

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KONYA NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**PTERJİUM DOKUSUNDA K-RAS MUTASYONLARININ  
BÖLGESEL DİZİLEME ile DEĞERLENDİRİLMESİ**

BANU TURGUT ÖZTÜRK  
TIBBİ GENETİK YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANABİLİM DALI BAŞKANI  
PROF. DR MAHMUT SELMAN YILDIRIM

TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. MAHMUT SELMAN YILDIRIM

KONYA 2015

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KONYA NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**PTERJİUM DOKUSUNDA K-RAS MUTASYONLARININ BÖLGESEL  
DİZİLEME ile DEĞERLENDİRİLMESİ**

BANU TURGUT ÖZTÜRK

TIBBİ GENETİK YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANABİLİM DALI BAŞKANI  
PROF. DR MAHMUT SELMAN YILDIRIM

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. M. SELMAN YILDIRIM

KONYA 2015

## TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi BANU TURGUT ÖZTÜRK'ün "Pterijium dokusunda k-ras mutasyonlarının bölgesel dizileme yöntemi ile değerlendirilmesi" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans tezi olarak uygun bulunmuştur.

Konya / 20.01.2015

Prof. Dr. M. Selman YILDIRIM  
Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.D.

Jüri Üyesi  
Yrd. Doç. Dr. Ayşegül ZAMANI  
Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi  
Fakültesi Tıbbi Genetik A.D.

Jüri Üyesi  
Prof. Dr. Mehmet OKKA  
Konya Necmettin Erbakan Tıp  
Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz  
Hastalıkları A.D.

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun Gün Ay Yıl tarih ve xxx-xxx sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

İmzası

## **APPROVAL**

We certify that we have read this dissertation entitled “ Evaluation of K-ras mutation in pterygium tissue with pyrosequence method” by “ Banu Turgut ÖZTÜRK” that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of Master of Science in the Department of “Medical Genetics”, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan Konya, TURKEY / 20.01.2015

Principal Advisor  
Prof. Dr. M. Selman YILDIRIM  
Konya Necmettin Erbakan University  
Faculty of Medicine , Dept. of Medical Genetics

Examination Committee Member  
Assis. Prof. Dr. Ayşegül ZAMANI  
Konya Necmettin Erbakan University  
Faculty of Medicine, Dept. of Medical Genetics

Examination CommitteeMember  
Prof. Dr. Mehmet OKKA  
Konya Necmettin Erbakan  
University Faculty of Medicine,  
Dept of Ophthalmology

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK  
Director of Institute of Health Sciences  
Date and Signature

## **BEYANAT**

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir asamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütun bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütun bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

20.01.2015

Banu Turgut ÖZTÜRK

## **TEŞEKKÜR**

Tıbbi Genetik anabilim dalında tamamlamıő olduğum yksek lisans programına gerek baőlamamda, gerekse yurutmemde her zaman destek olan değerli danıőmanım Prof. Dr. M. Selman Yildirim'a, yksek lisans programı boyunca bilgi birikimlerinden her zaman yararlandığım Yrd. Doç. Dr. Ayőegul Zamani'ye teşekkür ederim



## İÇİNDEKİLER

İç kapak .....	i
Tez Onay Sayfası.....	ii
Approval.....	iii
Beyanat.....	iv
Teşekkür .....	v
İçindekiler.....	vi
Kısaltmalar ve Simgeler Listesi.....	vii
Şekiller Listesi.....	viii
Resimler Listesi.....	viii
Tablolar Listesi.....	ix
Özet.....	x
Abstract .....	xi
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>2</b>
2.1 <i>Pterjium</i> .....	2
2.1.1 <i>Etiyoloji ve patogenezi</i> .....	2
2.1.2 <i>Histopatoloji</i> .....	12
2.1.3 <i>Tedavi</i> .....	13
2.2 <i>K-ras onkogeni</i> .....	15
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>23</b>
3.1 <i>Gereç</i> .....	23
3.2 <i>Yöntem</i> .....	23
3.2.1 <i>Taze dokudan DNA izolasyonu</i> .....	25
3.2.2 <i>Polimeraz zincir reaksiyonu</i> .....	26
3.2.3 <i>Dizi analizi</i> .....	30
3.3 <i>İstatistiksel analiz</i> .....	31
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>32</b>
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>37</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>42</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>57</b>



## **KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ**

- bFGF: Basic fibroblast growth factor  
COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer  
CSF: Colony stimulating factor  
DNA: Deoxyribonucleic acid  
EGF: Epidermal growth factor  
FGF: Fibroblast growth factor  
GAP: GTPase activating protein  
GDP: Guanosinediphosphate  
GTP: Guanozintriphosphate  
GEF: Guanine exchange factor  
HB-EGF: Heparine binding epidermal growth factor  
LH: Loss of heterozygosity  
HLA: Human leucocyte antigen  
hOGG: Human oxoguanine glycolase  
HPV: Human papilloma virus  
MAPK: Mitogen activated protein kinase  
Mİ : Microsatellite instability  
MMP: Matrix metalloproteinase  
MRN: Mre11-Rad50-Nbs1  
NF: Neurofibromine  
PDGF: Platelet derived growth factor  
PEDF: Pigment epithelium derived factor  
PI-3K: Fosfoinositide-3 kinase  
PCR: Polimerase chain reaction  
SCF: Stem cell factor  
SNP: Single nucleotide polymorphism  
SOS: Son of sevenless  
TGM: Transglutaminase  
TGF: Transforming growth factor  
UV: Ultraviyole  
VEGF: Vascular endothelial growth factor

## ŞEKİLER LİSTESİ

**Şekil 1:** RAS proteini temel yapısı

**Şekil 2.** Ras-MAPK yolağı

**Şekil 3.** Ras izoformlarında G12, G13 ve Q61'de mutasyon sıklığı

**Şekil 4.** Çalışmaya Alınan Hasta için Veri Formu

**Şekil 5.** Olgularda pterjiumun evrelere göre dağılımı

**Şekil 6.** Yirmibeşinci olguya ait kodon 12 dizileme grafiğı. Mutasyon saptanmayan normal konjonktiva dokusu.

**Şekil 7.** Olguların kodon 61'e ait dizileme grafikleri. (A) Kodon 61'de CGA mutasyonu (B) Kodon 61'de CTA mutasyonu (C) Mutasyon saptanmayan normal konjonktiva dokusu

## RESİMLER LİSTESİ

**Resim 1.** Pterjiumun Görünümü

## TABLULAR LİSTESİ

**Tablo 1.** İnsan Tümörlerinde *ras* Mutasyonlarının Dağılımı

**Tablo 2.** PCR Primer karışımı içeriği

**Tablo 3.** Termal cycle cihazı protokolü

**Tablo 4.** DNA'yı hareketsiz hale getirme için ana karışım

**Tablo 5.** Sekanslama primerlerinin örnek seyreltilmesi

**Tablo 6.** İzole edilen pterjium DNA'larının spektrofotometrik analiz sonuçları

**Tablo 7.** Kodon 12,13 ve 61'de mutasyon görülme sıklığı

**Tablo 8.** K-ras Kodon 61 mutasyon analiz sonuçları

## ÖZET

**Amaç:** Uzun süreli ultraviyole ışığa maruziyetin tetiklediği bir çeşit benign proliferasyon olduğu düşünülen pterjium dokusunda bir onkogen olan K-ras mutasyonu sıklığının değerlendirilmesi

**Metot:** Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları A.D. 'da otogreft ile pterjium eksizyonu esnasında alınan pterjium ve normal doku örnekleri DNA izolasyonuna kadar -80°C'de saklandı. Çalışmanın diğer prosedürleri Konya Necmettin Erbalan Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yürütüldü. Taze dokudan DNA izolasyonu "QIAamp DNA FFPE tissue kit" ile yapıldı. PCR ile DNA'nın K-ras geni kodon 12,13 ve 61 bölgelerini içeren dizileri amplifiye edildi.. Elde edilen ürünlerde "pyrosequence" sistemi kullanılarak K-ras kodon 12, kodon 13 ve kodon 61 'de mutasyon mevcudiyeti değerlendirildi.

**Bulgular:** Çalışmada toplam 25 olgunun (10 kadın, 15 erkek) pterjium ve normal doku örnekleri değerlendirildi. Olguların yaş ortalaması 54.54±13.13'dü. Pterjium 18 olguda (% 72) korneayı 2-4 mm geçiyordu (tip 2), 7 olguda (% 28) ise korneayı 4 mm'den fazla (tip 3) geçiyordu. On beş olgunun (%60) bilateral pterjiumu mevcuttu. Pterjium tüm olgularda temporal lokalizasyondaydı ve hepsine ilk kez pterjium cerrahisi uygulandı. Yapılan analizde olguların normal dokularında K-ras mutasyonu saptanmazken, aynı bireylere ait pterjium dokularında Kodon 12'de 1 olguda, kodon 61'de 7 olguda mutasyon saptandı. Kodon 61'deki bu nokta mutasyonları 4 olguda glutamin ile arjinin (Glu61Arg CAA>CGA), 3 olguda ise glutamin ile lösin (Glu61Leu;CAA>CTA) şeklindeydi.

**Sonuç:** Etiyopatogenezi halen tam olarak anlaşılamamış olan pterjium dokusunda K-ras geni 61. Kodonunda istatistiksel olarak anlamlı oranda mutasyon saptanması bu oluşumun benign bir tümöre benzer özellikler taşıdığı fikrini desteklemektedir.

## **ABSTRACT**

**Aim:** To evaluate the frequency of mutation of the oncogene K-ras in pterygium tissues which are claimed to be a benign proliferation triggered by prolonged exposure to ultraviolet radiation.

**Metot:** Pterygium tissues and normal conjunctiva tissue specimens obtained from patients who underwent pterygium excision with autograft in Selçuk University Faculty of Medicine, Department of Ophthalmology, were stored at -80°C until DNA extraction. Following laboratory procedures were performed at Konya Necmettin Erbakan University Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics. DNA extraction from fresh tissue was performed using the “QIAamp DNA FFPE tissue kit”. A PCR reaction was performed to amplify sequences containing codone 12, 13 and 61 in K-ras gene of the DNA. The PCR products were evaluated for K-ras mutation at codone 12, codone 13 and codone 61 with the “pyrosequence” method.

**Results:** In the study pterygium and normal conjunctival tissue samples of 25 cases (10 female, 15 male) were evaluated. The mean age was 54.54±13.13'dü. Pterygium was exceeding the cornea 2-4 mm (type 2) in 18 cases (% 72), more than 4 mm (type 3) in 7 cases (% 28). Fifteen cases presented bilateral pterygium. All cases had pterygium on the temporal quadrant and underwent primary pterygium excision. The genetic analysis revealed lack of any K-ras mutation in normal conjunctival tissues, in contrast pterygium tissues of the same cases demonstrated mutation at codone 12 in 1 case and mutation at codone 61 in 7 cases. The point mutations at codone 61 were glutamine to arginine (Glu61Arg CAA>CGA) in 4 cases and glutamine ile leucine (Glu61Leu;CAA>CTA) in 3 cases. .

**Conclusion:** Though the pathogenesis of pterygium is already unknown the statistically significant mutation in K-ras gene at codone 61 supports the hypothesis being a benign tumor proliferation.

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Konjonktivanın özellikle ultraviyole ışığa maruziyetle sıkı bağlantı gösteren, bir çeşit benign proliferasyonu olan pterjiumun etiopatogenezi halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Ultraviyole ışığa uzun süreli maruziyetin en önemli risk faktörü olduğu gösterilmiş olmakla birlikte bunun pterjium oluşumunu nasıl tetiklediği halen netleşmemiştir. Benign cilt tümörlerinde de patogenezi de rol oynayan ultraviyole ışığın bu dokularda tümör supresör genlerin birçoğunun ve bir onkogen olan K-ras'ın aktivasyonuna yol açtığı çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir.

Benign bir tümör sayılan pterjiumda ultraviyolenin etkisi bilinmesine rağmen tümör supresör ve onkogenlerin etkisi literatürde çok az çalışmada değerlendirilmiştir. K-ras onkogeni mutasyonu üzerine ise yalnız bir çalışma mevcuttur. Detorakis ve ark.nın bu çalışmasında doku örneklerinin %10'unda özellikle rekürrens gösteren genç olgularda kodon 12'de K-ras mutasyonu gösterilmiş ancak kodon 61 çalışılmamıştır. (Detorakis ve ark. 2005).

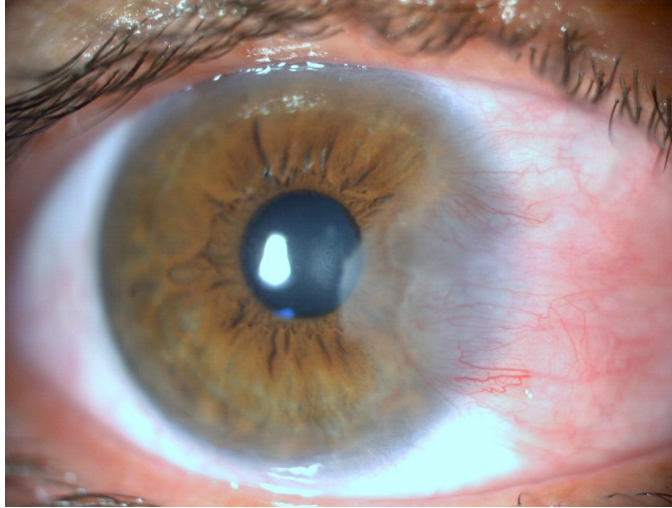
Bu tez kapsamında konjonktival otograft tekniği ile pterjium eksizyonu yapılan bir olgu serisinde pterjium olgularının morfolojik olarak sınıflandırılması ve dokuda K-ras ekzon 2, kodon 12 ve 13, ekzon 3 kodon 61 mutasyon analizi yapılması amaçlanmıştır. "Pyrosequencing" yönteminin kullanılması sayesinde yüksek güvenilirlik düzeyi sağlanmıştır. Moleküler bulgular ile demografik ve klinikopatolojik verilerin ilişkilendirilmesi, sonuçların literatür eşliğinde değerlendirilmesinin yapılması planlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Pterjium

Göz kapağı aralığında, tipik olarak üçgen şeklinde, konjonktivadan korneaya doğru uzanan fibrovasküler bir doku olan pterjiumun toplumda yaygınlığı %0.3-29 arasında değişmektedir (Moran ve Hollows 1984; Taylor ve ark. 1992). Genellikle kadın-erkek oranı eşittir. Ancak bazı toplumlarda erkeklerin çevre faktörlerine daha fazla maruz kalmasıyla ilişkili olarak erkek oranı daha belirgin olabilmektedir. Literatürde ırksal farklılıklar da bildirilmiştir (Skolnick ve Grimmett 2005).

Pterjium gözün sıklıkla nazal kadranında görülür. Ancak nadiren temporal kadran da beraberinde etkilenebilir (**Resim 1**). Olguların yaklaşık 1/3'ü bilateral tutulum göstermektedir.



**Resim 1.**  
Pterjiumun  
Görünümü

Klinik muayene bulgularına göre başlık, baş ve gövde olarak üç kısma ayrılır. Başlık pterjiumun korneaya doğru ilerleyen kısmında gri beyaz , kavisli subepitelyal kornea opasitesidir. Bu bölgede korneanın Bowman tabakası hasarlanmıştır. Kronik vakalarda başlığın önünde anormal göllenen gözyaşı kornea epitelinde demir depozitlerinin birikmesine neden olur. Bu birikim Stocker çizgisi olarak adlandırılır. Baş kısmı kabarık beyaz bir kitledir ve korneaya sıkı olarak yapışmıştır. Gövde damarlı, kabarık, hareketli bir kitle şeklindedir. Üst ve alt kenarında normal konjonktivadan belirgin bir hat ile ayrılır. Bu hat pterjiumun cerrahi tedavisinde önemlidir. Aktif pterjiumda damarlar dolgundur ve sürekli büyüme gösterir.

Tekrarlayan enflamasyon atakları görülebilir. Bazen olgularda pterjium yıllarca sessiz kalıp damarlı yapının gerilemesi ile düzleşebilir.

Pterjiumlar klinik özelliklerine göre 3 gruba ayrılır. Bu sınıflandırmada büyüklük, vaskülarizasyon, kornea yüzeyine yayılım ve optik zonu tutması esas alınmıştır.

Tip 1: Küçük primer pterjiumu tanımlar. Limbusta sınırlı olup korneayı minimal infiltre etmektedir. Fibröz, pinguekular ve klasik tip olmak üzere üç tipi mevcuttur.

Tip 2 : Optik zonu tutmayan fakat korneaya 2-4 mm ilerlemiş primer veya nüks pterjiumdur.

Tip 3: Optik zonu tutmuş ileri primer veya nüks pterjiumlardır. Kornea kalınlığının %30'u lezyon tarafından infiltre edilmiştir.

Semptomların şiddeti genellikle klinik tiplerle orantılıdır. Tip 1'de hafif derecede rahatsızlık gözlenirken Tip 2 ve 3'de hastalar yabancı cisim duygusu, yanma, sulanma ve bulanık görmeden şikayet edebilirler (Skolnick ve Grimmett 2005; Yağmur 2007). Snellen eşelinde görme iyi bile olsa kamaşma ve kontrast duyarlılıkta azalma oluşabilir (Lin ve ark. 1989). Bu bulguların birçoğu pterjiumdaki aktif inflamasyonla ilişkilidir. Bazı olgularda kornea yüzeyinde oluşturduğu çekme etkisi korneada düzleşmeye yol açmaktadır. İlerlemiş olgularda göz hareketlerinde kısıtlılık ve diplopi oluşturabilir. Kozmetik olarak da hoş olmayan bir görüntüye yol açmaya başlar (Skolnick ve Grimmett 2005).

### **2.1.1 Etiyoloji ve Patogenez**

Pterjiumun UV ışığa maruziyet, kuru ve sıcak iklim vb. çevresel faktörlerle ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Bu ilişki ile ilgili kuvvetli epidemiyolojik veriler mevcuttur. Chen ve ark. (2013) pterjium oranının dağlarda oturanlara göre deniz kenarında oturanlarda çok daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ekvatora yakın bölgelerde bu fibrovasküler lezyonun popülasyonun yaklaşık %22'sini etkilediği tahmin edilirken (Coroneo 1993; Hilgers ve ark. 1960), ekvatora uzak bölgelerde prevalans %2'nin altına düşmektedir. (Mackenzie ve ark. 1992). Güneş ışığındaki ultraviyole ışınları pterjiumun gelişimindeki en önemli çevresel faktör olarak



görülmektedir. Ayrıca erkeklerde kadınlara göre 2 kat daha fazla görülmesi de bazı ülkelerde erkeklerin kadınlara göre dış ortamda daha fazla zaman geçirmesine bağlanmaktadır (Skolnick ve Grimmett 2005).

