



T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PTERJİUMDA CRABP2, FABP5 ve PPAR α GENLERİNİN ROLÜ

Hazırlayan
Sümeyya Deniz AYBEK

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı
Doktora Tezi

Danışman
Prof. Dr. Hacı Ömer ATEŞ

TOKAT – 2020



T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PTERJİUMDA CRABP2, FABP5 ve PPAR α GENLERİNİN ROLÜ

Hazırlayan
Sümeyya Deniz AYBEK

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı
Doktora Tezi

Danışman
Prof. Dr. Hacı Ömer ATEŞ

TOKAT – 2020
Her hakkı saklıdır

PTERJİUMDA CRABP2, FABP5 ve PPARD GENLERİNİN ROLÜ

Tezin Kabul Ediliş Tarihi: .. / .. / 2020

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Başkan :

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

Bu tez, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve sayılı oturumunda belirlenen jüri tarafından kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü:

Mühür
İmza

T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

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

(15/09/2020)

Sümeyya Deniz AYBEK

İmza

TEŞEKKÜR

Akademik eğitimim süresince engin bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, manevi desteğini her zaman hissettiğim Ana Bilim Dalı Başkanımız ve danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Hacı Ömer ATEŞ' e,**

Eğitimim süresince bilgilerinden her zaman faydalandığım Ana Bilim Dalı Hocalarımız, Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ ve Dr. Öğr. Üyesi Nihan BOZKURT'a, Biyoistatistik Ana Bilim Dalı Hocamız, Dr. Öğr. Üyesi Osman DEMİR'e, Göz Hastalıkları Ana Bilim Dalı Hocamız, Doç. Dr. Helin DENİZ DEMİR'e,

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince bilgi ve desteklerini esirgemeyen, Dr. Saime SEZER SONDAŞ ve Arş. Gör. Emel ENSARİ'ye, güzel anılar paylaştığım ve manevi desteğini hep hissettiğim sevgili arkadaşım Msc. B10. Kübra ŞAHİN'e,

Hayatımın her anında bana en büyük sevgi ve hoşgörüyü veren, hayallerimin ardından gitmemde bana en büyük yardımı sağlayan, emeklerini ödeyemeyeceğim **Babama, Anneme, canım Ablama ve sevgili Eşine, canımın içi kardeşlerim Süheyla Pınar ÇELİK ve Mustafa Samet ÇELİK'e, neşe kaynağım yeğenlerim Ebrar, Eslem ve Talha'ya, eşim Ünsal AYBEK'e ve kıymetli ailesine,**

Teşekkürlerimi sunarım...

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), Araştırma Destek Programları Başkanlığı (ARDEB), 1001 – Bilimsel Ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı, Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu tarafından 215S692 no'lu proje ile desteklendi.

Sümeyya Deniz AYBEK

Tokat, Eylül 2020

ÖZET

PTERJİUMDA CRABP2, FABP5 VE PPAR δ GENLERİNİN ROLÜ

Pterjium, anormal fibrovasküler proliferasyon, matriks remodelizasyonu ve invazyonuyla karakterize edilen kanat şeklinde fibrovasküler bir dokudur. Pterjiumun patogenezi hala bilinmemektedir. Retinoik asit (RA), hücre içerisinde iki farklı lipit bağlayıcı protein olan hücrel retinoik asit bağlayıcı protein 2 (CRABP2) ve yağ asidi bağlayıcı protein 5 (FABP5) tarafından taşınmaktadır. RA sinyalleri tümör baskılayıcı yolak olan RA reseptörü (RAR) ve tümör ilerletici yolak olan proliferatör aktive edici reseptör β/δ (PPAR β/δ) aracılı yolak olmak üzere iki farklı yol izler. RA sinyallerinde görülen bozukluklar Pterjiumun gelişimine ve/veya nüksüne katkıda bulunabilir. Çalışmamızın amacı primer ve nüks pterjium dokusunda CRABP2, FABP5 ve PPAR δ genlerinin mRNA ve protein ekspresyonunu ve CRABP2/FABP5 oranını belirlemektir.

Çalışmamızda cerrahi operasyon sırasında 30 hastadan pterjium ve sağlıklı konjonktiva dokusu elde edildi. Elde edilen pterjium ve normal konjonktiva dokularında CRABP2, FABP5 ve PPAR δ 'nin mRNA ve protein ekspresyonları gerçek zamanlı PZR ve western blot yöntemleri kullanılarak değerlendirildi.

Primer pterjium ve normal konjonktiva dokuları karşılaştırıldığında CRABP2 ve FABP5 genlerinin ekspresyonu değişmemiştir ($1,03\pm 0,22$ - fold change, $p=0,895$; $1,02\pm 0,19$ $p=0,917$, sırasıyla). Nüks pterjium ve normal konjonktiva dokuları karşılaştırıldığında ise CRABP2 ve FABP5 genlerinin ekspresyonu azalmıştır ($0,71\pm 0,39$ - fold change, $p=0,577$; $0,88\pm 0,43$ $p=0,577$, sırasıyla). Hem primer hem de nüks pterjium dokusu normal konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında PPAR δ 'nin

ekspresyonu değişmemiştir (1,08±0,28-kat değişikliği, p=0,784; 1,10±0,71 p=0,095, sırasıyla).

Pterjium etiyopatogenezinin anlaşılması, erken aşamalarda pterjium gelişiminin engellenmesinde daha umut verici tedavilerin bulunmasına yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: CRABP2, CRABP2/FABP5 oranı, FABP5, PPAR β/δ , retinoik asit sinyal yolağı



ABSTRACT

THE ROLE OF CRABP2, FABP5, AND PPARD GENES IN PTERYGIUM

Pterygium is a wing shaped fibrovascular tissue, characterized by abnormal fibrovascular proliferation, matrix remodeling, and invasion. The pathogenesis of pterygium remains unknown. Retinoid acid (RA) is carried by two different lipid binding proteins cellular retinoic acid-binding protein 2 (CRABP2) and fatty acid-binding protein 5 (FABP5) in cells. The RA signalling can be transduced by two pathways that are mediated by RA receptors (RAR) as a tumor-suppressive pathway and peroxisome proliferator activated receptors β/δ (PPAR β/δ) as a tumor-promoting pathway. The deregulated RA signaling may also contribute to the development and/or recurrence of pterygium. The aim of our study was to determine mRNA and protein expressions of CRABP2, FABP5, PPARD and ratio of CRABP2/FABP5 in primer and recurrent pterygium tissues.

In our study, pterygial and healthy conjunctival tissues were obtained from 30 patients undergoing pterygium excision. CRABP2, FABP5, and PPARD mRNA and protein expression were assessed using Real-time PCR and Western blotting through examination of excised specimens from pterygium and normal conjunctival tissues.

The expressions of CRABP2 and FABP5 were not altered when primary pterygium tissues compared normal conjunctival tissues (1,03 \pm 0,22- fold change, p=0,895; 1,02 \pm 0,19 p=0,917, respectively). Whereas the expressions of CRABP2 and FABP5 were decreased when recurrent pterygium tissues compared normal conjunctival tissues (0,71 \pm 0,39- fold change, p=0,577; 0,88 \pm 0,43 p=0,577, respectively). The expression of PPARD wasn't altered when both primary and recurrent pterygium tissues

compared normal conjunctival tissues ($1,08 \pm 0,28$ -fold change, $p=0,784$; $1,10 \pm 0,71$ $p=0,095$, respectively).

Understanding etiopathogenesis of pterygium will aid in find of more promising treatments to prevent pterygium in earlier stages.

Key words: CRABP2, CRABP2/FABP5 ratio, FABP5, PPAR β/δ , retinoic acid signaling pathway



İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ETİK SÖZLEŞME | i |
| TEŞEKKÜR | ii |
| ÖZET | iii |
| ABSTRACT..... | v |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| TABLolar LİSTESİ | x |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | xi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ..... | xiii |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 4 |
| 2.1. PTERJİUM | 4 |
| 2.1.1. Pterjiumun Anatomisi ve Kliniği..... | 4 |
| 2.1.2. Epidemiyoloji | 7 |
| 2.1.3. Histopatoloji | 8 |
| 2.1.4. Etiyoloji | 8 |
| 2.1.4.1. Ultraviyole Işını..... | 8 |
| 2.1.4.2. Kalıtım..... | 11 |
| 2.1.4.3. Heterozigotluk Kaybı ve Mikrosatellit İnstabilite | 11 |
| 2.1.4.4. Viral Enfeksiyonlar | 12 |
| 2.1.5. Patogenez..... | 13 |
| 2.1.5.1. İnflamasyon ve İmmünolojik Mekanizmalar | 13 |
| 2.1.5.2. Hücresel Proliferasyon ve Hücre Göçü | 14 |
| 2.1.5.3. Anjiogenezis | 15 |
| 2.1.5.4. Epitelyal-Mezenşimal Değişim | 16 |
| 2.1.5.5. Hücre Dışı Matriks Proteinleri ve Hücre Dışı Matriksin Remodalizasyonu | 17 |
| 2.1.5.6. Apoptozis | 18 |

| | |
|---|----|
| 2.1.5.7. <i>Değişmiş Limbal Bazal Epitelyal Kök Hücre</i> | 19 |
| 2.1.5.8. <i>Moleküler Genetik Değişimler</i> | 19 |
| 2.1.6. Tedavi | 20 |
| 2.2. VİTAMİN A | 22 |
| 2.3. RETİNOİK ASİT | 23 |
| 2.3.1. Retinoik Asidin Biyolojik Aktiviteleri | 24 |
| 2.3.2. Retinoik Asit Sinyal Yolağı | 25 |
| 2.3.3. Retinoik Asidin Hastalıklarla İlişkisi | 27 |
| 2.4. HÜCRESEL RETİNOİK ASİT BAĞLAYICI PROTEİN 2 | 28 |
| 2.5. YAĞ ASİDİ BAĞLAYICI PROTEİN 5 | 29 |
| 2.6. PEROKSİZOM PROLİFERATÖR AKTİVE EDİCİ RESEPTÖR D | 32 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 35 |
| 3.1. GEREÇ | 35 |
| 3.1.1. Materyal | 35 |
| 3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler | 35 |
| 3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler | 36 |
| 3.1.4. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanışı | 37 |
| 3.2. YÖNTEM | 38 |
| 3.2.1. Dokuların Histopatolojik İncelemesi | 38 |
| 3.2.2. Dokulardan RNA İzolasyonu | 38 |
| 3.2.3. İzole Edilen RNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Tayini | 39 |
| 3.2.4. cDNA Sentezi | 40 |
| 3.2.5. cDNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi | 41 |
| 3.2.6. Gerçek Zamanlı PZR | 41 |
| 3.2.6.1. <i>Standart Eğri ve Amplifikasyon Verimliliği</i> | 42 |
| 3.2.6.2. <i>CRABP2, FABP5 ve PPARD Genlerinin İfade Analizi</i> | 43 |
| 3.2.7. Protein İzolasyonu | 45 |
| 3.2.8. Protein Miktarlarının Ölçülmesi | 46 |
| 3.2.9. Western Blot Analizi | 46 |
| 3.2.9.1. <i>CRABP2, FABP5 ve PPARD Proteinlerinin Analizi</i> | 47 |
| 3.2.10. Verilerin İstatistik Analizi | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI | 50 |
| 4.1. ÇALIŞMA GRUPLARI | 50 |
| 4.2. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME | 50 |
| 4.3. REAL TIME-PZR | 51 |
| 4.3.1. Pterjium ve Konjonktiva Dokularından Elde Edilen Total RNA'ların Kalitatif İncelenmesi | 51 |
| 4.3.2. Standart Eğri ve Amplifikasyon Verimliliği İnceleme Sonucu | 51 |
| 4.3.3. Real Time-PZR Sonuçları..... | 54 |
| 4.3.4. Real Time-PZR Sonuçlarının İstatistiksel Analizi..... | 56 |
| 4.4. WESTERN BLOT | 64 |
| 4.4.1. Western Blot Sonuçlarının İstatistiksel Analizi | 64 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 67 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 75 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 87 |

TABLOLAR LİSTESİ

| <u>Tablo No:</u> | <u>Sayfa No:</u> |
|--|-------------------------|
| Tablo 3.1. cDNA Sentezinde 1. Aşamada Kullanılan Bileşenler ve Miktarları..... | 40 |
| Tablo 3.2. cDNA Sentezinde Kullanılan 2. Aşama Bileşenler ve Miktarları | 41 |
| Tablo 3.3. Gerçek Zamanlı PZR İşleminde Kullanılan Primerler ve Sekansları | 43 |
| Tablo 3.4. Gerçek Zamanlı PZR Bileşenleri..... | 44 |
| Tablo 3.5. Gerçek Zamanlı PZR Koşulu | 44 |
| Tablo 3.6. Erime Eğrisi PZR Koşulu..... | 44 |
| Tablo 3.7. Protein Örneklerinin Hazırlanmasında Kullanılan Reaktifler ve Miktarları..... | 47 |
| Tablo 3.8. Western Blot İşleminde Kullanılan Antikorlar ve Özellikleri..... | 48 |
| Tablo 4.1. Primer ve Nüks Pterjium Dokuları Normal Konjonktiva Dokularıyla Karşılaştırıldığında CRABP2, FABP5 ve PPARD Genlerinin mRNA Ekspresyon Seviyelerinin İstatistiksel Analizi | 63 |
| Tablo 4.2. Primer ve Nüks Pterjium Dokuları Normal Konjonktiva Dokularıyla Karşılaştırıldığında CRABP2, FABP5 ve PPARD Protein Seviyelerinin İstatistiksel Analizi | 66 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| <u>Şekil No :</u> | <u>Sayfa No:</u> |
|---|-------------------------|
| Şekil 2.1. Pterjiumun Anatomik Bölümleri | 5 |
| Şekil 2.2. Pterjiumun Sınıflandırılması | 6 |
| Şekil 2.3. Pterjium Gelişiminde UV- İlişkili Mekanizma | 10 |
| Şekil 2.4. Retinoik Asit Sinyal Yolağı | 26 |
| Şekil 2.5. CRABP2 Geninin Genomik Lokalizasyonu | 28 |
| Şekil 2.6. FABP5 Geninin Genomik Lokalizasyonu | 31 |
| Şekil 2.7. PPARD Geninin Genomik Lokalizasyonu | 33 |
| Şekil 4.1. Pterjium Dokusuna Ait Histopatolojik Görüntü..... | 50 |
| Şekil 4.2. Pterjium ve Normal Konjonktiva Dokularından Elde Edilen Total RNA'ların Jel Görüntüsü..... | 51 |
| Şekil 4.3. Amplifikasyon Verimliliğini Hesaplamak İçin GAPDH Geninin Standart Eğrisi | 52 |
| Şekil 4.4. Amplifikasyon Verimliliğini Hesaplamak İçin CRABP2 Geninin Standart Eğrisi | 52 |
| Şekil 4.5. Amplifikasyon Verimliliğini Hesaplamak İçin FABP5 Geninin Standart Eğrisi | 53 |
| Şekil 4.6. Amplifikasyon Verimliliğini Hesaplamak İçin PPARD Geninin Standart Eğrisi | 53 |
| Şekil 4.7. GAPDH Genine Ait Amplifikasyon Eğrisi (A) ve Erime Piki (B) | 54 |
| Şekil 4.8. CRABP2 Genine Ait Amplifikasyon Eğrisi (A) ve Erime Piki (B)..... | 55 |
| Şekil 4.9. FABP5 Genine Ait Amplifikasyon Eğrisi (A) ve Erime Piki (B)..... | 55 |
| Şekil 4.10. PPARD Genine Ait Amplifikasyon Eğrisi (A) ve Erime Piki (B) | 56 |
| Şekil 4.11. Primer ve Nüks Pterjium Dokuları Normal Konjonktiva Dokuları İle Karşılaştırıldığında CRABP2 Geninin Ekspresyon Seviyesi Grafiği | 58 |
| Şekil 4.12. Primer ve Nüks Pterjium Dokuları Normal Konjonktiva Dokuları İle Karşılaştırıldığında FABP5 Geninin Ekspresyon Seviyesi Grafiği | 59 |
| Şekil 4.13. Primer ve Nüks Pterjium Dokuları Normal Konjonktiva Dokuları İle Karşılaştırıldığında PPARD Geninin Ekspresyon Seviyesi Grafiği | 60 |

- Şekil 4.14.** Primer ve Nüks Pterjium Dokuları Normal Konjonktiva Dokuları İle Karşılaştırıldığında CRABP2/FABP5 Ekspresyon Seviyesi Grafiği..... 58
- Şekil 4.15.** Primer Pterjium ve Normal Konjonktiva Dokuları Karşılaştırıldığında CRABP2 ve FABP5 Genlerinin Ekspresyon Paternlerinin Dağılım Grafiği 59
- Şekil 4.16.** Nüks Pterjium ve Normal Konjonktiva Dokuları Karşılaştırıldığında CRABP2 ve FABP5 Genlerinin Ekspresyon Paternlerinin Dağılım Grafiği 59
- Şekil 4.17.** Primer ve Nüks Pterjium Dokuları Normal Konjonktiva Dokularıyla Karşılaştırıldığında CRABP2, FABP5 ve PPARD Proteinlerinin Seviyeleri..... 61

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ**Simgeler**

| | |
|------------|--------------------|
| °C | : Santigrat Derece |
| µg | : Mikrogram |
| µl | : Mikrolitre |
| bç | : Baz Çifti |
| dk | : Dakika |
| gr | : Gram |
| kb | : Kilo Baz |
| kDa | : Kilo Dalton |
| mg | : Miligram |
| ml | : Mililitre |
| mM | : Milimolar |
| rpm | : Dakikadaki Devir |
| sn | : Saniye |
| U | : Ünite |
| V | : Volt |

Kısaltmalar

| | |
|--------------------------------------|---|
| CRABP2 | : Hücresel Retinoik Asit Bağlayıcı Protein 2 |
| DNA | : Deoksiribonükleik Asit |
| ECM | : Hücre Dışı Matriks |
| FABP5 | : Yağ Asidi Bağlayıcı Protein 5 |
| GAPDH | : Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz |
| HPV | : İnsan Papiloma Virüsü |
| Hsp | : Isı Şok Proteini |
| HSV | : Herpes Simpleks Virüsü |
| IFN- γ | : İnterferon α |
| IL | : İnterlökin |
| iLBP | : Hücreler Arası Lipit Bağlayıcı Proteinler |
| LATS1 | : Büyük Tümör Baskılayıcı Kinaz 1 |
| LOH | : Heterozigozite Kaybı |
| MI | : Mikrosatellit İnstabilite |
| MMP | : Matriks Metalloproteinazlar |
| mTORC1 | : Rapamisin Kompleks 1 |
| PCNA | : Prolifere Hücre Nükleer Antijeni |
| PPARβ/δ | : Peroksizom Proliferatör Aktive Edici Reseptör |
| RA | : Retinoik Asit |

| | |
|---------------------------------|--|
| RAR | : Retinoik Asit Reseptörleri |
| RARE | : Retinoik Asit Cevap Elementi |
| RNA | : Ribonükleik Asit |
| ROS | : Reaktif Oksijen Türleri |
| RT-PZR | : Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| S1P | : Sfingozin 1 Fosfat |
| TGF- β1 | : Tümör Büyüme Faktör β 1 |
| TGF-β | : Transforme Edici Büyüme Faktörü |
| TIMP | : Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri |
| TNFα | : Tümör Nekroz Faktör α |
| UV | : Ultraviyole |
| VEGF | : Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü |
| α-SMA | : Alfa Düz Kas Aktini |

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Eski Yunancada kanat anlamına gelen ‘pterygion’ kelimesinden köken alan pterjium, palpebral aralıkta bulber konjonktivadan korneaya doğru göç eden üçgen şeklinde dejeneratif hiperplastik bir doku olup, yaygın olarak görülen fibrovasküler bir oküler yüzey hastalığıdır. Dünya genelinde yaygın olarak görülen pterjium özellikle tropikal ve subtropikal bölgelerdeki popülasyonları etkilemektedir (Salman ve Mansour, 2011). Bu hastalık gözde irritasyona, kozmetik problemlere, astigmata ve görme bozukluklarına neden olabilmektedir (Lee ve ark., 2014). Pterjium gelişimi hala tartışmalı bir konudur ve etiyojisi tam olarak bilinmemektedir. Ancak, ultraviyole ışığına (UV) maruziyetin bu hastalığın etiyojisindeki anahtar olaylardan biri olabileceği düşünülmektedir. Pterjium dokusu, hücrel proliferasyon, invazyon, rezeksiyon sonrası nüks gibi özellikler göstermesinden dolayı premalignant bir doku olarak da tanımlanmaktadır (Girolamo ve ark., 2000). Pterjium için medikal tedaviler kısıtlıdır ve bu tedavi yöntemleri yalnızca semptomların giderilmesine yöneliktir. Pterjium pupili kaplamışsa, görmede bir engel veya akut semptomlar varsa mevcut tedavi yöntemleri; konjonktival otogreft, konjonktival flep kaydırması, açık sklera yöntemi, amniyotik membran transplantasyonudur. Cerrahi travma ve ameliyat sonrası inflamasyonun pterjium nüksüne sebep olduğu literatürde sıkça görülmektedir. Pterjium nüksünün engellenmesine dair birçok çalışma yapılmış, anti-inflamatuvar, anti-metabolik ve fibrovasküler büyümeyi engelleyici bazı ilaçlar ise bu amaç için kullanılmıştır. Bu ilaçlar pterjium gelişimini engellemiş ancak yan etkilerinden dolayı uzun dönemde tatmin edici bulunmamıştır (Zou ve Zhang, 2010). Pterjiumda, etiyojenik

mekanizmanın anlaşılması özellikle nüks vakalarında daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

Vitamin A ve onun biyolojik olarak aktif türevi olan retinoik asit (RA), hücre farklılaşması, proliferasyonun inhibisyonu, apoptoz ve hücre döngüsü gibi birçok biyolojik süreçte anahtar düzenleyicilerdir (Michalik ve Wahli, 2007). RA, hücre içerisinde iki farklı yol izlemekte ve bu yollara bağlı olarak hücresel ekspresyonda birbirine zıt sonuçlar meydana getirmektedir. RA, hücre içerisinde hücreler arası lipit bağlayıcı proteinler (iLBP) ile ilişkili olarak taşınmaktadır. Hücresel retinoik asit bağlayıcı protein 2 (CRABP2) ve yağ asidi bağlayıcı protein 5 (FABP5), RA'yı sitozol içinden nükleus içindeki nükleer reseptörlere taşımaktadır. CRABP2, RA'yı retinoik asit reseptörlerine (RAR), FABP5 ise RA'yı, peroksizom proliferatör aktive edici reseptöre (PPAR β/δ) taşımaktadır. RA'nın, RAR'lara mı yoksa PPAR β/δ 'ya mı taşınacağı sitozoldeki CRABP2'nin FABP5'e oranına bağlıdır. RAR'lar aktive olduğunda, apoptozu, hücre döngüsünün durdurulmasını ve hücre farklılaşmasını tetikler, böylelikle tümör büyümesi baskılanır, PPAR β/δ aktifleştğinde ise proliferasyon ve hücrelerin hayatta kalması uyarılmakta ve tümör gelişimi ilerlemektedir (Vreeland ve ark., 2014).

Klinik uygulamalarda, kutanöz T hücreli lenfoma ve akut promiyelositik lösemnin tedavisinde RA başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 2018). Ancak farklı kanser türlerinde retinoid sinyallerinde bazı anormallikler gözlenmiştir. Bu anormallikler retinoid reseptörlerinin seviyesindeki değişikliklerden ve retinoid metabolizmasında görevli proteinlerin ekspresyonundaki değişimlerden kaynaklanabilmektedir. Retinoid sinyalindeki bu değişimler tümör hücrelerini etkileyebilir ve kanser tedavisinde kullanılan retinoidlerin etkisini değiştirebilir (Cai ve

Gudas, 2009). Girolama ve ark.'ları, kültüre edilmiş insan pterjium epitelyal hücrelerinin UV-B ile uyarımı sonrasında, interlökin (IL)-6 ve IL-8 sitokinlerinin, interferon α (IFN- α) ve RA tarafından inhibe edilebileceğini bulmuşlardır. Aynı zamanda, bazı araştırmacılar topikal IFN- α ve RA'yı pterjiuma benzer özellikler taşıyan primer ve nüks korneal/konjonktival neoplazilerin tedavisinde hiçbir yan etki olmaksızın başarılı bir şekilde kullanmışlardır (Girolama ve ark., 2006). Ancak pterjium üzerinde RA ve IFN- α 'nın nasıl bir etki gösterdiği bu çalışmalarla tam olarak anlaşılamamıştır.

Bu çalışma, primer pterjium, nüks pterjium ve normal konjonktival dokularda retinoik asit sinyal yolağında görevli olan CRABP2, FABP5 ve PPAR β/δ 'nin mRNA ve protein ekspresyonlarını belirlemek, pterjium gelişiminde ya da nüksünde bu genlerin bir rolü olup olmadığını anlayabilmek ve pterjiumun tedavisine yönelik gelecekte yapılabilecek çalışmalara ışık tutabilmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. PTERJİUM

Pterjium, kornea içine transforme olmuş konjonktival dokunun aşırı büyümesiyle oluşan kanat şeklinde fibrovasküler bir dokudur ve oftalmoheliosis olarak bilinen güneş ışığı ile ilişkili göz hastalıkları ailesinin bir üyesidir (Kim ve ark., 2014; Salman ve Mansour, 2011). Yunanca kanat anlamına gelen pterygos kelimesinden köken alan pterjiumun tanımı yüzyıllar önce Hipoccrates, Galen ve Celcus tarafından yapıldı (<https://www.aao.org>). Bowman's tabakasının degradesyonu ve elastozeisinden dolayı dejeneratif bir lezyon olarak düşünölen pterjium günümüzde proliferatif bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Oftalmolojistler, yavaş ilerlemesinden dolayı pterjiumu benign bir lezyon olarak da görmekte-dirler (Chui ve ark., 2011).

