



T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PTERJİUM İLE RHO PROTEİNLERİNİN EKSPRESYONU VE
POLİMORFİZMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ahmet SARACALOĞLU
DOKTORA TEZİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK

GAZIANTEP
2019

T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**PTERJİUM İLE RHO PROTEİNLERİNİN EKSPRESYONU VE
POLİMORFİZMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ahmet SARACALOĞLU

Tez Savunma Tarihi: 09.12.2019

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Doktora” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Prof. Dr. A. Tuncay DEMİRYÜREK

Prof. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK

Prof. Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ

Prof. Dr. Hakan PARLAKPINAR

Doç. Dr. Nihat POLAT

BEYAN

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

09/12/2019

İmza

Ahmet SARACALOĞLU

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi boyunca desteklerini esirgemeyen, sabrına, yüksek bilgi birikimine ve iş titizliğine hayran olduğum tez danışmanım, değerli bilim insanı Prof. Dr. A. Tuncay Demiryürek'e ve saygıdeğer eşi Prof. Dr. Şeniz Demiryürek'e minnet ve şükranlarımı sunarım.

Desteklerini, yapıcı eleştirilerini, güleryüzlerini esirgemeyen, saygıdeğer ve değerli hocalarım Prof. Dr. Belgin Alaşehirli'ye ve Prof. Dr. Muradiye Nacak'a teşekkürü borç bilirim. Ayrıca doktora eğitim boyunca yardımlarını, desteklerini esirgemeyen, bana sabır gösteren Zekiye Doğantürk'e, F. Sinem Samim'e, Elif Baysalman'a, Z. Pınar Apaydın'a ve Z. Merve Eroğlu'na çok teşekkür ederim.

Kan ve doku örneklerinin toplanmasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Kıvanç Güngör'e, Doç.Dr. Alper Mete'ye, Dr. Öğr. Üyesi Sabit Kimyon'a ve diğer Göz Hastalıkları Anabilim Dalı çalışanlarına özverileri için içtenlikle teşekkür ederim. Ayrıca Gaziantep Dr. Ersin Arslan Eğitim ve Araştırma Hastanesinden Uzm. Dr. Betül Düzen'e özverisi ve yardımlarından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Deneysel aşamalarda yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Gülper Nacarkahya'ya, Öğr. Gör. Ebru Temiz'e ve diğer Tıbbi Genetik laboratuvar çalışanlarına gösterdikleri sabır için çok teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca her zaman bana destek veren ve yanımda olan aileme karşı her daim minnet duyacağım, iyi ki varlar.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'nın-1001 programı, Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu (SBAG) 114S562 numaralı ve Gaziantep Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (BAPYB)'nin TF.DT.17.45 numaralı projeleri ile desteklenmiştir. Teşekkür ederiz.

Ahmet SARACALOĞLU

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGE ve KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
RESİM LİSTESİ	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Göz Küresi Anatomisi	6
2.2. Konjonktiva Anatomisi ve Fizyolojisi	6
2.2.1. Konjonktiva	6
2.2.2. Konjonktivanın yapısı	8
2.2.3. Konjonktiva bezleri	9
2.2.4. Konjonktivanın damar yapısı	9
2.3. Kornea Anatomisi ve Fizyolojisi	10
2.4. Pterjium	13
2.4.1. Pterjium tanımı	13
2.4.2. Pterjium epidemiyolojisi	14
2.4.3. Pterjium etyopatogenezi	14
2.4.3.1. UV radyasyon	16
2.4.3.2. Viral enfeksiyon	18
2.4.3.3. Kalıtım	18
2.4.3.4. Epigenetik faktörler	19
2.4.3.5. Hücre proliferasyon faktörleri	19

2.4.3.6. İnflamatuvar mediyatörler ve büyüme faktörleri.....	20
2.4.3.7. Ekstrasellüler matriks (ECM) modülatörleri.....	21
2.4.3.8. Anjiyogenezis ve lenfanjiyogenezis.....	22
2.4.3.9. İmmünolojik mekanizmalar.....	23
2.4.3.10. Epitelyal-mezenkimal transisyon.....	23
2.4.3.11. Kolesterol metabolizmasındaki değişiklikler.....	24
2.4.4. Pterijum tedavisi.....	24
2.5. Rho Proteinleri.....	28
2.6. Rac Proteinleri.....	33
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	36
3.1. Polimorfizm Çalışmaları.....	36
3.1.1. Hasta ve kontrol grubu.....	36
3.1.2. Periferik kandan DNA izolasyonu.....	36
3.1.3. Tek nükleotid polimorfizm (single nucleotide polymorphism, SNP) analizi.....	37
3.1.4. Real-time polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) çalışması.....	39
3.1.5. Real-time PCR.....	40
3.2. Gen ve Protein Ekspresyonu.....	41
3.2.1. Çalışma popülasyonu.....	41
3.2.2. Gen ekspresyonu analizi.....	41
3.2.2.1. Dokudan total RNA izolasyonu.....	41
3.2.2.2. mRNA'dan cDNA eldesi.....	42
3.2.2.3. Elde edilen cDNA'lardan kalite ve miktar tayini.....	43
3.2.2.4. <i>RHO</i> (<i>RHOA</i> , <i>RHOB</i> , <i>RHOC</i> , <i>RHOD</i> , <i>RHOE</i> , <i>RAC2</i> , <i>RAC3</i>) ve <i>GAPDH</i> genlerinin ekspresyon düzeyleri ölçümü için RT-PCR (qRT-PCR) yöntemi.....	44
3.2.2.5. <i>RHO</i> genlerinin ekspresyon düzeyleri ölçümü için real-time PCR bileşenleri..	44
3.2.2.6. Gen ekspresyonunun analizi.....	45
3.2.3. Western blot.....	45

3.2.3.1. Doku homojenizasyonu.....	45
3.2.3.2. Periferik kandan lökosit izolasyonu ve lizat hazırlama	45
3.2.3.3. Protein ölçümü	46
3.2.3.4. Jel hazırlanması, yükleme ve elektroforez	46
3.2.3.5. Membrana transfer ve bloklama	47
3.2.3.6. İlgili proteinin işaretlenmesi	48
3.2.3.7. Görüntüleme.....	49
3.2.3.8. Analiz.....	49
3.2.4. Western Blot için gerekli solüsyonlar	49
3.3. İstatistiksel Analiz.....	51
4. BULGULAR.....	52
4.1. Polimorfizm Çalışmalarının Sonuçları	52
4.2. Gen ve Protein Ekspresyonu Çalışmaları	56
4.2.1. <i>RHO</i> gen ekspresyonu sonuçları	57
4.2.2. Western blot yöntemiyle yapılan Rho protein ekspresyonu sonuçları	58
4.2.3. Rho proteinleri korelasyon analizleri	60
4.2.4. <i>RAC</i> gen ekspresyonu sonuçları	65
4.2.5. Rac proteinlerinin Western blot analizi sonuçları	65
4.2.6. Rac proteinleri korelasyon analizleri	67
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	68
6. KAYNAKLAR	76
7. EKLER.....	103
8. ÖZGEÇMİŞ.....	105

SİMGE ve KISALTMALAR

4-HHE	4-hidroksiheksenal
4-HNE	4-hidroksinonenal
5-FU	5-Florourasil
8-OHdG	8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
bFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü
ACE	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
CMV	Sitomegalovirüs
CPDs	Siklobütan pirimidin dimerleri
CTGF	Bağ doku büyüme faktörü
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECL	Geliştirilmiş kemiluminesans
ECM	Ekstrasellüler matriks
EMT	Epitelyal-mezenkimal transisyon
GAPs	GTPaz aktive edici proteinler
GDI	Guanin nükleotid disosiyasyon inhibitörleri
GDP	Guanozin difosfat
GEFs	Guanin nükleotid değişim faktörleri
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSTM1	Glutasyon S-transferaz M1
GTP	Guanozin trifosfat
HB-EGF	Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü
HLA-DR	İnsan lökosit antijeni-DR
hOGG1	İnsan 8-oksoguanin glikozilaz I
HPV	İnsan papilloma virüsü
HSV	Herpes simpleks virüsü
ICAM	İntersellüler adezyon molekülü
IGFBP-2	İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-2
MDA	Malondialdehit
MMC	Mitomisin C
MMP	Matriks metalloproteinaz
MT1-MMP	Membran tipi matriks metalloproteinaz

NFDM	Yağsız süt tozu
NFκB	Nükleer faktör κB
NO	Nitrik oksit
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PCNA	Proliferasyon hücre nükleer antijeni
PDGF	Trombosit türevi büyüme faktörü
PEDF	Pigment epitelyum türevi faktörü
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
PVDF	Polivinil diflorür
Rho	Ras homolog
RNA	Ribonükleik asit
ROCK	Rho ilişkili protein kinaz enzimi
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SD	Standart sapma
SEM	Ortalamanın standart hatası
SNP	Tek nükleotid polimorfizm
SOD	Süperoksit dismutaz
TF	Doku faktörü
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü- β
TGM2	Transglutaminaz-2
TSP-1	Trombodopsin-1
uPA	Ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü
UTR	Translasyon olmayan bölge
UV	Ultraviyole
VCAM	Vasküler hücresel adezyon molekülü
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
α-SMA	Alfa-düz kas aktin

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Ras protein süper ailesi	35
Tablo 3.1. <i>RHOA</i> genine ait SNP'lerin fonksiyonel sonuçları	37
Tablo 3.2. <i>RHOB</i> genine ait SNP'lerin fonksiyonel sonuçları	38
Tablo 3.3. <i>RHOC</i> genine ait SNP'lerin fonksiyonel sonuçları	38
Tablo 3.4. <i>RHOD</i> genine ait SNP'lerin fonksiyonel sonuçları	38
Tablo 3.5. <i>RND3 (RHOE)</i> genine ait SNP'lerin fonksiyonel sonuçları	39
Tablo 3.6. PCR tepkime koşulları	41
Tablo 3.7. Revers Transkriptaz PCR karışım içerikleri	43
Tablo 3.8. Revers transkripsiyon için termal döngü	43
Tablo 3.9. Eş zamanlı PCR reaksiyon karışımının içerikleri	44
Tablo 3.10. %12'lik jel hazırlanması için gerekenler (1.5 mm kalınlığında)	47
Tablo 4.1. Polimorfizm çalışmalarında kontrol ve pterjium (hasta) gruplarının demografik özellikleri	52
Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubunda <i>RHO</i> gen polimorfizmlerinin genotip ve allel dağılımı	54
Tablo 4.3. Hasta ve kontrol grubunda <i>RHO</i> gen polimorfizmlerinin genotip ve allel dağılımı (devamı)	55
Tablo 4.4. Gen ve protein ekspresyonu çalışmalarında kullanılan primer pterjium hastalarının demografik ve klinik özellikleri	56
Tablo 4.5. Primer pterjium lökosit protein ekspresyonu analizi ile primer pterjium lökosit gen ekspresyonu analizinin korelasyon analizi	61
Tablo 4.6. Primer pterjium doku protein ekspresyonu analizi ile primer pterjium doku gen ekspresyonu analizinin korelasyon analizi	62
Tablo 4.7. Primer pterjium doku protein ekspresyonu analizi ile primer pterjium lökosit protein ekspresyonu analizinin korelasyon analizi	63
Tablo 4.8. Primer pterjium doku gen ekspresyonu analizi ile primer pterjium lökosit gen ekspresyonu analizinin korelasyon analizi	64
Tablo 4.9. Rac2 ve Rac3 Primer pterjium doku protein ekspresyonu analizi ile gen ekspresyonu analizinin korelasyon analizi	67

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Göz küresinin makroskopik anatomisi	6
Şekil 2.2. Konjonktiva kısımları ve konjonktival bezler	7
Şekil 2.3. Konjonktivanın mikroskopik yapısı (A), konjonktivanın farklı bölgelerinde epitel hücrelerinin dizilimi (B)	8
Şekil 2.4. Konjonktivanın damar yapısı	10
Şekil 2.5. Korneanın mikroskopik yapısı	11
Şekil 2.6. Pterjium gelişimine bağlı moleküler faktörler.....	15
Şekil 2.7. Pterjiumun patolojik mekanizmaları	15
Şekil 2.8. Rho proteinleri aktivasyonu	30
Şekil 2.9. Rho/ROCK yolağı mekanizması	31
Şekil 4.1. Doku gen ekspresyonu sonuçları.....	57
Şekil 4.2. Kandan izole edilen lökositlerdeki gen ekspresyonları sonuçları	58
Şekil 4.3. Doku Western blot analizlerinden örnek bantlar.....	58
Şekil 4.4. Doku Western blot analizleri sonuçları	59
Şekil 4.5. Lökosit Western blot analizlerinden örnek bantlar	59
Şekil 4.6. Kandan izole edilen lökositlerdeki Western blot sonuçları.....	60
Şekil 4.7. <i>RAC2</i> ve <i>RAC3</i> gen ekspresyonu analizi.....	65
Şekil 4.8. Rac proteinlerin Western blot analizlerinden örnek bantlar.....	66
Şekil 4.9. Rac proteinlerinin Western blot analizi.....	66

RESİM LİSTESİ

Resim 2.1. Pterjium anatomik bölümleri.....	13
Resim 2.2. Pterjium konjonktival otogreftin cerrahi işlemleri.....	25
Resim 2.3. Primer pterjium eksizyonunun şematik basamakları ve konjonktival flep tekniği ile onarımı.....	26
Resim 3.1. Jel oluşturma düzeneği.....	47
Resim 3.2. Western blot elektroforez ve transfer işlemleri.....	48



ÖZET

PTERJİUM İLE RHO PROTEİNLERİNİN EKSPRESYONU VE POLİMORFİZMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Ahmet SARACALOĞLU

Doktora Tezi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK

Aralık 2019, 105 sayfa

Pterjium yaygın bir oküler yüzey hastalığıdır. Bu çalışmada pterjium gelişiminde Rho proteinleri ekspresyonu ve gen polimorfizmlerinin rolü olabileceği hipotezi test edilmiştir. Bu çalışmanın amacı *RHOA*, *RHOB*, *RHOC*, *RHOD*, *RND3(RHOE)* gen polimorfizmleri, gen ve protein ekspresyonları ile pterjium arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. *RAC2*, *RAC3* gen ve protein ekspresyonları da çalışılmıştır. Çalışmaya 383 pterjium hastası ile benzer yaş ve cinsiyetteki 331 sağlıklı birey kontrol grubu olarak alınmıştır. Gen polimorfizmleri ve ekspresyonları BioMark HD dinamik *array* sistemi kullanılarak *real-time* PCR ile belirlenmiştir. Western blot metodu kullanılarak protein ekspresyonları araştırılmıştır. Bonferroni düzeltmesine göre *RHOB* (rs2602160, rs62121967, rs62121968, rs11541350), *RHOC* (rs2230329, rs2306937, rs1804292, rs11102522, rs11538960), *RHOD* (rs11227675, rs61891303, rs7112925) ve *RND3(RHOE)* (rs13418763, rs1441982, rs76447184) gen polimorfizmleri hem genotipi hem de allel frekansları açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0.001$). *RHOC*, *RHOD*, *RHOE*, *RAC2* ve *RAC3* gen ekspresyonları pterjial dokularda belirgin şekilde yükselmiştir (sırasıyla, $P=0.0047$, $P=0.0003$, $P=0.0164$, $P=0.0464$ ve $P=0.0002$). Pterjium hastalarının lökositlerinde *RHOB* ve *RHOC* gen ekspresyonları belirgin azalmıştır (sırasıyla, $P=0.0113$ ve $P=0.0236$). Pterjial dokularda RhoD protein ekspresyonunda belirgin azalma tespit edilmiştir ($P=0.0046$). RhoA, RhoB protein ekspresyonları lökositlerde belirgin şekilde artmıştır (sırasıyla, $P=0.0180$ ve $P=0.0033$). Pterjiumda ilk defa bu çalışma ile Rho proteinleri polimorfizmi ve ekspresyonu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, pterjium gelişimindeki moleküler mekanizmaları anlamaya ve yeni terapötik hedefler sağlamaya yardımcı olabilir.

Anahtar sözcükler: Pterjium, Rho protein, Polimorfizm, Ekspresyon

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ASSOCIATION OF PTERYGIUM WITH RHO PROTEINS EXPRESSION AND POLYMORPHISM

AHMET SARACALOĞLU

PhD Thesis, Department of Medical Pharmacology

Supervisor: Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK

December 2019, 105 pages

Pterygium is a common ocular surface disease. The hypothesis that Rho proteins polymorphisms and expression may play a role in pterygium development is examined in this study. The aim of this study is to investigate the association between *RHOA*, *RHOB*, *RHOC*, *RHOD*, *RND3(RHOE)* gene polymorphisms, gene, and protein expressions and pterygium. *RAC2*, *RAC3* gene and protein expressions were studied as well. A total of 383 pterygium patients and 331 healthy subjects (control group) with similar age and gender were enrolled in this study. Gene polymorphisms and expressions were identified by using BioMark HD dynamic array system with real-time PCR. Protein expressions were performed using Western blot method. There were statistically significant differences in genotype and allele frequencies for *RHOB* (rs2602160, rs62121967, rs62121968, rs11541350), *RHOC* (rs2230329, rs2306937, rs1804292, rs11102522, rs11538960), *RHOD* (rs11227675, rs61891303, rs7112925), and *RND3(RHOE)* (rs13418763, rs1441982, rs76447184) gene polymorphisms following Bonferroni correction ($P < 0.001$). *RHOC*, *RHOD*, *RHOE*, *RAC2*, and *RAC3* gene expressions were markedly elevated in pterygial tissues ($P = 0.0047$, $P = 0.0003$, $P = 0.0164$, $P = 0.0464$, and $P = 0.0002$, respectively). There were marked decreases *RHOB* and *RHOC* gene expressions in pterygium patient's leukocytes ($P = 0.0113$ and $P = 0.0236$, respectively). Significant decrease in protein expression in pterygial tissues was detected for RhoD ($P = 0.0046$). RhoA, RhoB protein expressions were markedly augmented in leukocytes ($P = 0.0180$ and $P = 0.0033$, respectively). Polymorphisms and expressions of Rho proteins have been demonstrated for the first time in the pterygium with this study. These results may help to understand the molecular mechanisms in the pterygium development and provide novel therapeutic targets.

Key Words: Pterygium, Rho proteins, Polymorphism, Expression

1. GİRİŞ ve AMAÇ

“Küçük kanat” anlamına gelen Yunanca “pterygion” teriminin latince bir versiyonu olan “pterygium (pterjium)” terimi, fibrovasküler konjonktiva büyümesi olarak tanımlanmaktadır (1). Literatürde sörfçü gözü (*surfer’s eye*) olarak da bilinmektedir (2). Korneaya da invazyon gösteren bir hastalıktır, aynı anda nazal ve temporal bölgede olmakla birlikte %90 nazal bölgede bulunmaktadır. Tipik olarak üçgen şeklindedir. Pterjium, kornea yüzeyindeki subkonjonktival ve fibrovasküler dokunun kontrolsüz hücresel proliferasyonundan kaynaklanan dejeneratif ve inflamatuvar bir süreçtir. Hastalığın etiyojisi ve patolojisi tam olarak bilinmemektedir (3, 4). Pterjiumun standart tedavi yöntemi cerrahi eksizyondur (5).

Pterjium prevalansı tüm dünyada yaygın olarak değişmekle birlikte, genel popülasyonda prevalans oranı %10.2 olarak bildirilmiştir (4). Pterjium; epidemiyolojik çalışmalarda ileri yaş, erkek cinsiyet, daha az eğitim süresi ve açık iş yeri ile ilişkili olarak daha yüksek oranda rapor edilmiştir (6-10). Pterjium prevalansı kronik güneşe maruz kalma (11) ve özellikle de ultraviyole (UV) ile ilişkilidir (12-14). Tropik bölgelerde daha yaygın görülen bir hastalıktır (15, 16).

Pterjium patogenezinin en çok UV sorumlu tutulmaktadır ama patogenezi tam olarak bilinmemektedir ve çeşitli patojenik faktörler öne sürülmüştür (17). Pterjiumun patogenezinin sorumlu tutulan UV radyasyonu reaktif oksijen radikalleri (ROS, *reactive oxygen species*) oluşumuna neden olmaktadır. Pterjiumda artmış ROS üretimi olduğu ve antioksidan enzimlerin azaldığı gösterilmiştir (18, 19). Pterjium dokusunda oksidatif stresin ve deoksiribonükleik asit (DNA) hasarının arttığı (20, 21) ve lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeylerinin yükseldiği, antioksidan enzim süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeylerinin düştüğü bilinmektedir (19, 22).

Ras homolog (Rho) proteinleri, monomerik GTPazların Ras süperfamilyasının Rho alt familyası üyeleridir. Rho GTPazlar; hücre büyüklüğünün, proliferasyonun, apoptozun, hücre polaritesinin, hücre yapışmasının, hücre motilitesinin ve membran trafiğinin düzenlenmesinde çok önemli rol oynamaktadır (23). Rho proteinlerinin birçok fonksiyonu RhoA ile yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. RhoA, vücutta en fazla

bulunan ve en çok çalışılan bir Rho proteini alt tipidir (24). RhoA protein seviyesinin glokomlu hastaların optik sinir ucunda anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir (25).

Rho GTPaz'ların ekspresyonu RhoB, UV ve ROS ile indüklenir (26, 27). UV radyasyon, RhoE mRNA ve protein düzeylerini arttırmaktadır (28). ROS'un direkt olarak Rho/Rho-kinaz sinyal yolağı üzerinden etki ettiği gösterilmiştir (29). Rac proteinleri de süperoksit oluşumundan sorumlu NADPH oksidaz enzimini kontrol etmektedir (30).

Glutasyon S-transferaz M1 (GSTM1) ve DNA tamir proteinlerinden *X-ray repair cross-complementing-1* (XRCC1, rs25487) polimorfizmlerinin pterjium oluşumuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (31, 32). CYP1A1 (C/T, T/T) polimorfizminin pterjium için risk oluşturduğu rapor edilmiştir (33, 34). Pterjium gelişim riskinde anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) polimorfizmi (rs1799752) ilişkili bulunmuştur (35). Ayrıca vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) polimorfizminin (rs833061) kadın hastalarda pterjium oluşumuyla ilişkili olduğu da saptanmıştır (36). Yapılan bu çalışmalar genetik faktörlerin pterjiumda rolü olduğunu göstermektedir.

Pterjiumda Glutasyon S-transferaz izoenzimleri GSTP1 ve GSTT1'in ekspresyonlarında anlamlı artış gözlenmiştir (37). Pterjiumda hücre migrasyonu ile ilgili genlerin ekspresyonunda artış olduğu bildirilmiştir (38). Pterjiumda VEGF sekresyon yoluyla vaskülarizasyon olduğu rapor edilmiştir (39). VEGF'nin pterjium dokusunda aşırı eksprese edildiği, pterjiumun anjiyogenezisi ve fibrovasküler progresyonunda rolü olduğu bildirilmiştir. (40-43). VEGF ile indüklenen mikrovasküler permeabilite artışı, hücre migrasyonu ve anjiogenezin Rho proteinlerinin yolağıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (44, 45).

Rho/*Rho-associated coiled-coil-forming kinase* (ROCK) yolağının; migrasyon, sitokinez, ROS ve VEGF üzerinde etkileri mevcuttur (23, 29, 44, 45). Rho proteinleri ailesi genlerinden *RHOA*, *RHOB*, *RHOC*, *RHOD* ve *RHOE*'deki polimorfizimler, bu proteinlerin fonksiyonlarını değiştirebilir. Rho proteinlerinin (*RHOA*, *RHOB*, *RHOC*, *RHOD*, *RHOE*, *RAC2* ve *RAC3*) gen ve protein ekspresyonlarının seviyeleri de patolojik durumlarda değişebilir. Pterjiumda UV ışınlarına bağlı olarak ROS'un, VEGF'nin ve hücre migrasyonunun sorumlu olduğu gösterilmiştir (17-19, 40). Pterjium

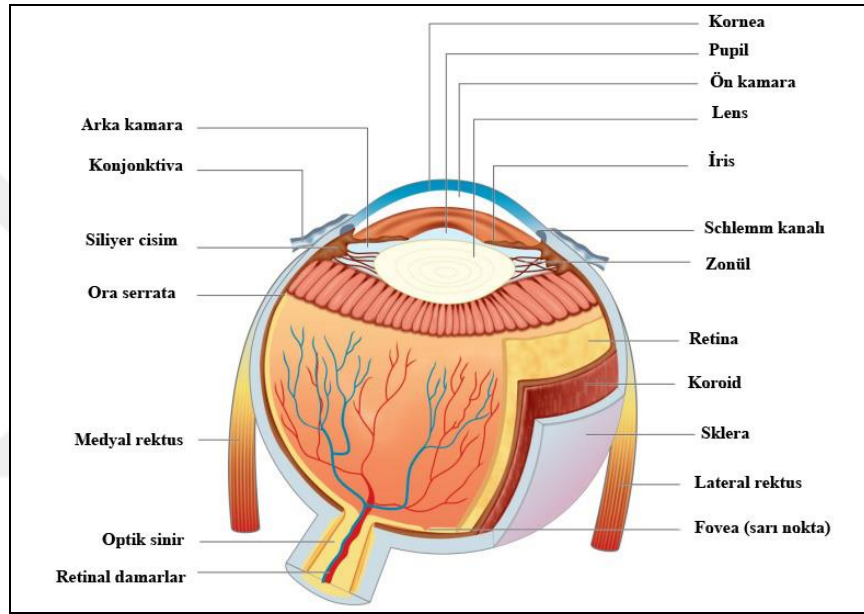
gelişiminde moleküler mekanizmaların ve genetik polimorfizmlerin rolü olduğu rapor edilmiştir (17, 31). Bu bilgiler bizi pterjium ile *RHOA*, *RHOB*, *RHOC*, *RHOD*, *RND3(RHOE)* gen polimorfizmleri; *RHOA*, *RHOB*, *RHOC*, *RHOD*, *RND3(RHOE)*, *RAC2*, *RAC3* gen ve protein ekspresyonları arasındaki ilişkiyi araştırmaya yönlendirmiştir. Bu çalışmada; “Rho proteinleri ekspresyonu ve gen varyantlarının, pterjium gelişim riskinde rol oynayabilir” hipotezini kurmaktayız. Bu konuyla ilgili literatürde yayınlanmış henüz bir araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile ilk kez Türk toplumunda pterjium ile Rho proteinleri gen polimorfizmi ve ekspresyonu arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Göz Küresi Anatomisi

Göz, yağ dokusuna gömülü şekilde orbitalarda bulunur. Orbital yağ dokusundan Tenon kapsülü denilen ince bir fasiyal kılıf ile ayrılır. Dıştan içe doğru: Tunica fibrosa bulbi (korneoskleral tabaka), tunica vasculosa bulbi (tractus uvealis) (vasküler tabaka) ve tunica interna bulbi (nöral tabaka) olmak üzere 3 tabakadan oluşmaktadır (46). Göz küresinin makroskobik anatomisi Şekil 2.1’de gösterilmiştir (47).

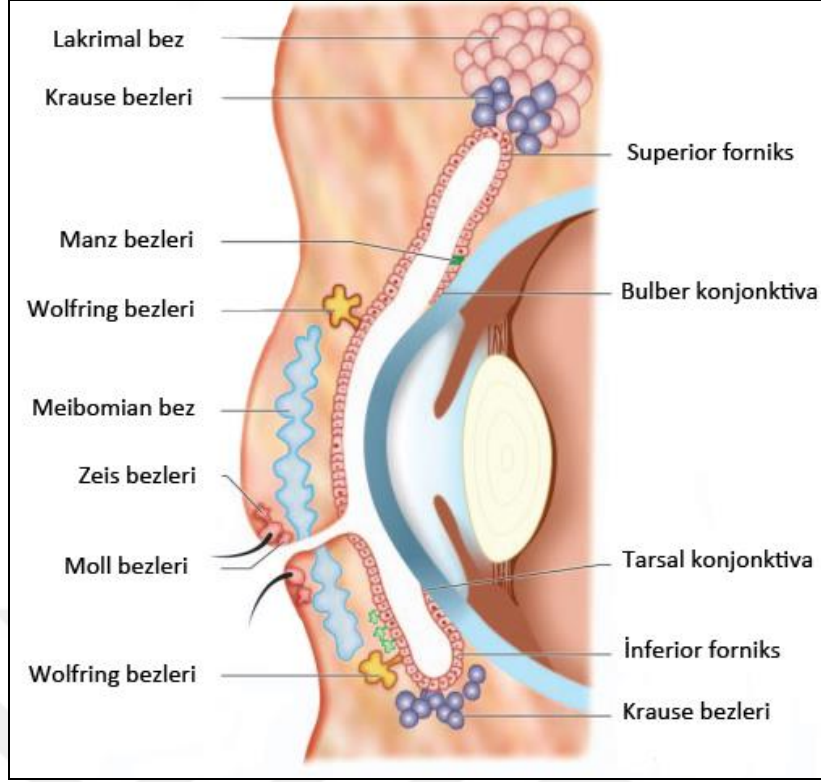


Şekil 2.1. Göz küresinin makroskobik anatomisi (47)

2.2. Konjonktiva Anatomisi ve Fizyolojisi

2.2.1. Konjonktiva

Konjonktiva, göz kapaklarının arka yüzeyini ve göz küresinin ön yüzünü kaplayan yarı saydam bir müköz membrandır. Göz küresini göz kapaklarına bitiştiirdiğinden dolayı bu mukozaya isim olarak konjonktiva adı verilmiştir (*conjoin: to join*). Göz kapağı kenarından limbusa kadar uzanır ve palpebral fissürde açık olan konjonktiva kesesi denilen kompleks alanı kaplar (48). Konjonktivanın; göz ve göz kapağının yumuşak dokularının korunması, gözyaşı filminin sulu ve mukus tabakalarının tedariki, immün dokunun ve bağımsız göz hareketinin kolaylaştırılmasının sağlanması gibi birçok önemli fonksiyonu vardır (49). Konjonktiva üç parçaya ayrılmaktadır (48) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Konjonktiva kısımları ve konjonktival bezler (48)

1. Palpebral konjonktiva: Göz kapaklarını kaplar. Marjinal, tarsal ve orbital konjonktiva olmak üzere alt sınıflara ayrılır (48).

i-Marjinal konjonktiva: Göz kapağı kenarından yaklaşık 2 mm kadar bir oluk gibi uzar. Cilt ve konjonktiva arasında uygun bir geçiş bölgesidir (48).

ii-Tarsal konjonktiva: İnce, şeffaf ve oldukça vasküler bir yapıya sahiptir. Üst göz kapağındaki tüm tarsal levha sıkıca bağlanırken alt göz kapağındaki tamamen bağlanmaz. Tarsal bezler, sarı çizgiler olarak görülmektedir (48).

iii-Orbital konjonktiva: Tarsal levha ve forniks arasında gevşek olarak uzanan bir yapıdır (48).

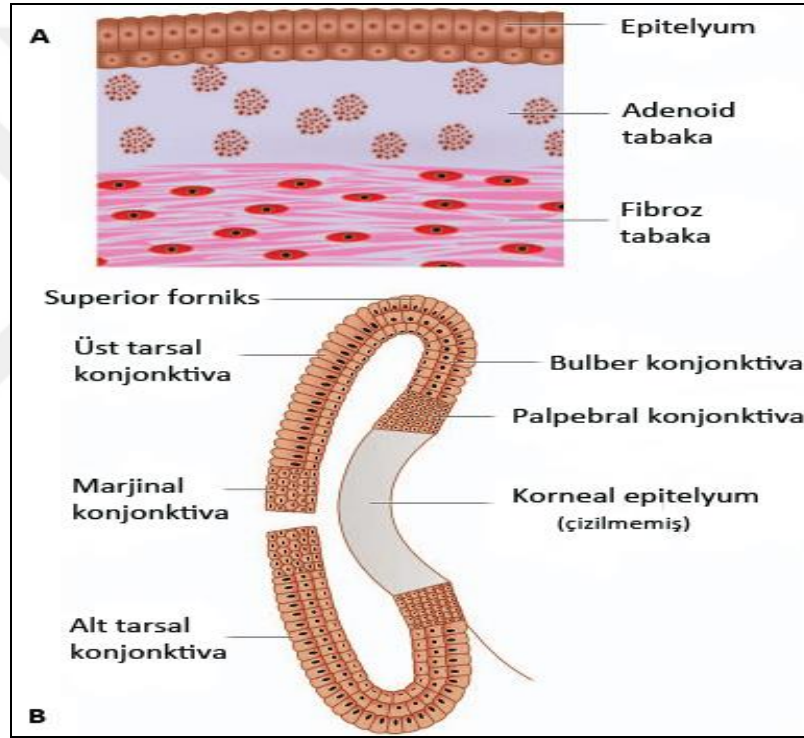
2. Bulber konjonktiva: İnce ve şeffaf bir yapı olup altındaki yapıların üzerinde gevşek olarak uzanır. Bundan dolayı kolayca hareket edebilir. Anterior skleradan episkleral doku ve Tenon kapsülü ile ayrılmaktadır. Kornea etrafındaki 3 mm'lik bir bulber konjonktiva çıkıntısı limbal konjonktiva olarak adlandırılır. Konjonktiva, Tenon kapsülü ve episkleral doku, limbus alanında korneoskleral kavşağın altında yatan yoğun

bir doku ile kaynaştırılır. Konjonktivanın epitelyumu limbusta kornea ile sürekli hale gelmektedir (48).

3. Konjonktival forniks: Bulber konjonktiva ile palpebral konjonktivayı bitişiren yapıdır. Superior, inferior, medial ve lateral olmak üzere 4 alt bölüme ayrılmaktadır (48).

2.2.2. Konjonktivanın yapısı

Histolojik olarak konjonktiva epitelyum, adenoid ve fibroz tabaka olmak üzere 3 tabakadan oluşmaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Konjonktivanın mikroskobik yapısı (A), konjonktivanın farklı bölgelerinde epitel hücrelerinin dizilimi (B) (48)

1. Epitelyum: Keratinize olmayan 2–5 katmanlı bir epitelyumdur. Epitelyumun yaklaşık %10'unu goblet hücreleri oluşturur. Konjonktivadaki epitel hücrelerinin tabakası bölgeden bölgeye değişiklik göstermektedir. *Marjinal konjonktiva*, çok katlı (5 katman) skuamöz epitel tipine sahiptir. *Tarsal konjonktiva*, silindirik hücrelerden oluşan bir yüzeyel katman ve düz hücrelerden oluşan derin katmandan meydana gelmektedir. *Forniks ve bulber konjonktiva*, silindirik hücrelerden oluşan bir yüzeyel katman, polihedral hücrelerden oluşan bir orta katman ve küboidal hücrelerden oluşan derin tabaka olmak üzere 3 tabakadan oluşmaktadır. Limbal konjonktiva, çok katlı (5-6

katman) skuamöz epitel tipine sahiptir. Limbal kök hücreler bu bölümün bazal tabakasında bulunmaktadır (48).