Pterjiumun daha çok nazalde görülmesi ise temporalden gelen ışınların temporal kornea tarafından kırılarak nazal korneada odaklanması, bu nedenle nazal korneanın daha fazla UV'ye maruz kalması ile açıklanmaktadır. UV'ye maruziyetin kornea konjonktivalizasyonunu önleyen sabit bir bariyer olan limbal kök hücrelerinde tahribata dolayısıyla bariyerin hasar görmesine yol açtığı ileri sürülmektedir (Coroneo 1993). Bu hasarın nasıl olduğu konusunda çok sayıda çalışmada farklı hipotezler ileri sürülmüştür. Şimdiye kadar yürütülen çalışmalarda etkisi olduğu gösterilen faktörler şu başlıklar altında toplanabilir:

1. Kalıtsal genetik faktörler
2. Epigenetik değişiklikler
3. Oksidatif stres
4. Hücre siklus regülasyonu
5. İnflamatuar medyatörler
6. İmmünolojik mekanizmalar
7. Büyüme faktörleri
8. Anjiojenik stimülasyon
9. Ekstraselüler matriks modülasyonu
10. Kolesterol metabolizması modifikasyonu
11. Virüsler

### **1. Kalıtsal genetik faktörler**

Bazı olgularda da pozitif aile öyküsü bildirilmiştir. Pterjiumun otozomal dominant inkomplet penetrans ile kalıtım gösterdiği iddia edilmiş ancak kesin olarak gösterilememiştir (Chui ve ark. 2008, Di Girolamo ve ark. 2006). Şu ana kadar pterjium oluşumu ile direk ilişkili, kalıtımı gösterilmiş bir gen bölgesi mutasyonu bulunmamaktadır. Hücre siklus regülasyonunda görev alan bazı proteinlerde polimorfizm, bir tümör supresör gen olan p53'ün veya ras onkogenlerinin mutasyonları bildirilen genetik değişikliklerdendir, ancak bu değişikliklerin

kalıtları ile ilgili bir bilgi literatürde bulunmamaktadır (Weinstein ve ark. 2002; Tung ve ark 2010; Detorakis ve ark. 2005)

## **2. Epigenetik değişiklikler**

Chien ve ark.nın çalışmasında da (2013) ilk defa olarak primer pterjiumlarda bir tumor supresör olan ve kornea epitel farklılaşmasının yani kök hücre fonksiyonunu ve doku gelişimini kontrol eden miR-145'nin azaldığı ve bunun pterjiumdaki kısmen elastik dejenerasyonla negatif korelasyon gösterdiğini bildirmiştir. Özellikle de miR-145'in kök hücrelerin kendini yenileme sürecinde, pluripotent genlerin indüksiyonunda, limbal bölgede farklılaşmanın represyonu gibi fonksiyonlarındaki bozulmanın pterjium patogenezinde rol oynadığı ileri sürülmüştür

Riau ve ark. (2011) ise çalışmalarında TGM-2, MMP-2 ve CD24 proteinlerinin anormal ekspresyonu ile ilişkili aberran DNA metilasyon bölgeleri olduğunu göstermişlerdir. Tümör supresör geni p16 promotor bölgesinin hipermetilasyonu ve buna bağlı azalmış ekspresyonunu ve buna bağlı kontrolsüz hücre çoğalması olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (Chen ve ark. 2006).

## **3. Oksidatif stres:**

UV radyasyonun oksidatif DNA hasarına yol açtığı bilinmektedir ve pterjium patogenezinde bunun önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir. Hatta pterjiumlu olgulardaki demir birikiminin de lokal epitel hücrelerinde oksidatif strese bağlı demir homeostazisindeki bozulmanın göstergesi olduğu düşünülmektedir (Loh ve ark. 2009). Oksidatif stres artmış reaktif oksijen ve nitrojen türevlerini açığa çıkarmakta ve bu da DNA hasarına, lipid peroksidasyonuna ve protein yapısında değişikliklere yol açmakta yani pterjium patogenezinde primer rol oynamaktadır. Çeşitli çalışmalarda DNA oksidatif hasarını gösteren önemli markırlardan biri olan 8-hidroksiguanozin pterjium dokusunda gösterilmiştir (Kau ve ark. 2006; Tsai ve ark. 2005a; Perra ve ark. 2006). 8-Hidroksiguanozini metabolize eden 8-hOGG1 enziminin pterjiumda aktivitesinin arttığı bildirilmektedir (Tsai ve ark. 2005a). Ayrıca hOGG1'in çeşitli polimorfizmlerinin pterjium riskini arttırdığını rapor eden çalışmalar da bulunmaktadır (Kau ve ark. 2004). Glutasyon S-transferaz M1 null genotipi UV ışığa maruziyeti arttırmakta ve pterjiumlu genç bireylerde frekansının yüksek olduğu bildirilmektedir (Tsai ve ark. 2004a).

#### 4. Hücre siklus regülasyonu

Hücre siklusu regülasyonunun işleyişinde apoptozis regülasyonunun bozulmasının pterjium patogeneğinde anlamlı bir rolü bulunmaktadır. UV ışığın kornea epitelinde apoptotik değişiklikleri tetiklediği gösterilmiştir (Podskochy ve ark. 2000; Ren ve Wilson 1994). Bu değişiklik pro-apoptotik proteinler (Örn: bax) ve anti-apoptotik proteinler (bcl-2) arasındaki dengenin antiapoptotikler lehine bozulmasından kaynaklanır. Apoptozise dirençli hale getiren bu değişim pterjium bazal epitelinde yüzeyel tabakalara göre daha belirgin olmaktadır (Tan ve ark. 2000; Podskochy ve Fagerholm 2001; Di Girolamo ve ark. 2004). Ayrıca pterjium impresyon sitolojisi spesmenlerinde skuamöz metaplazi ve daha az apoptotik markırlar saptanmıştır (Wang ve ark. 2000). Apoptozisin iki önemli markırından olan TUNEL boyamaları ve bax normalde tam kat boyanma gösterirken pterjiumun sadece epitel bazal tabakasında boyanma göstermektedir. Bir antiapoptotik protein olan bcl-2'de normal konjonktivada bulunamazken pterjium dokusunda bulunabilmektedir (Tan ve ark. 2000). Apoptozis protein inhibitörleri ailesinin bir üyesi olan survivin de pterjiumla ilişkili bulunmuştur. Maxia ve ark. (2009) UV-B maruziyetinin ve buna bağlı oksidatif stresin "survivin" düzeyinde artışa yol açtığını ve bunun da UV-indüklenmiş apoptozis ve hiperproliferasyona dirence yol açtığını ileri sürmüştür.

Tümör supresör p53 bir yandan proliferasyonu önlerken diğer yandan DNA mutasyonu varlığında apoptozisi indükleyerek bir kontrol noktası görevi üstlenmektedir. Çeşitli çalışmalarda pterjium bazal epitelinde artmış p53 düzeyi gösterilmiştir (Dushku ve ark. 1999; Tan ve ark. 1997; Weinstein ve ark. 2002). Ancak bu artışa rağmen mutasyon nedeniyle proteinin normal fonksiyon gösteremediği ileri sürülmektedir (Dushku ve Reid 1997; Ueda ve ark. 2001; Reisman ve ark. 2004). P53 Mutasyon oranı çeşitli çalışmalarda %15.7-38.1 arasında bildirilmektedir Ueda ve ark. 2001; Reisman ve ark. 2004; Tsai ve ark. 2005b). Bu da UV radyasyonun p53'ü stabilize ettiği bu nedenle pterjiumda düzeyinin arttığı hipotezini desteklemektedir (Ashcroft ve ark. 1999). Literatürde p53'ün pterjium gelişiminde rolü olmadığını iddia eden çalışmalar da mevcuttur (Schneider ve ark. 2006; Tsai ve ark. 2004b, 2005c).

Ayrıca enterasan olarak p53 ekspresyonu epitel ve bazal tabaka arasında da değişiklik göstermekte bazal tabakada yüzeyel tabakaya göre daha yüksek

seyretmektedir. Bu bulgu transkameral yolla limbal kök hücrelerin solar ışığa artmış maruziyeti ile açıklanmaktadır (Di Giroloma ve ark. 2004; Tan ve ark. 1997; Weinstein 2002).

SNP markırları genler ve hastalıklar arasındaki kompleks ilişkiyi belirlemede etkin bir araçtır. P53 kodon 72 polimorfizmleri (rs104(21)2522, G/C Ard 72Pro) tümör şüphesi için en önemli markırdır (Liu ve ark. 2012). Bir çalışmada 36 pterjium örneğinden 30'u heterozigot üçü prolin aleli için homozigot, 2'si arjinin aleli için homozigottur, kontrol grubunda ise 21 hastadan 12'si heterozigot, 7'si proline aleli için homozigot, 2'si arjinin aleli için homozigottur (Rodrigues ve ark. 2008). p53 proteinin anormal ekspresyonunun kodon 72 polimorfizmi birlikteliği pterjium patogeneğinde p53 mutasyonlarının rol oynadığını düşündürmektedir (Hussain ve ark. 2001).

P53 DNA tamir sisteminde anahtar bir rol oynadığından sistemin aşağı akış komponentleri anormal ekspresyona uğruyor olabilir. Çift sarmallı DNA kırık tamirinde rol oynayan genler özellikle MRN kompleksi üyeleri (Mre11–Rad50–Nbs1), RAD 51 ve iki RAD51 paraloğu (XRCC2 ve XRCC3) pterjium olgularında kontrol gruplarına göre farklı ekspresyona uğramaktadır (Lekawa-Ilczuk ve ark. 2011). Pterjium dokularında kontrol konjonktiva dokularına göre RAD50 proteininin fazla ekspresyonu gözlenmektedir. RAD50 çift sarmallı DNA kırıklarının hızlı tamirini tetiklemede rol oynamaktadır (Delmas ve ark. 2009). Pterjium dokularındaki aşırı ekspresyonu rekombinasyonel DNA tamir mekanizmalarının aktivasyonun söz konusu olabileceğini düşündürmektedir. RAD51, XRCC2 ve XRCC3 genlerinin ekspresyonu pterjium rekürrens öyküsü olan hastaların periferik kan lenfositlerinde de artmıştır. RAD51'in aktivitesini regüle edebilen PLK1 (polo benzeri kinaz 1)'de pterjiumda yüksek ekspresyona uğramaktadır (Lu ve ark. 2009). Bu kanıt pterjium patogenezi ve çift sarmallı DNA kırık tamir sistemleri arasında temelden bir bağlantı olduğunu göstermektedir.

Etiyopatogeneşte p16, p27, p63 (p53 gen ailesinin bir üyesi), cyclin D1, Ki67, proliferen olan hücre nükleer antijeni, K-ras ve Ku70 gibi başka hücre siklus regülatörlerinin de rolleri üzerinde çalışılmıştır. p16, p27, p63 (p53 gen ailesinin bir üyesi), cyclin D1, Ki67, proliferen olan hücre nükleer antijeni, K-ras hücre

bölünmesinde G1-S kontrol noktasında görev yapmaktadır (Sakoonwatanyoo ve ark. 2004; Chen ve ark. 2006; Tong 2008a; Kase ve ark. 2007a). Ku70 DNA çift sarmal kırık tamir proteindir ve pterjiumda polimorfizmi bildirilmiştir (Tsai ve ark. 2007). Bu proteinlerin regülasyonunun kaybı pterjiumun kontrolsüz büyümesine yol açmaktadır. Ayrıca telomeraz aktivitesinde artış ve buna bağlı hücre replikasyonu sırasında telomer kısalmasının engellenmesi ve hücre ömründe uzama olduğu da gösterilmiştir (Shimmura ve ark. 2000).

S100 proteini hücre migrasyonu, proliferasyonu ve farklılaşması gibi biyolojik fonksiyonları module eden diğer proteinlerle etkileşen, kalsiyum ile aktive olan bir sinyal proteindir (Zimmer ve ark. 1995; Lukanidin ve ark. 2012). Pterjium dokusunda S100A6, S100A8 ve S100A9 gibi S100 proteinlerinin normal konjonktivaya göre daha fazla ekspresyona uğradığı bildirilmiştir (Jaworski ve ark. 2009; Riau ve ark. 2009). Ayrıca doku faktörünün de epitelyal-mezenşimal geçişe bağlı yada bağımsız yolaklarla pterjium formasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (Ando ve ark. 2011). Aynı zamanda COX-2 (siklooksigenaz-2) ve vasküler endotelial büyüme faktörü eksprese eden maktofajların da pterjium patogenezi ile ilişkisi bildirilmektedir (Park ve ark. 2011). NF-kB yolağının da pterjium dokularında normal konjonktiva dokularına göre daha fazla aktive olduğu rapor edilmiştir (Siak ve ark. 2011, Torres ve ark. 2011; Lan 2012). İnflamatuar sitokin TNF- $\alpha$  ile stimülasyon pterjium fibroblastlarında kanonik ve kanonik olmayan NF-kB yolaklarını aktive edebilir (Siak ve ark. 2011). Primer pterjiumda COX-2 ve survivin proteini arasında anlamlı korelasyon olduğu da bildirilmektedir ki bu da pterjiumun anti-apoptotik bir mekanizmadan kaynaklandığını düşündürmektedir (Maxia ve ark. 2009).

## **5. İnflamatuar medyatörler**

UV-B maruziyeti çeşitli kemokin, sitokin ve büyüme faktörlerinin indüklenmesine ve buna bağlı olarak inflammatuar hücre toplanması ve neovaskülarizasyona yol açabilmektedir. Interlökin-6 (IL-6), IL-8 ve tümör nekroz faktörü - $\alpha$  pterjiumda ve UV-B maruziyeti sonrası artmaktadır (Di Girolamo ve ark. 2002; Kria ve ark. 1998; 1996). UV-B maruziyeti sonrası IL-1'de de artış olmakta ve başka inflammatuar medyatörler ve matriks metalloproteinazların artmasına yol açmaktadır. (Di Girolamo ve ark. 2004). Pterjiumda siklooksigenaz-

2'de de artış olmakta ve bu da prostaglandin ürünleri ve inflamatuvar kaskadlarda artışa neden olmaktadır (Chiang ve ark. 2007). Hücre farklılaşması ve inflamasyonda rol oynayan fosfolipaz -D'nin de pterjumda arttığı bildirilmiştir (Tong ve ark. 2008b). İnflamatuvar medyatörler pterjumda genellikle primer değil bazı değişikliklere ikincil olarak artış göstermektedir (Bradley ve ark. 2010).

## **6. İmmünolojik mekanizmalar**

İmmünolojik mekanizmaların pterjum patogenezindeki rolü kesin olarak gösterilmemiş olmakla birlikte doku örneklerinde artmış sinyalizasyon, vasküler hücresel adezyon molekülü-1, interselüler adezyon molekülü -1'de artış ve HLA-DR aberrant ekspresyonu gösterilmiştir (Beden ve ark. 2003; Ioachim-Velogianni ve ark. 1995). Diğer sinyalizasyon moleküllerinden E-cadherin ve  $\beta$ -katenin pterjum başında artmış ve konsantredir (Kase ve ark. 2007b). Artmış  $\beta$ -kateninin çeşitli hücre siklus proteinlerini ve matriks metalloproteinazları arttırdığı bildirilmiştir (Kato ve ark. 2007). Mast hücreleri, lenfositler, plazma hücreleri, dendritik hücreler ve CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin arttığı da dökümente edilmiştir (Beden ve ark. 2003; Ioachim-Velogianni ve ark. 1995; Ribatti ve ark. 2007). Ayrıca anormal IgE ve I depolanması ve yakın zamanlı bir çalışmada makrofaj inflamatuvar protein-4'de artış gösterilmiştir (Pinkerton ve ark. 1984; Liu ve Yang 1993; John-Aryankalayil ve ark. 2006). Tip 1,3 ve 4 hipersensitivite reaksiyonunun da pterjum gelişiminde rol oynadığı düşünülmekle birlikte tüm bu saptanan değişikliklerin patogeneizde mi rol oynadığı yoksa pterjum oluşumuna ikincil mi eksprese oldukları bilinmemektedir (Pinkerton ve ark. 1984; Liu ve Yang 1993).

## **7. Büyüme faktörleri**

HB-EGF, VEGF, b-FGF, trombosit-derive büyüme faktörü, TGF- $\beta$ , insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein -2 ve kök hücre faktörü gibi hücre proliferasyonu, inflamasyon, bağ doku "remodelling"i ve anjiogenezde rol oynayan büyüme faktörlerinde artış bildirilmiştir (Chiang ve ark. 2007; Nolan ve ark. 2004; Jin ve ark. 2003; Solomon ve ark. 2003; Wong ve ark. 2006; Maini ve ark. 2002). UV-B'ye maruziyet HB-EGF, VEGF ve bFGF'i arttırmaktadır. HB-EGF hem pterjumda hem de fibroblastlarda hücre migrasyonunu indüklemektedir. PEDF ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3 düzeyinde artış da gösterilmiştir.

PEDF anjiojenik inhibitör olarak fonksiyon görmektedir, bu nedenle düzeyinin azalması anjiojenik uyarıya ve pterjium oluşum ve progresyonuna yol açmaktadır (Jin ve ark. 2003; Solomon ve ark. 2003; Wong ve ark. 2006).

## **8. Anjiojenik stimülasyon**

Pterjiumda VEGF, trombospondin-1 ve substans P gibi birçok anjiojenik faktör gibi birçok anjiojenik faktör artmıştır (Aspiotis ve ark. 2007; Chui ve ark. 2007). Bu faktörlerin gözyaşı ve plazma düzeylerinin de artması ETS-1 transkripsiyon faktörünü artırarak anjiojenik aktiviteyi direk tetiklemektedir (Naib-Majani ve ark. 2007). Anjiojenik yolların indüklemesi ve buna bağlı pterjiumun neovaskülarizasyonuna yol açmakta, pterjium gelişimi ve büyümesinde rol oynamaktadır. Vasküler endotel hücre markırları örneğin CD31+ pterjiumda artmış olarak saptanmıştır (Aspiotis ve ark. 2007). Bunun yanısıra integrin molekülü P ve E-selektinin yoğun boyanması ile pterjiumun vaskülarizasyonunun aktif proliferatif durumda olduğu gösterilmiştir. VEGF'in yanısıra indüklenebilir nitrik oksid sentetaz da ekspresyona uğrayarak artmakta ve anjiogenez ve inflamasyona yol açmaktadır (Lee ve ark. 2001). Bir başka çalışmada da eritropoetin reseptöründe artış gösterilmiş ancak eritropoetin düzeyinde artış saptanmamıştır. Bu da eritropoetinden bağımsız bir eritropoetin reseptörü sinyalizasyon yolağının hücrel proliferasyon ve anjiogenezi stimüle ettiğini düşündürmektedir (Kase ve ark. 2007a). Bu bilgiler UV-B'ye bağlı anjiojenik uyarının da pterjium gelişiminde ikincil bir olay olduğu fikrini desteklemektedir.

## **9. Ekstraselüler matriks modülasyonu**

Limbal bazal epitel hücrelerinde UV radyasyon kollajenolitik bir enzim olan MMP seviyesini arttırmaktadır. İmmünohistokimyasal çalışmalarda normal konjonktiva, limbus ve kornea hücreleri MMP-1 için boyanırken, pterjiumda metabolizması modifikasyonu göstermektedir. Bu değişmiş MMP ekspresyonunun limbal bazal epitel hücrelerinin (pterjium hücreleri ) Bowman tabakasını sıkı yapışık şekilde işgal etmesine imkan sağlamaktadır. MMP 'lar pterjiumun migrasyon ve büyümesinde rol oynamaktadır, oluşumunda gerekli değildir. MMP ekspresyonundaki farklılıklar klinikte pterjium büyümesindeki farklılıkları açıklamaktadır (Di Girolamo ve ark. 2004; Duhsku ve ark. 2001).

## 10. Kolesterol metabolizması modifikasyonu

Peiretti ve ark. (2004) pterjium gelişimi ile kolesterol metabolizması modifikasyonları arasında bir ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir. Hidroksi-metilglutaril-koenzim A redüktaz ve düşük dansiteli lipoprotein reseptörü düzeylerindeki artışın fibroblast proliferasyonunun uyarılmasında rol oynayabileceği düşünülmüştür (Peiretti ve ark. 2004, 2006). Çeşitli lipid metabolizması değiştirici ilaçların pterjium fibroblastlarının proliferasyonunu azaltması da bu hipotezi desteklemektedir (Peiretti ve ark. 2007). Bu bağlantı kolesterol metabolizması modifikasyonunu pterjium gelişme ve büyümesinde gelecek hedeflerden biri haline getirmektedir.