2.1.1. Pterjiumun Anatomisi ve Kliniği

Pterjiumun anatomik bölümleri;

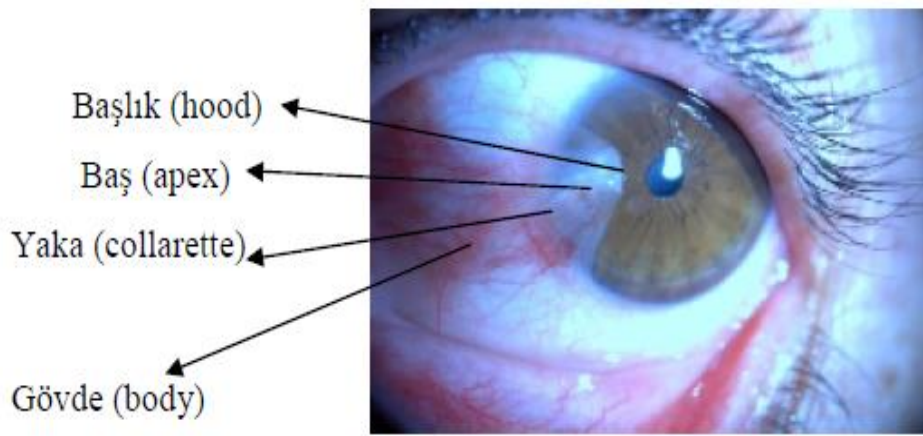
Gövde: Limbus ve kantus arasında uzayan skleral kısımdır.

Yaka: Lezyonun limbal kısmıdır.

Baş (apeks): Kornea üzerindeki apikal kısmıdır.

Başlık: Apeks etrafında, kornea epitelinde görölen, gri, damarsız, hilâl şeklindeki kısmıdır ve pterjium gelişiminin ilk işaretidir (Şekil 2.1.) (Karagöz 2009; Ca'rdenas-Cantu' ve ark., 2014).

Pterjium dokusunun baş kısmı korneaya sıkıca bağlanırken gövde kısmı zayıf olarak yapışmaktadır ve bu durum pterjium dokusunu, psödopterjiumlardan ayırmada önemli bir durumdur (Buratto ve ark., 2000). Pterjium dokusu, interpalpebral fissür bölgesinde daha yaygın görülmektedir. Nazal ya da temporal olmakla birlikte bazen her iki tarafta da meydana gelebilir ancak nazal bölgede daha sık rastlanmaktadır (<https://www.aao.org>).

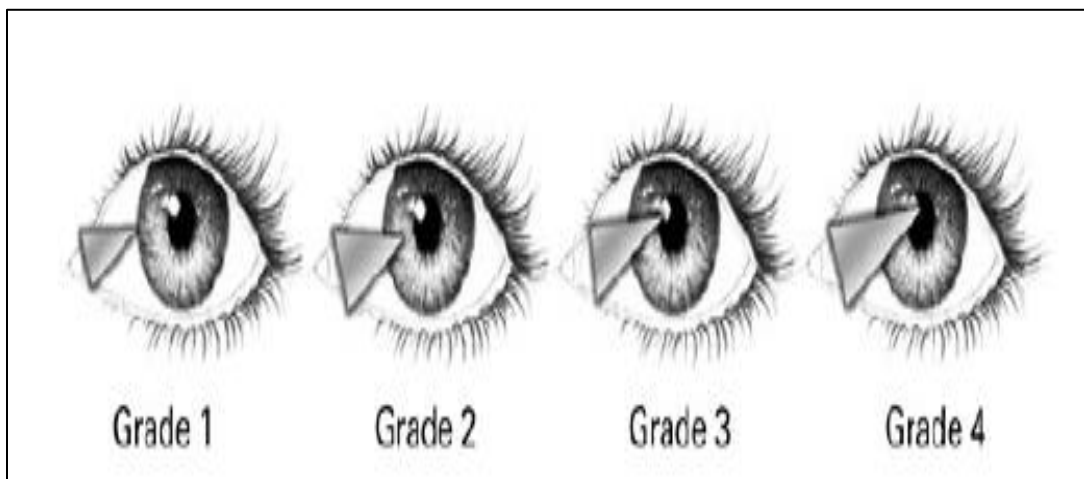


Şekil 2.1. Pterjiumun Anatomik Bölümleri (Karagöz, 2009)

Biyomikroskop ile pterjium dokusu incelendiğinde, bu doku 4 duruma göre derecelendirilmiştir:

- Derece 1: Fibrovasküler dokunun limbusa ulaşması,
- Derece 2: Fibrovasküler dokunun yaklaşık 2 mm kadar korneayı örtmesi,
- Derece 3: Fibrovasküler dokunun pupil kenarına ulaşması,
- Derece 4: Fibrovasküler dokunun pupili aşmasıdır (Şekil 2.2.) (Wanzeler ve ark., 2019).

Erken aşamada, pterjium interpalpebral fissürde, limbusa yakın bulbal konjonktiva üzerinde yükselen bir et kitlesi olarak ortaya çıkmaktadır. Pterjium ve bitişik kornea üzerinde tıkanmış radyal damarlar görülmektedir ve bu damarlar genellikle bu dokunun hızlı bir büyüme periyodunun içinde olduğunun işaretidir. Pterjium dokusu, limbusa doğru genişledikçe bulbar konjonktiva da bu oranda gerilmektedir (Ginger-Eke ve ark., 2018). Korneanın üzerine doğru pterjiumun büyümesi irritasyon, yanma, kızarıklık, gözyaşı ve yabancı cisim batma hissi gibi semptomlar görülmesine sebep olmaktadır. Pterjium görme eksenini engellediği için astigmatı da önemli derecede uyarmaktadır (Chen ve ark., 2006). Astigmatizm sıklıkla düzensizdir ve görmeye azalmaya neden olmaktadır. Ciddi vakalarda, simplefaron oluşumu oküler hareketliliği sınırlandırabilir ve bu durum diplopi ile sonuçlanabilir. Uzun zamandır var olan lezyonlarda süperfisial korneada demir depolanması sonucu stocker çizgisi olarak bilinen bir yapı meydana gelebilmektedir (Ginger-Eke ve ark., 2018). Pterjium, baskın olarak insanlarda görülmekle birlikte hayvanlarda da pterjium benzeri lezyonların olduğu rapor edilmiştir (Girolamo ve ark., 2006).



Şekil 2.2. Pterjiumun Sınıflandırılması (Wanzeler ve ark., 2019)

2.1.2. Epidemiyoloji

Pterjium, ekvatorun 40° güney ve 40° kuzey enlemleri arasında kalan bölgede yaygın olarak görülmektedir. Bu hastalığın prevalansı, ekvatoryal bölgede %22'den daha fazlayken 40°nin altındaki enlemlerde %2'den daha azdır (Chen ve ark., 2006). Pterjiumun dünyadaki prevalansı %10,2 olarak rapor edilmiştir. Afrika, Avrupa ve Avustralya'da yapılan bir çalışmada pterjium prevalansının %0,8 ile %11,7 arasında değiştiği görülmüştür. Güneş ışığına maruziyet, ileri yaş, ırk, sosyal durum, meslek, eğitim durumu ve cinsiyet gibi çeşitli risk faktörlerinin bu hastalık ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Ginger-Eke ve ark., 2018). Pterjiumun erkekler arasındaki prevalansı kadınlardakinden daha yüksektir (sırasıyla, %14,5 ve %13,6) (Liu ve ark., 2013). Ülkemizde yapılan bir çalışmada pterjiumlu hastaların %62,5'inin erkek, %37,5'inin kadın, hastaların yaş ortalamalarının ise 42,8±12,9 olduğu bulunmuştur (Gökmen ve Yeşilirmak, 2019). Genç yetişkinlerde bu hastalığın daha sık görüldüğü, 15 yaşın altında ise nadir olarak görüldüğü bildirilmiştir (Wanzeler ve ark., 2019). Nijerya, Güney Hindistan ve Çin'in güneybatısında içeride çalışan işçilere göre dışarda çalışan işçiler arasında pterjium prevalansının daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Lu ve ark., 2017). Günlük ortalama bir veya daha fazla saat güneş ışığına maruz kalmanın, pterjium gelişimi için yüksek derecede risk oluşturduğu bulunmuştur (Chen ve ark., 2006). Kuzey Amerika'da yapılan bir çalışmada, siyah ırkta pterjium görülme sıklığının 2,5 ile 3 kat daha yüksek olduğu görülmüş, toz ve kum gibi çevresel faktörler pterjium gelişimi ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Bu maddelerin, gözdeki inflamatuvar yanıtı artırarak pterjium gelişimine neden olabileceği ileri sürülmüştür (Ginger-Eke ve ark., 2018).

2.1.3. Histopatoloji

Histolojik olarak pterjium, atrofik konjonktival epitelyum ve yüksek derecede vaskülarize olmuş hipertrofik ve elastatik dejeneratif bir doku kitlesi ile karakterize edilmektedir. Pterjiumun subepitelyal konnektif dokusu elastodistrofinin (elastik fiberlerdeki dejeneratif değişiklikler) yanında elastodisplazide (elastik fiberlerin olgunlaşamaması) göstermektedir. Bu bulgular elastin metabolizmasındaki bozulmaların pterjium patogenezinde dahil olabileceğini düşündürmektedir (Perez-Rico ve ark., 2014). Pterjium dokusunda lenfosit, nötrofil ve mast hücrelerinden oluşan inflamatuvar hücre infiltrasyonu dikkat çekmektedir (Girolamo ve ark., 2006). Epitelyal-mezenşimal değişimin kanıtı olarak, pterjium örneklerinde fibrovasküler bir stroma görülmektedir. Bazı örneklerde ise amorf bazofilik materyallere rastlanmaktadır bu materyaller sıklıkla stroma içerisindeki elastik değişimlerle ilişkilendirilmektedir (Chui ve ark., 2011). Pterjium ekzisyonundan sonraki yara iyileşmesi sıklıkla aşırı fibrozise yol açarak bu hastalığın nüksüne neden olmaktadır. Primer pterjiyuma göre nüks pterjiyuma fibrovasküler büyüme çok daha yoğun olarak görülmektedir (Nuwormegbe ve ark., 2017).

2.1.4. Etiyoloji

2.1.4.1. Ultraviyole Işını

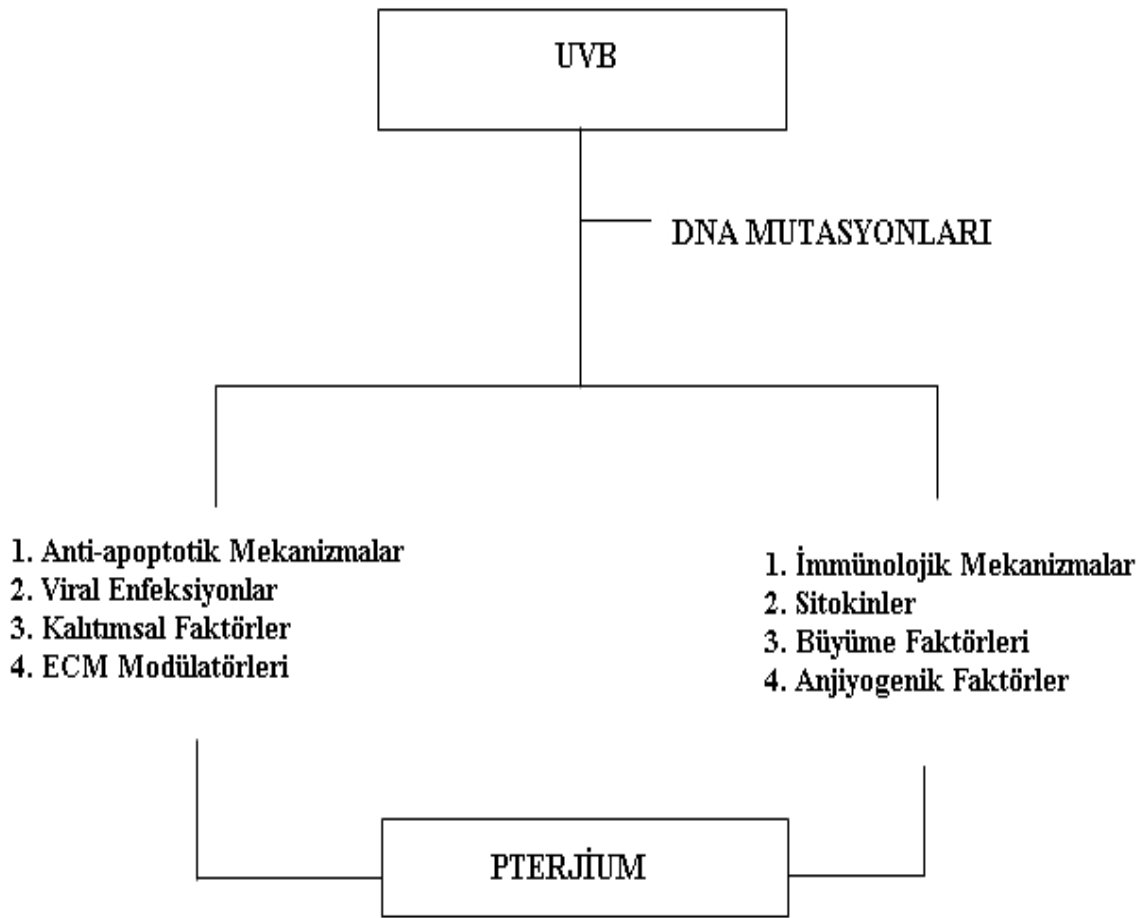
İnsan gözü sürekli olarak UV ışınına maruz kalmaktadır ve bu tip radyasyonlar reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimine neden olarak hücrel deoksiribonükleik asit (DNA) hasarına yol açmaktadır (Ca'rdenas-Cantu' ve ark., 2014; Toprak ve ark., 2019). UV-B radyasyonu 280-315 nm arasındadır ve oküler yüzeyi etkilemektedir. Pek çoğu

300 nm'nin altında kalan biyolojik olarak aktif olan küçük dalga boylarındaki ışınlar kornea tarafından çoğunlukla absorbe edilmektedir. (Ca'rdenas-Cantu' ve ark., 2014). UV ışını, DNA'da fotokimyasal reaksiyonlar yoluyla pirimidin dimerlerinin ve moleküler lezyonların oluşumuna yol açmaktadır. Bu lezyonlar premutajenik özelliktedir ve DNA yapısında değişikliklere neden olmaktadır (Cimpean ve ark., 2013). Normal şartlar altında sağlıklı hücrelerde bu hasarlar çeşitli savunma sistemleri ile elimine edilmektedir (Toprak ve ark., 2019).

Epidemiyolojik kanıtlar ultraviyole radyasyonuna maruz kalmanın, pterjium gelişimi için olası bir tetikleyici olabileceğini düşündürmektedir (Girolamo ve ark., 2006). Primer pterjiumlu hastalarda nitrik oksit seviyesinin yükseldiği; katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidant enzimlerin ise seviyelerinin azaldığı bulunmuştur (Toprak ve ark., 2019). Kim ve ark.'ları, pterjium dokusunda UV radyasyonuna maruziyet sonucu, aldehit dehidrojenaz 3A1 (ALDH3A1), protein disülfid izomeraz A3 (PDIA3) ve peroksiredoksin-2 (PRDX2) enzimlerinin seviyelerinin arttığını bulmuşlardır. Bu enzimlerin seviyesindeki artış, hücrelerin UV-uyarılı apoptozise karşı direnç göstermesine neden olabilmektedir (Kim ve ark., 2014). Oksidatif DNA hasarının başlıca belirteçlerinden biri olan 8-OHdG'nin seviyesinin pterjium dokusunda yükseldiği bulunmuş aynı zamanda DNA tamirinde görevli Ku70 ve X ışını çapraz onarım tamamlayıcı (XRCC1) enzimlerini kodlayan genlerde genetik polimorfizmler olduğu rapor edilmiştir (Toprak ve ark., 2019).

Genomik kararlılığın sürdürülmesinde önemli bir rol oynayan p53 geni, DNA hasarına karşı oluşan yanıtı düzenlemektedir. UV ışığına maruziyet sonrası DNA üzerinde oluşan lezyonların sıklığı p53'ü aktive etmekte ve bu proteinin serin rezidüsü fosforile olduğu zaman DNA tamiri uyarılmaktadır. Bu süreç UV ışınının dozuna ve

dalga boyunun uzunluğuna bağlıdır. Yapılan çalışmalarda, pterjium epitelyal hücrelerinde p53 geninde anormal derecede protein üretimine neden olan mutasyonlar olduğu saptanmıştır. Anormal p53 ekspresyonu apoptozisi yavaşlatarak hücrel proliferasyonu artırmaktadır ve bu mutasyonların, pterjium gelişimini hızlandırdığı düşünülmektedir (şekil 2.3.) (Cimpean ve ark., 2013).



şekil 2.3. Pterjium Gelişiminde UV- İlişkili Mekanizma

(Wanzeler ve ark., 2019)

2.1.4.2. Kalıtım

Pterjiumun ailesel kümelenme gösterme eğiliminde olduğu bulunmuştur ve genel popülasyona göre bazı aileler pterjium gelişimi için çok daha yüksek bir yatkınlık göstermektedir. Araştırmacılar tarafından bu hastalığın otozomal bir kalıtım modeli gösterdiği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, çiftçilikle uğraşan bir ailede 11 tane pterjium vakasının olduğu bulunmuştur. Hastalıktan etkilenmiş bir bireyin tüm çocuklarının da bu hastalıktan etkilenmiş olduğu ve bu etkilenen çocukların her birinin 28 yaşından daha küçük oldukları rapor edilmiştir. Bu ailedeki etkilenmiş 2 bireyin tek yumurta ikizi olması da pterjium gelişiminde genetik faktörlerin etkili olduğunu gösteren önemli bir kanıt olarak düşünülmektedir. Başka bir vaka çalışmasında ise 3 üyesinin pterjiumdan etkilenmiş olduğu bir ailede bu hastalığın başlangıcının daha erken yaşlarda olduğu ve daha agresif bir büyüme eğilimi (4,6 ve 20 yaş) gösterdiği bulunmuştur. Bu 3 hastada, mitomisin C ve konjonktival otogreft tedavisinden sonra bile ciddi bir pterjium nüksü olduğu rapor edilmiştir (Girolamo ve ark., 2005).

2.1.4.3. Heterozigotluk Kaybı ve Mikrosatellit İnstabilite

Yapılan bazı klinik gözlemlerde, in vitro kültür modellerinde pterjiumun, pre-malignant hastalıklardakine benzer bazı spesifik özellikler taşıdığını belirlenmiştir. Heterozigozite kaybı (LOH), haritalanan lokuslardaki tümör baskılayıcı genlerin kaybından dolayı tümörlü dokularda yaygın olarak görülen bir olaydır. Pterjiumda, ameliyat sonrası nüks ile ilişkili olarak 9q ve 17q bölgelerinde LOH olduğu belirlenmiştir. Belirlenen bu bölgelerin nüks lezyonlar için potansiyel bir prognostik belirteç olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir. Üst göz kapağının altında güneşten

korunan bölgelerden alınan normal fenotipteki konjonktiva dokularında ise bu LOH bölgelerine rastlanmamıştır. Bu durum, genetik değişimlerin UV ışığına maruziyetin seviyesi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Pterijum dokusunda MMP-1'i içine alan 11q 22.23 bölgesinde bir LOH olduğu belirlenmiş ve haritalanan bu LOH, metastatik melanomanın gelişimi ile de ilişkilendirilmiştir (Girolamo ve ark., 2004).

Mikrosatellit instabilite (MI), DNA replikasyonu esnasında DNA'da meydana gelen hasarın tamir edilememesinden kaynaklanmakta ve MI, yükselmiş mutasyon oranının bir yansıması olarak görülmektedir. Yüksek derecede polimorfik mikrosatellit DNA, dinükleotit ve nadiren trinükleotid tekrar dizileri içermekte ve bu bölgeler birçok hastalık için genetik bağlantı analizlerinde kullanılmaktadır (Detorakis ve ark., 1998). Nörodejeneratif hastalıklarda, aterosklerotik plaklarda, spontan düşük materyallerinde ve hemen hemen tüm kanser türlerinde, MI olduğu belirlenmiştir (Spandidos ve ark., 1997). Detorakis ve ark.'ları yaptıkları çalışmada, 50 adet pterijum örneğinde 3 kromozomda 15 mikrosatellit belirteci incelemişler ve yalnızca 3 vakada MI olduğunu belirlemişlerdir (Detorakis ve ark., 1998). Spandidos ve ark., ise 15 adet pterijum örneğinden 8'inde LOH, 2'sinde MI olduğunu saptamışlardır (Spandidos ve ark., 1997).

2.1.4.4. Viral Enfeksiyonlar

Yapılan çalışmalarda pterijum örneklerinde insan papiloma virüsüne (HPV), herpes simpleks virüsüne (HSV) ve sitomegalovirüse (CMV) rastlanmıştır (Chalkia ve ark., 2013). Bu hastalıkta en sık gözlenen virüs türü ise HPV'dir ve virüsler inaktif p53 proteini kodlayarak kromozomal instabiliteye yol açmaktadırlar (Wanzeler ve ark., 2019). Yunanistan'da yapılan bir çalışmada pterijum örneklerinin %22,5'inde HSV,

%40'ında CMV tespit edilmiş, ülkemizde yapılan bir çalışmada ise incelenen pterjium örneklerinin %10'unda HSV belirlenmiştir (Chalkia ve ark., 2013).

2.1.5. Patogenez

Günümüze kadar yapılan çalışmalar oksidatif stresin, ekstraselüler matriks modülatörlerinin, apoptotik ve onkojenik proteinlerin, inflamatuvar mediatörlerin, epitelyal-mezenşimal değişimin, anjiyogenezin ve değişmiş limbal kök hücrelerin pterjium gelişiminde etkili olabileceğini göstermektedir. Ancak, pterjium gelişimine ve nüksüne neden olan kesin mekanizma hala bilinmemektedir (Wanzeler ve ark., 2019).

2.1.5.1. İnflamasyon ve İmmünolojik Mekanizmalar

İnflamasyon yara iyileşmesinde olduğu gibi hem normal fizyolojik bir süreç hem de kanser de olduğu gibi hastalıklara neden olabilen patolojik bir süreçtir (Fang, 2013). Klinik olarak pterjiumun ilerlemesi inflamasyon ve neovaskülerizasyon ile ilişkilendirilmektedir (Gum ve ark., 2017). Kültüre edilmiş pterjium epitelyal hücreleri UV-B ışınlarına maruz bırakıldıktan sonra interlökin 6 (IL-6) ve IL-8'in seviyelerinin artmış olduğu rapor edilmiştir (Kim ve ark., 2014). IL-10'nun ekspresyonunun da pterjium örneklerinde yükselmiş olduğu bulunmuş IL-1 α 'nın ekspresyonunun ise hem primer hem de nüks pterjium dokusunda yükselmiş olduğu rapor edilmiştir. Son zamanlarda pterjium gibi inflamatuvar patolojilerde IL-17'nin ekspresyonunun oküler yüzey üzerinde artmış olduğu bulunmuştur (Wanzeler ve ark., 2019). Pterjiumda, inflamatuvar kaskadların uyarılmasında etkili olan siklooksijenaz-2'nin aşırı derecede eksprese olduğu rapor edilmiştir (Kim ve ark., 2014). Normal şartlarda oküler yüzey

üzerinde çok az sayıda immün hücre bulunurken, pterjium dokusunda mast hücrelerinin, lenfositlerin, plazma hücrelerinin, dentritik hücrelerin, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin sayısında artış olduğu görülmüştür (Notara ve ark., 2018; Kim ve ark., 2014).

2.1.5.2. Hücresel Proliferasyon ve Hücre Göçü

Pterjium dokusu kornea üzerine doğru anormal bir proliferasyon göstermekte ve sıklıkla Bowman tabakasına invaze olmaktadır (Konuk ve ark., 2011). UV ışığı, kısa süreli bile olsa fibroblast büyüme faktörü (FGF), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), konnektif doku büyüme faktörü (CTGF) ve heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) gibi büyüme faktörlerinin sentezini uyarmaktadır. Bu büyüme faktörleri fibroblastların proliferasyonu için gerekli uyarıcılardır (Anguria ve ark., 2014). Proliferasyonla ilişkili proteinler olan Ki-67, proliferasyon hücre nükleer antijeni (PCNA) ve siklin D1 proteinleri hücre döngüsünde önemli roller oynamaktadır ve Ki-67 proteini, hücresel proliferasyonun önemli bir belirteçidir. Pterjium örnekleri, normal konjonktiva örnekleri ile karşılaştırıldığında Ki-67 proteininin anormal derecede eksprese olduğu bulunmuştur. PCNA, DNA sentezi için gerekli olan non-histon bir proteindir ve PCNA'nın ekspresyonu, hücresel proliferasyon için bir belirteç olarak düşünülmektedir. Pterjium dokusunda, PCNA'nın ekspresyonunun önemli derecede yükseldiği görülmüştür. Siklin D1, hücre döngüsünde G1 fazından S fazına geçişte görevli olan önemli bir kontrol genidir ve yapılan bir çalışmada, pterjium epitelyal hücrelerinin limbal kısmında PCNA ve siklin D1'in aşırı derecede eksprese olduğu bulunmuştur ve bu genlerin yüksek derecede eksprese olmasının epitelyal hücrelerin hiperproliferasyonuna yol açabileceği düşünülmektedir (Wanzeler ve ark.,

2019). Epitelyal hücre proliferasyonun potansiyel bir belirteci olan total p63'ün pterjiumun ilk aşamalarında düşük, ilerlemiş aşamalarında ise yüksek derecede eksprese olduğu bulunmuştur (Xu ve ark., 2014). Hücre adezyonuna ve proliferasyonuna dahil olduğu düşünülen E-kaderinin ve beta-kateninin ise pterjium dokusunda yoğun bir şekilde bulunduğu görülmüştür (Wanzeler ve ark., 2019).

Hücre göçü, hücrelerin spesifik bir noktaya hareketi olarak tanımlanmakta ve doku oluşumu için kritik bir süreç olarak düşünülmektedir. Dönüşmüş bazal epitelyal hücre göçünün, pterjium oluşumunda anahtar nitelikte bir özellik olduğu bulunmuştur (Fang, 2013). Sfingozin 1 fosfat (S1P), proliferasyon, migrasyon ve fibrozis gibi hücresel aktiviteleri düzenleyen biyoaktif bir lipittir ve S1P'nin aktivasyonu RhoA'yı uyarmaktadır. Rho sinyalleri proinflamatuvar sitokinlerin ve kinazların üretimini uyarmaktadır. İgarashi ve ark.'ları yaptıkları çalışmada S1P2, S1P4 ve S1P5 reseptörlerinin ekspresyonunun normal konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında pterjium dokusunda önemli derecede yükselmiş olduğunu bulmuşlardır. Aynı zamanda, normal konjonktival fibroblast hücreleri UV'ye maruz bırakıldığında S1P'nin konsantrasyonunun önemli derecede arttığı görülmüştür (Igarashi ve ark., 2019).