2. Adenoid tabaka: Lenfoid tabaka olarak da adlandırılmaktadır. Lenfositlerin bulunduğu ince bağ dokusu retikulumundan oluşur. Bu tabaka fornikslerde daha gelişmiştir. Doğumdan itibaren mevcut olmayıp 3-4 ay sonrasında gelişmektedir. Bundan dolayı infantlarda ortaya çıkan konjonktival inflamasyonda foliküler reaksiyon gerçekleşmemektedir (48).

3. Fibroz tabaka: Kollajen ve elastik liflerden oluşan bir ağsı örgüdür. Çok ince olduğu tarsal konjonktiva bölgesi dışında adenoid tabakadan daha kalındır. Bu tabaka, konjonktivanın damar ve sinirlerini içerir. Bulbar konjonktiva bölgesinin altında yer alan Tenon kapsülüyle kaynaşır (48).

2.2.3. Konjonktiva bezleri

Konjonktiva iki türlü bez içermektedir (Şekil 2.2):

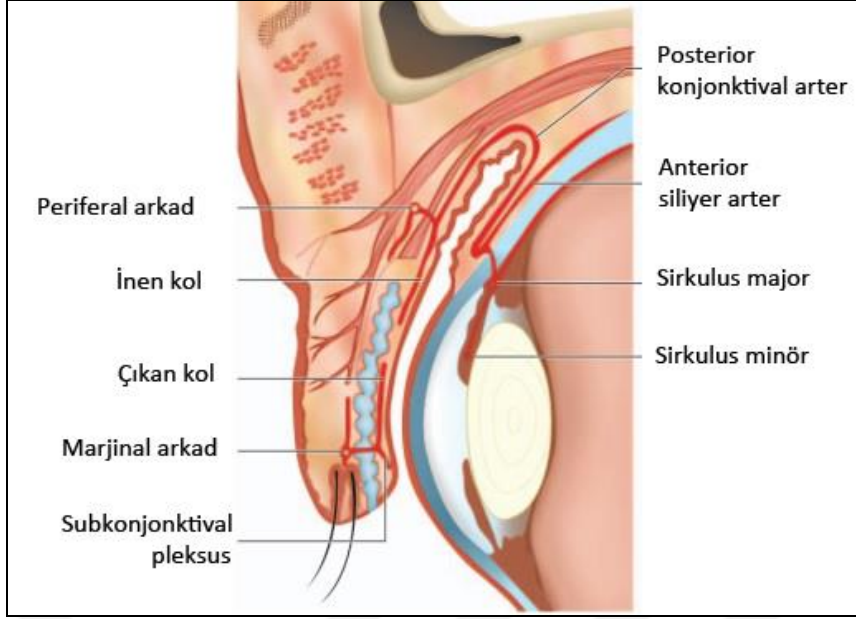
1. Müsin salgılayan bezler: Epitelyumda lokalize, unisellüler bezler olan goblet hücreleri; tarsal konjonktivada var olan Henle kriptaları ve limbal konjontivada bulunan Manz bezleridir. Kornea ve konjonktivanın ıslaklığı için esansiyel olan mukus, bu bezler tarafından sekrete edilmektedir (48).

2. Yardımcı lakrimal bezler: Krause ve Wolfring bezleridir. Krause, fornikslerin subkonjonktival bağ dokusunda yer alır. Wolfring bezleri ise superior tarsus'un üst sınırı ve inferior tarsus'un alt sınırı boyunca bulunmaktadır (48).

2.2.4. Konjonktivanın damar yapısı

Konjonktivayı besleyen arterler üç kaynaktan köken alır (Şekil 2.4):

1. Periferal arteriyel arkad
2. Marjinal arteriyel arkad
3. Anterior siliyer arterleri



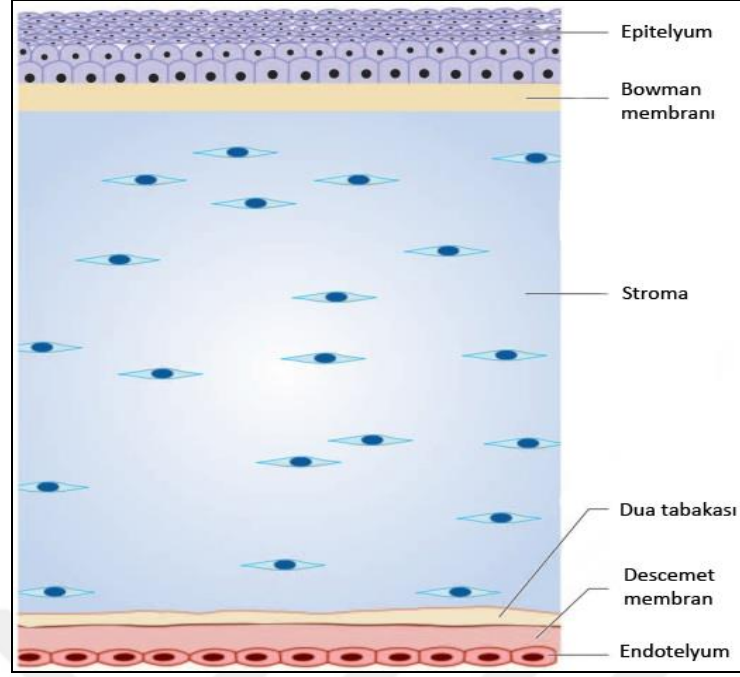
Şekil 2.4. Konjonktivanın damar yapısı (48)

Palpebral ve forniks konjonktiva, göz kapağının periferal ve marjinal arteriyel arkadların kolları ile beslenmektedir. Bulbar konjonktiva ise göz kapağının arteriyel kolları olan posterior konjonktival arterleri ve anterior siliyer arterlerin kolları olan anterior konjonktival arterleri ile beslenmektedir. Konjonktivadan gelen venler ise göz kapaklarının venöz pleksusuna ve kornea etrafındaki anterior siliyer venlere akmaktadır (48).

2.3. Kornea Anatomisi ve Fizyolojisi

Kornea, gözün başlıca enfeksiyöz ve yapısal bariyeri olarak işlev gören şeffaf bir avasküler bağ dokusudur. Üzerindeki gözyaşı filmi ile birlikte, göz için uygun bir ön refraktif yüzey sağlamaktadır (50). Yetişkinlerde ortalama olarak *korneanın yatay çapı*, dikey çaptan yaklaşık 1.0 mm daha büyük olup 11.5 ile 12.0 mm'dir. Kornea merkezde yaklaşık 0.5 mm kalınlıktadır ve korneanın kalınlığı perifere doğru giderek artmaktadır (51). Korneanın merkezindeki 5 mm² alan güçlü kırılma yüzeyi oluşturur. Korneanın bu merkezi kısmının anterior ve posterior eğrilik yarıçapları sırasıyla 7.8 mm ve 6.5 mm'dir. Korneanın refraktif indeksi 1.376 olup gözün toplam refraktif gücü (60 diyoptri)'nün %75'ini oluşturmaktadır (52).

Kornea histolojik olarak 6 katmandan oluşmaktadır. Bu katmanlar anteriordan posteriora doğru epitelyum, Bowman membran, substantia propria (korneal stroma), Dua tabakası, Descemet membran ve endotelyumdur (52) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Korneanın mikroskopik yapısı (52)

1. Epitelyum: Çok tabakalı skuamöz tiptedir ve limbusta bulber konjonktivanın epitelyumu ile devamlık gösterir. Hücreler 5-6 tabakadan oluşur. En derin (bazal) tabaka; kolumnar hücrelerinden oluşmaktadır, sonraki 2-3 tabaka kanat (*wing*) veya şemsiye (*umbrella*) hücrelerinden ve en yüzeysel iki tabaka yassılaştırmış hücrelerden meydana gelmektedir. Yüzeysel epitelyal hücreler arasındaki sıkı bağlantılar, gözyaşı sıvısının stromaya nüfuz etmesini önlemektedir (52).

Limbal epitelyum: Limbal alanın bazal epitel hücreleri, proliferen olan ve kornea epitelyumunu farklılaştıran limbal kök hücrelerini oluşturur. Bu bölgedeki hasarlar, konjonktival epitelyumun kornea üzerine invazyonu ile sonuçlanır (52).

2. Bowman membranı: Bu tabaka yoğun kollajen liflerin asellüler külesinden oluşur. Yaklaşık 12 µm kalınlığındadır ve epitelyumun bazal membranı ile korneal stromayı önden bağlamaktadır. Gerçek bir elastik membran olmayıp sadece stromanın yoğunlaşmış yüzeysel bir parçasıdır. Enfeksiyona karşı önemli direnç gösterir. Fakat bir kez tahrip olduğunda rejenere edilemez ve bu nedenle skarlaşma ile iyileşmektedir (52).

3. Stroma (substantia propria): Bu tabaka 0.5 mm kalınlığında olup korneanın total kalınlığının %90'ını oluşturmaktadır. Proteoglikanların (kondroitin sülfat, keratan sülfat) hidratlanmış matriksine gömülmüş kolajen fibrillerden (tip-VI kolajen filamentleri ile iç içe tip-I ve tip-V fibrilleri) oluşur. Lamelleri birçok katmanda

düzenlenmiştir. Her bir tabaka sadece birbirine paralel değil aynı zamanda kornea düzlemine de paraleldir ve limbusta skleral lamel ile devamlılık göstermektedir. Lameller arasında makrofajlar ve lökositlerin dolaştığı keratositler (modifiye fibroblastlar) mevcuttur (52). Stroma, korneaya hem yapısal destek hem de kollajen fibrilleri çerçevesinde ışığın geçişini kolaylaştırarak saçılmayı önleyecek şekilde şeffaflık sağlar. Kornea stromasının avaskülerliği şeffaflığı kolaylaştırmak için gerekli olup VEGF, bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve membran tipi matriks metalloproteinaz-1 (MT1-MMP-1) gibi proanjiojenik faktörler de dengeyi korumada yardımcı olur (52).

4. Pre-Descemet membran: Dr. Harminder Dua tarafından 2013 yılında keşfedilmiş olup Dua tabakası olarak da bilinir. Descemet zarının ön tarafında yer alıp yaklaşık 15 µm kalınlıktadır. Hava geçirmez ve güçlü asellüler yapıya sahiptir (52).

5. Descemet membran (posterior elastic lamina): Kornea endotelinin güçlü, homojen bir bazal membranıdır. Stromadan pre-Descemet membranı ile ayrılır. Kimyasal ajanlara, travmaya ve patolojik süreçlere çok dayanıklıdır. Descemet membranı kolajen ve glikoproteinlerden oluşur. Bowman membranının aksine rejenere olabilmektedir. Normal olarak sabit bir gerginliği olup yırtıldığında kendi içine doğru kıvrılmaktadır (52). Descemet membran, korneal dehidrasyonun korunmasında yardımcı olur. İntraoküler cerrahiden sonra iyatrojenik Descemet membran yırtığı veya ayrılması kornea ödemi ile sonuçlanmaktadır (52).

6. Endotelyum: Düz poligonal (esas olarak hegzagonal) epitelyal hücrelerden oluşan tek bir tabakadır, yarık lamba biyomikroskopunda mozaik şeklinde gözükür. İnsan endotel hücreleri, *in vivo* olarak proliferer olmaz ve yaşla birlikte hücre kaybı, genişleme (polimegatizm); komşu hücrelerin migrasyonu ile telafi edilir. Endotelyumun önemli bir fonksiyonel hücre rezervi olup ancak hücrelerin %75 kaybı ile kornea dekompenasyonu ortaya çıkar (52). Kornea endoteli, stromal dehidrasyonun korunmasında önemli bir rol oynar, böylece korneadan geçen ışığın doğruluğunu maksimuma çıkarır. Bu hidrasyon derecesinin korunması, Na^+/K^+ -ATPaz ve bikarbonat bağımlı Mg^{+2} -ATPaz ile ilişkili pompalar ile endotel hücreler arasındaki sıkı kavşak noktalarına bağlıdır (52).

2.4. Pterjium

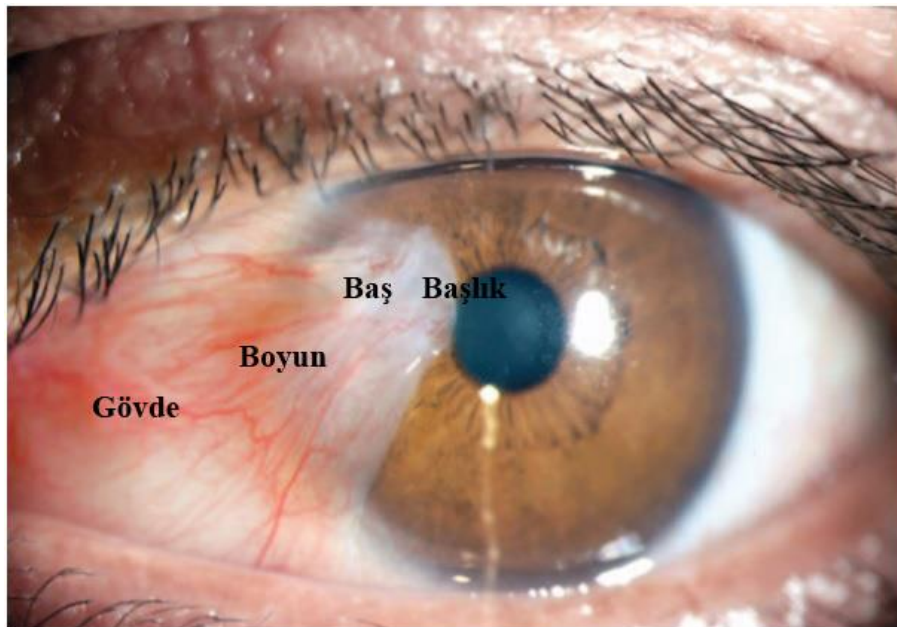
2.4.1. Pterjium tanımı

“Küçük kanat” anlamına gelen Yunanca “*pterygion*” teriminin latince bir versiyonu olan “*pterygium* (pterjium)” terimi, en sık nazal tarafta görülen ve korneada kanat şeklinde bir fibrovasküler konjonktiva büyümesi olarak tanımlanmaktadır (1). Pterjium dokusu anatomik olarak başlık (*cap*), baş (*head*), boyun (*neck*) ve gövde (*body*) olmak üzere 4 kısımdan oluşmaktadır (Resim 2.1) (54). Pterjium, konjonktivanın fibrovasküler proliferasyonu ile ortaya çıkıp korneaya da invazyon gösteren dejeneratif bir hastalıktır, etiyolojisi ve patolojisi tam olarak aydınlatılmamıştır (3). Aynı anda nazal ve temporal bölgede olmakla birlikte %90 nazal bölgede bulunmaktadır. Tipik olarak üçgen şeklindedir (4). Tan ve arkadaşları tarafından pterjium morfolojisi için klinik derecelendirme (grade) sistemi geliştirilmiştir (55).

Grade T1: Pterjium atrofiktir, episkleral damarlar görülebilmektedir.

Grade T2: Intermediate pterjium olarak bilinir. Episkleral damarlar kısmen gizlenmektedir.

Grade T3: Pterjium etli (*fleshy*) olup episkleral damarlar tamamen gizlenmektedir.



Resim 2.1. Pterjium anatomik bölümleri (54)

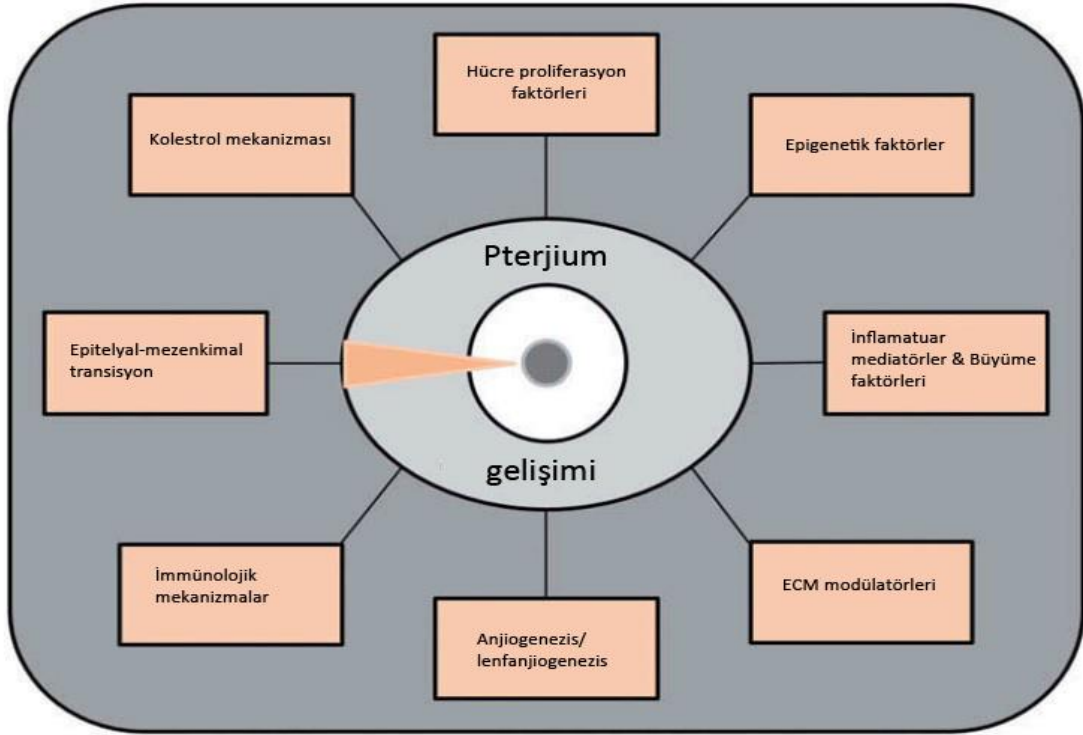
2.4.2. Pterjium epidemiyolojisi

Dünya genelinde pterjium prevalansı çalışma yapılan popülasyona bağlı olarak %1 ila %25 arasında değişmektedir (6, 7, 56-59). Pterjium mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte tropik bölgelerde daha yaygın görülmektedir (15, 16). Pterjium prevalansı kronik güneşe maruz kalma (11) özellikle ultraviyole (UV) ile ilişkilidir, bu da prevalansın coğrafi varyasyonunu kısmen açıklayabilir (12-14).

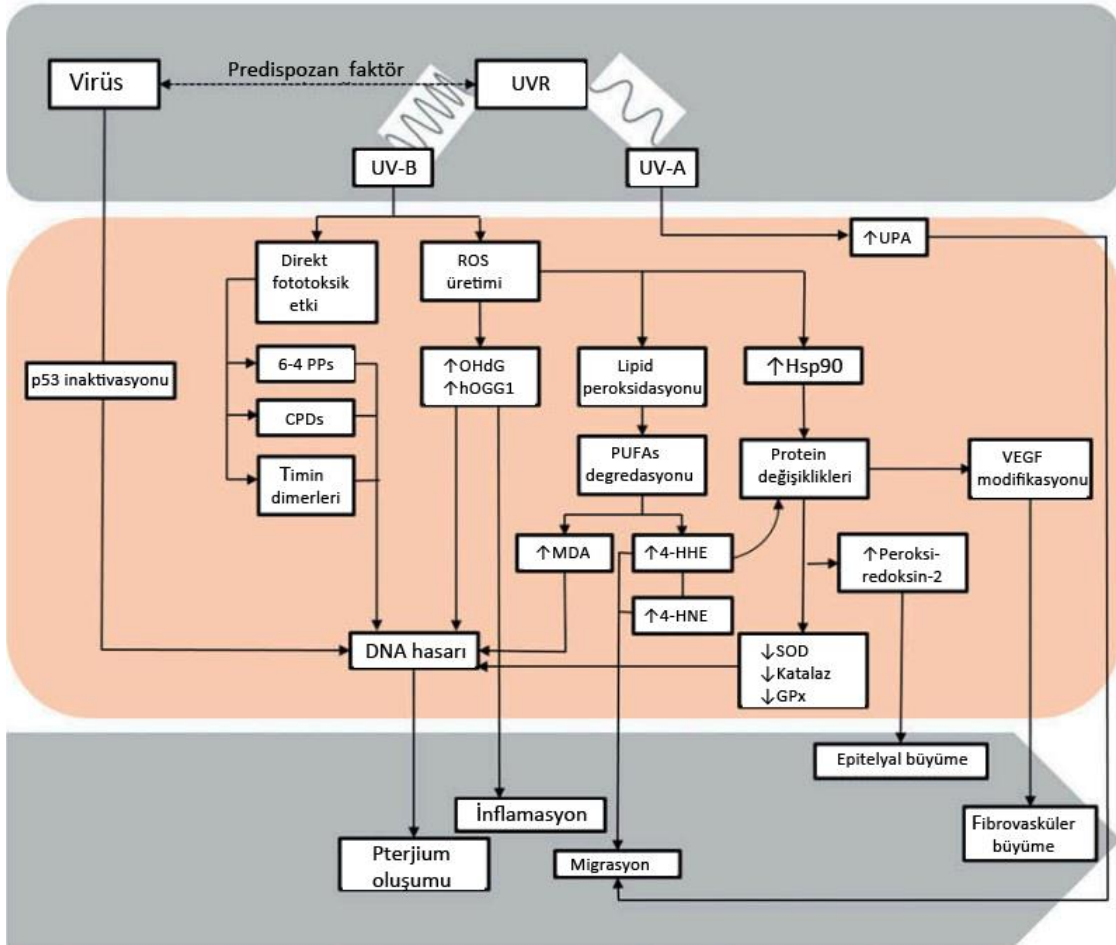
Pterjium, bazı popülasyon temelli çalışmalarda ileri yaş, erkek cinsiyet, daha az eğitim süresi ve açık iş yeri ile ilişkili olarak daha yüksek oranda saptanmıştır (6-10). Yapılan başka bir çalışmada siyahi katılımcıların yaklaşık dörtte birinin pterjiuma sahip olduğu ve beyazlardan yaklaşık 3 kat daha yüksek bir frekans sahip olduğu rapor edilmiştir (56). Açık havada her zaman güneş gözlüğü ve reçeteli gözlük kullananlarda daha düşük oranlar saptanmıştır (10, 56). Avustralya'da yapılan bir çalışmada pterjium, kırsal alanlarda (%6.7) kentsel alanlara (%1.7) göre daha yüksek oranda, kısmen de pterjiumun okülerin güneşe maruz kalmasının bir sonucu olduğu bulunmuştur (9).

2.4.3. Pterjium etyopatogenezi

Pterjium, korneaya merkezden girerek invaze olan, görüşü bozan ve inflamasyona neden olan epitelyal ve fibrovasküler dokuların anormal kanat şeklinde büyümesidir. Değişmiş bazal epitelyal hücre proliferasyonu, vaskülarizasyonu ve komşu kornea epitelinin invazyonu ile karakterizedir (17). Pterjium patogenezi tam olarak bilinmemektedir, patogenezin en çok UV sorumlu tutulmaktadır. Alternatif olarak viral dahil olmak üzere çok çeşitli patojenik faktörler önerilmiştir. Bunlar; viral enfeksiyonlar, epigenetik aberasyonlar, epitelyal-mezenkimal transisyon, immünolojik ve anti-apoptotik mekanizmalar, anjiojenik ve lenfanjiojenik stimülasyon, ekstrasellüler matriks modülatörlerinin ve büyüme faktörlerinin disregülasyonu, inflamasyon kaskadları, kemik iliği kaynaklı kök ve progenitor hücrelerin göçü ve kolesterol metabolizmasındaki değişikliklerdir (17) (Şekil 2.6 ve Şekil 2.7).



Şekil 2.6. Pterijum gelişimine bağlı moleküler faktörler (17)



Şekil 2.7. Pterijumun patolojik mekanizmaları (17)

2.4.3.1. UV radyasyon

UV radyasyonunun pterjium oluşumu ile bağlantılı olduğu ve güneşe maruz kalma ile daha yüksek pterjium prevalansı arasında açık bir ilişki gözlenmiştir (60, 61). Bu tür radyasyon; hücrel DNA üzerinde direkt fototoksik etki yaparak hücrel DNA'ya, proteinlere ve lipidlere zarar veren ROS üretimi mekanizmaları aracılığıyla dokuları değiştirme ve hücrelere zarar verme potansiyeline sahiptir (19, 20, 62). Küçük dalga boylarının (<300 nm) yüksek düzeyde aktif olduğu ve çoğunlukla kornea tarafından absorbe edildiği bilinmektedir (63). UV-B radyasyonun 280 ve 315 nm arasında değişen dalga boyları oküler yüzeyi etkiler ve bu etki direkt olarak UV maruziyet seviyesi ile ilişkilidir (11).

UV-B radyasyonu, oksidatif strese neden olma kapasitesi nedeniyle pterjium oluşumundan sorumlu ana etken olarak kabul edilir (20). Yüksek mutajenik potansiyele sahip oksidatif stresin yaygın bir belirteci olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) molekülü, primer pterjium baş kısmının epitelyumunda, sağlıklı konjonktivadan ortalama 4.7 kat daha yüksek bir seviyede bulunmuştur (20, 21). 8-OHdG'nin antioksidan fonksiyonuna ek olarak oluşumunun oksidatif strese bağlı inflamasyona karşı hücrelerin savunma mekanizmalarından biri olabileceği öne sürülmüştür (64). Hücrel DNA'da 8-OHdG'nin varlığı, pterjium dokusunda aşırı eksprese edildiği gösterilmiş olan insan 8-oksoguanin glikozilaz I (hOGG1) enzimi tarafından azaltılabilir (21). 8-OHdG'nin artması, hOGG1 ekspresyonundaki bir azalmayla korelasyon göstermediğinden bu enzimin etkinlik kaybını açıklayabilecek modifikasyonlar olup olmadığını belirlemek için daha fazla analiz yapılmıştır. hOGG1 geni ekzon bölgesinde belirlenen Ser326Cys polimorfizminin pterjium gelişiminde yatkınlığı arttırdığı rapor edilmiştir (65). Oksidatif stres ayrıca lipid ve proteinlerdeki değişikliklerden de sorumludur. UV-B radyasyonu ile oluşan ROS, hücrel membranlarda lipid peroksidasyonuna neden olma potansiyeline sahiptir, bunun sonucunda çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA, *Polyunsaturated fatty acid*) reaktif aldehytleri olan 4-hidroksiheksenal (4-HHE) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) dahil olmak üzere çeşitli bileşiklerle dejenerasyonunu teşvik etmektedir. Bu moleküller, pterjiumda korneal migrasyonun gerçekleştiği baş ve subepitelyal bağ dokularının aktif proliferasyonunun meydana geldiği gövde kısmında artmış seviyelerde bulunmuştur (66, 67). 4-HHE ve 4-HNE molekülleri; proteinleri modifiye etme ve histidin, sistein ve lizin kalıntıları ile reaksiyona girerek proteinlerin normal fonksiyonlarını etkileme potansiyeline sahiptir

(68). Ayrıca pterjium dokularında UV-B radyasyonunun neden olduğu lipid peroksidasyonunun bir başka işareti olan MDA'da önemli bir artış gözlenmiştir. Pterjium dokularındaki antioksidan enzimlerin SOD, katalaz ve GSH-Px aktivitesi azalmasının, ROS birikmesine ve DNA hasarına neden olduğu gösterilmiştir (19). Bununla birlikte peroksiti ve hidroperoksiti azaltan bir başka antioksidan enzim olan peroksiredoksin 2 enzimi, pterjium epitelyumunda aşırı eksprese edilmiştir. Bu aşırı ekspresyon, peroksit ile indüklenmiş apoptozun inhibisyonu ile korele bulunmuştur (69, 70). Bu analiz pterjiumda belirli ROS'a karşı seçicilik olduğunu göstermektedir, çünkü sadece peroksit ve hidroperoksit düşük seviyelerde tutulmaktadır. Ayrıca protein katlanmasında ve degradesyonunda rol alan bir şaperon proteini olan Hsp90'ın pterjium epitelyumunda aşırı ekspresyonu bildirilmiştir (71). Hsp90, anjiogenezde önemli olan VEGF indüksiyonu için gereklidir (72). Hsp90'ın aşırı ekspresyonunun, oksidatif stresten kaynaklanan modifiye protein artışına karşı doğal bir hücrel yanıt olabileceği öne sürülmüştür (17).

8-OHdG oluşumuna ek olarak UV radyasyonu doğrudan fototoksik etkileriyle DNA'ya zarar verebilmektedir. Primer pterjium fibroblastlarında, endotel hücrelerinde ve rekürren pterjium fibroblastlarında timin dimerlerin varlığı saptanmıştır (73). UV-B radyasyonunun DNA tarafından direkt absorpsiyonu, komşu pirimidinler arasında oluşan siklobütan pirimidin dimerleri (CPDs) ve 6-4 foto ürünler (6-4PPs) olmak üzere iki tür sarmal-bozucu fotolezyonların üretilmesine yol açmaktadır (74-76). Bu fotolezyonlar, DNA replikasyonu sırasında C-T ve CC-TT dönüşmesine neden olabilmektedir (77). CPDs, memeli hücrelerinin UV-B radyasyonu tarafından üretilen mutasyonların yarısından fazlasıyla ilişkilidir ve bunlar sadece UV ışığına maruz kalmanın ardından oküler ön kamaranın yapılarında bulunmuşlardır. DNA lezyonları ise transkripsiyon ve replikasyon gibi esansiyel hücrel metabolik süreçleri engelleyebilmektedir (78, 79).

UV-A'nın %45'ini absorbe eden korneanın hastalığı incelendiğinde, UV ışınlarına maruziyet (UV-A ve UV-B) ile pterjiumun ilişkisi saptanmıştır (80, 81). UV-A radyasyonundan sonra pterjium fibroblastlarında MMP aktivasyonundan, doku degradesyonundan ve tümör hücresi invazyonundan sorumlu olan ürokinaz tipi plazminojen aktivatörünün (uPA) aktivitesinin ve mRNA seviyesinin arttığı rapor edilmiştir (82-84). Pterjium hücreleri ile yapılan çalışmalarda hem epitelyal hem de

stromal fibroblastların, MMP-1 ve MMP-2'nin remodellemesi ve bağ doku degradasyonu ile ilgili molekülleri eksprese ettiği gösterilmiştir. Her iki hücre tipinin de bazal membranın ve Bowman tabakasının dissolüsyonuna katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (85-87). Genel olarak bu çalışmalar ile tek başına UV-B'den daha çok, pterijium ve geniş bant UV radyasyonu arasındaki ilişki gösterilmiştir.

2.4.3.2. Viral enfeksiyon

Detorakis ve ark. (88) göre pterijium oluşumu; çevresel faktörlerin, genetik yatkınlığın ve viral enfeksiyonların rol oynadığı çok adımlı bir süreci kapsamaktadır. Bu model, pterijium örneklerinde insan papilloma virüsü (HPV), sitomegalovirüs (CMV) ve herpes simpleks virüsü (HSV) dahil olmak üzere çeşitli onkojenik virüslerin saptanmasıyla desteklenmiştir. HPV virüsü, p53'ü inaktive eden proteinleri kodlayarak, kromozomal instabiliteye yol açmakta ve hücrenin maligniteye doğru evrilme olasılığını arttırmaktadır (89-91). Değişik araştırma gruplarının yaptığı çalışmalarda HPV'nin pterijiumda en sık rastlanan virüs olduğu ve HPV prevalansının toplumlara göre değişmekte olduğu gösterilmiştir. En düşük prevalans sırasıyla Türk, Japon ve Ekvadorlu (%0, %4.8 ve %21'dir); en yüksek ise İtalyan, Brezilyalı ve İngiliz (%100, %58,3 ve %50) hastalarında görülmüştür (92-96).

2.4.3.3. Kalıtım

Pterijiumun başlangıcı ve devamlılığı için kalıtsal yatkınlığın temel olduğu ileri sürülmüştür. Anguria ve ark. (97) pterijium gelişiminde kalıtsal yatkınlığın rolünü özetlemiş olup pterijium kalıtımının otozomal dominant olduğunu öne sürmüşlerdir. Ayrıca pterijium büyüklüğünün ve ciddiyetinin kalıtsal faktörler tarafından belirlenmesini ve bunun multifaktörel bir kalıtım olduğunu iddia etmişlerdir. İki tip gen; inhibitör smad proteinleri ve smurf proteinlerinin inaktif olmasının pterijium oluşumuna yatkınlık göstereceği rapor edilmiştir (97).

2.4.3.4. Epigenetik faktörler

Rezeksiyon sonrası pterjium; hücre proliferasyonu, invazyon ve rekürrens dahil olmak üzere kanser ile benzerlikler göstermektedir. Pterjiumda artmış proliferatif aktivite (Ki-67, proliferasyon hücre nükleer antijeni (PCNA) ve eritropoietin), hücre apoptoz (Bcl-2 ve p53)'un düşük seviyesi gösterilmiştir ayrıca sağlıklı konjonktiva ile karşılaştırıldığında pterjium epitel hücre tabakasında malignite (Hsp90) ile ilişkili proteinlerin aşırı eksprese olduğu rapor edilmiştir (98-101). Belirtilen proteinlerin farklı kanser türlerinde arttığı bulunmuş olup tümörün proliferatif aktivitesinin değerlendirilmesi için de bu proteinler kullanılmıştır (102, 103). DNA metilasyon paternlerindeki dramatik değişiklikler, birçok kanser türünde yaygındır. Kanser ile pterjium arasında var olan benzerlikler nedeniyle pterjiumun metilasyon paternleri üzerine bazı çalışmalar yapılmıştır. Matriks remodelleme (MMP-2, hipometilasyon) ve hücre adezyonu (TGM-2 ve CD24 hipermetilasyonu) ile ilgili genlerin anormal DNA metilasyonu, pterjium invazyonu ile yüksek derecede ilişkili bulunmuştur (60). Ayrıca tümör baskılayıcı gen p16'nın hipermetilasyonu, pterjiumdaki DNA metiltransferaz 3b'nin (DNMT3b) aşırı ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. Bu epigenetik modifikasyonlar, pterjiumun patogenezi ile ilgili önemli genlerin kontrolsüz ekspresyonuna veya süpresyonuna neden olabilen DNA mutasyonlarına bir alternatiftir. UV radyasyonunun neden olduğu oksidatif stresin, anormal DNA metilasyon paternlerinden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (17).