## 11. Virüsler

Kuvvetli genetik etkiye rağmen pterjiumun displazi, ekstra kanlanma ve cerrahi rezeksiyon sonrası rekürrens vb özellikleri enfeksiyöz bazı etkenlerin de sözkonusu olduğunu düşündürmektedir. Bunlardan ilk akla gelen bir tümör supresör gen olan p53 'ü inaktif hale getiren HPV olmaktadır ki pterjium etiolojisindeki rolü çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Otlu ve ark. 2009). Ancak bunlar oldukça geniş bölgesel ve irksal farklılıklar göstermektedir (Detorakis 2009). (11) HPV 16/18 E6 HPV-DNA pozitif pterjiumlarda gösterilmiş bir alt gruptur (Tsai ve ark. 2009). Bu konu üzerinde yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır ancak sonuçları oldukça büyük farklılıklar göstermektedir. Rodrigues ve ark. (2008) Brezilya'dan alınan pterjium örneklerinin %58.3'ünün, kontrol grubunun ise %9.5'inde HPV DNA pozitif olduğunu saptamıştır. HPV-pozitif pterjium örneklerinin %42.8'inde HPV tip 1, %33.3'ünde HPV tip 2 ve %23.8'inde her ikisi de pozitifken kontrol grubundaki HPV pozitif örneklerde tip 16 pozitif bulunmuştur. Tsai ve ark. (2009) Tayvan'daki pterjium örneklerinin %24'ünün HPV pozitif olduğunu ve tümünün tip 16/18 olduğunu rapor etmiştir. Ayrıca HPV16/18'in p53 inaktivasyonu ile ilgili E6 onkoproteininin ekspresyonunu arttırdığı yani HPV'ye bağlı pterjium patogenezinde anahtar rolü oynadığını göstermişlerdir. Bir başka çalışmada Sjo ve ark. (2007) Danimarka pterjium örneklerinin sadece %4.44'ünün HPV pozitif olduğunu ve hepsinin tip 6 olduğunu rapor etmişlerdir. Yakın zamanlı bir çalışmada ise Hsiao ve



ark. (2010) Tayvan'dan pterjium örnekleri üzerinde çalışmışlar ve 65 örnekten yalnız 2'sinde HPV olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu bulgular HPV'nin pterjium patogeneğinde tek başına hayati bir rol oynamadığını ancak çok evreli gelişiminde sinerjistik bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Mauro 2009; DiGirolamo 2012; Hisao ve ark. 2010; Piecyk-Sidor 2009). Konsensus olmamasına rağmen toplumların genetik zemini bu farklılıkta önemli bir faktör olabilir. Piras ve ark. (2003) farklı iki coğrafik bölgeden alınan pterjiumlarda HPV varlığının araştırmış ve pterjiumda patojenik bir rolü olabileceğini bildirmişlerdir. Di Girolamo (2012) ise 34 çalışmanın verileri üzerinde yaptığı değerlendirme sonucunda HPV'nin pterjium gelişimini başlatmak için yeterli olmadığı ancak yatkın konaklarda bir ko-faktör olabileceği kanısına varmıştır. Detorakis ve ark. (2001) ise pterjiumda HSV ve HPV'nin klinik profille ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir.

Literatürde bildirilen diğer risk faktörleri arasında lokal gözyaşı film anomalileri de yer almaktadır. Çünkü bilindiği gibi UV ışık moleküler düzeyde çeşitli makromolekülleri yakalayıp deaktif edip aktif serbest radikallerin oluşmasına yol açmakta ancak bunlar döngü içerisinde gözyaşı film proteinleri tarafından inaktif edilmektedirler (Weinberg 2003). Anjiojenetik faktör oluşturan kronik enflamasyon, tip 1 hipersensitivite ile ilişkili immünolojik mekanizma, herediter faktörler (VEGF-A polimorfizmi) ise diğer risk faktörleri arasında sayılabilir (Zhou ve ark. 2009; Peng ve ark. 2014).

### **2.1.2. Histopatoloji**

Epitelde hiperplastik veya displastik değişiklikler, kalınlaşmış elastik liflerin sayısının artması, substantia propriada kollajenin elastoid dejenerasyonu (elastodisplazi) ve konkresyon gösterilmiştir. Pterjium içindeki elastik liflerin normal olmadığı kabul edilir (Skolnick ve Grimmer 2005). Pterjium başının histopatolojik analizinde bazal kornea epitel hücrelerini Bowman tabakasından ayıran fibroblastik doku; bunun üzerindeki bazal kornea epitel hücrelerinde değişmiş organizasyon, altındaki Bowman tabakası ve yüzeysel kornea stromasında değişim ve pterjium başının proksimalinde normal korneal doku gösterilmiştir (Cameron 1983). İmmünohistokimyasal boyalarla Bowman tabakasının eriyen kenarı ve fibrovasküler doku arasında değişime uğramış limbal bazal kök hücreler gösterilmiştir. Pterjium

epitelindeki diğer histolojik değişiklikler skuamöz hücre metaplazisi, akantozis, diskeratozis, goblet hücre ve mast hücre sayısında artmadır (Dushku ve Reid 1994).

Pterjiumun primer cerrahi eksizyondan sonra tekrarlaması rekürren veya sekonder pterjium olarak adlandırılır. Fibrovasküler büyüme abartılı derecededir. Histolojik bulguları primer pterjiumdan farklıdır. Tipik dejeneratif bağ dokusu değişiklikleri yoktur. Primer eksizyondan sonra cerrahi travma proliferatif fibrovasküler cevabı arttırmaktadır (Skolnick ve Grimmett 2005).

### 2.1.3 Tedavi

Pterjium tedavisinde öncelikle ilerlemesini önlemeye yönelik önlemler alınmalıdır. UV filtreli gözlükler kullanılmalı, kronik irritasyonda koruyucu gözlükler kullanılmalıdır. Ilımlı irritatif semptomlarda oküler lubrikanlar ve/veya topikal antihistaminik/vazokonstriktörler önerilir. Şiddetli vasküler enjeksiyon ve irritatif semptomların olduğu durumlarda ılımlı topikal steroidler veya nonsteroid antiinflamatuvarlardan faydalanılır. Dellen gelişmişse prezervatif içermeyen gözyaşı pomatları ve 24 saat geçici kapama uygulanır. Pterjiumun esas tedavisi cerrahi eksizyondur.

Cerrahi tedavi endikasyonları şöyle sıralanabilir:

1. Görme kaybı,
2. Belirgin kozmetik deformite,
3. Medikal tedavi ile rahatlatılamayan irritasyon bulguları,
4. Oküler hareket kısıtlanması,
5. Pterjiumun görme aksına ilerlemesi

Cerrahide amaç iyi bir kozmetik görünüm ve inflame olmayan bir oküler yüzey sağlamak ve komplikasyon ve nüks gelişimini önlemektir. Tüm cerrahi yöntemlerde pterjiumun çıkarımı temel olarak aynıdır. Açıkta kalan sklera yüzeyinin kapatılmasında kullanılan yöntemler cerrahi farklılıkları oluşturmaktadır. Pterjiumun eksizyonu veya avülsiyonu, pterjium başının transplantasyonu, konjoktival otogreft cerrahisi, amniyotik membran transplantasyonu, konjonktival rotasyonel otogreft, dar-strip konjonktival otogreft, limbal konjonktival otogreft ve limbal epitelyal otogreft gibi ,lameller veya penetran keratoplasti, müköz membran greftleri ve deri greftleri, thiotepa, mitomisin-C gibi medikal tedavilerin nüksü azaltmak için cerrahi esnasında ve sonrasında uygulanması, radyasyon tedavisi, laser teknikleri günümüze

kadar uygulanan belli başlı yöntemler arasında sayılabilir. En yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olan konjonktival otogreft uygulamasında nüksün önlenmesi için pterjium eksizyonundan sonra hasarlanmış limbusun sağlam konjonktiva dokusu ile örtülmesi amaçlanır. primer ve nüks pterjiumlarda etkili ve uzun dönemde emniyetli olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir (Nurözler 2008; Ang ve ark. 2007; Jaros ve DeLuise 1988).

Nüks pterjiumlar klinik olarak çok daha hızlı ilerler ve tekrarlanan cerrahilerde başarı oranı düşüktür. Nüks oranı farklı cerrahi tekniklerle %80'e çıkabilmektedir. Nükslerin %97'si ilk bir yılda görülmektedir. Bu nedenle nüks oranını belirlemek için hastaların en az bir yıl gözlenmesi gerekir. 40 yaş altı ve şiddetli aktivite gösteren pterjium nüks için bir risk faktörüdür (Hirst ve ark. 1994).

Primer konjonktiva kapamada pterjium eksizyonundan sonra alt ve üstteki sağlam konjonktiva kenarları serbestleştirilerek sütüre edilir. Bu yöntemle nüks %2.1-88 arasında bildirilmektedir (Ang ve ark. 2007).

Konjonktival Z-plasti olarak bilinen rotasyonel konjonktival flep işleminde pterjium başı çıkarıldıktan sonra sağlam konjonktiva limbus tarafına dikilirken pterjium gövdesi yan tarafa bulbar konjonktivaya yönlendirilir. Bu teknikle nüksü önlemek için hasarlanmış limbus sağlam konjonktiva ile kapanırken daha sonra olası bir otogreft için normal konjonktiva korunmaktadır (Lei 1996).

Pterjium tedavisinde otogreft uygulaması Kenyon (1985) tarafından tarif edilmiştir. Pterjium eksizyonundan sonra açıkta kalan sklera üst temporalde bulbar konjonktivadan hazırlanan serbest konjonktival greft ile kapatılır. Bu yöntemin uygulandığı 8 çalışmanın ortalama nüks oranı %7.9'dur. Konjonktival otogreftin 0.5mm limbal doku ve periferik kornea içermesi bariyer olarak yararlıdır. Yirmisekiz ilerlemiş primer ve 15 nüks pterjiumu içeren bir çalışmada minimum 3 yıllık takipte konjonktival limbal otogreftte hiç nüks görülmezken yalnızca konjonktival otogreft yapılan primer pterjiumlu hastalarda %8.3, nüks pterjiumlu hastalarda %33.3 nüks görülmüştür (Allan ve ark. 1993).

## 2.2. K-ras Onkogeni

Başlangıçta normal olan bir hücre sonradan içinden çıktığı organizmanın ölümüne yol açacak özellikler edinmesi olarak tanımlanan “onkogenez” sürecinde nokta mutasyonu, kromozomal yeniden düzenlenme, gen amplifikasyonu veya aşırı gen ekspresyonu bilinen başlıca mekanizmalardır. Bu mekanizmalar hücre çoğalmasında itici rol oynayan protoonkogenlerin sürekli aktif hale geçmesi yada hücre çoğalmasını baskılayan tümör supresör genlerde işlev kaybı yolu ile kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olabilmektedir (Cefle 2009).

Protoonkogenler normalde hücre çoğalmasını fizyolojik gereksinimlere göre kontrollü olarak yürütmektedir. Transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörü ve büyüme faktörü reseptörleri, hücre içi sinyal iletimi, membranla ilişkili G proteinleri belli başlı örnekleri olarak sayılabilir. Dominant kalıtım gösteren protoonkogen devamlı etkin hale gelmesi halinde artık “onkogen” olarak adlandırılır (Croce 2008).

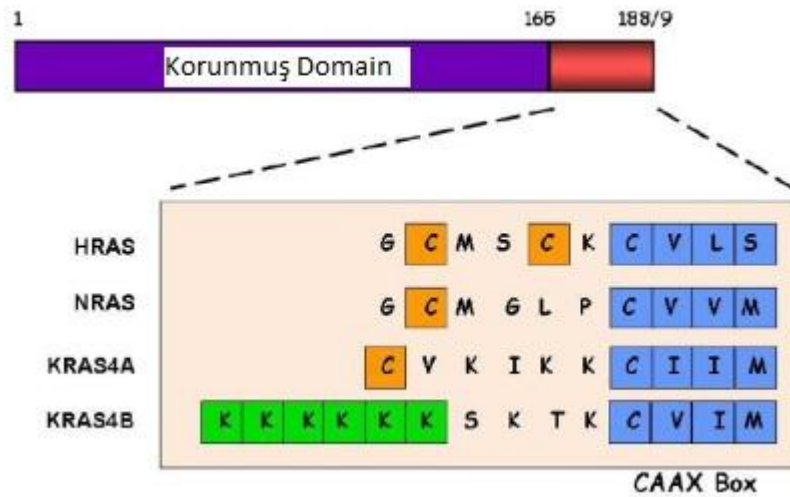
İlk olarak 1981’de insan mesane kanseri hücrelerinden elde edilen DNA’nın kültür ortamında fare hücrelerini etkin biçimde transforme etmesiyle insan tümörlerinin de biyolojik açıdan aktif hücre sel onkogenler içerdiği gösterilmiş ve bunlar Harvey Sarkom Virusunun insan homoloğu olduklarından H-*ras* onkogeni olarak adlandırılmıştır (Shih ve ark, 1981). İlk tanımlanan onkogen olan *ras* onkogeni aynı zamanda en sık görülen ve üzerinde en fazla çalışılan onkogendir. Tüm kanserlerin yaklaşık %30’unda bildirilmektedir ve literatürde hakkında 48000’in üzerinde çalışma mevcuttur.

Ras gen ailesi 189aa’lık ve yaklaşık 21kDa’luk, plazma membranı iç kısmına bağlı bir proteini kodlamaktadır. En sık mutasyona uğrayan üye 12p12.1 lokusundaki K-*ras*’dır. Bunu 11p15.5 lokusundaki H-*ras* ve 1p13.1 lokusundaki N-*ras* takip eder (Bos 1989). K-*ras* proteininden alternatif ekleme ile %90 homoloji gösteren, yalnızca karboksi uçları farklı Kras4A ve 4B alt protein tipleri ortaya çıkmaktadır (Konstantinopoulos ve ark. 2007). Bunların dışında R-*ras*, TC21, M-*ras*, Rap 1A, Rap 1B, Rap 2A, Rap 2B Ra1A, Ra1B gibi 150’den fazla alttipi mevcuttur (Takai ve ark, 2001). Tümünün yapısındaki ilk 165 aminoasit aynıdır. Oldukça konservatif olan bu bölgeler GTP’nin bağlanması, hidrolizi ve regülatör ve alt basamaklardaki efektörlerle fonksiyonel ilişkilerden sorumludur. Yüksek değişkenlik gösteren

karboksi ucunda posttranslasyonel modifikasyonu belirleyen sekanslar içermektedir. Örneğin CAAX domaini membran hedeflenmesinden sorumludur (Konstantinopoulos 2007).

Ras proteininin posttranslasyonel modifikasyonu komplike çok aşamalı bir süreçtir. H-ras hariç tüm ras proteinleri CAAX motifindeki sisteinden prenilasyona (yani farnezilasyon veya geranilgeranilasyon) uğrar. Takiben CAAX motifinden proteolitik klevaj olur ve ekspozite olan sistein karboksimetilasyona uğrar. Son olarak H-ras, N-ras ve K-ras 4A karboksi uca yakın sisteinden palmitolasyona uğrar. K-ras4B ise polibazik lizinden zengin sekans içerir ve bu da plazma membranı ile elektrostatik ilişki kurmasına imkan sağlar (Şekil 1) (Westcott ve To, 2013).

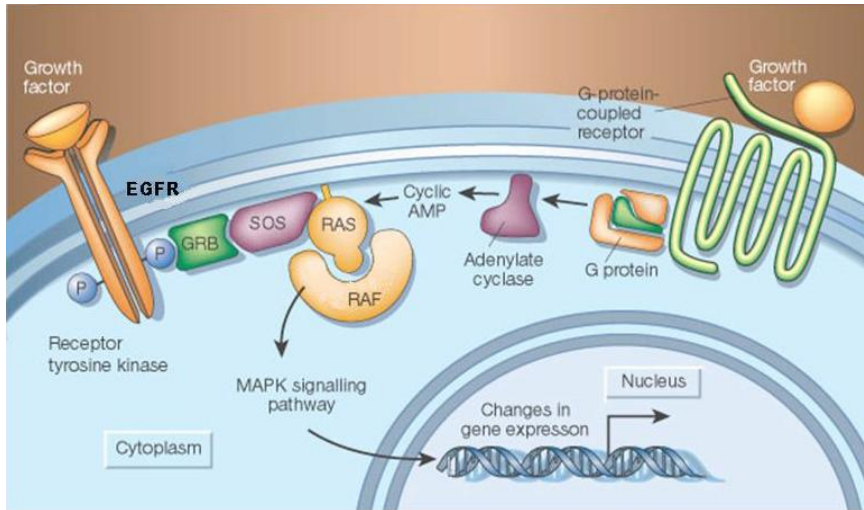
Şekil 1: RAS proteini temel yapısı (Westcott ve To 2013).



Ras gen ailesinin kodladığı proteinlerin bugün yalnız kanserde değil hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hayatta kalımı gibi birçok fizyolojik olayı kontrol eden sinyal iletim ağında da hayati rol oynadığı ortaya konmuştur (Fernandez-Medarde ve Santos, 2011). İlk olarak 1964'te Harvey ve Kirsten (Harvey 1964; Kirsten ve Mayer 1967) tarafından virüs aracılığıyla sarkoma oluşumunun gösterilmesi ile tanımlanmıştır. Bu nedenle "Rat sarcoma" nın kısaltması olarak "ras" geni olarak adlandırılmıştır. Altıptilerinden K-ras "Kirsten", H-ras ise "Harvey" isminden gelmektedir (Scolnick ve ark. 1973).

Monomerik bir G proteini olan *ras* proteini translasyon sonrası modifikasyondan sonra hücre içi membranda yerleşir ve istirahatte GDP ile birlikte (*ras*-GDP) inaktif halde bulunur. Burada protein tirozin kinaz (PTK) reseptöründen nükleer transkripsiyona kadar devam eden sinyal iletme basamaklarından oluşan MAPK yada diğer adıyla *Ras-raf-MEK-MAPK* yolağında fonksiyon görmektedir (Malumbres ve Barbacid 2003) (Şekil 2). Bu yolda ligand protein tirozin kinaz (PTK) reseptörüne bağlanır ve reseptörün otofosforilasyonuna yol açar. Bunu takiben bir adaptör protein olan Grb2 (growth factor receptor bound protein 2) yapısında bulunan SH-2 domainindeki Y-V/L-N-X motifi aracılığı ile PTK reseptörünün fosfotirozinine bağlanır. Grb-2'nin bağlandığı PTK reseptörleri arasında

**Şekil 2.** Ras-MAPK yolağı



EGF, PDGF, CSF-1, SCF sayılabilir. Bunların hepsi de *ras* yolağının aktivasyonuna yol açarlar. Bağlanma sonrası Grb-2'nin yapısındaki SH-3 domaini bir diğer adaptör protein olan SOS'un proline zengin C- terminal dizisine bağlanır. SOS *ras* proteini için bir guanin nükleotid değişim faktörüdür. Grb-2 ile bağlandığında GTP-bağlı aktif *ras* oluşumunu stimüle eder.

Bir GTPaz olan *ras* proteininde GDP'nin yerine GTP bağlanması aktif konformasyona dönüşümü tetikler. Aktive olan *ras* proteini bir serin/treonin kinaz olan *raf*'ın N-terminalinde yer alan regülatör bölgesi ile etkileşir ve konformasyonel değişimini sağlayarak çalıştırır. Bu değişimde *raf* fosforlanmış Ser621 kısmı aracılığı

ile skaffold protein 14-3-3 ailesi ile etkileşir. Yani *raf* proteininin aktivasyonu için hem 14-3-3 hem de *ras* gereklidir.

Aktive *raf* MAPK kinaz da denilen MEK'i (Mitojen ekstraselüler sinyali regüle edici kinaz) iki serininden (Ser218 ve Ser222 pozisyonlarından) fosforile eder. MEK keşfedilen ilk gerçek ikili özgül kinazdır (dual-specificity). Aktif hale gelen MEK de MAPK'ı aktive eder. MAPK bir serin/treonin protein kinazdır. Treonin ve tirozin amino asitlerinden fosforlanır. Aktif MAPK hücre zarı ve sitoplazmadaki substratlarını fosforlar, Ayrıca nükleer transkripsiyon faktörlerinin fosforladığı çekirdeğe girer ve hücre proliferasyonunda önemli genlerin transkripsiyonunu sağlar. (Örn: *myc*)

MAPK yolağı en iyi bilinen mitojenik yolaklardandır. Mitojenik uyarım ve strese yanıt sinyali oluşumuna katılırlar. Büyüme uyarımlarının çoğu MAPK'ı aktive eden kinaz kaskadı üzerinde birleşirler. MAPK'ya *erk* (Ekstraselüler Sinyal-Regülasyonlu Kinaz) da denir. Beş izoformu tanımlanmıştır, bunlardan *erk1* ve *erk2* üzerinde en çok çalışılanlardır. MAPK aktivasyonu bifaziktir: 5-10dk içinde bir geçici pik ve birkaç saat süren güçlü bir yapar. Farklı aktivasyon kinetikleri farklı hücresel yanıtı yol açarlar. İnaktivasyonu birkaç fosfataz tarafından yapılır. Sitoplazmada, negatif feedback loop'undaki yolağın yukarıdaki bileşenleri fosforlar, örneğin SOS, RAF ve MEK'i fosforlar MAP kinaz yolağı inhibe olur. MAPK'nın bilinmeyen daha birçok substratının olduğu düşünülmektedir (Kolch 2000).