2.1.5.3. Anjiogenezis

Pterjium patogenezinde anjiyogenez faktörlerinin önemli katkılarına olduğu rapor edilmiş ve bu anjiyogenetik faktörlerin yeni kan damarları oluşturarak pterjium gelişimini kolaylaştırdığı düşünülmektedir (Fang, 2013). TGF- β , fibroblast proliferasyonunu, anjiyogenezi ve hücre dışı matriks (ECM) proteinlerinin sentezini ve degradasyonunu düzenlemektedir (Wanzeler ve ark., 2019). Anjiyogenezi artırdığı için TGF- β geninin aşırı ekspresyonunun pterjium patogenezinde önemli bir rol oynadığı

düşünülmektedir (Gum ve ark., 2017). VEGF ailesi, pterjiyum gibi oküler hastalıklarda vasküler permeabilityi artırdığı ve patolojik anjiyogenezde rol aldığı için oftalmoloji alanında yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. VEGF'nin ekspresyonunun artması anjiyogeneze ve lenfanjiyogeneze yol açmakta ve pterjiyum örneklerinde VEGF seviyesinin yükselmiş olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Wanzeler ve ark., 2019).

2.1.5.4. Epitelyal-Mezenşimal Değişim

Primer ve nüks pterjiyumun fibrovasküler dokusunda fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümünün bu hastalığın gelişimindeki patolojik süreçte önemli olduğu düşünülmektedir. Bu dönüşüm alfa düz kas aktinin (α -SMA) ekspresyonuyla yakından ilişkilidir. Miyofibroblastlar, α -SMA'yı eksprese eder, bu protein ise kollajen tip I ve II gibi ECM bileşenlerinin, büyüme faktörünün ve integrinin sentezini uyarır (Igarashi ve ark., 2019). TGF- β , epitelyal-mezenşimal değişimin potansiyel bir uyarıcısıdır ve pterjial fibroblastlarda, aktif TGF- β 1 ve TGF- β 2 reseptörü olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda TGF- β 2'nin pterjial fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümünü uyarıcı yeteneğe sahip olduğu gösterilmiştir. Gum ve ark.'ları yaptıkları çalışmada, TGF- β 2'nin uyardığı fibroblastlardan miyofibroblastlara olan değişimin siklosporin A ile baskılanabileceğini bulmuşlardır ve Siklosporin A, α -SMA, laminin, fibronektin ve kollajen tip 1 proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonunu inhibe etmektedir (Gum ve ark., 2017).

2.1.5.5. Hücre Dışı Matris Proteinleri ve Hücre Dışı Matrisin Remodalizasyonu

Hücre dışı matris, yapısal ve biyokimyasal katkı sağlayan, hücreleri çevreleyen destek hücreleri tarafından salgılanan hücre dışı moleküllerin birleşiminden oluşmaktadır. ECM proteinleri, keratin, elastin, kollajen, fibrin ve diğer bazı proteinleri içermektedir. ECM proteinlerinin anormal ekspresyonunun pterjiumun proliferatif büyümesiyle doğrudan ilişkili olduğu düşünülmektedir (Wanzeler ve ark., 2019). Bowman's tabakası bozulduğunda proliferatif hücreler kollajen bariyerini geçerek migrate olabilmektedir (Ca'rdenas-Cantu, 2014). Pterjium örnekleri normal konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında tropoelastin ekspresyonunun daha yüksek olduğu bulunmuş, Tip II kollajen ekspresyonunun yalnızca pterjium örneklerinde pozitif olduğu, kollajen I, III ve IV'ün ise hem pterjium hem de normal konjonktiva örneklerinde pozitif olduğu görülmüştür (Wanzeler ve ark., 2019).

Matriksinler olarak bilinen matris metalloproteinazlar (MMP), doku remodalizasyonunda görevli proteinazlardır ve metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP) ise MMP'leri bağlayarak aktivitelerini engellemektedir. Pterjium patogenezi ile ilgili yapılan çalışmalarda bu iki protein grubu yoğun olarak ele alınmıştır (Wanzeler ve ark., 2019). Proliferasyonun ve migrasyonun başlıca yeri olan pterjiumun baş kısmında MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 ve MMP-9'un ekspresyon seviyelerinde yükselme olduğu bulunmuştur. Matrisin yeniden yapılandırılmasıyla ilişkili olan MMP-2 geninin hipometilasyonunun pterjium invazyonuyla yüksek derecede ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Ca'rdenas-Cantu ve ark., 2014). Pterjium fibroblast kültüründe, siklosporin A'nın MMP-3 ve MMP-13 ekspresyonlarını azalttığı bulunmuştur. Pterjiumun farklı aşamalarında MMP ve TIMP ekspresyonlarında değişimler olduğu gösterilmiştir. MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki dengenin bozulmasının, pterjium

ilerlemesinden ve nüksünden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Wanzeler ve ark., 2019).

2.1.5.6. Apoptozis

Pro-apoptotik özellikte olan Bax proteini sadece pterjium dokusunun epitelyal bazal katmanında bulunurken anti-apoptotik protein olan Bcl-2, pterjium dokusunun tamamında gözlemlenmiştir. Pterjiumun baş kısmında, bu pro-apototik proteinlerin yokluğunun pterjium dokusunun proliferatif davranış göstermesine neden olabileceği düşünülmektedir (Ca'rdenas-Cantu ve ark., 2014). Rapamisin kompleks 1 (mTORC1), hücre büyümesinin, proliferasyonun ve otofajinin başlıca düzenleyicilerindedir. mTORC1'in aktivasyonunun pterjiumdaki apoptozu inhibe ettiği gösterilmiş ve aynı zamanda pterjiumda mTORC1'in, p73 genini inhibe ederek hücre proliferasyonu uyardığı bulunmuştur. Apoptotik inhibitör gen ailesinin bir üyesi olan BIRC5 geni tarafından kodlanan survivin proteininin pterjium dokusunda yüksek derecede ifade olduğu, normal insan konjonktivasında ise ifade olmadığı bulunmuştur (Wanzeler ve ark., 2019). Daha önceki çalışmalarda bu proteinin hücre dışında, nükleusta, sitoplazmada ve mitokondride lokalize olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, nükleusta bulunduğu zaman hücre bölünmesini düzenlerken mitokondride bulunduğu anda apoptozu inhibe etmektedir. Bu durum survivinin farklı lokalizasyonlarının değişik fonksiyonlarla ilişkili olabileceğini göstermektedir. Xu ve ark.'ları yaptıkları çalışmada survivinin pterjiumun ilk aşamalarında çoğunlukla sitoplazmada yer alırken, ilerlemiş aşamalarında güçlü bir nükleer ekspresyon gösterdiğini bulmuşlardır (Xu ve ark., 2014). Survivin düzenlenmesinin moleküler mekanizması tam olarak anlaşılmış olmasa da bu proteinin p53 proteini ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Pterjium gelişimine neden

olan oksidatif stresin survivin proteininin aktivasyonunu uyardığı gösterilmiştir (Wanzeler ve ark., 2019).

2.1.5.7. Değişmiş Limbal Bazal Epitelyal Kök Hücre

Epitelyal tabaka, limbusun bazal kök hücre kompartmanındaki limbal epitelyal kök hücrelerden oluşmaktadır. Limbal epitelyal kök hücreler yüksek bir proliferatif potansiyele sahiptir ve bu hücreler, yaraların iyileşmesi ve epitelyal hücrelerin yenilenmesi için çok önemlidir. Eksikliklerinde doku homeostazisi önemli derecede değişmektedir. UV radyasyonu, limbal bazal epitelyal kök hücrelerde ve konjonktival fibroblastlarda hasara neden olabilmektedir (Notara ve ark., 2018). Dushku ve ark.'ları, UV radyasyonuna maruziyet sonucu limbal bazal epitelyal kök hücrelerdeki değişimin, pterjium gelişimine neden olabileceğini rapor etmişlerdir. Aynı zamanda, pterjiumun konjonktival epitelyumdan değil limbal epitelyumdan geliştiğini öne sürmüşler ve değişmiş limbal bazal epitelyal kök hücrelerde tüm MMP'lerin yüksek derecede eksprese edildiği bulmuşlardır. Ayrıca yine bu hücrelerde anormal p53 ekspresyonu olduğunu göstermişlerdir (Dushku ve ark., 2001).

2.1.5.8. Moleküler Genetik Değişimler

Pterjiumla ilgili yapılan gen analizi çalışmalarında, yara iyileşmesinde görevli olan proteinleri, hücresel adezyonda yer alan proteinleri ve mitotik proteinleri kodlayan genlerin yüksek derecede eksprese olduğu rapor edilmiştir (P'erez-Rico ve ark., 2014). Klaudin ailesine üye proteinler, epitelyal ve endotelyal hücre tabakasındaki hücre-hücre adezyonunda görevlidirler. Yapılan immünohistokimyasal analizlerde sağlıklı kornea ve

konjonktiva dokularının klaudin-1 ve klaudin-4 için pozitif olduğu gösterilmiş ve pterjium örneklerinde ise klaudin-1 proteininin ekspresyonunun önemli derecede azaldığı gösterilmiştir. Tümör baskılayıcı genler olan p63 ve p16 normal konjonktiva dokusunda nadiren eksprese olurken pterjium örneklerinde hem p63'ün hem de p16'nın protein ekspresyonunun artmış olduğu bulunmuştur (Wanzeler ve ark., 2019). Yapılan çalışmalarda, proteinlerin katlanmasından ve degradasyonundan sorumlu bir ısı şok proteininin (Hsp90) pterjium epitelinde aşırı derecede eksprese olduğu aynı zamanda Hsp27 ve Hsp70 proteinlerinin de ekspresyonlarının arttığı rapor edilmiştir. Bu proteinlerin aşırı ekspresyonu, oksidatif stres sonucu oluşan modifiye proteinlere karşı hücrelerin verdiği doğal bir yanıt olarak düşünülebilir (Ca'rdenas-Cantu' ve ark., 2014). Büyük tümör baskılayıcı kinaz 1 (LATS1) ve büyük tümör baskılayıcı kinaz 2 (LATS2), UV uyarılı DNA hasarına yanıtta görevli olan tümör baskılayıcı genlerdendir. Bu genlerin promotör bölgesinde meydana gelen metilasyon bu genlerin sessizleşmesine ve tümör gelişimine yol açabilir. Yapılan bir çalışmada, LATS1 ve LATS2 genlerinin metilasyonu sonucu ekspresyonlarının azalmasının pterjium gelişimi için bir risk oluşturabileceği bulunmuştur. Başka bir çalışmada ise, pterjium dokusunda E-kaderin ve MMP-2 genlerinin hipermetile olduğu gösterilmiştir (Ginger-Eke ve ark., 2018).

2.1.6. Tedavi

Pterjium cerrahisi sonrası en yaygın komplikasyon pterjiumun nüksetmesidir. Fibrovasküler aktiviteyi ve nüks oranını azaltmak için beta radyasyonu, konjonktival ve limbal otogreft, anti-mitotik ilaçlar ve amniyotik membran transplantasyonu gibi teknikler kullanılmaktadır (Salman ve Mansour, 2011). Limbal otogreft yöntemiyle,

epitelyal kök hücrelerin artırılması ve korneanın konjonktival invazyonuna karşı bir bariyer etkisi oluşturulması başarılı bir şekilde sağlanmaktadır. Amniyotik membran güçlü bir anti-adhezif etkiye sahiptir ve normalde avasküler olduğu için yeni damarların oluşmasını engellemektedir. Pterjium cerrahisinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırıldığı çalışmalarda, konjoktival otograft ile birlikte limbal kök hücre transplantasyonunun pterjium nüksünü engellemede daha etkili olduğu ve normal epitelyal morfolojinin daha hızlı yenilediği bulunmuştur. Mitomisin C ve 5-florourasil gibi anti-metabolitler anti-fibrotik etkilerinden dolayı operasyon sırasında kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçların konsantrasyonu iyi ayarlanmalıdır çünkü skleranın erimesi, ülserasyon veya epitelizasyonun gecikmesi gibi ciddi yan etkilerin görülmesine neden olabilmektedir (Salman ve Mansour, 2011). Pterjium tedavisinde, anjiyogenezi ve büyümeyi engelleyici biyomoleküller üzerinde de çalışmalar sürdürülmektedir. Chui ve ark.'ları pterjium örneklerinde Skp-2 siRNA'larını kullanarak bir protoonkogen olan c-myc geninin ekspresyon seviyesini düşürmeyi başarmışlardır (Chui ve ark., 2011). Anti-inflamatuar bir ajan olan siklosporin A, inflamatuvar oküler yüzey hastalıklarında topikal olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda bir çalışmada primer pterjiumlu hastalarda birincil ameliyatı takiben siklosporin A kullanımının nüks oranını azalttığı görülmüştür. Gum ve ark.'ları siklosporin A'nın MMP-3 ve MMP-13 genlerinin ekspresyonunu inhibe ederek pterjium fibroblastlarının migrasyonunu engelleyici bir etki gösterdiğini ve α -SMA, laminin, fibronektin ve kollajen tip 1'in ekspresyonunu büyük derecede azalttığını bulmuşlardır. Siklosporin A pterjium patogenezindeki fibroblastlardan miyofibroblastlara olan değişimi de baskılayabilmektedir (Gum ve ark., 2017). Lu ve ark.'ları yaptıkları bir çalışmada antioksidant, anti-inflamatuar, anti-anjiyogenik ve yaraları iyileştirici etkisi olan *Curcuma longa* bitkisinden izole edilen bir

polifenol olan Curcumi'nin insan pterjium fibroblastlarında VEGF ekspresyonunu inhibe ettiğini ve hücrel proliferasyonu baskıladığını bulmuşlardır (Lu ve ark., 2017).

2.2. VİTAMİN A

Vitamin A (retinoid), omurgalılar için esansiyel bir vitamindir ve hayvanlarda de nova sentezi olmadığı için diyet ile dışarıdan alınmak zorundadır. Bitkilerde, bazı bakterilerde, alglerde ve mantarlarda karotenoid olarak sentezlendikten sonra hayvanlarda vitamin A'ya dönüştürülmektedir (Blomhoff ve Blomhoff, 2005). Retinoid metabolizması, birçok taşıyıcı protein ve enzim içermektedir ve bunların büyük bir çoğunluğu retinoid metabolizmasına özgüdür. Dietle alınan bu preretinoid karotenoidler barsaklardan enterositlerin içine alınır daha sonra retinoidlere dönüştürülür ya da şilomikronlarda modifiye olmamış şekliyle paketlenirler. Retinoidler suda çözünmedikleri için vücutta hücrel retinoid bağlayıcı proteinlere (CRBP) bağlı olarak hücre içerisine taşınırlar (D'Ambrosio ve ark., 2011). Hücre içerisine girdikten sonra retinoidler ilk olarak retinaldehite daha sonra retinoik aside metabolize olmakta ve sitozolik alkol dehidrojenaz ailesinin üyesi olan enzimlerle retinolün oksidasyonu katalizlenir. Daha sonra retinaldehit, retinaldehit dehidrojenazla retinoik aside dönüşür (Niles, 2004). Gözün retinol pigment epitelyumu (RPE) retinolü, 11-cis retinale dönüştürür. Retinol, RPE içerisine alındıktan sonra tekrardan retinil estere esterefiye olduktan sonra bu esterler, izomerhidrolaz enzimi RPE65 ile 11-cis retinole hidroliz olurlar. 11-cis retinol, retinol dehidrojenaz ile vizual kromofor olan 11-cis retinale oksitlenir (von Linting ve ark., 2010; Kiser ve ark., 2012). Vitamin A'nın çeşitli formları işlendikten sonra karaciğerde depo edilir ve ihtiyaç halinde sistemik dolaşıma verilir (Perusek ve Maeda, 2013).

Vitamin A binlerce yıldır tedavi için kullanılmaktadır. Eski mısır papirüslerinde gece körlüğü gibi göz hastalıklarının tedavisinde karaciğerin nasıl kullanılacağı tarif edilmiştir. Yunanlı filozof Hipokrat, kitaplarında gece körlüğünün tedavisinde ayda bir veya iki kez bala batırılmış şekilde çiğ karaciğerin yenilmesini tavsiye etmiştir. Hematopoiezis, doku farklılaşması, embriyonik gelişim, görme, gen transkripsiyonunun düzenlenmesi ve bağışıklık sisteminin tamamlayıcılığı için yeterli miktarda vitamin A alınmasına ihtiyaç vardır. Epidemiyolojik çalışmalar, düşük vitamin A alımının kanser gelişme riskini artırdığını göstermiştir (Bushue ve Wan, 2010). Vitamin A eksikliği, epitel skuamöz metaplazi, ülserleşme ve keratinleşme ile sonuçlanan oküler yüzeyin anormal farklılaşmasına ve konjonktival goblet hücrelerinin eksikliğine sebep olmaktadır (Nezzar ve ark., 2007).

2.3. RETİNOİK ASİT

Vitamin A'nın aktif bir formu olan retinoik asit, hem in vivo hem de in vitro ortamda normal ve premalignant epitelyal hücrelerin büyümesinde ve farklılaşmasında majör bir rol oynamaktadır (Jones ve ark., 1997). RA'nın en aktif formu olan all-trans retinoik asit (ATRA), gen düzenleyici fonksiyona sahiptir ve birçok organın gelişiminde kritik bir öneme sahiptir. RA'nın diğer stereo-izomerleri olan 4-oxo-9-cis-retinoik asit (9-cis-RA) ve 4-oxo-13-cis-retinoik asit (13-cis-RA) RA sinyalinde görevlidirler (Brown ve ark., 2014).

2.3.1. Retinoik Asidin Biyolojik Aktiviteleri

Retinoik asidin, limbal ve merkezi korneal epitelyal hücrelerin farklılaşmasını etkilediği gösterilmiştir (Dua ve Azuara-Blanco, 2000). Retinoidler, sitokin ve kemokin üretimini etkileyerek immünolojik ve inflamatuvar yanıtı değiştirebilirler (Girolamo ve ark., 2006). Retinoidler anti-proliferatif, pro-apoptotik, anti-oksidant ve hücreleri farklılaştırıcı etkilerinden dolayı kemoterapotik ajan olarak kullanılmaktadırlar (Bushue ve Wan, 2010). RA'nın nükleer faktör (NF)- κ B ve aktivatör protein (AP)-1 gibi birkaç inflamatuvar transkripsiyon faktörünü baskılayarak hücreSEL büyüme ve proliferasyonu etkilediği gösterilmiştir (Girolamo ve ark., 2006). RA hücre döngüsünü düzenleyen bazı genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir. RA, embriyonik teratokarsinoma F9 hücrelerinde G1-G0 evrelerinde büyümeyi durdurur. RA p53- kontrol eden anti-proliferatif genini, BTC ailesi üyesi Tob-1 genini ve B-hücre translokasyon geni üyesi 2'yi (Btg-2) uyarılmaktadır. Btg-2 geninin promotör bölgesinde bir retinoik asit cevap elementi belirlenmiştir ve bu bölgeye RXR/RAR heterodimeri in vitro ortamda bağlanmaktadır. Btg-2 geni, siklin D1'in ekspresyonunu azaltarak hücre döngüsünü inhibe etmektedir. RA aynı zamanda NB4 promyelostik lösemi hücrelerinde farklılaşmayı ve apoptozu uyarılmaktadır. Meme kanseri hücrelerinde ise RA'nın survivin ve Bcl-2 genlerinin ekspresyonunu azaltarak, tümör baskılayıcı gen olan programlanmış hücre ölüm 4 geni (PDCD4) ve SRY box 9 (SOX9) transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu artırarak hücre büyümesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Donato ve ark., 2007). RA'nın meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücrelerinde pro-apoptotik genler olan kaspaz-9 ve kaspaz-7'nin ekspresyonunu artırdığı bulunmuştur. MCF-7 hücrelerinde RA'nın hücre büyümesini inhibe etmesi, hem apoptozun indüklenmesiyle hem de hücre döngüsünün durdurulmasıyla olmaktadır (Donato ve

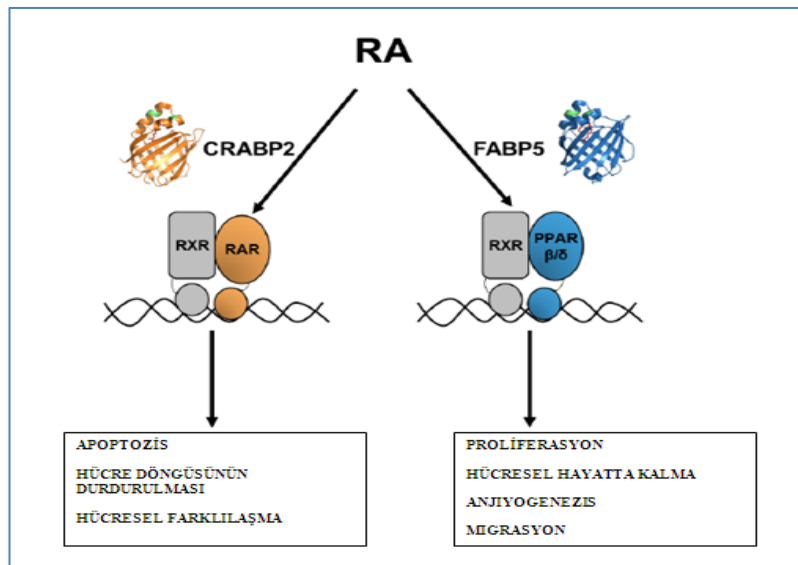
ark., 2005). ATRA, proliferasyon, farklılaşma, tümörögenезis ve apoptozis gibi hücresele fonksiyonların önemli bir düzenleyicisi olan protein kinaz C (PKC)'nin de aktivitesini azaltmaktadır (Blomhoff ve Blomhoff, 2005).

2.3.2. Retinoik Asit Sinyal Yolağı

RA, hücre içerisinde iki farklı yol izlemektedir ve bu yollara bağılı olarak hücresele ekspresyonda birbirine zıt sonuçlar meydana getirmektedir. RA, hücre içinde hücreler arası lipit bağlayıcı proteinler (iLBP) ile ilişkili olarak taşınmaktadır. Hücresele retinoik asit bağlayıcı protein (CRABP2) ve yağ asidi bağlayıcı protein 5 (FABP5), RA'yı sitozol içinden nükleus içindeki nükleer reseptörlere taşımaktadırlar. CRABP2, RA'yı retinoik asit reseptörlerine (RAR), FABP5 ise RA'yı, peroksizom proliferatör aktive edici reseptör olan PPAR β/δ 'ya taşımaktadır. RA'nın, RAR'lara mı yoksa PPAR β/δ 'ya mı taşınacağı sitozoldeki CRABP2'nin FABP5'e oranına bağılıdır. RAR'lar aktive olduğunda; apoptozu, hücre döngüsünün durdurulmasını ve hücre farklılaşmasını tetikler böylelikle tümör büyümesi baskılanabilmektedir. PPAR β/δ aktive olduğunda ise proliferasyon ve hücrelerin hayatta kalması uyarılmakta ve tümör gelişimi ilerlemektedir (Şekil 2.4.) (Michalik ve Wahli, 2007).

RAR'lar, steroid-tiroid hormon reseptör süper ailesinin üyesidirler. RAR'ların - α , - β ve - γ olmak üzere üç alt tipi izole edilmiş olmasına rağmen bu reseptörler yapısal olarak birbirine çok benzemektedirler ve her birinin farklı fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda RA, diğere bir nükleer reseptör ailesi olan retinoid X reseptörlerine (RXR'lere) bağlanmaktadır. RXR'lerin de - α , - β ve - γ olmak üzere üç alt tipi vardır. RAR'lar ve RXR'ler birlikte heterodimer bir yapı oluştururlar bu yapı transkripsiyon faktörlerini aktive edebilecek bir ligand olarak fonksiyon görmektedir.

Heterodimer oluşturan bu reseptörler, spesifik RA cevap elementlerine (RARE) bağlanarak gen transkripsiyonunu düzenlemektedirler (Jones ve ark., 1997). Son yıllarda yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir ki; RA-RARs/RXR kompleksi bir RARE'den bağımsız olarak da gen ekspresyonunu düzenleyebilir. Örneğin fos- ve jun- ilişkili proteinlerden oluşmuş heterodimer bir transkripsiyon faktörü olan AP1, RARE'den bağımsız olarak retinoid reseptör aracılı yolla baskılanabilmektedir (Blomhoff ve Blomhoff, 2005). RA'nın bu yolla 500'ün üzerinde genin ekspresyonunu düzenlediği düşünülmektedir (D'Ambrosio ve ark., 2011). Aynı zamanda kodlanmayan RNA transkriptlerinin önemli bir kısmının da RA aracılığıyla düzenlendiği bulunmuştur (Blomhoff ve Blomhoff, 2005). PPAR β/δ , yağ asidi aktive edici transkripsiyon faktörüdür ve nükleer hormon reseptör ailesinin üyesidir. PPAR β/δ ve RXR birlikte heterodimer bir yapı oluştururlar bu yapı transkripsiyon faktörlerini aktive edebilecek bir ligand olarak fonksiyon görür. Heterodimer oluşturan bu reseptörler, spesifik peroksizom proliferasyon cevap elementlerine (PPRE) bağlanarak gen transkripsiyonunu düzenlemektedirler (Michalik ve Wahli, 2007).



