pterygium excision with Sr 90 irradiation, lamellar keratoplasty and conjunctival flaps. *Doc Ophthalmol* 1987;67:33-44.
119. Laughrea PA, Arentsen JJ. Lamellar keratoplasty in the management of recurrent pterygium. *Ophthalmic Surg* 1986;17:106-8.
120. Shimazaki J, Kosaka K, Shimmura S, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation with conjunctival autograft for recurrent pterygium. *Ophthalmology* 2003;110:119-124.
121. Sangwan VS, Murthy SI, Bansal AK, Rao GN. Surgical treatment of chronically recurring pterygium. *Cornea* 2003;22:63-5.
122. Salomão DR, Mathers WD, Sutphin JE, Cuevas K, Folberg R. Cytologic changes in the conjunctiva mimicking malignancy after topical mitomycin C chemotherapy. *Ophthalmology* 1999;106:1756-1760.
123. Yaşar T, Özdemir M, İlhan B, Demirok A. Pterijyum cerrahisinde çıplak sklera ve mitomisin-C uygulaması ile konjonktival otogreftleme yönteminin karşılaştırılması. *MN Oftalmoloji* 2002;9:298-300.
124. Lam DS, Wong AK, Fan DS, et al. Intraoperative mitomycin C to prevent recurrence of pterygium after excision: a 30-month follow-up study. *Ophthalmology* 1998;105:901-904.
125. Manning CA, Kloess PM, Diaz MD, Yee RW. Intraoperative mitomycin C in primary pterygium excision: a prospective, randomized trial. *Ophthalmology* 1997;104: 844-848.
126. Oguz H, Basar E, Gurler B. Intraoperative application versus postoperative mitomycin C eye drops in pterygium surgery. *Acta Ophthalmol Scand* 1999;77:147-150.
127. Segev F, Jaeger-Roshu S, Gefen-Carmi N, Assia EI. Combined mitomycin C application and free flap conjunctival autograft in pterygium surgery. *Cornea* 2003;22: 598-603.
128. Gupta VP, Saxena T. Comparison of single-drop mitomycin C regime with other mitomycin C regimes in pterygium surgery. *Ind J Ophth* 2003;5:59-65.

129. Cardillo JA, Alves MR, Ambrosio LE, et al. Single intraoperative application versus postoperative mitomycin C eye drops in pterygium surgery. *Ophthalmology* 1995;102: 1949-1952.
130. Raiskup F, Solomon A, Landau D, et al. Mitomycin C for pterygium: long term evaluation. *Br J Ophthalmol* 2004;88:1425-1428
131. Meacham CT. Triethylene thiophosphoramidate. In the prevention of pterygium recurrence. *Am J Ophthalmol* 1962;54:751-3.
132. Ngoy D, Kayembe L. A comparative study of thio-tepa and mitomycine C in the treatment of pterygium. Preliminary results. *J Fr Ophthalmol* 1998;2196-102.
133. Farrell PL, Smith RE. Bacterial corneoscleritis complicating pterygium excision. *Am J Ophthalmol*,1989;107:515-7.
134. Bekibele CO, Baiyeroju AM, Ajayi BGK. 5-Fluorouracil vs. beta-irradiation in the prevention of pterygium recurrence. *Int J Clin Pract* 2004;58:920-3.
135. Akarsu C, Taner P, Ergin A. 5-Fluorouracil as chemoadjuvant for primary pterygium surgery. *Cornea* 2003;22:522-6.
136. Hurby G, Christie D. Reirradiation for recurrent pterygia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;35:635.
137. Şimşek T, Günalp İ, Atilla H. Comparative efficacy of beta-irradiation and mitomycin-C in primary and recurrent pterygium. *Eur J Ophthalmol* 2001;11:126- 32.
138. Amano S, Motoyama Y, Oshika T, Eguchi S, Eguchi K. Comparative study of intraoperative mitomycin C and beta irradiation in pterygium surgery. *Br J Ophthalmol* 2001;85:121.
139. Moriarty AP, Crawford GJ, McAllister IL, Constable IJ. Severe corneoscleral infection: a complication of beta irradiation scleral necrosis following pterygium excision. *Arch Ophthalmol* 1993;111:947-951.
140. Goodfellow SJ, White RJ. Regulation of RNA polymerase III transcription during mammalian cell growth. *Cell Cycle* 2007;6:2323-2326.
141. Le Quesne J, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. *Mol Oncol*, 2010;4:230-241
142. Zhang L, Huang J, Yang N, et al. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:9136-41.

143. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing (Reprinted from Cell, vol 123, pg 631-640, 2005). Cell 2007;131:63-73.
144. Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression Sci STKE 2007;1:367.
145. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function (reprinted from Cell, vol 116, pg 281297, 2004). Cell 2007;131:1129.
146. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C.elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 1993;75:843-854.
147. Pasquinelli EA, Reinhart JB. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. Nature 2000;408:86-89.
148. Ruvkun G. Glimpses of a tiny RNA world. Science, 2001; 294: 797–799
149. Gu TJ, Yi X, Zhao XW, et al. Alu-directed transcriptional regulation of some novel miRNAs. BMC Genomics 2009;10:563.
150. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer 2006;6:259-269.
151. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, et al. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. EMBO J 2002;21:5875-5885.
152. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, et al. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. Cell 2005;123:631-640.
153. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or tumor suppressor Cancer Metastasis Rev 2009;28:369-378.
154. Broderick JA, Zamore PD. MicroRNA therapeutics. Gene Therapy, 2011;18:1104-1110.
155. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA RNA 2005;11:1753-1761.