2.4.3.5. Hücre proliferasyon faktörleri

Pterjium bazal epitelyal hücreleri, artan proliferasyon oranı ve düşük veya ihmal edilebilir apoptozis ile ilişkili moleküler markerler ortaya koymaktadır. Proliferasyon ile ilişkili yolların pterjium oluşumunda anahtar rol oynadığı öne sürülmektedir (98, 100). Biyolojik süreçleri modüle etmek için diğer proteinlerle etkileşime giren dimerik kalsiyum bağlayıcı proteinler olan S100 ailesinin pterjium patogenezindeki rolü son zamanlarda bildirilmiştir. Oküler yüzeyde S100 proteinlerinin yapısal proteinlere, transkripsiyon faktörlerine ve immün modülatörlere bağlanması; adezyonu, immün hücrelerinin korneanın bazal membranları üzerinde migrasyonunu ve immün efektörlerinin veya antikor üretiminin aktivasyonunu, MMP'ler ve pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini etkilemektedir. Daha önceki çalışmalarda insan pterjium epitel örneklerinde normal konjonktivaya göre S100A6, S100A8, S100A9 ve S100A11 proteinlerindeki artış gösterilmiştir (104, 105).

İki pro-apoptotik marker olan TUNEL ve Bax, pterjiumun epitelyal bazal tabakasında anlamlı ölçüde eksprese olduğu; anti-apoptotik protein Bcl-2'nin tüm pterjium dokusunda geniş bir alana dağıldığı gözlenmiştir (106). Pterjiumun baş kısmında pro-apoptotik proteinlerin yokluğu proliferatif davranışı ile korelasyon göstermektedir. Ayrıca UV-B maruziyetinin neden olduğu oksidatif stresin, bir antiapoptotik protein olan survivinin ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (107). Hücre proliferasyonunun ana kontrol noktalarından biri olan tümör süpresör p53'ün pterjium gelişimindeki rolü araştırılmış olup pterjium bazal epitelinde p53 artışı bildirilmiştir (108-110). Bazı çalışmalar p53'teki mutasyonların normal pro-apoptotik fonksiyonunu inhibe etme olasılığını düşündürmektedir (110-112). Başka bir tümör baskılayıcı protein olan p16'nın muhtemelen promoter bölgesinin hipermetilasyonu ile down-regüle edildiği bulunmuştur (113). Ayrıca pterjiumun, aktif hücre döngüsünün markerları olan siklin-D1 ve Ki-67 için pozitif olarak daha yüksek sayıda hücre içerdiği ve bir hücre döngüsü inhibitörü olan p27 için daha az sayıda pozitif hücre olduğu bildirilmiştir (100). Telomeraz aktivitesinde bir artış da pterjium dokusunun epitelyumunda bildirilmiştir (114). Bu bulgular pterjiumun apoptozun anormal regülasyonunun bir sonucu olabileceğini düşündürmektedir.

2.4.3.6. İnflamatuar mediyatörler ve büyüme faktörleri

Kökeni ne olursa olsun pterjium gelişiminde inflammatuar mediyatörler anahtar faktörler olarak düşünülmektedir. UV-B radyasyonuna bağlı pterjiumda anjiyogenezis, hücre farklılaşması, doku invazyonu ve inflamasyonda rolü olan IL-1, IL-6, IL-8 ve tümör nekroz faktör (TNF)- α sitokinlerinin aşırı eksprese olduğu bulunmuştur (115, 116). İnflamasyon kaskadının önemli molekülü olan COX-2'nin aşırı eksprese olduğu, prostaglandin üretiminin artışından sorumlu olabileceği düşünülmüştür (117). Ayrıca inflamasyon ve hücre farklılaşmasında rolü olan fosfolipaz D ve ekstrasellüler matriks (ECM) modülatörlerin regülasyonunda rolü olan sistatin C (sistein proteaz inhibitörü)'nin aşırı ekspresyonu rapor edilmiştir (118, 119). Nükleer faktör κ B (NF κ B) yolağının da insan pterjium dokusunda aktive olduğu bulunmuş olup pterjium ve sağlıklı konjonktiva dokularının nükleer ekstraktlarında yapılan bir çalışmada pterjiumda daha yüksek NF κ B proteinleri saptanmıştır (120). NF κ B; inflammatuar hücrelerin pterjium dokusuna migrasyonu, hücrelerin motilitesi ve invazyon yeteneğini arttırmak, pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ve hücre döngüsü proteinlerinin ekspresyonunu etkilemek gibi çeşitli biyolojik etkilere sahip olup pterjium patogenezinin

bu şekilde katkı yapmaktadır (121-123). Bütün bu inflamatuvar mediyatörler pterjiumun primer oluşumdan daha çok gelişiminin bir sonucudur. Bununla birlikte, hastalığın devam etmesinde önemli olan bu moleküller patojenik faktör olarak düşünülmektedir.

Pterjium patogenizinde; bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF, *basic fibroblast growth factor*), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF, *platelet-derived growth factor*), bağ doku büyüme faktörü (CTGF, *connective tissue growth factor*), transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β , *transforming growth factor-beta*), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-2 (IGFBP-2, *insulin-like growth factor binding protein-2*), pigment epitelyum kökenli faktör (PEDF, *pigment epithelium-derived factor*) gibi büyüme faktörlerinin de rolü olduğu düşünülmektedir. Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF, *heparin-binding epidermal growth factor*), pterjiumda hücre migrasyonunu indükleyici olduğu ve ayrıca HB-EGF, bFGF ve VEGF'nin UV-B radyasyonu sonrası upregüle olduğu gösterilmiştir (40, 124, 125). VEGF, COX2 ile birlikte, pterjium makrofajlarında bulunmuş olup anjiyogenez, kollajen birikimi ve pterjium büyümesinde bir rolü oldukları düşünülmektedir (126). Pterjium dokularında, anjiyogenezis inhibitörü olan PEDF'nin azaldığı ve IGFBP-2'nin ise arttığı gözlenmiştir (40, 127). PDGF, CTGF ve TGF- β 'nin pterjiumda ekspresyon artışı gösterilmiştir (124, 128).

Pterjiumun inflamatuvar süreçleri; disregüle ve uygunsuz doku remodellemesini, fibroproliferasyonu, artmış vaskülarizasyonu ve ekstrasellüler matriks (ECM)'in birikmesini indükleyen reaktif yara oluşumunu tetikleyebilir (13). Organ onarımının up-regülatörü olan stromal türev faktör (SDF-1, *stromal derived factor*) reseptörü (CXCR-4)'nün pterjiumların stromasında aşırı eksprese olduğu bildirilmiştir (129).

2.4.3.7. Ekstrasellüler matriks (ECM) modülatörleri

Pterjiumda ECM remodellemesi meydana gelmektedir ve bu hastalığın karakteristik bir özelliği olarak kabul edilmektedir. Bu süreçte proliferatif hücreler farklı büyüme faktörlerine ve sitokinlere erişerek migrasyonu koruyan kollajen engelleri aşabilmektedir. ECM remodellemesinde farklı proteazlar görev almakta olup bunlardan biri MMP'lerdir. MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 ve MMP-9'un pterjiumun baş kısmında özellikle migrasyon ve proliferasyonun ana noktasında ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (86, 130, 131). Hücre dışı matriks remodellemesini arttıran

Transglutaminaz-2 (TGM2, *Transglutaminase-2*) ve MMP-2'nin anormal DNA metilasyonuna sahip olduğu bulunmuş olup pterjium patogenezinin esansiyel ECM genlerinin metilasyon durumu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (60). MMP inhibitörleri (TIMPs, *tissue inhibitors of metalloproteinases*)'nin pterjium örneklerinde yüksek ekspresyonu gözlenmiştir. Yüksek seviyelerde MMP'ler ile birlikte bu proteinlerin pterjiumu karakterize eden matriks *turnover* ve infiltrasyonunda aktif rol oynadığı düşünülmektedir (132). Bu proteinazların ve inhibitörlerinin ekspresyon seviyeleri, pterjiumun oluşum ve yayılma hızına aracılık etmektedir.

2.4.3.8. Anjiyogenezis ve lenfanjiyogenezis

Sağlıklı yetişkin organizmada yara iyileşmesi sırasında anjiyogenez gelişimi gözlenir. Patolojik koşullar altında anjiyogenez disregüle edilmiş gibi görünmektedir. Malignite-transforme hücreler, neovaskülarizasyonun parakrin kontrolünü ve otokrin büyüme kontrolünü indükleyen anjiyogenik faktörler üretmektedirler (133). İnflamasyonun neovaskülarizasyon ile sonuçlanabilen ve pterjium büyümesine katkıda bulunabilecek anjiyogenik yollara neden olduğu bilinmektedir (17).

Pterjiumda bulunan anjiyogenik stimülasyonun; yüksek seviyelerde VEGF, düşük seviyelerde trombodopsin-1 (TSP-1) ve P maddesinde azalma ile ilişkili olduğu ve bunun anjiyogenik aktiviteyi indükleyen proto-onkogen ETS-1 transkripsiyon faktörünün aktivitesini doğrudan arttırdığı gösterilmiştir (134-136).

VEGF, anjiyogenez sırasında endotelial hücrelerin daha fazla hareket ve proliferasyonu için gerekli bir işlem olan bazal membran degradasyonunun ilk basamağında bir kemokin olarak görev yapar ve daha sonra tübül benzeri yapılar geliştirirler (137). TSP-1, anti-anjiyogenik bir faktör olarak işlev gören çok fonksiyonlu bir trombosit ve ECM proteindir (138). Pterjiumda bulunan azalmış seviyeleri anjiyogenez indükleyici olarak bulunmuştur (134).

Nitrik oksit (NO) üretiminde artış sağlayan indüklenebilir nitrik oksit sentazın (iNOS), VEGF ile birlikte aşırı eksprese olduğu bulunmuştur ve bu durum anjiyogenik stimülasyona neden olmaktadır (139).

UV-ışığı ile indüklenen timin dimerleri, primer ve rekürren pterjium patogenezinde anjiyogenez ile ilişkilendirilmiştir. Primer ve rekürren pterjiumun kan ve lenfatik damarlarının yanı sıra özellikle fibrovasküler dokunun vasküler ağında timin dimerleri saptanmıştır (73).

Son zamanlarda, lenfanjiyogenezin pterjiumda olduğu ve geliştiği gösterilmiştir. Lenfatik damarların çokluğu ile pterjium şiddeti arasındaki ilişki bulunmuştur (140). Unilateral nazal pterjiumun farklı aşamasına sahip hastaların dahil edildiği bir çalışmada pterjium dokusunda kan ve lenfatik mikrodamar yoğunluğunun anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. Ayrıca cerrahi örneklerde artmış lenfatik mikrodamar yoğunluğunun pterjium nüksünü öngördüğü rapor edilmiştir (140).

2.4.3.9. İmmünolojik mekanizmalar

İmmün sistemin pterjium gelişiminin hem patogenezinde hem de oluşumunun bir sonucu olarak doğrudan ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Pterjiumda vasküler hücresel adezyon molekülü-1 (VCAM-1), intrasellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve insan lökosit antijeni-DR (HLA-DR) dahil olmak üzere immünolojik aktivite markerlarının seviyeleri arttığı rapor edilmiştir (141). Ayrıca pterjium dokularında ICAM-2 ve ICAM-3'ün gen ve protein ekspresyonlarında anlamlı bir artış saptanmıştır (142). Pterjium mast hücrelerinde, lenfositlerde, plazma hücrelerinde, dendritik hücrelerde ve CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde bir artış gösterilmiştir (143, 144). Pterjiumda T-lenfositleri, B-lenfositleri ve makrofajları ile ilgili yapılan bir çalışmada T-lenfositlerin pterjiumun bağ dokusunda çoğunluğu oluşturduğu bildirilmiştir. İnflamatuar sürecin yoğunluğu antijen seviyelerine bağlı olarak değişirken makrofaj tipi hücreler pterjium dokusunda düzensiz olarak dağılmaktadır. İmmün hücre infiltrasyonunun subepitelyal bölgede ve epitel tabakanın erozyona uğradığı alanlarda daha fazla olduğunun gösterilmesiyle inflammatuar sürecin; hücre proliferasyonundan, anjiyogenezden veya pterjium nüksünden sorumlu olmadığı fikrini ortaya çıkarmıştır (145).

2.4.3.10. Epitelyal-mezenkimal transisyon

Kanser hücrelerinin yaygın bir özelliği olan epitelyal-mezenkimal transisyon (EMT), epitelyal hücrelerin fenotipini, hasar görmüş dokudan fibroblastik hücrelere değiştirdiği fenomen olarak adlandırılır. Pterjium dokuları ile yapılan bir çalışmada temel bir EMT stimülatörü olan doku faktörü (TF) için immünoreaktivite bulunmuştur. Bazal,

suprabazal ve yüzeyel epitel hücrelerinin sitoplazmasında daha yüksek ekspresyon seviyeleri ile TF-immün pozitif hücreler saptanmıştır. Ek olarak peritijial epitelyal hücrelerde klasik bir EMT işareti olan bir alfa-düz kas aktin (α -SMA, *smooth muscle actin*)'in protein ekspresyonu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, epitel hücrelerinin mezenkimal fenotip ekspresyonu olan TF'ye dönüştüğünü göstermektedir. Hücre-hücre adezyonunu düzenleyen proteinler olan E-kaderin'in downregülasyonu ve β -kateninin intranükleer birikimi de immünohistokimyasal olarak peritijium epitelyumunda tespit edilmiştir (146, 147). E-kaderin down regülasyonu EMT boyunca majör bir yolaktır ve kanonik β -katenin sinyal yolağı da EMT için gerekli olup sıklıkla kanserde aktive edilen bileşendir (148). Peritijiumda EMT'nin miRNA regülatörlerinin farklı ekspresyonları da gösterilmiştir. Yapılan son çalışmalarda EMT'yi inhibe eden miR-200 ailesinin dört üyesinin peritijiumda down regüle olmasıyla, peritijium patogeneğinde potansiyel rol oynadığı düşünülmüş ve bunun yeni bir terapötik hedef olabileceği belirtilmiştir (149).

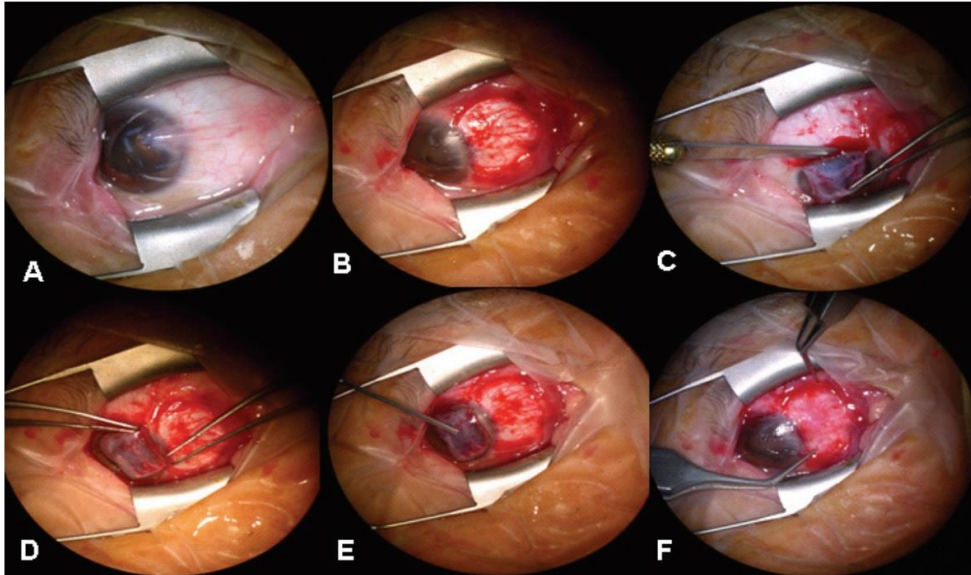
2.4.3.11. Kolesterol metabolizmasındaki değişiklikler

Peritijium türevi fibroblastlarda, kolesterol metabolizmasında bir değişiklik gözlenmiştir. Hastalardan izole edilen primer peritijium hücrelerinde intrasellüler kolesterol metabolizmasında artan bir aktivite gösterilmiştir. Ek olarak insan örneklerinden izole edilen peritijium fibroblastlarında, kolesterol biyosentezinin hız sınırlayıcı enzimi olan hidroksil-metilglutaril-koenzim-A (HMG-KoA) redüktaz ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) reseptörünün mRNA düzeylerinin arttığı bulunmuştur (150, 151). Kolesterol metabolizmasını değiştiren ilaçlar olan everolimus ve pioglitazonun peritijium fibroblast proliferasyonunu ve ayrıca hücre içi kolesterol homeostazını regüle eden açıl koenzim A kolesterol açıl transferaz seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir (152). Bu çalışmaların neticesinde topikal ilaçların kullanılmasıyla; kolesterol ester metabolizmasının modülasyonu sağlanarak peritijium proliferasyonunun engellenebileceği düşünülmektedir.

2.4.4. Peritijium tedavisi

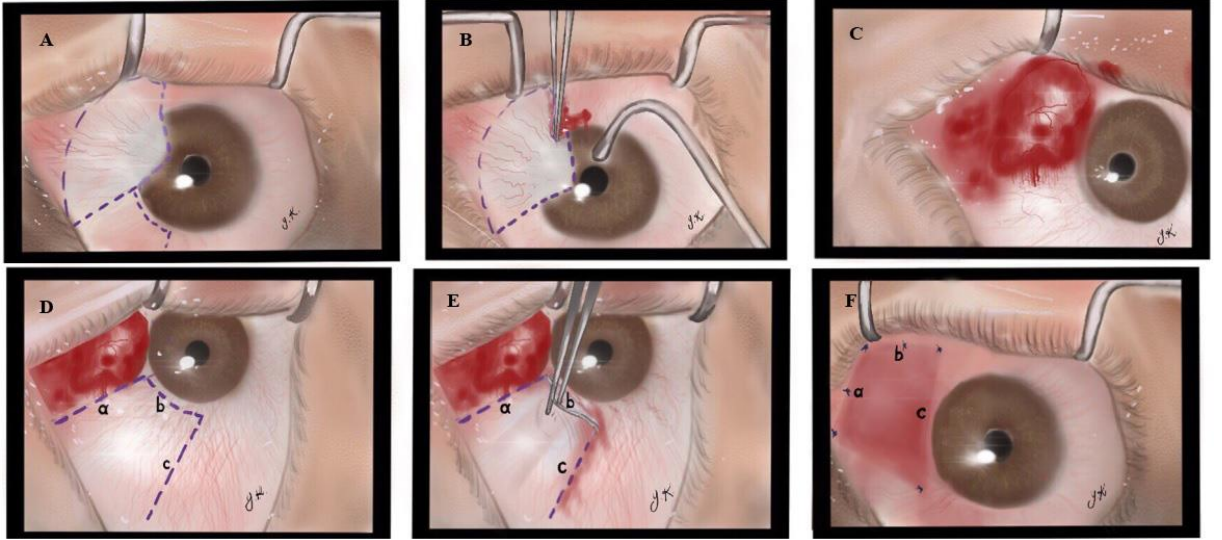
Peritijium, hastalık sürecinin erken döneminde genellikle asemptomatiktir. Ancak kuru göz belirtileri olan yanma, kaşıntı ve sulanma meydana gelebilir. Hastalık ilerledikçe lezyonlar boyut olarak artmakta ve direkt olarak görme aksına doğru ilerleyerek indüklenmiş astigmatizmaya bağlı olarak görsel semptomlara neden olabilmektedir. Bu tabloda cerrahi müdahale gerekli olmaktadır. Peritijiumun eksizyonu, onarım için ilk

adıdır. Pterjiumda kullanılan cerrahi yöntemler; çıplak sklera (*bare sclera*), konjonktival otogreft (*conjunctival autograft*) ve amniyotik membran greft (*amniotic membrane grafting*) tekniği olarak adlandırılır. Çıplak sklera tekniği, skleral yatağın yeniden epitelize olmasına izin vererek pterjium bölgesini kesmekten ibarettir. Bu prosedür ile eksizyon yüzeyi üzerinde pterjium dokusunun küçük kısımları kalabilmektedir ve bu da yüksek bir nüks oranına neden olmaktadır (17). Yapılan bir meta-analiz sonucuna göre primer pterjiumun çıplak cerrahi tedavisini takiben pterjium rekürrens oranı, konjonktival otogreft yapılmadığı takdirde 6 kat; intra/postoperatif mitomisin C kullanılmadığı durumlarda ise 25 kat daha yüksek rapor edilmiştir (153). Bu nedenle greftin pterjium yerine transplantasyonu, yeni büyümenin önünde bir bariyer olarak kullanılmaktadır. Konjonktival otogreft yöntemi; bulber konjonktivadan bir otogreft elde edilmesini ve pterjium çıkarıldıktan sonra maruz kalan skleral yatağın üzerine greftin süturlanması işlemidir (Resim 2.2 ve Resim 2.3). Bu yöntem, uzun süreli etkinliğe sahip olup çıplak skleradan daha düşük rekürrens oranları elde edilmektedir (154-156). Konjonktival otogreftler, sütür veya fibrin yapıştırıcı kullanılarak transplante edilir. Süturlar; postoperatif rahatsızlık, kronik inflamasyon ve granülom oluşumu ile ilişkilidir. Fibrin yapıştırıcı, plazmadan hazırlanan bir sentetik doku yapıştırıcısıdır ve ilk olarak 1993 yılında Cohen tarafından pterjium cerrahisi için tarif edilmiştir (157). Bu prosedür; komplikasyon oranlarını, postoperatif ağrı ve rahatsızlığı azaltmaktadır, bununla birlikte daha pahalı olup ayrılma riskine de sahiptir (158, 159).



Resim 2.2. Pterjium konjonktival otogreftin cerrahi işlemleri (160)

(A) Preoperatif pterjium (B) Pterjium başı ve subkonjonktival fibrovasküler doku ekzizyonu (C) Konjonktival otogreftin kornea üzerine çevrilmesi (D) Konjonktival otogreftin kornea üzerine yerleştirilmesi (E) Konjonktival otogreft ve çıplak sklera üzerine fibrin yapıştırıcısı uygulama (F) Konjonktival otogreftin çıplak skleraya yayılması



Resim 2.3. Primer pterjium eksizyonunun şematik basamakları ve konjonktival flep tekniği ile onarımı (161)

(A-C) Pterjium ekzizyonu (D-E) Transpozisyonel flep hazırlanması (F) Transpozisyonel flep transplantasyonu

Pterjiumun cerrahi tedavisinde antiinflamatuvar ve antifibrotik özelliklere sahip bir amniyotik membran kullanılır. Bu özellikleri sayesinde ECM üretimi ve skar oluşumunun önüne geçilebilmektedir (162). Amniyotik membran, tipik olarak bazal membran yukarı ve stroma aşağı bakacak şekilde çıplak sklera üzerine yerleştirilmektedir. Fibrin yapıştırıcısı ayrıca amniyotik membran greftinin altta yatan episkleral dokuya adezyonuna yardımcı olmak için kullanılır. Kullanımı güvenli ve etkili görünmektedir ve çıplak sklera ile karşılaştırıldığında daha düşük nüks oranlarına sahiptir (163, 164). Bununla birlikte, konjonktival otogreft tekniğine göre pterjium nüksünü önlemede bu yöntemin etkinliğine ilişkin tartışmalı sonuçlar mevcuttur (165, 166).

Otolog nazal mukoza transplantasyonunun, kimyasal yanık hasarlı kornealarda oküler yüzey rekonstrüksiyonu için etkili olduğu kanıtlanmıştır (167). Bu tekniğin konjonktiva eksikliği olanlarda veya ciddi pterjium tedavisinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (17). Son zamanlarda yumuşak doku rekonstrüksiyonu için kullanılan biyouyumlu bir floropolimer olan genişletilmiş politetrafloroetilenin (e-PTFE) intraoperatif insersiyonu, amniyotik membran ve konjonktiva arasına transplante edildiğinde pterjium nüksünü anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir (168). Cerrahi eksizyon yapıldıktan sonra pterjium nüksünü önlemek için adjuvan tedaviler kullanılmaktadır. En yaygın tedaviler: Mitomisin C (MMC), β -radyasyon ve 5-florourasil (5-FU)'dir. MMC, keratositlerin ve

miyofibroblastların apoptozunu indükleyen bir anti-mitotik ajandır (169). MMC'nin intraoperatif uygulaması yüksek başarı oranıyla sonuçlanır, ancak ciddi komplikasyonlar bildirilmiştir. Kullanımı ile kornea ödemi, korneal perforasyon ve skleral kalsifikasyon dahil olmak üzere dozlarla ilişkili kontrol edilmeyen şiddetli semptomlar görülmesi nedeniyle hasta seçiminde dikkatli olunmalıdır (170).

Beta radyasyonu, orta penetrasyonu olan ve oküler dokunun dış katmanlarında emilen bir ışımadır. İyonize radyasyonun oküler yapılara fokal olarak uygulanmasını sağlayan beta ışınması pratik bir yöntem olup fibroblast proliferasyonunu inhibe etmektedir (171). Cerrahi eksizyondan 24 saat sonra başlayan erken postoperatif β -radyasyon uygulanması etkili ve güvenli olup semptomları iyileştirmekle birlikte kemoterapötik ajanlar, konjonktival otogreft ve tek başına basit eksizyon ile karşılaştırıldığında daha iyi kozmetik sonuçlar sağlamaktadır (172-174).

5-FU, hücre döngüsünün S fazında DNA sentezini inhibe eden bir pirimidin analogudur. Fibroblast gibi hızla çoğalan hücreleri ve migrasyonu etkilemektedir (175). 5-FU'nun pterjium nüks oranını azaltmada güvenli ve etkili olduğu kanıtlanmıştır. Ancak rekürren vakalarda aşırı neovaskülarizasyon ile kabul edilemez bir kozmetik görünüm gelişebilmektedir (176).

Etanol, dokularda peptidlerin ve proteinlerin denatürasyonuna neden olmaktadır ve bazal membranı bölerek korneal epitel hücreler arasındaki hemidesmozom (epitel hücrelerinin altta yatan bazal membrana stabil adezyonunu kolaylaştıran protein yapılar) kavşaklarını yok etmektedir. İntraoperatif etanol tedavisinin pterjium nüksünü en aza indirdiği, kısa süreli uygulandığında yüksek düzeyde kozmetik memnuniyeti sağladığı gösterilmiştir (177). Son zamanlarda düşük nüks oranları olan ve intraoperatif komplikasyonları olmayan basit bir prosedür ile pterjiumun çıkarılmasında tek başına etanol kullanımı bildirilmiştir ve pterjium tedavisi için umut verici bir alternatif gibi görünmektedir (178).

Bevacizumab, endotelial hücrelerin VEGF ile indüklenen proliferasyonunu inhibe eden rekombinant insan kaynaklı monoklonal bir immüno globulindir. Pterjiumda VEGF'nin aşırı ekspresyonu, araştırmacıları pterjium nüksünün önlenmesinde anti-VEGF tedavisine yönlendirmiştir. Subkonjonktival bevacizumabın tek doz (12.5 mg/0.5 ml)

postoperatif uygulamasının iyi tolere edildiği ve korneal kan damarlarının sayısını ve çapını azalttığı ama bu olumlu etkinin geçici olduğu bildirilmiştir (179). Diğer yapılan çalışmalarda ise bevacizumab tedavisinden sonra fibrovasküler doku sıklığında bir azalma olduğu ama tedavi edilen ve tedavi edilmeyen gruplar arasındaki seviyelerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı bildirilmiştir (180, 181).

Doksisiklin; geniş spektrumlu bir antibiyotik olup inflamasyonu, proteolizi, anjiyogenezi ve apoptozu etkileyen biyolojik özelliklere sahiptir (182-184). Karsinom hücre hatları ve hayvan karsinogenez modellerinde doksisiklinin MMP'leri inhibe ederek tümör büyümesini inhibe edebileceği gösterilmiştir. Yapılan bir araştırmaya göre doksisiklinin deneysel pterjiumda lezyon büyümesini engellediği de gösterilmiş olup doksisiklin tedavisi sonrası pterjiumun anterior segmentinde histolojik gerileme gözlenmiştir (185). Doksisiklinin mitokondriyal gen ekspresyonu, endoplazmik retikulum stres yolağı, ECM ile ilgili genler, büyüme faktörleri, interlökinler ve hücre döngüsü ile ilişkili proteinler gibi hücre içi yolakları indükleyerek pterjiumda güçlü bir doza bağımlı cevap oluşturduğu gösterilmiştir (186). Tedavi edilmemiş primer pterjium hastalarında oral doksisiklinin kullanımının pterjium büyüklüğünün kontrolünde etkili olduğu rapor edilmiştir (187).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda çeşitli bileşikler, pterjium fibroblastlarında *in vitro* antiproliferatif aktivite göstermiştir. Poliamin analogu (S)-N1-(2-methyl-1-butyl)-N11-ethyl-4,8-dazaundean (IPENSpm) bileşiğinin N1-asetiltransferaz 1 (SAT1) inhibisyonu ile primer kültür hücrelerinde migrasyonu azalttığı gösterilmiştir (38). Antiproliferatif etkileri olan tetrandrine alkaloidi pterjium fibroblastlarında PCNA ekspresyonunu azalttığı ve doz-zaman bağımlı olarak apoptozu indüklediği kanıtlanmıştır (188). Kurkumin bileşiğinin de PCNA inhibisyonu ile pterjium fibroblast proliferasyonu üzerinden direkt inhibitör etkisi gösterilmiştir (189).

2.5. Rho Proteinleri

Rho proteinleri, monomerik GTPazların Ras süperfamilyasının Rho altfamilyası üyeleridir. Rho geni ilk olarak 1985'de bir deniz salyangozu olan *Aplysia*'dan bir Ras homologu olarak klonlanmıştır (190). Rho GTPaz ailesi 20 üyeye sahiptir. Bunlar arasında RhoA, Rac1 ve Cdc42 en iyi karakterize edilenlerdir. Rho proteinleri, küçük GTPaz süper ailesinin tüm üyeleri gibi guanozin trifosfat (GTP) bağlı (aktif) ve

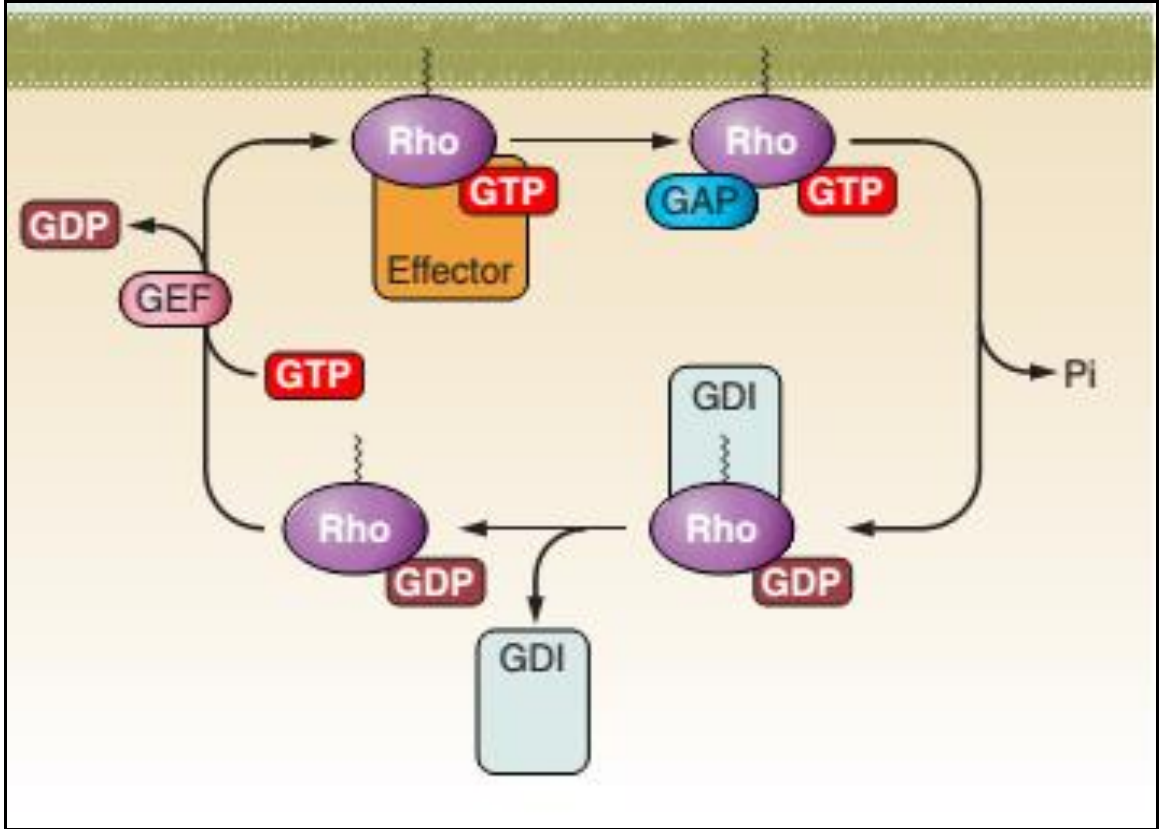
guanozin difosfat (GDP) bağı (inaktif) durumlar arasında geçiş yaparak hücrel süreçleri kontrol ederler ve moleküler anahtar işlevi görmektedirler (23). Rho proteinlerinin temel işlevi; hücre iskeletinin yeniden biçimlenmesini ve hücre migrasyonunu kontrol etmektir. Bununla birlikte basit bir GTPaz döngüsünün Rho proteinleri tarafından başlatılan çeşitli fonksiyonlar ve sinyaller ile açıklanamayacağı gösterilmiştir. Son bulgulara göre mikroRNA'lar tarafından post transkripsiyonel regülasyonu, ubiquitinasyon, palmitolasyon ve fosforilasyon gibi ek düzenleyici mekanizmaların Rho GTPazların düzenlenmesine daha fazla katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (191-194).