Şekil 2.4. Retinoik Asit Sinyal Yolağı (Vreeland, 2015)

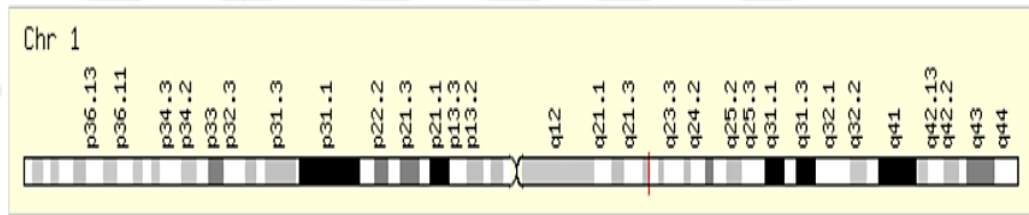
2.3.3. Retinoik Asidin Hastalıklarla İlişkisi

Retinoid terapiler, ilerleyici görme kayıplarının olduğu genetik retinal hastalıkların tedavisinde hastanın yaşam kalitesini arttırmak için kullanılmaktadırlar (Perusek ve Maeda, 2013). Topikal retinoidler, yara iyileşmesi, skuamöz metaplazi ve göz kuruluğu gibi oküler yüzey hastalıklarının tedavilerinde farmakolojik ajan olarak kullanılmaktadırlar (Nezzar ve ark., 2007). Tümörjenez süresince sıklıkla retinoid cevabının kaybı ve anormal retinoid metabolizması görülmektedir. Anormal retinol metabolizması çeşitli kanserlerin oluşumuna neden olabilmektedir. Kanser hücrelerinde retinol esterifikasyonundaki defektler retinolün depolanmasını ve onun metabolizmasını engelleyebilir bunun sonucu olarak bölgesel retinoid eksikliği, tümör gelişimini güçlendirebilir (Cai ve Gudas, 2009). Aynı zamanda retinoidler, hücrel proliferasyonu inhibe ettiği, hücrel farklılaşmayı ve apoptozisi uyardığı için birçok kanser türünün tedavisi ve engellenmesinde farmakolojik ajan olarak kullanılmaktadırlar. Klinik uygulamalarda, kutanöz T hücreli lenfoma ve akut promiyelositik lösemnin tedavisinde RA, başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (Zhang ve ark., 2018). Retinoidler bazı prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederken ATRA ve 13-cis-retinoik asit, prostat kanserinin tedavisi için kombine olarak kullanılmaktadır. Ancak farklı kanser türlerinde retinoid sinyallerinde bazı anormallikler gözlenmiştir. Bu anormallikler retinoid reseptörlerinin seviyesindeki değişiklikler ve retinoid metabolizmasında görevli enzim ve proteinlerin ekspresyonundaki değişimlerden kaynaklanabilmektedir. Retinoid sinyalindeki bu değişimler tümör hücrelerini etkileyebilir ve kanser tedavisinde kullanılan retinoidlerin etkisini değiştirebilir (Cai ve Gudas, 2009). Örneğin, meme kanserli MMTV-neu fare modelinde normal meme epitelinde CRABP2 eksprese edilmekteyken tümör dokusunda tam tersidir. FABP5 seviyesi ise normal epitelyumda

düşükken tümör dokusunda yüksektir. CRABP2/FABP5 oranındaki bu azalış sonucu olarak MMTV-neu fare modelinde dışardan RA verilmesi tümör büyümesini durdurmak yerine ilerletmektedir (Schug ve ark., 2008).

2.4. HÜCRESEL RETİNOİK ASİT BAĞLAYICI PROTEİN 2

Hücre içerisinde iki farklı hücresel retinoik asit bağlayıcı protein vardır; CRABP1 ve CRABP2. Bu proteinler, yüksek derecede homologdurlar ve yaklaşık olarak %72 amino asit benzerliğine sahiptirler (Niles, 2004). CRABP2 geni, 1q23.1'de lokalize olmakta ve CRABP2 proteini, 138 amino asit uzunluğunda 16 kDa ağırlığındadır (Şekil 2.5.) (<https://www.genecards.org>).



Şekil 2.5. CRABP2 Geninin Genomik Lokalizasyonu

(<https://www.genecards.org>)

Yapılan son çalışmalarda hedef gen ekspresyonunun düzenlenmesinde CRABP2'nin, RA'nın etkisini daha çok arttırdığı bulunmuştur (Niles, 2004). MCF7 meme karsinoma hücrelerinde, RA'nın yokluğunda CRABP2'nin aşırı ekspresyonu sonucu bazı genlerin ekspresyonunun artmış olduğu rapor edilmiştir. Bu gözlemler CRABP2'nin RA'dan bağımsız fonksiyonları olabileceğini göstermektedir (Donato ve Noy, 2005). Bazı çalışmalar, meme karsinoma hücrelerinde CRABP2'nin apoptozu uyardığını göstermiştir (Vreeland ve ark., 2014). Feng ve ark., CRABP2'nin meme

kanseri hücrelerinin invazyonunu ve metastazını baskıladığını bulmuşlardır (Feng ve ark., 2019). HuR proteini, proteinleri degradasyondan koruyan ve mRNA'ya bağlanan bir proteindir. Yapılan çalışmalarda, HuR proteininin, CRABP2 ile doğrudan etkileşim içinde olduğu gösterilmiştir. HuR proteini, hedef transkriptin 3'UTR bölgesine bağlanmaktadır. CRABP2, HuR proteininin hedef mRNA'ya olan afinitesini artırarak transkriptin stabilizasyonunu artırır ve bu transkriptlerin içinde apoptoz da görevli olan Apaf-1 proteini de bulunmaktadır. CRABP2, HuR proteini aracılığıyla karsinom hücre proliferasyonunu baskılamaktadır. Yapılan bu çalışmalar, gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenlenmesinde CRABP2 ve HuR proteinlerinin birbirleriyle yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Çeşitli kanserlerde CRABP2 mRNA ekspresyonunun azaldığı ve kafa ve boyun tümörlerinde CRABP2 promotörünün metile olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda CRABP2 geninin kaybının da tümör gelişimine katkıda bulunabileceği gösterilmiştir. CRABP2 hem RAR'larla birlikte anti-onkojenik özellik göstermekte hem de HuR aracılığıyla anti-proliferatif etki göstermektedir (Vreeland ve ark., 2014).

2.5. YAĞ ASİDİ BAĞLAYICI PROTEİN 5

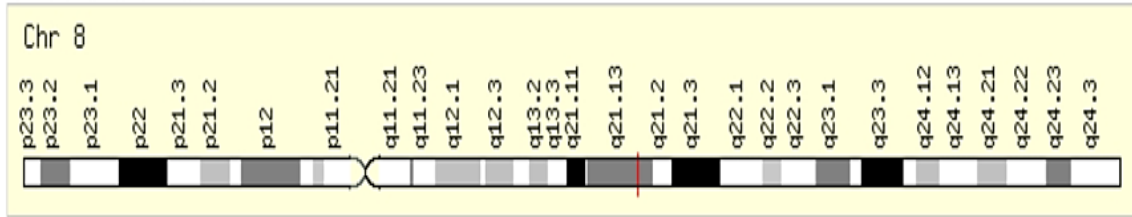
Yağ asitleri, hem metabolik enerji deposu hem de membran biyogenezinde substrat olarak kullanıldığından hücreler için hayati öneme sahiptirler. Son zamanlarda, yağ asitlerinin birçok hücresel süreçte hücre içi sinyal molekülü olarak çalıştığı gösterilmiştir (Di Sebastiano ve Mourtzakis, 2014; McArthur ve ark., 1999). Serbest yağ asitleri hücre içerisine pasif difüzyonla ya da taşıyıcı proteinlerle taşınırken, sitoplazmadaki yağ asitleri bir metabolik yolak içerisine girer ya da hücre içi yağ asidi bağlayıcı proteinlere bağlanarak farklı organellere taşınırlar (İshimura ve ark., 2013).

FABP'ler, geri dönüşümlü olarak doymuş ve doymamış yağ asitlerine bağlanan benzer moleküler ağırlıklara sahip (14-15 kDa) sitoplazmik bir protein ailesidir (İshimura ve ark., 2013). İlk kez 1972 yılında keşfedildiğinden beri en az 12 üyesi olduğu belirlendi ve FABP'ler iki alt gruba ayrıldı: bunlardan birincisi plazma membran ilişkili protein grubu (FABP_{PM}) diğeri sitoplazmik proteinler (FABP_C) grubudur (Ockner ve ark., 1972;Chmurzyńska, 2006). FABP ailesinin tüm üyeleri ilk buldukları organa göre isimlendirildiler fakat bu proteinlerin ekspresyonu özel doku ve hücrelerle sınırlı değildir. Örneğin, FABP1 (karaciğer FABP) yalnız karaciğerde değil, aynı zamanda pankreas, barsak, akciğer, mide ve böbreklerde de eksprese olmaktadır. FABP5 (epidermal FABP) ise en çok eksprese edilen FABP'lerden birisidir ve deri, dil, adiposit, beyin, barsak, makrofaj, böbrek, akciğer, karaciğer, meme bezleri, kalp, iskelet kası, testis, retina, lens ve dalakta yaygın olarak eksprese edilmektedir (Smathers ve Petersen, 2011).

FABP'lerin yapısı X-ray kristalografi, nükleer manyetik rezonans ve diğer biyokimyasal yöntemlerle ayrıntılı olarak incelenmiştir. Bu protein ailesi, orta derecede amino asit dizi homolojisi göstermekte (%20-70), ancak üçüncül yapıları yüksek derecede benzemektedir. Genellikle, FABP'ler on iplikli antiparalel β -fiçı yapısından oluşmaktadır. FABP'ler arasındaki küçük yapısal farklılıklar, bu proteinlerin yağ asitlerine bağlanma afinitelerini, ligand seçiciliklerini ve bağlanma mekanizmalarını değiştirmektedir (Chmurzyńska, 2006). Örneğin, FABP1 yağ asitlerinin büyük bir çoğunluğu için bağlanma afinitesi gösterirken, FABP7 çok uzun zincirli yağ asitleri için yüksek derecede seçicidir (Balendiran ve ark., 2000). FABP'lerin farklı biyolojik fonksiyonları belirlenmiştir bunlar; yağ asitlerinin spesifik organellere ve transkripsiyon

düzenleyici yağ asitlerinin ise nükleus içerisindeki PPAR'lara taşınmasıdır (Schachtrup ve ark., 2004).

FABP5, orta ve uzun zincirli yağ asitlerine yüksek affinite ile bağlanan 15kDa'luk sitozolik bir proteindir. FABP5 geni, 8q21.13 bölgesinde lokalize olmaktadır (Şekil 2.6.) (<https://www.genecards.org>).



Şekil 2.6. FABP5 Geninin Genomik Lokalizasyonu (<https://www.genecards.org>)

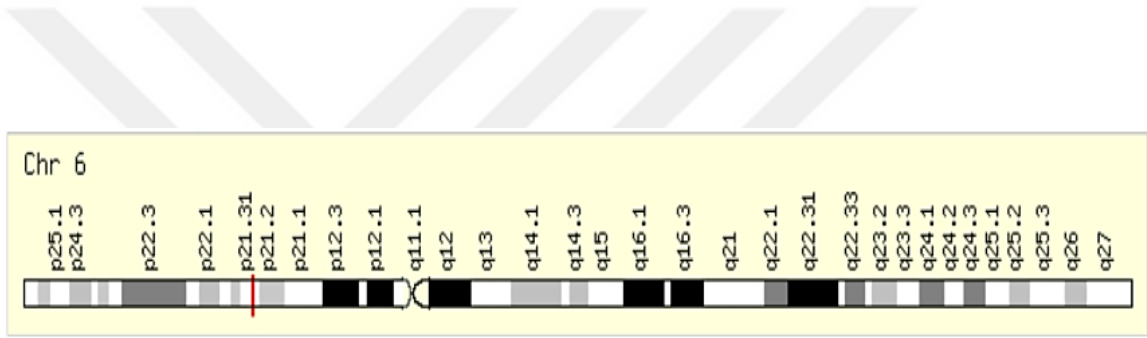
İnsan prostat kanseri hücre hatlarında ve prostat karsinoma dokusunda FABP5'in yüksek derecede eksprese olduğu bulunmuştur. Metastatik olmayan benign rat model hücre hattında (Rama 37) yapılan çalışmalarda hücre içerisine FABP5 geni transfer edildiğinde primer tümör büyümesinin ilerlediği ve metastazın uyarıldığı bulunmuştur (Adamson ve ark., 2003). Ayrıca, FABP5'in prostat ve meme kanserlerinde malignant progresyona dahil olduğu ve in vivo deneylerde bu proteinin ekspresyonundaki artışın VEGF ekspresyonunu artırarak metastazı uyarabildiği gösterilmiştir (Jing ve ark.,2001; Chmurzyńska, 2006). FABP5'in, potansiyel bir prognostik marker olarak kabul edilmekte ve malignansinin baskılanması için hedef gen olarak gösterilmektedir (Morgan ve ark., 2008).

2.6. PEROKSİZOM PROLİFERATÖR AKTİVE EDİCİ RESEPTÖR D

Peroksizom proliferatör aktive edici reseptörler olan PPAR α , PPAR β/δ ve PPAR γ , yağ asidi aktive edici transkripsiyon faktörleridir ve nükleer hormon reseptör ailesinin üyesidirler (Michalik ve Wahli, 2007). PPAR'lar, spesifik DNA dizilerine bağlanabilmek için tıpkı RAR'lar gibi RXR'ler ile heterodimerizasyona ihtiyaç duymaktadırlar. Heterodimer oluşturan bu reseptörler spesifik peroksizom proliferasyon cevap elementlerine (PPRE) bağlanarak gen transkripsiyonunu düzenlemektedirler (Lehrke ve Lazar, 2005). PPAR'lar, PPRE'den bağımsız olarak da gen ekspresyonunu düzenleyebilirler. PPAR'lar büyük bir T şeklinde ligand bağlayıcı cep içermektedirler ve buraya yapısal olarak değişik şekillerdeki ligandlar bağlanabilmektedirler. Doymamış ve oksidize yağ asitleri, nitro yağ asitleri, prostoglandinler PPAR'ların endojen ligandları arasındadır (Castelli ve ark., 2018). Peroksizom proliferatör aktive edici reseptörler, lipit ve glukoz metabolizmasının en önemli transkripsiyonel düzenleyicilerindendir (Michalik ve Wahli, 2007). Diyabetik retinopati, göz kuruluğu, yaşla ilişkili maküler dejenerasyon, optik nörit, tiroid göz hastalıkları, glukom ve oküler yaralanmalar gibi pek çok göz hastalığında PPAR'ların etkileri araştırılmıştır. Oksidatif stres ve inflamasyonun önemli olduğu oküler patolojilerde PPAR'ların önemli etkilerinin olduğu düşünülmektedir. Pterjium ekzisyonundan sonraki yara iyileşmesi sıklıkla aşırı fibrozise yol açarak nükse neden olmaktadır. Primer pterjiuma göre nüks pterjiumda fibrovasküler büyüme çok daha yoğun olmaktadır. Yapılan çalışmalar, PPAR γ ligandı olan rosiglitazonun pterjium fibroblastlarında etkili bir antifibrotik ajan olduğunu göstermiştir. Ancak, PPAR γ reseptör antagonisti GW9662 uygulandığında rosiglitazonun antifibrotik etkisinin tersine dönmemesi bu ligandın PPAR γ 'dan bağımsız olabileceğini de göstermektedir. Aynı zamanda Nuwormegbe ve ark.'ları

pterjium üzerinde yaptıkları çalışmada rosiglitazonun α -SMA ve fibronektinin bazal seviyesini azaltabileceğini bulmuşlar bu ligandın pterjium tedavisi için uygun bir ajan olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Nuwormegbe ve ark., 2017).

PPAR β/δ , korneal epitelyal hücrelerde, retinanın iç nükleer tabakasında, retinal gangliyon hücre tabakasında, korneal fibroblastlarda ve korneal endotelyumda bol miktarda eksprese edilmektedir. PPARD geni 6p21.31 bölgesinde lokalize olmaktadır (Şekil 2.7.). PPAR β/δ proteini 440 amino asit uzunluğunda 50 kDa ağırlığındadır (<https://www.genecards.org>).



Şekil 2.7. PPARD Geninin Genomik Lokalizasyonu

(<https://www.genecards.org>)

PPAR β/δ 'nın gözdeki etkisi ve görevleri çok iyi bilinmemektedir. Ancak, PPAR β/δ 'nın proanjyogenik ve proinflamatuvar etkilerine dair çok sayıda çalışma mevcuttur. PPAR β/δ , farklı hücre tiplerinde anjyogenezisi ve VEGF'yi uyarmaktadır. Neovaskülerizasyon sürecinin dahil olduğu göz hastalıklarının tedavisiyle ilgili yapılan deney modellerinde PPAR β/δ antagonistlerinin kullanışlı olabileceğini ileri süren çalışmalar bulunmaktadır (Castelli ve ark., 2018). Aynı zamanda PPAR β/δ 'nın korneal epitelyal yaraların iyileşme süresince ekspresyonunun artmış olduğu rapor edilmiştir (Nakamura ve ark., 2012). Hem in vivo hem de in vitro deneylerde PPAR β/δ 'nın aktivasyonunun endotelyal hücre proliferasyonunu artırdığı bulunmuştur (Gu ve ark.,

2014). Epiderminin yara iyileşmesinde keratinosit hücrelerinin hayatta kalma sürecindeki en önemli transkripsiyonel düzenleyicilerden biri PPAR β/δ reseptörüdür. PPAR β/δ , anti-apoptotik yolaktaki PKB α /Akt1'in güçlü aktivasyonu ile integrin-bağımlı kinaz (ILK) ve 3-fosfoinozitol-bağımlı kinaz-1 (PDK1)'i kodlayan genleri doğrudan uyarır. Ayrıca primer keratinosit kültürlerinde görülen defektler sonucu ortaya çıkan hücreler arası adhezyon ve migrasyonda da PPAR β/δ görevlidir (Michalik ve Wahli, 2007). Hematopoietik kök hücreler üzerine yapılan çalışmalarda PPAR β/δ agonistinin bu hücrelerin migrasyonunu artırdığı bulunmuştur. Aynı zamanda PPAR β/δ , fibroblastlardan miyofibroblastlara dönüşüm sürecinde de görevli bir reseptördür (Park ve ark., 2016).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Materyal

CRABP2, FABP5 ve PPARD genlerinin mRNA ve protein ekspresyonlarını analiz etmek için Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde pterjium teşhisi ile ameliyat edilen 30 adet pterjiumlu olgudan elde edilen dokular çalışmaya dahil edildi. Çalışmada cerrahi operasyon sırasında alınan pterjium dokuları ve her bir olgunun aynı gözüne ait normal konjonktiva dokuları kullanıldı. Çalışma için gerekli izin, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 15-KAEK-020 no'lu karar ile alındı. Çalışmaya dahil edilen hastalar çalışma hakkında bilgilendirilerek sözlü ve yazılı onay alındı. Cerrahi işlem esnasında pterjium dokularının bir kısmı alınarak histopatolojik incelemeye gönderildi. Kalan dokular ayrılarak farklı tüpler içerisinde sıvı azot ile hızlı bir şekilde donduruldu. CRABP2, FABP5 ve PPARD genlerinin ekspresyon ve protein miktarlarının ölçülmesi işlemlerinde kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Çalışma, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarı'nda aşağıda belirtilen gereçler kullanılarak gerçekleştirildi.

Blotlama sistemi (Biorad, 1704150, ABD), dikey elektroforez seti (Biorad, 1658030, ABD), buzdolabı (Arçelik, 570465 MB, Türkiye) çalkalayıcı (İka, Almanya),

etüv (Memmert, Almanya), -20 °C derin dondurucu (Arçelik, 2052DY, Türkiye), -80 °C Derin Dondurucu (Nuaire, NU-9483E, ABD), güç kaynağı (Biorad, 1645070, ABD). Distile su cihazı (Elga-option Q7, İngiltere), hassas terazi (Kern ABT, WB0750631, Almanya), manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica, F20520162, İtalya), mikrodalga fırın (Arçelik, MD554, Türkiye), homojenizatör (Next Advance Storme 24, BBY24M-CE, ABD), plate (Applied Biosystems, 4346907, İngiltere). Otoklav (HMC, HV25, Almanya), pH metre (Hanna Instruments, HI2020W, ABD), plate yapıştırıcı (Applied Biosystems, 201405092, İngiltere), qubit 2.0 Fluormeter (İnvitrogen by life technologies, Avusturalya), Real-Time PZR cihazı (Applied Biosystems, İngiltere), otomatik pipetler (Gilson, Fransa), Santrifüj (Hettich, D78532, Almanya), vorteks (Velp Scientifica, F20220176, İtalya), termal döngü cihazı (Techne, İngiltere), soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya). Cam şişe, beher, balon joje, bağıt, steril eldiven.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Gen ekspresyonunun belirlenmesi için kullanılan kimyasal maddeler ve kitle; RNA mini purification kiti (Thermo, Katalog No: 12183018A, ABD), β -merkaptoetanol (Merck, Almanya), RNA izolasyon kiti (Thermo, Katalog No: 12183018A, ABD), RNaz Zap (Thermo, Katalog No: AM9780, ABD), etanol (Sigma-Aldrich Katalog No: E7023, ABD), qubit RNA HS-Assay kiti (İnvitrogen Katalog No: Q32852, ABD), cDNA sentez kiti (GeneAll, Hyperscript, First strand synthesis kit Katalog no: 601-005, Kore), qubit ssDNA assay kiti (İnvitrogen Katalog No: Q10212, ABD), SYBR green PZR master miks (Applied Biosystems Life Technologies, Katalog No:A25742, ABD), primerler (Sentegen Biyoteknoloji, Türkiye).

Protein miktarının belirlenmesi için kullanılan kimyasal maddeler ve kitler; GeneAll proteinEx™ animal cell/tissue (Cat. No:701-001, Güney Kore) kiti, proteaz inhibitör kokteyli (Santa Cruz Biotechnology Katalog No: SC-29130, ABD), Qubit protein assay kiti (İnvitrogen Katalog No: Q33212, ABD), NuPAGE LDS örnek solüsyonu (Thermo Katalog No: NP0008, ABD), NuPAGE indirgeyici ajan (Thermo Katalog No: NP0004, ABD), bis-tris gradient jel (İnvitrogen NP0321Box, ABD), marker (NZytech Katalog No: MB09002, Portekiz), running solüsyonu (ThermoFisher, NP0002, ABD), ponceu (Sigma-Aldrich, Katalog No: P7170-1L, ABD), nitroselüloz membrana (İnvitrogen, ABD), western blot breeze kit (İnvitrogen, Kromojenik Immunodeteksiyon Sistem, Rabbit Primer Antikor Katolog No:WB7105), primer antikorlar (Cell Signaling, Hollanda, Elabscience, ABD).

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanışı

LYS Solüsyonu: LYS (400 μ L) ve β -merkaptoetanol LYS'nin %1'i olacak şekilde (4 μ L) hazırlandı.

20X MES Solüsyonu (Running Solüsyonu): 1X olarak hazırlandı.

Blokkıng Solüsyonu: Western breeze kit içeriğinde bulunan solüsyon A'dan 2 ml, solüsyon B'den 3 ml, distile sudan 5 ml olacak şekilde hazırlandı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Dokuların Histopatolojik İncelemesi

Pterjium dokularının histopatolojik incelemesi, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Biyopsi materyalleri %10'luk formalin solüsyonu içerisinde 24 saat tespit edildikten sonra doku takip işlemine alındı. Doku takip işlemi otomatik doku takip cihazında gerçekleştirildi. Doku takip işlemi tamamlandıktan sonra doku örnekleri paraffin bloklar haline getirilerek ve mikrotomda 4 mikrometre kalınlığında kesit alınarak hematoksilin-eozin boyası ile boyandı. Hazırlanan preparatlar mikroskop altında incelendi ve konjonktiva epiteli ile örtülü fibroblastik stromal alanlar içerisinde karışık halde endotel hücre proliferasyonundan oluşan kapiller vasküler proliferasyon alanlarının görülmesi ile pterjium tanısı histopatolojik olarak doğrulandı.

3.2.2. Dokulardan RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu RNA mini purifikasyon kiti (Thermo, ABD) kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun şekilde yapıldı. İzolasyon işlemi aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

- Pterjium ve normal konjonktiva dokularından yaklaşık 20–25 mg örnek kullanılarak buz üzerinde bistürü yardımıyla parçalandı.
- Parçalanmış dokuların üzerine 400 µl LYS buffer ve doku hacmi kadar çelik bilye eklenerek homojenizatörde 10,000 x g'de 5 dk santrifüj edildi. Homojenizasyon

işlemi tamamlandıktan sonra bilyeler uzaklaştırıldı ve homojenat yüksek hızda 5 dk. daha santrifüj edildi.

- Santrifüj sonrası süpernatant temiz bir tüpe alındı ve eşit hacimde %70'lik etanol eklendi. Elde edilen lizat vortekslenip mini spin kolona aktarıldı. 11,500 x g'de 15 sn. oda ısısında santrifüj edildi.
- Toplama tüpleri yenilendi ve 700 µl yıkama tamponu 1 eklendi. 11,500 x g'de 15 sn. oda ısısında santrifüj edildi.
- Toplama tüpleri yenilendi ve 500 µl yıkama tamponu 2 eklendi. 11,500 x g'de 15 sn. oda ısısında santrifüj edildi. Bu basamak tekrar uygulandı.
- Spin kolonun tamamen yıkama tamponlarından arındırılması için 11,500 x g'de 1-2 dk. daha oda ısısında santrifüj edildi.
- Spin kolonlar etiketlenmiş steril 1.5ml'lik ependorfların içine alındı.
- Spin kolonun üzerine 30 µl elution tamponu eklendi ve 1 dk. oda ısısında bekleddikten sonra, yüksek hızda 2 dk. oda ısısında santrifüj edildi.
- Elde edilen RNA örneklerinin kalitatif ve kantitatif incelemeleri yapıldı.

3.2.3. İzole Edilen RNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Tayini

İzolasyon sonrasında RNA'nın konsantrasyonu, Qubit™ RNA HS assay kiti (İnvitrogen, ABD) kullanılarak Qubit® 2.0 Fluorometer cihazı (Life Technologies, ABD) ile belirlendi ve değer aralıkları 1.8 ile 2.00 arasında bulundu. İzole edilen total RNA'ların kalitatif değerlendirmesi için elde edilen RNA örnekleri %1'lik agaroz jelde 90 V'da yürütüldü.

3.2.4. cDNA Sentezi

İzole edilen total RNA örneklerinden Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu, RT-PZR) metodu kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. RT-PZR işleminde GeneAll cDNA sentez kiti (Güney Kore) kullanıldı. cDNA sentezi iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşama işleminde Tablo 3.1.'de gösterilen bileşenler eklendikten sonra örnekler 65°C'de 5 dk. PZR cihazında inkübe edildi. Daha sonra örnekler buz üzerine alınarak 1 dk. inkübe edildi.