Tüm ras izoformlarının aktivitesi GTP ve GDP'ye bağlanma oranı ile kontrol edilmektedir. Ras proteinlerini çok yavaş bir GTPaz aktivitesi vardır. Bu süreç GEF ve GAP proteinleri ile kontrol edilir. GEF'leri GDP ayrılmasını hızlandırırken, GAP'ler intrinsik GTPaz aktivitesini değişik derecelerde teşvik eder. Kodon 61'deki Arg parmağı GTP hidrolizi için hayati bir bölgedir. Fosfor transferi yapan GAP için su moleküllerinin doğru oryantasyonda olması önemlidir (Bos ve ark. 2007). Bu hayati bölgeleri etkileyen mutasyonlar yada GAP proteinlerinin mutasyonları yolağın sürekli aktivasyonuna yol açabilmektedir. Nörofibromin (NF1), p120GAP, GAP1 ailesi, CAPRI ve RASAL GAP proteinlerine örnek olarak verilebilir. Bunların mutasyonları ve buna yönelik tedaviler güncel tedavi seçeneklerinde önemli bir

başka hedef grubu oluşturmaktadır (Tidyman ve Rauen 2009). İnsan tümörlerinin %30'unda Ras/Raf/MEK/ MAPK yolağının aşırı aktivasyonu söz konusudur. Bu oran tümörlerdeki *ras* mutasyonu sıklığı ile uyum göstermektedir. (Scheffzek ve ark. 1997) .

Bu malign transformasyon sürecinde sinerjik etkileşim de önem taşımaktadır. Normal koşullarda, EGF ve PDGF gibi büyüme faktörlerinin PI-3K yolunu uyarılarında *ras*'in etkinliği minimal düzeydedir. Buna karşılık onkojenik *ras*, PI-3K yolunun güçlü bir aktivatörüdür ve bu yolu aktive ederek apoptozisi baskılamaktadır (Blalock ve ark. 2003). İnsan kanserlerinin önemli bir bölümü epitel hücrelerinden köken alır. Dolayısıyla, bu hücrelerde apoptozisin baskılanması karsinogenez sürecinde kritik etkenlerden birini oluşturur. Ayrıca onkojenik *ras* uyarısı, transforme hücrelerde normal hücrelerden farklı genlerin ekspresyonunu da uyarabilir (McCormick 1999).

Bugün insan tümörigenezindeki en sık mutasyonlar olarak bilinen H-*ras*, N-*ras* ve K-*ras* genlerindeki mutasyonların COSMIC veritabanı verilerine dayanan tümör tiplerine göre dağılımı Tablo 1'de sunulmaktadır. Bunlar arasında en yüksek frekansta görülen K-*ras* mutasyonlarının (%25-30) tümör progresyonunun erken evresinde sık görülmeleri K-*ras*'in tümörigeneze yol açtığı fikrini kuvvetle desteklemektedir. Taranan örneklerde N-*ras* ve H-*ras*'da mutasyonu oranı çok daha düşüktür (sırasıyla %15 ve %1) (Downward 2003) .

Tüm çalışmaların analizinde çeşitli *ras* izoformlarının mutasyonlarının belirli bazı tümör tipleri ile ilişki gösterdiği görülmektedir. Örneğin en sık görülen K-*ras* mutasyonu pankreatik duktal adenokarsinom, akciğer ve kolon kanserleri gibi adenokarsinomlar ve solid tümörlerde yüksek sıklıkta saptanırken, mesane karsinomları, seminom ve Hurthle hücreli karsinomlarda H-*ras* en sık görülen *ras* izoformudur. N-*ras* ise hematopetik tümörler, tiroid karsinomları ve melanomlarda yüksek insidanda görülmekte ve bu tümörlerde K-*ras* ve H-*ras* mutasyonu nadirdir (**Tablo 1**) .

Mutasyonlar daha çok *ras* ailesi üyelerinin primer nükleotid sekansı olan 2 sıcak noktada belirlenmiştir: Yüksek muhafazalı kodlama sekansı içeren ekzon 2'de kodon 12,13 ve ekzon 3'de kodon 61 (Shimizu ve ark 2007; Forbes ve ark. 2011). Bu



noktalardaki mutasyonlar ve insidansları *ras* ailesinin başlıca 3 üyesi arasında değişiklik göstermektedir. *K-ras*'daki başka kodonlarda da mutasyonlar görülebilmektedir ancak bunların biyolojik açıdan önemi bilinmemektedir. Yakın zamanlı bir çalışmada kolorektal karsinomda kodon 19 ve 20'de transsforme edici bir mutasyon bildirilmiştir (L19F ve T20A) (Naguib ve ark. 2011).

**Tablo 1** İnsan Tümörlerinde *ras* Mutasyonlarının Dağılımı (Pylayeva-Gupta ve ark. 2011)

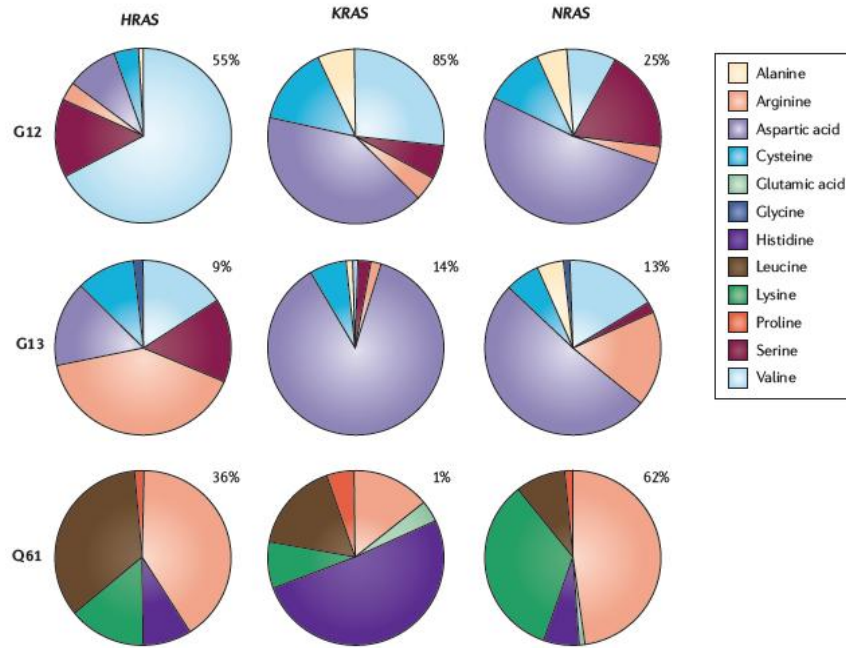
Doku	H-ras	K-ras	N-ras
Endokrin	3% (535)	0% (670)	5% (570)
Bilyer trakt	0% (153)	31% (1,679)	1% (287)
Kemik	2% (199)	1% (252)	0% (207)
Meme	1% (716)	4% (782)	2% (504)
Santral sinir sistemi	0% (964)	1% (1,054)	1% (1,017)
Serviks	9% (264)	7% (637)	2% (132)
Endometrium	1% (291)	14% (2,251)	0% (314)
Göz	0% (33)	4% (90)	1% (106)
Hematopoetik ve lenfoid doku	0% (3,076)	5% (5,978)	10% (8,753)
Böbrek	0% (273)	1% (704)	0% (435)
Kalın bağırsak	0% (617)	33% (34,013)	2% (1,570)
Karaciğer	0% (270)	5% (461)	3% (310)
Akciğer	0% (2,091)	17% (16,348)	1% (3,081)
Ösefagus	1% (161)	4% (375)	0% (161)
Over	0% (152)	14% (3,181)	5% (191)
Pankreas	0% (278)	57% (5,329)	2% (305)
Plevra	0% (19)	0% (45)	0% (30)
Prostat	6% (558)	8% (1,184)	2% (588)
Tükrük bezi	15% (161)	3% (170)	0% (45)
Cilt	6% (2,100)	3% (1,462)	18% (4,956)
İnce bağırsak	0% (5)	20% (316)	0% (5)
Mide	4% (384)	6% (2,793)	2% (215)
Testis	4% (130)	4% (432)	3% (283)
Timus	2% (46)	2% (186)	0% (46)
Tiroid	3% (4,137)	2% (5,166)	8% (4,662)

*Kaynak:* COSMIC veritabanı (Parantez içindeki rakamlar sekanslanan total örnek sayısını göstermektedir.)

*N-ras* geninin onkojenik mutasyonları insan tümörlerinde farklı bir dağılım paterni göstermektedir. En yüksek mutasyon oranı Q61'dedir (total *N-ras* mutasyonlarının yaklaşık %60'ı). Daha düşük oranlarda mutasyon G12'de (%24.4) ve G13'de (%12.7) saptanmaktadır. *H-ras* mutasyonları da kendi spesifik paternlerini göstermektedir. En yüksek oranda mutasyon kodon 12'de (yaklaşık %54) takiben kodon 61 (%34.5) ve kodon 13'de (%9) görülmektedir (Forbes ve ark 2011)(Şekil 3).

*Ras* aktivasyonu *in vitro* veya hücre dizilerinde başka mekanizmalarla da olabirse de *ras* genlerinde onkojenik mutasyon tümör gelişimindeki en hayati mekanizma olarak görünmektedir (Pulciani ve ark. 1985). *Ras* mutasyonu oranı ve tipi ise tümör tipine göre de değişkenlik göstermektedir.

**Şekil 3.** Ras izoformlarında G12, G13 ve Q61'de mutasyon sıklığı (COSMIC veritabanı, Pyleyeva-Gupta ve ark. 2011'den alınmıştır)



Son 30 yıldaki çalışmaların verileri *ras* ve diğer onkogenlerin sporadik insan tümörlerinin gelişimi ile de ilişkili olduğunu net olarak ortaya koymuştur. Yakın zamanlı çalışmalarda ise *ras* ve Ras-MAPK yolağının diğer üyelerinin germline mutasyonunun tümörlerden daha az oranda da olsa bu yolağın yapısal aktivasyonu ile sonuçlandığını ve birbirinden ayrı ama ilişkili gelişimsel sendromlara yol açtığı

gösterilmiştir. Bu tip mutasyonlardan ilk bildirilen nörofibromatozis 1 (NF-1) lokusundaki GTPaz aktive edici bir proteindir. Daha sonra ras-MAPK yolağında diğer sinyalizasyon moleküllerinden olan PTPN11, MEK1, MEK2 ve SPRED1'de, SOS1, Ras1 gibi pozitif ve negatif ras regülatörlerinde veya BRAF gibi yolağın alt kısmındaki moleküllerde mutasyon gösterilmiş ve Noonan, Costello, kardiyofasyokutanöz, Legius veya Leopard sendromları gibi kalıtsal gelişimsel sendromlarla ilişkili bulunmuştur (Schubbert ve ark. 2007).

Bugün ras sinyalizasyonunda değişikliklerin kanser ve gelişimsel sendromlar dışında başka bazı patolojilerin gelişiminde de rol oynadığı yakın zamanlı çalışmalarda bildirilmiştir. Örneğin H-Ras aktivasyonu obes olmayan diabet ve diabetik retinopatide retina kapiller hücrelerinin artmış apoptozisi ve anormal damar gelişimi ile ilişkili bulunmuştur. (Kowluru ve ark. 2009). Hücrel farnezillenmiş ras proteinlerinin artışı hiperinsülinemide gözlenen bazı fenotiplerden sorumlu bulunmaktadır (Kanwar ve ark. 2008). Glomerulonefritte ise K-ras ve H-ras ekspresyon paternlerindeki değişim gösterilmiştir (Kocher ve ark. 2003). Nöronların nörodejenerasyona maruz kaldığı Alzheimer hastalığında da N-ras akümüasyonu ve nNos ile birlikte lokalizasyon gösterilmiştir. (Luth ve ark. 2000). Ras ile ilişkisi gösterilmiş bir diğer hastalık da kronik idyopatik ürtikerdir. Yüksek SOS1 düzeyi ve ras sinyalizasyonu gösterilmiştir (Confino-Cohen ve ark. 2002).

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1 GEREÇ**

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları polikliniğinde muayenesi sonucunda pterjium tanısı konulup eksizyonuna karar verilen olgulara ameliyat öncesi çalışma hakkında bilgi verildi. Çalışmaya katılmayı kabul edenlere onam formu imzalatılmasını takiben ekte bulunan çalışma formu dolduruldu (Şekil 4). Hastanın dosya bilgilerinden her iki gözün en iyi düzeltilmiş görme keskinliği, ön segment muayene bulguları, pterjium evresi kaydedildi. Ameliyathane koşullarında lokal anestezi altında yapılan pterjium eksizyonu ve otogreft uygulaması esnasında patolojik incelemeye gönderilmek üzere saklanan pterjium dokusundan ve otogreft uygulaması için sağlam konjonktivadan eksize edilen dokudan 1x1 mm'lik örnek alındı. Alınan örnekler %0.9'luk serum fizyolojik içerisinde Ependorf tüplerine konuldu ve DNA analizi yapılana kadar -80°C'de saklandı.

#### **3.2 YÖNTEM**

Pterjium dokuları ve normal dokularda mutasyon analizi. Taze dokudan DNA izolasyonu sonrası "Qiagen Pyromark K-ras Kit" (katalog : 970452, Almanya) kullanılarak bölgesel sekanslama tekniği ile gerçekleştirildi. Bölgesel sekanslama, Sanger'in zincir sonlanma reaksiyonu ile gerçekleştirilen DNA dizi analizinden farklı ve yeni nesil sekanslama teknolojisi olarak bilinen bir tekniktir. Temeli DNA polimeraz aktivitesinin kemilüminesan bir enzim aracılığı ile tespitine dayanan bölgesel sekanslama yönteminde dizileme reaksiyonu dizilenecek DNA 'nın tek sarmalı üzerinde tamamlayıcı sarmalın sentezlenmesi şeklindedir. Sarmalı tamamlanması işlemi esnasında saptanan kemilüminesan sinyal hangi nükleotidin bağlandığını gösterir.

#### Şekil 4 Çalışmaya Alınan Hasta için Veri Formu

1

PTERJUM ÇALIŞMA FORMU

HASTA ADI SOYADI:

TC KİMLİK NO:

BASVURU NO:

DOĞUM TARİHİ : CİNSİYET : Kadın Erkek

Mesleği:

Ortalama günlük dışarıda kalma süresi : saat /gün

Güneş gözlüğü kullanımı :

Hiç Nadiren **ÇASUS** Sıklıkla Her zaman

Aile öyküsü: Var Yok

Diğer hastalık ve ilaç öyküsü :

**İsterjum** süresi :

Daha önce **pterjuma** cerrahisi : Var Yok

Diğer görece **pterjuma** : Yok Var **pterjuma** **pterjuma** değil

Diğer göz problemleri:

Muayene bulguları :

GK : OD: OS:

**Biyomikroskop** : OD: OS:

**İsterjumun** **İsterjuma** mesafesi:

**Evdus** : OD: OS:

### 3.2.1 Taze dokudan DNA izolasyonu

DNA analizi öncesinde dokular oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi. Ependorf tüplerindeki serum fizyolojik yalnız taze doku kalana kadar aspire edildi. Takiben dokular yeni Ependorf tüplerine alındı ve distile su ile yıkandı. Daha sonra aşağıdaki işlemler uygulanarak DNA analizi yapıldı. Analiz için QIAamp DNA FFPE Doku kiti kullanıldı.

1. Hazırlama protokolüne göre analiz için kullanılacak olan “Buffer AW1” e 25 ml, Buffer AW2” ‘ye 30 ml etanol eklendi. Buffer ATL oda sıcaklığına getirildi ve Buffer AL 56°C’de inkübe edildi.
2. Her doku örneğinin üzerine 180 µl Buffer ATL ve 25µl Proteinase K eklenerek tüpler vortekslendi.
3. Dokular lizise uğrayana kadar 56°C’de bir gece boyunca inkübe edildi. 90°C’de 1 saat daha inkübe edildikten sonra tüp kapaklarının iç tarafındaki damlaları da tüpün içine almak için tekrar santrifüj yapıldı.
4. 200 µl Buffer AL eklenip vortekslendi, takiben 200 µl etanol (%96-100) eklenir ve tüpler tekrar vortekslendi.
5. Tüplerin içindeki karışım QIAamp MinElute spin kolona aktarıldı ve 9000 rpm’de 2 dakika santrifüj yapıldı. Spin kolonun yerleştiği tüpler atılarak QIAamp MinElute spin kolon yeni kolleksiyon tüplerine yerleştirildi.
6. Her bir tüpe 500µl Buffer AW1 eklendi ve tüplerin kapakları kapatılarak tekrar 9000 rpm’de 2 dakika santrifüj yapıldı. Spin kolonun yerleştiği tüpler yine atılarak QIAamp MinElute spin kolon yeni kolleksiyon tüplerine yerleştirildi.
7. Tüplere 500µl Buffer AW2 eklendi ve tüplerin kapakları kapatılarak tekrar 9000 rpm’de 2 dakika santrifüj yapıldı. Spin kolonun yerleştiği tüpler yine atılarak QIAamp MinElute spin kolon yeni kolleksiyon tüplerine yerleştirildi.
8. Karışım 14000 rpm’de 4 dakika santrifüj edildi. Spin kolonun yerleştiği tüpler atıldı ve QIAamp MinElute spin kolon 1.5ml’lik Ependorf tüplerine yerleştirildi.
9. Spin kolonun tam ortasına 30-50µl Buffer ATL eklendi. Bir dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 14000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi.

DNA analizi sonrası spektrofotometrik olarak DNA'nın saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrofotometre (Nanodrop ND 1000) kullanılarak ölçüm yapıldı. DNA 260nm dalga boyunda, protein 280 nm dalga boyunda, fenol ve diğer bileşikler ise 230 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. Buna göre DNA'nın saflığı değerlendirilirken A260/280 ve A260/230 oranları dikkate alınmaktadır. Bu çalışmada da bu prensiplere uyularak DNA'nın saflık ve miktar analizi yapıldıktan sonra PCR aşamasına geçildi.

### **3.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Bu aşamada Hot StarTaq Plus Master Mix Kiti ve PyroMark KRAS Kiti kullanılarak kodon 12, kodon 13 ve kodon 61'in kanserde mutasyona uğrayabilen önemli bir bölgenin aşağıdaki aşamalar gerçekleştirilerek PCR amplifikasyonu yapıldı. İşlem öncesi PCR primer solüsyonları oda sıcaklığına getirildi ve PCR primerleri içeriği tüpün dibinde toplamak için santrifüj edildi.

1. PCR için gereken tüm bileşenleri içeren PCR primer karışımı Tablo 2'de verilen oranlarda, 24 olguya uygun miktarda hazırlandı. PCR tüplerinden her birine 20 µl konuldu.

2. İzole edilen DNA örnekleri 1 µl'de 10 ng olacak şekilde dilue edildi ve her örnek DNA'dan 5 µl'lik her bir PCR tüpüne eklenerek karıştırıldı .

3. Çalışma DNA'larının dışında negatif ve pozitif kontroller için de PCR tüpü hazırlandı. Negatif kontrol için bir PCR tüpüne şablon DNA olmadan yalnız PCR primer karışımı konuldu. Pozitif kontrol olarak ise kit içerisinde bulunan "wt KRAS" kontrol DNA'sı kullanıldı.

4. PCR tüpleri termal cycle cihazına yerleştirildi ve cihaz Tablo 3'deki protokole göre çalıştırıldı.

**Tablo 2.** PCR Primer karışımı içeriği

<b>Bileşen</b>	<b>1 olgu için gerekli hacim</b>	<b>25 olgu için hesaplanan hacim</b>
PyroMark Plus Master Mix	12.5 µl	312.5 µl
Primer Mix (Kodon 12/13 veya 61 için)	1 µl	25 µl
Coral Load	2.5 µl	62.5 µl
Q solution	3 µl	75 µl
Mg Cl <sub>2</sub>	1 µl	25 µl
<b>TOPLAM</b>	20 µl	500 µl

**Tablo 3.** Termal cycle cihazı protokolü

			<b>Notlar</b>
<b>İlk etkinleştirme adımı:</b>	5 dakika	95 °C	HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase, bu ısıtma adımıyla etkinleşir.
<b>3 adımlı çevrim:</b>			
Denatürasyon	20 sn.	95 °C	
Yapıştırma	30 sn.	53 °C	
Uzatma	20 sn.	72 °C	
Çevrim sayısı	40		
<b>Son uzatma:</b>	5 dakika	72 °C	

Elde edilen PCR ürünleri daha sonra “Streptavidin Sepharose High Performance Boncukları” üzerinde hareketsiz hale getirilmesi işlemine tabi tutuldu.