Rho GTPazlar; hücre büyüklüğünün, proliferasyonun, apoptozun, hücre polaritesinin, hücre yapışmasının, hücre motilitesinin ve membran trafiğinin düzenlenmesinde çok önemli rol oynamaktadır (23). Rho GTPaz'lar pro-inflamatuar sitokinler tarafından ortaya çıkarılan inflamatuvar yanıtı da kontrol eden önemli sinyal bileşenleridir (195). Rho GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*), GAPs (*GTPase-activating proteins*) ve GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*), Rho GTPazların ana düzenleyicileridir (196) (Şekil 2.8). GTPaz döngüsü, Rho GTPazın alt yolak efektörleri ile etkileşimine neden olan biyolojik fonksiyonlar için esansiyeldir (197, 198).

Rho-associated coiled-coil-forming kinase (ROCK), bir serin/treonin kinazdır ve Rho GTPaz'ın majör alt yolağı efektörlerinden biridir. GTP bağı formunda Rho-GTPaz; spesifik alt yolak efektör proteinleri olan ROCK, aktin polimerizasyon regülatörleri ve adaptör proteinleri ile etkileşim gösterir. Rho/ROCK yolağı, aktin stres lifleri ve fokal adhezyonun oluşumunda ve aktomiyozin hücre iskeleti organizasyonunun regülasyonunda, hücre adhezyonunda, hücre morfolojisinde, hücre motilitesinde, düz kas kontraksiyonunda, nöronal yapı ve sitokinezde önemli fonksiyonlara sahiptir (199, 200) (Şekil 2.9). ROCK1 (ROCK β) ve ROCK2 (ROCK α) olmak üzere iki izomeri vardır. Her iki ROCK proteinleri birçok dokuda her zaman eksprese edilir. ROCK1 enzimi karaciğer, akciğer ve testis dahil olmak üzere nöronal olmayan dokularda; ROCK2, beyin ve kaslarda yüksek seviyelerde bulunmaktadır (201, 202). Rho ve ROCK, optik sinir ve retinal gangliyon hücrelerinde de yüksek oranda eksprese edilmektedir (203). Limbal-korneal epitel transisyonu, ROCK1 ekspresyonunun artışı ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca ROCK sinyallerinin; kornea yara iyileşmesi

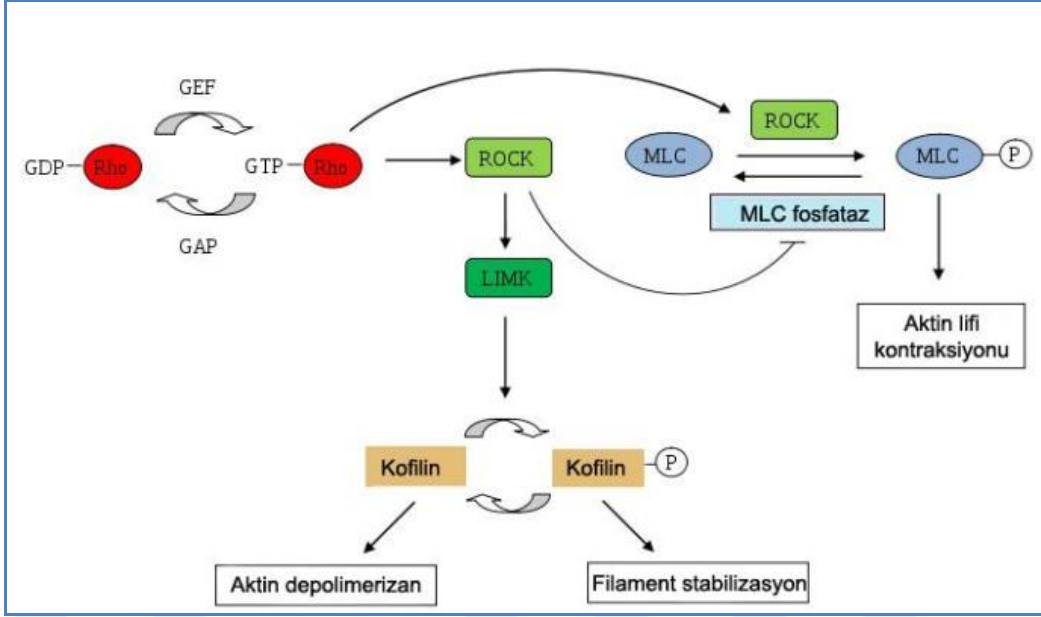
mekanizmalarında rol oynadığı, ROCK izoformlarının ekspresyonunun ve aktivasyonunun arttığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir (204, 205).

Bazı hastalıkların tedavisinde kullanmak amacıyla Rho/ROCK yolağını bloke eden ROCK inhibitörleri geliştirilmiştir. Bunlardan *fasudil*, serebral vazospazm; *ripasudil* ve *netarsudil* ise glokom tedavisinde kullanılmaktadır (206-208).



Şekil 2.8. Rho proteinleri aktivasyonu (209)

GEFs (*Guanine-nucleotide exchange factors*); GAPs (*GTPase-activating proteins*); GDIs (*Guanine-nucleotide dissociation inhibitors*)



Şekil 2.9. Rho/ROCK yoluğ mekanizması (210)

RhoA, RhoB ve RhoC proteinleri aynı hücrenel fonksiyonlara sahip olup benzer amino asit diziliş gösterirler (199, 200). Rho proteinlerinin birçok fonksiyonu RhoA ile yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. RhoA, vücutta en fazla bulunan ve en çok çalışılan bir Rho proteini alt tipidir (24). RhoA, RhoB, RhoC proteinlerin, translasyon sonrası korunan C-terminal sistein kısmı prenilasyon ile modifiye edilir (211). Bu modifikasyon, hücre büyümesi, transformasyonu ve hücre iskeleti organizasyonu için gereklidir (212). Rho proteinlerinin prenil grupları arasında farklılık vardır. Bu farklılık, onların lokalizasyonunu yansıtmaktadır. RhoB temel olarak geç endozom ve lizozomlarda; RhoA, RhoC ise çoğunlukla sitoplazmada veya plazma membranında bulunur (213).

RhoA, aktin hücre iskeleti yapısının stres lifleri aktivitesinden sorumludur (200). RhoA, regülatör miyozin hafif zincirin fosforilasyonu ile aktomyozin kontraktiletiyi stimüle eder (214). RhoA, Dia proteinleri olarak bilinen '*diaphanous-related*' formun proteinlerinin aktivasyonu yoluyla aktin polimerizasyonunu direkt olarak stimüle eder. Dia proteinleri, Rho ile indüklenen stres lifleri formasyonuna aracılık için ROCK enzimleriyle beraber hareket eder (215). $G_{12/13}$ protein aktivasyonunun Rho/ROCK sinyal yoluğın aktive ettiğ bilinmektedir (216, 217).

RhoB proteini; kararsız, stabil olmayan bir moleküldür, RhoA'ya %85 oranında yapı olarak benzemektedir, oksidatif strese cevap veren hücrelerde ve akciğerde yüksek

oranda eksprese edilir (218). RhoB, EGF ve PDGF gibi büyüme faktörleri ve DNA hasarı veren ilaçlar, UV ve reaktif oksijen türleri (ROS) ile ekspresyonu indüklenen Rho GTPaz'dır (26, 27, 219). RhoB, hipoksik ve genotoksik stres ile aktive edilmektedir (220, 221). RhoB, hipoksiyle indüklenen faktör-1 α ve NF κ B'nin aktivasyonunda rol oynamaktadır (219, 220, 222). RhoB'nin hücre döngüsünün G1 ve S fazında büyüme faktörleri tarafından upregüle edildiği rapor edilmiştir (223). RhoB, sitokin reseptörlerinin ve büyüme faktörlerinin degradasyonunu regüle eder (224-229). RhoA ve RhoC'nin aksine RhoB, büyüme inhibitörü etkisi göstermektedir (230, 231). RhoB ekspresyonunun tümörlerde down regüle olduğu saptanmıştır (232).

RhoB, stres ile indüklenen apoptoz ve antineoplastik aktivitede kritik bir role sahiptir. RhoB delesyonu, stresle stimüle edilen embriyonik fibroblastların cevabını tehlikeye düşürmektedir. RhoB'nin stres cevabı prenilasyon durumuna bağlıdır (233). Bu, RhoB'nin hücre yaşamında negatif bir moderatör olarak davranabileceğini düşündürmektedir (234). RhoB'nin genetik delesyonu farelerde gelişimi etkilememiştir; fakat geç başlayan retinal vaskülarizasyona yol açtığı bildirilmiştir (235).

Rho GTPaz'lar, pro-inflamatuar sitokinler tarafından ortaya çıkarılan inflamatuvar yanıtı kontrol eden önemli sinyal bileşenleridir (195). Pro-inflamatuar mediyatörler TNF- α , IL-1 β ve bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) RhoA ekspresyonunu değiştirmezken; insan endotel hücrelerinde RhoB ekspresyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir (236).

RhoC kanser gelişimi ile ilişkilidir (237). RhoC, malign pankreatik duktal karsinomalarda, inflamatuvar meme kanseri tümörlerinde ve metastatik melanomalarda up-regüle olur (238-240). Ayrıca RhoC, insan epitel hücrelerindeki anjiyojenik faktörlerin ekspresyonunu indükler ve bu da tümör vaskülarizasyonunu kolaylaştırmaktadır (241).

RhoD, hücre membranında lokalize olmaktadır. Ayrıca RhoD sitoplazma boyunca vezikül benzeri yapılarda da bulunur. RhoD vezikül yapıların fonksiyonunda ve formasyonunda rolü olmakla birlikte hücre migrasyonunda negatif etkiye sahip olduğunu gösteren birçok gözlem vardır. RhoD, iki farklı aktin ilişkili hücresel işlemin regülasyonundan sorumludur. Birincisi, erken endozomların aktin bağımlı transportunu

regüle etmesidir (242). İkincisi, aktin stres liflerinin ayrılmasını ve fokal adhezyonunun bozulmasını sağlayıp hücre motilitesini inhibe etmesidir (243, 244).

RhoE'nin endotel hücrelerinde RhoB ekspresyonunu indüklediği, RhoA'ya zıt yönde etki gösterdiği, ROCK1'e bağlanarak fosforilasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir (245-247). UV radyasyon, RhoE mRNA ve protein düzeylerini arttırmaktadır (28). Mide, kalın bağırsak, akciğer ve meme karsinomalarında RhoE ekspresyonun azaldığı, RhoE'nin aday bir tümör baskılayıcı protein olabileceği ve kanser gen terapisinde yeni bir hedef olabileceği bildirilmiştir (248).

2.6. Rac Proteinleri

Ras proteinleri, monomerik küçük GTPaz'ların (20-25 kDa) büyük bir süper ailesidir. Ras proteinleri; hücre siklus progresyonu, hücre yaşamı, aktin hücre iskeleti organizasyonu, hücre polaritesi ve hareketi, veziküler ve nükleer transport dahil olmak üzere çeşitli hücre işlemlerini regüle etmektedir (191, 249, 250). Hem unisellüler hem de multisellüler organizmalarda Ras proteinleri eksprese edilmektedir. İnsan Ras süper ailesi 166 üyeden oluşmaktadır ve 5 majör alt dala (Ras, Rho, Arf/Saf, Ran, Rab) ayrılmıştır. Cdc42, Rac1, Rac2 ve Rac3; 20 üyeli Rho ailesine ait proteinlerdir (Tablo 2.1) (209).

Rho proteinleri, aktin hücre iskeletinin farklı konformasyonel formlarının düzenlenmesinde önemlidirler. Rho ailesi üyelerinin, aktinin yeniden şekillenmesinin ve düzenlenmesindeki rolü ilk olarak fibroblast büyüme faktörü uyarısına yanıt çalışmaları ile açığa çıkarılmıştır (251, 252). Pterijum oluşumunda fibroblastların rolü de gösterilmiştir (253). Cdc42 ve Rac, RhoA ile birlikte ailenin en çok çalışılan üyeleridir. Her yerde eksprese edilen Rho, Cdc42 ve Rac proteinlerinin başlıca fonksiyonu hücre iskeleti regülasyonudur. Bu regülasyonda Rho ailesinin her üyesi farklı etkilere sahiptir. RhoA aktivasyonu aktin stres liflerinin ve fokal adhezyonun oluşumunu sağlar (254). Rac1 stimülasyonu hücre periferinde aktin polimerizasyonunu indükler ve aktin-zengin lamellipodia oluşumu meydana gelir. Rho tarafından indüklenen aktin hücre iskeleti reorganizasyonun sonuçları hücre morfolojisi, polaritesi, motilitesi ve adhezyonu üzerinedir (249, 250, 255). Rac ve Cdc42 başlıca hücre iskeleti yapısının ve hücre hareketinin kontrolünde rol oynar (256), ayrıca hücre proliferasyonu ve spesifik gen

ekspresyonunun kontrolünü de içeren diğer önemli hücresel aktivitelere de katılırlar (257).

Rho proteinleri hücre iskeleti regülasyonuna ek olarak enzim aktivitelerinde regülatör olarak davranırlar. Rac1 proteinleri, süperoksit oluşumundan sorumlu NADPH oksidaz enzimini kontrol eder (30). Rac aktivasyonun fibroblastlarda ROS'u arttırdığı gösterilmiştir (258). Pterjiunda artmış ROS üretimi olduğu ve antioksidan enzimlerin azaldığı gösterilmiştir (18). Ayrıca Rac proteinleri hücre siklus progresyonu ve gen transkripsiyonu gibi önemli süreçlerde de rol oynamaktadır (259, 260).



Tablo 2.1. Ras protein süper ailesi (209)

Ras protein süper ailesi					
Ras (36)	Rho (20)	Rab (64)	Ran (1)	Arf (28)	Other (11)
H-Ras	RhoA	Rab1A, B	Ran/TC4	Arf1	RabL2A
N-Ras	RhoB	Rab2A, B		Arf3	RabL2B
K-Ras	RhoC	Rab3A-D		Arf4	RabL5
E-Ras	Rnd1	Rab4A, B		Arf4L	SRPRB
M-Ras/R-Ras3	Rnd2	Rab5A-C		Arf5	LOC401884
R-Ras	Rnd3	Rab6A-C		Arf6	Arl10C
TC21/R-Ras2	RhoD	Rab7A, B		ArfRP1	Arl10B
Rit1	Rif	Rab7L1		ArfRP2	RabL3
Rit2/Rin	RhoG	Rab8A, B		FLJ22595	Rab20
RalA	RhoH	Rab9A, B		Arfd1	Miro1
RalB	Rac1	Rab10		Arl1	Miro2
Rap1A	Rac2	Rab11 A, B		Arl2	
Rap1B	Rac3	Rab12		Arl2L1	
Rap2A	Cdc42	Rab13		Arl3	
Rap2B	TC10	Rab14		Arl4	
Rap2C	TCL	Rab15		Arl5	
Noey2	Wrch-1	Rab18		Arl6	
Di-Ras1	Wrch-2	Rab17		Arl7	
Di-Ras2	RhoBTB1	Rab19		Arl8	
RasD1	RhoBTB2	Rab21		Arl9	
RasD2		Rab22A, B		Arl10A	
RRP17		Rab23		Arl10B	
RPR22		Rab24		Arl10C	
Rem1		Rab25		Arl11	
Rem2		Rab26		Sar1b	
Gem/Kir		Rab28		Sar1a	
Rad		Rab27A, B		Arl16	
Reng		Rab30		Arl14	
Ris		Rab31			
RERGL		Rab32			
RasL11A		Rab33A, B			
RasL11B		Rab34			
Rheb		Rab35			
Rheb2		Rab36			
NKIRas1		Rab37			
NKIRas2		Rab38			
		Rab39A, B			
		Rab40A-C			
		Rab41			
		Rab42			
		Rab43			
		RabL4			
		RasEF			

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Polimorfizm Çalışmaları

3.1.1. Hasta ve kontrol grubu

Polimorfizm çalışmaları için Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Kliniğine başvurup pterjium tanısı konulan 383 hasta ve herhangi bir hastalığı olmayan 331 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Hasta (55.3 ± 7.9 yaş, %50.7 kadın, %49.3 erkek) ve kontrol (54.7 ± 8.6 yaş, %51.4 kadın, %48.6 erkek) grubu yaş ve cinsiyet bakımından benzerdir ($P > 0.05$). Pterjium tanısı almış 383 hastadan ve kontrol grubu olarak kullanılan herhangi bir hastalığı olmayan 331 sağlıklı gönüllüden venöz kan örneği alınarak periferik lökositler izole edilmiş ve DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Çalışma için Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 24.07.2017/276 ve 11.09.2017/312 no'lu kararları ile Etik kurul onayı, hasta ve sağlıklı kontrol grubundan imzalanmış bilgilendirilmiş olur formu alınmıştır.

3.1.2. Periferik kandan DNA izolasyonu

1. Kandan DNA izolasyonu için DNA kiti kullanıldı (Qiamp DNA minikit, Qiagen, Hilden, Almanya)
2. 1.5 ml'lik eppendorf tüpe 20 µl proteinaz K eklendi.
3. Daha sonra 200 µl tam kan eklendi.
4. 200 µl buffer AL eklendi ve 15 sn vortekslendi.
5. 10 dk 56°C etüvde inkübe edildi.
6. Kapak kısmında damlalar için 10 sn spin işlemi uygulandı.
7. 200 µl etanol (%96-100) eklendi ve 15 sn vortekslendi. (Kan: etanol,1:1)
8. Karışım pipetle alınarak kolonlara yüklendi.
9. 20°C 'de 7000 g'de 1 dk santrifüj yapıldı.
10. Santrifüj sonrası altta süzülen kısım (filtrat) atıldı.
11. Kolonlara 500 µl AW1 buffer (kullanmadan önce 130 ml etanol eklenerek hazırlandı) eklendi ve 20°C 'de 7000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
12. Santrifüj sonrası filtrat yine atıldı.
13. Kolonlara 500 µl AW2 buffer (kullanmadan önce 160 ml etanol eklenerek hazırlandı) eklendi ve 20°C 'de 20000 g'de 3 dk santrifüj edildi.

14. Filtrat tekrar atıldı ve yine 20000 g'de 1 dk santrifüj edildi ve filtrat atıldı.
15. Santrifüj sonrası kolon steril tüpe yerleştirildi ve 200 µl AE buffer solüsyonu eklenerek oda ısısında 5 dk inkübe edildi.
16. İnkübasyon sonrası 20°C'de 7000 g'de 1 dk santrifüj yapıldı.
17. Altta steril tüp içerisinde DNA elde edildi, üstteki kolon kısım atıldı.

3.1.3. Tek nükleotid polimorfizm (single nucleotide polymorphism, SNP) analizi

Hasta ve kontrol gruplarında aşağıda belirtilen genlere ait 30 adet SNP çalışmaları gerçekleştirildi (Tablo 3.1-3.5).

RHOA: rs2177268, rs3811699, rs3448, rs17595772, rs6784820, rs2878298, rs974495;

RHOB: rs2602160, rs62121967, rs62121968, rs11541350, rs35881336

RHOC: rs2999156, rs2230329, rs2306937, rs1804292, rs11102522, rs11538960

RHOD: rs3923203, rs11227675, rs34602279, rs61891303, rs75872861, rs7112925

RND3 (RHOE): rs1528428, rs13418763, rs75581868, rs1441982, rs115015150, rs76447184

Tablo 3.1. RHOA genine ait SNP'lerin fonksiyonel sonuçları

SNP	RHOA
rs2177268	<i>intron variant</i>
rs3811699	<i>downstream transcript variant, upstream transcript variant</i>
rs3448	<i>upstream transcript variant, 3' untranslated region (UTR) variant</i>
rs17595772	<i>intron variant</i>
rs6784820	<i>intron variant, upstream transcript variant</i>
rs2878298	<i>intron variant</i>
rs974495	<i>intron variant</i>

Tablo 3.2. *RHOB* genine ait SNP'lerin fonksiyonel sonuçları

SNP	<i>RHOB</i>
rs2602160	<i>upstream transcript variant</i>
rs62121967	<i>3' UTR variant</i>
rs62121968	<i>3' UTR variant</i>
rs11541350	<i>missense variant, coding sequence variant</i>
rs35881336	<i>upstream transcript variant</i>

Tablo 3.3. *RHOC* genine ait SNP'lerin fonksiyonel sonuçları

SNP	<i>RHOC</i>
rs2999156	<i>intron variant</i>
rs2230329	<i>coding sequence variant, missense variant, genic downstream transcript variant, 3' UTR variant</i>
rs2306937	<i>intron variant</i>
rs1804292	<i>coding sequence variant, synonymous variant, missense variant</i>
rs11102522	<i>upstream transcript variant</i>
rs11538960	<i>missense variant, genic downstream transcript variant, 3' UTR variant, coding sequence variant</i>

Tablo 3.4. *RHOD* genine ait SNP'lerin fonksiyonel sonuçları

SNP	<i>RHOD</i>
rs3923203	<i>intron variant</i>
rs11227675	<i>intron variant, missense variant, coding sequence variant</i>
rs34602279 (delins)	<i>coding sequence variant, frameshift</i>
rs61891303	<i>upstream transcript variant</i>
rs75872861	<i>downstream transcript variant</i>
rs7112925	<i>intron variant</i>

Tablo 3.5. *RND3 (RHOE)* genine ait SNP'lerin fonksiyonel sonuçları

SNP	<i>RND3 (RHOE)</i>
rs1528428	<i>intron variant</i>
rs13418763	<i>coding sequence variant, synonymous variant</i>
rs75581868	<i>intron variant</i>
rs1441982	<i>intron variant</i>
rs115015150	<i>3' UTR variant</i>
rs76447184	<i>upstream transcript variant</i>

3.1.4. Real-time polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) çalışması

Real-time PCR (RT-PCR, qPCR) ile mutasyon analizi için nano teknoloji temelli yüksek kapasiteli BioMark™ HD Sistem (*Fluidigm, South San Francisco, CA, Amerika*) ile gerçekleştirildi. SNP analizi için periferik venöz kandan izole edilen DNA'lar pre-amplifiye edildi.

RHOA, RHOB, RHOC, RHOD, RHOE genleri ile ilişkili polimorfizmler için PreAmp primerleri kullanılarak gerekli PCR koşulları uygulandı.

Pre-amplifiye karışım:

Qiagen multiplex PCR karışım	5 µl
Primer pool	1 µl
DNaz, RNaz içermeyen su	1.5 µl

Pre-amplifikasyon karışımı hazırlanarak plağa yüklendi sonrasında hasta ve kontrol grubundan elde edilen DNA da eklenerek uygun PCR koşulları *Applied Biosystems 96 kuyucuklu Thermal Cycler* cihazı kullanılarak uygulandı.

Pre-amplifikasyon termal program

15 dk	95°C	
15 sn	95°C	} 14 döngü
4 dk	60°C	
∞	4°C	

3.1.5. Real-time PCR

Örnek ve primerler için iki farklı karışım hazırlandı.

Örnek ve PCR karışımı:

KASP 2X <i>reagent</i> karışım	496.80 µl
GT <i>sample loading reagent</i>	49.68 µl
DNaz, RNaz içermeyen su	31.92 µl

Pre-amplifiye DNA'lar 1:100 oranında dilüe edilerek karışıma eklendi ve cihaza özgü çipe pipetle yüklendi.

Primer karışımı:

2X <i>assay loading reagent</i>	575.00 µl
MgCl ₂ (50 mM)	92.00 µl
DNaz, RNaz içermeyen su	322.00 µl

Primer karışım hazırlandıktan sonra yeni bir plağa pipetle eklendi ve *RHO* geni mutasyon primer plağından primerler alındı ve karışıma ilave edilerek çipe yüklendi. Çip, RT-PCR'ın uygulamadan önce *Fluidigm IFC Controller HX* cihazına yerleştirilerek primer ve örneklerin çipte yer alan kuyucuklara ulaşarak karışması sağlandı ve daha sonra çip BioMark™ HD Sistemi'ne yerleştirildi ve uygun PCR koşulları uygulandı (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. PCR tepkime koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	70°C	30 dk
	25°C	10 dk
Denatürasyon	94 C	15 dk
20 döngü	94°C	10 sn
	57°C	10 sn
	94°C	10 sn
18 döngü	94°C	10 sn
	57°C	20 sn
	72 °C	40 sn

3.2. Gen ve Protein Ekspresyonu

3.2.1. Çalışma popülasyonu

Operasyonlardan elde edilecek dokuların az miktarda olmasından dolayı protein ve gen ekspresyon analizlerinde farklı hastalardan alınan dokular kullanıldı. Dolayısıyla çalışmamız Western blot yöntemiyle protein ekspresyonu incelemesinde 38 primer pterjium hastası ve gen ekspresyonu profili için 30 primer pterjium hasta olmak üzere toplam 68 hastada yapıldı. Hastaların operasyon sırasında sağlıklı otogreft dokusu da alındığı için hastalar aynı zamanda kontrol grubunu da oluşturdu. Hasta grubunda gözde, 5-florourasil, mitomisin C, siklosporin A, daunorubisin, bevacizumab gibi adjuvan ilaç tedavisi uygulananlar bu çalışmaya dahil edilmedi.

3.2.2. Gen ekspresyonu analizi

3.2.2.1. Dokudan total RNA izolasyonu

Dokudan total ribonükleik asit (RNA) izole etmek için miRNeasy Mini Kit (*Qiagen GmbH-Hilden, Almanya*) kullanıldı ve total RNA eldesi için aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. Pterjium ve otogreft dokuları tüplere alınarak üzerine 700 µl *QIAzol Lysis Reagent* eklendi ve doku homojenizatörü (*Tissue Lyser LT, Qiagen, Almanya*) ile homojenizasyon gerçekleştirildi.

2. Elde edilen doku homojenatı oda sıcaklığında (15–25°C) 5 dk boyunca inkübe edildi.
3. Üzerine 140 µl kloroform eklendi ve 15 sn boyunca pipetaj yapılarak 2-3 dk boyunca oda sıcaklığında tutuldu.
4. 4°C'de 12000 g'de 15 dk santrifüj yapıldı ve üst faz yeni bir tüpe alındı.
5. Yeni tüpe alınan miktarın 1.5 katı (yaklaşık 600 µl) etanol (%96-100) eklendi ve pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı.
6. En fazla 700 µl örnek, 2 ml toplama tüpü içerisindeki RNeasy® Mini kolona yüklendi ve oda sıcaklığında 20 sn boyunca 8000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken kalıntı uzaklaştırıldı. Bu işlem örnek bitimine kadar tekrar edildi.
7. Buffer RWT ve RPE çözeltilerine %96-100 etanol eklenerek kullanıma hazır hale getirildi.
8. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona 700 µl Buffer RWT çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 20 sn boyunca 8000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken kalıntı uzaklaştırıldı.
9. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona bu sefer 500 µl Buffer RPE çözeltisi eklendi ve yine oda sıcaklığında 15 sn boyunca 8000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken kalıntı uzaklaştırıldı.
10. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona tekrar 500 µl Buffer RPE çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 2 dk boyunca 8000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken kalıntı uzaklaştırıldı.
11. 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne alınan RNeasy Mini kolona 30–50 µl RNase içermeyen su eklendi ve oda sıcaklığında yaklaşık 1 dk inkübe edilerek 1 dk boyunca 8000 g'de santrifüj edildi ve total RNA, toplama tüpündeki çözeltilde elde edildi.

3.2.2.2. mRNA'dan cDNA eldesi

Elde edilen total RNA içindeki mRNA'yı cDNA'ya çevirmek için Ipsogen RT Kit (*Qiagen, GmbH, Hilden, Almanya*) kullanıldı. Test edilecek (10 µl) her bir RNA örneğinin 5 µl'si 65°C'de 5 dk inkübe edilip 5 dk buzda bekletilerek soğutuldu. Revers Transkriptaz ön karışımı soğuk blok üzerinde hazırlandı ve bekletildi (Tablo 3.7).

Tablo 3.7. Revers Transkriptaz PCR karışım içerikleri

Bileşenler	Örnek başına hacim (µl)
5x Revers Transkriptaz tamponu	5
dNTP	2
Random primer (100 µM)	5,25
RNaz İnhibitörü (40 U/µl)	0,5
Ters transkriptaz (200 U/µl)	1
DTT	1,25
RNaz içermeyen su	0,5
Örnek başına RT ön karışım hacmi	15,5

Ön karışım dikkatlice karıştırıldı, 10000 g'de 10 sn spin uygulandı ve her bir RNA örneğinin üzerine ön karışımdan 15 µl eklendi. Her bir tüp dikkatlice karıştırıldı ve 10000 g'de 10 sn santrifüj edildi. *Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, Amerika)* cihazındaki kayıtlı revers transkripsiyon programı çalıştırıldı (Tablo 3.8). Tüpün altındaki cDNA'yı toplamak için 10000 g'de 10 sn santrifüj edildi ve qPCR gerçekleştirene kadar -20°C'de saklandı.

Tablo 3.8. Revers transkripsiyon için termal döngü

Süre (dk)	Sıcaklık (°C)
10	25
60	50
5	85
∞	4

Tepkime tamamlandıktan sonra elde edilen tek sarmal cDNA örneklerinin dondurulup çözülerek oluşan kaybı önlemek için 0.2 ml'lik PCR tüplerine 2 µl dağıtıldı (*aliquot*). *Aliquot* işlemi yapıldıktan sonra cDNA'ları uzun süre kullanabilmek için -80°C'de saklandı.

3.2.2.3. Elde edilen cDNA'lardan kalite ve miktar tayini

Elde edilen cDNA örneklerinin miktarlarını ve kalitesini tayin etmek ve tüm örnekleri aynı yoğunlukta reaksiyona tabi tutmak için spektrofotometrik yöntem (*Epoch*

Microplate Spectrophotometer, Biotek, Amerika) kullanıldı. Gen ekspresyon analizi öncesi örneklerden elde edilen cDNA'lar 50 ng/μl konsantrasyonuna ayarlandı.

3.2.2.4. RHO (RHOA, RHOB, RHOC, RHOD, RHOE, RAC2, RAC3) ve GAPDH

genlerinin ekspresyon düzeyleri ölçümü için RT-PCR (qRT-PCR) yöntemi

RT-PCR reaksiyonu DNA bağlayan boyaların kullanımı ile amplifikasyonun eş zamanlı olarak takibine olanak sağlar. *SYBR Green*, bu amaçla sıklıkla tercih edilen boyalardan biridir. Çift iplikli DNA molekülüne bağlanarak floresan ışımaya verir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan *SYBR Green* miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir. *SYBR Green* boyasından alınan ışımamanın sınır değeri aştığı noktaya Ct ya da Cp değeri adı verilmektedir. Bu noktada DNA amplifiye olmuş ve DNA'ya bağlanan boyanın verdiği ışımaya sınır değerini aşmıştır. Işımanın sınır değeri aştığı anda amplifikasyondan emin olunur ancak doğru amplikonun takibinin yapıldığının belirlenebilmesi için erime eğrisinin (*melting point*) incelenmesi gerekmektedir. Çünkü *SYBR Green* tüm çift iplikli DNA moleküllerine bağlanan bir boya olup belirli bir DNA molekülüne bağlanan spesifik bir boya değildir.

3.2.2.5. RHO genlerinin ekspresyon düzeyleri ölçümü için real-time PCR bileşenleri

Eş zamanlı PCR ön karışımı Tablo 3.9'a göre buzda hazırlandı. Buz üzerinde 50 ng/μl'e ayarlanan cDNA örnekleri üzerine eklendi. cDNA örnekleri real-time PCR yöntemi ile BioMark HD (*Fluidigm, South San Francisco, CA, Amerika*) cihazında amplifiye edildi ve daha sonra analizleri yapıldı. Standardizasyonu sağlamak için *housekeeping* gen olarak *GAPDH* geni kullanıldı.

Tablo 3.9. Eş zamanlı PCR reaksiyon karışımının içerikleri

Bileşenler	Hacim (μl)
RT ² SYBR Green ROX FAST Mastermix	5
Forward Primer (10 μM)	0,3
Reverse Primer (10 μM)	0,3
Rnaz/Dnaz içermeyen su	3,9
cDNA (50 ng)	0,5
Total	10

3.2.2.6. Gen ekspresyonunun analizi

RHO genlerinin değerleri *GAPDH* geni ölçüm değerleri ile normalize edilmiştir. Normalizasyonda kullanılan *GAPDH* geni, belirli şartlar altında ekspresyon düzeyi değişmeyen, tüm dokularda ve hücrede bazal düzeyde eksprese edilen *housekeeping* genlerdir. qRT-PCR yönteminde C_p (*Crossing points*) değerleri elde edilmiştir. qRT-PCR sonuçlarındaki C_t ya da C_p değerleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü:

$2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-(\text{Örnek } \Delta C_t (\text{Gen}) - \text{Kontrol } \Delta C_t (\text{Referans}))}$ kullanılarak istatistiksel analiz yapılmıştır.

Bu değer bize ilgili genin dokudaki ekspresyon düzeyinin, kontrol baz alınarak kıyaslanmasını sağlayıp katsayı bilgisini vermektedir. Bu değer bize o genin referans gene göre hangi oranda ekspresyon düzeyinin değiştiğini gösterir yani göreceli ekspresyon bilgisini vermektedir (261).

3.2.3. Western blot

3.2.3.1. Doku homojenizasyonu

1. Pterjium operasyonu sırasında alınan sağlıklı konjonktival greft dokusu (kontrol) ve hasta grubu olarak da operasyonda çıkarılan primer pterjium dokusu kriyo tüplere konularak sıvı azot tankına alındı.
2. Doku lizatlarını hazırlamak için taze olarak HEPES Buffer [β -gliserofosfat (20 mM), sodyum pirofosfat (20 mM), benzamidin (10 mM), ditiyotritol (1 mM), HEPES (pH 7.5) (20 mM), Na_3VO_4 (0.2 mM), NaF (20 mM), EDTA (2 mM), leupeptin (20 $\mu\text{g/ml}$), aprotinin (10 $\mu\text{g/ml}$)] hazırlandı (262).
3. Dokular HEPES buffer ile homojenize edildi (*Tissue Lyser LT*, Qiagen, Almanya) ve analiz için -80°C saklandı.

3.2.3.2. Periferik kandan lökosit izolasyonu ve lizat hazırlama

1. EDTA'lı tüpe (CBC tüpü) alınan 2-3 ml hasta ve kontrol kanı 15 ml'lik falcon tüpe alındı.
2. Falcon tüpün üzerinde boşluk olacak şekilde Qiagen EL Buffer (Cat No:79217) eklendi. Tüp alt üst edilerek hafifçe karıştırıldı.
3. Örneklerle EL buffer eklendikten sonra $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüje alınarak 10 dk inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası $+4^\circ\text{C}$ 'de 1500 g'de 10 dk santrifüj yapıldı.
5. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine 2 ml EL buffer eklendi.