Tablo 3.1. cDNA Sentezinde 1. Aşamada Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

| Bileşenler | Miktar (1X) |
|-------------------|-------------|
| dH ₂ O | 6,5 µl |
| Oligo dT | 0,75 µl |
| Random Hekzamer | 0,75 µl |
| dNTP | 1 µl |
| Total RNA | 5 µl |
| Total Hacim | 14µl |

İkinci aşamada, Tablo 3.2'de gösterilen bileşenler örnekler üzerine eklendikten sonra 55°C'de 1 saat, 95°C'de 5 dk. termal döngü cihazında (Techne, İngiltere) inkübe edildikten sonra gerçek zamanlı PZR analizleri için cDNA'ların konsantrasyonlarının ölçülmesi işlemine geçildi.

Tablo 3.2. cDNA Sentezinde Kullanılan 2. Aşama Bileşenler ve Miktarları

| Bileşenler | Miktar (1X) |
|--------------------------------|-------------|
| RTaz Reaksiyon Tamponu (10x) | 2 µl |
| DTT (0.1 M) | 2 µl |
| Reverse Transkriptaz (200U/µl) | 1 µl |
| RNaz İnhibitör | 1 µl |
| Total Hacim | 6 µl |

3.2.5. cDNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Pterjium ve konjonktiva dokularına ait cDNA'ların konsantrasyonu, Qubit™ ssDNA Assay Kiti (İnvitrogen, ABD) kullanılarak Qubit® 2.0 Fluorometer cihazında (Life Technologies, ABD) belirlendi ve değer aralıkları 10.2 ng ile 18.6 ng arasında bulundu. Her bir reaksiyon 60 ng olacak şekilde ayarlandı ve cDNA örnekleri kısa süre içinde kullanılacaksa -20°C'de, uzun süre içerisinde kullanılacak ise -80°C'de saklandı.

3.2.6. Gerçek Zamanlı PZR

CRABP2, FABP5 ve PPARD genlerin ifade analizleri, SYBR Green temelli kantitatif gerçek zamanlı PZR (Real-Time PZR) metodu kullanılarak Applied Biosystems StepOnePlus cihazında (Applied Biosystems, İngiltere) yapıldı.

Gerçek zamanlı PZR, 1980'lerde Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem bir milyardan daha fazla sayıda küçük DNA parçasını amplifiye etmeye izin

verir. Gerçek zamanlı PZR ile örnek içerisindeki spesifik hedef dizi amplifiye edilirken floresans yardımıyla amplifikasyon aşaması eş zamanlı olarak monitörize edilmektedir (Seifi ve ark., 2012). PZR ürününün miktarını belirlemek için birkaç yaklaşım bulunmuştur. Bunlardan en popülerleri PZR ürününe spesifik olarak etiketlenmiş TaqMan probunun hibridizasyonudur. Diğer bir yaklaşım ise PZR ürünü içerisine floresans bir boyaya olan SYBR-Green 1'in bağlanmasını temel almaktadır (Ponchel ve ark., 2003). SYBR Green I boyası özgül olmayan PZR ürünleri ve primer dimerleri gibi çift zincirli DNA moleküllerine de bağlanabilir. Bu nedenle oluşan floresans artışı daima özgül bir amplifikasyonu göstermeyebilir. Gerçek zamanlı PZR cihazlarında özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin ve primer dimer oluşumlarının belirlenmesi için “melting curve” (erime eğrisi) analizi yapılabilmektedir. Amplifikasyon süresince eşik döngü değeri (threshold cycle = Ct) PZR ürünüdeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı göstermektedir (Seifi ve ark., 2012).

3.2.6.1. Standart Eğri ve Amplifikasyon Verimliliği

Örnekler arasında güvenli bir karşılaştırma yapabilmek için amplifikasyon verimliliğinin (E) hesaplanması önemli bir aşamadır. Örneklerin karşılaştırmalı ifadenin düzeyinin hesaplanmasında bu yöntem kullanılmaktadır. Amplifikasyon verimliliği hem hedef gen hem de referans gen için %100 olursa, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılabilir (Pfaffl 2001).

$$\Delta Ct = [(E_{Hedef})^{\Delta Ct_{Hedef} (Kontrol-Örnek)} / (E_{Referans})^{\Delta Ct_{Referans} (Kontrol-Örnek)}]$$

$$E = 2^{(-1/\text{eğim})}$$

Her bir hedef gen ve referans gen için, farklı konsantrasyonlarda cDNA (1/10:1/100:1/1000 ve 1/10000) örnekleri hazırlanarak seri dilüsyon yapıldı, her bir

örnek 3'er kez tekrar edildi. Applied Biosystems StepOnePlus cihazında standart eğri üzerinden amplifikasyon verimliliği hesaplandı.

3.2.6.2. *CRABP2*, *FABP5* ve *PPARD* Genlerinin İfade Analizi

Amplifikasyon verimlilikleri hesaplandıktan sonra cDNA ve standart örnekler, Applied Biosystems StepOnePlus cihazında 3 tekrarlı olarak çalışıldı ve Ct ortalamaları alındı. Gerçek zamanlı PZR primerleri Tablo 3.3.'te verildi.

Tablo 3.3. Gerçek Zamanlı PZR İşleminde Kullanılan Primerler ve Sekansları

| OLİGO ADI | SEKANS |
|-----------|---------------------------|
| FABP5/F | 5'AAGCCAGATTGTATCATCAC3' |
| FABP5/R | 5'ACACTCCACCACTAATTTCC3' |
| CRABP2/F | 5'GCAGTGGAGATCAAACAGGA3' |
| CRABP2/R | 5'TTCTCACTCTCCCATTTCACC3' |
| PPARD/F | 5'GCCTCTTCCTCAACGACCAG3' |
| PPARD/R | 5'ATATCACTGAAGGGTTTGCGG3' |
| GAPDH/F | 5'AGCCACATCGCTGAGACA3' |
| GAPDH/R | 5'GCCCAATACGACCAAATCC3' |

Çalışmanın doğruluğu ve güvenilirliği için, housekeeping gen olarak; gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni, negatif kontrol olarak içerisinde cDNA kalıbı içermeyen PZR karışımı kullanıldı ve son olarak pozitif kontrol için önceden sonucu iyi çıkan bir örnek kullanıldı. Toplam hacim 20 µl olacak şekilde distile su ile ayarlandı. Çalışmada kullanılan PZR bileşenleri Tablo 3.4.'de verildi.

Tablo 3.4. Gerçek Zamanlı PZR Bileşenleri

| PZR BİLEŞENLERİ | Miktar (1X) |
|---------------------------|---------------------------------------|
| 2X SYBR Green Master Miks | 10 µl |
| F(10pm) | 1 µl |
| R(10pm) | 1 µl |
| ROX | 2 µl |
| cDNA | 2 µl(60 ng olacak şekilde hesaplandı) |
| d H ₂ O | x (20 µl'ye tamamlandı) |
| Total | 20 µl |

Gerçek zamanlı PZR karışımları hazırlandıktan sonra 96 örneklilik plakalara eşit hacimlerde dağıtıldı ve üzerlerine cDNA örnekleri eklendi. Tablo 3.5'te belirtilen PZR programı kullanıldı. Erime eğrisi analizi için ise Tablo 3.6'da belirtilen PZR programı kullanıldı.

Tablo 3.5. Gerçek Zamanlı PZR Koşulu

| | | |
|------|-------|-----------|
| 95°C | 10 dk | |
| 95°C | 15 sn | X45 döngü |
| 60°C | 45 sn | |

Tablo 3.6. Erime Eğrisi PZR Koşulu

| | |
|------|-------|
| 95°C | 15 sn |
| 60°C | 1 dk |
| 95°C | 15 sn |

CRABP2, FABP5 ve PPAR α genlerinin ifade düzeyleri, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak hesaplandı ve pterjium dokusunda normal konjonktiva dokusuna göre genlerin ekspresyonunun kaç kat değiştiği bulundu (Livak ve Schmittgen., 2001). Hesaplama işleminde aşağıda belirtilen yol izlendi.

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu;

ΔCt (Pterjium Dokusu): Hedef Gen (CTort)-Referans Gen (CTort)

ΔCt (Konjonktiva Dokusu): Hedef Gen (CTort)-Referans Gen (CTort)

$\Delta\Delta Ct$: ΔCt (Pterjium Dokusu) - ΔCt (Konjonktiva Dokusu)

$2^{-\Delta\Delta Ct}$: Değeri ise bunun logaritmik olarak kat değişikliğini göstermektedir.

İlgili genlere ait her bir pterjium doku örneğinin konjonktiva dokusuna göre kat değişikliğı bulunup ortalama değeri alındı.

3.2.7. Protein İzolasyonu

GeneAll ProteinExTM Animal cell/tissue kiti (GeneAll, Güney Kore) kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun şekilde protein izolasyonu yapıldı.

- Dokular bisturi ile ufak parçalara ayrıldıktan sonra 250ul ProteinEx solüsyonu, 2,5 ul proteaz inhibitör kokteyli ve örneklerin büyüklüğüne bağlı olarak çelik bilye eklenerek homojenizatör cihazına yerleştirildi.

Örnekler yeterince parçalanıncaya kadar homojenize edildi. Daha sonra bilyeler uzaklaştırıldı.

- Soğutmalı santrifüjde 16.000 x g, 4°C de 10 dk. santrifüj edildi.
- Süpernatant yeni bir ependorf tüpüne alınarak izolasyon işlemi tamamlandı.
- Sonrasında protein örnekleri -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.8. Protein Miktarının Ölçülmesi

Protein konsantrasyonu, Qubit Protein Assay Kit (invitrogen Q33212, ABD) yardımı ile Qubit® 2.0 Fluorometer cihazı (Life Technologies PN Q32866, ABD) ile saptandı.

3.2.9. Western Blot Analizi

Western blot, moleküler ve hücre biyolojisi alanında kullanılan çok önemli bir tekniktir. Bu yöntemle hücrelerden elde edilen protein karışımlarından istenilen protein ayrıştırılabilir ve miktarı tayin edilebilir. Western blot 3 aşamada gerçekleştirilmektedir;

- Aşama 1'de, jel elektroforezi yardımıyla proteinler moleküler ağırlıklarına göre ayrılırlar.
- Aşama 2'de, her protein için oluşan bantlar nitroselüloz veya PVDF membrana transfer edilir.
- Aşama 3'de, primer ve sekonder antikorlar kullanılarak hedef protein işaretlenir. İlgili protein ile bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılır. Daha sonra proteinlerin görüntülenmesi yapılır (Tahrin ve Ping-Chang, 2012).

3.2.9.1. CRABP2, FABP5 ve PPARD Proteinlerinin Analizi

Jele yüklenmesi gereken minimum miktarı, Qubitte ölçülen protein miktarına bölüp (A değeri) elde edildi. A değeri kadar protein ul cinsinden mikrosantrifüj tüpüne ilave edildi. A değeri 6,5 ul değerine bölündü (B değeri) bulundu. B değerini 2,5 ile çarpıp (C değeri) elde edildi. 0,5 ml mikrosantrifüj tüpüne C değeri kadar NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) ilave edildi. B değeri kadar NuPAGE® Reducing agent (10X) eklendi (Tablo 3.7.). Hazırladığımız örnekler 70°C’de 10 dk denatüre edildi. Denatüre edildikten sonra örnekler 2 dk buz üzerinde inkübe edildi.

Tablo 3.7. Protein Örneklerinin Hazırlanmasında Kullanılan Reaktifler ve Miktarları

| REAKTİF | MİKTAR |
|--------------------------------|---------------------------|
| Örnek | A DEĞERİ |
| NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) | C DEĞERİ (B DEĞERİ x 2,5) |
| NuPAGE® Reducing agent (10X) | B DEĞERİ (A DEĞERİ/6,5) |
| Deiyonize Su | X |

Jel kasetindeki ilk kuyucuğa 8ul marker (NZY Colour Protein Marker II) ve kalan kuyucuklara her bir örnekten hazırlanan 50ug (total protein miktarı eşitlendikten sonra 50 ug protein içerecek şekilde hesaplanmıştır) protein örneği %4-12’lik Bis-Tris Gradient jele (İnvitrogen NP0321Box, ABD) yüklendi. Jel 120 V’da 50 dk yürütüldü. Protein örnekleri SDS-PAGE’e tabii tutulduktan sonra nitroselüloz membrana (İnvitrogen, ABD) aktarıldı. Transfer işleminin başarılı olup olmadığını anlayabilmek için membran Ponceu ile boyandı. Proteinler görüldükten sonra membran ponceudan yıkayarak uzaklaştırıldı. Bu işlemden sonra Western Breeze kiti kullanıldı (İnvitrogen,

Chromogenic Immunodetection System, AntiRabbit Primary Antibody Cat:WB7105) ve (İnvitrogen, Chromogenic Immunodetection System, AntiMouse Primary Antibody Cat:WB7103). Proteinleri içeren membran bloklama solüsyonunda (İnvitrogen, ABD) oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda bekletildi. Yıkama işlemleri sonrasında, her protein için belirli oranlarda sulandırılmış primer antikor eklendi ve membran overnight bekletildi. Çalışmada kullanılan primer antikorlar ve özellikleri Tablo 3.8.'de verildi. İnternal kontrol olarak GAPDH proteini kullanıldı. İnkübasyon sonrasında antikor yıkama solüsyonu (İnvitrogen, ABD) ile membran yıkandı. Yıkama işlemi sonrasında membran alkalın fosfataz konjuge sekonder antikor solüsyonu (İnvitrogen, ABD) ile 1 saat muamele edildi. Membran antikor yıkama solüsyonu ve distile su ile yıkandı. 5ml kromojenik substurat (İnvitrogen, ABD) eklendi ve çalkalayıcıda 20 dk inkübe edildi. Bantlar görüntülenebilir hale geldikten sonra reaksiyonu durdurmak için 2X2 dk 10 ml distile su ile yıkama yapıldı. Bant görüntüleri kamera yardımı ile alınıp JPEG formatında bilgisayar ortamına aktarıldı ve sonuçlar İmage J programında analiz edildi.

Tablo 3.8. Western Blot İşleminde Kullanılan Antikorlar ve Özellikleri

| Antikor Adı | Moleküler Ağırlığı | Kaynağı |
|------------------------------------|--------------------|---------|
| PPARD (Kat. No. ESAP13086) | 50 kDa | Rabbit |
| FABP5 (Kat. No. ESAP3833) | 15 kDa | Rabbit |
| CRABP2 (Kat. No. ESAP12341) | 16 kDa | Rabbit |
| GAPDH (Kat. No. 2118S) | 37 kDa | Rabbit |

3.2.10. Verilerin İstatistik Analizi

Bu çalışma süresince yapılan tüm değerlendirmelerde, aynı hastanın aynı gözüne ait pterjium dokusu verileri ile normal konjonktiva dokusu verileri birbirlerine oranlanmıştır. Pterjium dokusu ve normal konjonktiva dokularındaki CRABP2, FABP5 ve PPARD genlerinin ekspresyon miktarları step one software v2.3 programı ile kantite edildi. CRABP2, FABP5 ve PPARD genlerinin verileri GAPDH geniyle normalize edilip $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünden çıkan verilerle istatistiksel analiz gerçekleştirildi. Protein bantları ImageJ programı kullanılarak analiz edildi. Ekspresyon ve protein verilerinin istatistiksel analiz SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yazılımı kullanılarak yapıldı. Tüm veriler ortalama \pm SEM ve ortanca değerler olarak verildi. Student t testi ve Mann-Whitney U testi ile verilerin anlamlılık düzeyleri analiz edildi. Yaş, cinsiyet gibi özellikler arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacı ile SPSS programı kullanıldı ve tüm analizler için χ^2 testi yapıldı. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak 0,05 kabul edilmiş olup, $p \leq 0,05$ ise anlamlı, $p \geq 0,05$ ise farklılık olmadığı yönünde değerlendirme yapıldı.

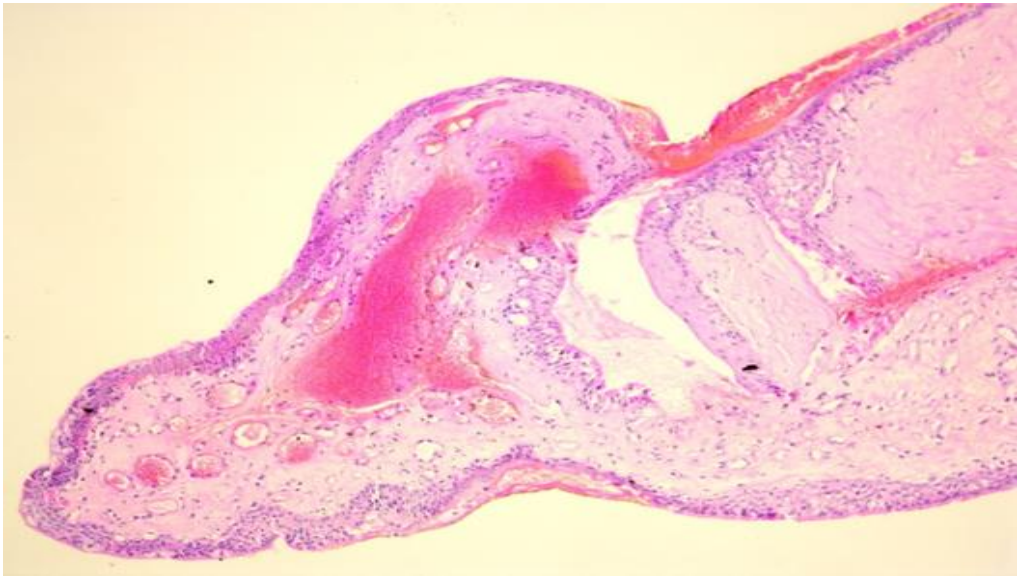
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. ÇALIŞMA GRUPLARI

30 pterjiumlu olgudan alınan dokulardan 25 tanesi primer pterjium (%83,3) ve 5 tanesi de nüks pterjiyum (%16,7) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Aynı zamanda pterjiumlu olguların aynı gözünden olmak üzere 30 tane normal konjonktiva dokusu alındı. Primer pterjiumlu gruptaki hastaların 17'si (%68) erkek, 8'i (%32) kadın ve yaş ortalaması 58.16 ± 8.65 bulundu. Nüks pterjiumlu gruptaki hastaların ise 4'ü (%80) erkek, 1'i (%20) kadın ve yaş ortalaması 58.20 ± 7.29 bulundu.

4.2. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Konjonktiva epiteli altı stromal alanlarda çok sayıda konjesyone ektazik kapiller vasküler yapılardan oluşan pterjium dokusuna ait histopatolojik görüntü aşağıda verildi (Şekil 4.1.).

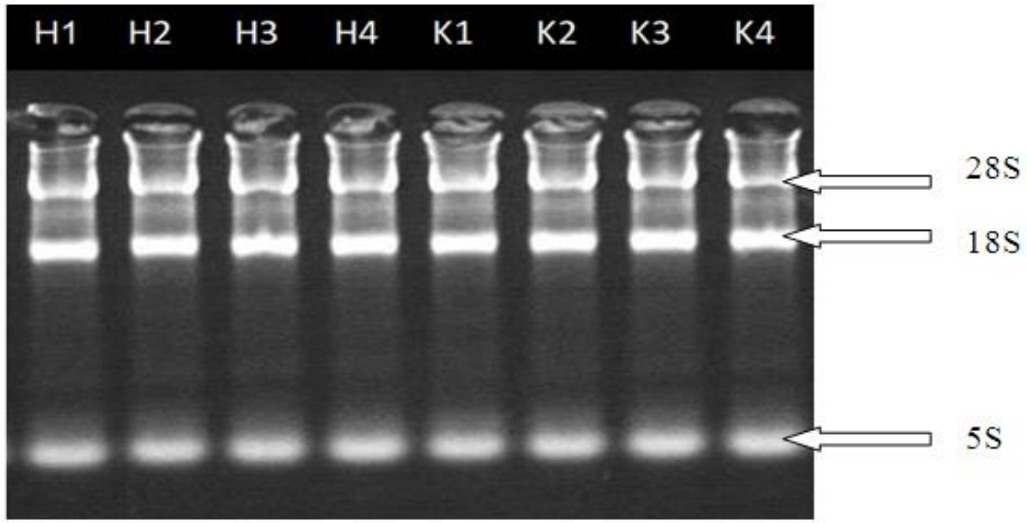


Şekil 4.1. Pterjium Dokusuna Ait Histopatolojik Görüntü (HE, X100)

4.3. REAL TIME-PZR

4.3.1. Pterjium ve Konjonktiva Dokularından Elde Edilen Total RNA'ların Kalitatif İncelenmesi

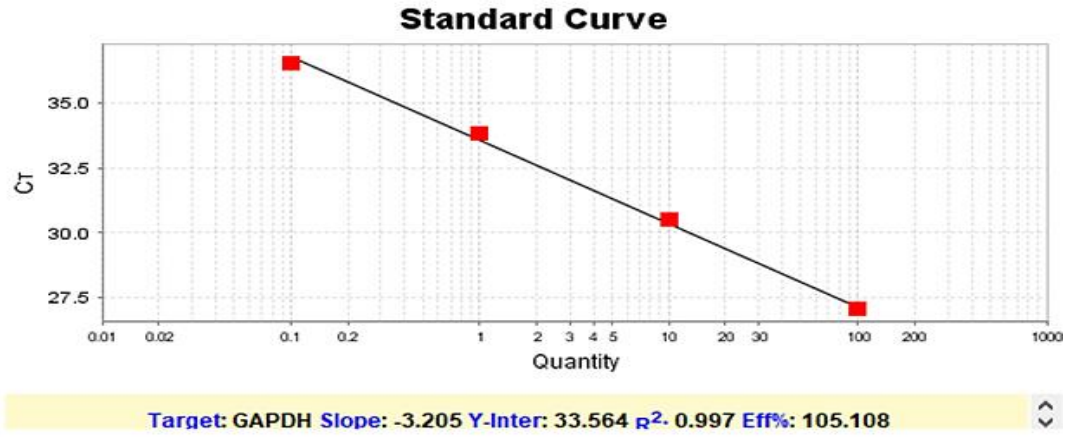
Total RNA'ların kalitatif değerlendirmesi için elde edilen RNA'lar %1'lik agaroz jelde ve 90 V'da yürütüldü (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Pterjium ve Normal Konjonktiva Dokularından Elde Edilen Total RNA'ların Jel Görüntüsü

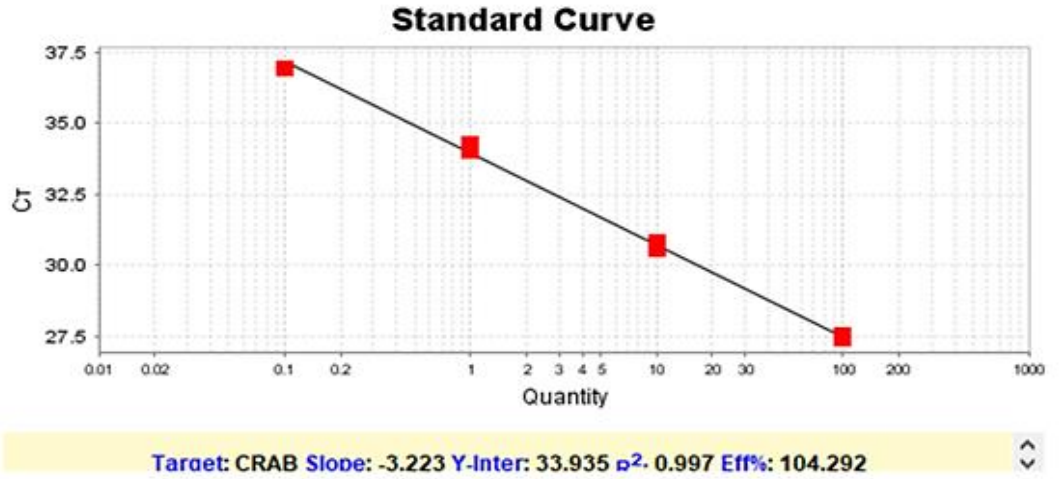
4.3.2. Standart Eğri ve Amplifikasyon Verimliliği İnceleme Sonucu

Elde edilen standart eğrilerin R^2 değerinin, 0.98 değerinden büyük olduğu ve amplifikasyon verimliliklerinin ise %90–110 arasında olduğu değerler kabul edildi (Al-Shanti ve ark., 2009). Hedef ve referans genlerinin amplifikasyon verimliliğinde hiçbir engelleyici etki gözlenmedi ($E=2.0$) (Şekil 4.3.-4.6.). Tüm genler için hesaplama işlemlerinde $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanıldı.



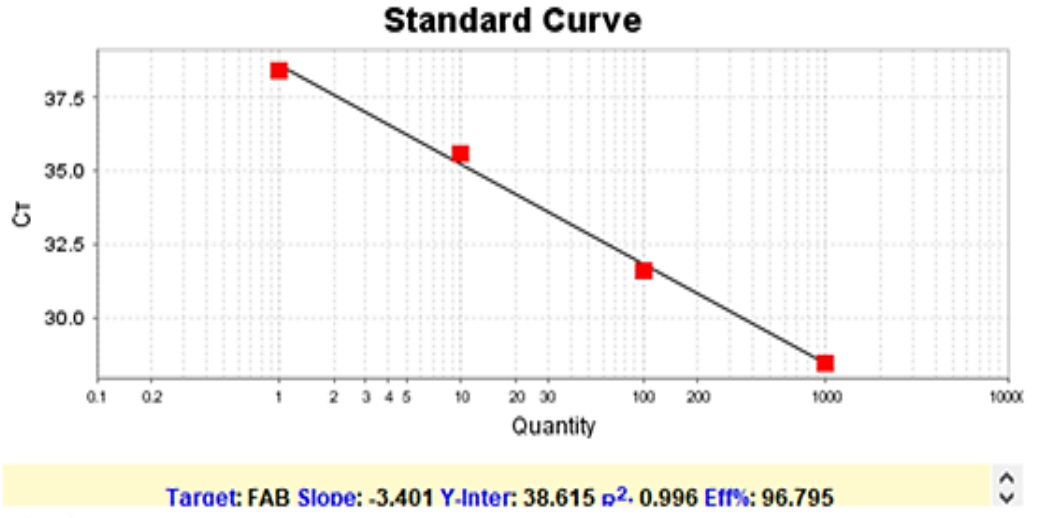
Şekil 4.3. Amplifikasyon Verimliliğini Hesaplamak İçin GAPDH Geninin

Standart Eğrisi.