## A. “Streptavidin Sepharose High Performance” Boncuklarında Hareketsiz Hale Getirme

Bu aşamada PCR ürünü olan DNA'nın tek sarmal haline getirilmesi ve sekanslama primerinin PyroMark Q24 MDx üzerinde bölgesel dizileme analizinden önce şablona yapışmasına yöneliktir

1. Öncelikle PyroMark Q24 MDx vakum istasyonu işlem için hazırlandı. Her kuyuya cihaz kullanım kılavuzunda %70'lik etanol, denaturasyon solüsyonu, “washing buffer ve distile su gibi sıvılar belirtilen miktarlarda konuldu. Vakum açılır ve prob içinden en az 70 ml su geçirilerek temizlenir ve prob istasyon üzerindeki park kuyucuğuna yerleştirildi.
2. Tüm ayıraç ve solüsyonlar oda sıcaklığına getirildi. Streptavidin Sepharose High Performance'ı içeren şişe homojen bir solüsyon oluşana kadar çalkalandı.
3. DNA'yı hareketsiz hale getirme için Tablo 4'deki miktarlarda bir ana karışım hazırlandı.

**Tablo 4.** DNA'yı hareketsiz hale getirme için ana karışım

<b>Bileşen</b>	<b>Hacim/örnek</b>
Streptavidin Sepharose High Performance	2 µl
PyroMark Binding Buffer	40 µl
Yüksek saflıkta su	28 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>70 µl</b>

4. Yirmi dört kuyulu plakanın kuyularına anakarışımdan 70 µl ve PCR ürününden 10 µl eklendi.

5. Kuyuların üzeri strip kullanılarak kapatıldı. Kuyuların arasındaki bölgelere tekrar baskı uygulanarak aralasında sızıntı olmadığından emin olundu.

6. Sekanslama primerleri bulunan tüpleri açmadan önce, içerikleri tüplerin dibine toplamak için kısa süreyle santrifüj uygulandı. Her bir sekanslama primerinden yani “Seq Primer KRAS 12/13” ve “Seq Primer KRAS 61”den Tablo

5’de gösterilen miktarı PyroMark Annealing Buffer’da seyreltildi. Sekanslanacak toplam örnek sayısı için gerekenden bir fazla miktarda seyreltilmiş sekanslama primeri hacmi hazırlandı (örnek sayısı + bir ekstra).

**Tablo 5.** Sekanslama primerlerinin örnek seyreltilmesi

<b>Bileşen</b>	<b>Hacim/örnek</b>
Seq Primer KRAS 12/13 <b>veya</b> Seq Primer KRAS 61	0,8 $\mu$ l
PyroMark Annealing Buffer	24,2 $\mu$ l
<b>Toplam hacim</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>

7. PCR plakasını oda sıcaklığında (15–25 °C) 1400 devir/dakika hızında 5–10 dakika boyunca çalkalandı. Bir dakikadan az bir süre içinde sefaroz boncukların yakalanması işlemine geçildi.

8. 25  $\mu$ l seyreltilmiş sekanslama primeri her bir PyroMark Q24 Plate kuyusuna eklendi.

9. PCR plakası ve PyroMark Q24 Plate şekil 1’de görülen “ PyroMark Q24 MDx vakum istasyonunda” uygun yerlere yerleştirildi. Vakum anahtarı açılarak alete vakum uygulandı.

10. Filtre problemleri PCR plakasına dikkatle indirildi, bu şekilde 15 sn tutuldu. Böylece hareketsiz hale getirilmiş şablonu içeren boncukları yakalandı. Vakum aleti dikkatlice kaldırıldı.

11. Alet %70 etanol içeren yatağa (yatak 1) aktarıldı ve 5 sn. boyunca yıkandı.

12. Alet denatürasyon solüsyonunu içeren yatağa (yatak 2) aktarıldı ve 5 sn. boyunca yıkandı.

13. Alet yıkama tamponunu içeren yatağa (yatak 3) aktarıldı. Filtre Burada problemler 10 sn. boyunca yıkandıktan sonra yukarıya ve geriye, dikey yönde 90°’den fazla kaldırıp, filtre problemlerinden sıvıların akmasını sağlamak için 5 sn. boyunca bekletildi .

14. Alet “PyroMark Q24 Plate” üzerinde tutulurken, alettaki vakum anahtarı

“Off” konumuna getirerek kapatıldı.

15. Sekans primerlerini içeren plakadaki boncuklar, aleti yanlara doğru nazikçe çalkalayarak serbest bıraktırılmaya çalışıldı. Filtre problemlerini kuyuların dibine yaslanmış olarak bırakıldı.

16. Problemler nükleaz içermeyen su bulunan yatağa (yatak 4) aktarıldı ve 10 sn. boyunca çalkalandı.

17. Filtre problemleri nükleaz içermeyen suya (yatak 5) indirildi ve vakum uygulayarak yıkandı. Problemler 70 ml ultra saf suyla yıkandı.

18. Aleti yukarıya ve geriye, dikey yönde 90°’den fazla kaldırıp, filtre problemlerinden sıvıların akmasını sağlamak için 5 sn. boyunca bekletildi .

19. Alettaki vakum anahtarı “Off” konuma getirildi ve alet “Parking (P)” konumuna alındı.

16. Vakum pompası kapatıldı.

17. PyroMark Q24 Plate’i örnekler 80°C’de 2 dakika boyunca ısıtıldıktan sonra optimum birleşmeyi sağlamak için +4’de 15 dakika boyunca bekletildi. Takiben “PyroMark Q24 MDx”in çalıştırıldığı sekans analizi aşamasına geçildi.

### **3.2.3 Dizi Analizi**

Bu aşamada “PyroMark Gold Q24 Reagents”ın , “PyroMark Q24 Cartridge”a yüklenmesi ve “PyroMark Q24 MDx” üzerinde bir run (çalışma) işleminin yürütülmesi amaçlanmaktadır. Kodon 12/13 ve kodon 61 için ayrı ayrı yapılmaktadır.

1. İşlem öncesinde cihaza bağlı bilgisayarda araç çubuğunda “yeni çalışma dosyası oluşturma” komutu seçildi ve çalışma parametreleri olgu isimleri girildi. Takiben “Tools” komutundan “pre run information” seçilerek gereken enzim karışımı, substrat karışımı ve nükleotid hacimleri ve plaka ayarının bir listesi yazdırıldı.
2. USB belleği bağlantı noktasına takıldı.
3. PyroMark Q24 Cartridge’ına “pre run information” da cihaz programının bildirdiği miktarda adenin, timin, guanine ve sitozin nükleotidleri , enzim ve substrat tampon hacimleriyle yüklendi.
4. Kartuş kapısı açıldı ve doldurulmuş ayıraç kartuşunu etiketi dışarıya bakacak şekilde yerleştirildi. Çizginin kartuş önünde görünür olduğu kontrol edildi ve kapı kapatıldı.

5. Plaka tutucu çerçeve açıldı ve plaka ısıtma bloğuna yerleştirildi.
6. Ekran düğmeleri kullanılarak önceden hazırlanmış olan çalışma dosyası seçildi. Ana menüden “Run” [Çalışma] seçilerek işlem başlatıldı.
7. Çalışma bittiğinde ve alet, çalışma dosyasının USB belleğe kaydedildiğini doğruladığında cihaz kapatıldı.
8. Alet kapağı açılarak ayıraç kartuşu ve plaka yerleştirilen kısımlardan çıkarıldı.

USB belleğe kaydedilmiş plan veri dosyaları incelendi ve kodon 12/13 ve kodon 61’e ait normal doku ve pterjium örneklerinde saptanan mutasyonlardan LOD değeri  $\pm 3$  oranında olanlar belirlendi. Bu örneklerin PCR aşamasından itibaren tüm işlemleri tekrarlandı. PCR aşamasında DNA miktarı 10  $\mu$ l’ye çıkarıldı.

### **3.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Bu çalışmadaki verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 13.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Değerlendimelerde “Kikare testi” ve Fisher Exact Test” kullanılırken ;  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

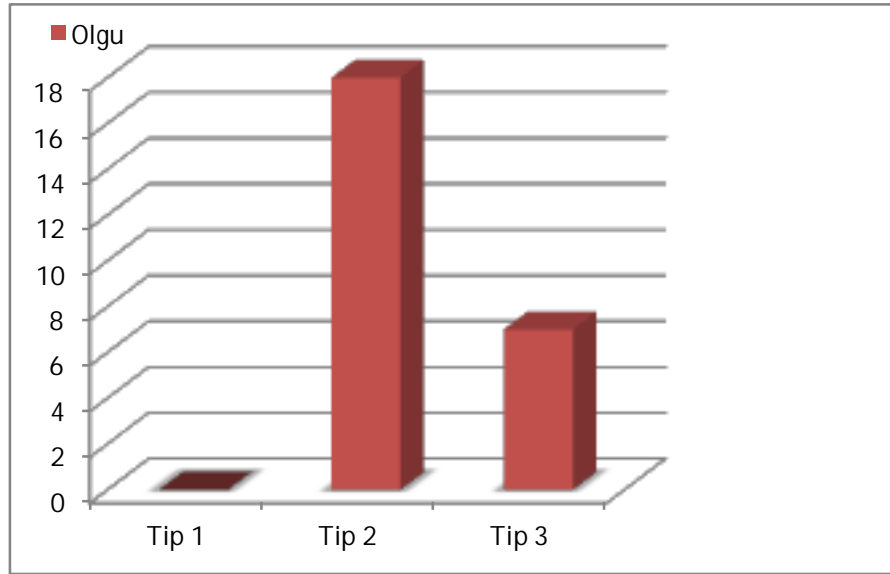
#### 4. BULGULAR

Çalışma kapsamında 25 olguya ait pterjium dokusu değerlendirilmiştir. Aynı olgulara ait normal konjonktiva dokuları çalışmada kontrol grubu olarak alınmıştır. Olguların 10'u (%40) kadın , 15'i (% 60) erkek ve yaş ortalaması  $54.54 \pm 13.13$ 'dü.

Güneş gözlüğü kullanım oranı % 16 (4/25) idi. Günlük dışarıda kalma süresi ortalama 4.08 (2-8) saattir. Ailesinde birinci derece akrabalarında pterjium öyküsü bildirilen hasta olmadı.

Pterjium 18 olguda (% 72) korneayı 2-4 mm geçiyordu (tip 2), 7 olguda (% 28) ise korneayı 4 mm'den fazla (tip 3) geçiyordu (**Şekil 5**). On beş olgunun (%60) diğer gözünde de pterjium mevcuttu. Bunların 4'ünde pterjium tip 3, 3'ünde tip 2, 8'inde tip 1 aşamasındaydı. Pterjium tüm olgularda nazal lokalizasyondaydı ve hepsine ilk kez pterjium cerrahisi uygulandı.

**Şekil 5.** Olgularda pterjiumun evrelere göre dağılımı



Pterjium dokusunun mutasyon analizinden önce yapılan DNA izolasyonunun uygun kalitede ve miktarda olduğu belirlendi. Bunun için yapılan spektrofotometrik ölçüm (Nanodrop ND ile) Tablo 6 'da sunulmuştur.

**Tablo 6.** İzole edilen pterjium DNA'larının spektrofotometrik analiz sonuçları

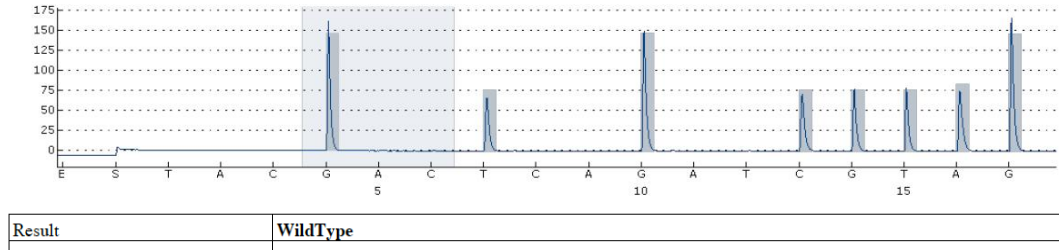
Olgu No	Nükleik Asit (ng/μl)	A260	A280	260/280	260/230
1	61.7	1.233	0.667	1.85	0.3
2	30.1	0.603	0.351	1.72	0.16
3	28.2	0.564	0.339	1.66	0.14
4	87.9	1.759	0.932	1.89	0.37
5	29.6	0.592	0.355	1.66	0.15
6	28.2	0.564	0.336	1.68	0.15
7	28	0.56	0.334	1.67	0.14
8	33.5	0.67	0.394	1.7	0.17
9	29.2	0.585	0.347	1.68	0.15
10	40.6	0.813	0.463	1.75	0.18
11	36.1	0.723	0.417	1.73	0.19
12	27.7	0.555	0.331	1.67	0.13
13	27.7	0.554	0.33	1.68	0.13
14	69.1	1.382	0.774	1.78	0.33
15	94.5	1.891	0.891	2.12	0.45
16	33.3	0.666	0.382	1.74	0.17
17	32.8	0.657	0.379	1.73	0.17
18	67.8	1.356	0.755	1.8	0.33
19	46.7	0.935	0.524	1.78	0.24
20	27	0.539	0.322	1.67	0.14
21	26.3	0.526	0.318	1.65	0.14
22	39.4	0.787	0.454	1.73	0.18
23	26.4	0.529	0.32	1.65	0.14
24	27.3	0.546	0.328	1.66	0.15
25	27	0.542	0.332	1.63	0.14

“Pyrosequence” yöntemi ile yapılan dizi analizinde olguların normal konjonktiva dokularında 12, 13 ve 61 nolu kodonlarda K-ras mutasyonu saptanmadı (**Şekil 6**). Aynı bireylere ait pterjium dokularında kodon 12’de yalnız 1 olguda mutasyon saptandı. Bu mutasyon Glisin ile Valin (Gli12Val; GGT >GTT) yer değiştirme nokta mutasyonu idi. Kodon 13’de pterjium dokusunda mutasyon saptanan olgu olmadı (**Tablo 7**). İstatistiksel analizde Fisher kesin ki-kare testinde normal gruba göre anlamlı bir farklılık bulunmadı (sırasıyla  $p= 0.32$  ,  $p= 1$ ).

**Tablo 7.** Kodon 12,13 ve 61’de mutasyon görülme sıklığı

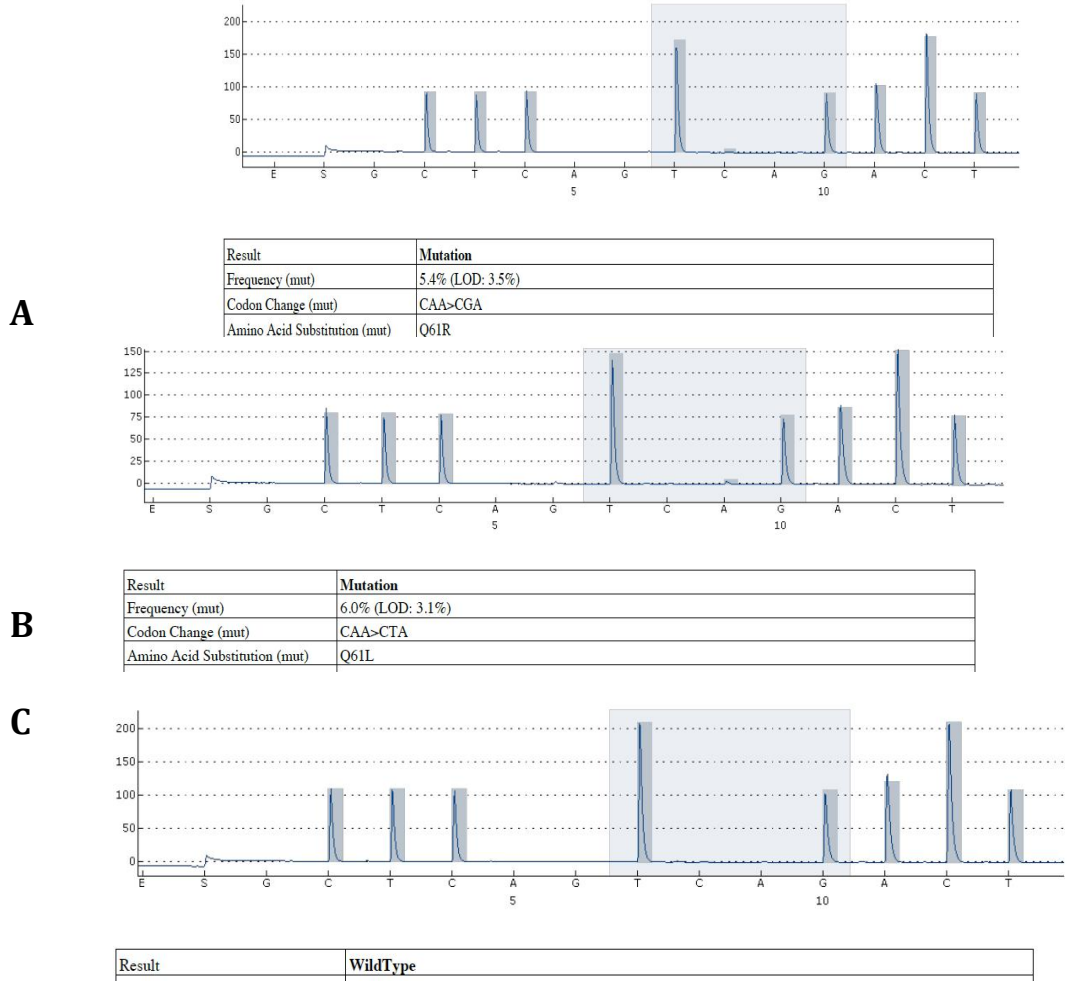
KODON	Normal doku	Pterjium
Kodon 12	0	1
Kodon 13	0	0
Kodon 61	0	7

**Şekil 6.** Yirmibeşinci olguya ait kodon 12 dizileme grafiği. Mutasyon saptanmayan normal konjonktiva dokusu.



Kodon 61’de ise 7 olguda pterjium dokusunda mutasyon saptandı (Tablo 8). Bu nokta mutasyonları 4 olguda glutamin ile arjinin (Glu61Arg CAA>CGA), 3 olguda ise glutamin ile lösün (Glu61Leu;CAA>CTA) yer değiştirme nokta mutasyonu şeklindeydi (**Şekil 7**). Mutasyonların görüldüğü olgular Tablo 8’de görülmektedir. Fisher kesin ki-kare testi ile yapılan istatistiksel analizde de kodon 61’deki mutasyon frekansı pterjium dokusunda normal dokudan istatistiksel olarak da farklı bulundu ( $p=0.01$ ).

**Şekil 7.** Olguların kodon 61'e ait dizileme grafikleri. (A) Kodon 61'de CGA mutasyonu (B) Kodon 61'de CTA mutasyonu (C) Mutasyon saptanmayan normal konjonktiva dokusu



Kodon 61'de mutasyon saptanan olguların demografik özellikleri incelendiğinde 5'i kadın 2'si erkek 7 olgunun yaş ortalamalarının 53.5 (28-65) olduğu saptandı. Klinik özellikler açısından ise olguların 5'inde pterjium tip 2, birinde tip 3 düzeyindeydi. Tüm olguların diğer gözlerinde de pterjium mevcuttu ve 5 olguda evre 1, bir olguda tip 2 aşamasındaydı. Olguların hiçbiri güneş gözlüğü kullanmıyordu ve günlük ortalama dışarıda çalışma süresi 3.33 (3-5) saatti.