6. Tüpler santrifüj içerisinde 5 dk inkübe edildikten sonra +4°C'de 1500 g'de 10 dk santrifüj yapıldı.
7. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet üzerine soğuk *Phosphate Buffered Saline* (PBS) eklenerek hafifçe karıştırıldı ve +4°C'de 1000 g'de 2 dk santrifüj yapıldı.
8. Süpernatant uzaklaştırıldı.
9. Tüpler buz üzerine alındı.
10. Her tüpteki pellet 200 µl soğuk HEPES Buffer eklendi ve vortekste pelletin çözünmesi sağlandı.
11. Çözünen pelletler 1.5 ml'lik tüplere alınarak 30 dk buz üzerinde inkübe edildi.
12. Buz üzerinde tüplerin donmasına izin verilmeden her 10 dk'da bir vorteksleme işlemi yapıldı.
13. Son vortekslemeden sonra 10000 g'de 15 dk santrifüj yapıldı.
14. Santrifüj sonrası örnekler 200 µl'lik tüplere aliquot edildi ve analiz yapılana kadar -80°C'de saklandı.

3.2.3.3. Protein ölçümü

15. Doku ve kan lizatlarındaki protein konsantrasyonu *Coomassie Plus* (Bradford) yöntemi ile 565 nm'de mikropalak okuyucu ile ölçüldü (*Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek, Amerika*).
16. Protein ölçümü yapıldıktan sonra her kuyucukta eşit protein olacak şekilde hesaplamalar yapıldı (Örnek+Sample Buffer (5 µl) + HEPES buffer).

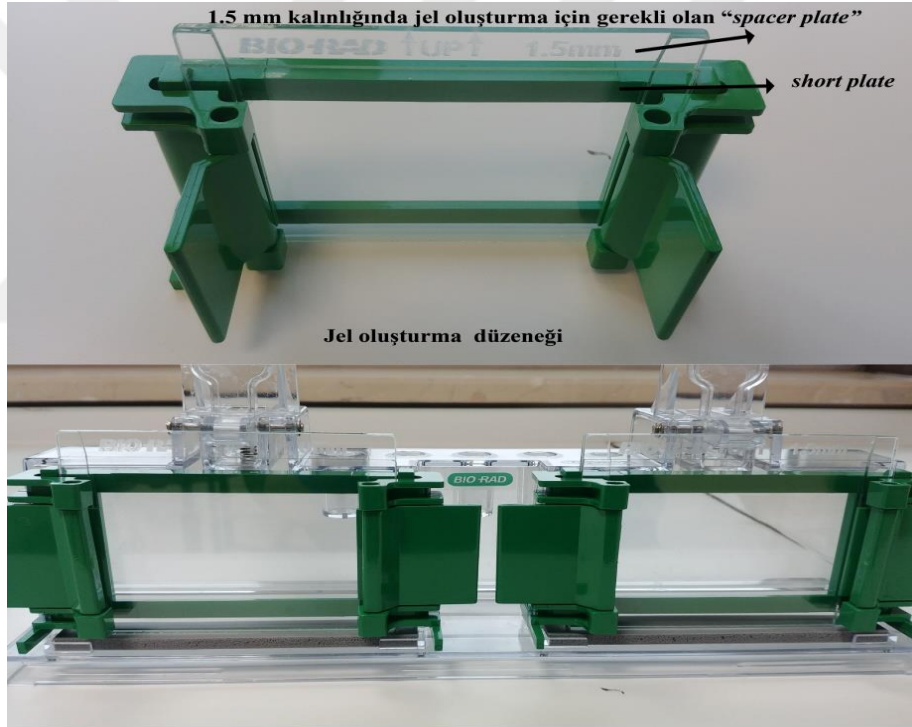
3.2.3.4. Jel hazırlanması, yükleme ve elektroforez

1. 1.5 mm kalınlığında 10 kuyucuklu jel hazırlandı (%12) (Tablo 3.10) (Resim 3.1)
2. Hazırlanan örnekler 95°C'de 5 dk kaynatıldı.
3. Kuyucuklara hazırlanan örnekler ve protein marker (10-245 kDa, ab116028, *Abcam, Cambridge, İngiltere*) yüklendi.
4. Elektroforez tankına yerleştirilen jele running buffer ile 30 dk 50 V ve 3 saat 80V'ta elektroforez işlemi uygulandı (Resim 3.2).

Tablo 3.10. %12'lik jel hazırlanması için gerekenler (1.5 mm kalınlığında)

%12'lik jel (1.5 mm)	Stack (Üst jel) (ml)	Resolving (Alt jel) (ml)
Acrylamide/Bis (%30)	0,67	4
Tris-HCl (0,5 M, pH:6.8)	1,25	-
Tris-HCl (1.5 M, pH:8.8)	-	2,6
SDS (%10)	0,05	0,1
Distile su	2,97	3,2
Amonyum persülfat (%10)	0,05	0,1
TEMED	0,005	0,01
Total Hacim	5,0	10,0

Not: Karışıma en son amonyum persülfat ve TEMED eklenmelidir.

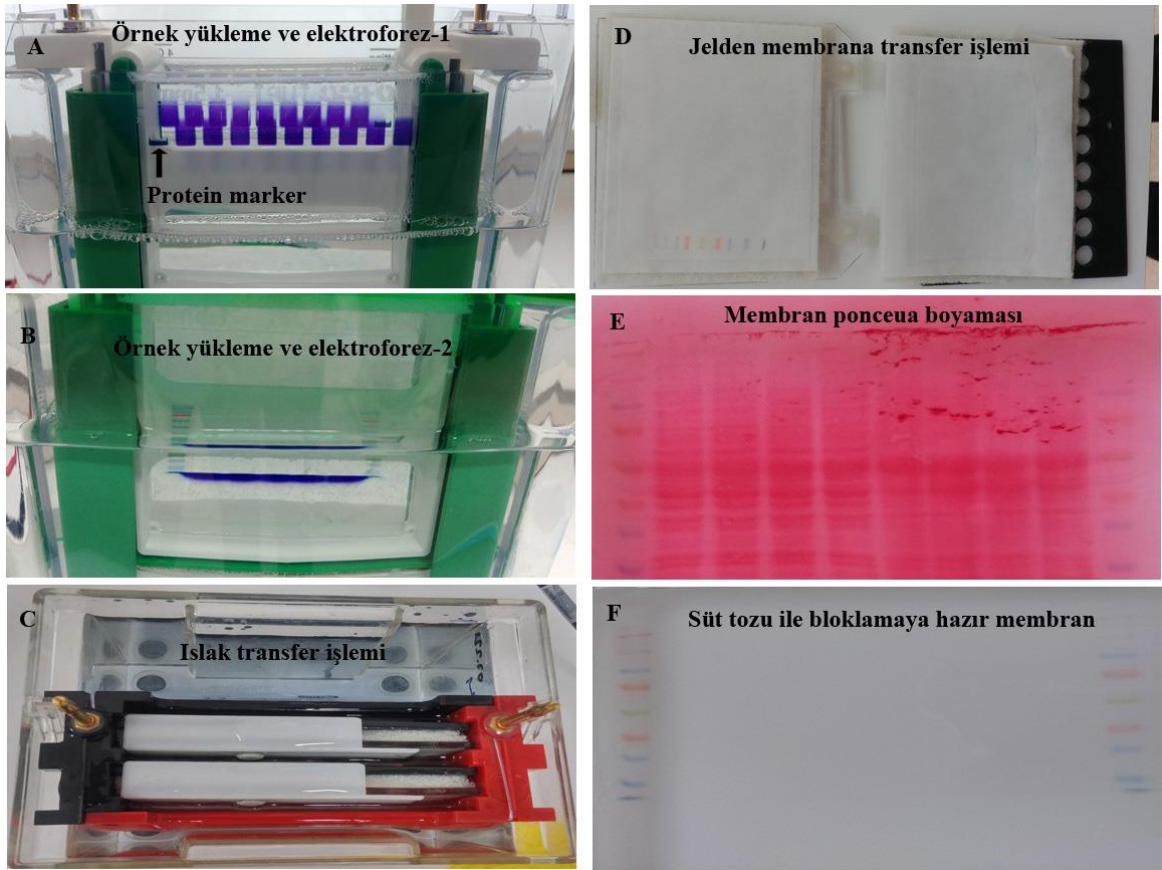


Resim 3.1. Jel oluşturma düzeneği

3.2.3.5. Membrana transfer ve bloklama

1. Jel boyutunda kesilen *polyvinylidene fluoride* (PVDF) membran, metanol ile 1 dk aktiveleştirildikten sonra Transfer Buffer ile yıkandı ve sonra siyah filtre-ıslak beyaz Watman kağıdı-jel-membran-ıslak beyaz Watman kağıdı-siyah filtre olacak şekilde kasete yerleştirildi (Resim 3.2).
2. Jelden membrana proteinlerin geçmesini istediğimizden jel negatif uca (katot), membran pozitif uca (anot) yerleştirildi.

3. Tanka transfer buffer eklendi ve +4°C'de 25 V'de gece boyu ıslak (*wet*) transfer işlemi yapıldı. Transfer işlemi Ponceau boyaması ile kontrol edildi (Resim 3.2).
4. Ponceau kırmızısından kurtulmak için membran 3 kez 10 dk Tris Buffer Saline %0.05 Tween (TBST) ile yıkandı.
5. Renk kaybolduktan sonra membran %5 *non fat dry milk* (NFDM)/TBST ile 1.5 saat oda sıcaklığında bloklama işleme uygulandı.
6. Bloklama işleminden sonra membran 3 kez 10 dk TBST ile yıkandı.



Resim 3.2. Western blot elektroforez ve transfer işlemleri

3.2.3.6. İlgili proteinin işaretlenmesi

1. TBST solüsyonu ile yıkama işlemlerinden sonra membranlar gece boyu +4°C'de primer antikor RhoA (sc-418, 1:500, *Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Amerika*), RhoB (ab155149, 1:500, *Abcam, Cambridge, İngiltere*), RhoC (ab64659, 1 µg/ml, *Abcam, Cambridge, İngiltere*), RhoD (ab80537, 1 µg/ml, *Abcam, Cambridge, İngiltere*), RhoE (ab171799, 1:1000, *Abcam, Cambridge, İngiltere*) ve yükleme kontrolü (*loading control*) olarak β-aktin (ab16039, 1:1000, *Abcam, Cambridge, İngiltere*) ile inkübe edildi.

2. Primer pterjium ve otogreft dokularındaki Rac2 ve Rac3 protein ekspresyonu analizi için membranlara primer antikor anti-Rac2 (sc-517424, *Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Amerika*) 1/300; anti-Rac3 (ab124943, *abcam, Cambridge, İngiltere*) 1/1000 oranında dilüe edilerek membran +4°C'de gece boyu inkübe edildi. Yükleme kontrolü olarak 1/1000 oranında beta-aktin kullanıldı (sc-47778, *Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Amerika*).
3. İnkübasyon sonrası membranlar primer antikorlara bağlı olarak sekonder antikor *anti-mouse* IgG-HRP (sc-516102, 1:1000, *Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Amerika*), sekonder antikor *anti-rabbit* IgG-HRP (ab6721, 1:3000, *Abcam, Cambridge, İngiltere*) ve sekonder antikor *anti-mouse* IgG-HRP (ab6728, 1:3000, *Abcam, Cambridge, İngiltere*) ile oda sıcaklığında 1.5 saat inkübe edildi.
4. Membranlar 3 kez 10 dk TBST ile yıkandı.

3.2.3.7. Görüntüleme

Bantlar, *Enhanced chemiluminescence* (ECL) prime (cat. no.34080, *Thermo Fischer, Amerika*) ile kemilüminesans olarak otomatik elektroforez jel analiz sistemi (*ChemiDoc XRS+ Imager, Bio-Rad, Hercules, CA, Amerika*) ve programı (*Image Lab, Bio-Rad, Hercules, CA, Amerika*) ile görüntülendi.

3.2.3.8. Analiz

ImageJ (1.52a) programı ile dansitometrik analiz yapılarak beta-aktin seviyeleri normalize edildi.

3.2.4. Western Blot için gerekli solüsyonlar

HEPES (2x, pH 7.5)

HEPES asit	0.12 g
NaCl	0.16 g
Na ₂ HPO ₄	0.0021 g

Hacim dH₂O ile 10 ml'ye ayarlandı.

Na₃VO₄ (0.2 M, pH 10.0, *activated*)

Na ₃ VO ₄	1.84 g
H ₂ O	50 ml

Not: Çözelti rengi sarıdan beyaz olana kadar kaynatılır ve pH 10'da stabilize olana kadar işlem tekrar edildi.

Sample Buffer

1 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.4 ml
SDS	0.8 g
Bromfenol mavisi	40 mg
dH ₂ O	3.1 ml
Gliserol	4 ml

Running Buffer (pH 8.3) 1x

Tris-Base	25 mM	3.03 g
Glisin	192 mM	14.4 g
SDS	% 0.1	1 g

Hacim dH₂O ile 1 L'ye ayarlandı.

Transfer Buffer (Towbin) (pH 8.3) 1x

Tris	25 mM	3.03 g
Glisin	195 mM	14.63 g
Metanol	200 ml (kullanmadan önce eklendi)	

Hacim dH₂O ile 1 L'ye ayarlandı.

Ponceau Boyası

Asetik asit	25 ml
Ponceau kırmızısı	0.5 g
dH ₂ O	500 ml

TBS (pH 7.4) 10x

Tris (25 mM)	30 g
NaCl (137 mM)	80 g
KCl (27 mM)	20 g

Hacim dH₂O ile 1 L'ye ayarlandı.

TBST (pH 7.4)

TBS (10x)	0.1 L
dH ₂ O	0.8 L
Tween 20 (%0.05)	0.5 ml

Hacim dH₂O ile 1 L'ye ayarlandı

Blocking Buffer (%5 NFDM)

<i>Non-Fat-DryMilk</i>	5 g
TBST	100 ml

3.3. İstatistiksel Analiz

Veriler ortalama \pm standart sapma (SD), ortalamanın standart hatası (SEM) veya yüzde olarak ifade edildi. Çalışmada istatistiksel analizler için GraphPad InStat (sürüm 3.05, *GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ABD*) programları kullanıldı. İki grup ortalamalarının karşılaştırılmasında eşleşmemiş *Student t*-testi, yüzdelerin karşılaştırılmasında ki-kare veya *Fisher exact* testi uygulandı. Genotip dağılımı ve allel sıklıkları gruplar arasında ki-kare veya *Fisher exact* testi kullanılarak karşılaştırıldı. Pterjium hasta genotip frekanslarında *RHOA* gen polimorfizminin (rs974495) rölatif risk oranı (*odds ratio*) 1.89'a dayanan bir güç hesaplaması kullanarak örneklem büyüklüğü tahmin edilmiştir (263). Polimorfizm çalışmalarında kontrol ve hasta grupları arasında %80 güç düzeyinde anlamlı bir fark saptamak için her bir grupta en az 162 kişi olması gerektiği *G*Power* (sürüm 3.1.9.4, Almanya) programı ile hesaplanmıştır ($\alpha = 0.05$). Bu çalışmada 30 SNP analizi gerçekleştirildi. *RHOB* geni rs35881336, *RHOD* geni rs75872861 ve *RND3 (RHOE)* geni rs75581868 analizlerinde SNP tespit edilememiştir. Gen ekspresyonu analizleri QIAGEN online web portalı olan GeneGlobe (<http://www.qiagen.com/geneglobe>) kullanılarak yapıldı. Gen ekspresyonları delta delta Ct yöntemi ile hesaplandı. QIAGEN GeneGlobe analiz sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılmasında *Student t*-testi kullanıldı. Western blot analizi sonuçları *ANOVA* ve sonrasında *post hoc* test olarak *Student-Newman-Keuls* testi kullanılarak analiz edildi. *Pearson* korelasyon testi kullanılarak korelasyon analizi yapıldı. İstatistik testlerinde P değeri iki yönlüydü ve 0.05'ten az olan P değerleri anlamlı olarak kabul edildi. Polimorfizm çalışmalarında çoklu testler için *Bonferroni* düzeltmesi kullanıldı ve yukarıda belirtilen 3 SNP tespit edilemediği için istatistiksel olarak $P < 0.00185$ ($0.05/27$) değeri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Polimorfizm Çalışmalarının Sonuçları

Projede pterjium tanısı almış olan 383 hastadan ve kontrol grubu olarak kullanılan herhangi bir hastalığı olmayan 331 sağlıklı gönüllüden venöz kan örneği alınmış, lökositler izole edilmiş ve DNA eldesi gerçekleştirilmiştir. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir ($P>0.05$). Analizler yapılmış ve sonuçlar aşağıdaki tablolarda (Tablo 4.2 ve 4.3) sunulmuştur. Bu çalışmada hasta ve kontrol grupları için *RHOA*, *RHOB*, *RHOC*, *RHOD* ve *RND3* (*RHOE*) genlerine ait polimorfizmlerin genotip ve allel dağılımları da belirlenmiştir.

Tablo 4.1. Polimorfizm çalışmalarında kontrol ve pterjium (hasta) gruplarının demografik özellikleri

	Kontrol (n=331)	Pterjium (n=383)	P
Yaş (yıl)	54.7±8.6	55.3±7.9	0.3318
Cinsiyet			
Erkek (n, %)	161 (48.6)	189 (49.3)	0.8506
Kadın (n, %)	170 (51.4)	194 (50.7)	

Hasta ve kontrol grupları arasındaki genotiplerin ve allellerin dağılımları Tablo 4.2 ve 4.3’te gösterilmiştir. *RHOA* geni rs2177268, rs3811699, rs3448, rs17595772, rs6784820, rs2878298 ve rs974495 polimorfizmleri için genotip ve allel frekansları bakımından kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($P>0.00185$) (Tablo 4.2).

RHOB gen rs2602160, rs62121967, rs62121968, rs11541350 SNP’leri hem genotip hem de allel frekansları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.0001$). *RHOB* gen rs35881336 SNP analizinde, SNP tespit edilemediği için istatistiksel olarak hesaplanamamıştır bundan dolayı *Bonferroni* düzeltmesi kullanırken de dahil edilmemiştir (Tablo 4.2).

RHOC gen rs2230329, rs2306937, rs1804292, rs11102522 SNP’leri hem genotip hem de allel frekansları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.0001$).

RHOC gen rs11538960 SNP'i de hem genotip hem de allel frekansları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P=0.0002$). *RHOC* gen rs2999156 polimorfizmi için genotip ve allel frekansları bakımından kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($P>0.00185$) (Tablo 4.3).

RHOD gen rs11227675, rs61891303 SNP'leri hem genotip hem de allel frekansları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.0001$). *RHOD* geni rs7112925 SNP'i de genotip frekansı ($P<0.0001$) ve allel frekansı ($P=0.0016$) bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *RHOD* gen rs3923203 ve rs34602279 polimorfizmleri için genotip ve allel frekansları bakımından kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($P>0.00185$). *RHOD* gen rs75872861 SNP analizinde SNP tespit edilemediği için istatistiksel olarak hesaplanamamıştır bundan dolayı *Bonferroni* düzeltmesi kullanırken de dahil edilmemiştir (Tablo 4.3).

RND3 (RHOE) gen rs13418763, rs1441982 ve rs76447184 SNP'leri hem genotip hem de allel frekansları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.0001$). *RND3 (RHOE)* gen rs1528428 ve rs115015150 polimorfizmleri için genotip ve allel frekansları bakımından kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($P>0.00185$). *RND3 (RHOE)* gen rs75581868 SNP analizinde SNP tespit edilemediği için istatistiksel olarak hesaplanamamıştır bundan dolayı *Bonferroni* düzeltmesi kullanırken de dahil edilmemiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubunda *RHO* gen polimorfizmlerinin genotip ve allel dağılımı

Gen SNP	Genotip/ Allel	Kontrol	n*	Pterjium	n*	P
<i>RHOA</i> rs2177268	TT/TA/AA T/A	165/118/28 448/174	311	210/139/30 559/199	379	0.7834 0.5122
<i>RHOA</i> rs3811699	AA/AG/GG A/G	139/128/35 406/198	302	165/160/53 490/266	378	0.6129 0.3835
<i>RHOA</i> rs3448	CC/CT/TT C/T	167/116/27 450/170	310	210/138/30 558/198	378	0.8828 0.6518
<i>RHOA</i> rs17595772	GG/GA/AA G/A	116/144/65 376/274	325	150/162/71 462/304	383	0.6300 0.3751
<i>RHOA</i> rs6784820	AA/AG/GG A/G	55/205/51 315/307	311	34/284/61 352/406	379	0.0024 0.1333
<i>RHOA</i> rs2878298	TT/TC/CC T/C	121/154/36 396/226	311	153/185/38 491/261	376	0.7864 0.5681
<i>RHOA</i> rs974495	GG/GA/AA G/A	161/119/24 441/167	304	209/139/31 557/201	379	0.8034 0.7399
<i>RHOB</i> rs2602160	AA/AG/GG A/G	115/123/72 353/267	310	199/142/25 540/192	366	<0.0001 <0.0001
<i>RHOB</i> rs62121967	GG/GT/TT G/T	311/0/13 622/26	324	379/0/0 758/0	379	<0.0001 <0.0001
<i>RHOB</i> rs62121968	CC/CT/TT C/T	96/205/0 397/205	301	377/0/0 754/0	377	<0.0001 <0.0001
<i>RHOB</i> rs11541350 (Val38Phe)	CC/CA/AA C/A	307/12/0 626/12	319	377/0/0 754/0	377	<0.0001 <0.0001
<i>RHOB</i> rs35881336	AA/AG/GG A/G	305/0/0 610/0	305	330/0/0 660/0	330	(SNP yok)
<i>RHOC</i> rs2999156	GG/GC/CC G/C	95/146/62 336/270	303	101/203/74 405/351	378	0.3135 0.5252
<i>RHOC</i> rs2230329	GG/GA/AA G/A	128/183/0 439/183	311	189/95/0 473/95	284	<0.0001 <0.0001
<i>RHOC</i> rs2306937	GG/GA/AA G/A	135/128/49 398/226	312	238/130/10 606/150	378	<0.0001 <0.0001

Tablo 4.3. Hasta ve kontrol grubunda *RHO* gen polimorfizmlerinin genotip ve allel dağılımı (devamı)

Gen	Genotip/ Allel	Kontrol	n*	Pterjium	n*	P
SNP						
<i>RHOC</i>	GG/GT/TT	125/185/12	322	0/188/0	188	<0.0001
rs1804292	G/T	435/209		188/188		<0.0001
<i>RHOC</i>	TT/TC/CC	165/109/39	313	255/105/19	379	<0.0001
rs11102522	T/C	439/187		615/143		<0.0001
<i>RHOC</i>	GG/GA/AA	318/11/0	329	379/0/0	379	0.0002
rs11538960	G/A	647/11		758/0		0.0002
<i>RHOD</i>	GG/GC/CC	96/158/45	299	127/191/59	377	0.8527
rs3923203	G/C	350/248		445/382		0.0861
<i>RHOD</i>	AA/AG/GG	185/110/4	299	378/0/0	378	<0.0001
rs11227675	A/G	480/118		756/0		<0.0001
<i>RHOD</i>	GG/G/--	270/0/0	270	370/2/0	372	0.5119
rs34602279 (385delG)	G/-	540/0		742/2		0.5122
<i>RHOD</i>	CC/CT/TT	215/92/1	308	371/6/0	377	<0.0001
rs61891303	C/T	522/94		748/6		<0.0001
<i>RHOD</i>	TT/TC/CC	287/0/0	287	377/0/0	377	(SNP yok)
rs75872861	T/C	574/0		754/0		
<i>RHOD</i>	TT/TC/CC	43/233/34	310	108/237/32	377	<0.0001
rs7112925	T/C	319/301		453/301		0.0016
<i>RND3 (RHOE)</i>	AA/AC/CC	153/130/29	312	182/153/44	379	0.6143
rs1528428	A/C	436/188		517/241		0.5434
<i>RND3 (RHOE)</i>	CC/CT/TT	303/0/0	303	286/90/1	377	<0.0001
rs13418763	C/T	606/0		662/92		<0.0001
<i>RND3 (RHOE)</i>	GG/GT/TT	272/0/0	272	378/0/0	378	(SNP yok)
rs75581868	G/T	544/0		756/0		
<i>RND3 (RHOE)</i>	CC/CT/TT	134/132/37	303	242/118/18	378	<0.0001
rs1441982	C/T	400/206		602/154		<0.0001
<i>RND3 (RHOE)</i>	CC/CT/TT	208/96/9	313	266/107/7	380	0.4773
rs115015150	C/T	512/114		639/121		0.2898
<i>RND3 (RHOE)</i>	GG/GA/AA	318/13/0	331	383/0/0	383	<0.0001
rs76447184	G/A	649/13		766/0		<0.0001

BioMark HD dinamik array sisteminde kayıp verilerden dolayı n sayısı farklılık göstermiş olup bazı SNP'lerde kontrol grubunda toplam sağlıklı gönüllü olan 331 sayısına, hasta grubunda da 383 sayısına ulaşamamıştır. SNP, *single-nucleotide polymorphism*.

Bazı polimorfizmlerde allel ve genotip dağılımları primer ya da cihazdan kaynaklanan nedenlerden dolayı tüm hasta ve kontrollerde tespit edilemedi. Her polimorfizm için sonuç alınan hasta ve kontrollerin n sayıları tablolarda belirtilmiştir.

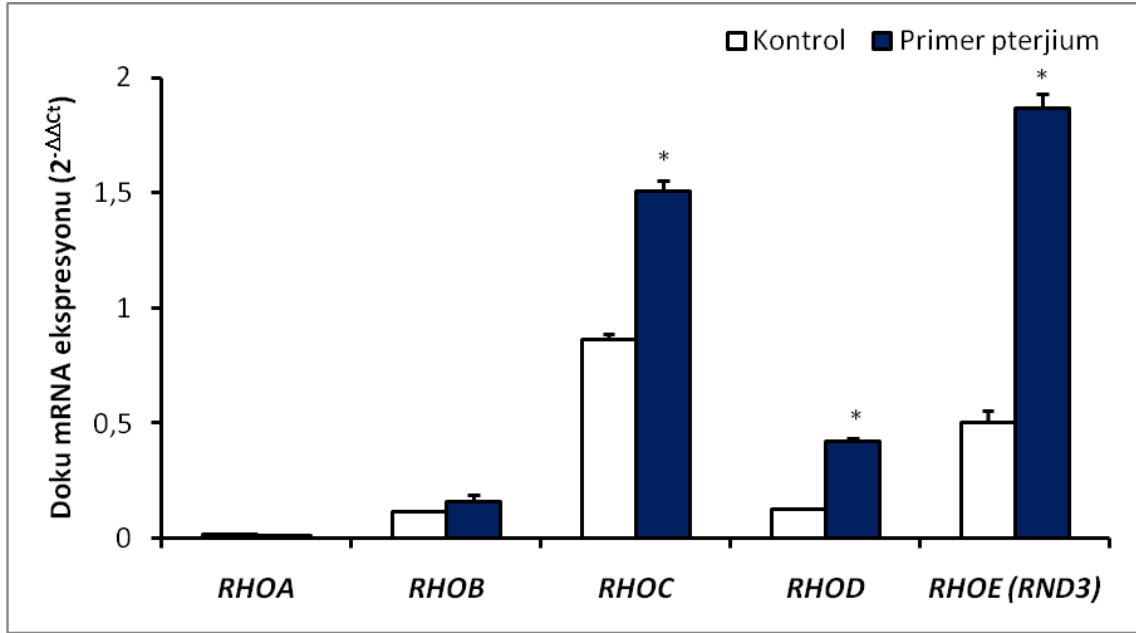
4.2. Gen ve Protein Ekspresyonu Çalışmaları

Tablo 4.4. Gen ve protein ekspresyonu çalışmalarında kullanılan primer pterjium hastalarının demografik ve klinik özellikleri

	Primer pterjium (n=68)
Yaş (yıl)	51.3±9.2
Cinsiyet	
Erkek (n, %)	32 (47.1)
Kadın (n, %)	36 (52.9)
Görme	
Sağ	0.7±0.2
Sol	0.6±0.2
Oküler tansiyon	
Sağ	17.1±2.8
Sol	16.3±3.1
Refraksiyon	
Sağ	
Sferik	0.5±2.1
Silindirik	-0.4±2.1
Sol	
Sferik	1.6±2.1
Silindirik	-1.4±2.2
Keratometri	
Sağ	
KAV	42.7±2.1
K1	43.9±2.0
K2	43.6±1.9
Sol	
KAV	42.1±2.9
K1	41.7±2.8
K2	43.1±2.6
Ön segment	
Sağ	0.9±0.3
Sol	0.8±0.3
Fundus	
Sağ	0.1±0.3
Sol	0.1±0.4

4.2.1. *RHO* gen ekspresyonu sonuçları

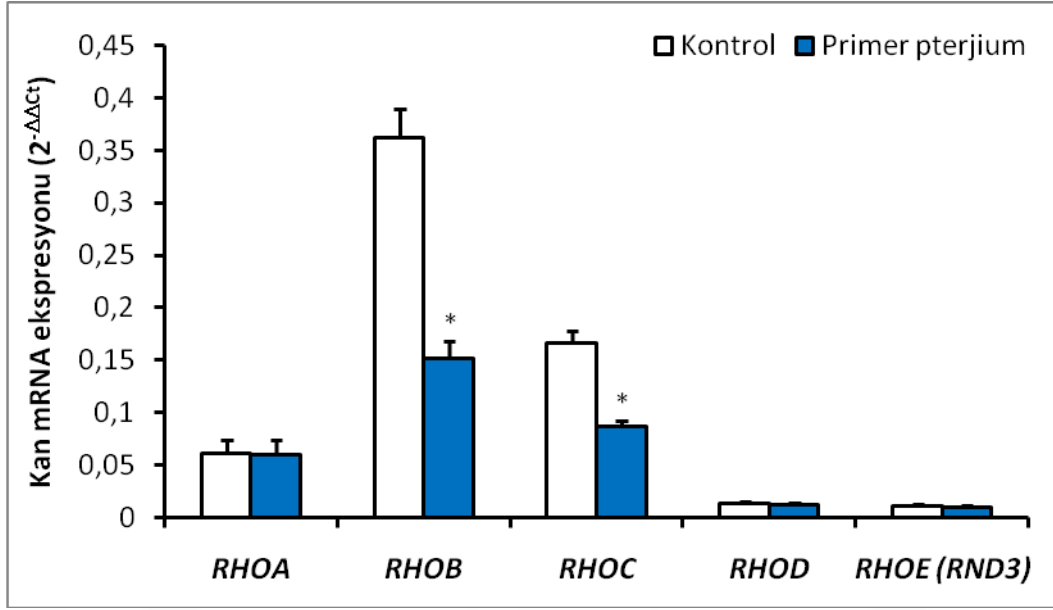
Gen ekspresyonu deneylerinde primer pterjium dokularından elde edilen sonuçlar Şekil 4.1’de sunulmuştur. Primer pterjiumda *RHOC*, *RHOD* ve *RHOE* doku gen ekspresyonları anlamlı olarak artarken *RHOA* ve *RHOB* de değişiklik saptanmadı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Doku gen ekspresyonu sonuçları

Kontrol grubu olarak pterjium operasyonu sırasında alınan sağlıklı konjonktival greft dokusu (n=30) ve hasta grubu olarak da operasyonda çıkarılan primer pterjium (n=30) dokuları alınmış ve mRNA düzeyleri çalışılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. P değerleri sırasıyla $P=0.0047$ (*RHOC*), $P=0.0003$ (*RHOD*) ve $P=0.0164$ (*RHOE*) olarak bulunmuştur.

Kandan izole edilen lökositlerde yapılan gen ekspresyonu çalışmasının sonuçları Şekil 4.2’de sunulmuştur. Lökositlerdeki analizde ise primer pterjiumda *RHOB* ve *RHOC* gen ekspresyonunda anlamlı azalış saptanmıştır.



Şekil 4.2. Kandan izole edilen lökositlerdeki gen ekspresyonları sonuçları

Kontrol grubu (rutin göz muayenesinden geçmiş sağlıklı bireyler, n=30) ve primer (n=30) pterjiumu olan hastaların periferik kanlarından izole edilen lökositlerde mRNA düzeyleri çalışılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. Şekildeki P değerleri sırasıyla P=0.0113 (*RHOB*) ve P=0.0236 (*RHOC*) olarak saptanmıştır.

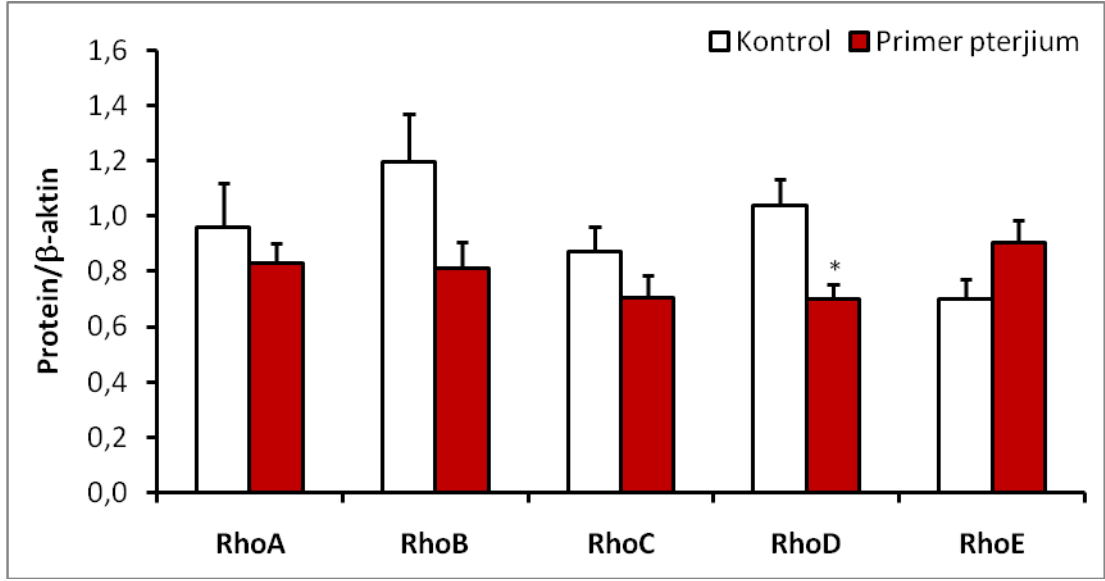
4.2.2. Western blot yöntemiyle yapılan Rho protein ekspresyonu sonuçları

Western blot yöntemiyle dokudan elde edilen protein ekspresyonu sonuçları Şekil 4.3 ve 4.4'te sunulmuştur. Dokularındaki protein ekspresyonlarının Western blot analizleri sonuçları incelendiğinde sadece primer pterjiumda RhoD protein ekspresyonunda bir azalma olduğu belirlendi.