156. Loscher CJ, Hokamp K, Wilson JH, et al. A common microRNA signature in mouse models of retinal degeneration. *Exp Eye Res* 2008;87:529–534.
157. Karali M, Peluso I, Marigo V, Banfi S. Identification and characterization of microRNAs expressed in the mouse eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48: 509–515
158. Ryan DG, Oliveira-Fernandes M, Lavker RM. MicroRNAs of the mammalian eye display distinct and overlapping tissue specificity. *Mol. Vis* 2006;12:1175–1184
159. Detorakis ET, Zaravinos A, Spandidos DA. Growth factor expression in ophthalmic pterygia and normal conjunctiva. *Int J Mol Med* 2010;25: 513-6
160. Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 2011;469:336-342
161. Chien KH, Chen SJ, Liu JH, Woung LC, Chen JT, Liang CM, Chiou SH, Tsai CY, Cheng CK, Hu CC, Peng CH. Correlation of microRNA-145 levels and clinical severity of pterygia. *Ocul Surf.* 2013 Apr;11(2):133-8.
162. Lan W¹, Chen S, Tong L. MicroRNA-215 Regulates Fibroblast Function: Insights from a Human Fibrotic Disease. *Cell Cycle.* 2015;14(12):1973-84.
163. Di Girolamo N. Signaling pathways activated by ultraviolet radiation:role in ocular and cutaneous health. *Curr Pharm Des* 2010;16:1358-75
164. Chui J, Coroneo MT, Tat LT, et al. Ophthalmic pterygium: a stem cell disorder with premalignant features. *Am J Pathol* 2011;178:817-27
165. Liang K, Jiang Z, Ding BQ, et al. Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in pterygia and normal conjunctiva. *Mol Vis* 2011;17:1687-93
166. Pascual G, Montes MA, Perez-Rico C, et al. Expression of embryonic markers in pterygium derived mesenchymal cells. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2011;85:400-4
167. Tung JN, Chiang CC, Tsai YY, et al. CyclinD1 protein expressed in pterygia is associated with beta-catenin protein localization. *Mol Vis* 2010;16:2733-8
168. Cui D, Pan Z, Zhang S, et al. Downregulation of c-Myc in pterygium and cultured pterygial cells. *Clin Exp Ophthalmol* 2011;39:784-92
169. Cox CA, Amaral J, Salloum R, et al. Doxycycline's effect on ocular angiogenesis: an in vivo analysis. *Ophthalmology* 2010;117:1782-91

170. Yin GR, Wang Q, Zhang XB, Wang SJ. Regulatory role of microRNA184 in osteosarcoma cells Genet Mol Res. 2015 Nov 13;14(4):14246-52.
171. Li H, Xiang H, Ge W, Wang H, Wang T, Xiong M. Expression and functional perspectives of miR-184 in pancreatic ductal adenocarcinoma. Int J Clin Exp Pathol. 2015 Oct 1;8(10):12313-8.
172. Bian DL, Wang XM, Huang K, Zhai QX, Yu GB, Wu CH. Expression and regulatory effects of microRNA-182 in osteosarcoma cells: A pilot study. Oncol Lett. 2016 May;11(5):3040-3048.
173. Song C, Zhang L, Wang J, Huang Z, Li X, Wu M, Li S, Tang H, Xie X. High expression of microRNA-183/182/96 cluster as a prognostic biomarker for breast cancer.
174. Miao F, Zhu J, Chen Y, Tang N, Wang X, Li X. MicroRNA-183-5p promotes the proliferation, invasion and metastasis of human pancreatic adenocarcinoma cells. Oncol Lett. 2016 Jan;11(1):134-140. Epub 2015 Nov 5.
175. Li P, Xue WJ, Feng Y, Mao QS. MicroRNA-205 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1). Am J Transl Res. 2015 Oct 15;7(10):2053-9.
176. Nie G, Duan H, Li X, Yu Z, Luo L, Lu R, Ji Z, Zhang W. MicroRNA-205 promotes the tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through targeting tumor protein p53-inducible nuclear protein 1. Mol Med Rep. 2015 Oct;12(4):5715-22

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ÇST : Çıplak Sklera Tekniği

KOT : Konjonktival Ototreft Tekniği

DM : Diabetes Melitus

HT : Hipertansiyon

UV : Ultraviyole

VEGFA : Vasküler Endotelial Growth Faktör Antijeni

FGF2 : Fibroblast Growth Faktör

LEC : Limbal Epitelial Hücre

MMP : Metalloproteinaz Enzim

PDFG : Platelet-Derived Growth Faktör

TGF- β : Transforming Growth Faktör-beta

TNF-a : Tümör Nekrosis Faktör-alfa

NO : Nitrikoksid

ICAM : Intercellular Adhesion Molecule

VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule

TSP1 : Tronbospondin 1



ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Tip 1 fibröz pterjium	19
Şekil 2. Tip 1 klasik pterjium	19
Şekil 3. Tip 2 primer pterjium	19
Şekil 4. Tip 2 rekürren pterjium	19
Şekil 5. Tip 3 primer pterjium	20
Şekil 6. Tip 3 rekürren pterjium	20
Şekil 7. Hasta grubunda anlamlı olarak eksprese olan miRNA'lar	39

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Hasta ve kontrol grubu cinsiyet dağılımı	33
Tablo 2. Hasta ve kontrol grubu ortalama yaşları	39
Tablo 3. Gruplarda doku miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması	39
Tablo 4. Hasta grubunda anlamlı düzeyde eksprese olan miRNA'lar	39