**Tablo 8.** K-ras Kodon 61 mutasyon analiz sonuçları

OLGU NO	KODON 61	
	Normal doku	Pterjium
1	N	N
2	N	CAA>CGA
3	N	N
4	N	N
5	N	CAA>CGA
6	N	N
7	N	N
8	N	N
9	N	N
10	N	N
11	N	CAA>CTA
12	N	CAA>CGA
13	N	N
14	N	N
15	N	CAA>CTA
16	N	N
17	N	CAA>CGA
18	N	N
19	N	N
20	N	N
21	N	CAA>CTA
22	N	N
23	N	N
24	N	N
25	N	N

## 5. TARTIŞMA

Konjonktivanın hiperplazi ve displazisi ile karakterize pterjiumun klinik özellikleri ve cerrahi tedavi yöntemleri iyi bilinmekle birlikte patogenezi halen tam olarak açıklanamamıştır. Ancak bugüne değin yapılan çalışmalarda gösterilen hücre siklus regülasyonundaki proliferasyon lehine değişiklikler, apoptozisin inhibisyonu, VEGF, b-FGF, TGF- $\beta$  vb büyüme faktörlerinin artışı, anjiogenik stimülasyon ve ekstraselüler matriksin modülasyonu vb bulgular pterjiumun neoplazi benzeri bir büyüme bozukluğu olabileceği şüphesini gündeme getirmektedir (Detorakis ve Spandidos 2009; Liu ve ark. 2013; Bradley ve ark 2010). Metastatik tümör özellikleri göstermemekle birlikte kanser dokusuna benzer şekilde hücre migrasyonu ve lokal anjiogenez gerektirmesi benign neoplazi hipotezini desteklemektedir. Günümüzde özellikle nüks pterjium tedavisinde cerrahi eksizyona ek olarak kullanılan 5-florourasil, mitomisin vb ilaçlar ile daha başarılı sonuçlar elde edilmesi de patogenezi kontrol edilemeyen hücre çoğalmasının sözkonusu olduğunu düşündürmektedir (Yağmur 2007).

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada da pterjium –benign neoplazi benzerliğini destekleyen bulgular elde edilmiştir. Telomerin kısalmasını bloke ederek hücre bölünmesinde rol oynayan bir ribonükleoprotein olan telomerazın birçok neoplazideki gibi özellikle UVR etkisi ile artması, hücre proliferasyonunda rol oynayan ve kanserlerde sürekli olarak aktive olduğu bilinen MAP kinaz sinyal yolağı üyelerinin pterjiumda anormal ekspresyonu bunlara örnek olarak verilebilir (Park ve Jin 2000; Forsyth ve ark. 2002; Di Girolama ve ark. 2004; De Luca ve ark. 2012; del Barco ve ark. 2012; Detorakis ve ark. 2010; Cui ve ark. 2011). LH ve Mİ'de transformasyon gösteren hücrelerin karakteristik bir özelliğidir. Detorakis ve ark. (1998) pterjium dokusunda en sık 9p'de (48%), takiben 17q'da LH olduğunu göstermişlerdir ancak Mİ saptayamamışlardır. LH daha fazla olmak üzere , Mİ pterjium etiyojisinde tumor supresör genlerin rol oynadığını desteklemektedir (Spandidos ve ark. 1997; Detorakis ve ark. 1998; Detorakis ve ark. 2000). Bu anormalliklerin üst kapak altında kalan, güneşe maruz kalmayan normal konjonktivada olmaması ise değişikliklerin UV-radyasyonu ile ilişkili olduğunu doğrulamaktadır (Schneider ve ark 2007).

UV'nin DNA 'da neden olduğu hasarın onarılamaması ile karakterize bir kromozom kırığı hastalığı olan kseroderma pigmentosumda cilt kanserlerinin sık

görüldüğü bilinmektedir. Bu hastalarda da en sık oküler bulgulardan biri pterjiumdur. Coroneo (2011) hipotezine göre göze direk olarak az miktarda UV ışık vurmakta ancak yansıyan ışık gözün ön kısmında odaklanmakta ve distal limbustaki korneal kök hücreler direk vuran ışığın 20 katına kadar ulaşan oranda UV'ye maruz kalmaktadır (Podskochy 2004). Bu nedenle de yüzeyel limbus hücreleri normal vuran ışığı absorbe ederken yansıyan ışık kornea kök hücrelerinin direk hasar görmesine yol açmaktadır. Bu durum da kseroderma pigmentosumda pterjiumun en sık konjonktiva bulgusu arasında yer almasına yol açmaktadır (Brooks ve ark. 2013).

UV ışığın en sık yol açtığı baz değişimleri diprimidine sekanslarında C→ T ve CC→ TT 'dir (Wood ve ark. 1984). Bunlardan biri olan siklobutan primidin dimerleri frekans, yavaş tamir ve mutajenite gözönünde bulundurulduğunda en mutajenik olandır (Yoon ve ark. 2000; You ve ark. 2001) Deneysel bir çalışmada tavşan kornealarında da UV ışığın siklobütan primidin dimeri oluşumuna yol açtığı bildirilmiştir (Cimpean ve ark. 2013).

Siklobutan primidin oluşumuna en hassas bölge ise fare cilt tümörlerinde p53 geninin özellikle 270. Kodonunu (insanlarda 278. Kodona karşılık gelir) olarak gösterilmiştir. (Kanjalil ve ark. 1993; van Kranen ve ark. 1995). Ultraviyole radyasyon hasarlı hücrelerin birçoğunda major hücre stress düzenleyicilerinden olan p53 aşırı ekspresyona uğramaktadır. Bu immünohistokimyasal yöntemlerle de gösterilmiştir. (Wood ve ark. 1984) Bir tümör supresör olan p53 hücre siklusunu düzenlemekte ve DNA tamir, ve sentezi, hücre diferansiasyonu ve apoptozisi sürecinde fonksiyon görmektedir. İnsanlardaki neoplastik olaylardaki en sık genetik markırdır (Pfeifer 1997).

Normal hücrelerde genellikle saptanamayan p53 mutasyonu insan konjonktivasında da normalde zayıf ekspresyon göstermektedir (Bargonetti ve Manfredi 2002). Pterjium dokusunda da p53'ün artmış ekspresyonu birçok çalışmada gösterilmiştir. Chowers ve ark. (2001) p53'ün aktif primer pterjiumlarda aşırı, rekürren pterjiumlarda aktif formdan biraz daha az ekspresyon gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bu ilişki nedeniyle Weinstein ve ark. (2002) da pterjiumun dejeneratif bir patoloji değil anormal veya kontrolsüz hücre proliferasyonundan kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Ancak çelişkili sonuçlar bildiren çalışmalar da mevcuttur. Örneğin Tunuslu hastalarda p53 aşırı ekspresyonu görülürken Japon hastalarda saptanamamıştır. Bu da Tunus'lu hastalarda aktinik patolojinin daha fazla rol

oynadığını düşündürmektedir (Ueda ve ark. 2001). Chowers ve ark (2001) ise p53'ün sadece primer pterjiumlarda pozitif olduğunu rekürren formlarda saptanamadığını bildirmiş ve rekürrensle ilişkili olmadığını ileri sürmüştür.

Ancak p53 mutasyonunun ağırlıklı olarak aktinik radyasyona maruz kalanlarda görülmesi ve rekürrenslerde düşük olması hücre proliferasyonunun tetikleyen başka onkogenlerin de rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle tümör supresör genlerin yanısıra protoonkogenlerin de UVR'dan etkilenerek pterjiyum oluşumunda rol oynadığını bildiren çalışmalar gündeme gelmiştir. Fare cilt tümörlerinde kültür hücrelerinde UVR'a maruziyet sonrası H-ras, K-ras, ve N-ras genlerinde mutasyonlar da saptanmıştır ve genellikle insanlarda da kutanöz melanomlar gibi güneşe maruz kalan bölgelerde görülmektedir. Bu mutasyonlar genleri aktif hale getirmektedir (Dushku ve Reid 1994; Nishigori ve ark. 1994).

Ras onkogenleri malign tümörlerin yaklaşık %22'sinde aktive olmaktadır (Prior ve ark. 2012). Karsinogenezin özellikle erken dönemlerinde saptanan mutasyonların prekanseröz veya benign tümörlerde aktivasyonu ile ilgili bilgilerimiz sınırlıdır . Cildin benign bir tümörü olan keratoakantomda ve prekanseröz bir lezyonu olan kolon adenomlarında da ras mutasyonları bildirilmektedir (Coramiras ve ark. 1991). İnsanlarda malignensilerde saptanan K-ras geni mutasyonlarının %98'i kodon 12 ve 13'de saptanmaktadır. Kodon 61 mutasyonları malignensilerde oldukça nadir görülmektedir (Prior ve ark. 2012). Mutant *ras* proteinleri, kodon 61'de fosfat bağlanması için gerekli olan su moleküllerinin koordinasyonunu bozarak kodon 12 ve 13'de ise van der Waals bağlarının oluşumunu önlemektedir. Hidrolizi bozulan GTP'nin *ras* proteinin aktif *ras*-GTP formunda kalmasına; bu da hücrenin kontrolsüz uyarılmasına yani *Ras/Raf/MEK/ MAPK* yolağının aşırı aktivasyonuna yol açmaktadır (Scheffzek ve ark. 1997) .

Pterjiyum dokusunda restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism- RFLP) ve sekans analizi yöntemleri ile yapılan bir çalışmada pterjiyumların %10'unda kodon 12'de K-ras mutasyonu (tüm olgularda GGT- glisinden GTT-valin'e) gösterilmiştir. Aynı çalışmada normal konjonktiva ve periferik kan örneklerinde mutasyon saptanmamıştır. H-ras ve N-ras'da da kodon 12'de mutasyon saptanmamıştır. Ancak K-ras kodon 12'deki mutasyonlarının postoperative rekürrens ve genç yaşla korele olması pterjiyumun klinik profili ile uyumlu olduğunu göstermektedir (Detorakis ve ark. 2005).

Bizim çalışmamızda sadece bilinen mutasyon varlığını taramak yerine tüm bölgenin dizilemesine imkan sağlaması, sensitivitesinin yüksek olması nedeniyle RFLP yöntemi yerine bölgesel dizileme yöntemini tercih edildi (Zhiyong ve ark. 2006). Yalnız primer pterjium eksizyonu yapılan 24 olguda K-ras mutasyonunun değerlendirilmiş ve kodon 12'de yalnız bir olguda K-ras mutasyonu saptanırken, kodon 61'de 7 olguda mutasyon saptanmıştır. Bu nokta mutasyonları 4 olguda Glu61Arg, 3 olguda Glu61Leu mutasyonu şeklindeydi. A-T'dan T-A'ya transversiyona bağlı glutamin lösin transformasyonu benign bir cilt tümörü olan keratoakantomda da Hras onkogeni 61. Kodonundaki en sık mutasyon olarak bildirilmiştir (Corominas ve ark. 1991). Detorakis ve arkadaşlarının (2005) çalışmasından farklı olarak bölgesel dizileme yönteminin kullanıldığı çalışmamızda yalnız primer cerrahi uygulanan pterjium olguları dahil edildiği için Detorakis ve ark.nın ileri sürdüğü kodon 12 mutasyonu ile rekürrens ilişkisini gösterilememiştir.

Kodon 61'de mutasyon saptanan olguların özellikleri incelendiğinde yaş ortalaması ve pterjium evrelerinin benzer oranlarda olduğu görülmektedir. Ancak olguların tümünde pterjiumun bilateral olması bu olguların K-ras mutasyonu için belki de bir yatkınlık taşıdıklarını düşündürmektedir. Bu gruptaki olguların günlük ortalama dışarıda çalışma süresi daha kısa olmasına rağmen güneş gözlüğü kullanmaması mutasyona yatkınlığı açıklamaktadır. Ancak bu durum değerlendirilirken hastalardan alınan bu bilgilerin hata payının yüksek olduğu gözönünde bulundurulmalıdır.

Pterjiumda K-ras kodon 61 mutasyonu ile ilgili daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürde bu konuda bir ilk olan çalışmamızda bu bölgedeki mutasyon oranı normal konjonktiva dokusuna göre anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Törmänen ve ark. (1992) cilt tümörlerinde UV radyasyonun oluşturduğu primidin dimerlerinin ras onkogeninde kodon 61 mutasyonuna yol açtığını göstermiştir. Pterjiumda da K-ras onkogeninde kodon 61'de mutasyonun normal dokuya göre belirgin artışı pterjiumun benign bir neoplazi olması yönündeki bulguları desteklemektedir. Bu pterjium dokusunda hücrelerin regülasyonunda proliferasyon yönündeki değişiklikleri, büyüme faktörlerinin artışı ve özellikle antikanserojen ajanların tedavideki etkinliğini açıklayıcı bir bulgudur. Mutasyon saptanan olguların yaş ortalamasının diğer olgulara göre daha yüksek olması, bilateralite ve güneş gözlüğü kullanım oranının ana gruptan daha düşük kalması ileri yaş ve UV'ye maruziyetin mutasyonla ilişkili olabilecek risk faktörleri olabileceğini

düşündürmektedir. Ancak bu ilişkinin açıklığa kavuşturulması daha fazla olgu içeren ve bu faktörlere göre gruplanmış yeni çalışmalar ile mümkün olacaktır.

.Mevcut tedavi yöntemleri ile ancak eksiz edilerek tedavisi mümkün olan pterjiumun daha kolay ve kesin tedavisi için progresyonunda etkin olan moleküler mekanizmaların ortaya konması şarttır. Moleküler mekanizmalara yönelik tedaviler konjonktivadaki bu hiperplazinin önlenmesini sağlayarak prognozda önemli gelişmeler sağlayabilecektir. Çalışmamızda K-ras kodon 61 mutasyonunun normal dokuya göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermesi patogeneizde benign neoplazi benzeri proliferasyon hipotezini destekleyen ve yeni tedavilere öncülük edebilecek bir bulgudur.

## 6. KAYNAKLAR

1. Allan BD, Short P, Crawford GJ, Barrett GD, Constable IJ. Pterygium excision with conjunctival autografting : an effective and safe technique. *Br J Ophthalmol* 1993; 77(11): 698-701.
2. Ando R, Kase S, Ohashi T, Dong Z, Fukuhara J, Kanda A, Murata M, Noda K, Kitaichi N, Ishida S. Tissue factor expression in human pterygium. *Mol Vis* 2011; 17: 63–69.
3. Ang LP, Chua JL, Tan DT. Current concepts and techniques in pterygium treatment *Curr Opin Ophthalmol* 2007; 18(4): 308-13.
4. Ashcroft M, Vousden KH. Regulation of p53 stability. *Oncogene* 1999; 18(53): 7637-43.
5. Aspiotis M, Tsanou E, Gorezis S, Ioachim E, Skyrias A, Stefaniotou M, Malamou-Mitsi V. Angiogenesis in pterygium: study of microvessel density, vascular endothelial growth factor, and thrombospondin-1. *Eye* 2007; 21(8): 1095-101.
6. Bargonetti J, Manfredi JJ. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol* 2002; 14(1):86–91.
7. Beden U, Irkec M, Orhan D, Orhan M. The roles of T-lymphocyte subpopulations (CD4 and CD8), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), HLA-DR receptor, and mast cells in etiopathogenesis of pterygium. *Ocul Immunol Inflamm* 2003; 11(2):115-22.
8. Blalock WL, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Moyer PW, Lee JT, Franklin RA, Mirza A, MsMahon M, White MK, McCubrey JA. Requirement for the PI3K/Akt pathway in MEK1-mediated growth and prevention of apoptosis: Identification of an Achilles heel Leukemia. 2003 Jun; 17(6): 1058-67.
9. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989; 49(17): 4682–4689.
10. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEF's and GAP's: critical elements in the control of small G proteins *Cell* 2007; 129(5): 865-77.
11. Bradley JC, Yang W, Bradley RH, Reid TW, Schwab IR. The science of pterygia. *Br J Ophthalmol* 2010; 94(7): 815–820.
12. Brooks BP, Thompson AH, Bishop RJ, Clayton JA, Chan C, Tsilou E, Zein

- WM, Tamura D, Khan SG, Ueda T, Boyle J, Oh K, Imoto K, Inui H, Moriwaki S, Emmert S, Iliff NT, Bradford P, DiGiovanna JJ, Kraemer KH. Ocular manifestations of xeroderma pigmentosum: long term follow-up highlights the role of DNA repair in protection from sun damage *Ophthalmology*. 2013; 120(7): 1324–1336.
13. Cameron ME. Histology of pterygium : an electron microscopic study. *Br J Ophthalmol* 1983; 67(9): 604-8.
  14. Cefle K. Kanser Genetiği. *Klinik Gelişim* 2009; 22 (3): 50-59.
  15. Chen PL, Cheng YW, Chiang CC, Tseng SH, Chau PS, Tsai YY. Hypermethylation of the p16 gene promoter in pterygia and its association with the expression of DNA methyltransferase 3b. *Mol Vis* 2006; 12: 1411-16.
  16. Chen CL, Lai CH, Wu PL, Wu PC, Chou TH, Weng HH. The epidemiology of patients with pterygium in southern Taiwanese adults: the Chiayi survey. *Taiwan J Ophthalmol* 2013; 3: 58–61.
  17. Chien KH, Chen SJ, Liu JH, Woung LC, Chen JT, Liang CM, Chiou SH, Tsai CY, Cheng CY, Cheng CK, Hu CC, Peng CH. Correlation of microRNA-145 levels and clinical severity of pterygia. *Ocul Surf* 2013; 11(2): 133-8.
  18. Chiang CC, Cheng YW, Lin CL, et al. Cyclooxygenase 2 expression in pterygium. *Mol Vis* 2007; 13: 635-8
  19. Chowers I, Pe'er J, Zamir E, Livni N, Ilsar M, Frucht-Pery J. Proliferative activity and p53 expression in primary and recurrent pterygia. *Ophthalmology* 2001; 108(5): 985–8
  20. Chui J, Di Girolamo N, Coroneo MT, et al. The role of substance P in the pathogenesis of pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(10): 4482e9.
  21. Chui J, Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT. The pathogenesis of pterygium: current concepts and their therapeutic implications. *Ocul Surf* 2008; 6(1): 24-43
  22. Cimpean AM, Sava MP, Raica M. DNA damage in human pterygium : one-shot multiple targets *Mol Vis* 2013; 19: 348-56.
  23. Confino-Cohen R, Aharoni D, Goldberg A, Gurevitch I, Buchs A, Weiss M, Weissgarten J, Rapoport MJ. Evidence for aberrant regulation of the p21Ras



- pathway in PBMCs of patients with chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 109(2): 349-56.
24. Corominas M1, Sloan SR, Leon J, Kamino H, Newcomb EW, Pellicer A. ras activation in human tumors and in animal model systems *Environ Health Perspect.* 1991; 93: 19-25.
  25. Coroneo MT. Pterygium as an indicator of ultraviolet insulation: a hypothesis. *Br J Ophthalmol* 1993; 77(11): 734–739.
  26. Coroneo M. Ultraviolet radiation and the anterior eye. *Eye Contact Lens.* 2011; 37(4): 214–24.
  27. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 2008; 385(5): 503-511.
  28. Cui D, Pan Z, Zhang S, Zheng J, Huang Q, Wu K. Downregulation of c-Myc in pterygium and cultured pterygial cells. *Clin Exp Ophthalmol* 2011; 39(8): 784–792.
  29. De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/ AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16 Suppl2: S17–S27.
  30. del Barco Barrantes I, Nebreda AR. Roles of p38 MAPKs in invasion and metastasis. *Biochem Soc Trans* 2012; 40(1): 79–84.
  31. Delmas S, Shunburne L, Ngo HP, Allers T. Mre11-Rad50 promotes rapid repair of DNA damage in the polyploidy archaeon *Haloferax volcanii* by restraining homologous recombination. *PLoS Genet* 2009; 5(7): e1000552.
  32. Detorakis ET, Sourvinos G, Tsampralakis J and Spandidos DA. Evaluation of loss of heterozygosity and microsatellite instability in human pterygium: clinical correlations. *Br J Ophthalmol* 1998; 82(11): 1324-1328.
  33. Detorakis ET, Drakonaki EE and Spandidos DA: Molecular genetic alterations and viral presence in ophthalmic pterygium (Review). *Int J Mol Med* 2000; 6 (1): 35-41.
  34. Detorakis ET, Sourvinos G, Spandidos DA. Detection of herpes simplex virus and human papilloma virus in ophthalmic pterygium. *Cornea* 2001; 20(2): 164–167.
  35. Detorakis ET, Zafiropoulos A, Arvanitis DA, Spandios DA. Detection of point mutations at codone 12 of K-ras in ophthalmic pterygia *Eye* 2005; 19(2): 210-14

36. Detorakis ET, Spandidos DA. Pathogenetic mechanisms and treatment options for ophthalmic pterygium: trends and perspectives. *Int J Mol Med* 2009; 23(4): 439–447.
37. Detorakis ET, Zaravinos A, Spandidos DA. Growth factor expression in ophthalmic pterygia and normal conjunctiva. *Int J Mol Med* 2010; 25(4): 513–516.
38. Di Girolamo N, Kumar RK, Coroneo MT, Wakefield D. UVB-mediated induction of interleukin-6 and -8 in pterygia and cultured human pterygium epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(11): 3430-7.
39. 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(2): 195-228.
40. Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT. UVB-mediated induction of cytokines and growth factors in pterygium epithelial cells involves cell surface receptors and intracellular signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(6): 2430-7.
41. Di Girolamo N. Association of human papilloma virus with pterygia and ocular-surface squamous neoplasia. *Eye* 2012; 26(2): 202–211.
42. Downward J. Targeting RAS signaling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(1): 11-22.
43. Dushku N, Reid TW. Immunohistochemical evidence that human pterygia originate from an invasion of vimentin-expressing altered limbal epithelial basal cells. *Curr Eye Res* 1994; 13(7): 473-81.
44. Dushku N, Reid TW. p53 expression in altered limbal basal cells of pingueculae, pterygia, and limbal tumors. *Curr Eye Res* 1997; 16(12): 1179-92.
45. Dushku N, Hatcher SL, Albert DM, Reid TW. p53 expression and relation to human papillomavirus infection in pingueculae, pterygia, and limbal tumors. *Arch Ophthalmol* 1999; 117(12): 1593e9.
46. Dushku N, John MK, Schultz GS and Reid TW: Pterygia pathogenesis: corneal invasion by matrix metalloproteinase expressing altered limbal epithelial basal cells. *Arch Ophthalmol* 2001; 119(5): 695-706.
47. Fernandez-Medarde AF, Santos E. Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes & Cancer* 2011; 2(3): 344-358.

48. Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, Beare D, Jia M, Shepherd R, Leung K, Menzies A, Teague JW, Campbell PJ, Stratton MR, Futreal PA. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res* 2011; 39 (Database issue): D945-50.
49. Forsyth NR, Wright WE and Shay JW. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* 2002; 69(4-5): 188-197.
50. Harvey JJ. An unidentified virus which causes the rapid production of tumors in mice. *Nature* 1964; 204,:1104–1105.
51. Hilgers JH. Pterygium: its incidence, heredity and etiology. *Am J Ophthalmol* 1960; 50: 635–644.
52. Hirst LW, Sebban A, Chant D. Pterygium recurrence time. *Ophthalmology* 1994; 101(4): 755-8.
53. Hsiao CH, Lee BH, Ngan KW, Chuang WY, Yeung L, Yeh LK, Tan HY, Hui-Kang D, Lin KK. Presence of human papillomavirus in pterygium in Taiwan. *Cornea* 2010; 29(2): 123–127.
54. Hussain SP, Amstad P, Raja K, Sawyer M, Hofseth L, Shields PG, Hewer A, Philips DH, Ryberg D, Haugen A, Harris CC. Mutability of p53 hotspot codons to benzo(a)pyrene diol epoxide (BPDE) and the frequency of p53 mutations in nontumorous human lung. *Cancer Res* 2001; 61(17): 6350–6355.
55. Ioachim-Velogianni E, Tsironi E, Agnantis N, Datsiris G, Psilas K. HLA-DR expression in pterygium epithelial cells and lymphocyte subpopulations: an immunohistochemistry study. *Ger J Ophthalmol* 1995; 4(2): 123-9.
56. Jaros PA, DeLuise VP. Pingueculae and pterygia *Surv Ophthalmol* 1988; 33(1): 41-9.
57. Jaworski CJ, Aryankalayil-John M, Campos MM, Fariss RN, Rowsey J, Agarwalla N, et al. Expression analysis of human pterygium shows a predominance of conjunctival and limbal markers and genes associated with cell migration *Mol Vis* 2009; 15: 2421–2434.
58. Jin J, Guan M, Sima J, Gao G, Zhang M, Liu Z, Fant J, Ma JX. Decreased pigment epithelium-derived factor and increased vascular endothelial growth factor levels in pterygia. *Cornea* 2003; 22(5): 473-7.

59. John-Aryankalayil M, Dushku N, Jaworski CJ, Cox CA, Schultz G, Smith JA, Ramsey KE, Stephan DA, Freedman KA, Reid TW, Carper DA. Microarray and protein analysis of human pterygium. *Mol Vis* 2006; 12: 55-64.
60. Kanjilal S, Pierceall WE, Cummings KK, Kripke ML, Ananthaswamy HN. High frequency of p53 mutations in ultraviolet radiation-induced murine skin tumors: evidence for strand bias and tumor heterogeneity. *Cancer Res* 1993; 53(13): 2961-4.
61. Kanwar M, Kowluru RA. Diabetes regulates small molecular weight G-protein, H-Ras, in the microvasculature of the retina: implication in the development of retinopathy. *Microvasc Res* 2008; 76(3): 189-93.
62. (a) Kase S, Takahashi S, Sato I, Nakanishi K, Yoshida K, Ohno S. Expression of p27 (KIP1) and cyclin D1, and cell proliferation in human pterygium. *Br J Ophthalmol* 2007; 91(7): 958-61.  
(b) Kase S, Osaki M, Jin XH, Ohgami K, Yoshida K, Saito W, Takahashi S, Nakanishi K, Ito H, Ohno S. Increased expression of erythropoietin receptor in human pterygial tissues. *Int J Mol Med* 2007; 20(5): 699-702.
63. Kato N, Shimmura S, Kawakita T, Miyashita H, Ogawa Y, Yoshida S, Higa K, Okano H, Tsubota K. Beta-catenin activation and epithelial-mesenchymal transition in the pathogenesis of pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(4): 1511-7.
64. Kau HC, Tsai CC, Hsu WM, Liu JH, Wei YH. Genetic polymorphism of hOGG1 and risk of pterygium in Chinese. *Eye* 2004; 18(6): 635-9.
65. Kau HC, Tsai CC, Lee CF, Kao SC, Hsu WM, Liu JH, Wei YH. Increased oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human pterygium. *Eye* 2006; 20(7): 826-31.
66. Kenyon KR, Wagoner MD, Hettinger ME. Conjunctival autograft transplantation for advanced and recurrent pterygium. *Ophthalmology* 1985; 92(11): 1461-70.
67. Kirsten, W. H. & Mayer, L. A. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J Natl Cancer Inst.* 1967; 39(2): 311-335.
68. Kocher HM, Moorhead J, Sharpe CC, et al. Expression of Ras GTPases in normal kidney and in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18(11): 2284-92.

69. Kolch W. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; 351: Pt2: 289-305.
70. Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. Posttranslational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6(7): 541-555.
71. Kowluru RA, Kanwar M Translocation of H-Ras and its implications in the development of diabetic retinopathy, *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 387(3):461-6.
72. Kria L, Ohira A, Amemiya T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, transforming growth factor-beta, and tumor necrosis factor-alpha in pterygium. *Acta Histochem* 1996; 98(2): 195-201.
73. Kria L, Ohira A, Amemiya T. Growth factors in cultured pterygium fibroblasts: immunohistochemical and ELISA analysis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998; 236(9): 702-8.
74. Lan W, Petznick A, Heryati S, Rifada M, Tong L. Nuclear factor-kappa B: central regulator in ocular surface inflammation and diseases. *Ocul Surf* 2012; 10(3): 137–148.
75. Lee DH, Cho HJ, Kim JT, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and inducible nitric oxide synthase in pterygia. *Cornea* 2001; 20(7): 738-42.
76. Lei G. Surgery for pterygium using a conjunctival pedunculated flap slide. *Br J Ophthalmol* 1996; 80(1): 33-4.
77. Lekawa-Ilczuk A, Antosz H, Rymgayllo-Jankowska B, Zarnowski T. Expression of double strand DNA breaks repair genes in pterygium. *Ophthalmic Genet* 2011; 32(1): 39–47.
78. Lin S, Reiter K, Dreher AW, Frucht-Pery J, Feldman ST. The effect of pterygia on contrast sensitivity and glare disability. *Am J Ophthalmol* 1989; 107(4): 407-10.
79. Liu L, Yang D. Immunological studies on the pathogenesis of pterygium. *Chin Med Sci J* 1993; 8(2): 84-8.
80. Liu KJ, Qi HZ, Yao HL, Lei SL, Lei ZD, Li TG, Zhao H. An updated meta-analysis of the p53 codon 72 polymorphism and gastric cancer risk. *Mol Biol Rep* 2012; 39(8): 8265–8275.

81. Liu T, Yangwuyue L, Xie L, He X, Bai J. Progress in the pathogenesis of Pterygium *Current Eye Research* 2013; 38(12): 1191-97.
82. Loh A, Hadziahmetovic M and Dunaief JL: Iron homeostasis and eye disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790(7): 637-49.
83. Lu H, Lou DH, Zhu LL. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction study of polo-like kinase-1 in pterygia. *J Int Med Res* 2009; 37(6): 1851–1858.
84. Lukanidin E, Sleeman JP. Building the niche: the role of the S100 proteins in metastatic growth. *Semin Cancer Biol* 2012; 22(3): 216–225.
85. Luth HJ, Holzer M, Gertz HJ, Arendt T. Aberrant expression of nNOS in pyramidal neurons in Alzheimer’s disease is highly co-localized with p21ras and p16ink4a. *Brain Res.* 2000; 852(1): 45-55.
86. Mackenzie FD, Hirst LW, Battistutta D, Green A. Risk analysis in the development of pterygia. *Ophthalmol* 1992; 99(7):1056–1061.
87. Maini R, Collison DJ, Maidment JM, Davies PD, Wormstone IM. Pterygial derived fibroblasts express functionally active histamine and epidermal growth factor receptors. *Exp Eye Res* 2002; 74(2): 237-44.
88. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6): 459-65.
89. Mauro J, Foster CS. Pterygia: pathogenesis and the role of subconjunctival bevacizumab in treatment. *Semin Ophthalmol* 2009; 24(3):130–134.
90. Maxia C, Perra MT, Demurtas P, Minerba L, Murtas D, Piras F, Corbu A, Gotuzzo DC, Cabrera RG, Ribatti D, Sirigu P. Expression of survivin protein in pterygium and relationship with oxidative DNA damage. *J Cell Mol Med* 2008; 12(6A): 2372-80.
91. Maxia C, Perra MT, Demurtas P, Minerba L, Murtas D, Piras F, Cabrera R, Ribatti D, Sirigu P. Relationship between the expression of cyclooxygenase-2 and survivin in primary pterygium. *Molecular Vision* 2009; 15: 458–463.
92. McCormick F. Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol* 1999; 9(12):M53-6.
93. Moran DJ, Hollows FC. Pterygium and ultraviolet radiation: a positive correlation. *Br J Ophthalmol* 1984; 68(5): 343-6.
94. Naguib A, Wilson CH, Adams DJ, Arends MJ. Activation of K-RAS by co-mutation of codons 19 and 20 is transforming. *J Mol Signal* 2011; 6:2.

95. Naib-Majani W, Breipohl W, Shazli EE, Theuerkauf I, Pleyer U, Hahne JC, Wernert N. The Ets-1 transcription factor is involved in pterygial angiogenesis. *Anat Histol Embryol* 2007; 36(2): 107-10.
96. Nishigori C, Wang S, Miyakoshi J, Sato M, Tsukada T, Yagi T, Imamura S and Takebe H: Mutations in ras genes in cells cultured from mouse skin tumors induced by ultraviolet irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(15): 7189-7193.
97. Nolan TM, Di Girolamo N, Coroneo MT, Wakefield D. Proliferative effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on pterygium epithelial cells and fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(1): 110-13.
98. Nurözler AB. Konjonktiva yaşlanması ve dejeneratif hastalıkları Türkiye Klinikleri *J Ophthalmol-Special Topics* 2008; 1(3): 94-102.
99. Otlu B, Emre S, Turkcuoglu P, Doganay S, Durmaz R. Investigation of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNAs in pterygium tissue. *Eur J Ophthalmol* 2009; 19(2):175–179.
100. Park TK and Jin KH: Telomerase activity in pterygeal and normal conjunctival epithelium. *Korean J Ophthalmol* 2000; 14(2): 85-89.
101. Park CY, Choi JS, Lee SJ, Hwang SW, Kim EJ, Chuck RS. Cyclooxygenase-2-expressing macrophages in human pterygium co-express vascular endothelial growth factor. *Mol Vis* 2011; 17: 3468–3480.
102. 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 Vis Sci* 2004; 45(11): 3982-5.
103. Peiretti E, Dessi S, Mulas MF, Abete C, Galantuomo MS, Fossarello M. Fibroblasts isolated from human pterygia exhibit altered lipid metabolism characteristics. *Exp Eye Res* 2006; 83(3): 536-42.
104. Peiretti E, Dessi S, Mulas C, Abete C, Norfo C, Putzolu M, Fossarello M. Modulation of cholesterol homeostasis by antiproliferative drugs in human pterygium fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(8): 3450-8.
105. Peng ML, Tsai YY, Tung JN, Chiang CC, Huang YC, Lee H, Cheng YW. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism and protein expression in the pathogenesis of pterygium. *Br J Ophthalmol* 2014; 98(4):

106. Perra MT, Maxia C, Corbu A, Minerba L, Demurtas P, Colombari R, Murtas D, Bravo S, Piras F, Sirigu P. Oxidative stress in pterygium: relationship between p53 and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Mol Vis* 2006; 12:1136-42.
107. Pfeifer GP. Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochem Photobiol* 1997; 65(2): 270-83.
108. Piecyk-Sidor M, Polz-Dacewicz M, Zagorski Z, Zarnowski T. Occurrence of human papillomavirus in pterygia. *Acta Ophthalmol* 2009; 87(8): 890–895.
109. Pinkerton OD, Hokama Y, Shigemura LA. Immunologic basis for the pathogenesis of pterygium. *Am J Ophthalmol* 1984; 98(2): 225-8.
110. Piras F, Moore P, Ugalde J, Perra M, Scarpa A, Sirigu P. Detection of human papillomavirus DNA in pterygia from different geographical regions. *Br J Ophthalmol* 2003; 87(7): 864–866.
111. Podskochy A, Gan L and Fagerholm P: Apoptosis in UV exposed rabbit corneas. *Cornea* 2000; 19(1): 99-103.
112. Podskochy A and Fagerholm P. Repeated UVR exposures cause keratocyte resistance to apoptosis and hyaluronan accumulation in the rabbit cornea. *Acta Ophthalmol Scand* 2001; 79(6): 603-608.
113. Podskochy A. Protective role of corneal epithelium against ultraviolet radiation damage. *Acta Ophthalmol Scand.* 2004; 82(6):714–7
114. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of ras mutations in cancer. 2012; 72(10): 2457-67.
115. Pulciani S, Santos E, Long LK, Sorrentino V, Barbacid M. Ras Gene amplification and malignant transformation. *Mol Cell Biol.* 1985; 5(10): 2836-41.
116. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving tumorigenic web *Nat Rev Cancer* 2011; 11(11): 761-774.
117. Reisman D, McFadden JW, Lu G. Loss of heterozygosity and p53 expression in pterygium. *Cancer Lett* 2004; 206(1): 77-83.
118. Ren H and Wilson G. The effect of ultraviolet-B irradiation on the cell shedding rate of the corneal epithelium. *Acta Ophthalmol* 1994; 72(4): 447-



452.

119. Riau AK, Wong TT, Beuerman RW, Tong L. Calcium binding S100 protein expression in pterygium. *Mol Vis* 2009; 15: 335–342.
120. Riau AK, Wong TT, Finger SN, Chaurasia SS, Hou AH, Chen S, Yu SJ, Tong L. Aberrant DNA methylation of matrix remodeling and cell adhesion related genes in pterygium *PLoS* 2011; 6(2): e14687.
121. Ribatti D, Nico B, Maxia C, Longo V, Murtas D, Mangieri D, Perra MT, De Giorgis M, Piras F, Crivellato E, Sirigu P. Neovascularization and mast cells with tryptase activity increase simultaneously in human pterygium. *J Cell Mol Med* 2007; 11(3): 585-9.
122. Rodrigues FW, Arruda JT, Silva RE, Moura KK. TP53 gene expression, codon 72 polymorphism and human papillomavirus DNA associated with pterygium. *Genet Mol Res* 2008; 7(4): 1251–1258.
123. Sakoonwatanyoo P, Tan DT, Smith DR. Expression of p63 in pterygium and normal conjunctiva. *Cornea* 2004; 23(1): 67-70.
124. Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 1997; 277(5324): 333-8.
125. Schneider BG, John-Aryankalayil M, Rowsey JJ, Dushku N, Reid TW. Accumulation of p53 protein in pterygia is not accompanied by TP53 gene mutation. *Exp Eye Res* 2006; 82(1):91-8.
126. Schneider BG, Sahni D, Torres JC, Dushku N, Reid TW. MLH1 and MSH2 expression in pterygia. *Cornea* 2007; 26(4): 468-72.
127. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(4): 295-308.
128. Scolnick, EM, Rands E, Williams D, Parks WP. Studies on the nucleic acid sequences of Kirsten sarcoma virus: a model for formation of a mammalian RNA-containing sarcoma virus. *J Virol* 1973; 12(3): 458–463.
129. Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 1981; 290(5803): 261-4.
130. Shimizu N, Ohtsubo M, Minoshima S. Mutation- View/KMcancerDB: a database for cancer gene mutations. *Cancer Sci* 2007; 98(3): 259-67.
131. Shimmura S, Ishioka M, Hanada K, Shimazaki J, Tsubota K. Telomerase

- activity and p53 expression in pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(6): 1364-9.
132. Siak JJ, Ng SL, Seet LF, Beuerman RW, Tong L. The nuclearfactor kappaB pathway is activated in pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(1): 230–236.
133. Sjo NC, von Buchwald C, Prause JU, Norrild B, Vinding T, Heegaard S. Human papillomavirus and pterygium. Is the virus a risk factor? *Br J Ophthalmol* 2007; 91(8): 1016–1018.
134. Skolnick CA, Grimmert MR. Management of pterygium. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, eds. *Cornea. Surgery of the cornea and conjunctiva* 2<sup>nd</sup> ed. St. Louis: Mosby Year Book; 2005, p.1749-61.
135. Solomon A, Grueterich M, Li DQ, Meller D, Lee SB, Tseng SC. Overexpression of Insulin-like growth factor binding protein-2 in pterygium body fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(2): 573-80.
136. Spandidos DA, Sourvinos G, Kiaris H and Tsamprakakis J. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in human pterygia. *Br J Ophthalmol* 1997; 81(6): 493-496.
137. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001; 81(1): 153-208.
138. Tan DT, Lim AS, Goh HS, et al. Abnormal expression of the p53 tumor suppressor gene in the conjunctiva of patients with pterygium. *Am J Ophthalmol* 1997; 123(3): 404-5.
139. Tan DT, Tang WY, Liu YP, Goh HS and Smith DR. Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium. *Br J Ophthalmol* 2000; 84(2): 212-216.
140. 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(1): 99-104.
141. Tidyman WE, Rauen KA. The RASopathies: Developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19(3): 230-36.
142. a. Tong L. Expression of p27(KIP1) and cyclin D1, and cell proliferation in human pterygium. *Br J Ophthalmol* 2008; 92(1): 157.
- b. Tong L, Li J, Chew J, Tan D, Beuerman R. Phospholipase D in the