	RhoA	RhoB	RhoC	RhoD	RhoE
Kontrol (Otogreft)					
β-aktin					
Primer pterjium					
β-aktin					

Şekil 4.3. Doku Western blot analizlerinden örnek bantlar

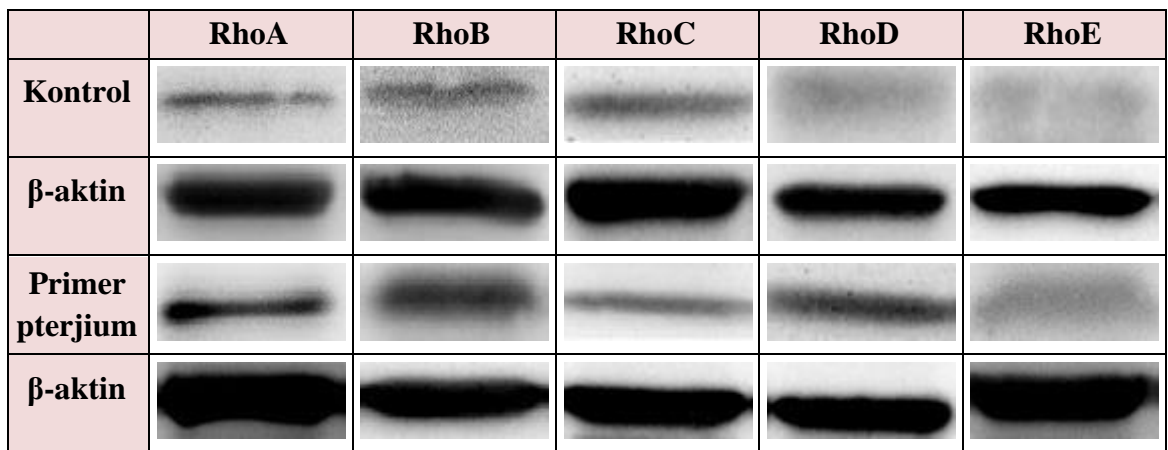
Kontrol (sağlıklı konjonktival greft dokusu) ve primer pterjium dokularındaki RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE ve β -aktin protein ekspresyonlarının Western blot analizlerinden örnek bantlar.



Şekil 4.4. Doku Western blot analizleri sonuçları

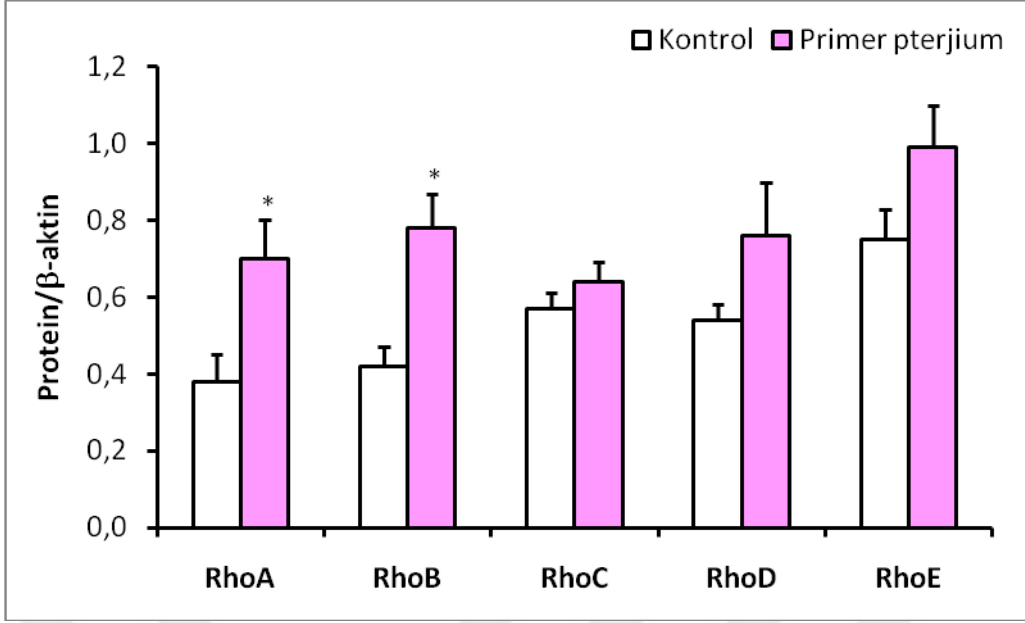
Kontrol (sağlıklı konjonktival greft dokusu, n=30) ve primer pterjium (n=30) hasta dokularındaki RhoA, RhoB, RhoC, RhoD ve RhoE protein ekspresyonlarının Western blot analizleri sonuçları. Sonuçlar ortalama ± SEM olarak verilmiştir. *P=0.0046 (RhoD) olarak saptanmıştır.

Pterjiumlu hastaların kanından izole edilen lökositlerde Western blot yöntemiyle elde edilen protein ekspresyonu sonuçları Şekil 4.5 ve 4.6’da sunulmuştur. Lökositlerdeki Western blot sonuçları incelendiğinde; primer pterjiumda RhoA ve RhoB protein ekspresyonlarında anlamlı artış olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.5. Lökosit Western blot analizlerinden örnek bantlar

Kontrol ve primer pterjium hastalarının kanından izole edilen lökositlerdeki RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE ve β-aktin protein ekspresyonlarının Western blot analizlerinden örnek bantlar



Şekil 4.6. Kandan izole edilen lökositlerdeki Western blot sonuçları

Kontrol grubu (rutin göz muayenesinden geçmiş sağlıklı bireyler, n=39) ve primer peritonitis (n=42) hastalarının periferik kanlarından izole edilen lökositlerde protein ekspresyonları çalışılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. Şekildeki P değerleri sırasıyla *P=0.0180 (RhoA), *P=0.0033 (RhoB), P=0.3047 (RhoC), P=0.0701 (RhoD) ve P=0.0808 (RhoE) olarak saptanmıştır.

4.2.3. Rho proteinleri korelasyon analizleri

Protein ve gen ekspresyonu sonucunda elde edilen verilerin korelasyon analizleri Tablo 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8'de sunulmuştur.

Tablo 4.5. Primer pterjium lökosit protein ekspresyonu analizi ile primer pterjium lökosit gen ekspresyonu analizinin korelasyon analizi

Protein ekspresyonu	Gen ekspresyonu				
	<i>RHOA</i>	<i>RHOB</i>	<i>RHOC</i>	<i>RHOD</i>	<i>RND3</i>
RHOA	$r^2=0.00030$ P=0.9275	$r^2=0.03855$ P=0.2984	$r^2=7.86 \times 10^{-5}$ P=0.9629	$r^2=0.09526$ P=0.0970	$r^2=0.07429$ P=0.1451
RHOB	$r^2=0.00167$ P=0.8302	$r^2=0.00044$ P=0.9115	$r^2=0.002005$ P=0.8142	$r^2=7.40 \times 10^{-5}$ P=0.9640	$r^2=9.99 \times 10^{-5}$ P=0.9582
RHOC	$r^2=0.0107$ P=0.5864	$r^2=0.05128$ P=0.2289	$r^2=0.008767$ P=0.6226	$r^2=0.008836$ P=0.6213	$r^2=0.01333$ P=0.5435
RHOD	$r^2=0.02308$ P=0.4997	$r^2=0.1167$ P=0.1197	$r^2=0.1613$ P=0.0639	$r^2=0.009765$ P=0.6617	$r^2=0.003817$ P=0.7847
RND3	$r^2=0.00516$ P=0.7060	$r^2=0.00289$ P=0.7779	$r^2=0.02714$ P=0.3843	$r^2=0.01262$ P=0.5545	$r^2=0.00003$ P=0.9752

Primer pterjium lökosit protein ekspresyonları ile primer pterjium lökosit gen ekspresyonları arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı.

Tablo 4.6. Primer pterjium doku protein ekspresyonu analizi ile primer pterjium doku gen ekspresyonu analizinin korelasyon analizi

Protein ekspresyonu	Gen ekspresyonu				
	<i>RHOA</i>	<i>RHOB</i>	<i>RHOC</i>	<i>RHOD</i>	<i>RND3</i>
RHOA	$r^2=0.0366$ P=0.3114	$r^2=0.04408$ P=0.2655	$r^2=0.003851$ P=0.7446	$r^2=8.37 \times 10^{-5}$ P=0.9617	$r^2=0.09418$ P=0.0990
RHOB	$r=0.5099$ $r^2=0.2600$ P=0.0109	$r^2=0.0016$ P=0.8535	$r^2=0.002473$ P=0.8175	$r^2=0.09873$ P=0.1348	$r^2=0.01453$ P=0.5747
RHOC	$r^2=0.00428$ P=0.7725	$r=-0.4407$ $r^2=0.1943$ P=0.0401	$r^2=0.003669$ P=0.7889	$r^2=0.03795$ P=0.3850	$r^2=0.00761$ P=0.6995
RHOD	$r^2=0.04412$ P=0.3245	$r^2=0.01773$ P=0.5351	$r^2=0.04351$ P=0.3280	$r^2=0.00786$ P=0.6804	$r^2=0.1274$ P=0.0869
RND3	$r^2=0.00369$ P=0.7586	$r^2=0.00163$ P=0.8383	$r^2=0.003697$ P=0.7586	$r^2=0.00569$ P=0.7027	$r^2=0.00035$ P=0.9247

Primer pterjium hastalarında pterjium dokusu *RHOA* gen ekspresyonu ile RhoB protein ekspresyonu arasında pozitif korelasyon bulundu (P=0.0109). Bu grupta *RHOB* gen ekspresyonu ile RhoC protein ekspresyonu arasında negatif korelasyon saptandı (P=0.0401).

Tablo 4.7. Primer pterjium doku protein ekspresyonu analizi ile primer pterjium lökosit protein ekspresyonu analizinin korelasyon analizi

Lökosit protein ekspresyonu	Doku protein ekspresyonu				
	RHOA	RHOB	RHOC	RHOD	RND3
RHOA	$r^2=0.06686$ P=0.1677	$r=0.6154$ $r^2=0.3787$ P=0.0014	$r=0.4599$ $r^2=0.2115$ P=0.0313	$r^2=0.00855$ P=0.6674	$r^2=0.07181$ P=0.1680
RHOB	$r^2=0.02173$ P=0.4369	$r=0.4417$ $r^2=0.1951$ P=0.0307	$r^2=0.0133$ P=0.6093	$r^2=0.03704$ P=0.3676	$r^2=0.04895$ P=0.2578
RHOC	$r^2=0.00984$ P=0.6020	$r^2=0.02963$ P=0.4213	$r=-0.4944$ $r^2=0.2444$ P=0.0193	$r=-0.4703$ $r^2=0.2212$ P=0.0204	$r^2=0.1224$ P=0.0680
RHOD	$r^2=0.02303$ P=0.5002	$r^2=0.1288$ P=0.1010	$r^2=0.0059$ P=0.7346	$r^2=0.001062$ P=0.8855	$r=-0.5383$ $r^2=0.2897$ P=0.0098
RND3	$r^2=0.00311$ P=0.7697	$r^2=0.02387$ P=0.4711	$r^2=0.0122$ P=0.6242	$r^2=1.51 \times 10^{-6}$ P=0.9955	$r^2=0.04357$ P=0.2865

Primer pterjium doku RhoC ve RhoD protein ekspresyonları ile lökosit RhoC protein ekspresyonu arasında, doku RhoE protein ekspresyonu ile lökosit RhoD protein ekspresyonu arasında negatif korelasyon saptandı (sırasıyla P=0.0193, P=0.0204 ve P=0.0098). Primer pterjium dokusu RhoB protein ekspresyonu ile lökosit RhoA ve RhoB protein ekspresyonları arasında, doku RhoC protein ekspresyonu ile lökosit RhoA protein ekspresyonu arasında ise pozitif korelasyon vardı (sırasıyla P=0.0014, P=0.0307, P=0.0313).

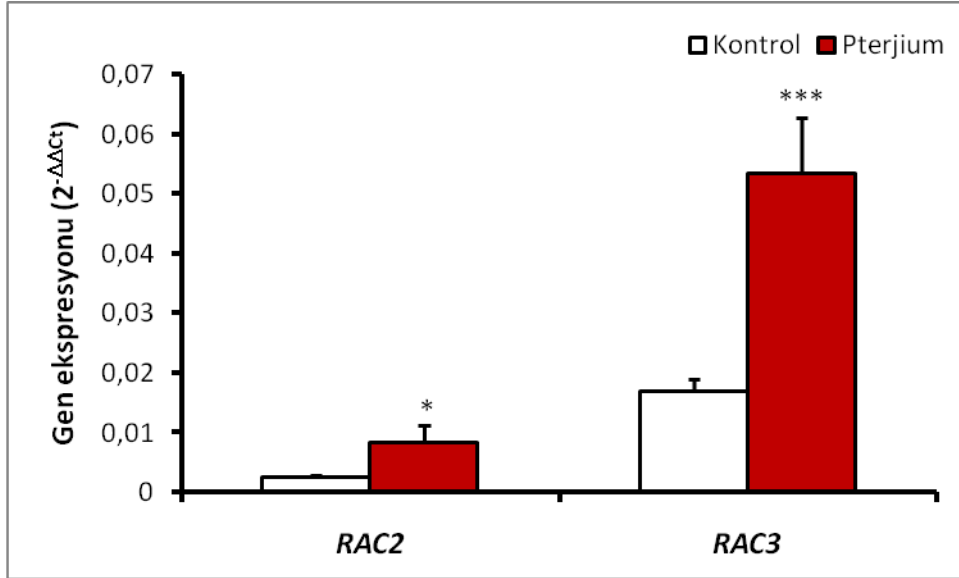
Tablo 4.8. Primer pterjium doku gen ekspresyonu analizi ile primer pterjium lökosit gen ekspresyonu analizinin korelasyon analizi

Lökosit gen ekspresyonu	Doku gen ekspresyonu				
	<i>RHOA</i>	<i>RHOB</i>	<i>RHOC</i>	<i>RHOD</i>	<i>RND3</i>
<i>RHOA</i>	$r^2=0.03282$ P=0.3380	$r^2=0.02357$ P=0.4180	$r^2=0.02513$ P=0.4028	$r^2=0.01383$ P=0.5360	$r^2=0.002571$ P=0.7902
<i>RHOB</i>	$r^2=0.07061$ P=0.1558	$r^2=0.0592$ P=0.1951	$r^2=0.08537$ P=0.1172	$r^2=0.05287$ P=0.2216	$r^2=0.000391$ P=0.9174
<i>RHOC</i>	$r^2=0.1020$ P=0.0854	$r^2=0.08567$ P=0.1165	$r^2=0.0514$ P=0.2283	$r^2=0.004347$ P=0.7292	$r^2=0.4270$ $r^2=0.1824$ P=0.0186
<i>RHOD</i>	$r^2=0.02941$ P=0.3648	$r^2=0.02757$ P=0.3805	$r^2=0.03416$ P=0.3282	$r^2=0.02513$ P=0.4028	$r^2=0.000709$ P=0.8889
<i>RND3</i>	$r^2=0.02199$ P=0.4341	$r^2=0.02083$ P=0.4467	$r^2=0.009293$ P=0.6123	$r^2=0.008885$ P=0.6203	$r^2=0.00006$ P=0.9665

Primer pterjium doku *RHOE* (*RND3*) gen ekspresyonları ile lökosit *RHOC* gen ekspresyonu arasında pozitif korelasyon saptandı (P=0.0186).

4.2.4. RAC gen ekspresyonu sonuçları

Şekil 4.7’de 30 hastanın dokusundan elde edilen gen ekspresyonu analizi sonuçları gösterilmektedir. Şekilde belirtildiği gibi RAC2 ve RAC3 gen ekspresyonu pterjium dokusunda belirgin olarak artış göstermiştir.



Şekil 4.7. RAC2 ve RAC3 gen ekspresyonu analizi.

Kontrol olarak kullanılan konjonktival greft dokusu ve primer pterjium dokusunda RAC2 (*P=0.0464) ve RAC3 (**P=0.0002) gen ekspresyonu (n=30). Veriler ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur.

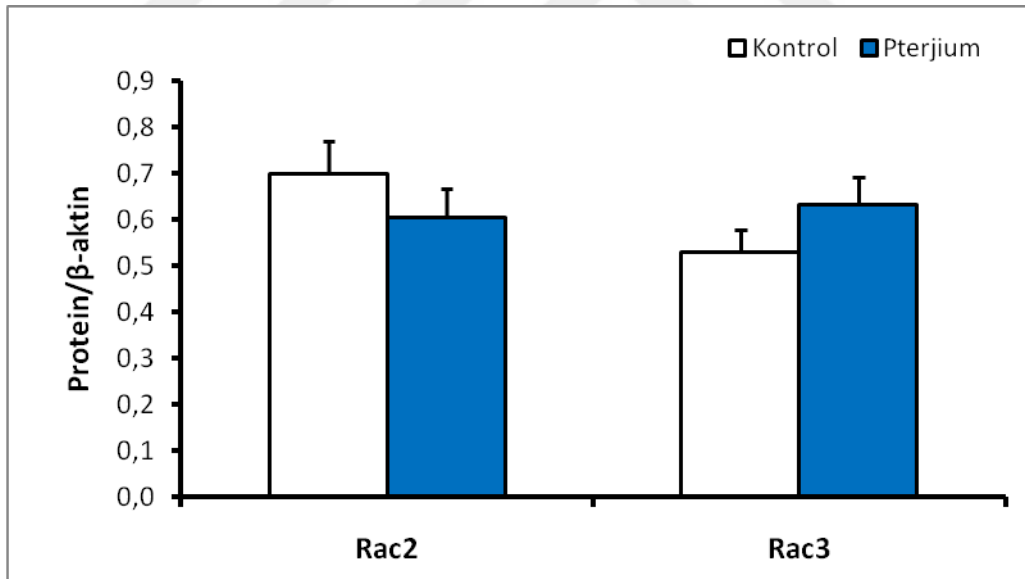
4.2.5. Rac proteinlerinin Western blot analizi sonuçları

Kontrol ve primer pterjium dokularındaki Rac2 ve Rac3 ile β -aktin protein ekspresyonlarının Western blot analizlerinden örnek bantlar Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Rac2 ve Rac3 protein ekspresyonları pterjium dokusunda anlamlı olarak değişmediği saptanmıştır (P>0.05, Şekil 4.9).

	Rac2	Rac3
Kontrol (Otogreft)		
β -aktin		
Pterjium		
β -aktin		

Şekil 4.8. Rac proteinlerin Western blot analizlerinden örnek bantlar.

Kontrol (sağlıklı konjonktival greft dokusu) ve hasta (primer pterjium) dokularındaki Rac2 ve Rac3 ile β -aktin protein ekspresyonlarının Western blot analizlerinden örnek bantlar.



Şekil 4.9. Rac proteinlerinin Western blot analizi

Kontrol olarak kullanılan konjonktival greft dokusu ve primer pterjium dokusunda Rac2 (n=36, P=0.3304) ve Rac3 (n=38, P=0.3094) protein ekspresyonları. Veriler ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur.

4.2.6. Rac proteinleri korelasyon analizleri

Tablo 4.9. Rac2 ve Rac3 Primer pterjium doku protein ekspresyonu analizi ile gen ekspresyonu analizinin korelasyon analizi

Protein ekspresyonu	Gen ekspresyonu	
	<i>RAC2</i>	<i>RAC3</i>
Rac2	$r^2=0.000071$ P=0.9668	$r^2=0.03916$ P=0.3225
Rac3	$r^2=0.001713$ P=0.8344	$r^2=0.01092$ P=0.5966

Primer pterjium doku Rac2 ve Rac3 protein ekspresyonu analizinin korelasyon analizinde anlamlılık saptanmamıştır ($r^2=0.01203$, P=0.5306).

Primer pterjium doku *RAC2* ve *RAC3* gen ekspresyonunun korelasyon analizinde pozitif korelasyon saptanmıştır ($r=0.6414$, $r^2=0.4114$, P=0.0002).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma ile ilk kez pterjium doku örneklerinde ve izole edilen lökositlerinde *RHOA*, *RHOB*, *RHOC*, *RHOD* ve *RND3 (RHOE)* gen ve protein ekspresyon düzeyleri araştırılmış ve sonuçlar arasında korelasyon analizi yapılmıştır. Gen ekspresyon sonuçları genellikle protein ekspresyon sonuçlarını destekler nitelikte bulunmamıştır. Bu sonuçların doğrulanması için daha başka çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

ROCK; aktin hücre iskeleti organizasyonu, hücre adhezif etkileşimleri ve kontraktiletiyi ve ESM komponent sentezini regüle eder (264). Rho/ROCK sinyalinin; hücre proliferasyonu, epitelyal farklılaşma, hücre migrasyonunun modülasyonu ve hücre adezyonu dahil olmak üzere tüm kornea tabakalarında birçok fonksiyonu düzenlediği gösterilmiştir (265). Limbal-korneal epitel transisyonu, ROCK1 ekspresyonunun artışı ile ilişkilendirilmiştir (204). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda ROCK sinyallerinin kornea yara iyileşmesi mekanizmalarında rol oynadığı ve aktivasyonunun arttığı gösterilmiştir (204, 205).

VEGF, anjiyogeneze katkıda bulunan bir büyüme faktörüdür. VEGF'nin pterjium dokusunda aşırı eksprese edildiği, pterjium anjiyogenezinde ve fibrovasküler progresyonunda rolü olduğu bildirilmiştir (39, 40, 41, 43, 139). VEGF ile indüklenen permeabilite artışı, hücre migrasyonu ve anjiyogenezin Rho proteinleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir. RhoA, VEGF tarafından hızlı bir şekilde aktive edilip endotelial sitoplazma zarına alınmaktadır (44, 45). Ayrıca ROS'un direkt olarak Rho/Rho-kinaz sinyal yolağı üzerinden etki ettiği gösterilmiştir (29). Rho/ROCK yolağının hücre proliferasyonu, migrasyonu, anjiyogenez ve oksidatif stres mekanizmalarındaki etkilerine dayanarak yapılan bu araştırma; *RHOA*, *RHOB*, *RHOC*, *RHOD* ve *RHOE* gen polimorfizmleri, *RAC2* ve *RAC3* dahil olmak üzere gen ve protein ekspresyonları ile pterjium gelişimi arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk çalışmadır.

Araştırmacılar son zamanlarda pterjium ile ilişkili genleri tanımlamak için SNP analizleri yapmaktadır. Pterjium oluşumu veya nüksü ile ilişkili olabilecek genlerin tespiti için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. SNP'ler, pterjium riski için yararlı markerlar olabilir ve pterjiuma yatkın olan hastaları önceden tanıma imkanı sağlayabilir. Literatürde pterjium ile yapılan polimorfizm çalışmaları mevcuttur.

Pterjium patojenizinden en çok sorumlu tutulan UV radyasyonu, ışığa duyarlı endojen bileşikleri aktive ederek ROS üretimine ve oksidatif strese neden olur. UV kaynaklı oksidatif stres; ECM'nin bozulmasına, kollajen ve elastinin sentezinde hasara neden olmaktadır. Hücrelerin antioksidan mekanizmalarından olan Glutasyon S-Transferaz enziminin GSTT1 *null* polimorfizmi ile pterjium prevalansı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (266). GSTM1 *null* genotipinin ise pterjiumun erken başlangıcıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (31, 267).

DNA tamir genleri polimorfizmlerinin pterjium oluşumuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. DNA tamir proteinlerinden XRCC-1 (rs25487)'in, hOGG1 enziminin (rs1052133) ve DNA çift zincir kırıkları onarım sisteminde önemli bir rolü olan Ku70 proteinin (rs5751129) gen polimorfizmlerinin pterjium ile korelasyonu olduğu saptanmıştır (32, 65, 268). DNA onarım yolları ve foto-oksidatif reaksiyonları için belirlenen genetik polimorfizmler, pterjium gelişimi riski yüksek olan bireyleri tanımlamayı vaat etmektedir.

Bir endotel hücresine özgü mitojen VEGF'nin pterjiumun epitelyal, stromal ve endotelyal hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği ve pterjiumun fibrovasküler proliferasyonunda rolü olduğu ileri sürülmüştür (40, 43, 139). VEGF genetik polimorfizminin pterjiumun oluşumuna ve anjiyogenez yeteneğine katkıda bulunabileceği rapor edilmiştir. Antianjiyogenez ilacına verilen terapötik cevabın VEGF allel varyantına bağlı olabileceği tespit edilmiştir. VEGF geninin genetik polimorfizmi ve protein ekspresyonu, pterjiumun anti-VEGF ajanları ile selektif tedavisinde potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir (41). Ayrıca VEGF'nin pterjiumun ana kısmı olan fibrovasküler komponenti ile ilişkisinden dolayı VEGF polimorfizmi ile pterjium arasındaki ilişkisi incelenmiş olup kadın hastalarda VEGF polimorfizminin (rs833061) pterjium oluşumuyla korele olduğu saptanmıştır (36).

Pterjiumda ACE'nin nükleer immünolokalizasyonu histolojik olarak gösterilmiştir. Bunu takiben yapılan bir çalışmada; pterjium gelişim riskinde ACE polimorfizmi (rs1799752) ilişkili bulunmuştur (35, 269). CYP1A1 polimorfizminin (C/T, T/T) de pterjium ile korelasyon gösterdiği, pterjium için risk oluşturduğu rapor edilmiştir. CYP1A1 polimorfizminin pterjium hassasiyetinde bir marker olabileceği öne sürülmüştür (33, 34).

Pterjiumun patogenezinden sorumlu olan UV, oküler yüzey epitelinden proinflamatuvar sitokinlerin sekresyonuna neden olmaktadır. Bu inflamatuvar sitokinlerden TNF- α , pterjium fibroblastlarını aktive etmektedir. TNF- α 'nın promoter bölgesindeki polimorfizm ile pterjium arasında ise korelasyon bulunamamıştır (270).

Rodrigues ve ark. (95) tarafından p53 proteindeki anormal ekspresyonunun, kodon 72 polimorfizminin (Arg/Pro) pterjium patogenizinde rolü olduğu öne sürülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda ise p53 kodon 72 polimorfizmi ile pterjium arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (271, 272).

Pterjium fibroblastlarında MMP-9 ekspresyon seviyelerinin normal fibroblastlara göre daha yüksek olması pterjiumun ilerlemesi ile ilgili bulunmuştur (273). Tayvan'da yapılan bir çalışmada ise MMP-8'e ait genetik polimorfizm ile pterjium arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (274).

Literatürde kanser, kardiyovasküler hastalıklar, otoimmün hastalıklar, iskemik felç, metabolik sendrom, respiratuvar distres sendromu (RDS), böbrek hastalıkları, diyabet, yüksek irtifa akciğer ödemi ve psikiyatrik rahatsızlıklarla ROCK1 ya da ROCK2 enzim polimorfizmleri arasında ilişki bulunmuştur (275-283). Sistemik sklerosis, glokom, prostat kanseri ve atriyal fibrilasyon gibi çeşitli rahatsızlıklarda Rho proteinleri gen polimorfizmleri ve ekspresyonu çalışmaları literatürde mevcuttur (284-287). Pterjium ile Rho proteinlerinin polimorfizmi ve ekspresyonu arasındaki ilişki ilk kez bu çalışmayla ele alınmıştır.

Bu çalışmada ise *RHOA* genine ait 7, *RHOB* genine ait 5, *RHOC* genine ait 6, *RHOD* genine ait 6, *RND3* (*RHOE*) genine ait 6 polimorfizm bölgesi olmak üzere toplam 30 SNP'in pterjium ile ilişkisi araştırıldı. Bu genlere ait polimorfizmlerin genotip ve allel analizleri yapıldı. *RHOB* geni rs35881336, *RHOD* geni rs75872861 ve *RHOE* geni rs75581868 polimorfizmlerinde sonuç alınamadığı için analizler 27 SNP üzerinden yapıldı.

RHOA gen SNP'lerinde genotip ve allel frekansları bakımından kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır. *RHOB* gen rs2602160, rs62121967, rs62121968, rs11541350 SNP'leri; *RHOC* gen rs2230329, rs2306937, rs1804292,

rs11102522 SNP'leri hem genotip hem de allel frekansları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0.0001$). *RHOC* gen rs11538960 SNP'i ($P = 0.0002$); *RHOD* gen rs11227675, rs61891303 SNP'leri ($P < 0.0001$) hem genotip hem de allel frekansları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *RHOD* geni rs7112925 SNP'i de genotip frekansı ($P < 0.0001$) ve allel frekansı ($P = 0.0016$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *RND3 (RHOE)* geni rs13418763, rs1441982 ve rs76447184 SNP'leri hem genotip hem de allel frekansları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Alınan sonuçlara göre pterjium ile *RHOB* gen rs2602160 polimorfizminde AA genotipi; rs62121967 polimorfizminde GG genotipi; rs62121968 ve rs11541350 polimorfizmlerinde CC genotipi arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. *RHOC* gen rs2230329, rs2306937 ve rs11538960 polimorfizmlerinde GG genotipi; rs11102522 polimorfizminde TT genotipi ile ilgili anlamlı bir ilişki saptanmıştır. *RHOC* gen rs1804292 polimorfizminde ise GG genotipi taşıyımama pterjium ile ilişkili bulunmuştur. *RHOD* gen rs11227675 polimorfizminde AA genotipi; rs61891303 polimorfizminde CC genotipi; rs7112925 polimorfizminde TT genotipi ile ilgili anlamlı bir ilişki saptanmıştır. *RND3 (RHOE)* geni rs13418763 polimorfizminde CT genotipi ve T alleli; rs1441982 polimorfizminde CC genotipi; rs76447184 polimorfizminde GG genotipi ile pterjium arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Risk genotipinin belirlenmesi pterjium patogenezi tam olarak açıklayamamakla beraber, genetik tarama testleriyle riskli genotipe sahip bireyler belirlenebilirse bu bireylere pterjium gelişimi için risk tayini yapılabilir. Bunun sonucunda hastalar daha sık takip edilerek pterjiumun kornea invazyonu ve hastaların görme kalitesinin bozulması geciktirilebilir. Dolayısıyla belirtilen Rho proteinleri SNP'lerinin pterjium için prognostik değer taşıdığı düşünülmektedir.

VEGF genellikle yara iyileşmesi sırasında yüksek oranda eksprese edilmektedir (288). Kornea, limbus ve konjonktivada tekrarlanan UV hasarının, limbal hücrelerin azalmış aktivitesine ve yara iyileşmesi için artmış VEGF ekspresyonuna neden olduğu belirtilmiştir (43). Artan VEGF'nin neovaskülarizasyona neden olduğu ve limbal hücrelerin azalmış aktivitesinin korneanın fibrovasküler doku invazyonunu engelleyemediği bu faktörlerin pterjiumun patogeneziinde sinerjistik olarak etki ettiği öne sürülmüştür (288, 289). Bryan ve ark. (290) Rho/Rho-kinaz sinyal yolağının VEGF

ile indüklenen migrasyonun yanında VEGF aracılıklı hücre permeabilitesini ve yaşam süresini de düzenlediğini göstermişlerdir. Rac'ın da fibroblastlarda RhoA'nın aktivitesini düzenlediği, hücre morfolojisi ve migrasyonunun kontrolünü sağladığı gösterilmiştir (291).

Postmortem gözlerde yapılan araştırmada RhoA protein ekspresyonunun glokomlu hastaların optik sinir ucunda anlamlı olarak arttığı ve glokom kaynaklı optik sinir hasarı patofizyolojisinde RhoA'nın katkısı olabileceği rapor edilmiştir (25). Optik sinir hasarından sonra retinal gangliyon hücrelerde Rho aktivitesinin arttığı da bilinmektedir (292). Sıçanlarda optik sinir aksotomi sonrası RhoA antagonisti C3'ün uygulanması ile aksonal rejenerasyonun sağlandığı ve retinal gangliyon hücrelerinin daha uzun yaşadığı rapor edilmiştir (293, 294). TNF- α 'nın RhoA'yı aktive ettiği ve ROCK bağımlı miyozin fosforilasyonunu indüklediği de bilinmektedir (295).

Gözlerdeki anjiyogenez, yaşa bağlı maküler dejenerasyon ve diyabetik retinopati gibi birçok oküler hastalıkta görme kaybına katkıda bulunur (296). K-115 olarak da bilinen ROCK inhibitörü ripasudil, VEGF'nin neden olduğu ROCK aktivasyonunun azalması ile retinal mikrovasküler endotel hücrelerinin migrasyonunu ve proliferasyonunu önemli ölçüde baskılamaktadır. Ripasudil, oksijenle indüklenen retinopatiye sahip farelerde retinal hipoksi alanını etkili bir şekilde azaltmaktadır. Ek olarak vaskülariteyi normalleştirip vasküler perfüzyonunu arttırmaktadır (297). ROCK inhibitörü AMA0526'nın *in vivo* anjiyogenez modelinde korneal neovaskülarizasyonu ve azalmış inflamatuvar hücre infiltrasyonunu etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (298). Ek olarak AMA0428 ROCK inhibitörünün lazer kaynaklı koroidal neovaskülarizasyonunun fare modelinde damar büyümesini ve sızıntıyı azalttığı rapor edilmiştir (299).