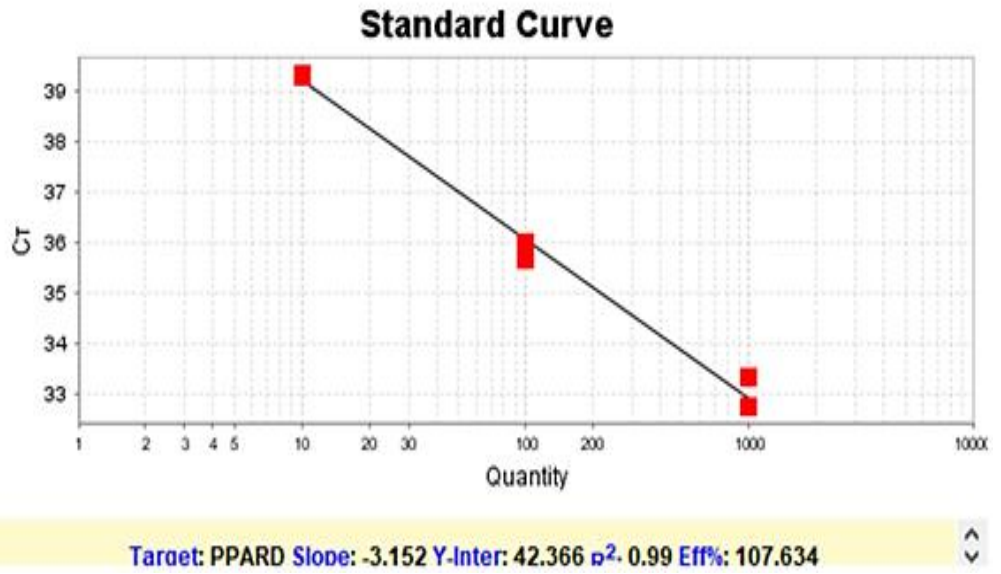


Şekil 4.4. Amplifikasyon Verimliliğini Hesaplamak İçin CRABP2 Geninin

Standart Eğrisi.



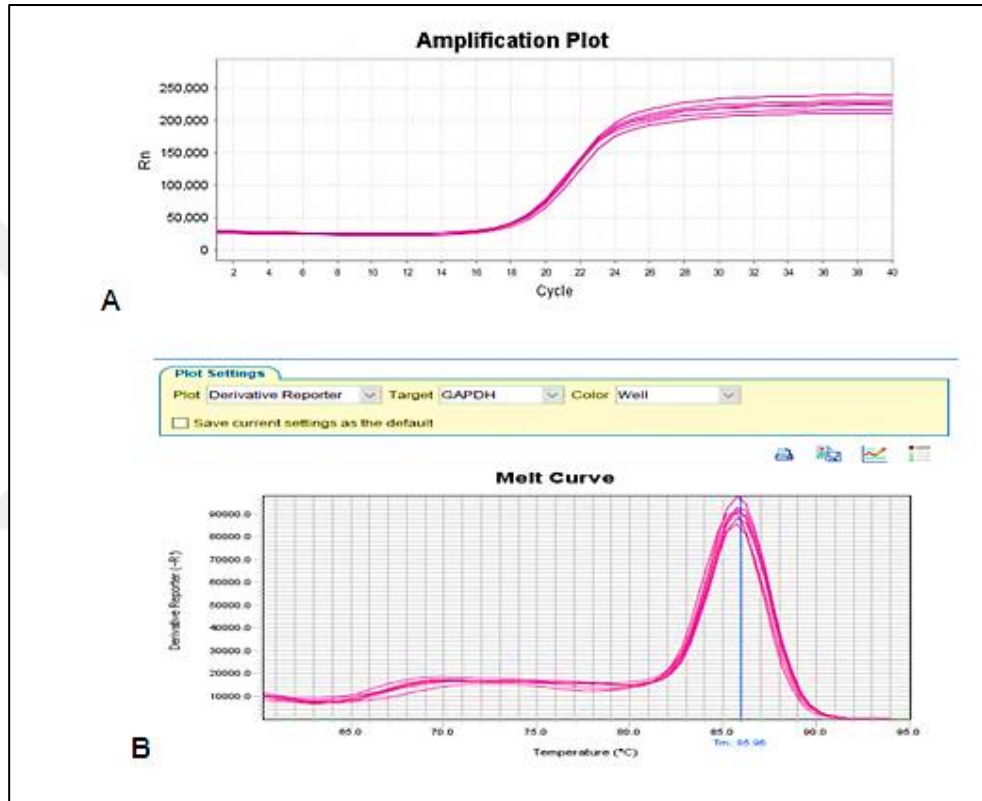
Şekil 4.5. Amplifikasyon Verimliliğini Hesaplamak İçin FABP5 Geninin Standart Eğrisi.



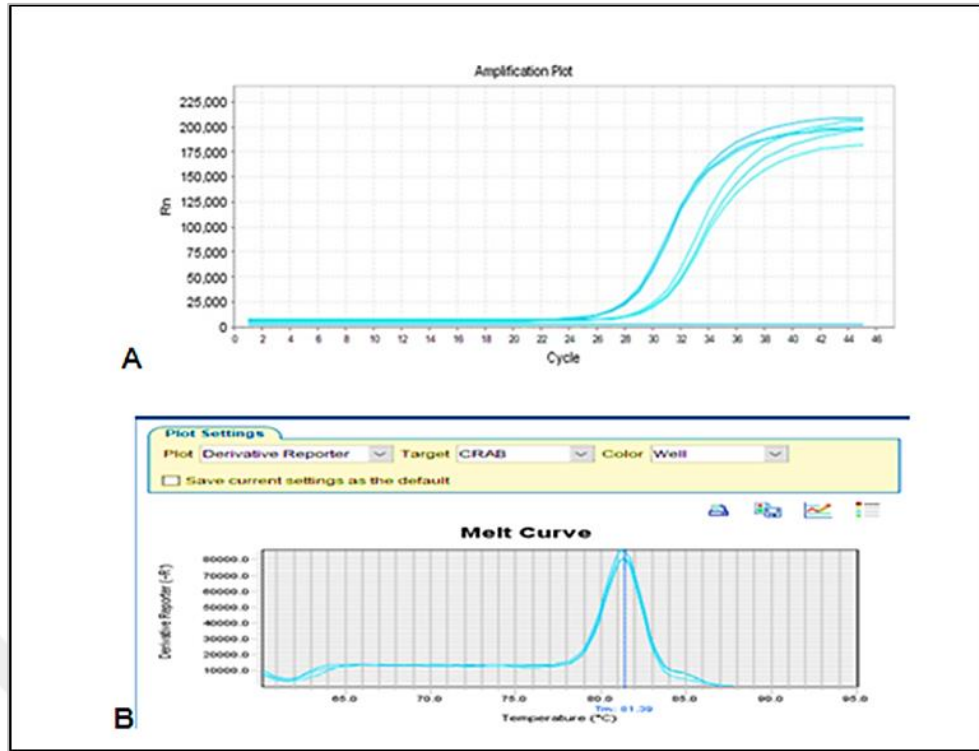
Şekil 4.6. Amplifikasyon Verimliliğini Hesaplamak İçin PPARD Geninin Standart Eğrisi.

4.3.3. Real Time-PZR Sonuçları

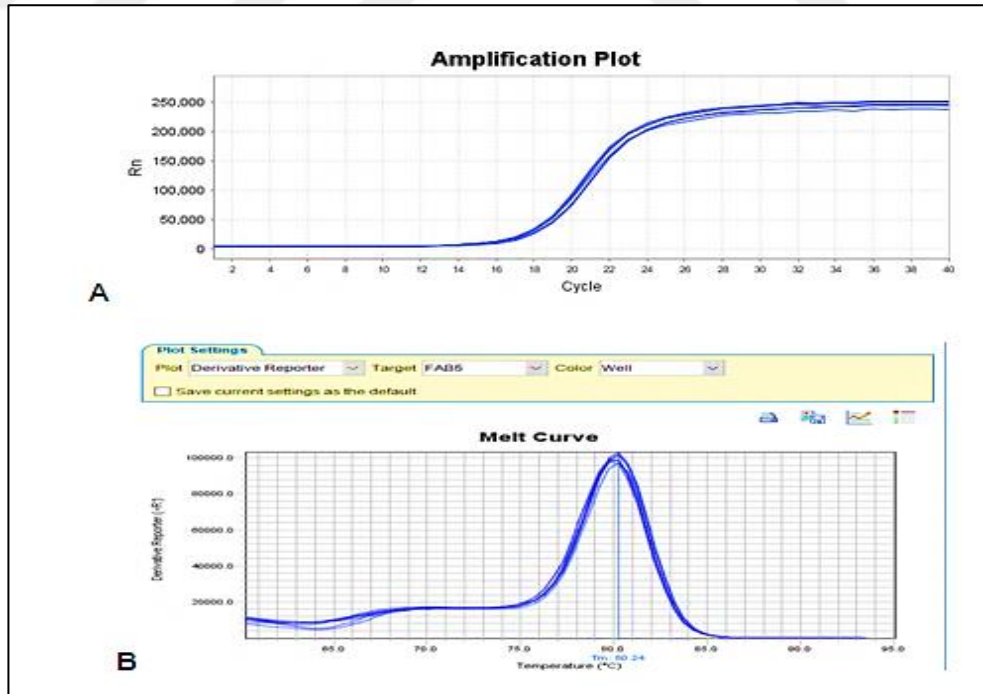
Real Time-PZR reaksiyonu sonucunda her gen için amplifikasyon eğrileri ve erime pikleri gözlemlendi (Şekil 4.7.-4.10.).



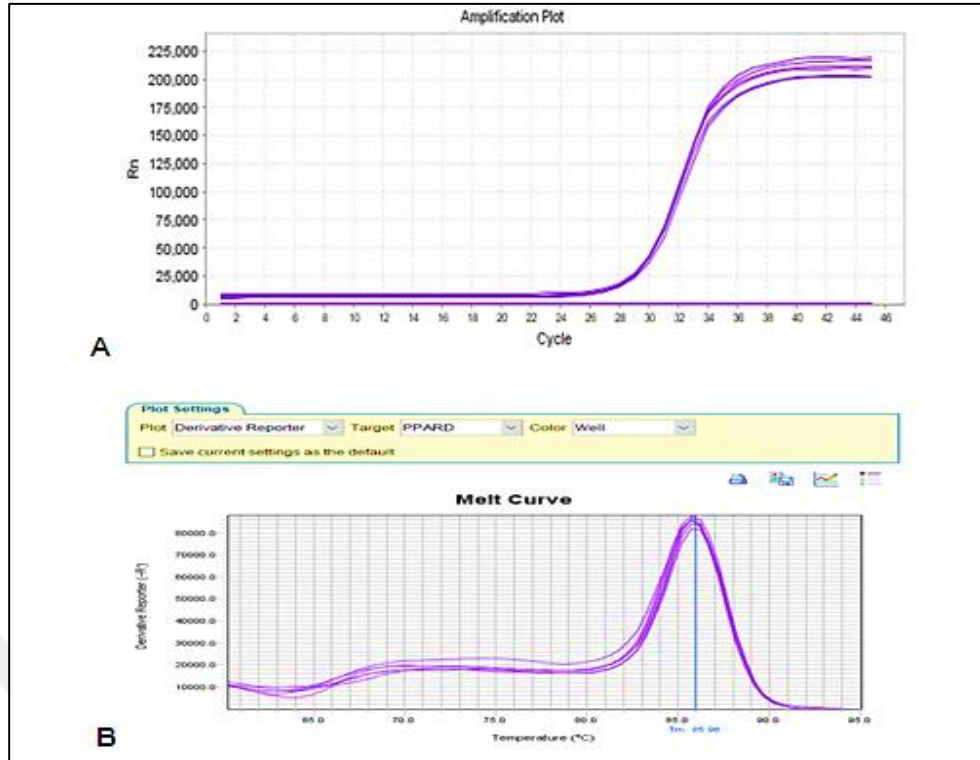
Şekil 4.7. GAPDH Genine Ait Amplifikasyon Eğrisi (A) ve Erime Piki (B)



Şekil 4.8. CRABP2 Genine Ait Amplifikasyon Eğrisi (A) ve Erime Piki (B)



Şekil 4.9. FABP5 Genine Ait Amplifikasyon Eğrisi (A) ve Erime Piki (B)



Şekil 4.10. PPARD Genine Ait Amplifikasyon Eğrisi (A) ve Erime Piki (B)

4.3.4. Real Time-PZR Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

Primer pterjium, nüks pterjium ve normal konjonktiva dokularındaki CRABP2, FABP5 ve PPARD genlerinin qRT-PZR sonuçları step one software v2.3 programı ile kantite edildi. CRABP2, FABP5 ve PPARD genlerinin verileri GAPDH geniyle normalize edilip kat değişikliğinin hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü kullanıldı. Bu işlemde çıkan verilerle istatistiksel analiz gerçekleştirildi. Tüm veriler $\text{ort} \pm \text{SEM}$ ve ortanca olarak verildi. Sonuçların analizi 0,9 – 1,1 aralığına göre yapıldı. 0,9'dan düşük olan değerlerde normal konjonktiva dokusuna oranla pterjium dokusunda ilgili geninin ifade düzeyinin azaldığı, 0,9–1,1 aralığında ise normal konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında değişmediği ve 1,1 değerinden yüksek değerlerde ise normal konjonktiva dokusuna oranla genin ifadesinde bir artış olduğu kabul edildi (Schmittgen

ve Livak 2008). CRABP2, FABP5 ve PPARD genlerinin ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre, sırasıyla incelendiğinde;

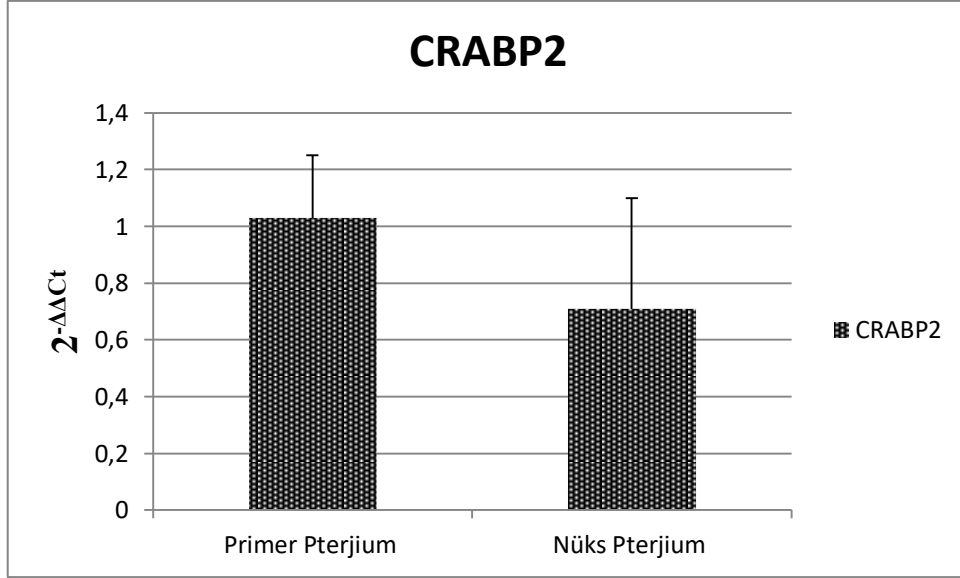
CRABP2 geninin ekspresyon seviyesi konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında, primer pterjium dokusunda ($1,03\pm 0,22$ - kat değişikliği, $p=0,895$) değişim olmadığı, nüks pterjium dokusunda ise ($0,71\pm 0,39$ -kat değişikliği, $p=0,577$) azalma olduğu saptandı (Şekil 4.11.).

FABP5 geninin ekspresyon seviyesi konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında, primer pterjium dokusunda ($1,02\pm 0,19$ -kat değişikliği, $p=0,917$) değişim olmadığı, nüks pterjium dokusunda ise ($0,88\pm 0,43$ -kat değişikliği, $p=0,577$) azalma olduğu saptandı (Şekil 4.12.).

Primer ve nüks pterjium dokuları arasında CRABP2 ve FABP5 genlerinin ekspresyon miktarları arasında bir fark görülmedi (sırasıyla, $p=0,551$, $p=0,764$).

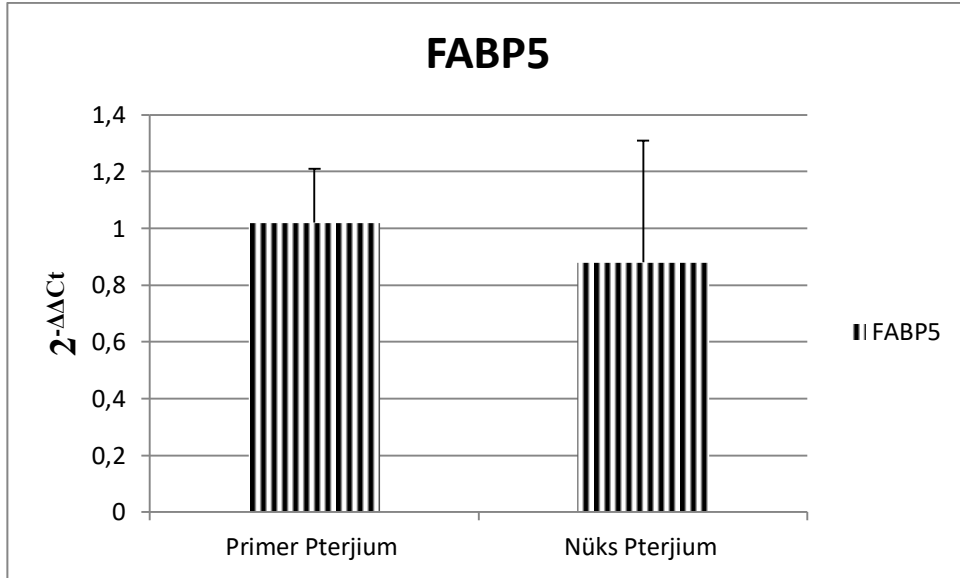
PPARD geninin ekspresyon seviyesi konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında, hem primer pterjium dokusunda ($1,08\pm 0,28$ - kat değişikliği, $p=0,784$) hem de nüks pterjium dokusunda ($1,10\pm 0,71$ -kat değişikliği, $p=0,095$) değişim olmadığı saptandı (Şekil 4.13.).

CRABP2 geninin FABP5 genine oranı konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında, primer pterjium dokusunda (1,00-kat değişikliği) değişim olmadığı, nüks etmiş pterjium dokusunda ise (0,81-kat değişikliği) oranında azalma olduğu saptandı (Şekil 4.14.), (Tablo 4.1.).



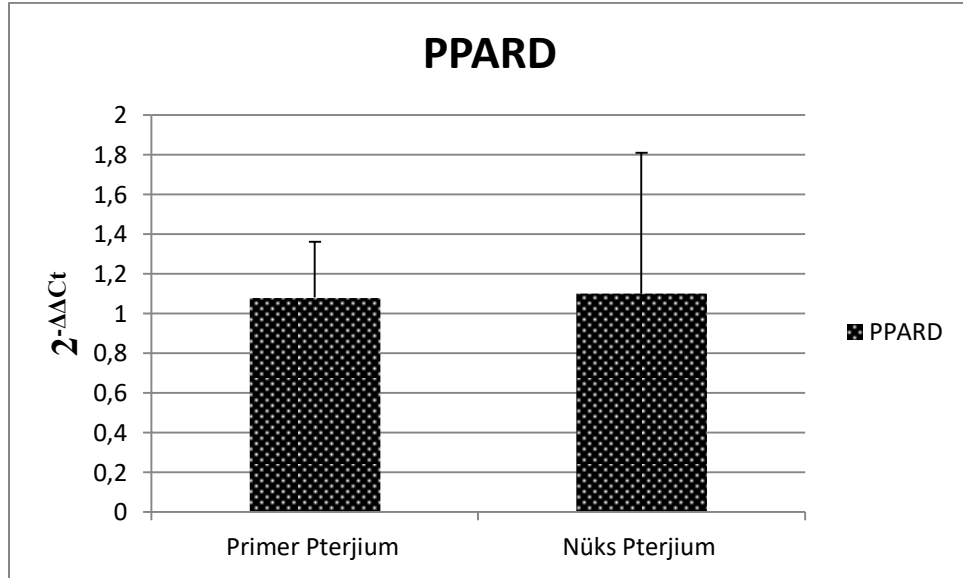
Şekil 4.11. Primer ve Nüks Pterjium Dokuları Normal Konjonktiva Dokuları İle Karşılaştırıldığında CRABP2 Geninin Ekspresyon Seviyesi Grafiği.

Çubuk grafik, primer pterjium (N=25) ve nüks pterjium (N=5) dokuları normal konjonktiva dokuları ile kıyaslandığında CRABP2 geninin ekspresyon seviyesindeki kat değişikliğini göstermektedir. CRABP2 geninin relatif kantifikasyon seviyesi qRT-PZR yöntemi kullanılarak ölçüldü. CRABP2 geninin kantifikasyon verilerinin normalizasyonunda housekeeping gen olarak GAPDH kullanıldı. Çubuk grafiğin yüksekliği ortalama değeri hata çubukları ise standart hata oranını temsil etmektedir.



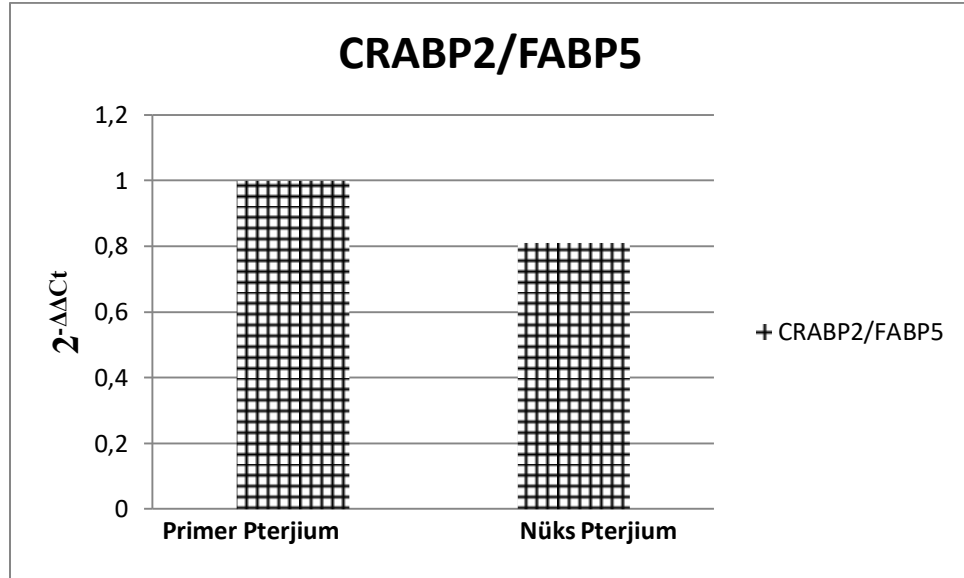
Şekil 4.12. Primer ve Nüks Pterjium Dokuları Normal Konjonktiva Dokuları İle Karşılaştırıldığında FABP5 Geninin Ekspresyon Seviyesi Grafiği.

Çubuk grafik primer pterjium (N=25) ve nüks pterjium (N=5) dokuları normal konjonktiva dokuları ile kıyaslandığında FABP5 geninin ekspresyon seviyesindeki kat değişikliğini göstermektedir. FABP5 geninin relatif kantifikasyon seviyesi qRT-PZR yöntemi kullanılarak ölçüldü. FABP5 geninin kantifikasyon verilerinin normalizasyonunda housekeeping gen olarak GAPDH kullanıldı. Çubuk grafiğin yüksekliği ortalama değerleri, hata çubukları ise standart hata oranını temsil etmektedir.



Şekil 4.13. Primer ve Nüks Pterjium Dokuları Normal Konjonktiva Dokuları İle Karşılaştırıldığında PPARD Geninin Ekspresyon Seviyesi Grafiği.

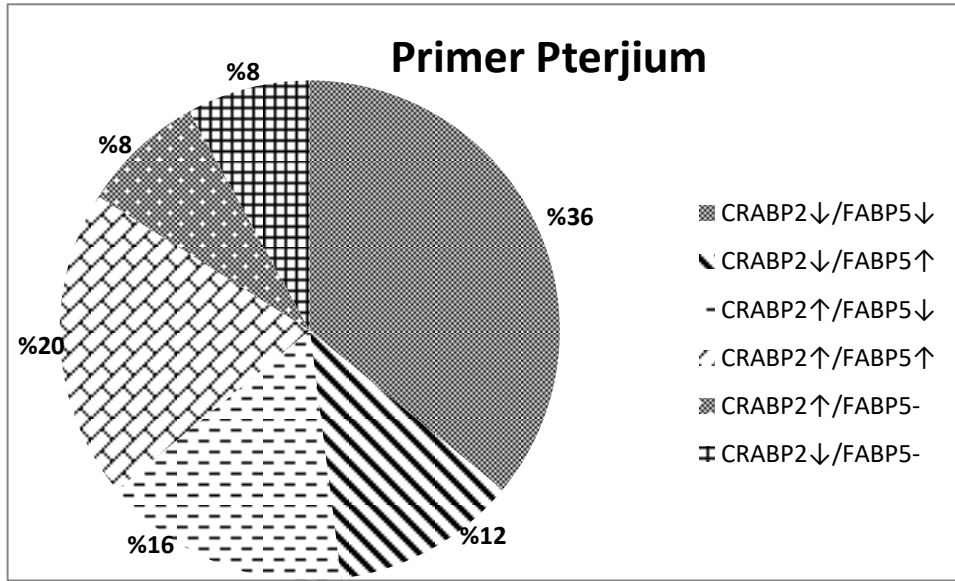
Çubuk grafik primer pterjium (N=25) ve nüks pterjium (N=5) dokuları normal konjonktiva dokuları ile kıyaslandığında PPARD geninin ekspresyon seviyesindeki kat değişikliğini göstermektedir. PPARD geninin relatif kantifikasyon seviyesi qRT-PZR yöntemi kullanılarak ölçüldü. PPARD geninin kantifikasyon verilerinin normalizasyonunda housekeeping gen olarak GAPDH kullanıldı. Çubuk grafiğin yüksekliği ortalama değerleri, hata çubukları ise standart hata oranını temsil etmektedir.