- human ocular surface and in pterygium. *Cornea* 2008; 27(6): 693-8.
143. Torres J, Enriquez-de-Salamanca A, Fernandez I, Rodriguez-Ares MT, Quadrado MJ, Murta J, Benitez del-Castillo JM, Stern ME, Calonge M. Activation of MAPK signaling pathway and NF-kappaB activation in pterygium and ipsilateral pterygium-free conjunctival specimens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(8):5842–5852.
144. Törmänen VT, Pfeifer GP. Mapping of UV photoproducts within ras proto-oncogenes in UV-irradiated cells: correlation with mutations in human skin cancer. *Oncogene* 1992; 7(9): 1729–36.
145. a. Tsai YY, Lee H, Tseng SH, Cheng JW, Tsai CH, Wu YH, Tsai FJ. Null type of glutathione S-transferase M1 polymorphism is associated with early onset pterygium. *Mol Vis* 2004; 10: 458-61.
- b. Tsai YY, Cheng YW, Lee H, Tseng SH, Tsai CH, Tsai FJ. No association of p53 codon 72 and p21 codon 31 polymorphisms in Taiwan Chinese patients with pterygium. *Br J Ophthalmol* 2004; 88(7): 975-6.
146. a. Tsai YY, Cheng YW, Lee H, Tsai FJ, Tseng SH, Lin CL, Chang KC. Oxidative DNA damage in pterygium. *Mol Vis* 2005; 11:71-5.
- b. Tsai YY, Cheng YW, Lee H, Tsai FJ, Tseng SH, Chang KC. p53 gene mutation spectrum and the relationship between gene mutation and protein levels in pterygium. *Mol Vis* 2005; 11: 50-5.
- c. Tsai YY, Chang KC, Lee H, Cheng YW, Tsai FJ, Tseng SH, Ao HS, Chau PS. Effect of p53 codon 72 polymorphism on p53 protein expression in pterygium. *Clin Experiment Ophthalmol* 2005; 33(1): 60-2.
147. Tsai YY, Bau DT, Chiang CC, Cheng YW, Tseng YW, Tseng SH, Tsai FJ. Pterygium and genetic polymorphism of DNA double strand break repair gene Ku70. *Mol Vis* 2007; 13: 1436-40.
148. Tsai YY, Chang CC, Chiang CC, Yeh KT, Chen PL, Chang CH, Chou MC, Lee H, Cheng YW. HPV infection and p53 inactivation in pterygium. *Mol Vis* 2009; 15: 1092–1097.
149. Tung JN, Wu HH, Chiang CC, Tsai YY, Chou MC, Lee H, Cheng YW. An association between BPDE-like DNA adduct levels and CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms in pterygium. *Mol Vis* 2010; 16: 623–629.
150. Ueda Y, Kanazawa S, Kitaoka T, Dake Y, Ohira A, Ouertani AM, Amemiya T. Immunohistochemical study of p53, p21 and PCNA in

- pterygium. *Acta Histochem* 2001; 103(2): 159-65.
151. van Kranen HJ, de Gruijl FR, de Vries A, Sontag Y, Wester PW, Senden HC, Rozemuller E, van Kreijl CF. Frequent p53 alterations but low incidence of ras mutations in UV-B-induced skin tumors of hairless mice. *Carcinogenesis* 1995; 16(5): 1141-7.
152. Wang IJ, Lai WT, Liou SW, Chiu CZ, Hu FR, Kao WW, Hung PT. Impression cytology of pterygium. *J Ocul Pharmacol Ther* 2000;16(6): 519-28.
153. Weinberg ED. The therapeutic potential of lactoferrin. *Expert Opin Investig Drugs* 2003;12(5): 841-851.
154. Weinstein O, Rosenthal G, Zirkin H, Monos T, Lifshitz T, Argov S. Overexpression of p53 tumor suppressor gene in pterygia. *Eye (Lond)* 2002; 16(5): 619–621.
155. Westcott PMK, To MD. The genetics and biology of KRAS in lung cancer. *Chin J Cancer* 2013; 32(2): 63-70.
156. Wood RD, Skopek TR, Hutchinson F. Changes in DNA base sequence induced by targeted mutagenesis of lambda phage by ultraviolet light. *J Mol Biol* 1984; 173(3):273-91.
157. Wong YW, Chew J, Yang H, et al. Expression of insulin-like growth factor binding protein-3 in pterygium tissue. *Br J Ophthalmol* 2006; 90(6): 769-72.
158. Yağmur M. Pterijum cerrahisi. *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci.* 2007; 3 (1): 67-74.
159. Yoon JH, Lee CS, O'Connor TR, Yasui A, Pfeifer GP. The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight. *J Mol Biol* 2000; 299(3):681-93.
160. You YH, Lee DH, Yoon JH, Nakajima S, Yasui A, Pfeifer GP. Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. *J Biol Chem* 2001; 276(4):44688-94.
161. Zhou L, Beuerman RW, Ang LP, Chan CM, Li SF, Chew FT and Tan DT. Elevation of human {alpha}-defensins and S100 calcium binding protein A8 and A9 in tear fluid of pterygium patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(5): 2077-86.
162. Zhiyong Zhou, Amanda C. Poe, Josef Limor, Katharine K. Grady, Ira Goldman, Andrea M. McCollum, Ananias A. Escalante, John W. Barnwell, Venkatachalam Udhayakumar. Pyrosequencing, a High-Throughput Method

for Detecting Single Nucleotide Polymorphisms in the Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate Synthetase Genes of *Plasmodium falciparum* J Clin Microbiol 2006; 44(11): 3900-3910.

163. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. Brain Res Bull 1995; 37(4): 417-429.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Banu Turgut Öztürk

**Doğum Tarihi:** 23 Kasım 1972

### Yabancı Diller:

1. ÖSYM Kamu Personeli Yabancı Dil Bilgisi Seviye Tespit Sınavı, Kasım 1997, İngilizce yabancı dil puanı: 94 (A)
2. ÖSYM Kamu Personeli Yabancı Dil Bilgisi Seviye Tespit Sınavı, Mayıs 1998, Almanca yabancı dil puanı: 74 (C)
3. Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı (ÜDS), Mart 2003, Sağlık bilimleri, İngilizce dil puanı: 90
4. Goethe Institut “Zentrale Mittelstufenprüfung” sınav sertifikası, 1991.
5. Goethe Institut “Deutsch als Fremdsprache” sınav sertifikası, 1989.

### Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Almanca Bölümü	Ankara Anadolu Lisesi	1990
Lisans - Y. Lisans	Tıp Fakültesi	Hacettepe Üniversitesi	1997
Tıpta Uzmanlık	Göz Hastalıkları	Hacettepe Üniversitesi	2001

- Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları A.D. Retina ve Üveit Birimi rotasyonu
- Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Yüksek Lisans Programı (devam ediyor)

**Tıpta Uzmanlık Tezi:**

**KONJENİTAL EKSTRAOKÜLER ADALE FİBROZİSİNİN KLİNİK,  
HİSTOPATOLOJİK ve AİLE AĞACI ANALİZİ**

*Tez Danışmanı : Prof. Dr. Cumhuri Şener*

**Görevler:**

<b>Görev Unvanı</b>	<b>Görev Yeri</b>	<b>Yıl</b>
Araştırma Görevlisi	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara	1997-2001
Uzman Doktor	Ankara Güven Hastanesi, Ankara	2001-2004
Yardımcı Doçent	Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Konya	2004- 2011
Doçent	Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Konya	2011-2012
Doçent	Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Konya	2012-

**Onur ve Ödüller:**

1. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başarılı İntörn Ödülü 1997.
2. XXXIV. Ulusal Oftalmoloji Kongresi En İyi Sözlü Sunum Ödülü, 2000

### **Sertifikalar ve sınavlar:**

1. The Basic Science Assesment in Ophthalmology Including Optics and Refraction. International Council Of Ophthalmology (**ICO**) Sertifikası, 2003.
2. ÖSYM ALES Sınavı, 2010-Sonbahar Dönemi, sayısal puan: 81.67
3. Clinical Sciences. International Council Of Ophthalmology (**ICO**) Sertifikası, 2011.

### **Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler ve Görevler :**

1. Türk Oftalmoloji Derneği
  - I. Tıbbi Retina birimi üyeliği
  - II. Elektrodiagnostik birimi üyeliği
    - i. Yönetim kurulu üyeliği (2014- )
  - III. Genç Oftalmologlar Grubu  
2012-2013 Kurucu Başkan  
2012-2014 Sosyal Faaliyetler Koordinatörü
  - IV. TOD Konya-Antalya Şubesi Üyeliği
    - i. Şube sekreteri (2014 - )
2. American Research for Vision Organisation - ARVO
3. European Society of Retina Specialists - EURETINA



## Projelerde Yaptığı Görevler

1. Türk Oftalmoloji Derneği, Uvea-Behçet birimi, “OFTAL” çalışması.
2. “Diabetik retinopatili bir grup olguda diabetik retinopatinin erken evrede önlenilme yöntemi” araştırması, Selçuk Üniversitesi proje no: 05401095, yardımcı araştırmacı.
3. “Yaş tip yaşa bağlı makula dejenerasyonunda fundus anjiyografisi, fundus otoflöresan görüntüleme ile optik koherens tomografi bulgularının korelasyonu ve tedavi sonuçlarına etkisi” araştırması, Selçuk Üniversitesi BAP koordinatörlüğü altyapı projesi, proje no:10301006, proje yürütücüsü.
4. “A Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Apremilast (CC-10004) in the Treatment of Behçet Disease” araştırma projesi, proje no: NCT00866359, yardımcı araştırmacı.
5. “Yaşla bağlı makula dejenerasyonu ile ilişkili başlıca gen polimorfizmlerinin toplumumuzda incelenmesi” TÜBİTAK araştırma projesi, proje no:112S269 yardımcı araştırmacı (devam ediyor)
6. “Yeni Tanı Almış Yaş Tıp Yaşla Bağlı Makula Dejenerasyonu (YBMD) Olan Hastalarda, Hasta Demografileri ve Tedavi Yaklaşımlarını Kapsayan Çok Merkezli Elektronik Veri Tabanı Oluşturma Çalışması” (REGistry of AMD in Turkish Population –REGAIN) -CRFB002ATR02, yardımcı araştırmacı (devam ediyor)
7. TURK-DEM , Türkiye’de Diabetik Makula Ödemi Kayıt Çalışması, Proje no: 16644 yardımcı araştırmacı (devam ediyor)
8. Unraveling nAMD real life Clinical Management and Outcome w,th intravitreal ranibizumab injection-A retrospective analysis –UNCOVER çalışması , protokol no CRFB002A-MAX-AU-01, yardımcı araştırmacı (devam ediyor)
9. Yaşla bağlı makula dejenerasyonunda Apolioprotein E Polimorfizminin Ranibizumab Tedavi Yanıtına Etkisi, Selçuk Üniversitesi BAP koordinatörlüğü araştırma projesi, proje no:13401104, yardımcı araştırmacı

## YAYIN LİSTESİ

### A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

**A1.** Sener E.C., Lee B.A., **Turgut B.**, Akarsu A.N., Engle E.C. A clinically variant of fibrosis syndrome in a Turkish family maps to the CFEOM1 locus on chromosome 12 *Arch Ophthalmol* 2000;118 (8):1090-1097.

**A2.** Kiratli H, İrkeç M, Bilgiç S, **Turgut B.** Iris hamartomas presenting without neurofibromatosis *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2001;38(1): 39-40.

**A3.** Yamada K, Andrews C, Chan WM, McKeown CA, Magli A, de Berardinis T, Loewenstein A, Lazar M, O'Keefe M, Letson R, London A, Ruttum M, Matsumoto N, Saito N, Morris L, Del Monte M, Johnson RH, Uyama E, Houtman WA, de Vries B, Carlow TJ, Hart BL, Krawiecki N, Shoffner J, Vogel MC, Katowitz J, Goldstein SM, Levin AV, Sener EC, **Oztürk BT**, Akarsu AN, Brodsky MC, Hanisch F, Cruse RP, Zubcov AA, Robb RM, Roggenkaemper P, Gottlob I, Kowal L, Battu R, Traboulsi El, Franceschini P, Newlin A, Demer JL, Engle EC. Heterozygous mutations of the kinesin *KIF21A* in congenital fibrosis of the extraocular muscles type1 (CFEOM1) *Nature Genetics* 2003;35(4):318-321.

**A4.** Yamada K, Chan WM, Andrews C, Bosley TM, Sener EC, Zwaan JT, Mullaney PB, **Oztürk BT**, Akarsu AN, Sabol LJ, Demer JL, Sullivan TJ, Gottlob I, Roggenkaemper P, Mackey DA, De Uzcatogui CE, Uzcatogui N, Ben-Zeev B, Traboulsi El, Magli A, de Berardinis T, Gagliardi V, Awasthi-Patney S, Vogel MC, Rizzo JF 3rd, Engle EC. Identification of *KIF21A* mutations as a rare cause of congenital fibrosis of the extraocular muscles type 3 (CFEOM3) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(7): 2218-23.

**A5.** Kamis U, **Oztürk BT**, Ozkagnici A, Gunduz K. Comparison of the efficacy of olopatadine hydrochloride 0.1% ophthalmic solution and artificial tears in seasonal allergic conjunctivitis *Acta Ophthalmol Scand* 2006;84(1): 148-9.

**A6.** Reisli I, Keles S, Kamis U, Elmas S, **Ozturk BT**. Picture of the month: Coughing paroxysms associated with subconjunctival hemorrhage and dellen *Arch Pediatr Adolesc Med* 2006; 160(1): 53-5.

**A7. Ozturk BT**, Kerimoğlu H, Kamış U, Gönül S, Okudan S. Choroidal neovascular membrane following clear lens extraction *Clin Ophthalmol* 2007; 1(4): 559-61.

**A8.** Reisli I, Artac H, van der Burg M, **Ozturk BT**. Iris atrophy in a patient with X-linked agammaglobulinemia *Can J Ophthalmol* 2007; 42(6): 882-83.

**A9.** Kerimoglu H, Tokgoz M, **Ozturk B**, Gonul S, Pekel H. Topiramate-induced acute-onset myopia and central corneal thickening: Pentacam Scheimpflug imaging findings *Can J Ophthalmol* 2009; 44(2): 222-223.

**A10. Ozturk BT**, Oltulu R, Kerimoglu H, Okudan S. Behcet's disease presenting with cerebral vasculitis: a case report *Cases Journal* 2009; 2: 7528.

**A11.** Cakir M, Gonen S, Dikbas O, **Ozturk B**. Thyroid hemiagenesis with Graves' Disease, Graves' Ophthalmopathy and Multinodular Goiter *Intern Med* 2009; 48(12): 1047-1049.

**A12. Ozturk BT**, Bozkurt B, Kerimoglu H, Okka M, Kamis U, Gunduz K. Effect of serum cytokines and VEGF levels on diabetic retinopathy and macular thickness *Mol Vis* 2009; 15: 1906-14.

**A13.** Kamis U, **Ozturk BT**, Sahin A, Kerimoglu H, Okudan S. Assessment of capsular block syndrome with Scheimpflug camera *Can J Ophthalmol* 2009; 44(3): 342-3.

**A14. Ozturk BT**, Kerimoglu H, Dikbas O, Pekel H, Gonen MS. Ocular changes in primary hypothyroidism *BMC Res Notes* 2009; 2: 266.

**A15.** Kerimoglu H, **Ozturk B**, Gunduz K, Bozkurt B, Kamis U, Okka M. Effect of altered eating habits and periods during Ramadan fasting on intraocular pressure, tear secretion, corneal and anterior chamber parameters *Eye* 2010; 24(1): 97-100.

**A16.** Kerimoglu H, Zengin N, **Ozturk B**, Gunduz K. Unilateral chemosis, acute onset myopia and choroidal detachment following the use of tamsulosin *Acta Ophthalmol* 2010; 88(2): e20-1.

**A17.** Arden GB, Gündüz MK, Kurtenbach A, Völker M, Zrenner E, Gündüz SB, Kamis U, **Ozturk BT**, Okudan S. A preliminary trial to determine whether prevention of dark adaptation affects the course of early diabetic retinopathy *Eye* 2010; 24(7): 1149-55.

**A18.** Bozkurt B, **Ozturk BT**, Kerimoglu H, Irkeç M, Pekel H. In-vivo confocal microscopic findings of 2 patients with Bietti's crystalline corneoretinal dystrophy *Cornea* 2010; 29(5): 590-3.

**A19.** Okka M, Bozkurt B, Kerimoglu H, **Ozturk BT**, Gunduz K, Yılmaz M, Okudan S. Control of steroid induced glaucoma with surgical excision of subtenon triamcinolone acetate deposits: A clinical and biochemical approach *Can J Ophthalmol*, 2010; 45(6): 1-6.

**A20.** Sirmaci A, Erbek S, Price J, Huang M, Duman D, Cengiz FB, Bademci G, Tokgöz-Yılmaz S, Hismi B, Özdağ H, **Ozturk B**, Kulaksızoglu S, Yildirim E, Kokotas H, Grigoriadou M, Petersen MB, Shahin H, Kansan M, King MC, Chen ZY, Blanton SH, Liu XZ, Zuchner S, Akar N, Tekin M. A truncating mutation in SERPINB6 is associated with autosomal-recessive nonsyndromic sensorineural hearing loss *Am J Hum Genet* 2010 May 14; 86(5): 797-804.

**A21.** Kerimoglu H, **Ozturk BT**, Bozkurt B, Okka M, Okudan S. Does lens status affect the course of early intraocular pressure and anterior chamber changes after intravitreal injection? *Acta Ophthalmol* 2011; 89(2): 138-42.

**A22.** Dogan EA, **Ozturk BT**, Mutluer M, Yıldız GU, Genc E, Yuruten B, Kocaogullar Y. Lumboperiotenial shunt for treating a patient with Behçet's disease with medically refractory intracranial hypertension *J Clin Neuroscience* 2011; 18(3): 409-11.

**A23.** **Ozturk BT**, Genc E, Tokgöz M, Kerimoglu H, Genc BO. Ocular changes associated with topiramate *Curr Eye Res* 2011; 36(1): 47-52.

**A24.** Bozkurt MK, **Ozturk BT**, Kerimoglu H, Ersan I, Arbag H, Bozkurt B. Association of age-related macular degeneration with age-related hearing loss *J Laryngol Otol* 2011; 125(3): 231-5.

**A25.** **Ozturk BT**, Kerimoglu H, Adam M, Gunduz K, Okudan S. Glucose regulation influences outcome in ranibizumab treatment for diabetic macular edema. *J Diab Complic*, 2011; 25(5): 298-302.

**A26.** Yagci A, Bozkurt B, Egrilmez S, Palamar M, **Ozturk BT**, Pekel H. Topical Anesthetic Abuse Keratopathy: A Commonly Overlooked Helath-Care Problem *Cornea*, 2011; 30(5): 571-5.

**A27.** **Ozturk B**, Bozkurt B, Koyuncu Z, Kerimoglu H. Follow-up of Lupus Choroidopathy with Optical Coherence Tomography *Lupus*, 2011; 20(10): 1076-8.

**A28.** **Ozturk BT**, Kerimoglu H, Bozkurt B, Okudan S. Comparison of intravitreal bevacizumab and ranibizumab treatment for diabetic macular edema *J Ocul Pharmacol* 2011; 27(4): 373-7.

**A29.** İrkeç C, Teksüt TK, Adisen E, **Ozturk B**, İsil F, Gurer M. Ali, İmir T, Bozkurt B. Fractalkine (CX3CL1) levels in patients with Behçet's disease and Neuro-Behçet's disease *J Neurol Sci* 2012; 315(1-2):120-22.

**A30.** Koç O, Genc E, **Ozturk B**, Genç BO, Keskin F, Özbek O. Dural Caroticocavernous Fistula: Pre- and Postembolization Appearances of Bone-subtracted CT Angiography Turkish Neurosurgery 2013; 23(2): 249- 51.

**A31.** Bakbak B, **Ozturk BT**, Gonul S, Yılmaz M, Gedik S. Comparison of the effect of unilateral intravitreal bevacizumab and ranibizumab injection on diabetic macular edema of the fellow eye. *J Ocul Pharmacol Ther* 2013; 29(8): 728-32.

**A32.** Bakbak B, **Ozturk BT**, Gedik S, Koktekir BE, Gonul S. Can intramuscular corticosteroid injection cause nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy? *Clin Ophthalmol* 2013; 7: 633-5.

**A33.** Bakbak B, Gedik S, **Ozturk BT**, Koktekir BE, Gonul S, Yılmaz M. Quantitative assessment of anterior chamber inflammation in patients with retained presumed intraocular cotton fiber after phacoemulsification. *Ocul Immunol Inflamm* 2013; 21(3): 207-11.