VEGF'ye yanıt olarak endotel hücrelerinde RhoB ekspresyonu artmaktadır. RhoB, VEGF'nin neden olduğu endotel hücre morfogenezinde kısmen RhoA/ROCK yolağının aktivitesini negatif şekilde regüle ederek rol oynadığı öne sürülmüştür (300). İnsan endotel hücresinde RhoB tükenmesinin, endotel hücre migrasyonu ve kapiller morfogenez gibi anjiyogenez için önemli olan işlemler üzerinde zararlı etkilere yol açtığı gösterilmiştir. Bunun RhoB yokluğunda VEGF stimülasyonunun ardından uygun olmayan şekilde artmış aktif RhoA seviyelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. RhoC aktivitesinin olmaması da buna katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Bu

sonuçlar doğrultusunda RhoB'nin pro-anjiyojenik büyüme faktörü VEGF'ye karşılık olarak RhoA'nın negatif regülasyonu ve RhoC aktivitesinin pozitif regülasyonu yoluyla endotel hücre kılcal morfogenezini üzerinde kontrol uyguladığını dşndrmştir (300).

Primer pterjiumda *RHOC*, *RHOD* ve *RHOE* doku gen ekspresyonları anlamlı olarak artarken *RHOA* ve *RHOB*'de değişiklik saptanmamıştır. Rho GTPaz'ların ekspresyonu da UV ve ROS ile indüklenmektedir (26, 27). UV radyasyon, RhoE mRNA ve protein düzeylerini arttırmaktadır (28). Bu sonuç bizim bulduğumuz *RHOE* doku gen ekspresyonu artışı ile uyumludur. UV ışınları klinikte tedavi amaçlı olarak da kullanılmaktadır. Özellikle psoriasis (sedef) ve vitiligo gibi deri hastalıklarında UVA ve UVB ışınlarından faydalanılmaktadır. Tedavi ile birlikte hastalarda pterjium gibi yüzeyel göz rahatsızlıklarının gelişmesi mümkündür (301). UV ışınları ile tedavide hastalara filtreli gözlük takılarak göz rahatsızlıklarının olası pterjium gelişiminin engellenmesi mümkün olabilir.

Primer pterjium hastalarının venöz kanından izole edilen lökositlerdeki analizde ise *RHOB* ve *RHOC* gen ekspresyonunda anlamlı azalış saptanmıştır. Primer pterjium dokularında ise RhoD protein ekspresyonunda anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir. Primer pterjium hastalarının kanından izole edilen lökositlerdeki protein ekspresyonu sonuçlarına göre RhoA ve RhoB protein ekspresyonlarında anlamlı artış olduğu gözlenmiştir. Bütün bu sonuçlar pterjium patogenezinde Rho/ROCK yolağının da katkısı olduğunu ortaya koymaktadır.

Protein ve gen ekspresyonu sonucunda elde edilen verilerin korelasyon analizleri yapılmıştır. Primer pterjium hastalarında pterjium dokusu *RHOA* gen ekspresyonu ile RhoB protein ekspresyonu arasında pozitif korelasyon, *RHOB* gen ekspresyonu ile RhoC protein ekspresyonu arasında ise negatif korelasyon saptanmıştır. Primer pterjium doku RhoC ve RhoD protein ekspresyonları ile lökosit RhoC protein ekspresyonu; doku RhoE protein ekspresyonu ile lökosit RhoD protein ekspresyonu arasında negatif korelasyon saptanmıştır. Primer pterjium dokusu RhoB protein ekspresyonu ile lökosit RhoA ve RhoB protein ekspresyonları arasında, doku RhoC protein ekspresyonu ile lökosit RhoA protein ekspresyonu arasında ise pozitif korelasyon bulunmuştur. Primer pterjium doku *RHOE* (*RND3*) gen ekspresyonları ile lökosit *RHOC* gen ekspresyonu arasında pozitif korelasyon saptanmıştır.

Bu çalışmayla ilk defa pterjium dokusunun gen ekspresyonu analizinde *RAC2* ve *RAC3* gen ekspresyonlarının arttığı bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da *Rac3* protein ekspresyonu artışı da gösterilmiştir. *Rac2* ve *Rac3* proteinlerinin pterjium gelişimine katkıda bulunabileceği, pterjium dokusunun büyümesini ve invazyonunu modüle edebileceği düşünülmektedir.

Rac proteinleri; immün regülasyonunda, apoptoz, hücre iskeleti regülasyonu, ROS üretimi ve lökosit trafiği gibi birçok inflamatuvar yolda anahtar bir proteindir. Bu nedenle *Rac* yolunun modülasyonu patogenetik öneme sahip olmaktadır (302, 303). *Rac* aktivasyonun fibroblastlarda ROS'u arttırdığı gösterilmiştir (258). Pterjium oluşumunda fibroblastların rolü de gösterilmiştir (253). Pterjium hastalarında ROS artışı ile birlikte oksidan ve antioksidan sistem arasında bir dengesizlik olmaktadır. Pterjiumda antioksidan enzimlerin azaldığı da gösterilmiştir (18, 19). *Rac2* ve *Rac3* ekspresyonundaki artış ile birlikte daha fazla üretilen serbest radikallerin, pterjiumdaki azalmış antioksidan enzimlerle ortamdan uzaklaştırılamaması ile birlikte pterjiumun gelişimine katkı yapması mümkündür.

Pterjium tedavisinde kullanılan anti-VEGF ajanı bevacizumab'ın yapılan bir meta analizde tedavinin anlamlı bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle anjiyogeneze katkıda bulunan yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (304). Demiryürek ve ark. (142) tarafından hem *ICAM-2* hem de *ICAM-3*'ün pterjiumun epitel ve kapiller endotel hücrelerinde upregüle olduğu gösterilmiştir. *ICAM-2* ayrıca endotel kavşaklarında da eksprese edilmektedir, küçük GTPaz *Rac* aktivasyonu ve hücre migrasyonu yoluyla anjiyogeneze aracılık etmektedir (305). Tüm veriler ele alındığında bu çalışmada gösterilen *Rac2* ve *Rac3* gen ekspresyonu artışının anjiyogeneze katkı yapabileceği fikrini akla getirmektedir.

Bu çalışmada primer pterjium doku örnekleri normal konjontival doku ile karşılaştırıldığında *RAC2* ve *RAC3* gen ekspresyonlarında artış bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da pterjium dokularında *Rac3* protein ekspresyonunda artış saptanmıştır. Bu bulgular *Rac2* ve *Rac3* proteinlerinin pterjium patogenezine bir katkısı olduğunu işaret edebilir. Pterjium gelişiminde *Rac1* proteinin rolüne ilişkin bir araştırma bulunmamaktadır ve daha başka çalışmalarla *Rac1* proteininin rolü de belirlenmelidir.

Çalışmamızın limitasyonu, gen ve protein ekspresyon analizlerinin farklı hastalar üzerinden yapılmasıdır. Kontrol olarak kullanılan konjonktival otogreft dokusundan çok küçük miktarda alınabildiğinden gen ve protein ekspresyon analizlerini aynı numuneden yapmak mümkün olmamıştır. Bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre gen ekspresyonunu ile elde edilen verilerin protein ekspresyonu ile desteklenmemesi, farklı yöntemlerle gen ekspresyonunun araştırılmasını ve protein ekspresyonu için immunohistokimyasal yöntemler gibi farklı metotlara başvurulmasını gerekli kılmaktadır.

Bu araştırma; *RHOA*, *RHOB*, *RHOC*, *RHOD* ve *RND3 (RHOE)* genetik polimorfizmlerinin ve Rho proteinlerinin (RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, Rac2 ve Rac3) gen ve protein ekspresyonlarının pterjiyum hastalığının gelişmesinde katkısının olup olmadığını ve pterjiyuma yatkınlığı ortaya koyan ilk çalışmadır. *RHOC*, *RHOD* ve *RHOE* doku gen ekspresyonunun pterjiyum olanlarda yüksek bulunması da bu hastalıkta Rho/Rho-kinaz yolağının rolü olabileceğini gösteren önemli bir veridir. Bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgular pterjiyum etyopatogenezinde genetik faktörlerin rol oynadığını ve Rho/Rho-kinaz yolağının rolünün olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu projede araştırılan 15 adet *RHO* gen polimorfizmlerinin pterjiyumla ilişkili olduğu ilk kez gösterilmiştir. Bu araştırma ile pterjiyum patogenezinin açıklanmasına katkıda bulunacak yeni bir gen bölgesi ortaya konmuştur. Çalışmamız aynı zamanda Türk toplumunda *RHO* gen polimorfizmlerinin pterjiyuma yatkınlıkta ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. *RHOA*, *RHOB*, *RHOC*, *RHOD* ve *RND3 (RHOE)* gen polimorfizmlerinin fonksiyonel olup olmadıkları bilinmemektedir. Bu araştırmanın sonuçları pterjiyum hastalığının takibinde ve tedavi stratejilerinin belirlenmesinde katkı sağlayabilecek niteliktedir. Genel olarak Rho proteinlerinin farmakolojik olarak hedeflenerek pterjiyumun destekleyici tedavisine katkıda bulunabileceğini düşünmek mümkündür. Pterjiyumun erken dönemde tespiti için Rho proteinleri gen polimorfizmlerinin genotiplemesi yapılarak marker olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir. Farklı yaşam tarzları, çevresel koşullar ve genetik faktörler de pterjiyumun gelişimine katkıda bulunmaktadır. Türk toplumunda yapılan bu çalışmanın farklı etnik ve büyük popülasyonlarda da uygulanması ve sonuçlarının karşılaştırılması önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Johnson RD, Pai VC, Hoft RH. Historical approaches to pterygium surgery, including bare sclera and adjunctive beta radiation techniques. In: Hovanesian JA, editor. Pterygium: Techniques and Technologies for Surgical Success. Thorofare, NJ: Slack Incorporated. 2012;27–36.
2. Campbell TG. A radical treatment for surfer's eye. *BMJ Case Rep.* 2014;2014:bcr2014203896.
3. Detorakis ET, Spandidos DA. Pathogenetic mechanisms and treatment options for ophthalmic pterygium: trends and perspectives (Review). *Int J Mol Med.* 2009;23(4):439-447.
4. Liu L, Wu J, Geng J, Yuan Z, Huang D. Geographical prevalence and risk factors for pterygium: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2013;19:3(11):e003787.
5. Stern GA, Lin A. Effect of pterygium excision on induced corneal topographic abnormalities, *Cornea.* 1998;17(1):23-27.
6. Cajucom-Uy H, Tong L, Wong TY, Tay WT, Saw SM. The prevalence of and risk factors for pterygium in an urban Malay population: the Singapore Malay Eye Study (SiMES). *Br J Ophthalmol.* 2010;94:977-981.
7. Ma K, Xu L, Jie Y, Jonas JB. Prevalence of and factors associated with pterygium in adult Chinese: the Beijing Eye Study. *Cornea.* 2007; 26:1184-1186.
8. Wong TY, Foster PJ, Johnson GJ, Seah SK, Tan DT. The prevalence and risk factors for pterygium in an adult Chinese population in Singapore: the Tanjong Pagar survey. *Am J Ophthalmol.* 2001;131(2):176-183.
9. McCarty CA, Fu CL, Taylor HR. Epidemiology of pterygium in Victoria, Australia. *Br J Ophthalmol.* 2000;84(3):289-292.
10. Nemesure B, Wu SY, Hennis A, Leske MC; Barbados Eye Studies Group. Nine-year incidence and risk factors for pterygium in the barbados eye studies. *Ophthalmology.* 2008;115(12):2153-2158.
11. Threlfall TJ, English DR. Sun exposure and pterygium of the eye: a dose-response curve. *Am J Ophthalmol.* 1999;128(3):280-287.
12. Mackenzie FD, Hirst LW, Battistutta D, Green A. Risk analysis in the development of pterygia. *Ophthalmology.* 1992;99(7):1056-1061.

13. Bradley JC, Yang W, Bradley RH, Reid TW, Schwab IR. The science of pterygia. *Br J Ophthalmol*. 2010;94(7):815-820.
14. Liang QF, Xu L, Jin XY, You QS, Yang XH, Cui TT. Epidemiology of pterygium in aged rural population of Beijing, China. *Chin Med J (Engl)*. 2010;123(13):1699-1701.
15. Singh G. Pterygium in the tropics. *Ophthalmology*. 1990;97(5):542-543.
16. Wiwanitkit V. Tropical pterygium. *Bull Soc Belge Ophtalmol*. 2009;313:7.
17. Cárdenas-Cantú E, Zavala J, Valenzuela J, Valdez-García JE. Molecular Basis of Pterygium Development. *Semin Ophthalmol*. 2016;31(6):567-583.
18. Chui J, Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT. The pathogenesis of pterygium: current concepts and their therapeutic implications (Review). *Ocul Surf*. 2008;6(1):24-43.
19. Balci M, Sahin S, Mutlu FM, Yagci R, Karanci P, Yildiz M. Investigation of oxidative stress in pterygium tissue. *Mol Vis*. 2011;9(17):443-447.
20. Kau HC, Tsai CC, Lee CF, Kao SC, Hsu WM, Liu JH, Wei YH. Increased oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxy-guanosine, in human pterygium. *Eye (Lond)*. 2006;20(7):826-831.
21. Tsai YY, Cheng YW, Lee H, Tsai FJ, Tseng SH, Lin CL, Chang KC. Oxidative DNA damage in pterygium. *Mol Vis*. 2005;11:71-75.
22. Shen A, Ye Y, Wang X, Chen C, Zhang H, Hu J. Raman scattering properties of human pterygium tissue. *J Biomed Opt*. 2005;10(2):024036.
23. Brandwein D, Wang Z. Interaction between Rho GTPases and 14-3-3 Proteins. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10):E2148.
24. Fukata M, Kaibuchi K. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:887-897.
25. Goldhagen B, Proia AD, Epstein DL, Rao PV. Elevated levels of RhoA in the optic nerve head of human eyes with glaucoma. *J Glaucoma*. 2012;21:530-538.
26. Jahner D, Hunter T. The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 1991;11:3682-3690.
27. Fritz G, Kaina B, Aktories K. The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments. *J Biol Chem*. 1995;270:25172-25177.

28. Boswell SA, Ongusaha PP, Nghiem P, Lee SW. The protective role of a small GTPase RhoE against UVB-induced DNA damage in keratinocytes. *J Biol Chem.* 2007;282:4850-4858.
29. Jin L, Ying Z, Webb RC. Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(4):H1495-500.
30. Sawada N, Li Y, Liao JK. Novel aspects of the roles of Rac1 GTPase in the cardiovascular system. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10:116–121.
31. Tsai YY, Lee H, Tseng SH, Cheng YW, Tsai CH, Wu YH, Tsai FJ. Null type of glutathione S-transferase M1 polymorphism is associated with early onset pterygium. *Mol Vis.* 2004;10:458-461.
32. Chen PL, Yeh KT, Tsai YY, Koeh H, Liu YL, Lee H, Cheng YW. XRCC1, but not APE1 and hOGG1 gene polymorphisms is a risk factor for pterygium. *Mol Vis.* 2010;16:991-996.
33. Young CH, Lo YL, Tsai YY, Shih TS, Lee H, Cheng YW. CYP1A1 gene polymorphisms as a risk factor for pterygium. *Mol Vis.* 2010;16:1054-1058.
34. 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;16:623-639.
35. Demurtas P, Orrù G, Coni P, Minerba L, Corrias M1, Sirigu P, Zucca I, Demurtas E, Maxia C1, Piras F, Murtas D, Lai S, Perra MT. Association between the ACE insertion/deletion polymorphism and pterygium in Sardinian patients: a population based case-control study. *BMJ Open.* 2014;4(10):e005627.
36. Tsai YY, Chiang CC, Bau DT, Cheng YW, Lee H, Tseng SH, Tsai FJ. Vascular endothelial growth factor gene 460 polymorphism is associated with pterygium formation in female patients. *Cornea.* 2008;27(4):476-479.
37. Karadag R, Bayram N, Oguztuzun S, Bozer B, Bayramlar H, Simsek GG, Rapuano CJ. Investigation of Glutathione S-Transferase isoenzyme protein expression in patients with pterygium. *Cornea.* 2016;35(8):1089-1092.
38. Jaworski CJ, Aryankalayil-John M, Campos MM, Fariss RN, Rowsey J, Agarwalla N, Reid TW, Dushku N, Cox CA, Carper D, Wistow G. Expression analysis of human pterygium shows a predominance of conjunctival and limbal markers and genes associated with cell migration. *Mol Vis.* 2009;20(15):2421-2434.

39. Liang K, Jiang Z, Zhao B, Shen J, Huang D, Tao L. The expression of vascular endothelial growth factor in mast cells promotes the neovascularisation of human pterygia. *Br J Ophthalmol*. 2012;96(9):1246-1251.
40. 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):473-477.
41. 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):556-561.
42. Hoyama E, Viveiros MM, Shiratori C, Oliveira DE, Padovani CR, Selva D, Schellini SA. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in macrophages, fibroblasts, and endothelial cells in pterygium treated with 5-Fluorouracil. *Semin Ophthalmol*. 2015;30(3):171-176.
43. Marcovich AL, Morad Y, Sandbank J, Huszar M, Rosner M, Pollack A, Herbert M, Bar-Dayana Y. Angiogenesis in pterygium: morphometric and immunohistochemical study. *Curr Eye Res*. 2002;25(1):17-22.
44. Van Nieuw Amerongen GP, Koolwijk P, Versteilen A, van Hinsbergh VW. Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration and angiogenesis in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(2):211-217.
45. Sun H, Breslin JW, Zhu J, Yuan SY, Wu MH. Rho and ROCK signaling in VEGF-induced microvascular endothelial hyperpermeability. *Microcirculation*. 2006;13(3):237-247.
46. Ozan H. *Ozan Anatomi, 3. baskı*. Ankara: Klinisyen Tıp Kitapevleri, 2014: s.612-618.
47. Khurana AK, Khurana Aruj K, Khurana Bhawna. *Comprehensive Ophthalmology, 6th edition, Chapter 1 (Anatomy and Development of Eye)*, New Delhi:Jaypee Brothers Medical Publishers, 2015:p.15.
48. Khurana AK, Khurana Aruj K, Khurana Bhawna. *Comprehensive Ophthalmology, 6th edition, Chapter 5 (Diseases of Conjunctiva)*, New Delhi:Jaypee Brothers Medical Publishers, 2015:p.68-70.
49. Harvey T, Fernandez A, Patel R, Goldman D, Ciralsky J. Conjunctival anatomy and physiology. In: Holland E, Mannis M, Lee W, eds. *Ocular surface disease: Cornea, conjunctiva and tear film*. USA: Elsevier Saunders, 2013:23-27.

50. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg.* 2011;37(3):588-598.
51. Rufer F, Schroder A, Erb C. White-to-white corneal diameter; normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II topography system. *Cornea.* 2005; 24:259–261.
52. Khurana AK, Khurana Aruj K, Khurana Bhawna. *Comprehensive Ophthalmology*, 6th edition, Chapter 6 (Diseases of Cornea), New Delhi:Jaypee Brothers Medical Publishers, 2015:p.104-105.
53. Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD. Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;134:7-23.
54. Khurana AK, Khurana Aruj K, Khurana Bhawna. *Comprehensive Ophthalmology*, 6th edition, Chapter 5 (Diseases of Conjunctiva), New Delhi:Jaypee Brothers Medical Publishers, 2015:p.96-97.
55. Tan DT, Chee SP, Dear KB, Lim AS. Effect of pterygium morphology on pterygium recurrence in a controlled trial comparing conjunctival autografting with bare sclera excision. *Arch Ophthalmol.* 1997;115(10):1235-1240.
56. Luthra R, Nemesure BB, Wu SY, Xie SH, Leske MC; Barbados Eye Studies Group. Frequency and risk factors for pterygium in the Barbados Eye Study. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1827-1832.
57. West S, Muñoz B. Prevalence of pterygium in Latinos: Proyecto VER. *Br J Ophthalmol* 2009;93:1287-1290.
58. Viso E, Gude F, Rodríguez-Ares MT. Prevalence of pinguecula and pterygium in a general population in Spain. *Eye (Lond)* 2011;25:350-357.
59. Fotouhi A, Hashemi H, Khabazkhoob M, Mohammad K. Prevalence and risk factors of pterygium and pinguecula: the Tehran Eye Study. *Eye (Lond)* 2009;23:1125-1129.
60. Riau AK, Wong TT, Lan W, Finger SN, Chaurasia SS, Hou AH, Chen S, Yu SJ, Tong L. 2011. Aberrant DNA methylation of matrix remodeling and cell adhesion related genes in pterygium. *PLoS One.* 2011;6(2):e14687.
61. Cameron ME. *Pterygium throughout the World*; Springfield, Illinois: Thomas. 1965.
62. Marchetti C, Sidahmed-Adrar N, Collin F, Jore D, Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D. Melatonin protects PLPC liposomes and LDL towards radical-induced oxidation. *J Pineal Res.* 2011;51(3):286–296.

63. Young S, Sands J. Sun and the eye: prevention and detection of light-induced disease. *Clin Dermatol.* 1998;16(4):477–485.
64. Ock CY, Kim EH, Choi DJ, Lee HJ, Hahm KB, Chung MH. 8-Hydroxydeoxyguanosine: not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol.* 2012;18(4):302–308.
65. Kau HC, Tsai CC, Hsu WM, Liu JH, Wei YH. Genetic polymorphism of hOGG1 and risk of pterygium in Chinese. *Eye (Lond).* 2004;18(6):635–639.
66. Tanito M, Haniu H, Elliott MH, Singh AK, Matsumoto H, Anderson RE. Identification of 4-hydroxynonenal-modified retinal proteins induced by photooxidative stress prior to retinal degeneration. *Free Radic Biol Med.* 2006;41(12):1847–1859.
67. Sano I, Kaidzu S, Tanito M, Hara K, Okuno T, Ohira A. 4-Hydroxyhexenal- and 4-hydroxynonenal-modified proteins in pterygia. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:602029.
68. Uchida K, Stadtman ER. Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89(10):4544–4548.
69. Bautista-de Lucio VM, López-Espinosa NL, Robles-Contreras A, Pérez-Cano HJ, Mejía-López H, Mendoza G, Jiménez-Martínez MC, Garfias Y. Overexpression of peroxiredoxin 2 in pterygium: a proteomic approach. *Exp Eye Res.* 2013;110:70–75.
70. Klebe S, Callahan T, Power JH. Peroxiredoxin I and II in human eyes: cellular distribution and association with pterygium and DNA damage. *J Histochem Cytochem.* 2014;62(1):85–96.
71. Sebastia R, Ventura MP, Solari HP, Antecká E, Orellana ME, Burnier MN Jr. Immunohistochemical detection of Hsp90 and Ki-67 in pterygium. *Diagn Pathol.* 2013;8:32.
72. Bohonowych JE, Gopal U, Isaacs JS. Hsp90 as a gatekeeper of tumor angiogenesis: clinical promise and potential pitfalls. *J Oncol.* 2010;2010:412985.
73. Cimpean AM, Sava MP, Raica M. DNA damage in human pterygium: one-shot multiple targets. *Mol Vis.* 2013;19:348–356.
74. Beukers R, Eker AP, Lohman PH. 50 years thymine dimer. *DNA Repair (Amst).* 2008;7(3):530–543.

75. Mesa R, Bassnett S. UV-B-induced DNA damage and repair in the mouse lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(10):6789–6797.
76. Pfeifer GP. Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochem Photobiol.* 1997;65(2):270–283.
77. Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Pontén J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(22):10124–10128.
78. Besaratinia A, Yoon JI, Schroeder C, Bradforth SE, Cockburn M, Pfeifer GP. Wavelength dependence of ultraviolet radiation-induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight. *Faseb J.* 2011;25(9):3079–3091.
79. Mallet JD, Rochette PJ. Ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in rabbit eyes. *Photochem Photobiol.* 2011;87(6):1363–1368.
80. Yam JS, Kwok AH. Ultraviolet light and ocular diseases. *Int Ophthalmol.* 2014;34(2):383–400.
81. Taylor HR. Ultraviolet radiation and the eye: an epidemiologic study. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1989;87:802–853.
82. Chao SC, Hu DN, Yang PY, Lin CY, Nien CW, Yang SF, Roberts JE. Ultraviolet-A irradiation upregulated urokinase-type plasminogen activator in pterygium fibroblasts through ERK and JNK pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(2):999–1007.
83. Dass K, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Sarkar FH. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat Rev.* 2008;34(2):122–136.
84. de Vries TJ, Quax PH, Denijn M, Verrijp KN, Verheijen JH, Verspaget HW, Weidle UH, Ruiters DJ, van Muijen GN. Plasminogen activators, their inhibitors, and urokinase receptor emerge in late stages of melanocytic tumor progression. *Am J Pathol.* 1994;144(1):70–81.
85. Fini ME, Girard MT. Non-coordinate regulation of metalloproteinase gene expression in cornea. *Matrix Suppl.* 1992;1:203–204.
86. Li DQ, Lee SB, Gunja-Smith Z, Liu Y, Solomon A, Meller D, Tseng SC. Overexpression of collagenase (MMP-1) and stromelysin (MMP-3) by pterygium head fibroblasts. *Arch Ophthalmol.* 2001;119(1):71–80.

87. Di Girolamo N, McCluskey P, Lloyd A, Coroneo MT, Wakefield D. Expression of MMPs and TIMPs in human pterygia and cultured pterygium epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(3):671–679.
88. Detorakis ET, Drakonaki EE, Spandidos DA. Molecular genetic alterations and viral presence in ophthalmic pterygium. *Int J Mol Med.* 2000;6(1):35–41.
89. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(5):342–350.
90. 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.
91. Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics.* 2009;12(5–6):281–290.
92. 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.
93. Takamura Y, Kubo E, Tsuzuki S, Akagi Y. Detection of human papillomavirus in pterygium and conjunctival papilloma by hybrid capture II and PCR assays. *Eye (Lond).* 2008;22(11):1442–45.
94. Piras F, Moore PS, Ugalde J, Perra MT, Scarpa A, Sirigu P. Detection of human papillomavirus DNA in pterygia from different geographical regions. *Br J Ophthalmol.* 2003;87(7):864–866.
95. 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.
96. Gallagher MJ, Giannoudis A, Herrington CS, Hiscott P. Human papillomavirus in pterygium. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(7):782–784.
97. Anguria P, Kitinya J, Ntuli S, Carmichael T. The role of heredity in pterygium development. *Int J Ophthalmol.* 2014;7(3):563–573.
98. Liang K, Jiang Z, Ding BQ, Cheng P, Huang DK, Tao LM. Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in pterygia and normal conjunctiva. *Mol Vis.* 2011;17:1687–1693.
99. 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):985–988.

100. 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):958–961.
101. Kim KW, Park SH, Wee SW, Kim JC. Overexpression of angiogenin in pterygium body fibroblasts and its association with proliferative potency. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(9):6355–6362.
102. Kramer E, Herman O, Frand J, Leibou L, Schreiber L, Vaknine H. Ki67 as a biologic marker of basal cell carcinoma: a retrospective study. *Isr Med Assoc J.* 2014;16(4):229–232.
103. Barrett TL, Smith KJ, Hodge JJ, Butler R, Hall FW, Skelton HG. Immunohistochemical nuclear staining for p53, PCNA, and Ki-67 in different histologic variants of basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 1997;37 (3 Pt 1):430–437.
104. Riau AK, Wong TT, Beuerman RW, Tong L. Calcium binding S100 protein expression in pterygium. *Mol Vis.* 2009;15:335–342.
105. Tong L, Lan W, Lim RR, Chaurasia SS. S100A proteins as molecular targets in the ocular surface inflammatory diseases. *Ocul Surf.* 2014;12(1):23–31.
106. Tan DT, Tang WY, Liu YP, Goh HS, Smith DR. Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium. *Br J Ophthalmol.* 2000;84(2):212–216.
107. 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):2372–2380.
108. Weinstein O, Rosenthal G, Zirkin H, Monos T, Lifshitz T, Argov S. Overexpression of p53 tumor suppressor gene in pterygia. *Eye (Lond).* 2001;16(5):619–621.
109. Tan DT, Lim AS, Goh HS, Smith DR. Abnormal expression of the p53 tumor suppressor gene in the conjunctiva of patients with pterygium. *Am J Ophthalmol.* 1997;123(3):404–405.
110. 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):1593–1599.

111. Reisman D, McFadden JW, Lu G. Loss of heterozygosity and p53 expression in Pterygium. *Cancer Lett.* 2004;206(1):77–83.
112. 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):159–165.
113. 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;12:1411–1416.
114. Shimmura S, Ishioka M, Hanada K, Shimazaki J, Tsubota K. Telomerase activity and p53 expression in pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(6):1364–1369.
115. 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):3430–3437.
116. 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.
117. Chiang CC, Cheng YW, Lin CL, Lee H, Tsai FJ, Tseng SH, Tsai YY. Cyclooxygenase 2 expression in pterygium. *Mol Vis.* 2007;13:635–638.
118. Tong L, Li J, Chew J, Tan D, Beuerman R. Phospholipase D in the human ocular surface and in pterygium. *Cornea.* 2008;27(6):693–698.
119. Barba-Gallardo LF, Ventura-Juárez J, Kershenovich Stalnikowitz D, Gutiérrez-Campos R, Torres-Bernal E, Torres-Bernal LF. Over-expression of human cystatin C in pterygium versus healthy conjunctiva. *BMC Ophthalmol.* 2013;13:6.
120. Siak JJ, Ng SL, Seet LF, Beuerman RW, Tong L. The nuclear-factor kappaB pathway is activated in pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(1):230–236.
121. Pinkerton OD, Hokama Y, Shigemura LA. Immunologic basis for the pathogenesis of pterygium. *Am J Ophthalmol.* 1984;98(2):225–228.
122. Julien S, Puig I, Caretti E, Bonaventure J, Nelles L, van Roy F, Dargemont C, de Herreros AG, Bellacosa A, Larue L. Activation of NF-kappaB by Akt upregulates snail expression and induces epithelium mesenchyme transition. *Oncogene.* 2007;26(53):7445–7456.

123. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999;18(49):6853–6866.
124. 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 the pterygium. *Acta Histochem*. 1996;98(2):195–201.
125. 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):110–113.
126. 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.
127. 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;4(2):573–580.
128. Van Setten G, Aspiotis M, Blalock TD, Grotendorst G, Schultz G. Connective tissue growth factor in pterygium: simultaneous presence with vascular endothelial growth factor: possible contributing factor to conjunctival scarring. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2003;241(2):135–139.
129. Kim KW, Park SH, Lee SH, Kim JC. Upregulated stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) expression and its interaction with CXCR4 contribute to the pathogenesis of severe pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(12):7198–7206.
130. Di Girolamo N, Coroneo MT, Wakefield D. Active matrilysin (MMP-7) in human pterygia: potential role in angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(9):1963–1968.
131. Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors at the advancing pterygium head. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(13):4142–4149.
132. Tsai YY, Chiang CC, Yeh KT, Lee H, Cheng YW. Effect of TIMP-1 and MMP in pterygium invasion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(7):3462–3467.
133. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86(3):353–364.
134. Aspiotis M, Tsanou E, Gorezis S, Ioachim E, Skyrlas A, Stefaniotou M, Malamou-Mitsi V. Angiogenesis in pterygium: study of microvessel density,

- vascular endothelial growth factor, and thrombospondin-1. *Eye (Lond)*. 2007;21(8):1095–1101.
135. 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):107–110.
136. Chui J, Di Girolamo N, Coroneo MT, Wakefield D. The role of substance P in the pathogenesis of pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48(10):4482–4489.
137. Kuwano M, Fukushi J, Okamoto M, Nishie A, Goto H, Ishibashi T, Ono M. Angiogenesis factors. *Intern Med*. 2001;40(7):565–572.
138. Roberts DD. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. *Faseb J*. 1996;10(10):1183–1191.
139. Lee DH, Cho HJ, Kim JT, Choi JS, Joo CK. Expression of vascular endothelial growth factor and inducible nitric oxide synthase in pterygia. *Cornea*. 2001;20(7):738–742.
140. Ling S, Liang L, Lin H, Li W, Xu J. Increasing lymphatic microvessel density in primary pterygia. *Arch Ophthalmol*. 2012;130(6):735–742.
141. Beden U, Irkeç 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):115–122.
142. Demiryürek S, Saracaloglu A, Kimyon S, Mete A, Eronat O, Temiz E, Nacarkahya G, Sav Tunca Z, Düzen B, Saygili O, Güngör K, Karakök M, Demiryürek AT. Increased expressions of ICAM-2 and ICAM-3 in pterygium. *Curr Eye Res*. 2019;44(6):645-650.
143. Ioachim-Velogianni E, Tsironi E, Agnantis N, Datsaris G, Psilas K. HLADR antigen expression in pterygium epithelial cells and lymphocyte subpopulations: an immunohistochemistry study. *Ger J Ophthalmol*. 1995;4(2):123–129.
144. 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):585–589.
145. Golu T, Mogoantă L, Streba CT, Pirici DN, Mălăescu D, Mateescu GO, Muțiu G. Pterygium: histological and immunohistochemical aspects. *Rom J Morphol Embryol*. 2011;52(1):153–158.

146. 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.
147. 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):1511–1517.
148. Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol kinase/AKT pathways. *Oncogene.* 2005;24(50):7443–7454.
149. Korpál M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem.* 2008;283(22):14910–14914.
150. 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):3982-3985.
151. 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):536–542.
152. 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):3450–3458.
153. Sanchez-Thorin JC, Rocha G, Yelin JB. Meta-analysis on the recurrence rates after bare sclera resection with and without mitomycin C use and conjunctival autograft placement in surgery for primary pterygium. *Br J Ophthalmol.* 1998;82(6):661–665.
154. Yang Y, Pi M, Xu F. Observation of long-term efficacy of corneal limbal conjunctival autografts in microscopy treatments of pterygium. *Eye Sci.* 2013;28(2):73–78.
155. Salagar KM, Biradar KG. Conjunctival autograft in primary and recurrent pterygium: a study. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(12):2825–2827.