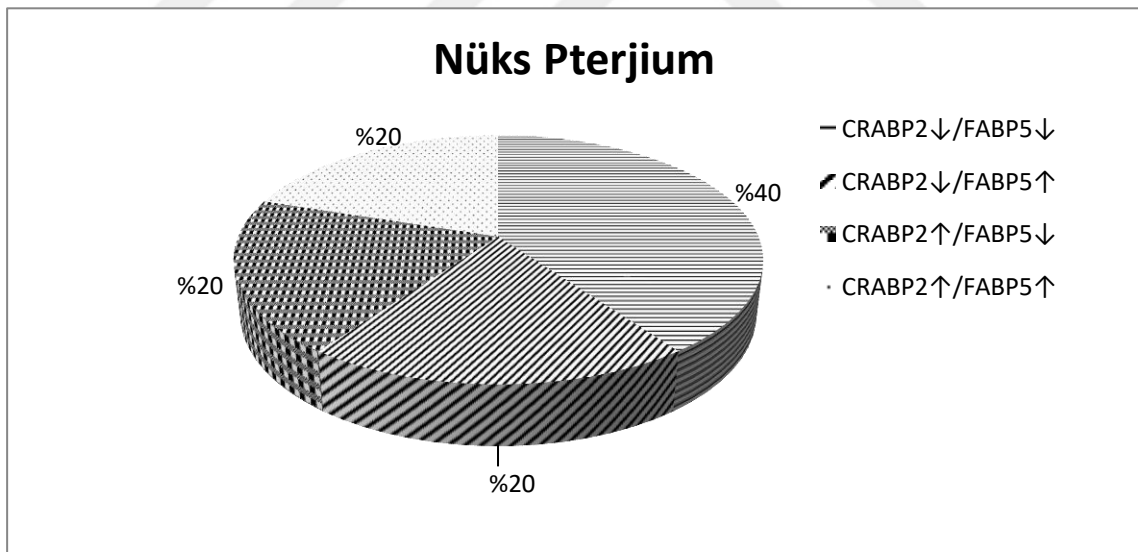
Şekil 4.14. Primer ve Nüks Pterjium Dokuları Normal Konjonktiva Dokuları İle Karşılaştırıldığında CRABP2/FABP5 Ekspresyon Seviyesi Grafiği.

Çubuk grafik, primer pterjium (N=25) ve nüks pterjium (N=5) dokuları normal konjonktiva dokuları ile kıyaslandığında CRABP2/FABP5 ekspresyon seviyesindeki kat değişikliğini göstermektedir. CRABP2 ve FABP5 genlerinin relatif kantifikasyon seviyeleri qRT-PZR yöntemi kullanılarak ölçüldü. CRABP2 ve FABP5 genlerinin kantifikasyon verilerinin normalizasyonunda housekeeping gen olarak GAPDH kullanıldı. Çubuk grafiğin yüksekliği ortalama değerleri temsil etmektedir.

CRABP2 ve FABP5 genlerinin ekspresyon paternleri, primer ve nüks pterjium dokuları incelendiğinde; primer pterjium dokularının %36'sında CRABP2↓/FABP5↓ (9/25), %12'sinde CRABP2↓/FABP5↑ (3/25), %16'sında CRABP2↑/FABP5↓ (4/25), %20'sinde CRABP2↑/FABP5↑ (5/25), %8'inde CRABP2↑/FABP5- (2/25) ve %8'inde CRABP2↓/FABP5- (2/25) paterni sergilemektedir. Nüks pterjium dokularının %40'ında ise CRABP2↓/FABP5↓ (2/5), %20'sinde CRABP2↓/FABP5↑ (1/5), %20'sinde CRABP2↑/FABP5↓ (1/5) ve %20'sinde CRABP2↑/FABP5↑ (1/5) paterni sergilemektedir (↑:artış; ↓:azalış; -:değişim yok) (Şekil 4.15–4.16).



Şekil 4.15. Primer Pterjium ve Normal Konjonktiva Dokuları Karşılaştırıldığında CRABP2 ve FABP5 Genlerinin Ekspresyon Paternlerinin Dağılım Grafiği.
 ↑:upregüle, ↓:downregüle, -:değişim yok



Şekil 4.16. Nüks Pterjium ve Normal Konjonktiva Dokuları Karşılaştırıldığında CRABP2 ve FABP5 Genlerinin Ekspresyon Paternlerinin Dağılım Grafiği.
 ↑:upregüle, ↓:downregüle

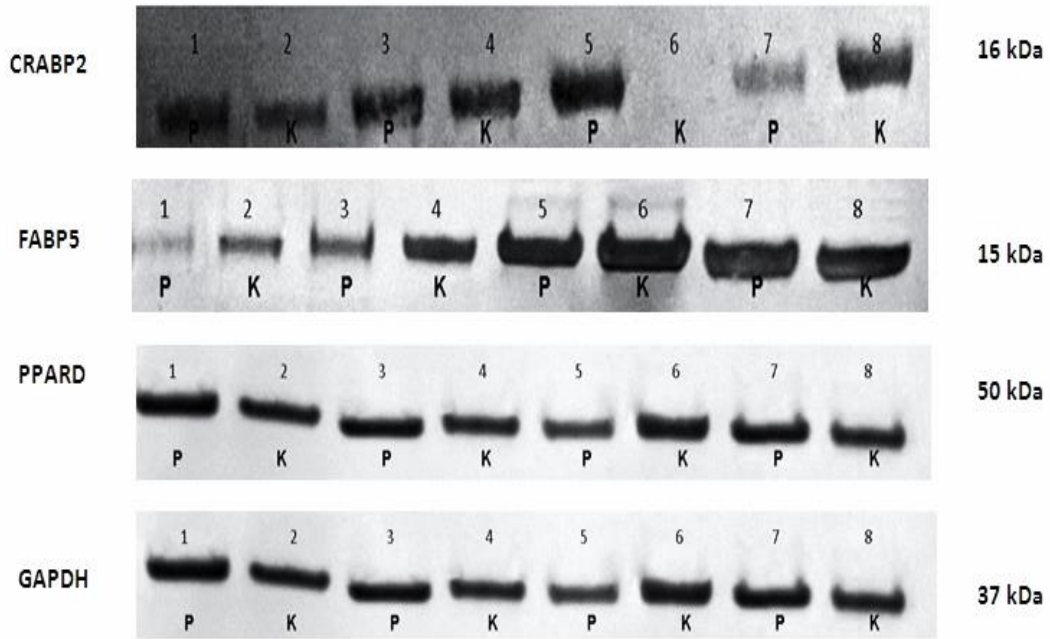
Tablo 4.1. Primer ve Nüks Pterjium Dokuları Normal Konjonktiva Dokularıyla Karşılaştırıldığında CRABP2, FABP5 ve PPARD Genlerinin mRNA Ekspresyon Seviyelerinin İstatistiksel Analizi

| Gen Adı | CRABP2 | FABP5 | PPARD |
|----------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| | (ort±SEM) | (ort±SEM) | (ort±SEM) |
| Primer Pterjium (N=25) | 1,03±0,22 | 1,02±0,19 | 1,08±0,28 |
| Normal Konjonktiva (N=25) | 1 | 1 | 1 |
| p | 0,895 | 0,917 | 0,784 |
| Gen Adı | CRABP2 | FABP5 | PPARD |
| | (medyan) | (medyan) | (medyan) |
| Nüks Pterjium (N=5) | 0,16 | 0,51 | 0,60 |
| Normal Konjonktiva (N=5) | 1 | 1 | 1 |
| Z | -0,557 | -0,557 | -1,671 |
| p | 0,577 | 0,577 | 0,095 |

(Tüm değerler ort±SEM ve medyan şeklinde verildi. İstatistiksel olarak anlamlı olan veriler koyu olarak ifade edildi)

4.4. WESTERN BLOT

Primer pterjium, nüks pterjium ve normal konjonktiva dokularındaki CRABP2, FABP5 ve PPARD proteinlerinin miktarları western blot yöntemiyle belirlendi. Normalizatör olarak GAPDH proteini kullanıldı (Şekil 4.17.).



Şekil 4.17. Primer ve Nüks Pterjium Dokuları Normal Konjonktiva Dokularıyla Karşılaştırıldığında CRABP2, FABP5 ve PPARD Proteinlerinin Seviyeleri.

4.4.1. Western Blot Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

CRABP2, FABP5 ve PPARD proteinlerinin verileri GAPDH proteini ile normalize edildi. Tüm veriler $\text{ort} \pm \text{SEM}$ ve medyan olarak verildi. Sonuçların analizi 0,9 – 1,1 aralığına göre yapıldı. 0,9'dan düşük olan değerlerde normal konjonktiva dokusuna oranla pterjium dokularında ilgili proteinin düzeyinin azaldığı, 0,9–1,1

aralığında ise normal konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında değişmediği ve 1,1 değerinden yüksek değerlerde ise normal konjonktiva dokusuna oranla proteinin miktarında bir artış olduğu kabul edildi. Protein verilerinin istatistiksel analizi SPSS 16.0 yazılımı kullanılarak yapıldı. Student t testi ve Mann-Whitney U testi ile verilerin anlamlılık düzeyleri analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak 0,05 kabul edilmiş olup, $p \leq 0,05$ ise anlamlı, $p > 0,05$ ise farklılık olmadığı yönünde değerlendirme yapıldı.

FABP5 protein seviyesi konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında, primer pterjium dokusunda ($0,91 \pm 0,08$ -kat değişikliği, $p=0,258$) değişim olmadığı, nüks etmiş pterjium dokusunda ise ($0,76 \pm 0,13$ -kat değişikliği, $p=0,095$) azalma olduğu saptandı.

CRABP2 protein seviyesi konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında, primer pterjium dokusunda ($0,97 \pm 0,08$ - kat değişikliği, $p=0,679$) değişim olmadığı, nüks etmiş pterjium dokusunda ise ($0,63 \pm 0,14$ -kat değişikliği, $p=0,095$) azalma olduğu saptandı.

PPARD protein seviyesi konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında, hem primer pterjium dokusunda ($0,94 \pm 0,06$ - kat değişikliği, $p=0,272$) hem nüks etmiş pterjium dokusunda ($0,97 \pm 0,19$ -kat değişikliği, $p=0,577$) değişim olmadığı saptandı.

CRABP2 proteininin ve FABP5 protein seviyesine oranı primer pterjium dokusunda (1,06-kat değişikliği) değişim olmadığı, nüks etmiş pterjium dokusunda ise (0,83-kat değişikliği) oranında azalma olduğu saptandı (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. Primer ve Nüks Pterjium Dokuları Normal Konjonktiva Dokularıyla Karşılaştırıldığında CRABP2, FABP5 ve PPARD Protein Seviyelerinin İstatistiksel Analizi

| Protein Adı | CRABP2 | FABP5 | PPARD |
|----------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| | (ort±SEM) | (ort±SEM) | (ort±SEM) |
| Primer Pterjium (N=25) | 0,97±0,08 | 0,91±0,08 | 0,94±0,06 |
| Normal Konjonktiva (N=25) | 1 | 1 | 1 |
| p | 0,679 | 0,258 | 0,272 |
| Protein Adı | CRABP2 | FABP5 | PPARD |
| | (medyan) | (medyan) | (medyan) |
| Nüks Pterjium (N=5) | 0,51 | 0,64 | 0,73 |
| Normal Konjonktiva (N=5) | 1 | 1 | 1 |
| Z | -1,671 | -1,671 | -0,557 |
| p | 0,095 | 0,095 | 0,577 |

Tüm değerler ort±SEM ve medyan şeklinde verildi. İstatistiksel olarak anlamlı olan veriler koyu olarak ifade edildi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Pterjium, özellikle güneş ışığına maruz kalan bireylerde sık rastlanan invazif ve proliferatif bir oküler yüzey hastalığıdır (Girolama ve ark., 2006). Pterjium dünya genelinde dağılım göstermektedir ancak sıcak ve kuru iklimlerde çok daha yaygın görülmektedir (Lu ve ark., 2017). Pterjium dokusu, konjonktival epitelyum ve subkonjonktival konnektif dokuların bileşiminden oluşmakta ve Bowman tabakasının çözülmesi, elastozis, epitelyal-mezenşimal dönüşüm ve inflamasyona uğramış neovasküler fibroblastik bir stroma ile karakterize edilmektedir (Chien ve ark., 2013). Pterjium tedavisinde şu anki birincil yaklaşım cerrahi operasyon ile dokunun uzaklaştırılmasıdır ancak ameliyat sonrası skleral nekrozis, nüks ve oküler enfeksiyon gibi yan etkiler oldukça dikkat çekmektedir (Sha ve ark., 2014). DNA hasarı, moleküler genetik değişim, sitokinler, büyüme faktörleri, anjiyogenik faktörler, ekstraselüler matriks yeniden oluşumu, immünolojik mekanizmalar ve viral enfeksiyonlar gibi pek çok biyolojik sürecin pterjium patogenezinde dahil olduğu düşünülse de bu hastalığa sebep olan kesinleşmiş bir moleküler mekanizma hala bilinmemektedir (Xu ve ark., 2014). Ancak korneal invazyon, hücresel proliferasyon, ameliyat sonrası nüks ve anti-apoptozis gibi özellikler göstermesi pterjiumun premalignant özellikte bir doku olabileceğini düşündürmektedir (Chen ve ark., 2006).

Vitamin A eksikliği, ülserleşme, epitel skuamöz metaplazi ve keratinleşme ile sonuçlanan oküler yüzeyin anormal farklılaşmasına ve konjonktival goblet hücrelerinin eksikliğine sebep olmakta ve aynı zamanda bu vitaminin eksikliğinden kaynaklı göz kuruluğu ve kornea erimesi gibi gözle ilişkili rahatsızlıklar gelişmekte olan ülkelerin birçoğunda önemli bir halk sağlığı problemi olarak tanımlanmaktadır. Retinoidler, oküler yüzey hastalıkları, göz kuruluğu ve skuamöz metaplazi gibi hastalıklarının

tedavilerinde farmakolojik ajanlar olarak test edilmişlerdir (Nezzar ve ark., 2007). Vitamin A eksikliği, hem korneal hem de konjonktival epitelde anormal farklılaşmaya yol açmaktadır. Oküler yüzey dokularında gen ekspresyonu ile ilişkili olarak RA'nın araştırıldığı çok az çalışma mevcuttur. Hori ve ark.'ları, insan konjonktival hücre hattında yaptıkları çalışmada RA'nın, membran ilişkili mucin (muc) 4 ve 16 genlerinin mRNA seviyelerini artırdığını bulmuşlardır. Vitamin A'nın oküler yüzey zemin ıslaklığını hangi moleküler mekanizma ile sürdürdüğü henüz tam olarak bilinmemektedir (Hori ve ark., 2005). Pterijiumda vitamin A eksikliği görülmesinin RA sinyal yolağındaki reseptörlerin bu hastalığın tedavisinde potansiyel farmakolojik hedefler olabileceği görüşünü güçlendirmektedir (Gümüş ve Yaşar, 2013). RA, hücre farklılaşması, proliferasyonun inhibisyonu, apoptozis ve hücre döngüsü gibi birçok biyolojik süreçte anahtar düzenleyici olarak görev almaktadır (Michalik ve Wahli, 2007). RA, hücre içerisinde iki farklı yol izlemekte ve izlediği bu yollara bağlı olarak hücrel ekspresyonda birbirine zıt sonuçlar meydana getirmektedir. CRABP2, RA'yı RAR'lara taşıdığında apoptozu, hücre döngüsünün durdurulmasını ve hücre farklılaşmasını tetikler böylelikle tümör büyümesi baskılanmaktadır. FABP5, RA'yı PPAR β/δ 'ya taşıdığında ise proliferasyon ve hücrelerin hayatta kalması uyarılmakta ve tümör gelişimi ilerlemektedir. RA'nın, RAR'lara mı yoksa PPAR β/δ 'ya mı taşınacağı sitozoldeki CRABP2'nin FABP5'e oranına bağlıdır (Vreeland ve ark., 2014). RA birçok kanser türünün tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 2018). Ancak farklı kanser türlerinde retinoid sinyallerinde bazı anormallikler olduğu gözlemlenmiştir. Bu anormallikler retinoid reseptörlerinin seviyesindeki değişikliklerden retinoid metabolizmasında görevli genlerin ekspresyonundaki değişimlerden kaynaklanabilmektedir. Retinoid sinyalindeki bu değişimler tümör

hücrelerini etkileyebilir ve kanser tedavisinde kullanılan retinoidlerin etkisini değiştirebilir (Cai ve Gudas, 2009). Girolama ve ark.'ları pterjium ve kültüre edilmiş insan pterjium epitelyal hücrelerinde UV-B aracılığıyla uyarılmış IL-6 ve IL-8 sitokinlerinin IFN- α ve RA tarafından inhibe edildiğini bulmuşlardır (Girolamo ve ark., 2006). Birkaç çalışmada nüks pterjiumun topikal IFN- α ile tedavi edilebileceği gösterilmiştir (Boehm ve Huang, 2004; Herbort ve ark., 1988). Bazı araştırmacılar, topikal IFN- α ve RA'yı pterjiума benzer özellikler taşıyan primer ve nüks korneal/konjonktival neoplazilerin tedavisinde hiçbir yan etki olmaksızın başarılı bir şekilde kullanmışlardır (Girolama ve ark., 2006). Ancak pterjium üzerinde RA etkisi bu çalışmalarla tam olarak anlaşılmamıştır. Bu çalışma, primer pterjium, nüks pterjium ve normal konjonktival dokularda retinoik asit sinyal yolağında görevli olan CRABP2, FABP5 ve PPAR β/δ 'nın mRNA ve protein ekspresyonlarını belirlemek amacıyla gerçekleştirildi.

CRABP2, anti-karsinojenik aktiviteye sahiptir ve birçok kanser türünde mRNA ekspresyonunun azalmış olduğu bulunmuştur. Bazı çalışmalar, meme karsinoma hücrelerinde CRABP2'nin apoptozu uyardığını göstermiştir (Vreeland ve ark., 2014). Feng ve ark.'ları, CRABP2 geninin meme kanseri hücrelerinin invazyonunu ve metastazını baskıladığını bulmuşlardır (Feng ve ark., 2019). Favorskaya ve ark.'ları küçük hücreli olmayan akciğer kanseri dokularında yaptıkları çalışmada örneklerin %56'sında CRABP1 ve CRABP2 mRNA seviyelerinin yükselmiş olduğunu ve CRABP2 mRNA'sındaki azalışın lenf nodu metastazıyla ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (Favorskaya ve ark., 2014). Literatürü incelediğimiz kadarıyla RA sinyal yolağındaki genler ile pterjium patogenezi arasındaki ilişkiyi araştıran çok az çalışma mevcuttur. 2013 yılında Fang tarafından yapılan bir tez çalışmasında, hücre kültüründe

kullanılan serumun azaltılmasının ve TGF- β eklenmesinin, pterjium fibroblastlarının fonksiyonlarına ve hücre sinyallerine olan etkisi araştırıldı. Çalışma sonucunda pterjium fibroblast hücre kültüründe RA sinyal yolağında görevli ve aynı zamanda tümör baskılayıcı özelliklere sahip olan retinoik asit reseptörü yanıtlayıcısı 3 (RARRES3), CRABP2 ve retinol dehidrojenaz 10 (RDH10) genlerinin ekspresyonunun azalmış olduğu rapor edilmiştir. Fang'ın pterjium fibroblastlarında CRABP2 geninin ekspresyonunun down regüle olduğunu bulması pterjium gelişiminde bu genin etkili olabileceğini düşündürmektedir (Fang, 2013). Biz, Fang'ın çalışmasından farklı olarak bu genin ekspresyonunu hem primer hem de nüks pterjium dokusunda inceledik. Yaptığımız bu çalışmada; CRABP2 geninin ekspresyon seviyesi normal konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında, primer pterjium dokusunda ($1,03 \pm 0,22$ - kat değişikliği, $p=0,895$) değişmediğini bulduk. CRABP2 geninin mRNA ekspresyonun nüks pterjium dokusu normal konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında 1,4 kat azaldığını bulduk ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($0,71 \pm 0,39$ -kat değişikliği, $p=0,577$). Primer ve nüks pterjium dokuları arasında ise CRABP2 geninin ekspresyon miktarı arasında bir fark görülmedi ($p=0,551$). Pterjiumun proliferatif bir büyüme göstermesi ve birçok kanser türünde anti-karsinojenik özellikte olan CRABP2 geninin mRNA ekspresyonunun azalmış olması, bu genin pterjium patogenezinde de önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bu yüzden nüks pterjium dokusundaki CRABP2 geninin mRNA ve protein ekspresyonundaki azalışın daha çok sayıda doku içeren çalışmalarla doğrulanmasına ihtiyaç vardır.

Tümör anjiyogenezinde önemli olan FABP5'in hepatoselüler ve prostatik karsinoma gibi bazı kanser türlerinde yüksek seviyede ifade edildiği bulunmuştur (Pan ve ark., 2018; Adamson ve ark., 2003). Bazı çalışmalarda FABP5'in up regülasyonunun

insan intrahepatik kolonjiokarsinoma hücrelerinde ve hepatoselüler karsinoma hücre hatlarında migrasyonu, invazyonu ve proliferasyonu artırdığı gösterilmiştir (Ohata ve ark., 2017; Jeong ve ark., 2012). Yapılan araştırmalarda, insan prostat kanseri hücre hatlarında ve prostat karsinoma dokusunda FABP5 geninin yüksek derecede eksprese olduğu rapor edilmiştir. Metastatik olmayan benign rat model hücre hattında (Rama 37) yapılan çalışmalarda hücre içerisine FABP5 geni transfer edildiğinde primer tümör büyümesinin ilerlediği ve metastazın uyarıldığı bulunmuştur (Adamson ve ark., 2003). Aynı zamanda, prostat ve meme kanserlerinde malignant progresyona dahil olduğu ve in vivo deneylerde FABP5 geninin ekspresyonundaki artışın VEGF ekspresyonunu artırarak metastazı uyarabildiği rapor edilmiştir (Jing ve ark.,2001; Chmurzyńska, 2006). Birçok kanser türünde FABP5 geninin ekspresyonun artmış olması bu genin potansiyel bir prognostik marker olarak kabul edilmesine ve malignansinin baskılanması için hedef olarak gösterilmesine neden olmuştur (Morgan ve ark., 2008). Aynı zamanda FABP5, pterjiyum gelişiminde de önemli olan epitelial-mezenşimal dönüşümün uyarılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Ohata ve ark., 2017). Ancak literatürü incelendiğimiz kadarıyla bununla ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Yaptığımız çalışmada, primer pterjiyum dokusu konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında FABP5 geninin ekspresyon seviyesinin değişmediğini (1,02±0,19-kat değişikliği, p=0,917) nüks pterjiyum dokusunda ise azaldığını (0,88±0,43-kat değişikliği, p=0,577) bulduk. Primer ve nüks pterjiyum dokuları arasında FABP5 geninin ekspresyon miktarı arasında bir fark görülmedi (p=764). Yapılan bu çalışma pterjiyum gelişiminde FABP5'in rolünün olup olmadığının anlaşılmasına yönelik öncü bir çalışmadır ve birçok kanser türünde bu geninin ekspresyonu artarken nüks pterjiyum dokusunda istatistiksel olarak anlamlı

olmasada bir azalış olduğu bulundu. Yapılan bu gözlemlerin örnek sayısının daha fazla olduğu çalışmalarla desteklenmesi önemlidir.

Kanser hücreleri üzerinde RA'nın biyolojik etkisi büyük çoğunlukla CRABP2 ve FABP5'in ekspresyon paternleriyle belirlenmektedir. Zhang ve ark.'ları kafatası içerisinde agresif bir büyüme gösteren ve yüksek derecede nüks oranına sahip bir beyin tümörü olan medulloblastoma (MB) üzerinde yaptıkları çalışmada CRABP2/FABP5 oranının MB hücrelerinin RA duyarlılığıyla yakından ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmanın sonuçları MB'nin klinik tedavisinde RA'nın seçici olarak kullanılması gerektiğini göstermektedir (Zhang ve ark., 2018). Li ve ark.'ları yaptıkları çalışmada primer kraniofarenjioma tümörleri nüks kraniofarenjioma tümörleri ile karşılaştırıldığında FABP5/CRABP2 oranının önemli derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır (Li ve ark., 2016). Yaptığımız çalışmada CRABP2 geninin FABP5 genine oranının konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında, primer pterjium dokusunda (1,00-kat değişikliği) değişmediğini, nüks pterjium dokusunda ise (0,81-kat değişikliği) oranında azaldığını bulduk. Nüks pterjiumda CRABP2'nin ekspresyonu FABP5'e göre daha fazla azalmıştır. Nüks pterjium dokularındaki CRABP2 geninin FABP5 genine oranının azalması RA'nın etkisini değiştirebilir bu yüzden bu çalışmanın daha fazla sayıdaki nüks örneğiyle çalışılmasına ihtiyaç vardır.