156. Kocamis O, Bilgec M. Evaluation of the recurrence rate for pterygium treated with conjunctival autograft. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2014;252(5):817–820.
157. Cohen RA, McDonald MB. Fixation of conjunctival autografts with an organic tissue adhesive. *Arch Ophthalmol.* 1993;111(9):1167–1168.
158. Cagatay HH, Gokce G, Ekinçi M, Koban Y, Daraman O, Ceylan E. Long-term comparison of fibrin tissue glue and vicryl suture in conjunctival autografting for pterygium surgery. *Postgrad Med.* 2014;26(1):97–103.
159. Vichare N, Choudhary T, Arora P. A comparison between fibrin sealant and sutures for attaching conjunctival autograft after pterygium excision. *Med J Armed Forces India.* 2013;69(2):151–155.
160. Kim HH, Mun HJ, Park YJ, Lee KW, Shin JP. Conjunctivolimbal autograft using a fibrin adhesive in pterygium surgery. *Korean J Ophthalmol.* 2008;22(3):147-154.
161. Bilge AD. Comparison of conjunctival autograft and conjunctival transposition flap techniques in primary pterygium surgery. *Saudi J Ophthalmol.* 2018;32(2):110-113.
162. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea.* 2000;19(3):348-352.
163. Arain MA, Yaqub MA, Ameen SS, Iqbal Z, Naqvi AH, Niazi MK. Amniotic membrane transplantation in primary pterygium compared with bare sclera technique. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2012;22(7):440–443.
164. Moreno-Lo'pez R. Comparative study between primary pterygium excision using conjunctival autograft, amniotic membrane, and primary closure. *Rev Mex Oftalmol.* 2004;78:291–297.
165. Liang W, Li R, Deng X. Comparison of the efficacy of pterygium resection combined with conjunctival autograft versus pterygium resection combined with amniotic membrane transplantation. *Eye Sci.* 2012;27(2):102–105.
166. Taylan Sekeroglu H, Erdem E, Dogan NC, Yagmur M, Ersoz R, Dogan A. Sutureless amniotic membrane transplantation combined with narrow-strip conjunctival autograft for pterygium. *Int Ophthalmol.* 2011;31(6), 433–438.

167. Kim JH, Chun YS, Lee SH, Mun SK, Jung HS, Lee SH, Son Y, Kim JC. Ocular surface reconstruction with autologous nasal mucosa in cicatricial ocular surface disease. *Am J Ophthalmol.* 2010;149(1):45–53.
168. Kim KW, Kim JC, Moon JH, Koo H, Kim TH, Moon NJ. Management of complicated multirecurrent pterygia using multimicroporous expanded polytetrafluoroethylene. *Br J Ophthalmol.* 2013;97(6):694–700.
169. Netto MV, Mohan RR, Sinha S, Sharma A, Gupta PC, Wilson SE. Effect of prophylactic and therapeutic mitomycin C on corneal apoptosis, cellular proliferation, haze, and long-term keratocyte density in rabbits. *J Refract Surg.* 2006; 22(6):562–574.
170. Raiskup F, Solomon A, Landau D, Ilsar M, Frucht-Pery J. Mitomycin C for pterygium: long term evaluation. *Br J Ophthalmol.* 2004;88(11):1425–1428.
171. Kirwan JF, Constable PH, Murdoch IE, Khaw PT. Beta irradiation: new uses for an old treatment: a review. *Eye (Lond).* 2003;17(2):207–215.
172. Qin XJ, Chen HM, Guo L, Guo YY. Low-dose strontium-90 irradiation is effective in preventing the recurrence of pterygia: a ten-year study. *PLoS One.* 2012;7(8):e43500.
173. Ali AM, Thariat J, Bensadoun RJ, Thyss A, Rostom Y, El-Haddad S, Gérard JP. The role of radiotherapy in the treatment of pterygium: a review of the literature including more than 6000 treated lesions. *Cancer Radiother.* 2011;15(2):140–147.
174. Viani GA, Fonseca EC, De Fendi LI, Rocha EM. Conjunctival autograft alone or combined with adjuvant beta-radiation? A randomized clinical trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;82(3):e507–e511.
175. Boyd S, Boyd B. *New Trends in Ophthalmology: Medical and Surgical Management.* Panama: Chapter 3, Jaypee-Highlights Medical Publishers, 2013:p.58.
176. Said DG, Faraj LA, Elalfy MS, Yeung A, Miri A, Fares U, Otri AM, Rahman I, Maharajan S, Dua HS. Intra-lesional 5-fluorouracil for the management of recurrent pterygium. *Eye (Lond).* 2013;27(10):1123–1129.
177. Chen KH, Hsu WM. Intraoperative ethanol treatment as an adjuvant therapy of pterygium excision. *Int J Biomed Sci.* 2006;2(4):414–421.
178. Tsumi E, Levy J, Pitchkhadze A, Baidousi A, Lifshitz T. New approach for pterygium removal using 20% ethanol. *Int Ophthalmol.* 2012;32(5):443–448.

179. Stival LR, Lago AM, Figueiredo MN, Bittar RH, Machado ML, Nassaralla Junior JJ. Efficacy and safety of subconjunctival bevacizumab for recurrent pterygium. *Arq Bras Oftalmol.* 2014;77(1):4–7.
180. Karalezli A, Kucukerdonmez C, Akova YA, Koktekir BE. Does topical bevacizumab prevent postoperative recurrence after pterygium surgery with conjunctival autografting? *Int J Ophthalmol.* 2014;7(3):512–516.
181. Razeghinejad MR, Banifatemi M. Subconjunctival bevacizumab for primary pterygium excision: a randomized clinical trial. *J Ophthalmic Vis Res.* 2014;9(1):22–30.
182. Sapadin AN, Fleischmajer R. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. *J Am Acad Dermatol.* 2006;54(2):258–265.
183. Duivenvoorden WC, Hirte HW, Singh G. Use of tetracycline as an inhibitor of matrix metalloproteinase activity secreted by human bone-metastasizing cancer cells. *Invasion Metastasis.* 1997;17(6):312–322.
184. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(3):178–193.
185. Cox CA, Amaral J, Salloum R, Guedez L, Reid TW, Jaworski C, John-Aryankalayil M, Freedman KA, Campos MM, Martinez A, Becerra SP, Carper DA. Doxycycline's effect on ocular angiogenesis: an in vivo analysis. *Ophthalmology.* 2010;117(9):1782–1791.
186. Larrayoz IM, de Luis A, Rúa O, Velilla S, Cabello J, Martínez A. Molecular effects of doxycycline treatment on pterygium as revealed by massive transcriptome sequencing. *PLoS One.* 2012;7(6):e39359.
187. Rúa O, Larráyoz IM, Barajas MT, Velilla S, Martínez A. 2012. Oral doxycycline reduces pterygium lesions: results from a double blind, randomized, placebo controlled clinical trial. *PLoS One.* 2012;7(12):e52696.
188. Sun GL, Zhang MC, Jiang L. Effect of tetrandrine on proliferation of human pterygium fibroblasts. *Int J Ophthalmol.* 2009;2(3):253-256.
189. Zhang M, Bian F, Wen C, Hao N. Inhibitory effect of curcumin on proliferation of human pterygium fibroblasts. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2007; 27(3):339–342.
190. Madaule P, Axel R. A novel ras-related gene family. *Cell.* 1985;41:31-40.
191. Ligeti E, Welti S, Scheffzek K. Inhibition and termination of physiological responses by GTPase activating proteins. *Physiol Rev.* 2012;92:237–272.

192. Mettouchi A, Lemichez E. Ubiquitylation of active Rac1 by the E3 ubiquitin-ligase HACE1. *Small GTPases*. 2012;3:102–106.
193. Navarro-Lerida I, Sanchez-Perales S, Calvo M, Rentero C, Zheng Y, Enrich C, Del Pozo MA. A palmitoylation switch mechanism regulates Rac1 function and membrane organization. *EMBO J*. 2012;31:534–551.
194. Loirand, G, Guilluy C, Pacaud P. Regulation of Rho proteins by phosphorylation in the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med*. 2006;16:199–204.
195. Rolfe BE, Worth NF, World CJ, Campbell JH, Campbell GR. Rho and vascular disease. *Atherosclerosis*. 2005;183:1–16.
196. Aznar S, Lacal J. Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Lett*. 2001;165:1–10.
197. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*. 1997;11:2295–2322.
198. Liu M, Bi F, Zhou X, Zheng Y. Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. *Trends Cell Biol*. 2012;22:365–373.
199. Nobes C, Hall A. Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases. *Curr Opin Genet Dev*. 1994;4(1):77–81.
200. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in Cell Biology. *Nature*. 2002;420:629-635.
201. Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett*. 1996;392:189–193.
202. Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol*. 1996;16:5313–5327.
203. Hall A, Lalli G. Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010; 2:1–18.
204. Chen J, Guerriero E, Lathrop K, SundarRaj N. Rho/ROCK signaling in regulation of corneal epithelial cell cycle progression. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(1):175–183.
205. Yin J, Yu FX. Rho kinases regulate corneal epithelial wound healing. *Am J Phys Cell Phys*. 2008;295:C378–C387.

206. Suzuki Y, Shibuya M, Satoh S, Sugimoto Y, Takakura K. A postmarketing surveillance study of fasudil treatment after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Surg Neurol.* 2007;68:126-131.
207. Garnock-Jones KP. Ripasudil: first global approval. *Drugs.* 2014;74(18):2211-2215.
208. Asrani S, Robin AL, Serle JB, Lewis RA, Usner DW, Kopczynski CC, Heah T. Mercury-1 Study Group. Netarsudil/Latanoprost Fixed-Dose Combination for Elevated Intraocular Pressure: 3-Month Data From a Randomized Phase 3 Trial. *Am J Ophthalmol.* 2019;207:248-257.
209. Loirand G, Sauzeau V, Pacaud P. Small G proteins in the cardiovascular system: physiological and pathological aspects. *Physiol Rev.* 2013;93(4):1659-1720.
210. Saracaloğlu A. 2014. Rho Proteinleri Gen Polimorfizmleri ile Primer Açık Açık Glokom Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, Gaziantep, s.27.
211. Shao F, Dixon JE. YopT is a cysteine protease cleaving Rho family GTPases. *Adv Exp Med Biol.* 2003;529:79–84.
212. Allal C, Favre G, Couderc B, Salicio S, Sixou S, Hamilton AD, Sebti SM, Lajoie-Mazenc I, Pradines A. RhoA prenylation is required for promotion of cell growth and transformation and cytoskeleton organization but not for induction of serum response element transcription. *J Biol Chem.* 2000;275:31001–31008.
213. Adamson P, Paterson HF, Hallm A. Intracellular localization of the P21 rho proteins. *J Cell Biol.* 1992;119:617-627.
214. Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol.* 1996;133:1403-1415.
215. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 2003;302:1704–1709.
216. Bian D, Mahanivong C, Yu J, Frisch SM, Pan ZK, Ye RD, Huang S. The G(12/13)-RhoA signaling pathway contributes to efficient lysophosphatidic acid-stimulated cell migration. *Oncogene.* 2006;25:2234-2244.
217. Worzfeld T, Wettschureck N, Offermanns S. G₁₂/G₁₃-mediated signalling in mammalian physiology and disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29:582-589.
218. Guilluy C, Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Guerin P, Sagan C, Pacaud P, Loirand G. Inhibition of RhoA/Rho kinase pathway is involved in the beneficial

- effect of sildenafil on pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol.* 2005;146:1010–1018.
219. Kajimoto H, Hashimoto K, Bonnet SN, Haromy A, Harry G, Moudgil R, Nakanishi T, Rebeyka I, Thébaud B, Michelakis ED, Archer SL. Oxygen activates the Rho/Rho-kinase pathway and induces RhoB and ROCK-1 expression in human and rabbit ductus arteriosus by increasing mitochondria derived reactive oxygen species: a newly recognized mechanism for sustaining ductal constriction. *Circulation.* 2007;115:1777–1788.
220. Skuli N, Monferran S, Delmas C, Lajoie-Mazenc I, Favre G, Toulas C, Cohen-Jonathan-Moyal E. Activation of RhoB by hypoxia controls hypoxia-inducible factor-1 alpha stabilization through glycogen synthasekinase-3 in U87 glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2006;66:482–489.
221. Tillement V, Lajoie-Mazenc I, Casanova A, Froment C, Penary M, Tovar D, Marquez R, Monsarrat B, Favre G, Pradines A. Phosphorylation of RhoB by CK1 impedes actin stress fiber organization and epidermal growth factor receptor stabilization. *Exp Cell Res.* 2008;314:2811-2821.
222. Rodriguez PL, Sahay S, Olabisi OO, Whitehead IP. ROCK I-mediated activation of NF-kappaB by RhoB. *Cell Signal.* 2007;19:2361–2369.
223. Zalcman G, Closson V, Linares-Cruz G, Lerebours F, Honore N, Tavitian A, Olofsson B. Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle. *Oncogene.* 1995;10:1935-1945.
224. Gampel A, Parker PJ, Mellor H. Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase RhoB. *Curr Biol.* 1999;9:955–958.
225. Huang M, Duhadaway JB, Prendergast GC, Laury-Kleintop LD. RhoB regulates PDGFR-beta trafficking and signaling in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2597–2605.
226. Lajoie-Mazenc I, Tovar D, Penary M, Lortal B, Allart S, Favard C, Brihoum M, Pradines A, Favre G. MAP1A light chain-2 interacts with GTP-RhoB to control epidermal growth factor (EGF)-dependent EGF receptor signaling. *J Biol Chem.* 2008;283:4155–4164.
227. Neel NF, Lapierre LA, Goldenring JR, Richmond A. RhoB plays an essential role in CXCR2 sorting decisions. *J Cell Sci.* 2007;120:1559–1571.

228. Rondanino C, Rojas R, Ruiz WG, Wang E, Hughey RP, Dunn KW, Apodaca G. RhoB dependent modulation of postendocytic traffic in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Traffic*. 2007;8:932–949.
229. Sandilands E, Akbarzadeh S, Vecchione A, McEwan DG, Frame MC, Heath JK. Src kinase modulates the activation, transport and signalling dynamics of fibroblast growth factor receptors. *EMBO Rep*. 2007;8:1162–1169.
230. Chen Z, Sun J, Pradines A, Favre G, Adnane J, Sebti S. M. Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. *J Biol Chem*. 2000;275:17974-17978.
231. Du W, Prendergast GC. Geranylgeranylated RhoB mediates suppression of human tumor cell growth by farnesyltransferase inhibitors. *Cancer Res*. 1999;59:5492-5496.
232. Adnane J, Muro-Cacho C, Mathews L, Sebti SM, Munoz-Antonia T. Suppression of Rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2002;8:2225-2232.
233. Allal C, Pradines A, Hamilton AD, Sebti SM, Favre G. Farnesylated RhoB prevents cell cycle arrest and actin cytoskeleton disruption caused by the geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-298. *Cell Cycle*. 2002;1:430-437.
234. Prendergast GC. Farnesyltransferase inhibitors: antineoplastic mechanism and clinical prospects. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12:166-173.
235. Liu AX, Rane N, Liu JP, Prendergast GC. RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol Cell Biol*. 2001;21:6906–6912.
236. Kroon J, Tol S, van Amstel S, Elias JA, Fernandez-Borja M. The Small GTPase RhoB regulates TNF α signaling in endothelial cells. *Plos One*. 2013;8:e75031.
237. Chardin P, Madaule P, Tavitian A. Coding sequence of human rho cDNAs clone 6 and clone 9. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:2717.
238. Suwa H, Ohshio G, Imamura T, Watanabe G, Arii S, Imamura M, Narumiya S, Hiai H, Fukumoto M. Overexpression of the RhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Cancer*. 1998;77:147-152.
239. van Golen KL, Wu ZF, Qiao XT, Bao LW, Merajver SD. RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially

- recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. *Cancer Res.* 2000;60:5832-5838.
240. Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes, RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature.* 2000;406:532-535.
241. van Golen KL, Wu ZF, Qiao XT, Bao L, Merajver SD. RhoC GTPase overexpression modulates induction of angiogenic factors in breast cells. *Neoplasia.* 2000;2:418-425.
242. Murphy C, Saffrich R, Grummt M, Gournier H, Rybin V, Rubino M, Auvinenm P, Lutcke A, Parton RG, Zerial M. Endosome dynamics regulated by a Rho protein. *Nature.* 1996;384:427-432.
243. Murphy C, Saffrich R, Olivo-Marin JC, Giner A, Ansorge W, Fotsis T, Zerial M. Dual function of RhoD in vesicular movement and cell motility, *Eur J Cell Biol.* 2001;80:391-398.
244. Tsubakimoto K, Matsumoto K, Abe H, Ishii J, Amano M, Kaibuchi K, Endo T. Small GTPase RhoD suppresses cell migration and cytokinesis. *Oncogene* 1999;18:2431-2440.
245. Gottesbühren U, Garg R, Riou P, McColl B, Brayson D, Ridley AJ. Rnd3 induces stress fibres in endothelial cells through RhoB. *Biol Open.* 2013;2:210-216.
246. Riento K, Villalonga P, Garg R, Ridley A. Function and regulation of RhoE. *Biochem Soc Trans.* 2005;33:649-651.
247. Riento K, Guasch RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol.* 2003;23:4219-4229.
248. Zhu Y, Zhou J, Xia H, Chen X, Qiu M, Huang J, Liu S, Tang Q, Lang N, Liu Z, Liu M, Zheng Y, Bi F. The Rho GTPase RhoE is a p53-regulated candidate tumor suppressor in cancer cells. *Int J Oncol.* 2014;44:896-904.
249. Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjano IM. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays.* 2007;29:356–370.
250. Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:690–701.
251. Vojtek AB, Cooper JA. Rho family members: activators of MAP kinase cascades, *Cell.* 1995;82(4):527-529.
252. Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:459-486.

253. Kim KW, Park SH, Kim JC. Fibroblast biology in pterygia. *Exp Eye Res.* 2016;142:32-39.
254. Heasman SJ, Ridley AJ. Multiple roles for RhoA during T cell transendothelial migration. *Small GTPases.* 2010;1(3):174–179.
255. Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J.* 2000;348:241–255.
256. Hall A. Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans.* 2012;40(6):1378-1382.
257. Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA, Brown JH. The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:459-489.
258. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Sulciner DJ, Gutkind JS, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, Finkel T. Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem J.* 1996;318:379-382.
259. Mettouchi A, Klein S, Guo W, Lopez-Lago M, Lemichez E, Westwick JK, Giancotti FG. Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol Cell.* 2001;8:115–127.
260. Ison MF, Ashworth A, Hall A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science.* 1995;269:1270–1272.
261. Demiryürek S, Koruk I, Bozdag Z, Ozkara E, Kaplan DS, Oztuzcu S, Cetinkaya A, Alasehirli B, Demiryürek AT. Investigation of the esophageal Rho-kinase expression in patients with Barrett's esophagus. *Ultrastruct Pathol.* 2013;37(4);284-289.
262. Tunctan B, Korkmaz B, Sari AN, Kacan M, Unsal D, Serin MS, Buharalioglu CK, Sahan-Firat S, Cuez T, Schunck WH, Manthati VL, Falck JR, Malik KU. Contribution of iNOS/sGC/PKG pathway, COX-2, CYP4A1, and gp91(phox) to the protective effect of 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, against vasodilation, hypotension, tachycardia, and inflammation in a rat model of septic shock. *Nitric Oxide.* 2013;33:18-41.
263. Oguz E. 2012. RhoA/Rho-Kinaz (ROCK) Gen Polimorfizmlerinin ve ROCK1 ve ROCK2 Gen Ekspresyonlarının Behçet Hastalığı ile İlişkisinin Araştırılması. Doktora Tezi, Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, Gaziantep, s.77.
264. Rao VP, Epstein DL. Rho GTPase/Rho kinase inhibition as a novel target for the treatment of glaucoma. *BioDrugs.* 2007;21:167–177.
265. Moura-Coelho N, Tavares Ferreira J, Bruxelles C, Dutra-Medeiros M, Cunha JP, Pinto Proença R. Rho kinase inhibitors-a review on the physiology and clinical

- use in Ophthalmology. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2019;257(6):1101-1117.
266. Dos Reis GM, de P R Júnior A, E Silva KS, Rodrigues DA, Gomes MC, Martins JV, da Costa IR, Freitas GA, Moura KK. Pterygium in patients from Goiânia, Goiás, Brazil. *Genet Mol Res.* 2015;14(2):6182-6188.
267. de P R Júnior A, Dos Reis GM, E Silva KS, Rodrigues DA, Gomes MC, Martins JV, da Costa IR, Freitas GA¹, Moura KK. Analysis of the GSTM1-null polymorphism in patients with pterygium from Goiânia, Goiás Brazil. *Genet Mol Res.* 2015;14(2):6173-6181.
268. Tsai YY, Bau DT, Chiang CC, Cheng YW, Tseng SH, Tsai FJ. Pterygium and genetic polymorphism of DNA double strand break repair gene Ku70. *Mol Vis* 2007;13:1436-1440.
269. Demurtas P, Di Girolamo N, Corrias M, Zucca I, Maxia C, Diana A, Piras F, Lai S, Sirigu P, Perra MT. Immunohistochemical analysis of angiotensin converting enzyme in Sardinian pterygium. *Histol Histopathol* 2012;28:759–766.
270. Tsai YY, Lee H, Tseng SH, Cheng YW, Tsai CH, Hsu CM, Tsai FJ. Evaluation of TNF-alpha and IL-1 beta polymorphisms in Taiwan Chinese patients with pterygium. *Eye (Lond).* 2005;19(5):571-574.
271. Tsai YY, 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):975-976.
272. 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 Exp Ophthalmol.* 2005;33(1):60-62.
273. Yang SF, Lin CY, Yang PY, Chao SC, Ye YZ and Hu DN:Increased expression of gelatinase (MMP-2 and MMP-9) in pterygia and pterygium fibroblasts with disease progression and activation of protein kinase C. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:4588-4596.
274. Hu PS, Chang WS, Chou AK, Hsia NY, Hung YW, Lin CW, Wu CW, Huang CY, Wu MF, Liao CH, Tsai CW, Bau DT, Gong CL. The Association of MMP-8 Genotypes with Pterygium. *In Vivo.* 2018;32(1):41-46.
275. Zucchini C, Martinelli M, De Sanctis P, Rodia MT, Matei G, Ugolini G, Montroni I, Ghignone F, Solmi R. Possible gender-related modulation by the ROCK1 gene in colorectal cancer susceptibility. *Pathobiology.* 2015;82(6):252-258.

276. Rankinen T, Church T, Rice T, Markward N, Blair SN, Bouchard C. A major haplotype block at the rho-associated kinase 2 locus is associated with a lower risk of hypertension in a recessive manner: The HYPGENE study. *Hypertension Research*. 2008;31(8):1651-1657.
277. Oguz E, Alasehirli B, Pehlivan Y, Onat AM, Oztuzcu S, Ozkara E, Kisacik B, Camci C, Demiryürek AT. Association between Rho-kinase (ROCK2) gene polymorphisms and Behçet's disease. *Translational Research*. 2012;160(6):428-434.
278. Zee RY, Wang QM, Chasman DI, Ridker PM, Liao JK. Gene variations of ROCKs and risk of ischaemic stroke: The Women's Genome Health Study. *Clinical Science (Lond)*. 2014;126(12):829-835.
279. Tabur S, Oztuzcu S, Oguz E, Korkmaz H, Eroglu S, Ozkaya M, Demiryürek AT. Association of Rho/Rho-kinase gene polymorphisms and expressions with obesity-related metabolic syndrome. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2015;19(9):1680-88.
280. Kaya G, Sivasli E, Oztuzcu S, Melekoglu NA, Ozkara E, Sarikabadayi U, Demiryürek AT. Association of Rho-kinase gene polymorphisms with respiratory distress syndrome in preterm neonates. *Pediatrics & Neonatology*. 2017;58(1):36-42.
281. Rao F, Wessel J, Wen G, Zhang L, Rana BK, Kennedy BP, Greenwood TA, Salem RM, Chen Y, Khandrika S, Hamilton BA, Smith DW, Holstein-Rathlou NH, Ziegler MG, Schork NJ, O'Connor DT. Renal albumin excretion: Twin studies identify influences of heredity, environment, and adrenergic pathway polymorphism. *Hypertension*. 2007;49:1015-1031.
282. Pandey P, Mohammad G, Singh Y, Qadar Pasha MA. ROCK2 and MYLK variants under hypobaric hypoxic environment of high altitude associate with high altitude pulmonary edema and adaptation. *The Application of Clinical Genetics*. 2015;8:257-267.
283. Ross KA. Evidence for somatic gene conversion and deletion in bipolar disorder, Crohn's disease, coronary artery disease, hypertension, rheumatoid arthritis, type-1 diabetes, and type-2 diabetes. *BMC Medicine*. 2011;9:12.
284. Pehlivan Y, Yolbas S, Cetin GY, Alibaz-Oner F, Cagatay Y, Yilmaz N, Oztuzcu S, Donmez S, Ozgen M8, Koca SS, Pamuk ON, Sayarlioglu M, Kisacik B,

- Direskeneli H, Demiryurek AT, Onat AM. Investigation of the association between Rho/Rho-kinase gene polymorphisms and systemic sclerosis. *Rheumatol Int.* 2016;36(3):421-427.
285. Liu K, Li X, Wang J, Wang Y, Dong H, Li J. Genetic variants in RhoA and ROCK1 genes are associated with the development, progression and prognosis of prostate cancer. *Oncotarget.* 2017;8(12):19298-19309.
286. Saracaloglu A, Demiryürek S, Okumus S, Oztuzcu S, Bozgeyik I, Coskun E, Aksoy U, Kaydu E, Erbagci I, Gürler B, Alasehirli B, Demiryürek AT. Towards Novel Diagnostics for Primary Open-Angle Glaucoma? An Association Study of Polymorphic Variation in Ras Homolog Family Member (A, B, C, D) Genes RHOA, RHOB, RHOC, and RHOD. *OMICS: A Journal of Integrative Biology.* 2016;20(5):290-295.
287. Düzen IV, Yavuz F, Vuruskan E, Saracoglu E, Poyraz F, Cekici Y, Alıcı H, Göksülük H, Candemir B, Sucu M, Demiryürek AT. Investigation of leukocyte RHO/ROCK gene expressions in patients with non-valvular atrial fibrillation. *Exp Ther Med.* 2019;18(4):2777-2782.
288. Amano S, Rohan R, Kuroki M, Tolentino M, Adamis AP. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:18–22.
289. Ma HK, Tsai RJ, Chu WK, Kao CH, Chen JK. Inhibition of vascular endothelial cell morphogenesis in cultures by limbal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:1822–1828.
290. Bryan BA, Dennstedt E, Mitchell DC, Walshe TE, Noma K, Loureiro R, Saint-Geniez M, Campaigniac JP, Liao JK, D'Amore PA. RhoA/ROCK signaling is essential for multiple aspects of VEGF-mediated angiogenesis. *FASEB J.* 2010;24(9):3186-3195.
291. Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Collard JG: Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol.* 1999;147:1009-1022.
292. Ahmed Z, Suggate EL, Brown ER, Dent RG, Armstrong SJ, Barrett LB, Berry M, Logan A. Schwann cell-derived factor-induced modulation of the NgR/p75NTR/EGFR axis disinhibits axon growth through CNS myelin in vivo and in vitro. *Brain.* 2006;129:1517-1533.

293. Bertrand J, Di Polo A, McKerracher L. Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal neurons by repeated delivery of cell-permeable C3-like Rho antagonists. *Neurobiol Dis.* 2007;25:65-72.
294. Hu Y, Cui Q, Harvey AR. Interactive effects of C3, cyclic AMP and ciliary neurotrophic factor on adult retinal ganglion cell survival and axonal regeneration. *Mol Cell Neurosci.* 2007;34:88–98.
295. Kakiashvili E, Speight P, Waheed F, Seth R, Lodyga M, Tanimura S, Kohno M, Rotstein OD, Kapus A, Szaszi K. GEF-H1 mediates tumor necrosis factor- α -induced Rho activation and myosin phosphorylation: role in the regulation of tubular paracellular permeability. *J Biol Chem.* 2009;284:11454–11466.
296. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22:1-29.
297. Yamaguchi M, Nakao S, Arita R, Kaizu Y, Arima M, Zhou Y, Kita T, Yoshida S, Kimura K, Isobe T, Kaneko Y, Sonoda KH, Ishibashi T. Vascular normalization by ROCK inhibitor: Therapeutic potential of ripasudil (K-115) eye drop in retinal angiogenesis and hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57:2264-2276.
298. Sijnave D, Van Bergen T, Castermans K, Kindt N, Vandewalle E, Stassen JM, Moons L, Stalmans I. Inhibition of Rho associated kinase prevents pathological wound healing and neovascularization after corneal trauma. *Cornea.* 2015;34:1120-1129.
299. Hollanders K, Van Bergen T, Kindt N, Castermans K, Leysen D, Vandewalle E, Moons L, Stalmans I. The effect of AMA0428, a novel and potent ROCK inhibitor, in a model of neovascular age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:1335-1348.
300. Howe GA, Addison CL. RhoB controls endothelial cell morphogenesis in part via negative regulation of RhoA. *Vasc Cell.* 2012;4:1.
301. El-Fattah MAA, Esmat SM, El-Hadidi HH. The Effect of Phototherapy and Photochemotherapy on the Eye. *Med. J. Cairo Univ.* 2011;79(2):55-59.
302. Bokoch GM. Regulation of innate immunity by Rho GTPases. *Trends Cell Biol.* 2005;15:163–171.
303. Seinen ML, van Nieuw Amerongen GP, de Boer NK, van Bodegraven AA. Rac Attack: Modulation of the Small GTPase Rac in Inflammatory Bowel Disease and Thiopurine Therapy. *Mol Diagn Ther.* 2016;20(6):551-557.

304. Liu J, Xu JH, Xu W, Liang GL, Lou JX, Wang Y, Wen JQ, Cao YB. Bevacizumab as adjuvant therapy in the management of pterygium: a systematic review and Meta-analysis. *Int J Ophthalmol*. 2017;10(7):1126–1133.
305. Amsellem V, Dryden NH, Martinelli R, Gavins F, Almagro LO, Birdsey GM, Haskard DO, Mason JC, Turowski P, Randi AM. ICAM-2 regulates vascular permeability and N-cadherin localization through ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins and Rac-1 signalling. *Cell Commun Signal*. 2014;12:12.



7. EKLER

Ek 1

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU							
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Prerium ile Rho Proteinlerinin Ekspresyonu ve Polimorfizmi Arasındaki İlişkinin Araştırılması					
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		276					
KARAR BİLDİRİMİ	FORMU	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	HAYAT	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	YÜKSELİMLER	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	SEKİLER RANJERİ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	ÖZGÜNLÜK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Karar No: 2017/276		Tarih: 24.07.2017					
<p>Yukarıda bilgileri verilen hayvan deneyleri için aşağıdaki araştırmacıların katılımı gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak aceleyle etik kurulun bilgilendirilip araştırmanın yapılmasının uygun olduğu belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesi masinde etik ve bilimsel amaçlarla bilimsel ve tıbbi uygulamaya katılan etik kurul üyelerinin sayısının yeterli olduğu ile karar verilmiştir.</p> <p>Etik ve Biyetik Kurulları Kurulmasıyla İlgili Yürürlükte Kararında verilen araştırmacıların katılımı için Türkiye İş ve Tıbbi Etik Kurullarının katılımı gerekmektedir.</p>							
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU							
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyoteknoloji Ürünleri Klinik Araştırmaları Hakkında Yürürlükte İyileştirilmiş Uygulamaların Kılavuzu					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. Selma ALAŞEHİRİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Ünvanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma İlişkisi		Katılım *	İmza
Prof. Dr. Selma ALAŞEHİRİ	FARMAKOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mehmet KESKİN	PEDİYATRİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Feriye İSİK	LOGİSTİK ETİKALİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İker SEÇKİNLER	ETİKALİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ramazan İBA	FİZYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yavuzhan ZER	MİKROBİYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Zeynep Aban ÖZLERK	BC PASYANLILARI	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sevil KUL	HEYDİMETLER	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Barış TAŞ	AGİLİ DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ	Gaziantep Üniversitesi Diş Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Cahide ERDOĞAN	FARMAKOLOJİ	Gaziantep Sağlık Bilimleri Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. K.	AVUKAT	Gaziantep Barosu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Recep ÇEK	BANKAÇI	Ziraat Bankası Gaziantep Şube Yöneticisi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
* Toplantıda Bulunan							
Etik Kurul Başkanı:		Elden teslim aldım.					
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Selma ALAŞEHİRİ							
İmza:		A. Turay Demirel					
		Not: Etik kurul başkanı, başkanın yer almadığı her sayfaya imza atmaktadır.					

Ek 2

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARASTIRMANIN AÇIK ADI	Rac2 ve Rac3 proteinlerinin ekspresyonu ile pterjiom hastalığı arasındaki ilişkinin araştırılması.
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	312
KARAR BELGELERİ	FORM İLAN <input type="checkbox"/>
	YILLIK BİLDİRİM <input type="checkbox"/>
	SONUÇ RAPORU <input type="checkbox"/>
	ÇEVRESELİK BİLDİRİMLERİ <input type="checkbox"/>
	DEĞER <input type="checkbox"/>
Karar No:2017.312	Tarih: 11.09.2017
Yakında bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırma süreci tamamlandı. Amac, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak gerçekleştirilmiş ve uygun bulunmuş olan araştırmanın/gözetiminin başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıda katılan etik kurul üyelerinin tamamının salt çoğunluğu ile karar vermiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yürürlükte bulunan kararlarında yer alan araştırmalar/gözetimler için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yürürlükte, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BASKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. B. ALAŞEHİRLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişkisi		Karar*		İmza
Prof. Dr. B. ALAŞEHİRLİ	FARMAKOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	F <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mahmut KEŞİSİN	PEDİYATRİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	F <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Feriit İŞİK	GÖĞÜS CERRAHI	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	F <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İker SEÇKİNER	ÜRÖLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	F <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ramazan İBA	FİZYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	F <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yasemin ZER	MİKROBİYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	F <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Zeynep Aydin ÖZTÜRK	İÇ HASTALIKLAR	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	F <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Seydi KÜL	BIYOSTATİSTİK	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	F <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Baran TAŞ	AĞIZ DİŞ ve ÇENE CERRAHİSİ	Gaziantep Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	F <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Cahide ERGÖRAN	FARMAKOLOJİ	Gaziantep İ. Sağlık Müdürlüğü	F <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Evrop ÇELİK	AVUKAT	Gaziantep Barosu	F <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Beyza TÜRK	BANKAÇI	Ziraat Bankası Gaziantep Bölge Yönetimi	F <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

*Toplantıda Bakımın

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. B. ALAŞEHİRLİ
İmza:

E İden teslim aldım.

Prof. Dr. A. Turay Demirelek

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

8. ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Manisa, Kula ilçesinde doğdum. İlkokulu Manisa, Kula Kenan Evren İlköğretim Okulu'nda; ortaöğretim ve liseyi Manisa, Salihli Sekine Evren Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2012 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun oldum. Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP, 2012 Aralık) ile Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalına araştırma görevlisi olarak atandım. 2014 yılında Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, tezli yüksek lisans programından mezun olup doktora eğitimine başladım. Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında halen araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