Oksidatif stres ve inflamasyonun önemli olduğu oküler patolojilerde PPAR'ların önemli etkilerinin olduğu düşünülmektedir (Castelli ve ark., 2018). Literatürde, PPAR γ 'nın pterjium dokusu üzerindeki etkisi yoğun olarak çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda, PPAR γ ligandı olan rosiglitazonun pterjium fibroblastlarında etkili bir antifibrotik ajan olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda Nuwormegbe ve ark.'ları pterjium üzerinde yaptıkları çalışmada, rosiglitazonun α -SMA ve fibronektinin bazal seviyesini

azaltabileceğini bulmuşlar ve bu ligandın pterjium tedavisi için uygun bir ajan olabileceği ileri sürmüşlerdir (Nuwormegbe ve ark., 2017). Saika ve ark.'ları ise pterjium gelişiminde etkili olduğu düşünülen MMP ve inflamatuvar büyüme faktörlerinin ekspresyonundaki artışın, PPAR γ tarafından baskılandığını bulmuşlardır (Saika ve ark., 2007). PPAR β/δ 'nın gözdeki etkisi ve görevleri çok iyi bilinmemektedir. Yapılan son çalışmalarda, PPAR β/δ 'nin aktivasyonunun, hücrel apoptozisi inhibe ederken hücrel proliferasyon ve anjiyogenez süreçlerini ilerlettiği ve farklı hücre tiplerinde VEGF'yi uyardığı bulunmuştur (Park ve ark., 2016; Castelli ve ark., 2018). Hem in vivo hem de in vitro deneylerde PPAR β/δ 'nin aktivasyonunun endotelial hücre proliferasyonunu artırdığı raporedilmiştir (Gu ve ark., 2014). PPAR β/δ , anti-apoptotik yolaktaki PKB α /Akt1'in güçlü aktivasyonu ile PDK1'i kodlayan geni doğrudan uarmakta ve ayrıca primer keratonosit kültürlerde görülen defektler sonucu ortaya çıkan hücrel adhezyon ve migrasyonda da PPAR β/δ görevlidir (Michalik ve Wahli, 2007). Diyabetik retinopati, göz kuruluğu, yaşla ilişkili maküler dejenerasyon, optik nörit, tiroid göz hastalıkları, glukom ve oküler yaralanmalar gibi pek çok göz hastalığında PPAR'ların etkileri araştırılmıştır. Oksidatif stres ve inflamasyonun önemli olduğu oküler patolojilerde PPAR'ların önemli etkilerinin olduğu düşünülmektedir. (Nuwormegbe ve ark., 2017). PPAR β/δ , pterjium gelişiminde etkili olduğu düşünülen fibroblastlardan miyofibroblastlara dönüşüm sürecinde de görevli bir reseptördür (Park ve ark., 2016). Literatürü incelediğimiz kadarıyla pterjium dokusunda PPAR β/δ 'nin etkili olup olmadığı ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yaptığımız çalışmada konjonktiva dokusuyla karşılaştırıldığında hem primer pterjium dokusunda hem de nüks pterjium dokusunda PPAR geninin ekspresyon seviyesinin değişmediğini bulduk (1,08 \pm 0,28- kat değişikliği, p=0,784; 1,10 \pm 0,71-kat değişikliği, p=0,095). Yapılan bu

çalışma pterjiumda PPARD geninin ekspresyonunun çalışıldığı ilk çalışmadır. Oksidatif stres ve inflamasyonda PPAR'ların etkisi göz önüne alındığında bu genlerin pterjiumda daha detaylı olarak çalışılmasına ihtiyaç vardır.

Nüks pterjium grubumuzun 5 dokudan oluşması bizim çalışmamızı sınırlandırmaktadır. Daha fazla sayıdaki nüks pterjium dokusunda CRABP2 ve FABP5 genlerinin ekspresyonlarının çalışılması pterjium patogenezinde bu genlerin etkisinin olup olmadığının anlaşılmasında faydalı olacaktır. Aktif ve agresif bir büyüme eğilimi gösteren pterjiumun etiyopatogenezinin aydınlatılması, erken aşamalarda bu hastalığın engellenmesinde ve nüksünde daha umut verici tedavilerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Adamson, J., Morgan, E.A., Beesley, C., Mei, Y., Foster, C.S., Fujii, H. ve ark. (2003).** High-level expression of cutaneous fatty acid-binding protein in prostatic carcinomas and its effect on tumorigenicity. *Oncogene*; 22(18):2739-49.
- Anguria, P., Kitinya, J., Ntuli, S. ve Carmichael, T. (2014).** The role of heredity in pterygium development. *Int j ophthalmol*; 7(3), 563-573.
- Balendiran, G.K., Schnutgen, F., Scapin, G., Borchers, T., Xhong, N., Lim, K. ve ark. (2000).** Crystal structure and thermodynamic analysis of human brain fatty acid-binding protein. *The Journal of biological chemistry*; 275(35):27045-54.
- Blomhoff, R. ve Blomhoff, H.K. (2005).** Overview of Retinoid Metabolism and Function. *Journal of Neurobiology*; DOI 10.1002/neu.
- Boehm, M.D. ve Huang, A.J.W. (2004).** Treatment of recurrent corneal and conjunctival intraepithelial neoplasia with topical interferon alfa 2b. *Ophthalmology*; 2004 111(9):1755-1761.
- Brown, G.T., Cash, B.G., Blihoghe, D., Johansson, P., Alnabulsi, A. ve Murray, G.I. (2014).** The Expression and Prognostic Significance of Retinoic Acid Metabolising Enzymes in Colorectal Cancer. *PLoS ONE*; 9(3): e90776. doi:10.1371/journal.pone.0090776.
- Buratto, L., Phillips, R.L. ve Carito, G. (2000).** Pterygium Surgery. Thorafare nj:slack; Chapter9/32.
- Bushue, N. ve Wan, Y.Y. (2010).** Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 62/1285–1298.

- Cai, K. ve Gudas, L.J. (2009).** Retinoic acid receptors and GATA transcription factors activate the transcription of the human lecithin: Retinol acyltransferase gene. *Int J Biochem Cell Bio.*; March, 41(3): 546–553. doi:10.1016/j.biocel.2008.06.007.
- Cárdenas-Cantú, E., Zavala, J., Valenzuela, J. ve Valdez-García, J.E. (2014).** Molecular basis of pterygium development. *Seminars in Ophthalmology*; DOI: 10.3109/08820538.2014.971822.
- Castelli, V., D'Angelo, M., Antonosante, A., Catanesi, M., Benedetti, E., Desideri, G. ve Cimini, A. (2018).** Physiology and Pathophysiology of PPARs in the Eye. *Nuclear Receptor Research*; Vol. 5, Article ID 101370, 17 pages doi:10.11131/2018/101370.
- Chalkia, A.K., Spandidos, D.A. ve Detorakis, E.T. (2013).** Viral involvement in the pathogenesis and clinical features of ophthalmic pterygium. *International Journal Of Molecular Medicine* 32; 539-543.
- Chen, Y., Milos, D. C., Stein, W.D., Ardecky, R.J. ve Roninson, I.B. (2006).** Agonist and Antagonist of Retinoic Acid Receptors Cause Similar Changes in Gene Expression and Induce Senescence-like Growth Arrest in MCF-7 Breast Carcinoma. *Cancer Res.*; 66: (17).
- Chien, K.H., Chen, S.J., Liu, J.H., Woung, L.C., Chen, J.T., Liang, C.M., Chiou, S.H., Tsai, C.Y., Cheng, C.K., Hu, C.C. ve ark. (2013).** Correlation of MicroRNA-145 levels and clinical severity of pterygia. *The Ocular Surface*; 11(2):133-138.
- Chmurzynska, A. (2006).** The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *Journal of applied genetics*; 47(1):39-48.

- Chui, J., Coroneo, M.T., Tat, L.T., Crouch, R., Wakefield, D. ve Girolamo, N.D. (2011).** Ophthalmic Pterygium A Stem Cell Disorder with Premalignant Features. *AJP*; February, Vol. 178, No. 2.
- Cimpean, A.M., Sava, M.P. ve Raica, M. (2013).** DNA damage in human pterygium: One-shot multiple targets. *Molecular Vision*; 19, 348-356.
- D'Ambrosio, D.N., Clugston, R.D. ve Blaner, W.S. (2011).** Vitamin A Metabolism: An Update. *Nutrients*; 3, 63-103; doi:10.3390/nu3010063.
- Detorakis, E.T., Sourvinos, G., Tsampralakis, J., Spandidos, D.A. (1998).** Evaluation of loss of heterozygosity and microsatellite instability in human pterygium: clinical correlations. *Br J Ophthalmol*; 82:1324–1328.
- Di Sebastiano, K.M. ve Mourtzakis, M. (2014).** The role of dietary fat throughout the prostate cancer trajectory. *Nutrients*; 6(12):6095-109.
- Donato, L.J. ve Noy, N. (2005).** Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling. *Cancer Res*; 65:8193-8199.
- Donato, L.J. ve Noy, N. (2005).** Suppression of Mammary Carcinoma Growth by Retinoic Acid: Proapoptotic Genes Are Targets for Retinoic Acid Receptor and Cellular Retinoic Acid–Binding Protein II Signaling. *Cancer Res*; 65(18): 8193-9.
- Donato, L.J., Suh, J.H. ve Noy, N., (2007).** Suppression of mammary carcinoma cell growth by retinoic acid: the cell cycle control gene *Btg2* is a direct target for retinoic acid receptor signaling. *Cancer Res.* 15; 67(2), 609-15.
- Dua, H.S. ve Azuara-Blanco, A. (2000).** Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol*; 44(5).

- Dushku, N., John, M.K., Schultz, G.S. ve Reid, T.W. (2001).** Pterygia pathogenesis: corneal invasion by matrix metalloproteinase expressing altered limbal epithelial basal cells. *Arch Ophthalmol*; 119(5):695–706.
- Fang, C. (2013).** Elucidating the regulatory mechanisms of pterygium. Scientific Thesis ;School of Biological Sciences,University of East Anglia, Norwich, UK.
- Favorskaya I, Kainov Y, Chemeris G, Komelkov A, Zborovskaya I, Tchevkina E. (2014).** Expression and clinical significance of CRABP1 and CRABP2 in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*; 35(10):10295-10300.
- Feng, X., Zhang, M., Wang, B., Zhou, C., Mu, Y., Li, J., Liu, X., Wang, Y., Song, Z. ve Liu, P. (2019).** CRABP2 regulates invasion and metastasis of breast cancer through hippo pathway dependent on ER status. *J Exp Clin Cancer Res*; Aug 16, 38(1): 361.
- Ginger-Eke, H. A., Ogbonnaya, C. E. ve Ezisi, C. N. (2018).** Pterygium: recent trends and perspectives –A review of pathogenesis and current management options. *Journal of ophtalmology*; 26(2): 89-98.
- Girolamo, N.D., McCluskey, P., Lloyd, A., Coroneo, M.T. ve Wakefield, D. (2000).** Expression of MMPs and TIMPs in Human Pterygia and Cultured Pterygium Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; Vol. 41, No. 3.
- Girolamo, N.D., Wakefield, D. ve Coroneo, M.T. (2006).** UVB-Mediated induction of cytokines and growth factors in pterygium epithelial cells involves cell surface receptors and intracellular signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 47:2430–2437.

- Girolamo, N.D., Chuia, J., Coroneob, M.T. ve Wakefield, D. (2004).** Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Progress in Retinal and Eye Research*; 23:195–228.
- Gökmen, O. ve Yeşilirmak, N. (2019).** Van Bölgesindeki pterjium vakalarında etiyolojik faktörlerin değerlendirilmesi (pterjiumda etiyolojik faktörler). *Ortadoğu Tıp Derg.*; 11(4): 427-432.
- Gu, Y., Li, X., He, T., Jiang, Z., Hao, P. ve Tang, X. (2014).** The Antifibrosis Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ on Rat Corneal Wound Healing after Excimer Laser Keratectomy. Hindawi Publishing Corporation PPAR Research; Article ID 464935.
- Gum, S.I., Kim, Y.H., Jung, J.C., Kim, I.G., Lee, J.S., Lee, K.W. ve Park, Y.J. (2017).** Cyclosporine A inhibits TGF- β 2-induced myofibroblasts of primary cultured human pterygium fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 482/1148e1153.
- Gümüş, E., Yaşar, İ. (2013).** Pterjium Oluşmasında Mesleğin Etkileri. *Türk J Ophthalmol*;43:245-9.
- Herbort, C.P., Zografos, L., Zwingli, M. ve Schoeneich, M. (1988).** Topical retinoic acid in dysplastic and metaplastic keratinization of corneconjunctival epithelium. *Graefes arch clin exp ophthalmol*; 226(1):22-6.
- Hori, Y., Spurr-Michaud, S. J., Russo, C. L., Argüeso, P., Gipson, I. K. (2005) .** Effect of Retinoic Acid on Gene Expression in Human Conjunctival Epithelium: Secretory phospholipase A2 mediates retinoic acid induction of MUC16. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 46(11): 4050–4061.

- Igarashi, N., Honjo, M., Fujishiro, T., Toyono, T., Ono, T., Mori, Y., Miyata, K., Obinata, H. ve Aihara, M. (2019).** Activation of the Sphingosine 1 Phosphate–Rho Pathway in Pterygium and in Ultraviolet-Irradiated Normal Conjunctiva. *Int. J. Mol. Sci.*; 20, 4670; doi:10.3390/ijms20194670.
- Ishimura, S., Furuhashi, M., Watanabe, Y., Hoshina, K., Fuseya, T., Mita, T. ve ark. (2013).** Circulating Levels of Fatty Acid-Binding Protein Family and Metabolic Phenotype in the General Population. *PloS one*; 8(11):e81318.
- İnternet. (Erişim Tarihi: 02.11.2019).** History of Ptergium. <https://www.aoa.org>
- İnternet. (Erişim Tarihi: 12.10.2019).** FABP5, PPARD ve CRABP2 gene localization. <https://www.genecards.org>
- Jeong, C.Y., Hah, Y.S., Cho, B.I., Lee, S.M., Joo, Y.T., Jung, E.J., Jeong, S.H., Lee, Y.J., Choi, S.K., Ha, W.S. ve ark. (2012).** Fatty acid-binding protein 5 promotes cell proliferation and invasion in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncol rep.* 28(4):1283-92.
- Jing, C., Beesley, C., Foster, C.S., Chen, H., Rudland, P.S., West, D.C. ve ark. (2001).** Human cutaneous fatty acid-binding protein induces metastasis by up-regulating the expression of vascular endothelial growth factor gene in rat Rama 37 model cells. *Cancer Res*; 61(11):4357-64.
- Jones, H., Eaton, C.L., Barrow, D., Dutkowski, C. ve Griffiths, K. (1997).** Response of Cell Growth and Retinoic Acid Receptor Expression to Retinoic Acid in Neoplastic and Non-Neoplastic Prostate Cell Lines. *The Prostate*; 30:174–182

- Karagöz, E., (2009).** Primer ve nüks pterjium cerrahisinde konjonktival otogreft nakli ve amniyotik membran transplantasyonu ile kombine konjonktival otogreftleme yöntemlerinin karşılaştırılması. S.B. Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi; İstanbul.
- Kilic-Toprak, E., Toprak, İ., Caliskan, S., Ozdemir, Y., Demirtas, O., Altintas, F. ve Kucukatay, V. (2019).** Oxidative Stress and Genotoxicity in Pterygium: A Systemic Investigation. *Eye & Contact Lens*; 00: 1–6.
- Kim, S. W., Lee, J., Lee, B. ve Rhim, T. (2014).** Proteomic analysis in pterygium; upregulated protein expression of ALDH3A1, PDIA3, and PRDX2. *Molecular Vision*; 20:1192-1202.
- Kiser, P.D., Golczak, M., Maeda, A. ve Palczewski, K. (2012).** Key enzymes of the retinoid (visual) cycle in vertebrate retina. *Biochim Biophys Acta*; 1821:137-151.
- Konuk, O., Aktaş, Z., Erdem, Ö., Yüksel Konuk, E.B. ve Ünal, M. (2011).** Expression of Cyclooxygenase-2 and Ki-67 in Primary and Recurrent Pterygias. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.*; 31(1):115-21.
- Lee K., Lee S.Y., Park, S.Y. ve Yang H. (2014).** Antifibrotic Effect of Pirfenidone on Human Pterygium Fibroblasts. *Current Eye Research*; 39(7): 680–685.
- Lehrke, M. ve Lazar, M.A. (2005).** The Many Faces of PPAR γ . *Cell* 123; December 16.
- Li, Q., You, C., Zhou, L., Sima, X., Liu, Z., Liu, H. ve Xu, J. (2016).** High fabp5 versus crabpII expression ratio in recurrent craniopharyngiomas: implications for future treatment. *World neurosurg*; 94:197-205.

- Liu, L., Wu, J., Geng, J., Yuan, Z. ve Huang, D., (2013).** Geographical prevalence and risk factors for pterygium: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*; 3(11):e003787.
- Livak, K.J. ve Schmittgen, T.D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods*; 25(4):402-8.
- Lu, C.W., Hao, J.L., Yao, L., Li, H.J. ve Zhou, D.D. (2017).** Efficacy of curcumin in inducing apoptosis and inhibiting the expression of VEGF in human pterygium fibroblasts. *International Journal Of Molecular Medicine*; 39: 1149-1154.
- McArthur, M.J., Atshaves, B.P., Frolov, A., Foxworth, W.D., Kier, A.B. ve Schroeder, F. (1999).** Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *Journal of lipid research*; 40(8):1371-83.
- Michalik, L. ve Wahli, W. (2007).** Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1771/ 991–998.
- Michalik, L. ve Wahli, W. (2007).** Guiding Ligands to Nuclear Receptors. *Cell* 129; May 18.
- Morgan, E.A., Forootan, S.S., Adamson, J. , Foster, C.S., Fujii, H., Igarashi, M. ve ark. (2008).** Expression of cutaneous fatty acid-binding protein (C-FABP) in prostate cancer: potential prognostic marker and target for tumourigenicity-suppression. *International journal of oncology*; 32(4):767-75.
- Nakamura, Y., Nakamura, T., Tarui, T., Inoue, J. ve Kinoshita, S. (2012).** Functional Role of PPAR in Corneal Epithelial Wound Healing. *AJP*; February, Vol. 180, No. 2.

- Nezzar, H., Chiambaretta, F., Marceau, G., Blanchon, L., Faye, B., Dechelotte, P., Rigal, D. ve Sapin, V. (2007).** Molecular and metabolic retinoid pathways in the human ocular surface. *Molecular Vision*; 13,1641-50.
- Niles, R.M. (2004).** Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. *Mutation Research*; 555/ 81–96.
- Notara, M., Lentzsch, A., Coroneo, M., ve Cursiefen, C. (2018).** The Role of Limbal Epithelial Stem Cells in Regulating Corneal (Lymph) angiogenic Privilege and the Micromilieu of the Limbal Niche following UV Exposure. *Hindawi Stem Cells International*; Article: ID 8620172.
- Nuwormegbe, S.A., Sohn, J.H. ve Kim, S.W. (2017).** A PPAR-gamma agonist rosiglitazone suppresses fibrotic response in human pterygium fibroblasts by modulating the p38 MAPK pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; 58:5217–5226. DOI:10.1167/iovs.17-22203.
- Ockner, R.K., Manning, J.A., Poppenhausen, R.B. ve Ho, W.K. (1972).** A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science (New York, NY)*; 177(4043):56-8.
- Ohata, T., Yokoo, H., Kamiyama, T., Fukai, M., Aiyama, T., Hatanaka, Y., Hatanaka, K., Wakayama, K., Orimo, T., Kakisaka, T. ve ark. (2017).** Fatty acid-binding protein 5 function in hepatocellular carcinoma through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Cancer med.*; 6(5):1049-1061.
- Pérez-Rico, C., Pascual, G. ve Sotomayor, S. (2014).** As'unsolo A, Cifuentes A, Garc'ia-Honduvilla N, Buj'an J. Elastin development-associated extracellular matrix constituents of subepithelial connective tissue in human pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; 55:6309–6318.

Pan, L., Xiao, H., Liao, R., Chen, Q., Peng, C., Zhang, Y., Mu, T. ve Wu, Z. (2018).

Fatty acid binding protein 5 promotes tumor angiogenesis and activates the Il6/Stat3/Vegfa pathway in hepatocellular carcinoma. *Biomed Pharmacother*; 106:68-76.

Park, J.R., Ahn, J.H., Jung, M.H., Koh, J.S., Park, Y., Hwang, S.J. ve ark. (2016).

Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- δ Agonist on Cardiac Healing after Myocardial Infarction. *PLoS ONE*; 11(2):e0148510. doi:10.1371/journal.pone.0148510.

Perusek, L. ve Maeda, T. (2013). Vitamin A Derivatives as Treatment Options for

Retinal Degenerative Diseases. *Nutrients*; 5, 2646-2666; doi:10.3390/nu5072646.

Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F.T., Douglas, S.H., Field, S.L. ve ark. (2003).

Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology*; 3.

Saika, S., Yamanaka, O., Okada, Y., Miyamoto, T., Kitano, A., Flanders, K.C.,

Ohnishi, Y., Nakajima, Y., Kao, W.W. ve Ikeda, K. (2007). Effect of overexpression of PPARgamma on the healing process of corneal alkali burn in mice. *Am J Physiol Cell Physiol*: 293(1):75-86.

Salman, A.G. ve Mansour, D.E. (2011). The recurrence of pterygium after different

modalities of surgical treatment. *Saudi Journal of Ophthalmology*; 25, 411–415.

- Schachtrup, C., Emmler, T., Bleck, B., Sandqvist, A. ve Spener, F. (2004).** Functional analysis of peroxisome-proliferator-responsive element motifs in genes of fatty acid-binding proteins. *The Biochemical journal*; 382(Pt 1):239-45.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. (2008).** Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.*;3(6):1101-1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
- Schug, T.T., Berry, D.C., Toshkov, I.A., Cheng, L., Nikitin, A.Y. ve Noy, N. (2008).** Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from PPARbeta/delta to RAR. *Proc Natl Acad Sci; U.S.A* 105:7546-7551.
- Seifi, M., Ghasemi, A., Heidarzadeh, S., Khosravi, M., Namipashaki, A., Soofiany, V.M., Khosroshahi, A.A. ve Danaei, N. (2012).** Overview of Real-Time PCR Principles. *Polymerase Chain Reaction*; 405-442
- Sha, X., Liu, Z., Song, L., Peng, J. ve Xie, L. (2014).** Inhibition of α -smooth muscle actin expression and migration of pterygium fibroblasts by coculture with amniotic mesenchymal stem cells. *Current Eye Research*; 1–9.
- Smathers, R.L. ve Petersen, D.R. (2011).** The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. *Human genomics*; 5(3):170-91.
- Spandidos, D.A., Sourvinos, G., Kiaris, H., ve Tsampralakis, J. (1997).** Microsatellite instability and loss of heterozygosity in human pterygia. *British Journal of Ophthalmology*; 81:493–496.
- Tahrin, M. ve Ping-Chang, Y. (2012).** Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N am j med sci.*; 4(9):429-434.

- Von Lintig, J., Kiser, P.D., Golczak, M. ve Palczewski, K. (2010).** The biochemical and structural basis for trans-to-cis isomerization of retinoids in the chemistry of vision. *Trends in biochemical sciences*; 35:400-410.
- Vreeland, A.C. (2015).** Cellular Retinoic Acid-Binding Protein 2 Cooperates With HuR To Stabilize Rna And Inhibit Tumor Growth. Department of Pharmacology. Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy; Case Western Reserve University.
- Vreeland, A.C., Yu, S. Levi, L., Rossetto, D.B. ve Noy, N. (2014).** Transcript stabilization by the RNA-binding protein HuR is regulated by cellular retinoic acid-binding protein 2. *Mol. Cell. Biol.* Doi; 10.1128/MCB.00281-14.
- Wanzeler, A.C.V., Barbosa, I.A.F., Bruna Duarte, Borges. D., E.B., Danielle Kamiji1, Huarachi, D.R.G., Barbosa de Melo, M. ve Alves, M. (2019).** Mechanisms and biomarker candidates in pterygium development. *Arq Bras Oftalmol*; 82(6):528-36.
- Xu Y.X., Zhang, L.Y., Zou, D.L., Liu, Z.S., Shang, X.M., Wu, H.P., Zhou, Y., He, H. ve Liu, Z.G. (2014).** Differential expression and function of survivin during the progress of pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; 55:8480–8487. DOI:10.1167/iovs.14-15715
- Zhang, S., Liu, H., Li, H., Wu, M.L., Yu, Y., Lia, F.Z. ve Cheng, X.X. (2018).** Differential CRABP-II and FABP5 expression patterns and implications for medulloblastoma retinoic acid sensitivity. *RSC Adv.*; 8, 14048–14055.
- Zou, Y. ve Zhang, M. (2010).** Inhibitory Effect of PPAR γ Agonist on the Proliferation of Human Pterygium Fibroblasts. *J Huazhong Univ Sci Technol*; 30(6).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyad: Sümeyya Deniz AYBEK

Doğum Yeri: MERKEZ/TOKAT

Doğum Tarihi: 01.06.1991

Yabancı Dili: İngilizce-Almanca

Mail: sumeyyadenizcelik@gmail.com

Eğitim Durumu

Doktora: 2016- devam TOGÜ/ Tıp Fakültesi/Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans: 2013-2015 TOGÜ/ Tıp Fakültesi/Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Lisans: 2009- 2013 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi/Biyoloji Bölümü

Projeler

| Proje No | Projedeki Görevi | Proje Adı | Başlama-Bitiş Tarihi | Destek Miktarı (TL) |
|---------------------------------------|------------------|---|---------------------------|---------------------|
| 215S692 TUBİTAK 1001 PROJESİ | Bursiyer | Pterijumlu hastalarda retinoik asit sinyal yolağı ile ilişkili genlerin araştırılması | 01/06/2016- 01/11/2018 | 376.700,00 |
| 2015/59 BAP | Araştırmacı | Akut Bronşiolitli bebeklerde Sürfaktan Protein A ve D gen polimorfizminin araştırılması | 2015-2017 | 12.000,00 |

Makaleler**Uluslararası SCI Dergiler**

Celik, S.D., Ates, O. Analysis of CRABP2 and FABP5 genes in primary and recurrent pterygium tissues. *Mol Biol Rep* 47, 6105–6110 (2020).

Sumeyya Deniz Celik and Omer Ates. Genetic analysis of interleukin 18 gene polymorphisms in alopecia areata. *J Clin Lab Anal.* 2018;32:e22386.

Nursal AF, Turkmen E, Uzun Kaya S, Tekcan A, Sezer O, **Celik SD**, Yigit S. Angiotensin Converting Enzyme Gene Insertion/Deletion Variant and Familial Mediterranean Fever-related Amyloidosis. *Iran J Kidney Dis.* 2018 May;12(3):150-155.

Ulusal Dergiler

Nihan Bozkurt, **Sümeyya Deniz Çelik**, Ömer Ateş, Saime Sezer Sondaş, Emel Ensari, Göknur Kalkan. Alopesi Areata’da IL–17 Promotör Polimorfizminin (-152 G/A) Araştırılması Investigation of IL–17 promoter polymorphism (-152 G/A) in alopecia areata. *TOGÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2018;10 (4): 157-165.